

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED IBN
ABDALLAH
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL
MEHRAZ
FES

جامعة سيدي محمد بن عبد الله
كلية العلوم ظهر المهرارز
فاس

**THESE DE DOCTORAT NATIONALE EN BIOLOGIE
SPECIALITE : PHYTOPATHOLOGIE**

SOUS LE THEME :

**CARACTERISATION DE POPULATIONS DE
PHYTOPHTHORA INFESTANS (MONT.) DE BARY
DANS LA REGION DE SAÏS**

Présenté publiquement le 17 juillet 2003

par Mr. **ABDELHADI HAMMI**

devant le jury :

Président : Pr. D. Bouya Fac. Sc. Fès

Rapporteurs : Pr. Y. Msatef Fac. Sc. Fès
Pr. A. Douira Fac. Sc. Kénitra
Pr. D. Bouya Fac. Sc. Fès

Examineurs : Pr. M. N. Serrhini E. N. A. Meknès
Pr. A. Bennani Fac. Sc. Meknès
Mr. A. El Ismaili Sev. Rég. Pro. Vèg. Fès
Pr. A. Khalid Fac. Sc. Oujda

ABREVIATIONS

HR	Humidité relative
PP	Milieu de culture à base de petits pois
H	Milieu de culture à base d'haricot
PC	Milieu de culture à base de pois chiche
SG	Milieu de culture à base de seigle
NB	Milieu de culture à base de nibier
CMA	Corn meal agar
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
CI₅₀	Dose du fongicide qui réduit la croissance mycélienne <i>in vitro</i> ou la capacité de sporulation <i>in vivo</i> de moitié
CI₁₀₀	Dose du fongicide qui inhibe complètement la croissance mycélienne <i>in vitro</i> ou la capacité de sporulation <i>in vivo</i>
FRAC	Fungicide Resistance Action Comitee
FR	Facteur de résistance
SM	Sensibilité au métalaxyl
MSM	Moyennement Sensibilité au métalaxyl
MRM	Moyennement résistant au métalaxyl
RM	Résistant au métalaxyl
AC	Localité de Ain-Cheggag
F	Localité de Fès
MK	Localité de Meknès
TS	Type sexuel
CMT	Croissance mycélienne <i>in vitro</i>
IST	Intensité de sporulation <i>in vitro</i>
TGD	Taux de germination directe
IGI	Intensité de germination indirecte
PL	Période de latence
DL	Dimension des lésions
ISV	Intensité de sporulation <i>in-vivo</i>
INC	Incidence de la maladie
ESP	Extrait de sol de la pomme de terre
ERP	Extrait des racines de la pomme de terre
IFC	Infusion de fumier frais de cheval
IFM	Infusion de fumier frais de mouton

MS	Milieu synthétique
CMO1	Culture mono-oospore 1
CMO2	Culture mono-oospore 2
C1, C2,, C15	Cultures mono-zoospores issues la souche mono-oosporale CMO1
M1, M2,, M15	Cultures mono-zoospores issues de la souche mono-oosporale
S1, S2,, S15	Cultures mono-zoospores issues l'isolat parental S1F27
F1, F2,, F15	Cultures mono-zoospores issues de l'isolat parental S2F18
VCL	Vitesse de la croissance des lésions
PI	Période d'incubation
IS	Intensité de sporulation
TSN	Taux de la croissance des nécroses
VCN	Vitesse de la croissance des nécroses
Pr N	Profondeur de la nécrose
ASCPM	Aire sous la courbe de la progression de la maladie

Liste des figures

	Titre des figures	Page
Figure 1	Aspect du mildiou sur tige de pomme de terre	4
Figure 2	Aspect de mildiou sur feuilles de pomme de terre	4
Figure 3	Aspect interne et externe d'un tubercule de la pomme de terre infecté par <i>Phytophthora infestans</i>	4
Figure 4	Cycle de vie de <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary	9
Figure 5	Dispositif des croisements des isolats sur milieu à base de petit pois pour déterminer leur types sexuels	30
Figure 6	Evolution de l'incidence moyenne et la sévérité moyenne de la maladie dans les différentes localités de la région de Saïs durant la campagne agricole 1997-1998	39
Figure 7	Fréquence de la maladie dans les différentes localités du Saïs pendant la campagne agricole 1997-1998	40
Figure 8	Relation entre l'incidence et la sévérité de la maladie dans le Saïs au cours de la campagne agricole 1997-1998	40
Figure 9	Diamètre des colonies mycéliennes de <i>P. infestans</i> sur différents substrats 5 et 10 jours après incubations à 20°C et à l'obscurité	45
Figure 10	Vitesse de la croissance mycélienne selon le type de substrat	45
Figure 11	Survie du mycélium de <i>P. infestans</i> sur différents substrats	46
Figure 12	Aspects des colonies mycéliennes âgées de 10 jours des isolats de <i>P. infestans</i>	48
Figure 13	Aspects des colonies mycéliennes âgées de 10 jours de deux isolats de types sexuels différents	49
Figure 14	Croissance mycélienne d'un isolat de <i>P. infestans</i> collecté de la pomme de terre sur milieu à base de petits pois amendé de différentes concentrations du métalaxyl	52
Figure 15	Disques de feuilles de la pomme de terre inoculés par <i>P. infestans</i> et exposés à différentes concentrations du métalaxyl	56
Figure 16	Croissance mycélienne des isolats selon leur origine	60
Figure 17	Distribution des isolats selon leur croissance mycélienne	60
Figure 18	Croissance mycélienne des isolats selon leurs phénotypes	62
Figure 19	Croissance mycélienne des isolats selon leur types sexuels	62
Figure 20	Sporanges caractéristiques de <i>P. infestans</i>	63
Figure 21	Sporulation <i>in vitro</i> des isolats selon leur origine	64
Figure 22	Distribution des isolats selon leur capacité de sporulation <i>in vitro</i> sur milieu petits pois	65
Figure 23	Sporulation <i>in vitro</i> des isolats selon leur phénotypes	66
Figure 24	Sporulation <i>in vitro</i> des isolats selon leur types sexuels	66
Figure 25	Distribution des isolats selon le pouvoir de germination directe	68

	des sporocystes	
Figure 26	Germination directe des isolats selon leur origine	68
Figure 27	Germination directe des isolats selon leur phénotypes	69
Figure 28	Germination directe des sporocystes des isolats selon leur types sexuels	69
Figure 29	Classes des isolats selon la quantité de zoospores libérées après 3 h d'incubation à 4°C et à l'obscurité	71
Figure 30	Germination indirecte des isolats selon leur localité d'origine	71
Figure 31	Germination indirecte des sporocystes des isolats selon leur phénotypes	72
Figure 32	Germination indirecte des isolats selon leur types sexuels	72
Figure 33	Distribution des isolats selon leur périodes de latence enregistrées sur le feuillage des variétés de pomme de terre testées	74
Figure 34	Temps de latence des isolats selon leur origine	76
Figure 35	Périodes de latence des isolats selon leur phénotypes sur les 4 variétés de pomme de terre et la variété de tomate Daniela	77
Figure 36	Périodes de latence des isolats selon leur types sexuels	78
Figure 37	Lésions développées par un isolat issu de la pomme de terre sur le feuillage des 5 variétés testées	80
Figure 38	Distribution des isolats de <i>P. infestans</i> selon les dimensions des lésions développées sur les 5 variétés de pomme de terre et de tomate testées	81
Figure 39	Dimensions des lésions développées sur le feuillage des variétés de pomme de terre et tomate par les isolats selon leur origine	82
Figure 40	Dimensions des lésions développées sur le feuillage des variétés testées par les isolats selon leur phénotypes	84
Figure 41	Dimensions des lésions développées sur le feuillage des 5 variétés par les isolats selon leur types sexuels	85
Figure 42	Distribution des isolats selon leur intensités de sporulation sur le feuillage des variétés de pomme de terre et de tomate	87
Figure 43	Sporulation <i>in vivo</i> des isolats sur le feuillage des variétés de pomme de terre et de tomate selon leur origine	88
Figure 44	Sporulation des isolats sur le feuillage des variétés de pomme de terre et de tomate selon leur phénotypes	90
Figure 45	Sporulation <i>in vivo</i> des isolats sur le feuillage des 5 variétés selon leur type sexuels	91
Figure 46	Principaux stades de la reproduction sexuée	118
Figure 47	Oospores produites sur milieu à base de petit pois	122
Figure 48	Evaluation de l'effet du métalaxyl sur la fertilité <i>in vitro</i> des différents croisements sur le milieu petits pois	125

Figure 49	Oogones, anthéridies et oospores produites sur feuille de la pomme de terre	128
Figure 50	Disques de feuilles de la variété Désirée inoculés par des suspensions mixtes de sporanges de deux isolats interfertiles pour l'induction de la reproduction sexuée	129
Figure 51	Fertilité <i>in vivo</i> des croisements exposés à différentes concentrations du métalaxyl (Inoculation et exposition au métalaxyl simultanées)	136
Figure 52	Fertilité <i>in vivo</i> des croisements exposés aux différentes concentrations du métalaxyl (exposition au métalaxyl après 5 jours d'inoculation)	138
Figure 53	Germination des oospores de <i>P. infestans</i>	141
Figure 54	Germination des oospores sur différents substrats	145
Figure 55	Germination des oospores sur différents substrats naturels et synthétique	145
Figure 56	Influence de la température et la durée de stockage des oospores sur leur germination	145
Figure 57	Germination des oospores issues de 8 croisements et âgées de 2 mois	147
Figure 58	Germination des oospores produites dans quatre croisements après ou sans transit dans le tube digestif de l'escargot	149
Figure 59	Effet du métalaxyl sur la germination des oospores	151
Figure 60	Aspects des colonies mycéliennes des deux isolats parentaux (S2F18 et S1F27) et leur descendance sexuée (CMO1 et CMO2)	155
Figure 61	Lésions développées par les deux isolats parentaux (S2F18 et S1F27) et les deux souches sexuées (CMO1 et CMO2)	156
Figure 62	Aspects des colonies des cultures mono-zoospores issues de la souche mono-oospore CMO1	158
Figure 63	Diamètres des colonies mycéliennes relevés dans chacun des groupes de souches mono-zoospores issues de la reproduction asexuée et sexuée	164
Figure 64	Distribution des souches mono-zoospores selon leur niveau de sensibilité au métalaxyl	165
Figure 65	Plants de la pomme de terre de différentes variétés cultivées dans des pots et testées vis à vis de <i>P. infestans</i> sous tunnel	179
Figure 66	Réactions de deux plants de pomme de terre vis à vis de <i>P. infestans</i> : l'un sensible est totalement détérioré (à gauche : Fabula) l'autre résistant (à droite : Cicéro)	179
Figure 67	Lésions développées sur le feuillage des 16 cultivars après 7 jours d'inoculation par <i>P. infestans</i> sous tunnel	182
Figure 68	Nécroses développées sur les fragments des tubercules des différents cultivars de la pomme de terre après 7 jours	190

	d'inoculation par <i>P. infestans</i>	
Figure 69	Les ASCPM des variétés de la pomme de terre déterminées sous tunnel	194

Liste des tableaux

	Titre des tableaux	Page
Tableau 1	Chronologie d'apparition du type sexuel A2 dans différents pays du monde	12
Tableau 2	Dénomination et origine des isolats de <i>P. infestans</i>	42
Tableau 3	Pourcentages d'isolements de <i>P. infestans</i> à partir des tissus infectés provenant de 4 régions	43
Tableau 4	Groupement des 108 isolats selon leur type sexuels	50
Tableau 5	Distribution des types sexuels selon les régions	51
Tableau 6	Distribution des isolats dans les différentes localités selon leurs CI₅₀ déterminées <i>in-vitro</i>	53
Tableau 7	Distribution des isolats dans les différentes localités selon leurs CI₁₀₀ déterminées <i>in-vitro</i>	54
Tableau 8	Distribution des isolats dans les différentes localités selon leurs niveaux de sensibilité <i>in-vitro</i> au métalaxyl	54
Tableau 9	Distribution des classes des phénotypes(type sexuel + résistance au métalaxyl) dans les différentes localités	55
Tableau 10	Distribution des isolats dans les différentes localités selon leurs CI₅₀ déterminées <i>in-vivo</i>	57
Tableau 11	Distribution des isolats dans les différentes localités selon leurs CI₁₀₀ déterminées <i>in-vivo</i>	57
Tableau 12	Distribution des isolats dans les différentes localités selon leur sensibilité <i>in-vivo</i> au métalaxyl	57
Tableau 13	Distribution des isolats dans les différentes localités selon leur type sexuel et leur sensibilité <i>in-vitro</i> au métalaxyl	58
Tableau 14	Coefficients de corrélations des paramètres utilisés pour la caractérisation des isolats	92
Tableau 15	Evaluation de la fertilité de six croisements menés sur le milieu petits pois et mensurations des organes sexués produits	120
Tableau 16	Fertilité de quatre croisements sur des milieux différents (Nombre d'oospores/mm³)	123
Tableau 17	Production des oospores sur les folioles entières et sur les disques de feuilles de la variété de pomme de terre Désirée	130
Tableau 18	Fertilité de sept croisements sur les différents organes	132

	des deux hôtes principaux de <i>P. infestans</i>	
Tableau 19	Fertilité de quatre croisements sur des variétés de pomme de terre ayant des sensibilités différentes	134
Tableau 20	Effet de la lumière sur la germination des oospores après 2, 3, 5, 10 jours d'incubation à 20°C	140
Tableau 21	Caractéristiques des isolats parentaux et les cultures mono-zoospores sexuées et asexuées	160
Tableau 22	Paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage des 16 variétés de pomme de terre commercialisées testées	183
Tableau 23	Coefficients de corrélation entre les paramètres d'évaluation de la sensibilité de feuillage des variétés testées	185
Tableau 24	Paramètres d'évaluation de la sensibilité des tubercules des 16 variétés de pomme de terre testées	187
Tableau 25	Coefficients de corrélation entre les différents paramètres d'évaluation de la sensibilité des tubercules	191
Tableau 26	Coefficients de corrélation entre les paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage et ceux des tubercules de chacune des variétés testées	192
Tableau 27	Coefficients de corrélation entre les paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage et ceux des tubercules pour l'ensemble des variétés testées	193

Resumé

Le présent travail a montré que les attaques du mildiou de la pomme de terre causées par *P. infestans* dans la région du Saïs peuvent être sévères au niveau du feuillage lorsque l'infection est précoce et les conditions climatiques sont favorables. Ainsi, les incidences, les sévérités et les fréquences enregistrées dans cette région ont été remarquablement élevées pendant la campagne agricole 1997-1998.

La caractérisation de 108 isolats provenant de la pomme de terre et de tomate, collectés de différentes localités de la région de Saïs a révélé une grande variabilité dans la population de *P. infestans* collectées. Cette variabilité réside essentiellement en la coexistence des deux types sexuels A1 et A2 dans la même parcelle ou dans des parcelles différentes et par l'émergence d'isolats résistants au métalaxyl (18% *in vitro* et 10% *in vivo*). Ainsi, les isolats collectés de la pomme de terre, ceux provenant de la région de Ain-Cheggag, ceux résistants au métalaxyl et ceux de type sexuel A2 possèdent des caractéristiques biologiques et épidémiologiques plus importantes que celles des autres isolats en terme de la croissance mycélienne *in vitro*, la capacité de sporulation *in vitro*, la germination directe et indirecte des sporocystes et le pouvoir pathogène.

La capacité des isolats à produire les oospores est confirmée *in-vivo* après des inoculations artificielles de différents tissus de la pomme de terre et de la tomate par des confrontants interfertiles. Cette production dépend de plusieurs facteurs, à savoir le type d'hôte (pomme de terre ou tomate), les organes végétaux, le niveau de la sensibilité des variétés (pomme de terre), le type de croisement et le niveau de résistance au métalaxyl. Les taux de germination des oospores peuvent atteindre les 25%. Ce taux de germination dépend aussi de certains facteurs tels que le milieu de germination, le type de croisement, la durée et la température du stockage et l'exposition au métalaxyl et au tube digestif de l'escargot.

Nous avons constaté par ailleurs qu'aucune infection n'est obtenue sur les différents tissus végétaux de la pomme de terre après incubation dans le sol naturellement ou artificiellement inoculés par des oospores de *P. infestans*. Néanmoins, la mise en culture des oospores produites *in vitro* a permis d'obtenir deux cultures mono-oospores dont l'agressivité est comparable à celle de l'un des isolats parentaux. La nature recombinante de ces deux souches mono-oospores s'avère possible. Une tendance vers une performance des souches mono-zoospores issues de la reproduction sexuée par rapport à celles issues de la reproduction asexuée est relevée en utilisant certains paramètres de caractérisation.

L'évaluation du niveau de sensibilité de 16 variétés de pomme de terre a montré que la majorité de ces variétés possèdent des feuillages et des tubercules sensibles à moyennement sensibles vis à vis des nouvelles souches locales de *P. infestans*. Il n'existe souvent pas de corrélation entre le niveau de résistance du feuillage et celui des tubercules pour presque toutes les variétés.

Mots clés : *Phytophthora infestans*, Pomme de terre, Tomate, Epidémiologie, Reproduction sexuée, oospores, Résistance au métalaxyl, Sensibilité des cultivars.

Abstract

The present study has showed that epidemics of potato late blight caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Saïs and Middle Atlas region can be destructive of the potato foliage if the disease appears early and the weather is favorable during some agricol seasons. This is demonstrated by the high severity, incidence and frequency values of the infection recorded during the agricol season of 1997-1998.

One hundred and eight isolates of the pathogen obtained from potato and tomato plots which are situated in different localities of the Saïs and Middle Atlas region were assessed for their biological and epidemiological characteristics by using different parameters. *P. infestans* populations in this region are characterized by the coexistence of the two mating types A1 and A2 which are collected from same or different potato and tomato plots. Thus, the mating type A2 was found in all the localities prospected. This study has also confirmed the emergency of the metalaxyl resistant isolates (18% *in vitro* and 10% *in vivo*). Moreover, the isolates collected from potato, those originated from the Ain-Cheggag locality, those with high level of metalaxyl resistance and those of mating type A2 appeared more performants than the other isolates.

The capacity of the isolates to produce oospores is confirmed and evaluated *in-vivo* after inoculations of different potato and tomato tissues by some fertile crosses. Thus, this production depends on some factors : the hote type, the vegetal organ types, the sensibility level of potato cultivars to late blight, the type of crosses and the metalaxyl resistance level of the confronted isolates. This study has also showed that a maximum of 25% of oospores produced *in vitro* were able to germinate. Thus, this germination depends on the germination medium, the confrontation types, the periode and temperature of storage of oospores, the metalaxyl exposition and the transit through the digestive tube of snail.

Meanwhile, no infection was observed when different potato tissues were incubated into soil samples either naturally or artificially infected by *P. infestans* oospores. Nevertheless, two mono-oospore strains has showed an aggressivity level relatively identic to these of the parent isolates, but the real genetic origin of these mono-oospores cultures was not determined. By using some characterization parameters, this study revealed that the mono-zoospore strains descended from sexual reproduction has a tendency to a performance than those descended from asexual reproduction .

The screening test of sensibility of 16 potato cultivars revealed that the foliage and tubers of the majority of these cultivars were classed from highly susceptibles to moderately susceptibles. One cultivar (Cicero) possess a highly resistant foliage. However, there isn't often any correlation between the foliage and tubers resistance level for the most of the cultivars assessed.

key words : *Phytophthora infestans*, Potato, Tomato, Epidemiology, Sexual reproduction, Oospores, Metalaxyl resistance, Cultivars sensibility

ملخص

أوضحت هذه الدراسة أن الإصابة بمرض البياض الزغبي (أو الميليديو) الذي يسببه الفطر *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary والذي يصيب البطاطس و الطماطم, يمكن أن تكون خطيرة في منطقة سايس إذا كانت الإصابة مبكرة والأحوال الجوية ملائمة لانتشارها.

خلال هذه الدراسة تم عزل 108 فصيلة *P. infestans* من مجموعة من الحقول المزروعة بالبطاطس و الطماطم. أوضحت معاينة خصائص هذه الفصائل الفطرية إلى وجود تغيرات كبيرة من أهمها وجود الجنسين معا A1 و A2 اما داخل نفس البستان أو في بساتين مختلفة. كذلك لاحظنا انتشار فصائل مقاومة للمبيد الفطري Métalaxyl وهكذا فإن الفصائل التي تم عزلها من البطاطس, أو التي عزلت من حقول منطقة عين شكاك ١ و تلك المقاومة للمبيد Métalaxyl أو الفصائل ذات الجنس من نوع A2 تتوفر على خصائص بيولوجية و ابدميولوجية أكثر أهمية من الفصائل الأخرى.

أظهرت هذه الدراسة على أن المجابهات الاصطناعية بين الفصائل الفطرية المتجانسة جنسيا على أعضاء نباتية للبطاطس و الطماطم نتج عنها تكون بويضات الفطر. أهمية هذا التكون يرتكز على نوع النبات والأعضاء النباتية المستعملة لهذا الغرض, وعلى مدى مقاومة أنواع البطاطس للمرض, وعلى نوع المجابهة, وعلى مدى مقاومة الفصائل الفطرية للمبيد Métalaxyl.

وأبانت هذه الدراسة أيضا على أن حوالي 25% من البويضات الفطرية قابلة للإنبات, ويتطلب هذا الإنبات مجموعة من الظروف منها الوسط المعد لهذه العملية, نوع المجابهة التي كونت البويضات, مدة وحرارة تخزين البويضات و كذلك مرور هذه الأخيرة عبر أحشاء الحلزون.

من ناحية أخرى لم تؤكد هذه الدراسة على مدى ضلوع التربة كمصدر ممرض بعد ما تم استعمال تربة مريضة طبيعيا أو تلك التي تم تمييزها اصطناعيا ببويضات الفطر. لكن بالمقابل أكدت هذه الدراسة على أن المفحوصتين الفطريتين المنحدرتين من البويضات (souches mono-oospores) بإمكانهما التسبب في إصابة البطاطس بالمرض بطريقة مشابهة للفصيلتين الأبوين, فيما يخص الأصل الجنسي الحقيقي لهاتين المفحوصتين الفطريتين فقد يكونا كلاهما نتيجة للتوالد الجنسي بين الفصيلتين الأبوين. و تبين كذلك أن المفحوصات الفطرية (souches mono-zoospores) المتكونة عن طريق التوالد الجنسي تتوفر نسبيا على خصائص مميزة بالمقارنة مع تلك الناتجة عن التوالد لا جنسي.

أكدت هذه الدراسة أيضا أن معظم أنواع البطاطس الستة عشر التي تم تقييم درجة حساسيتها للفطر تتوفر على أوراق و بطاطس مقاومتها تنحصر بين جد ضعيفة إلى مقاومة متوسطة, فقط النوع Cicéro هو الذي تتوفر أوراقه على مقاومة قوية للمرض. كذلك لم يلاحظ في أغلب الأحيان على أي تقارب أو تشابه بين مدى مقاومة الأوراق و تلك الخاصة بالبطاطس.

الكلمات المفتاحية : *Phytophthora infestans* ، البطاطس ، الطماطم ، التوالد الجنسي، البويضات، مقاومة المبيد Metalaxyl ، مقاومة المرض

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Aperçu historique de la maladie du mildiou.....	3
II- Symptomatologie.....	3
III- Facteurs affectant l'évolution de la maladie.....	3
III- 1- Facteurs climatiques.....	5
III- 2- Facteur de sol.....	5
III- 3- Prédisposition de l'hôte.....	6
IV- Agent pathogène.....	7
IV- 1- Description morphologique.....	7
IV- 2- Position taxinomique	7
IV- 3- Gamme d'hôtes.....	7
IV- 6- Cycle de vie.....	8
IV- 7- Sources d'inoculum primaires et modes de conservation.....	8
V- Caractérisation biologiques et biochimiques des populations de <i>P. infestans</i>	10
V- 1- Croissance mycélienne <i>in-vitro</i>	10
V- 2- Facteurs de virulence: "Race pathogénique ".....	10
V- 3- Compatibilité sexuelle: "Mating type"	11
V- 4- Résistance aux inhibiteurs.....	11
V- 5- Les allozymes.....	13
V- 6- AND génomique.....	14
V- 7- ADN mitochondrial.....	14
VI- Mécanismes évolutionnaires chez <i>P. infestans</i>	14
VI- 1 Migration.....	14
VI- 2- hétérocaryose.....	15
VI- 3- La recombinaison somatique.....	15
VI- 4- Hybridation interspécifique.....	15
VI- 5- La recombinaison sexuelle.....	16
VI- 5- 1- Influence de certains facteurs sur la production des oospores Chez <i>Phytophthora</i>	16
VI- 5- 1- 1 - Les exigences trophiques.....	16
VI- 5- 1- 2 - Les facteurs physico-chimiques.....	16
VI- 5- 1- 3 - Génotypes des hôtes.....	17
VI- 5- 2 - Survie des oospores.....	17
VI- 5- 3- Germination des oospores.....	18
VI- 5- 3- 1- Morphologie de la germination.....	18
VI- 5- 3- 2- Effets de certains facteurs sur la germination des oospores.....	18
VI- 5- 4- Infectivité des oospores.....	20
VII- Eléments de la lutte intégrée de la maladie.....	20
VII- 1- Techniques prophylactiques.....	20
VII- 2- Modèles de prévisions des épidémies.....	21
VI- 3- Lutte chimique.....	21
VII- 4- Résistance variétale.....	22
VII- 5- Autres méthodes de lutte.....	23

Chapitre II : CARACTERISATION DES ISOLATS DE *P. INFESTANS*

INTRODUCTION.....	24
MATERIELS & METHODES.....	25
I- Prospections et évaluation de l'importance du mildiou dans la zone étude.....	25
II- Collecte des échantillons	25
III- Isolements de l'agent pathogène.....	26
III- 1 - Préparation des milieux de culture.....	26
III- 3- Techniques d'isolements.....	27
III- 3- 1- Isolement directe.....	27
III- 3- 2- Isolement indirect (par appât).....	28
III- 4- Identification du pathogène.....	29
III- 5 Test de pathogénicité des isolats.....	29
III- 6- Maintenance de la pathogénicité des isolats.....	29
IV- Caractérisation des isolats collectés.....	30
IV- 1- Détermination des types sexuels des isolats.....	30
IV- 2- Etude des niveaux de sensibilité des isolats au métalaxyl.....	31
IV- 2- 1- Essai <i>in-vitro</i>	31
a/ Préparation de la solution du fongicide.....	31
b/ Conditions d'inoculation et d'incubation.....	31
c/ Lecture des résultats.....	31
IV- 2- 2- Essai <i>in-vivo</i>	32
a/ Matériel fongique.....	32
b/ Préparation de la solution du métalaxyl.....	33
c/ Préparation du tissu végétal.....	33
d/ Conditions d'inoculation et d'incubation.....	33
c/ Lecture des résultats.....	33
IV- 3- Croissance mycélienne sur petits-pois <i>in-vitro</i>	34
IV- 4- Intensité de sporulation <i>in-vitro</i>	34
IV- 5- Etude du pouvoir germinatif des sporanges.....	34
IV- 5- 1- Germination directe.....	34
IV- 5- 2- Germination indirecte.....	35
IV- 6- Evaluation de l'agressivité des isolats.....	35
IV- 6- 1- Matériel végétal.....	35
IV- 6- 2- Matériel fongique.....	35
IV- 6- 3- Inoculation et incubation.....	36
IV- 6- 4- Lecture des résultats.....	36
a/ Temps de latence.....	36
b/ Dimension de la lésion.....	36
c/ Sporulation.....	36
IV- 7- Modalités de l'étude comparative de la variabilité de la population de <i>P. infestans</i>	36
IV- 8- Analyses statistiques.....	37

RESULTATS.....	38
I- Importance de la maladie au cours des prospections réalisées.....	38
II- Isolements et vérification de la pathogénicité des isolats collectés.....	41
II- 1- Isolements.....	41
II- 2- Sélection du milieu de culture du <i>P. infestans</i>	41
II- 3- Effet de substrat sur la survie du mycélium.....	44
II- 4- Pathogénicité des isolats.....	47
III- Caractérisation des isolats collectés.....	47
III- 1- Détermination des morphotypes.....	47
III- 2- Groupement des isolats selon leur type sexuel.....	50
III- 3- Niveaux de sensibilités des isolats au métalaxyl	51
III- 3- 1- <i>In-vitro</i>	51
III- 3- 2- <i>In-vivo</i>	55
III- 4- Croissance mycélienne des isolats sur petits pois.....	59
III- 5- Intensité de sporulation <i>in-vitro</i>	62
III- 6- Germination des sporocystes.....	66
III- 6- 1- Germination directe.....	66
III- 6- 2- Germination indirecte.....	66
III- 7- Pouvoir d'agressivité des isolats.....	72
III- 7- 1- Période de latence.....	72
III- 7- 2- Dimension de la lésion.....	78
III- 7- 3- Intensité de sporulation.....	85
IV- Corrélations entre les différents caractères étudiés.....	88
 DISCUSSION.....	 92

Chapitre III : INDUCTION DE LA REPRODUCTION SEXUEE & ESSAIS SUR LA GERMINATION DES OOSPORES DE *P. INFESTANS*

INTRODUCTION.....	99
 MATERIELS & METHODES.....	 101
I- Etude de la fertilité des croisements in-vitro.....	101
I- 1- Fertilité de différents croisements sur milieu PP.....	101
a/ Croisements testés.....	101
b/ Inoculation et incubation.....	101
c/ Dénombrement des oospores.....	101
I- 2- Estimation de la fertilité en fonction de milieu de culture.....	101
I- 3- Effet du métalaxyl sur la production <i>in-vitro</i> des oospores	102
a / Préparation de milieu amendé de métalaxyl.....	102
b / Croisement testés.....	102
II- Induction de la reproduction sexuée in-vivo.....	102
II- 1- Fertilité sur le feuillage de la variété de la pomme de terre Désirée.....	102
a/ Croisements testés.....	102
b/ Préparation de matériel végétal.....	103

c/ Inoculation et incubation.....	103
d/ Préparation des tissus végétaux pour les observations microscopiques.....	103
e/ Dénombrement des oospores	104
II- 2- Evaluation de la fertilité sur des organes végétaux différents.....	104
a/ Matériel fongique.....	104
b/ Préparation des tissus végétaux.....	104
c/ Inoculation et incubation.....	105
d/ Dénombrement des oospores.....	105
II- 3- Effet de la sensibilité des variétés de pomme de terre sur la fertilité.....	105
II- 4- Effet du métalaxyl sur la fertilité <i>in-vitro</i>	106
a/ Matériel fongique.....	106
b/ Matériel végétal.....	106
c/ Solution du fongicide	106
d/ Inoculation et incubation.....	106
e/ Dénombrement des oospores.....	106
III-Essais de germination des oospores produites <i>in-vitro</i>	107
III- 1- Effet de la lumière.....	107
III- 1- 1- Préparation de la suspension des oospores.....	107
III- 1- 2- Incubation des oospores	107
III- 2- Effet du milieu de germination.....	107
III- 2- 1- Préparation des milieux de germination.....	108
III- 2- 2- Préparation et incubation de la suspension des oospores.....	108
III- 2- 3- Autres substrats naturels.....	109
III- 2- 4- Milieu synthétique S+L	109
III- 3- Effet de la température et la durée de stockage sur la germination	110
III- 4- Effet de type de croisement.....	110
III- 5- Effet du transit des oospores à travers le tube digestif de l'escargot sur leur germination.....	110
III- 6- Effet du métalaxyl sur la germination.....	111
IV- Etude de la Contribution des oospores dans les infections.....	111
IV- 1- Essais menés sur les sols infestés naturellement et artificiellement.....	111
IV- 1- Préparation du sol	111
IV- 1- 1- Sol naturellement infesté	111
IV- 1- 2- Sol artificiellement inoculé.....	112
a/ Désinfection du sol.....	112
b/ Préparation des suspensions des oospores.....	112
c/ Inoculation et incubation des sols.....	112
d/ Préparation de matériel végétal.....	112
IV- 2- Essais de cultures mono-oospores.....	113
IV- 2- 1- Préparation du milieu de culture sélectif.....	113
IV- 2- 2- Préparation des oospores et conditions d'incubation.....	113
IV- 3- Comparaison entre les cultures mono-zoospores issues de la reproduction asexuée et celles issues de la reproduction sexuée.....	114
IV- 3- 1- Préparation des cultures mono-zoospores.....	114
IV- 3- 2- Caractères de comparaison entre les cultures mono-zoospores.....	115

RESULTATS & DISCUSSION.....	116
I- Description des principaux stades de la phase sexuée chez <i>P. infestans</i>	116
II- Stabilité des isolats autofertiles.....	116
III- Fertilité des croisements <i>in-vitro</i>.....	119
III- 1- Evaluation de la fertilité sur milieu de culture PP.....	119
III- 2- Evaluation de la fertilité sur milieux de culture différents.....	120
III- 3- Effet du métalaxyl sur la fertilité <i>in-vitro</i>.....	123
IV- Induction de la reproduction sexuée <i>in-vivo</i>.....	125
IV- 1- Test de fertilité sur les feuilles de la variété de pomme de terre Désirée.....	126
IV- 1- 1- Formation des oospores sur les folioles entiers....	126
IV- 1- 2- Production des oospores sur les disques de feuillage.....	126
IV- 2- Formation des oospores sur des organes différents des deux principaux hôtes.	130
IV- 3- Fertilité sur des variétés différentes de la pomme de terre.....	132
IV- 4- Effet du métalaxyl sur la production <i>in-vivo</i> des oospores.....	134
IV- 5- Production des oospores dans la nature.....	138
V- Essais de germination des oospores	139
V- 1- Effet de la lumière.....	139
V- 2- Effet du milieu de germination.....	141
V- 3- Effet de la température et la durée de stockage des oospores.....	143
V- 4- Effet du type de croisement.....	145
V- 5- Effet de l'exposition au tube digestif de l'escargot.....	147
V- 6- Effet du métalaxyl sur la germination des oospores.....	149
VI- Contribution des oospores dans le déclenchement des infections.....	151
VI- 1- Sol naturellement infecté.....	152
VI- 2- Sol artificiellement infecté.....	152
VII- Essais de cultures mono-oospores.....	153
VII- 1- Cultures mono-oospores réalisées.....	153
VII- 2- Caractérisation des souches sexuées et asexuées.....	156
VII- 2- 1- L'aspect des colonies mycéliennes.....	156
VII- 2- 2- Type sexuel.....	156
VII- 2- 3 - Croissance mycélienne.....	162
VII- 2- 4- Sensibilité au métalaxyl <i>in-vivo</i>.....	162
VII- 2- 5- Nature génétique probable des deux souches mono-oospores.....	167

Chapitre IV : EVALUATION DE LA SENSIBILITE DES VARIETES DE POMME DE TERRE VIS A VIS DES NOUVELLES SOUCHES DU PATHOGENE

INTRODUCTION.....	168
--------------------------	------------

MATERIELS & METHODES.....	170
--------------------------------------	------------

I- Préparation du sol.....	170
II- Matériel végétal.....	170
II- 1- Origine et caractéristiques agronomiques des cultivars.....	170
II- 2- Préparation du matériel végétal.....	171

II- 2- 1- Plants entiers	171
II- 2- 2- Tubercules.....	171
III- Préparation de l'inoculum	171
IV- Conditions d'inoculation et d'incubation.....	172
IV- 1- Plants entiers.....	172
IV- 2- Tubercules	172
V- Détermination des composantes de la résistance.....	172
V- 1- Les plants entiers.....	172
a/ Période de latence.....	172
b/ Incidence de la maladie.....	172
c/ Taux de croissance des lésions.....	172
d/ Période d'incubation.....	173
e/ Dimension de la lésion et intensité de sporulation.....	173
V- 2- Tubercules.....	173
a/ Temps de latence.....	173
b/ Incidence de l'infection.....	173
c/ Surface nécrosée.....	173
d/ Vitesse de la croissance de la nécrose.....	173
e/ Période d'incubation.....	173
f/ Intensité de sporulation.....	174
g/ Profondeur de la lésion.....	174
VI- Aire sous la courbe de la progression de la maladie (ASCPM).....	174
VI- 1- Inoculation et incubation des plants.....	174
VI- 2- Calcul de l'ASCPM.....	175
VII- Analyses statistiques	175

RESULTATS.....	176
I- Evolution de la maladie sur le feuillage des variétés.....	176
I- 1- Temps de latence et période d'incubation	176
I- 2- Incidence ou Intensité d'infection.....	178
I- 3- Vitesse de croissance des lésions développées sur le feuillage	178
I- 4- Dimensions des lésions.....	179
I- 5- Intensité de sporulation sur le feuillage.....	182
I- 6- Corrélation entre les paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage des variétés de pomme de terre.....	182
II- Evaluation de la sensibilité des tubercules au mildiou.....	183
II- 1- Temps de latence et période d'incubation.....	183
II- 2- Taux d'infection (ou incidence).....	184
II- 3- Sévérité : Surface nécrosée des fragments de tubercules	186
II- 4- Vitesse de la croissance de la nécrose.....	186
II- 5- Intensité de sporulation.....	186
II- 6- Profondeur de la lésion.....	187
II- 7- Corrélations entre les paramètres de la résistance des tubercules au mildiou	189
III- Corrélation entre les paramètres de la résistance du feuillage et des tubercules	190
IV- Aire sous la courbe de la progression de la maladie	191
V- Corrélation entre l'ASCPM et les paramètres	

d'évaluation de la résistance du feuillage	192
VI- Corrélation entre l'ASCPM et les paramètres	
d'évaluation de la résistance des tubercules.....	194
DISCUSSION.....	195
CONCLUSION GENERALE & RECOMMANDATIONS.....	199
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	204
ANNEXES	224

INTRODUCTION GENERALE

La pomme de terre représente l'une des principales cultures maraîchères au Maroc. Elle constitue 26 à 32 % des superficies réservées aux maraîchages. Cette superficie a évolué de 25137 ha en 1971 à 70.000 ha en 2000, alors que, le nombre de variétés cultivé au Maroc reste limité (Anonyme, 2002). Cependant, la superficie totale de cette culture a régressé durant certaines campagnes agricoles essentiellement à cause de la sécheresse. Dans les champs marocains, la pomme de terre peut faire l'objet d'attaques de plusieurs ravageurs tels que les pucerons, les thrips et la teigne et des maladies fongiques telles que l'alternariose, la pourriture grise et le mildiou (Hilali, 1987 ; El Ismaili, 1994 ; Laftah, 1997). Cette dernière constitue l'une des maladies les plus largement distribuées géographiquement lorsque les conditions climatiques sont favorables. Elle est causée par l'oomycète *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, une espèce hétérothallique avec deux types sexuels A1 et A2. Ces derniers coexistent depuis longtemps au Mexique, alors que la détection de type sexuel A2 n'a été rapporté, en dehors du Mexique, qu'à partir des années quatre vingt

(Hohl et Islin, 1983 ; Drenth *et al.*, 1993). Les pertes de rendements des cultures de pomme de terre dues au mildiou varient de 20 à 50% dans les pays développés et peuvent aller jusqu'à la perte totale de la récolte dans le cas d'attaques sévères de variétés sensibles (Andrison *et al.*, 1997 ; Goodwin *et al.*, 1998 , Zwankhuien, 1998). Ainsi, les simulations par ordinateur prévoient une augmentation de 15 à 25 % des fréquences de traitement contre la maladie aux Etats Unies et au Canada (Terence, 1997). Au Maroc, avec l'évolution des superficies cultivées en pomme de terre ou en tomate, l'utilisation des produits chimiques est devenue intense contre le mildiou fait apparition.

Au Maroc, les premières études réalisées sur le mildiou de la pomme de terre se sont intéressées essentiellement à l'étude épidémiologique de la maladie en plein champ (Achouri, 1979) ou à l'évaluation de l'efficacité de certains fongicides sur le comportement du pathogène en laboratoire ou en plein champ (Stiki, 1983 ; Chrif, 1992). Bien que le problème de la résistance au metalaxyl ait été rapporté au Maroc depuis 1994, la population du pathogène y était composée uniquement de souches de type sexuel A1 (El Ismaili, 1994 ; Sediqui *et al.*, 1997) ; donc une population dont la structure était simple. Après avoir observé quelques oogones et anthéridies dans une culture pure de *P. infestans*, EL Ismaili (1994) a suggéré la présence de souche de type sexuel A2 au Maroc

Etant donnée la progression et les répercussions de la maladie dans le monde démontrées essentiellement par l'évolution rapide des populations de l'agent causal au cours de ces dernières années (Fry *et al.*, 1992 ; Bradshaw *et al.*, 1998), il est important d'étudier les caractéristiques de la population actuelle du pathogène au Maroc. Les objectifs visés dans le présent travail sont donc :

- en une première partie, l'estimation de l'importance de la maladie dans le périmètre de Saïss et une caractérisation de la population locale en utilisant plusieurs paramètres tels que le type sexuel, la sensibilité au metalaxyl, la capacité de croissance mycélienne et de sporulation *in-vitro*, le pouvoir de germination directe et indirecte des sporocystes et le pouvoir pathogène des isolats collectés sur différentes variétés de pomme de terre et de tomate.

- en une deuxième partie, l'évaluation de la fertilité des isolats *in-vitro* et *in-vivo* et une étude de l'influence de certains facteurs sur cette fertilité. La capacité germinative des oospores résultats de la reproduction sexuée est vérifiée ainsi que la contribution de ces formes sexuées dans le déclenchement des infections. En outre, une comparaison entre la progéniture mono-zoospores issue de la reproduction asexuée et celle issue de la recombinaison sexuée sera réalisée en utilisant certains paramètres de caractérisation.

- en une troisième partie, l'évaluation de la sensibilité du feuillage et des tubercules de plusieurs variétés commerciales de pomme de terre vis à vis des nouvelles souches du pathogène est menée au laboratoire et sous serre. Des tests de corrélations entre les différents paramètres d'évaluation sont réalisés d'une part pour chaque type d'organe végétal, et d'autre part entre les deux organes inoculés.

Chapitre I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUES

I- Aperçu historique de la maladie du mildiou

Le mildiou, causé par *P. infestans*, est une maladie très redoutable de la pomme de terre et de la tomate non seulement dans les régions tempérées mais pratiquement dans toutes les zones de production de ces cultures (Fry *et al.*, 1992). Cette maladie n'a pas cessé de faire couler l'encre depuis son apparition dramatique en Irlande en 1845-46 où elle a provoqué une grande famine qui a entraîné la mort de plus d'un million d'habitants et la migration de plus d'un million et demi de personnes (Fry et Goodwin, 1997 ; Andrivon et Lebreton, 1998). Le centre d'origine de ce fléau est probablement les montagnes du Mexique Centrale (Niederhausser, 1991 ; Christine *et al.*, 2000) où la diversité du parasite est maximale et où la reproduction sexuée du champignon a toujours existé (Tooley *et al.*, 1986). Ensuite, la maladie s'est manifestée en dehors du Mexique après migration en plusieurs temps (Spielmen *et al.*, 1991 ; Fry *et al.*, 1992 ; Goodwin *et al.*, 1993 ; Andrivon, 1996). En Afrique, la maladie a été détectée pour la première fois en 1941 (Sediqui *et al.*, 1997).

II- Symptomatologie

P. infestans l'agent responsable du mildiou de la pomme de terre attaque toutes les parties de la plante. Au stade précoce, les petites feuilles des jeunes pousses brunissent et se dessèchent rapidement si les conditions d'infection sont favorables. Aux stades végétatifs plus avancés, l'infection se manifeste sur les tiges par des nécroses qui se repartissent longitudinalement en différentes zones (Fig. 1). Ces nécroses s'étendent, brunissent et provoquent souvent l'affaissement des fanes (Paitier, 1980). Sur les feuilles, le premier signe macroscopique de l'infection est l'apparition de taches humides (Pieterse *et al.*, 1992). Ces taches devenant brunes s'entourent d'une bande de couleur vert pale ou jaune clair sur la face supérieure (Henfling, 1987). Les nécroses se développent souvent aux extrémités des feuilles ou sur les parties marginales (Fig. 2). Avec un temps chaud et humide, les feuilles nécrosées se recouvrent sur la face inférieure par une fructification blanchâtre abondante du pathogène (Paitier, 1980). L'infection des tubercules se manifeste sur la peau par des lésions grisâtres irrégulières. Tandis que la chair présente une altération de couleur brunâtre avec une texture souvent granuleuse (Fig. 3). Il en résulte une pourriture sèche (Thurston et Shultz, 1981 ; Henfling, 1987).

III- Facteurs affectant l'évolution de la maladie

Lorsque les conditions du milieu sont favorables, l'évolution de l'épidémie dépend de l'agressivité du pathogène et du système de défense de la plante hôte (Pieterse *et al.*, 1992).

III- 1- Facteurs climatiques

La période de latence et la croissance de la lésion dépendent essentiellement de la température alors que l'intensité de l'infection dépend de l'humidité (Crosier, 1934). La fructification est abondante pendant les périodes fraîches et humides (90 à 100% d'humidité relative (HR) et une gamme de température de 10 à 25°C), alors qu'elle est limitée pendant les périodes chaudes et sèches (Conce et Duvauchelle, 1982). Pendant les périodes dont l'HR est modérée, les sporocystes de *P. infestans* persistent sur les sporangiophores ou sur les feuilles durant plusieurs heures (Hunter et Kunimoto, 1974 ; Rotem et Cohen, 1974). La durée d'humectation des feuilles affecte surtout la sévérité de la maladie (Umaerus 1969 in Oigen, 1991). Par contre, la température affecte tous les stades de développement de la maladie (Harrison, 1992). Selon ce auteur, des températures inférieures à 23°C sont plus favorables au développement de la maladie. Cependant, la dispersion des sporocystes est plus importante durant les jours chauds et secs que pendant les jours froids et humides (Kable et Mackenzie, 1980). En plus de l'HR, Harrison et Lowe (1989) et Harrison (1992) ont mentionné la vitesse du vent comme facteur déterminant de la dispersion des sporocystes.

A des températures supérieures à 18°C, la germination des sporocystes est essentiellement directe. Tandis qu'à des températures inférieures à 15°C la germination est principalement indirecte (Henfling, 1987 ; Harrison, 1990). En absence du film d'eau, les zoospores peuvent rapidement perdre leur viabilité (Pristou et Gallegly, 1954). De faibles précipitations (6 à 25 mm) peuvent être suffisantes pour causer l'infection des tubercules (Lacey, 1962, 1963 ; Lapwood, 1977). En effet, la distribution temporelle des pluies et la durée d'humectation des feuilles sont plus déterminantes que les précipitations totales (Harrison, 1992).

III- 2- Facteur du Sol

Les sporocystes produits par les lésions développées sur tige sont souvent à l'origine de l'infection des tubercules (Ller et Bain, 1998). Selon ce dernier auteur, l'importance de l'infection dépend de la texture du sol telle qu'une grande porosité qui facilitent le déplacement des spores. *P. infestans* possède une faible capacité saprophytique dans le sol (Malajczuk, 1983). Cette persistance limitée dans le sol est attribuée à l'inactivation et la rapide détérioration des sporocystes et du mycélium par les micro-organismes du sol (Ller et Bain, 1998). Néanmoins, le sol contaminé par les sporocystes de *P. infestans* conserve son pouvoir infectieux vis à vis des tubercules pendant 15 à 77 jours selon le type du sol, l'humidité et le pH (Lacey, 1965 ; Bogulavskaya et Filippov, 1977 ; Lapwood, 1977 ; Sato, 1979, 1980 ; Stewart *et al.*, 1993 ;

Andrivon, 1994, 1995 ; Fairclough, 1995 ; Ller et Bain, 1998). Ainsi, les sols argileux et les sols dont la capacité de rétention de l'eau est de 20 à 25% conservent leur infectivité plus longtemps que les sols sableux et ceux saturés à 100% (Zan, 1962 ; Lacey, 1965). Selon Ller et Bain (1998), la relation entre l'humidité du sol et l'infection des tubercules est complexe. Sato (1979) a remarqué un faible taux d'infection des tubercules à des températures du sol supérieures à 18°C malgré l'importante infection du feuillage et les fortes précipitations. Selon Zan (1962) et Fehrmann (1963), l'infection des tubercules ne dépend pas du pH du sol à une gamme de 4.8 et 8.

III- 3- Prédisposition de l'hôte

Plusieurs études ont montré que la nutrition, la photopériode, l'intensité lumineuse et la présence d'autres pathogènes dans les plants sont impliqués dans la variabilité de la sensibilité des cultivars au mildiou (Thurston, 1971 ; Turkensteen, 1993). La croissance des lésions et l'intensité de sporulation dépendent de la nutrition azotée (Umearus, 1967 in Oïgen, 1991 ; Cohen et Rotem, 1987). En ce qui concerne l'effet de la lumière, l'application de certaines photopériodes et intensités lumineuses peut influencer la résistance de la plante au point que les différences entre les cultivars tendent à diminuer (Umearus, 1967 in Oïgen, 1991 ; Victoria et Thurston, 1974). Quant à l'influence d'autres infections, la présence de la maladie elle-même et certains traitements avec des propagules du pathogène peuvent affecter les réactions de la plante (Nardis *et al.*, 1979 ; Doke *et al.* , 1987 ; Fischer *et al.*, 1988). Ainsi, la densité de l'inoculum et la méthode d'inoculation influencent remarquablement la résistance de la plante (Stewart *et al.*, 1989). L'utilisation des semences saines (surtout des infection virales) peut améliorer la résistance des cultivars vis à vis du pathogène (Turkensteen, 1993).

Par ailleurs, des études ont montré que la sévérité de la maladie varie avec l'âge de la plante et des feuilles (Tarkase, 1968 ; Malcolmson, 1969 ; Warren *et al.*, 1973 ; Carnegie and Calhoun, 1983). Ainsi, le degré d'infection des tubercules en période de culture dépend de l'âge et de l'état de ces organes (Cieslewicz, 1967 ; Darsow et Meinel, 1981 ; Darsow, 1981 in Swizynski et Zimnoch-Guzowska, 2001 ; Stewart *et al.*, 1983). L'importance de l'infection des tubercules dépend également des conditions de stockage et de croissance de ces organes (Bhatia et Young, 1985 ; Pathak et Clarke, 1987). Chez certains cultivars de pomme de terre, la couche externe du cortex et plus résistante à la colonisation du pathogène (Pathok and Clarke, 1987 ; Swizynski and Zimnoch-Guzowska, 2001).

IV- Agent pathogène

IV - 1- Description morphologique

P. infestans possède un mycélium coenocétique hyalin et à développement endogène (intercellulaire et intracellulaire) via la formation d'haustoria (Thurston et Shultz, 1981). Les sporangiophores émergent souvent à travers les stomates. Le caractère morphologique principale de ce pathogène est la présence de renflements au niveau des sites de ramification, en particulier aux points de la formation des sporocystes (Thurston et Shultz, 1981). Ces derniers en position terminale ont une forme souvent citronnée et possèdent une papille apicale. Leur paroi est mince et leurs dimensions sont de 21-38 x 12-23µm (Thurston et Shultz, 1981).

IV- 2- Position taxinomique

P. infestans est une espèce appartenant à la Classe des Oomycètes, à l'Ordre des Péronosporales et à la Famille des Pythiacées (Alexopoulos *et al.*, 1996). Le genre *Phytophthora* regroupe actuellement 43 espèces divisées en six groupes morphologiques. L'espèce *P. infestans*, séparée morphologiquement des autres espèces, est classée dans le groupe IV (Waterhouse *et al.*, 1963).

IV- 3- Gamme d'hôtes

En plus de la pomme de terre et de la tomate, plusieurs Solanacées constituent des hôtes préférés de l'espèce *P. infestans*. Etant donné que les grandes montagnes du Mexique sont considérées comme le centre d'origine de plus de vingt espèces de *Solanum*, ce pathogène aurait fait sa première apparition dans cette région (Christine *et al.*, 1999). Cependant, cette pathogénicité ne se limite pas seulement aux grandes cultures naturelles. En effet, plusieurs autres cultures appartenant à d'autres genres et espèces d'arbres tropicaux et arbustes se sont révélées des hôtes pour ce pathogène (Vartanian et Endo, 1985). Erwin et Ribeiro (1996) ont rapporté que d'après des inoculations artificielles au laboratoire ou des observations en plein champ, le pathogène *P. infestans* peut attaquer 89 espèces. Christine *et al.* (1999) ont conclu que la large apparition récemment de nouveaux génotypes de *P. infestans*, a contribué à l'élargissement de la gamme hôtes de ce pathogène. Aux Etats Unis, plusieurs investigations ont confirmé que la Morelle (*S. sarachioides*) petunia (*Petunia hybrida*) et l'aigre-doux (*S. bulcamara*) constituent aussi des hôtes pour ce pathogène (Laing, 1998).

IV- 4- Cycle de vie

Le cycle de vie de *P. infestans* consiste en une phase asexuée et une autre sexuée (Fig. 4). Les sporocystes constituent l'unité de la reproduction asexuée. Ces organes sont facilement détachés des sporangiophores qui constituent un duvet blanc autour des lésions. Les sporocystes germent soit directement par émission d'un ou de plusieurs tubes germinatifs soit indirectement par production des zoospores (Harrison, 1990). Ces propagules seront à l'origine des contaminations secondaires. L'infection des tubercules se fait souvent par les zoospores de *P. infestans* qui sont facilement drainés avec l'eau d'irrigation ou des précipitations. Le pathogène infecte les tubercules au niveau des lenticelles, les yeux, les stolons ou les blessures mais ne pénètre jamais à travers le périderme intact (Walmsley-Woodward et Lewis, 1977 ; Pathak et Clarke, 1987). L'importance relative des différentes voies de pénétration du pathogène dans les tubercules dépendent des conditions de la croissance et le type de cultivar (Swizynsky et Zimnoch-Guzowska, 2001).

L'espèce *P. infestans* est hétérothallique et se caractérise par l'existence de deux types sexuels A1 et A2 (Gallegly et Galindo, 1958, Smoot *et al.*, 1958). Après confrontation entre les anthéridies et les oogones, les oospores sont formés selon les réactions de chacun des types sexuels vis à vis de l'hormone produite par le type sexuel opposé (Ko, 1988 ; Shaw, 1987). Les oospores peuvent être formées selon trois mécanismes différents : par apomixie, autofertilité ou par reproduction sexuée croisée. Cependant, l'importance relative des oospores formées par ces trois voies reste indéterminé (Christine *et al.*, 1999).

IV- 5- Sources d'inoculum primaires et modes de conservation

Le mycélium hivernant dans les yeux et/ou les blessures des tubercules de semences constitue la source principale d'inoculum primaire (Paitier, 1980 ; Gregory, 1983 ; Davidse *et al.*, 1983). En effet, un tubercule infecté sur 100000 sains est considéré comme une quantité d'inoculum suffisante pour déclencher une épidémie générale (Robinson, 1976 in Weste, 1983). L'infection peut être aussi provoquée par les propagules du champignon (sporocystes, zoospores et fragments mycéliens) conservés dans le sol sur les débris des fanes et parfois sur les repousses en zone à climat doux (Paitier, 1980). Selon ce même auteur , il suffit d'une quantité infime de sporocystes dans la culture pour qu'une épidémie puisse avoir lieu lorsque les conditions climatiques sont favorables. Les oospores résultant de la recombinaison génétique sont considérées comme la forme de conservation la plus importante de ce pathogène (Thurston et Shultz, 1981 ; Drenth *et al.*, 1993).

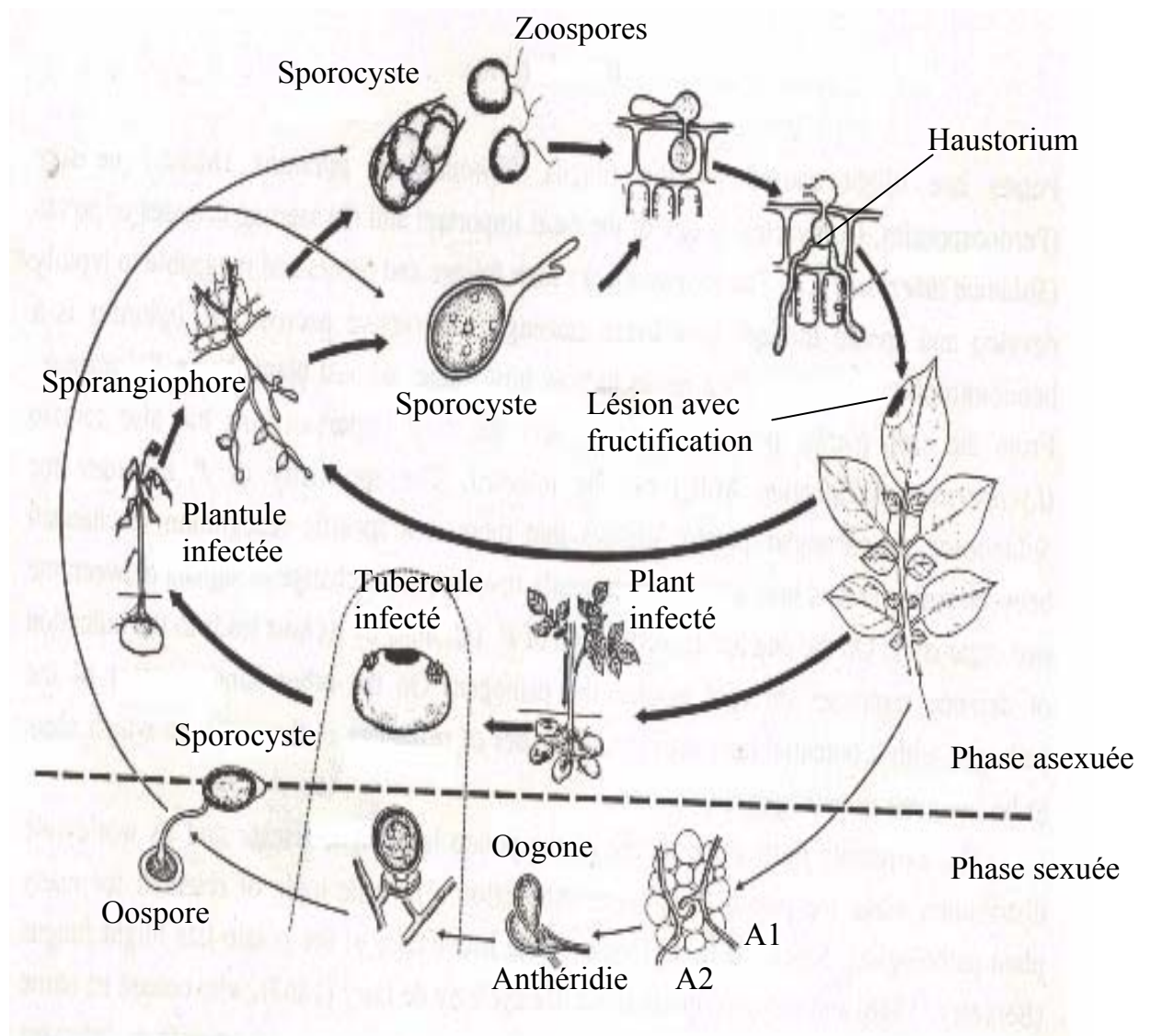


Figure 4 : Cycle de vie de *Phytophthora infestans* (Mont.)

Cependant, les informations concernant les mécanismes par lesquels les plants de la pomme de terre sont infectés par les oospores dans la nature sont très limitées. Drenth *et al.* (1995) ont suggéré que les oospores présentes dans le sol germent et les zoospores qui en résultent se déplacent vers la surface où ils infectent les feuilles et les tiges des plants de la pomme de terre ou de la tomate qui sont en contact avec le sol.

V- Caractérisation biologiques et biochimiques des populations de *P. infestans*.

V-1- Croissance mycélienne *in-vitro*

P. infestans peut être cultivé sur différents substrats naturels ou synthétique (Ribeiro, 1983 ; Shaw, 1991). Cependant, certains isolats exigent des apports particuliers pour pousser en dehors de la plante. Certains isolats, se développant sur le milieu synthétique, exigent des sources d'azotes particulières tels que le nitrate, l'ammonium, l'asparagine, l'histidine et la purine (Hohl, 1975, 1983). Ces isolats correspondant à des mutants auxotrophes sont rarement signalés chez *P. infestans* et sont souvent récessifs (Shaw, 1991).

V-2-Facteurs de virulence: "Race pathogénique ".

P. infestans existe sous forme de races physiologiques, chacune capable d'infecter des lignées différentielles particulières. Ces races sont déterminées selon le modèle de complémentarité gène pour gène (Person, 1966 in Gallegly, 1970). En effet, dans le pathosystème Pomme de terre - *P. infestans*, au moins 11 gènes R de résistance (R1, R2, ..., R11) sont, actuellement, identifiés dans les espèces de *Solanum* particulièrement chez l'espèce *Solanum demissum* (Wastie, 1991). Ainsi, une race du pathogène de type 1 est capable d'infecter tous les plants récessifs (ne possédant aucun gène R de résistance) et celles possédant le gène R1 de résistance correspondant. Certains isolats de race complexe (possédant une combinaison de gènes de virulence) sont capables d'attaquer les plantes récessives et celles possédant une combinaison de gènes R correspondants. Cette situation reflète l'image d'une confrontation entre une population du parasite composée de souches sauvages et polymorphes avec une population d'hôte homogène et génétiquement fixe (Boccas, 1979). Ce déséquilibre permet au pathogène de développer son potentiel d'agressivité.

Le développement des outils de la biologie moléculaire a permis de localiser et caractériser des gènes de *P. infestans* qui s'expriment pendant une interaction compatible avec l'hôte (Unkless *et al.*, 1991 ; Moon *et al.*, 1992 ; Pieterse *et al.*, 1991, 1993d, 1993c, Kamoun *et al.*, 1997, Bucher *et al.*, 1997).

V- 3- Compatibilité sexuelle: "Mating type"

Le type de compatibilité est un trait important pour la caractérisation des populations de *P. infestans*. La bisexualité chez ce champignon a été décrite pour la première fois au Mexique par Gallegly et Galindo (1958) et Smoot *et al* (1958). Ces auteurs ont démontré que la reproduction sexuée n'est réalisable qu'après confrontation entre deux mycéliums de types sexuels différents A1 et A2. En dehors du Mexique, tous les isolats récoltés avant les années quatre-vingt ont été déterminés de type sexuel A1. L'existence du type sexuel A2 en Europe a été rapporté, pour la première fois, par Hohl et Islin (1981). En Afrique, la forme A2 a, jusqu'à présent, été mise en évidence uniquement en Egypte (Shaw *et al.*, 1985).

Au Mexique, l'analyse des différentes collections de ce pathogène suggère une coexistence à des proportions presque égales des deux types sexuels (Fry *et al.*, 1992). Par conséquent, les populations existant dans les champs Mexicains sont surtout le fruit de la recombinaison sexuée (Tooley *et al.*, 1985). Depuis les années 1980, la fréquence d'apparition des isolats A2 devient de plus en plus importante en Europe (Drenth *et al.*, 1993), aux Etats Unis (Fraser, *et al.*, 1995 ; Marshall *et al.*, 1998 ; Dorrance *et al.*, 1999) et au Canada (Petters *et al.*, 1998 ; Daaf et Patt, 1999). Selon Shaw (1991), la présence du A2 ne peut être considérée importante que si sa fréquence dépasse 10 % des isolats collectés. Cependant, le type sexuel A2 est le plus répandu dans certains pays tels que le Japon et la Corée de Sud (Thierrien *et al.*, 1990, Young *et al.*, 1994), le Brésil (Fry *et al.*, 1992), certaines régions du Canada (Chycoski et Punja, 1996 ; Goodwin *et al.*, 1994a, 1994b, 1995) et dans plusieurs localités de l'ex URSS (Gorborova *et al.*, 1989 in Shaw, 1991). En France, sa détection est réalisée uniquement sur la tomate (Lebreton *et al.*, 1996). Par contre, le type sexuel A2 n'est pas détecté au Perou (Tooley *et al.*, 1989 ; Perez *et al.*, 2001), au Taiwan (Ann *et al.*, 1998) et en Afrique de Sud (McLeod *et al.*, 2001).

V- 4- Résistance aux inhibiteurs

Des souches de *P. infestans* ont manifesté des niveaux élevés de résistance à certaines molécules chimiques tels que la streptomycine, le chloramphenicol, la blasticidine, l'oxytetracycline, la trichothecine et l'acriflavine *in-vitro* ou *in-vivo* avec ou sans utilisation des agents mutagènes (Shaw, 1991). Le phénomène de la résistance se produit souvent après introduction des fongicides ayant une action spécifique sur des phases particulières du cycle de vie du champignon (Dekker, 1976). La plus importante résistance des isolats de

Tableau 1 : Chronologie d'apparition du type sexuel A2 dans différents pays du monde (* Drenth *et al.*, 1993)

Pays	Année	Référence
------	-------	-----------

Mexico *	1956	Niederhausser (1956). Tr. New York Acad. Sci.19: 55-63.
Allemagne	1980	Dagget <i>et al.</i> (1993). Phytopathology 83: 319-323.
Suisse	1981	Hohl et Iselin (1981). Tr. Br. Mycol. Soc. 83: 529-530.
Angleterre	1981	Tantius <i>et al.</i> (1986). Plant Pathology 35: 578-581.
Holland *	1981	Frinkling <i>et al.</i> (1987). Neth. J. Pl. Pathol. 93: 147-149.
Scotland*	1983	Malcolmson (1985). Tr. Br. Mycol. Soc. 85: 531.
Israel*	1983	Grinberg <i>et al.</i> (1989). Phytoparasitica 17: 197-204
Egypt	1984	Shaw et al. (1985). Plant Pathology 34: 552-556
Suède*	1985	Kadir et Umaerus (1987). Ad. 10Th EAPR conf. DK p.223.
USSR*	1985	Vorob'eva <i>et al.</i> (1991). Mikolog. i Fitopatologiya 1:62-67.
Japon *	1985	Mosa <i>et al.</i> (1989). An. Phytopath. Soc. Japan 55: 615-620.
Brasil*	1986	Brommonschenkel (1988). M. Sc. Thesis Vicosia, Brasil.
USA*	1987	Deahl <i>et al.</i> (1991). American Patato Journal 68: 717-726.
Poland	1988	Spielman <i>et al.</i> (1991). Plant pathology 40: 422-430.
Ireland*	1988	O'Sullevan et Dowley (1991). Irish J. Agr. Res. 30: 67-69.
Canada*	1989	Deahl <i>et al.</i> (1991). American Potato Journal 68: 717-726.
Ecuador	1989	Fry <i>et al.</i> (1993). Plant Disease 77: 653-661.
Colombie	1990	Fry <i>et al.</i> (1993). Plant Disease 77: 653-661.
Bolivia *	1990	S. B. Goodwin, unpublished.
Korea*	1991	Y. J. Koh, unpublished.
China	1993	Fry <i>et al.</i> (1993). Plant Disease 77: 653-661.
France	1995	Lebreton et Andrivon, 1998, Eup. J. Pl. Path. 104 : 583-594
Italie	1996	Critinziio et Testa, 1997, Plant Disease 79 : 121-123.
Hongrie	1996	Bakonyi et Ersek, 1997, Plant Disease 81 : 1094
Népal	1997	Shrestha <i>et al.</i> , 1998, Plant Disease 82 : 1064.
Ouganda	1999	Mukalazi <i>et al.</i> , 2001, Crop Protection 20 : 379-388
Finlande	2000	Hermensen <i>et al.</i> 2002. Plant Pathology 49 : 11-22
Norvège	2000	Hermensen <i>et al.</i> 2002. Plant Pathology 49 : 11-22

P. infestans est celle liée à des fongicides de la classe des phenylamides dont le fongicide le plus important et le plus actif est le metalaxyl. Ce fongicide systémique exerce son action fongitoxique à l'intérieur des tissus du plant (Staub *et al.*, 1980). Ce produit une fois redistribué dans la plante traitée, possède la faculté de protection des organes non encore développée au moment du traitement. Le metalaxyl inhibe la formation d'haustoria, la croissance

mycélienne à l'intérieur des feuilles, la formation des lésions et la sporulation (Bruck *et al.*, 1980 ; Staub *et al.*, 1980). Des études biochimiques ont montré que le metalaxyl agit en réduisant la synthèse de ADN, la synthèse protéique et surtout l'ensemble des ARN. En effet, il agit sur la synthèse d'ARN en inhibant l'ARN polymérase (Fischer et Hayes, 1972, 1982 in Schwinn, 1983 ; Schwinn et Margot, 1991). D'autres études ont montré que cette inhibition est spécifique puisque seule une partie de l'ARN de synthèse est sensible au metalaxyl (Davidse *et al.*, 1991).

Au début, vers les années 1970, l'introduction de ce fongicide a été très appréciée vu sa grande efficacité contre les oomycètes. Très rapidement et vers les années 1980, des problèmes de résistance sont apparus dans plusieurs pays du monde (Reuveni *et al.*, 1980 ; Davidse *et al.*, 1981, 1983 ; O'sullivan, 1980 ; Coffey *et al.*, 1984 ; Holmes and Channon, 1984 ; Pappas, 1985 ; Kadish and Cohen, 1988). L'expression de cette résistance est souvent associée à l'utilisation intensive et unique de ce fongicide. (Staub *et al.*, 1980 ; Davidse *et al.*, 1981). Quant à Schwinn (1983), il explique qu'il existe généralement des conditions favorables à l'apparition de cette résistance au champ. Cette résistance peut être due à certains mécanismes tels que l'inactivation du fongicide, l'altération de son transport, la perturbation de son métabolisme ou un changement au niveau de son site d'action (Judelson and Roberts, 1999).

Au Maroc, le problème de la résistance au metalaxyl a été démontré chez *P. citrophthora* (Serrhini, 1986) et chez *P. infestans* (El Ismaili, 1994 ; Sedigui *et al.*, 1997).

V- 5- Les allozymes

Le polymorphisme d'isoenzymes a pour objectif de fournir un outil de marquage chromosomique d'un seul gène. Chez *P. infestans*, l'utilisation de l'électrophorèse sur gel d'amidon a permis d'identifier 13 enzymes dont deux seulement ont montré un polymorphisme suffisant et une résolution claire pour être utilisés comme marqueurs génétiques. Il s'agit de la glucose-phosphate isomérase et la peptidase (Tooley *et al.*, 1985, Spielman, 1991 ; Goodwin, 1991 ; Goodwin *et al.*, 1995b)

V- 6- AND génomique

L'espèce *P. infestans*, comme plusieurs champignons phytopathogènes, a un génome de grande taille avec plusieurs séquences d'ADN répétitives (Shaw, 1996). Sa taille est de $2,5 \times 10^8$ pb approximativement (Shaw, 1991) dont 90% des séquences sont répétitives (Carter *et al.*, 1990).

Plusieurs amorces sélectionnés ont permis l'amplification des séquences de polymorphismes. La plus importante de ces amorces est une séquence multilocus nommée RG57 qui permet de détecter plus de 13 loci (Goodwin *et al.*, 1992b). Selon ces auteurs, cette séquence apparaît être moyennement répétitive, non évolutionnaire, dispersée et à polymorphisme important. Elle permet par conséquent la mise en évidence de la variabilité génotypique de *P. infestans*.

V- 7- ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial est une molécule bicatenaire (double brin) avec peu de séquences non codantes et ne présente pas des segments de grandes tailles (Shaw, 1996). Le séquençage du génome mitochondrial entier de *P. infestans* a été réalisé et la longueur de ce génome est d'environ 37.957 pb (Paquin *et al.*, 1997). Ce génome est plus similaire à celui des plantes et des protistes qu'à celui des vrais champignons et des animaux (Paquin *et al.*, 1997). Il existe des variations intraspécifiques de l'ADNm chez *P. infestans*. En effet, Carter *et al.* (1990) et Goodwin (1991) ont rapporté l'existence de deux morphotypes d'ADNm (I et II). Récemment, 8 halotypes mitochondriaux différents ont été identifiés dont quatre semblent être les plus répandus dans le monde (Gavino, 1998 ; Griffith et Shaw 1998 in Christine *et al.*, 1999)

VI- Mécanismes évolutifs chez *P. infestans*

VI-1- Migration

Il existe deux types de migration : l'une de courte distance (Quelques Km) par le vent et l'autre de longue distance (>500 Km) (Fry *et al.*, 1992). Plusieurs travaux ont rapporté l'implication de ce phénomène dans la diversité et la variabilité génomique de *P. infestans* en Europe (Fry *et al.*, 1991 ; Daggett *et al.*, 1993 ; Ludwik *et al.*, 1993 ; Sujowski *et al.*, 1994), aux USA et au Canada (Goodwin *et al.*, 1996). Pratiquement tous les génotypes détectés à travers les pays du monde existent au Mexique (Fry *et al.*, 1992). Plusieurs autres allèles ne sont identifiés qu'au Mexique. Ce qui indique l'existence de plusieurs migrations du Mexique vers les différents continents. Au moins deux migrations se sont produites du Mexique vers l'Europe et les Etats Unis : l'une au début des années 1840 et l'autre après 1980 (Spielman *et al.*, 1991 ; Fry *et al.*, 1992, 1993 ; Goodwin *et al.*, 1993 ; Goodwin *et al.*, 1993 ; Goodwin *et al.*, 1994).

VI- 2- Hétérocaryose

La possibilité de formation des hétérocaryons chez les *Phytophthoras* a été évoquée après l'observation des anastomoses par Stephensen *et al.* (1974). Mais la première confirmation de ce mécanisme a été démontré par Long et Keen en 1977. Ces auteurs ont obtenus chez *P. megasperma* var *sojae* une culture prototrophique à partir d'une mixture de deux mutants auxotrophiques. Certaines cultures mono-zoospores de *P. infestans* obtenues d'une culture pure des extrémités mycéliennes se sont révélés des hétérocaryons (El-Refai, 1990 in Shaw, 1991). De même, la fusion des zoospores observé *in-vitro* chez *P. infestans* peut constituer une voie de formation d'hétérocaryons dans la nature (Hiddeman et Kole, 1954 in Shaw, 1993, Judelson et Yang, 1998).

VI- 3- La recombinaison somatique

En absence de la phase sexuelle du cycle de vie la recombinaison somatique ou la parasexualité demeure un mécanisme de variabilité très important chez *P. infestans* (Leach et Rich, 1969 in Shaw, 1983, Shaw, 1991). Cette parasexualité s'effectue par anastomose suivie d'une interaction nucléocytoplasmique complexe aboutissant à la formation d'hétérocaryons. La fréquence de ce mécanisme de variabilité peut être importante si le caractère observé est à déterminisme polygénique (Fry *et al.*, 1992). Ce mécanisme peut contribuer significativement à la diversification des races pathogéniques chez *P. infestans* (Malcolmson, 1970 ; Fry *et al.*, 1992 ; Shaw, 1991). certaines hybrides autofertiles chez *P. infestans* résultent de la recombinaison somatique entre deux parents de type sexuels différents (Shaw, 1991).

VI- 4- Hybridation interspécifique

Toutes les espèces hétérothalliques de *Phytophthora* sont pratiquement capables de s'intercroiser entre elles (Savage, 1970 ; Shaw, 1983). Une grande proportion des oospores résultent de la fusion gamétocystiques interspécifiques et non pas seulement d'autofécondation (Savage *et al.*, 1970). La germination et la viabilité des oospores produites dans de tels croisements sont remarquablement faibles (Boccas, 1981 ; Boccas et Zentmeyer, 1976). Néanmoins, l'hybridation interspécifique peut constituer un moyen de variabilité et d'adaptation au moins à faible échelle, surtout avec la coexistence de plusieurs espèces différentes dans un même biotope.

VI- 5- La recombinaison sexuelle.

La reproduction sexuée demeure le moyen le plus efficace pour induire une importante diversité génotypique. Par conséquent, elle permettra au

pathogène de s'adapter pour faire face aux contraintes du milieu extérieur (Fry *et al.*, 1992).

VI-5-1- Influence de certains facteurs sur la production des oospores chez *Phytophthora*.

VI-5-1- 1- Les exigences trophiques

Elliot (1983) a rapporté que certains acides aminés tels que l'acide aspartique et glutamique constituent des sources d'azote bénéfiques pour l'accomplissement de la reproduction sexuée chez les *Phytophthora*. Par contre, d'autres acides aminés tels que la valine et la leucine ne favorisent pas le processus sexuel à cause de la toxicité de leur métabolites (Leal et Gomez-Miranda, 1969 in Elliot, 1983).

La reproduction sexuée de plusieurs espèces de *Phytophthora* est stimulée par un rapport C/N élevé (Leal, 1964 et Ravise, 1972 rapporté par Boccas, 1979 ; Child *et al.*, 1969 in Ribeiro, 1983).

Contrairement aux espèces de *Pythium*, les espèces de *Phytophthora* sont auxotrophes pour la thiamine et l'exigent pour leur reproduction sexuée (Boccas, 1979).

Plusieurs travaux ont rapporté l'implication des stérols dans la stimulation de la formation des oospores chez plusieurs espèces hétérothalliques de *Phytophthora* (Pratt et Mitchell, 1973 ; Elliot et Glen, 1982). Les deux substances les plus impliquées dans le processus de la reproduction sexuée sont le sistosterol et le stigmasterol qui sont extraites de nombreux végétaux tels que le pois , l'avoine et le maïs (Romero et Erwin, 1969 ; Boccas, 1978).

VI- 5 - 1- 2- Les facteurs physico-chimiques

- Température

Chez plusieurs espèces de *Phytophthora*, les températures favorables à la reproduction sexuée sont sensiblement inférieures à celles de la croissance mycélienne (Drenth *et al.*, 1995). Chez *P. infestans*, la production des oospores est obtenue *in-vitro* à des températures comprises entre 18 et 21°C et *in-vivo* de 8 à 20°C (Cohen *et al.*, 1997 ; Drenth *et al.*, 1995).

- Lumière

La lumière a une action inhibitrice sur la reproduction sexuée chez les espèces de *Phytophthora* (Boccas et Laville, 1978). C'est la phase d'induction précédant la différenciation des gamétocystes qui est photosensible (Huggenin, 1972 in Boccas, 1979). Cet effet inhibiteur de la lumière continue sur

l'oosporogenèse est considérablement atténué si les cultures de champignon sont incubées sous une photopériode de 12h (Hugenin et Boccas, 1971)

- Humidité

Ni les oospores ni les oogones ne sont observés sur des plants sévèrement attaqués par les deux types sexuels et incubés à une humidité relative de 50 à 80% (Cohen *et al.*, 1997). Par contre, les folioles ou les rondelles de feuilles de pomme de terre inoculés et placés sur l'eau permettent une importante production des formes sexuées (Drenth *et al.*, 1995 ; Cohen *et al.*, 1997).

VI-5-1-3- Génotypes des hôtes

Certains travaux ont montré que les oospores sont produites en quantité plus importantes sur les feuilles des cultivars de pomme de terre moyennement résistants que sur celles des cultivars sensibles (Drenth *et al.*, 1995 ; Hanson *et al.*, 1997). D'autres auteurs ont conclu qu'il n'existe pas d'effet du génotype de la pomme de terre sur la reproduction sexuée (Cohen *et al.*, 1997). D'après ces derniers auteurs, la formation des oospores est plus importante sur la tomate que sur la pomme de terre .

VI- 5- 2- Survie des oospores

Les sporocystes, les zoospores et le mycélium des espèces de *Phytophthora* ont une très courte longévité (Pittis et Shattock, 1994 ; Drenth *et al.*, 1995).

Avec la détection des deux types sexuels A1 et A2 dans plusieurs pays, de nombreuses études ont suggéré la possibilité de la contribution des oospores dans le cycle de vie de *P. infestans*. Les oospores sont des structures qui permettent aux *Phytophthora spp.* de survivre dans des conditions adverses pendant de longues périodes dans des débris de plant ou dans le sol (Madden, 1991). Ainsi, après une attaque sévère d'un sol au Mexique par le mildiou de la pomme de terre, celui ci a conservé son pouvoir infectieux pendant environ 3 années (Perches et Galindo (1969) in Schôber et Turkensteen, 1992). Dans des études de laboratoire, Pittis et Shattock (1994) ont remarqué que les oospores peuvent survivre pendant 5 à 7 mois après un stockage dans l'eau ou dans le sol à des températures comprise entre 0 et 20°C. Drenth *et al.* (1995) ont montré que les oospores de *P. infestans* restent vivaces après leur exposition à des températures comprises entre -80 et 35°C et sont capables de survivre au moins pendant toute une saison hivernale en Europe.

VI- 5- 3- Germination des oospores

VI- 5- 3-1- Morphologie de la germination

La levée de la dormance des oospores est caractérisée par de profondes modifications de ces formes sexuées. Selon Boccas (1979), le protoplasme perd son aspect homogène et réfringent, devient granuleux et retrouve l'aspect qu'il avait avant la différenciation de l'oospore. Généralement, la germination des oospores chez les espèces de *Phytophthora* se réalise selon deux voies. Dans le premier cas, la germination est dite directe lorsque l'oospore émet un ou plusieurs tubes germinatifs qui se développent directement en un thalle. Dans le second cas, le ou les tubes germinatifs émergeant de l'oospore se terminent par un sporocyste ; il s'agit de la germination indirecte (Gallegly, 1970).

VI- 5- 3-2- Effets de certains facteurs sur la germination des oospores

Les études concernant les facteurs qui influencent la capacité germinative des oospores de *P. infestans* sont peu nombreuses. Cependant, certaines investigations ont montré l'effet stimulateur de la germination par certains traitements préalables des oospores.

- Lumière

La lumière reste le facteur limitant de la germination des oospores. En effet, l'action inductrice de la lumière sur la germination a été rapportée par plusieurs auteurs (Romero et Gallegly, 1963 ; Romero et Erwin, 1969 ; Berg, 1966 in Gallegly 1970 ; Boccas, 1979 et Shattock *et al.*, 1985). Chez *P. infestans*, l'exposition à la lumière après le début de l'oogamie permet d'induire une germination précoce (Romero et Gallegly, 1963). Cependant, cette capacité de germination précoce disparaît rapidement après la phase de la condensation du protoplasme oogonial (Boccas, 1979).

- Maturité des oospores

La germination des oospores de plusieurs espèces de *Phytophthora* et de *Pythium* augmentent avec l'âge des oospores (Ribeiro, 1983). Des taux de germination relativement élevés (7 à 15%) sont aussi enregistrés pour les oospores jeunes (âgées de moins de 7 jours) chez certaines espèces telles que *P. infestans* (Smoot *et al.*, 1958 ; Harrison, 1990). Néanmoins, cette germination précoce ne peut se réaliser que sous des conditions appropriées de lumière, de température et de nutrition (Ribeiro, 1983). Boccas (1983) a rapporté que cette germination précoce est un phénomène de caractère accidentel déclenché par l'interruption de l'évolution physiologique de l'organe sexuel néoformé ; c'est l'oogone qui germe. De même, Harrison (1990) a rapporté que les cultures mono-oospores, établit à partir de ces oospores à germination précoce, résultent vraisemblablement de l'autofertilité de l'un ou l'autre des deux parents.

-Température

La germination des oospores des *Phytophthora* exigent un traitement préalable d'exposition à des températures basses (10 à 15°C) ou élevées (25 à 33°C) pendant une certaine période (Ribeiro, 1983). Pour *P. infestans* la germination des oospores est obtenue après une incubation à des températures comprises entre 18 et 22°C et sous une photopériode de 16 h (Wittaker *et al.*, 1991 ; Pittis et Shattock, 1994 ; Fay et Fry, 1997).

- Apports nutritifs

Les glucides tels que le fructose et le manitol sont des stimulateurs de la germination des oospores de certaines espèces de *Phytophthora* (Leal et Gomez-Meranda, 1965 in Ribeiro, 1983). Tandis que d'autres glucides tels que glucose, fructose, sucrose se sont révélés des inhibiteurs de la germination des oospores de plusieurs espèces de *Phytophthora* (Leal et Gomez-Meranda, 1965 ; Frster *et al.*, 1982 in Ribeiro *et al.*, 1983). En outre, des sources d'azote telles que l'asparagine seul ou en association avec une source de carbone (glucose) stimulent la germination des oospores de *P. megasperma f. sp. medicaginis* (Leal et Gomez-Meranda, 1965 in Ribeiro *et al.*, 1983).

-Type de substrat

Des études ont montré l'importance du type de milieu de culture dans la germination des oospores de *P. infestans*. En effet, des taux variables de germination des oospores sont obtenus lorsque ces propagules sont incubées dans un milieu contenant du fumier organique (Smoot *et al.*, 1958), ou d'extrait de sol de la pomme de terre (Medina et Platt, 1999).

e- Autres facteurs

La majorité des études, a montré que la germination des oospores de *P. infestans* est relativement faible (5 à 15%) et généralement instable (Andrivon, 1995). Les taux de germination des oospores de *P. infestans* augmentent après le traitement de ces dernières avec le KMnO₄ (Chang et Ko, 1991 in Andrivon, 1995) ou par des enzymes cellulolytiques telles que la novazyme (Spielman *et al.*, 1989). Le passage des oospores de *P. infestans* dans le tube digestif de l'escargot permet d'obtenir une germination massive de celles-ci (Shattock *et al.*, 1986). Cette germination est attribuée à l'action de certaines enzymes telles que la B-glucuronidase et l'aryl sulfatase (Shaw, 1967 ; Saltatore *et al.*, 1973 in Ribeiro, 1983). L'addition d'une petite quantité d'un bouillon de culture naturel (extrait de seigle) stimule la germination mais favorise aussi la contamination rapide par des champignons et bactéries saprophytes (Shattock et Shaw, 1990). Le pH a peu ou pas d'influence sur la germination des oospores (Ribeiro, 1983).

VI- 5- 4- Infectivité des oospores

Les oospores peuvent constituer une source d'inoculum primaire chez certains espèces homothalliques de *Phytophthora* tels que *P. megasperma* (Gray *et al.*, 1973) et *P. syringae* (Harris, 1979). Le pouvoir infectieux des formes sexuées de *P. infestans* a été confirmé au laboratoire (Strmberg *et al.*, 1999 ; Pittis et Shattock, 1994 ; Drenth *et al.*, 1994, 1995). Les oospores survivant dans le sol sont capables d'infecter les plants en produisant des lésions sur les feuilles ou les tiges qui sont en contact avec le sol (Pittis et Shattock, 1994 ; Drenth *et al.*, 1995). Anderson *et al.* (1998) ont rapporté qu'une épidémie apparut en Suède en 1996 est causée par les propagules sexués formés suite à des infections de plants pendant les saisons précédentes. Néanmoins, l'importance de leur contribution réelle dans le déclenchement des épidémies et leur influence sur la composition et l'évolution des populations restent encore à quantifier.

VII- Eléments de la lutte intégrée de la maladie

VII- 1- Techniques prophylactiques

Certaines pratiques culturales peuvent contribuer à réduire les sources d'inoculum primaire et/ou la propagation de la maladie. Ces mesures peuvent être récapitulées dans les points suivants :

- ♦ L'utilisation des semences de la pomme de terre saines et certifiées (Laing, 1998).

- ♦ L'élimination des déchets de triage et les repousses de pomme de terre de la culture précédente (Henfling, 1987 ; Laing, 1998). La méthode utilisée dépend des conditions climatiques locales. Cette élimination peut se faire par l'enfouissement, le compostage ou la congélation. Ces déchets peuvent aussi être utilisés comme source de pâturage pour les animaux. Néanmoins, l'incinération de ces déchets s'avère le moyen le plus efficace pour détruire ou diminuer la quantité d'inoculum formé durant la saison agricole précédente.

- ♦ L'assainissement du matériel et des installations d'entreposage (Laing, 1998).

- ♦ Le défanage précoce et total permet souvent d'éradiquer la contamination ultérieure des tubercules-fils (Kooistra *et al.*, 1991 ; Duvauchelle et Andrivon., 1996).

- ♦ L'utilisation d'une ou plusieurs cultures non hôtes de *P. infestans* dans le cycle de rotation limite la propagation de l'infection vers d'autres régions encore vierges (Paitier, 1980).

- ♦ L'aération adéquate du magasin de stockage durant la période de conservation des tubercules limite l'infection de ces organes.

- ♦ L'irrigation exagérée par aspersion peut créer des microclimats favorable à l'apparition des premiers foyers d'infection.

VII- 2- Modèles de prévisions des épidémies

Il existe une relation très étroite entre le développement de la maladie et les variables micro-météorologiques facilement mesurables telles que la température l'humidité et les précipitations (Harrison, 1992). Cette relation a permis de construire des modèles de prévisions des épidémies et donc d'identifier les périodes de risques maximum (Krause *et al.*, 1975 ; Fry, 1977 ; Levy *et al.*, 1983 ; Fohner *et al.*, 1984 ; Milgroom et Fry, 1988 ; Shtienberg *et al.*, 1988 ; Fry *et al.*, 1989 ; Shtienberg et Fry, 1990 ; Duvauchelle, 1991 ; Duvauchelle et Andrivon, 1996 ; JaeHoon *et al.*, 1998). L'objectif final de ces modèles est de cibler les périodes où l'intervention est nécessaire et de réduire ainsi le nombre d'application des fongicides.

Malgré ces modèles, il reste toujours difficile de prévoir les dates de contaminations pour deux principales raisons : la première est la répartition hétérogène des sources primaires d'inoculum ; la deuxième est que ces modèles n'incorporent pas les facteurs de conservation, ni la germination et ni le pouvoir infectieux des oospores (Duvauchelle et Andrivon, 1996). En effet, selon Andrivon et Lebreton (1997), l'élaboration d'un modèle fiable et réaliste nécessite d'abord de combler le manque d'information concernant la biologie des ces organes (conditions physiques et chimiques de la levée de la dormance, leur capacité de survie dans différents sols, ...).

VII- 3- Lutte chimique

Les traitements chimiques contre le mildiou de la pomme de terre utilisent des produits de contacts, des produits pénétrants dont la matière active est le cymoxanil et des produits systémiques pour lesquels le metalaxyl représente la matière active la plus importante (Staub *et al.*, 1980 ; Shwinn et Margot, 1991 ; Duvauchelle et Andrivon, 1996 ; Andrivon et Lebreton, 1997).

Selon Duvauchelle et Andrivon (1996), ces fongicides sont composés d'un systémique et d'un de contact (spécialité dites 2 voies), ou d'un systémique, d'un de contact et d'un pénétrant (spécialités dites 3 voies). L'intervalle d'application entre deux traitements peut atteindre 10 jours pour les produits à 2 voies et 14 jours pour ceux à 3 voies. Cependant, dès les premières années d'utilisation massive de ces composés systémiques, le problème de la résistance à ces fongicides est apparu (Cf. V-4). Pour limiter l'émergence des souches résistantes, il est essentiel de n'utiliser ces produits qu'en préventif et en début de saison, de limiter leur emploi à deux ou trois applications par saison et de respecter des délais entre traitements (Andrivon et Lebreton, 1997).

VII- 4- Résistance variétale

Chez un hôte sensible, *P. infestans* envahit les tissus et les cellules alors que chez le plant résistant, le champignon reste limité au niveau du site d'infection (Hohl et Suter, 1976 ; Cupyers et Hahlbrock, 1988). Cette résistance aux parasites génétiquement contrôlée peut être classée en deux types, la résistance spécifique et la résistance non spécifique. La première, appelée aussi la résistance verticale, est basée sur le modèle gène pour gène (Cf. V-2). Dans ce cas, plusieurs études ont évoqué la notion d'interaction compatible et incompatible entre l'hôte et le pathogène (Pieterse *et al.*, 1992). Dans les interactions incompatibles (résistance/avirulence) ; c'est à dire, une combinaison entre l'allèle de résistance et l'allèle d'avirulence, une réaction d'hypersensibilité se manifeste dans les cellules épidermiques et mésophylliennes adjacentes à celles envahies par *P. infestans*. Ces dernières deviennent nécrotiques après 5 heures d'inoculation (Furuse *et al.*, 1999). Une activation locale et rapide des gènes codant pour plusieurs enzymes, accompagne ou suit la réaction d'hypersensibilité (Bostock *et al.*, 1981 ; Bach, 1987 ; Hahlbrock et Scheel, 1988 ; Krombrink *et al.*, 1988, Pieterse *et al.*, 1993 ; Birch *et al.*, 1999). Dans les interactions compatibles (sensibilité/virulence), les cellules ne brunissent pas pendant les 12 à 24 h premières (Cupyers et Hahlbrock, 1988). Les mêmes gènes activés dans les interactions incompatibles sont souvent exprimés dans les interactions compatibles mais les différences résident dans le temps et le site d'expression (Shrber *et al.*, 1992 ; Pieterse *et al.*, 1992).

Au contraire de la résistance spécifique, où un seul gène ou un nombre limité de gènes est suffisant pour assurer la protection complète du plant contre une race particulière de *P. infestans*, la résistance non spécifique ou horizontale est sous le contrôle de plusieurs gènes (Umaerus, 1963). Ce type de résistance est, généralement, durable, plus stable et commercialement plus attractive que la résistance verticale est rapidement surmonté par les nouvelles races du pathogène (Pieterse *et al.*, 1992 ; Van Oïgen, 1996). La source de la résistance durable des anciens cultivars est l'espèce *Solanum tuberosum* sp. *tuberosum* (Turkensteen, 1993). Les espèces Mexicaines de solanum, *Solanum demisium* et *Solanum stoloniferum* sont les plus importantes sources des deux types de résistance caractérisant les cultivars actuellement cultivés (Malcolmson et Black, 1966 in Turkensteen, 1993 ; Goodwin, 1996). D'autres espèces peuvent être aussi une source potentielle de la résistance horizontale à savoir *Solanum andigenum* (Kiru et Vavilov, 2002), *S. simpliciform*, *S. polytrichon* et *S. verrucosum* (Kolobaev *et al.*, 2002).

La carte génétique de certains des gènes R de résistance est déterminée : R1 est localisé sur le chromosome 5 (Léonard-Schippers *et al.*, 1992), R2 sur le chromosome 4 (Li *et al.*, 1998), et R3, R6 et R7 sur le chromosome 11 (El-Kharbotly *et al.*, 1994 ; Al-Kharbotly *et al.*, 1996). Un autre gène R de résistance est identifié sur le chromosome 10 et a pour origine l'espèce *Solanum berthaultii*. Chez la tomate deux gènes R sont actuellement identifiés, Ph1 situé

sur le chromosome 7 (Peirce, 1971), et le gène Ph2 sur le grand bras du chromosome 10 (Moreau *et al.*, 1998).

VII- 5- Autres méthodes de lutte

Les associations variétales combinant des plantes résistantes et sensibles dans diverses dispositions spatiales (rang alternés, répartition en mosaïques, mélange au hasard), constituent une voie potentielle pour limiter les dégâts de mildiou de pomme de terre (Andrивon et Lucas, 1998 ; Garrett et Mundt, 2000). Cette technique peut être utilisée comme méthode de gestion des variétés sensibles au mildiou dans les situations où la lutte chimique est limitée, comme en culture biologique ou faute de moyens techniques et financières.

Par ailleurs, le comportement de plusieurs espèces de *Phytophthora* est influencé par les micro-organismes du sol induisant soit la stimulation soit l'antagonisme (Malajczuk, 1983). Ainsi, des bactéries antagonistes de *P. infestans* tels que *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae), *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces*, pourraient contribuer à limiter l'infection du feuillage ou des tubercules de pomme de terre (Lockwood, 1964 ; Lacey, 1965 ; Malajczuk, 1983 ; Andrивon, 1994 ; NG et Webster, 1997). Selon ces auteurs, les différents mécanismes d'antagonismes évoqués *in-vitro* ou dans le sol vis à vis du *P. infestans* sont la fongistase, la lyse des organes du champignon et la production des antibiotiques. Néanmoins, les études de l'action antagoniste de plusieurs bactéries, virus et champignons vis à vis du pathogène sont en cours d'expérimentation en plein champ.

Dans une étude menée en Allemagne, Blaeser et Steiner (1998), ont étudié l'efficacité de 35 extraits de plants différents vis à vis du mildiou de tomate cultivée sous tunnel. Ces auteurs ont rapporté que 32% des extraits ont une efficacité comprise entre 50 et 80% alors que 5 % de ces extraits sont capables de réduire l'infection à des taux supérieures à 80%. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les extraits de *Potentilla erecta* (90%) et *Salvia officinalis* (83%).

Chapitre II

CARACTERISATION DES

ISOLATS DE PHYTOPHTHORA

Au cours de ces dernières années, la maladie de mildiou de la pomme de terre a connu une évolution très alarmante dans plusieurs pays du monde. Selon Chycoski et Punja (1996), l'augmentation des incidences et sévérités des épidémies est attribuée à la combinaison de plusieurs facteurs tels que la migration de nouveaux génotypes qui remplacent les anciens, l'apparition et l'extension des souches du pathogène de type sexuel A2, l'émergence des souches résistantes au métalaxyl et enfin les conditions climatiques favorisant la propagation rapide de l'infection. En effet, la détection du type sexuel A2 en dehors du Mexique vers les années 1980 a constitué une première indication du changement des populations de *P. infestans* et de leur répartition géographique (Fry *et al.*, 1992 ; Zwankhuizen, 1998). Depuis cette date une variation rapide des génotypes de *P. infestans* et de leur fréquence dans le temps et dans l'espace a caractérisé la structure des populations de ce pathogène (Andrison et Lebreton,

1997). Les nouvelles populations de *P. infestans* se sont révélées plus agressives et génétiquement plus diverses que les populations anciennes (Kato *et al.*, 1997 ; Bradshaw *et al.*, 1998 ; Platt, 1999 ; Peters *et al.*, 1999 ; Gavino *et al.*, 2000).

Dans le périmètre de Fès-Saïs, des attaques sévères de la pomme de terre par le mildiou ont été enregistrées durant ces dernières années. L'apparition de la maladie bien qu'elle surgit souvent à la fin du cycle végétatif de la culture, caractérise plusieurs zones de production de la pomme de terre dans la région d'étude lorsque les conditions sont favorables. Au Maroc, des souches résistantes au métalaxyl ont été détectées dans la population du pathogène depuis 1994 dans la région de Larache (El Ismaili , 1994 ; Sediqui *et al.*, 1997). Selon le dernier auteur, la population du pathogène de cette région est jusqu'à l'année 1997 serait composée uniquement de souches de type sexuel A1 résistantes au métalaxyl.

Notre investigation a pour objectif d'apporter plus d'informations concernant les particularités essentiellement biologiques et épidémiologiques de la population de *P. infestans* au Maroc d'autant plus qu'aucune étude n'a été conduite auparavant dans ce périmètre de Fès-Saïs. Le présent travail s'articule autour des points suivants : ❶ évaluer l'importance de la maladie du mildiou dans la région de Saïs ❷ vérifier la présence de souches de type sexuel A2, ❸ réexaminer la présence de souches résistantes au métalaxyl et de quantifier leurs fréquences, ❹ caractériser les isolats collectés en utilisant plusieurs paramètres biologiques et épidémiologiques tels que la croissance mycélienne et la sporulation *in-vitro*, la capacité de germination directe et indirecte des sporocystes des isolats ainsi que l'évaluation du pouvoir pathogène des isolats sur différentes variétés de la pomme de terre et de la tomate.

I- Prospections et évaluation de l'importance du mildiou dans la zone d'étude.

Plusieurs prospections ont été réalisées dans les différentes localités de production de la pomme de terre et de tomate de la région de Saïs pendant la campagne agricole 1997-1998. Dans le but d'évaluer l'importance de la maladie dans la région nous avons sélectionné 20 parcelles cultivées de la pomme de terre situées dans chacune des localités suivantes Imouzzer, Ain-Cheggag, Sefrou, Bhalil et Fès à raison de 4 parcelles par zone. Ces parcelles ont été inspectées tous les 3 à 5 jours pendant une période d'un mois et demi environ, depuis le 30 Novembre 1997 jusqu'à le 15 janvier 1998.

L'estimation de l'importance du mildiou est effectuée en choisissant au hasard et en diagonale 100 plants infectés par parcelle. Les paramètres déterminés au cours de ces prospections sont :

♣ Sévérité = Pourcentage de tissus infectés par plant qui représente une estimation du taux de la surface des lésions développées sur les feuilles et les tiges par rapport à la surface totale de la plante.

♣ Incidence = Pourcentage de plants mildioués par parcelle. Un plant ayant une feuille ou une tige portant une seule lésion est considéré comme le « seuil minimum » pour juger qu'un plant est mildioué.

♣ Fréquence = Pourcentage de parcelles attaquées par le mildiou dans chacune des localités visitées.

II- Collecte des échantillons

Le mildiou de la pomme de terre n'a fait apparition au cours de ces 4 dernières années que pendant 3 saisons agricoles il s'agit de la culture de saison de l'année Janvier 1997 (Novembre 1997-Janvier 1998), la culture de l'arrière saison de l'année 1998 (Avril-Mai 1998) et la culture de saison 2000 (Décembre 2000). Des prospections ont été alors effectuées tout au long du cycle de la culture de pomme de terre durant ces périodes dans les localités de Fès, de Meknès, de Sefrou et de Ain-Cheggag. Des échantillons ont été prélevés pour être analysés au laboratoire. Il s'agit des feuilles, de tiges de tubercules et de sol de la rhizosphère. Ils sont mis dans des sachets de plastiques et ramenés dans une glacière.

III- Isolements de l'agent pathogène

P. infestans est considéré parmi les champignons difficiles à isoler sans l'utilisation des antibiotiques. Ceci est dû à ses caractéristiques particulières à savoir sa faible compétitivité et ses exigences nutritives strictes. Par conséquent, un des objectifs de ce travail est de mettre au point une ou plusieurs techniques relativement rapide et fiable pour isoler et mettre en culture le champignon sans l'utilisation des antibiotiques.

III- 1 - Préparation des milieux de culture

Dans la littérature, plusieurs milieux de cultures sont utilisés pour l'isolement et la mise en culture de *P. infestans*. Dans un test préliminaire, nous avons évalué l'importance des apports nutritifs de certains milieux (cités ci-dessous) pour sélectionner le milieu le plus favorable à la croissance mycélienne (5 et 10 jours après incubation à 20°C) et à la conservation du

pathogène. Après 7 jours d'incubation à 20°C à l'obscurité, les colonies mycéliennes de huit isolats (I5S67, P5F4, P6F11, P6F16, S1F35, S2T9, S2F18, S3T40) choisis au hasard et conservées à 4°C et à 20-24°C à l'obscurité, sont repiquées tous les 2 à 5 jours sur un milieu de culture vierge (à partir de la même boîte mère de chaque isolat) jusqu'à un épuisement du mycélium du pathogène.

Les milieux de culture testées sont préparés selon les méthodes suivantes:

- Milieu à base de Petits pois:

- petit pois de conserve gélosé 140 g
- agar agar.....16g
- Eau distillée stérile.....q. s. q. 1000 ml

Les 140 g de petits pois sont bouillis dans 600 ml d'eau distillée pendant 20 à 30 min. Le produit obtenu est filtré à travers une mousseline avant l'addition de l'agar et de l'eau distillée.

- Milieu à base d'Haricot :

- graines de haricot broyées.....70g
- agar agar17g
- Eau distilléeq. s. q. 1000 ml

- Milieu à base de Pois-chiche:

- graines de pois chiche broyés100g
- agar agar17g
- eau distilléeq. s. p. 1000 ml

- Milieu à base de Nibier:

- graines de nibier broyés100g
- agar agar17g
- eau distilléeq. s. p. 1000 ml

Pour les milieux haricot, pois-chiche et nibier, la farine obtenue par broyage est solubilisée dans 500 ou 600 ml d'eau distillée pendant 30 min. L'extrait est filtré à travers une mousseline puis additionnée d'agar et d'eau distillée.

- Corn Meal Agar :

- farine de CMA17g
- eau distillée1000 ml

Tous les milieux utilisés sont autoclavés à 121°C pendant 20 min. Le pH est ajusté à 5.7 à 6. Après un refroidissement modérée, 15 à 20 ml de milieu sont versés par boîte de Petri de 90 mm de diamètre.

III - 2- Techniques d'isolements

III - 2- 1-Isolement directe

-Technique 1 : des feuilles, des tiges ou des fruits de tomates infectés sont lavés à l'eau du robinet. Des fragments sont prélevés au front d'avancement de la lésion. Ces transplants sont superficiellement désinfectés en les trempant dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 2 à 3 minutes. Ils sont ensuite lavés avec de l'eau distillée stérile deux à trois fois puis séchés pendant une ou deux minutes. ils sont ensuite placés dans des boîtes de Petri contenant le milieu de culture petits pois et incubés à 20°C et à l'obscurité. L'observation est effectuée quotidiennement jusqu'à apparition du mycélium caractéristique de l'agent pathogène (Cf. IV-1, Chapitre I). Celui-ci est repiqué plusieurs fois jusqu'à purification de l'isolat.

-Technique 2 : Les organes infectés sont lavés à l'eau du robinet puis désinfectés par une solution d'hypochlorite de sodium 1%. Ils sont ensuite trempés dans l'eau distillée stérile deux à trois fois. Après séchage, ils sont incubés dans des boîtes humidifiées à 18-20°C à l'obscurité pendant 24h pour favoriser la fructification du champignon. L'isolement de ce pathogène consiste à repiquer des sporocystes prélevés dans des conditions aseptiques à la surface du tissu infecté à l'aide d'une aiguille stérile dont l'extrémité contient un fragment de la gélose de 1 à 2 mm de diamètre. Ce dernier ne doit toucher que les sporocystes attachés à l'extrémité du mycélium. Ce prélèvement est effectué, de préférence, au front d'avancement de la lésion. Cette manipulation est réalisée sous la loupe. Les fragments de gélose inoculés sont placés dans des boîtes de Petri de 90 mm contenant le milieu de culture non sélectif, à raison de six fragments par boîte. L'incubation est effectuée à l'obscurité à 20°C. Des repiquages successifs du mycélium, issu de la germination directe des sporocystes, sont réalisés après 3 à 4 jours d'incubation jusqu'à purification de l'isolat.

III - 2 -2 -Isolement indirect (par appât)

- à partir du matériel végétal : Des fragments d'organes infectés de 4 à 6 mm de diamètre sont prélevés au front d'avancement de la lésion et sont lavés et désinfectés comme décrit précédemment. Ces fragments sont placés sous des rondelles de la pomme de terre (variété saine et sensible) de 20 mm de diamètre et 5 mm d'épaisseur qui sont préalablement désinfectés à l'hypochlorite de sodium à 1% et lavés à l'eau distillée stérile. Le test est conduit dans des boîtes de Petri stériles contenant du papier filtre imbibé d'eau. L'incubation est réalisée à 18°C et à l'obscurité jusqu'à apparition de la fructification. Ensuite, l'isolement du pathogène est pratiqué selon la technique 2 (Cf. III-2-1)

- **à partir du sol** : Huit échantillons de sols infectés ont été prélevés les zones de Ain-Cheggag, Sefrou et Fès. Après tamisage et séchage du sol, une quantité de 1000 ml par échantillon est placée dans une bassine de 40 x 40 cm. Elle est ensuite couverte de 600 ml d'eau distillée stérile de manière à obtenir juste un film d'eau à la surface du sol. Des tubercules sains de la variété de pomme de terre Désirée sont lavés à l'eau du robinet et épluchés. Des rondelles de 20 mm de diamètre et 5 mm d'épaisseur sont prélevés à l'aide d'un emporte pièce et désinfectées par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 1 minute puis lavées avec de l'eau distillée stérile. Deux manipulations sont ensuite utilisées dans cette partie : la première consiste à déposer les rondelles de pomme de terre directement sur le sol humidifié à raisons de 40 à 50 rondelles par bassine. L'incubation est réalisée à 20° à l'obscurité pendant 3 à 4 jours. Les rondelles sont ensuite transférées dans des boîtes de Petri de 90 mm stériles contenant du papier filtre humidifié. Ces boîtes sont incubées à 18-20°C et à l'obscurité pendant 48h. La deuxième manipulation consiste à incuber les bassines contenant le sol humidifié à 20°C et à une photopériode de 16h pendant 24 à 48 h avant d'y mettre les rondelles de pomme de terre et à procéder ensuite comme décrit précédemment.

III- 3- Identification du pathogène

L'identification du pathogène est basée sur les caractères morphologiques décrits par Thurston et Shultz (1981) et les températures cardinales favorables à la croissance mycélienne : 4°C pour la température minimale, 20°C pour la température optimale et 25°C pour la température maximale (Waterhouse ,1963).

III- 4 - Test de pathogénicité des isolats

a/ Plants hôtes

La pathogénicité de tous les isolats collectés (108) est vérifiée sur des folioles détachées et les tubercules de la variété de pomme de terre Désirée et sur des feuilles détachées de la variété de tomate Daniela.

b/ Inoculation et incubation

- Inoculation des feuilles détachées : Des folioles ou des feuilles saines sont lavées à l'eau du robinet. Elles sont ensuite désinfectées à l'hypochlorite de sodium 1% pendant 2 minutes puis lavées à l'eau distillée stérile. Une

suspension sporangiale (5×10^4 sporocystes ml^{-1}) de chaque isolat est préalablement préparée à partir d'une culture mycélienne âgée de 10 jours. Une quantité de 40 à 60 μl de l'inoculum est déposée sur la face inférieure des folioles. Ces dernières sont incubées dans des boîtes humidifiées à 20°C et à une photopériode de 16h. Après 24h, la face supérieure est mise en haut. Les tissus du feuillage inoculés sont examinés après 4 à 7 jours d'incubation.

- Inoculation des tubercules : Après lavage et désinfection des tubercules sains de la variété Désirée, on réalise des trous d'un diamètre de 10 mm et d'une profondeur de 5 mm à l'aide d'un emporte pièce, le long de la surface d'un côté du tubercule. L'inoculation est effectuée en déposant 50 à 100 μl de la suspension sporangiale de chaque isolat (5×10^4 sporocystes. ml^{-1}) préalablement préparée. Les tubercules inoculés sont incubés à 20°C à l'obscurité dans des boîtes humidifiées. Les tubercules inoculés sont examinés quotidiennement jusqu'au 7^{ème} jours d'incubation.

III- 5- Maintenance de la pathogénicité des isolats

Pour maintenir le pouvoir pathogène des isolats, ceux-ci sont conservés pendant de courtes durées dans des tubes à essais contenant 10 ml du milieu à base de petits pois. Avant de procéder au repiquage pour une conservation suivante, l'isolat est mis en culture pour être inoculé à des folioles ou des fragments de tubercules de la variété Désirée préalablement désinfectées. Après apparition de la lésion, le réisolement de l'isolat est effectué selon la technique 2 (Cf. III-2-1). Le champignon est ensuite conservé dans des tubes à essais pour une utilisation ultérieure. Cette manipulation est répétée chaque période de 2 à 4 mois pour maintenir la pathogénicité des isolats. Ce réisolement est effectué aussi avant chaque test de caractérisation.

IV- Caractérisation des isolats collectés

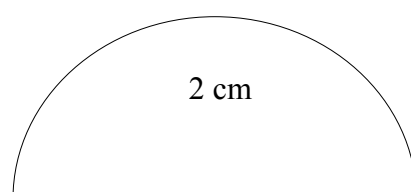
IV- 1- Détermination des types sexuels des isolats

Pour déterminer le type sexuel des 108 isolats collectés des différentes localités, deux tests ont été effectués :

- croisements des isolats entre eux. ; pour ce faire, deux isolats interfertiles de notre collection (S2F18 et P10F1) sont croisés avec tous les autres isolats

-croisements de chacun des isolats avec les deux souches anglaises de référence qui nous ont été spécialement envoyées par Dr. D. Shaw (Université de Wales, Institut de recherches biologiques à Wyggened, Grande Bretagne.) l'une de type sexuel A1 et l'autre de A2.

Les différents croisements sont réalisés dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre contenant le milieu de culture petits pois selon le dispositif de la figure 5.



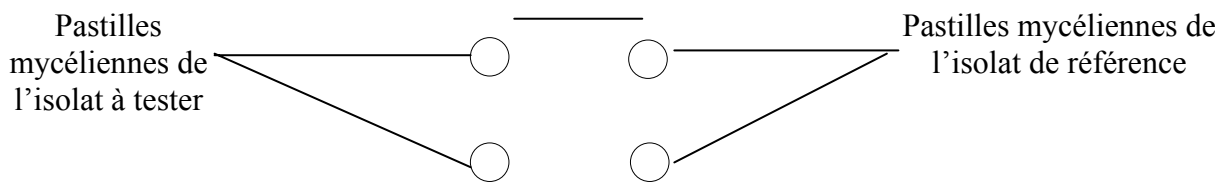


Figure 5 : Dispositif des croisements des isolats sur milieu à base de petits pois pour déterminer leur types sexuels.

Pour chaque croisement envisagé, 4 pastilles mycéliennes, prélevées au bord de jeunes colonies (âgées de 10 jours), sont mises en culture à 2 cm l'une de l'autre et à raison de deux pastilles par isolat et par croisement. Les croisements sont incubés à 20 °C et à l'obscurité. Deux à trois répétitions ont été effectuées pour chaque croisement. Les formes sexuées sont recherchées dans la zone de contact des colonies après 7 à 10 jours d'incubation. Les isolats qui ont formé des oospores avec le type sexuel A1 sont considérés de type sexuel A2, tandis que les isolats qui ont produit des formes sexuées avec la souche de référence de type sexuel A2 sont répertoriés de type sexuel A1.

IV-2- Etude des niveaux de sensibilité des isolats au métalaxyl

L'évaluation de la sensibilité au métalaxyl a été réalisée pour 99 isolats parmi les 108 collectés des localités de Ain-Cheggag (17 isolats), de Fès (24 isolats), de Sefrou (2 isolats) et de Meknès (56 isolats).

IV- 2-1- Essai *in-vitro*

Ce test est mené sur le milieu à base de petits pois. Le fongicide utilisé est l'Apron 35 dont la matière active est le métalaxyl. Celui-ci est le représentant typique des phenylamides. Les caractéristiques techniques de ce fongicide sont récapitulées dans l'annexe.

a/ Préparation de la solution du fongicide

Une quantité de 5.72g de l'Apron 35 est mise en suspension dans 2ml du solvant à 5% (dimethyl sulfoxide) et la solution obtenue est complétée à 100 ml avec l'eau distillée pour obtenir une concentration de 20000µg /ml du métalaxyl. Des dilutions sont effectuées à partir de cette solution mère pour obtenir les

concentrations suivantes: 2000, 200, 20, 2 µg /ml. Un ml de chaque concentration est versée à l'aide d'une pipette stérile dans un erlenmeyer contenant 200 ml de milieu de culture préalablement maintenu en suspension dans un bain marie à 45°C. Ceci permet d'obtenir des concentrations de 100, 10, 1, 0.1 µg /ml. Le pH est ajustée à 5.9-6. Après homogénéisation, 20 ml du milieu sont versés par boîte de Petri de 90 mm de diamètre. Quatre boîtes par concentration et par isolat sont réalisées dans ce test.

b/ Conditions d'inoculation et d'incubation

Une pastille mycélienne de 4 mm de diamètre est prélevée au bord d'une jeune colonie de l'isolat à tester (âgée de 10 jours) et déposée au centre d'une boîte de Petri vierge contenant la solution du fongicide. Les boîtes inoculées sont incubées à 20°C et à l'obscurité

c/ Lecture des résultats

Des mesures diamétrales des colonies sont effectuées après 7 jours d'incubations selon deux directions perpendiculaires. Les pourcentages d'inhibitions de la croissance mycélienne par rapport au témoin non traité par le fongicide sont déterminés selon la formule suivante :

$$PI = [T - Dc / T] \times 100$$

PI = Pourcentage d'inhibition
T = Diamètre du témoin
Dc = Diamètre du l'isolat testé à une concentration déterminée

Pour chaque isolat, les doses efficaces CI_{50} représentant la dose du fongicide qui réduit la croissance mycélienne de moitié et les doses inhibitrices CI_{100} qui représentent la dose du fongicide qui inhibe complètement cette croissance sont déterminées graphiquement en portant en ordonnée les % d'inhibitions et en abscisse les concentrations testées. La CI_{50} de chaque isolat est utilisée pour calculer le facteur de résistance (FR) déterminé selon la méthode de FRAC (Fungicide Resistance Action Comitee) (Duvaucelle *et al.*, 1997) et dont la formule est la suivante :

$$FR = \frac{CI_{50} \text{ de l'isolat à tester}}{CI_{50} \text{ d'un isolat sensible de référence}}$$

Les isolats sont alors classés comme sensibles si le facteur de résistance est inférieur à 5, moyennement sensible si $5 < FR < 10$, moyennement résistant si $10 < FR < 100$ et résistant si $FR > 100$.

Vue la non disponibilité d'un isolat sensible de référence, nous avons choisi l'isolat de notre collection le plus sensible dont la CI_{50} est la plus faible ($0.5\mu\text{g/ml}$). Cette dose est comparable à celle signalée par Fraser *et al.* (1999) et Daayf et Platt (2000).

IV-2- 2- Essai *in-vivo*

L'étude des niveaux de sensibilité des isolats au métalaxyl sur les tissus de l'hôte est d'une importance primordiale. Cette technique permet de vérifier les résultats obtenus *in-vitro* et donc de savoir s'ils sont significativement corrélés. Plusieurs auteurs se sont même limités uniquement à ce test (*in-vivo*) dans leur étude de la résistance de la population de *P. infestans* vis-à-vis du métalaxyl. En effet, cette technique a été utilisée en 1980 pour contrôler les récoltes de la pomme de terre dans l'ouest de l'Angleterre et pour la recherche des formes de résistance de *P. infestans* au métalaxyl (Carter et Brent, 1981 in El Ismaili, 1994).

a/ Matériel fongique

Une suspension sporangiale est préparée pour chaque isolat testé, à partir d'une culture mycélienne âgée de 10 jours. La concentration des sporocystes est ajustée à 5.10^4 sporocystes ml^{-1} .

b/ Préparation de la solution du métalaxyl

Une quantité de 0.28 g du fongicide est mise en suspension dans un flacon stérile contenant 2 ml du solvant diméthyle sulfoxyde à 5% puis on complète jusqu'à 100 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de $1000\mu\text{g/ml}$ du métalaxyl. Des dilutions sont réalisées à partir de cette solution stock pour obtenir différentes concentrations : 100, 10, 1, 0.1 et $0\mu\text{g/ml}$. Une quantité de 15 ml de la solution du fongicide de chaque concentration est versée dans des boîtes de Petri stériles de 90 mm de diamètre. Cette manipulation est effectuée sous des conditions aseptiques.

c/ Préparation du tissu végétal

Les folioles de la variété Désirée sont collectées à partir des feuilles de l'étage sub-apical. Les folioles sont soigneusement lavées à l'eau du robinet et désinfectées à l'aide d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 3 minutes. Les folioles sont ensuite lavées trois fois à l'eau distillée stérile. Ces organes végétaux sont découpés en petits disques de 20 mm de diamètre à l'aide d'un emporte pièce. Ils sont ensuite déposés sur un papier filtre absorbant. Après séchage, les disques sont mis à flotter dans des boîtes de Petri contenant la

solution du fongicide ou l'eau distillée stérile (témoin). La face inférieure des folioles est placée vers le haut.

d/ Conditions d'inoculation et d'incubation

A l'aide d'une micropipette graduée les disques de folioles sont inoculés immédiatement après leur trempage dans la solution du fongicide en déposant une goutte de 20 µl de la suspension sporangiale contenant environ 200 à 300 sporocystes. Les boîtes sont ensuite incubées à 18-20°C et sous une photopériode de 16 heures. Pour chaque concentration, 10 boîtes sont préparées à raison de 6 à 8 disques foliaires par boîte.

c/ Lecture des résultats

Après 7 jours d'inoculation, l'estimation de la sévérité de la maladie est réalisée en déterminant le pourcentage de la surface des disques de feuillage couverte par les sporocystes. Les CI_{50} et CI_{100} sont déterminées graphiquement. La CI_{50} est la concentration effective du métalaxyl qui réduit de moitié la sporulation sur les disques de feuillage, tandis que la CI_{100} représente la concentration effective du fongicide qui inhibe totalement la sporulation sur les disques de feuille. Le degré de sensibilité au métalaxyl des isolats est évalué selon la méthode de Duvauchelle *et al.* (1997) précédemment décrite (Cf. IV-2 - 1- c).

IV- 3- Croissance mycélienne *in-vitro* sur petits-pois

La capacité de croissance mycélienne sur le milieu à base de petits pois est déterminée pour 99 isolats collectés. Pour se faire, une pastille mycélienne de 4 mm de diamètre de chaque isolat est prélevée au bord d'une colonie jeune âgée de 7 jours puis déposée au centre d'une boîte de Petri de 90 mm contenant un milieu de culture vierge. Les boîtes inoculées sont incubées à 20°C à l'obscurité. Les mesures diamétrales des colonies sont réalisées selon deux directions perpendiculaires après 10 jours d'incubation. Le test est répété 6 fois.

IV- 4- Intensité de la sporulation *in-vitro*

La détermination des intensités de sporulation de 99 isolats, collectés de localités de Ain-Cheggag, de Fès et de Meknès, est effectuée à partir des cultures mycéliennes âgées de 10 jours. La suspension mycélienne est préparée en versant 10 ml d'eau distillée stérile dans la boîte contenant la colonie de l'isolat. Celui-ci est lavé soigneusement de manière à ne pas blesser la gélose. La suspension sporangiale est récupérée dans un petit flacon. La suspension est filtrée. Le dénombrement des sporocystes est déterminé en utilisant la cellule de

THOMA. 10 mesures sont effectuées pour chaque échantillon et le test est répété trois fois.

IV- 5- Etude du pouvoir germinatif des sporocystes

La germination directe ou indirecte des sporocystes constituent des stades très important du cycle de vie du pathogène. Ce caractère permettra de renseigner sur la prédisposition du pathogène à infecter l'hôte. Cette germination est évaluée pour les 99 isolats pré-cités.

IV- 5- 1- Germination directe

Ce test est réalisé sur des disques d'eau gélosée (0.2%) préparé selon la méthode suivante : une quantité de 0.2 g d'agar est mis dans 100 ml d'eau distillée. Le mélange est bouilli pendant 10 minutes. Le tout est autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. Le pH est ajusté à 5.9-6. Après refroidissement légère, le milieu est coulé dans des boîtes de Petri de 90 mm. L'eau gélosée est découpée en petits disques de 5 mm de diamètre qui sont déposées dans des boîtes de Petri stérilisées à raison de 8 disques par boîte. Une suspension sporangiale est préalablement préparée pour chaque isolat à partir d'une culture mycélienne de 10 jours (Cf. IV- 4). La concentration des sporocystes est ajustée à 5.10^4 sporocystes ml^{-1} . Une goutte de la suspension (10 à 20 μl), est déposée sur chaque disque de gélose. Les boîtes contenant ces disques sont incubées à 20°C et à l'obscurité. La détermination des pourcentages de germination directe des sporocystes est réalisée après 4, 8, 12 et 24 heures d'incubation. Le test est répété 8 fois.

IV- 5- 2- Germination indirecte

Des suspensions sporangiales de chacun des 99 isolats sont préparées à partir des colonies mycéliennes âgées de 10 jours (5×10^4 sporocystes/ ml^{-1}). Pour chaque isolat, la suspension est divisée dans des tubes à hémolyse. Ces derniers sont incubés au réfrigérateur à 4 °C. Le taux de germination indirecte représenté par le nombre des zoospores libérés est déterminée après 1, 2, 3 et 4 heures d'incubation à l'aide de la cellule de THOMA. Le test est répété 10 fois.

IV- 6- Evaluation de la pathogénicité des isolats

La pathogénicité du champignon constitue un trait de caractérisation très important. Il permet de déterminer le degré d'agressivité de la population étudiée. Dans la bibliographie, deux tests sont utilisés à savoir les inoculations artificielles des plants entiers ou des tissus végétaux détachés tels que les

feuilles ou les tubercules. Le test conduit sur les feuilles détachées présente l'avantage de demander un espace réduit et permet donc de tester simultanément un grand nombre d'isolats. En outre, d'après plusieurs auteurs les résultats obtenus par ce test sont largement corrélés avec ceux obtenus par les tests menés sur des plants entiers en laboratoire ou en plein champ (Stewart, 1990 ; Tooley, 1990).

IV- 6- 1- Matériel végétal

Les feuilles détachées de 5 variétés sont utilisées pour tester le pouvoir pathogène des isolats collectés des différentes localités : quatre variétés de pomme de terre (Désirée, Nicola, Spunta et Kondor) et une variété de tomate (Daniela). Les feuilles saines sont lavées, désinfectées à l'aide de l'hypochlorite de sodium 1% puis lavées avec de l'eau distillée stérile. Après séchage, les folioles sont incubées dans des boîtes de Petri contenant du papier filtre humidifié, la face inférieure étant placée vers le haut.

IV-6 -2- Matériel fongique

Le pouvoir pathogène est évalué pour 99 isolats. Un test préliminaire est effectué sur les tubercules de pomme de terre de la variété Désirée pour s'assurer de la pathogénicité des isolats. Après 6 à 7 jours d'incubation, le champignon est réisolé et mis en culture sur le milieu de culture à base de petits pois. Le test est ensuite conduit avec les souches nouvellement réisolées. Une suspension sporangiale est préparée à partir de cultures mycéliennes âgées de 10 jours pour chaque isolat. La concentration est ajustée à 5.10^4 sporocystes/ ml

IV-6 -3- Inoculation et incubation

Les conditions d'inoculation et d'incubation des feuilles détachées de chaque variété de pomme de terre ou de tomate sont les mêmes que celle décrites dans le paragraphe. Cinq feuilles par isolat et par variété sont inoculés. Le test est répété 2 fois.

IV-6 -4- Lecture des résultats

Les critères d'évaluation de l'agressivité des isolats testés vis-à-vis des feuille des variétés sont :

a/ Temps de latence : Le suivi des tissus foliaires inoculés est effectué toutes les 3 heures. Pour chaque confrontation isolat x variété, le temps mis par le pathogène pour manifester l'infection est déterminé en heures.

b/ Dimension de la lésion : Après 7 jours d'incubation, les bordures de la lésion sont transférées sur un papier transparent et la surface marquée est mesurée en mm² par un planimètre (modèle Mk 340, USA).

c/ Sporulation : Après 7 jours d'incubation, les feuilles inoculées sont incubées pendant 24h à 20°C et à l'obscurité. Elles sont ensuite soigneusement placées dans des boîtes de Petri stériles et lavées avec 10 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'une seringue stérile. A partir des suspensions obtenues, la concentration des sporocystes est déterminée à l'aide de la cellule de THOMA. Dix mesures sont effectuées pour chaque interaction isolat x variété.

IV-7- Modalités de l'étude comparative de la variabilité de la population de *P. infestans*

Pour déterminer le degré de variabilité au sein de la population de *P. infestans* dans le périmètre de Saïs, des études comparatives ont été réalisées. Ainsi, pour chaque caractère étudié, la comparaison du comportement des isolats est réalisée en tenant compte des paramètres suivants :

- ♣ l'hôte d'origine (pomme de terre ou tomate).

- ♣ l'origine des isolats (variabilité géographique). Dans ce cas, pour chaque localité 17 isolats de pomme de terre sont pris en considération dans cette comparaison (soit au total 51 isolats).

- ♣ le type sexuel des isolats (A1 ou A2). Dans ce cas, 40 isolats de chaque type sexuel sont choisis pour évaluer leur performance (soit au total 80 isolats).

- ♣ le phénotype des isolats (type sexuel + résistance au métalaxyl). Dans cette étude, 3 isolats de chaque phénotype sont choisis (soit au total 24 isolats). En plus, des distributions des isolats en classes homogènes seront établies selon la gamme de variabilité de chaque caractère utilisé.

IV- 8- Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats obtenus sont effectuées à l'aide du logiciel STAT-ITCF (Ver. 5) pour l'analyse de la variance, la comparaison des moyennes conduite selon le test L. S. D (Least Significant Difference test = Newman-Keuls's test) à $P = 0.05$ et les tests de corrélations entre les différents paramètres.

ChpII **RESULTATS**

I- Importance de la maladie au cours des prospections réalisées

La figure 6 montre l'évolution de l'incidence moyenne et de la sévérité moyenne de l'infection par le mildiou au cours des prospections réalisées pendant la campagne agricole 1997-1998 (Novembre 1997-Janvier 1998) dans chacune des localités visitées, à savoir Sefrou, Bhalil, Fès, Ain-Cheggag et Imouzzet. Depuis le début des prospections, les incidences moyennes les plus importantes sont notées dans la zone de Ain-Cheggag; où elles progressent de 5 à 95%. Dans les localités de Fès et Sefrou, les incidences enregistrées varient entre 0 à 69%. Dans les zones de Bhalil et Imouzzet les incidences évoluent respectivement de 0 à 60% et de 0 à 54%. Les sévérités moyennes les plus élevées sont également relevées dans la région de Ain-Cheggag et varient de 0.4 à 56%. Pour les localités de Fès, Bhalil et Sefrou, les sévérités moyennes enregistrées progressent de 0 à 30%. Quant aux valeurs les plus faibles de la sévérité, elles sont enregistrées dans la région d'Imouzzet.

Les différentes fréquences de la maladie relevées dans les zones visitées sont représentées dans la figure 7. La fréquence la plus élevée est enregistrée

dans la localité de Ain-Cheggag (83%), et la plus faible est notée dans la région de Bhalil (16%). Dans les régions de Fès, Sefrou et Imouzzet, les fréquences relevées sont respectivement 63, 50 et 37%.

A l'aide du logiciel d'analyse statistique STAT-ITCF (Ver. 5), et comme le montre la figure 8, l'équation de la régression des sévérités sur les incidences enregistrées dans ces régions est la suivante :

$$S = 0.46I - 1.68 \quad (r^2 = 0.95)$$

S= Sévérité ; I= Incidence

En effet, le coefficient de régression et le terme constant sont significativement différents de zéro ($P < 0.05$) (tableau 1 en Annexe). Le test de corrélation entre la sévérité et l'incidence a montré l'existence d'une bonne corrélation ($R^2 = 0.97$) entre ces deux paramètres dans la région étudiée. Ces résultats montrent que plus les sévérités sont importantes plus l'expansion de la maladie est importante tant que les conditions climatiques restent favorables (Fig. 8). Par conséquent, la sévérité constitue une fonction croissante de l'incidence.

Par ailleurs, le taux de tubercules infectés déterminé à la fin du cycle végétatif dans les différentes localités prospectées s'est révélé très faible voir nul.

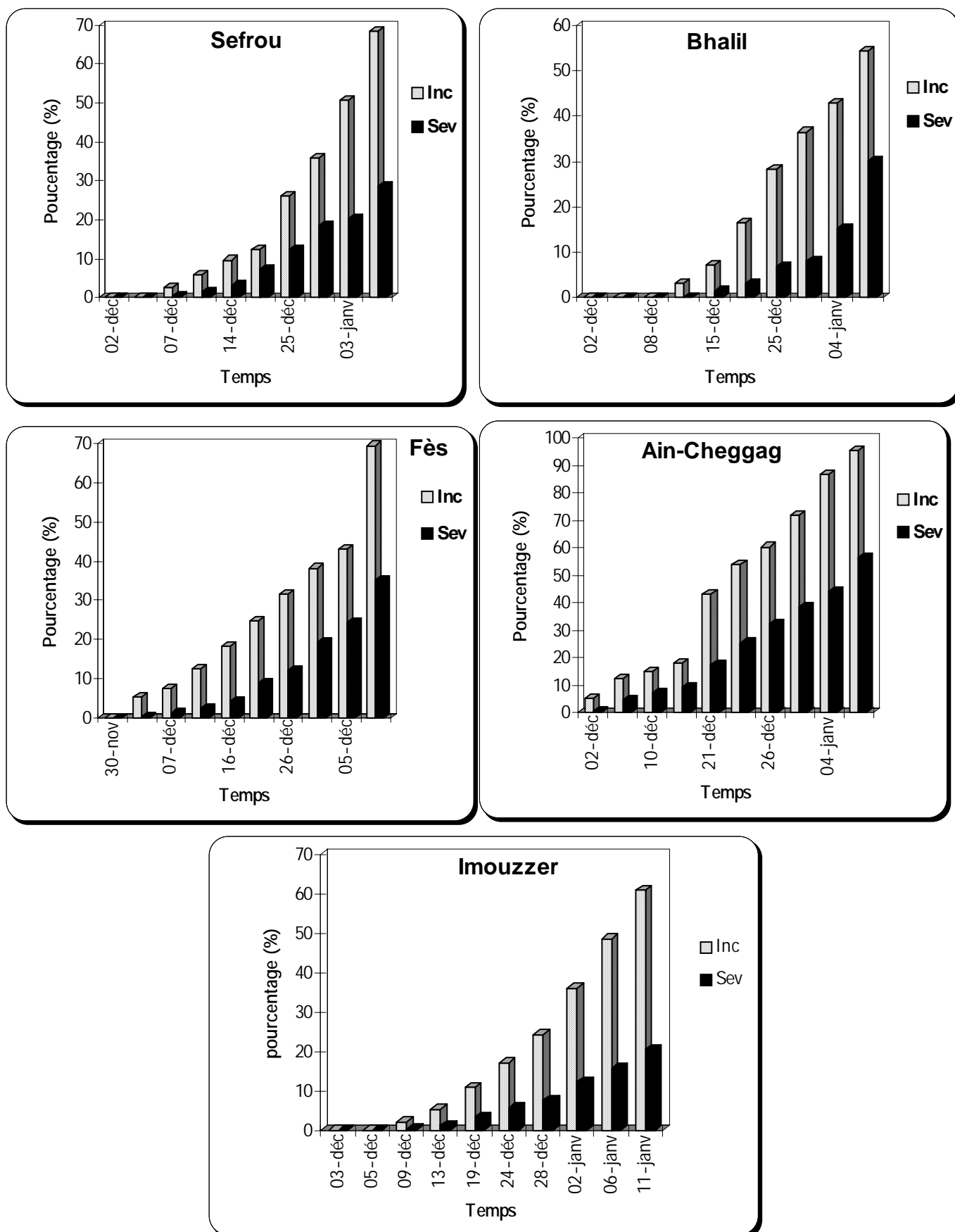


Figure 6: Evolution de l'incidence moyenne et la sévérité moyenne de la maladie dans les différentes localités de la région de Saïs (Sefrou, Bhalil, Fès, Ain-Cheggag, Imouzzar) durant la campagne agricole 1997-1998 .

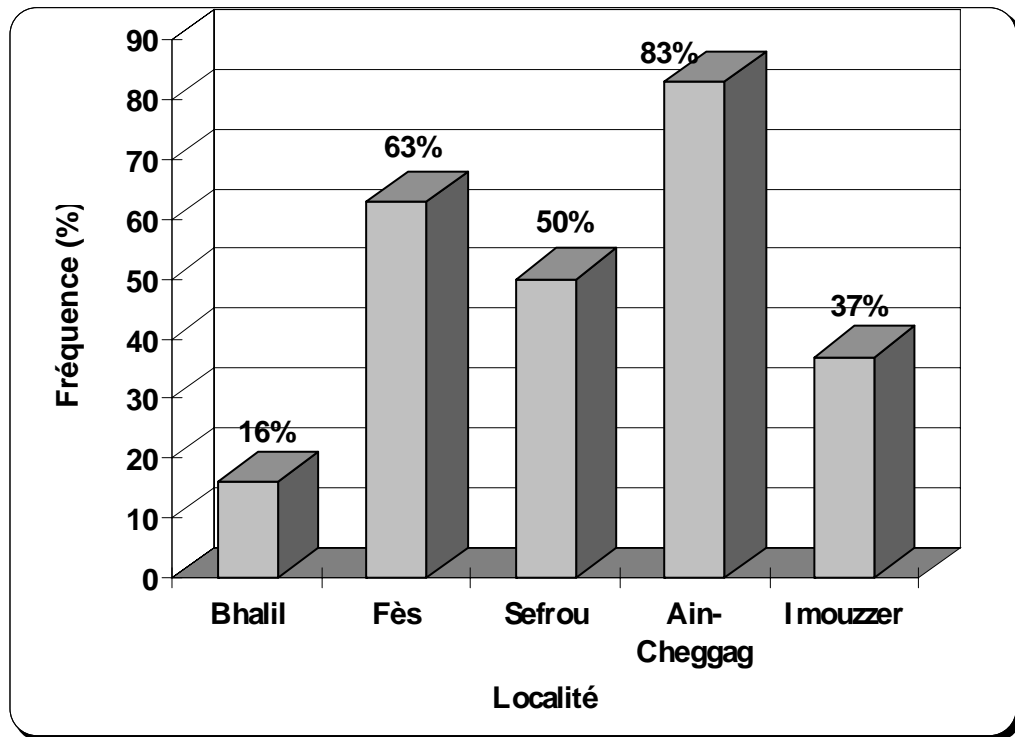


Figure 7 : Fréquence de la maladie dans les différentes localités du périmètre de Fès-Saïs pendant la campagne agricole 1997-1998.

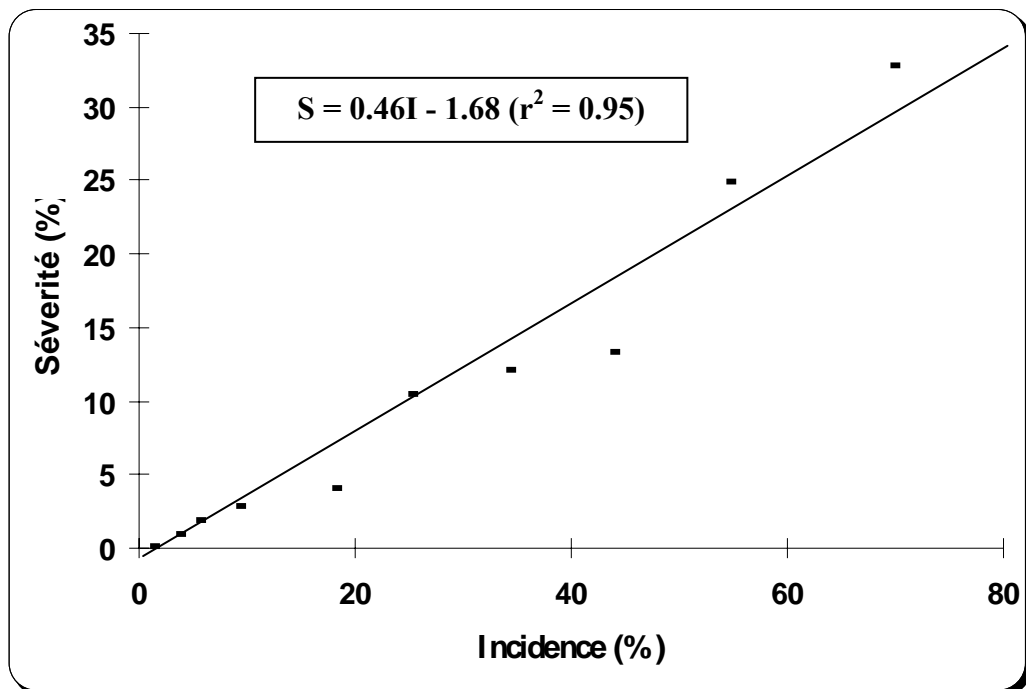


Figure 8 : Relation entre l'incidence et la sévérité de la maladie dans la région de Sais au cours de la campagne agricole 1997-1998.

II- Isollements et vérification de la pathogénicité des isolats collectés

II-1- Isollements

Sur 40 parcelles infectées et prospectées, nous avons réussi l'isolement du pathogène à partir de plants issus de 19 parcelles seulement. Parmi elles 17 sont cultivées en pomme de terre et 2 en tomate (cultivées sous tunnel). Seule la technique de repiquage directe des sporocystes développés sur les lésions nous a permis d'isoler facilement et rapidement le champignon. Les autres techniques d'isollements utilisées (directe et indirecte) s'avèrent non fiables pour la mise en culture du pathogène sur le substrat artificiel. Ceci peut être expliqué par l'utilisation du milieu de culture à base de petits pois qui est non sélectif et la faible compétitivité de *P. infestans* vis à vis des saprophytes. Des repiquages successifs nous ont permis de purifier *P. infestans* et d'obtenir 108 isolats dont 101 sont issus de la pomme de terre et 7 isolats collectés de feuilles (2 isolats) et de fruit (5 isolats) de tomate (tableau 2). Les taux de réussite d'isolement du pathogène à partir des différents tissus de pomme de terre analysés sont montrés dans le tableau 3. Ce dernier montre que l'isolement de *P. infestans* à partir du feuillage infecté de la pomme de terre est plus réussi que celui effectué à partir des tiges. Ceci peut être essentiellement expliqué par la présence d'une fructification du pathogène plus importante sur le feuillage que sur les tiges, ce qui rend le repiquage des sporocystes plus facile.

II-2- Sélection du milieu de culture du *P. infestans*

La croissance mycélienne appréciée par la mesure du diamètre de la colonie est testée sur 6 milieux de culture à base de petits pois, haricot, pois-chiche, seigle, corn meal agar et nibier. Les résultats représentent la moyenne de 8 isolats (I5S67, P5F4, P6F11, P6F16, S1F35, S2T9, S2F18, S3T40) choisis au hasard. L'analyse de variance des résultats obtenus a révélé une différence significative ($P < 0.05$) du facteur milieu et aussi de l'interaction Isolat \times milieu (tableau 2 en annexe). La figure 9 montre que les milieux de culture de petits pois et de haricot permettent une meilleure croissance mycélienne des 8 isolats testés. Les croissances les plus faibles sont enregistrées sur les milieux à base de nibier et Corn meal agar.

De même, les vitesses moyennes les plus importantes de la croissance mycélienne sont obtenues sur les milieux de culture à base de petits pois et haricot (Fig. 10).

Cette relation étroite entre le pouvoir de croissance mycélienne et le milieu de culture est signalée par plusieurs auteurs tels que Shaw (1990) et Medina et Platt (1999).

Tableau 2: Dénomination et origine des isolats de *P. infestans*.

[illegible]

Haj Kaddour	F13	15/02/2000	Pomme de terre (Var. Désirée)	“
	F38			“
	F42			“
	F43			“
	F45			“
	F48			“
	F50			“
	F52			“
	F54			“
	F55			“
	F58			“
	F59			“
	F60			“
	F61			Tige
	F62			Foliole
	F63			“
	F70			“
	F73			“
	F75			“
	F77			“
	F78			Tige
	F80			Foliole
	F82			“
	F83			“
	F85			“
	F90			“
	F91			“
	F92			“
	F93			Tige
	F94			Foliole
	F96			”
	F97			“
	F98			“
	F108			“
	F109			“
	F110			“
Sbai Aioun	A12	18/02/2000	Pomme de terre (Var. Désirée)	Foliole
	A13			“
	A14			“
	A20			“
El Mhaya	M4	22/02/2000	Pomme de terre (Var. Désirée)	Foliole
	M7			Tige
	M15			Foliole
	M18			”
Chlihat	SP1	24/02/2000	Pomme de terre (Var. Désirée)	Foliole
	SP4			”
	SP10			”
	SP11			Tige
	SP16			Foliole
	SP20			“
	SP30			“
	SP33			“

Tableau 3 : Pourcentages d'isolement de *P. infestans* à partir de tissus infectés provenant des 4 régions (la technique utilisée et le repiquage direct des sporocystes)

Localité	Nombre d'isolats	Organes utilisés	
		Feuilles	Tiges

Fes	18 (+7)	15%	3%
Ain-Cheggag	23	23%	0%
Sefrou	4	4%	0%
Meknès	56	51%	5%

II-3- Effet du substrat sur la survie du mycélium

Cette étude a été réalisée sur les mêmes isolats utilisés dans l'essai précédant et qui sont collectés à partir de localités différentes. La période de survie du mycélium sur les milieux de culture gélosés sans transfert correspond au temps nécessaire pour l'épuisement des besoins trophiques du pathogène contenus dans le substrat. Les milieux de culture gélosés testés sont ceux utilisés précédemment pour évaluer la croissance mycélienne. Les résultats obtenus montrent que quelque soit le milieu, la survie du champignon sur le milieu gélosé est remarquablement plus importante à 4°C (Fig. 11).

La rapide détérioration du mycélium lorsqu'il est incubé à la température ambiante (20-24°C) à l'obscurité montre la faible compétitivité du champignon par rapport aux saprophytes qui peuvent pousser dans des boîtes contenant le pathogène. Le milieu gélosé à base de petits pois a permis la plus grande période de survie du pathogène à savoir une période supérieure à 210 jours après incubation à 4°C et à l'obscurité. Pour les autres milieux gélosés le champignon peut rester en vie à 4°C et à l'obscurité pendant des périodes allant de 70 à 170 jours. Nous avons noté aussi que l'isolat I5S67 collecté de la tomate a une longévité plus faible par rapport à celle des isolats de pomme de terre. Les périodes de survie du pathogène obtenus dans les deux types de tests (4°C et 20-24°C) constituent des données minimales puisque le test d'évaluation de la longévité du champignon est réalisé par des transferts du pathogène pendant des intervalles de temps de 7 jours sur un milieu vierge non sélectif (sans antibiotique). Par conséquent, bien que les propagules du pathogène (mycélium

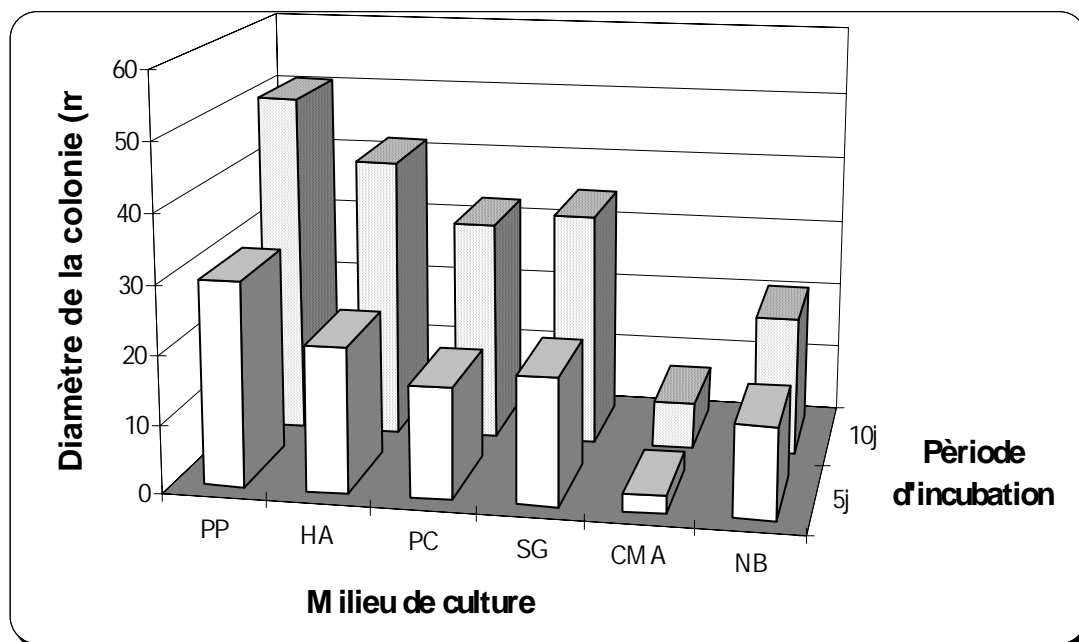


Figure 9 : Diamètres des colonies mycéliennes de *P. infestans* sur différents substrats 5 et 10 jours après incubation à 20 °C à l'obscurité (PP = Petits pois, HA = Haricot, PC = Pois chiche, SG = Seigle, CMA = Corn meal agar, NB = Nibier).

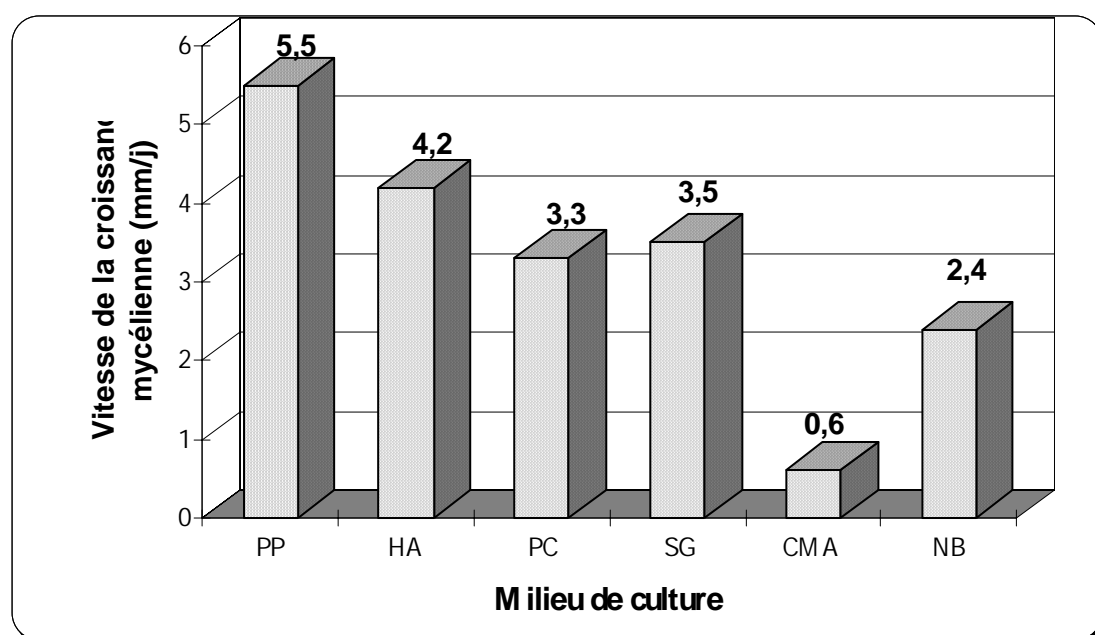


Figure 10 : vitesse de la croissance mycélienne selon le type de substrat (PP = Petits pois, HA = Haricot, PC = Pois chiche, SG = Seigle, CMA = Corn meal agar, NB = Nibier).

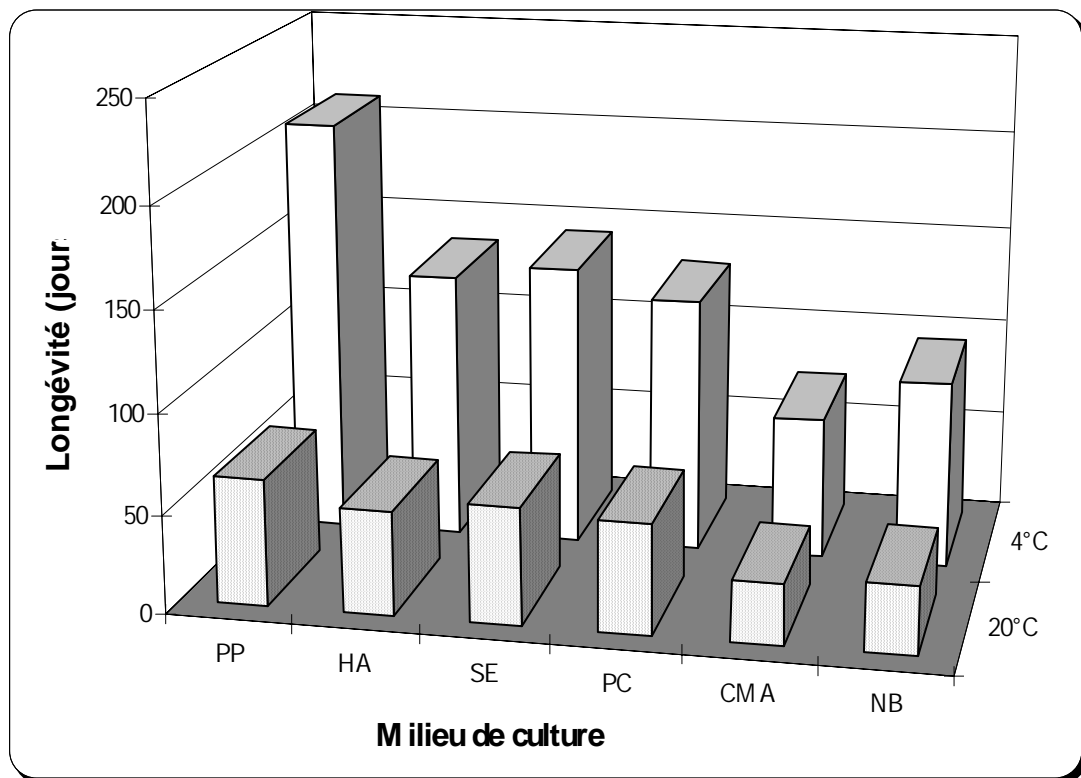


Figure 11 : Survie du mycélium de *P. infestans* sur différents substrats (PP = Petits pois, HA = Haricot, SE = Seigle, PC = Pois chiche, CMA = Corn Meal Agar, NB = Nibier).

ou spores) soient présents dans le fragment de gélose repiqué, l'existence de certains antagonistes limiteraient leur développement. Ce temps dépend aussi des performances intrinsèques de chaque isolat. Ces tests ont donc confirmé la performance du milieu PP pour la croissance et la conservation du pathogène. Le milieu à base de petit pois (PP) et de seigle (SG) sont les plus utilisés pour la mise en culture de *P. infestans* par la plupart des auteurs. Dans le présent test, le milieu de culture SG n'est pas révélé favorable pour la croissance mycélienne de nos isolats. Le milieu PP sera donc utilisé dans les différents tests conduits dans cette étude.

II-4- Pathogénicité des isolats

Tous les isolats dont nous avons réussi l'isolement se sont révélés pathogènes. En effet, les folioles de la variété de pomme de terre Désirée inoculées par les suspensions sporangiales ont toutes développé des lésions typique du mildiou 2 à 5 jours après incubation. Par contre, le comportement des tubercules est variable. Certains parmi eux n'ont manifesté aucun symptôme de la maladie, d'autres ont montré des degrés variables de pourriture caractéristique de *P. infestans*.

Par ailleurs, nous avons constaté que les isolats issus de la tomate sont relativement moins agressifs (petites lésions et faible sporulation) que ceux prélevés de la pomme de terre. Ceci peut être expliqué par la spécificité pathogénique du champignon vis à vis de l'hôte.

III- Caractérisation des isolats collectés

III- 1 - Détermination des morphotypes

Après 10 à 15 jours d'incubation, le champignon colonise la totalité de la boîte de petri. Trois morphotypes ont pu être distingués.

⇒ Morphotype 1 : La colonie est dense et possède une bordure souvent diffuse. Le mycélium aérien est très abondant et occupe souvent presque la totalité de la surface de la boîte de petri ; les sporocystes sont abondants (Fig. 12 A).

⇒ Morphotype 2 : La colonie ne se distingue de celle du morphotype 1 que par la bordure qui est nette (Fig. 12 B). Les deux morphotypes 1 et 2 peuvent parfois se transformer en un autre morphotype particulier caractérisé par un mycélium aérien moins abondant et une croissance en forme de bouquets. Ces derniers résultent de la ramification dichotomique intense du mycélium (Fig. 12 C).

⇒ Morphotype 3 : La colonie est peu dense et son contour est souvent net. Le mycélium aérien est absent ou peu développé. La sporulation asexuée est quasiment inexistante (Fig. 12 D). Les organes de reproduction sexués (oogones, anthéridies, oospores) sont par contre observés ; il s'agit d'isolats

autofertiles (P10F10 et P6F15). Le phénomène d'auto-fertilité observé s'avère cependant instable ; il disparaît après deux à trois repiquages successifs.

III-2- Groupement des isolats selon leur types sexuels

Les croisements des isolats collectés avec deux isolats sexuellement compatibles choisis au hasard (S2F18 et P10F1) ont mis en évidence l'existence de deux groupes d'isolats de types sexuels différents A1 et A2 (tableau 4). En effet, les confrontations de nos isolats avec chacun des deux isolats anglais de types sexuels A1 et A2 a permis la mise en évidence de la présence du type sexuel A2 pour la première fois au Maroc. Les distributions des types sexuels A1 et A2 dans les différentes localités visitées sont indiquées dans le tableau 5.

Ces résultats montrent que le type sexuel A2 existe dans toutes les régions prospectées, ce qui prouve la large distribution de la population de type sexuel A2. Cependant, cette distribution est variable selon les parcelles et les régions. En effet, cette hétérogénéité est moins importante si l'on analyse les types sexuels des isolats collectés de la même parcelle. Dans ce cas, il y a souvent une prédominance de l'un ou de l'autre des deux types sexuels appartenant à la même parcelle. Mais, si l'on considère toutes les régions prospectées, le taux des deux types sexuels tend à être comparable. La coexistence des deux types sexuel A1 et A2 dans la même parcelle ou dans des parcelles peu distantes augmentera la probabilité de l'accomplissement de la reproduction sexuelle en plein champ.

Par ailleurs, il n'y a pas de distinction entre les deux types sexuels A1 et A2 basée uniquement sur l'aspect des colonies. En effet, deux isolats de type sexuels différents peuvent avoir le même aspect de colonie mycélienne (Fig. 13).

Tableau 4 : Groupement des 108 isolats selon leur types sexuels

Type sexuel A1	Type sexuel A2
P6F16; P6F17; S2F18 ; S2F19 ; S1F4 ; S1F15 ; M18 ; M7; M4. F10; F13 ; F38 ; F42 ; F48; F50; F52 ; F55 ; F58 ; F59; F60; F61; F62 ; F63 ; F70 ; F73 ; F75 ; F77 ; F78 ; F80; F82 ; F83 ; F85 ; F90; F92 ; F93 ; F94 ; F98 ; F110. SP4 ; SP10 ; SP11; SP31 ; SP33.	I1S67; I2S68 ; I3S67; I4S67; I5S56; I6S67; I7S67. P3F1; P5F6; P6F4 ; P6F11; P6F12 ; P6F14 ; P6F15*. P7F1; P7F2; P7F3; P10F1*; P10F2 ; P10F3 ; P10F4 ; P10F5 ; P10F6 ; P10F10* ; P10F18 ; P10F20 ; P10F33. S1F27 ; S1F35; S2F1; S2F5; S2F6; S2T9; S2F14; S2F20; S2F22; S2F25 ; S2T30 ; S3F12 ; S3F21; S3F25 ; S3F28 ; S3F31 ; S3F39 ; S3T40. FO1; FO2 ; FO3 ; FO4 ; FO5 ; F45 ; F54 ; F91; F96 ; F 97 ; F108 ; F109 ; M15 SP1 ; SP16 ; SP20 ; A12 ; A13 ; A14 ; A20.

*: Isolats ayant présentés une autofertilité instable

Tableau 5 : Distribution des types sexuels selon les régions

Localité	Type sexuel	
	A1	A2
Fes	3 (12 %)	22 (88 %)
Ain-Cheggag	2 (9 %)	21 (91 %)
Sefrou	2 (50%)	2 (50 %)
Meknès	36 (64%)	20 (36%)

III-3- Niveaux de sensibilités des isolats au métalaxyl

III-3-1- *In-vitro*

La sensibilité au métalaxyl a été évaluée pour 99 isolats collectés de quatre localités. Cette évaluation a essentiellement portée sur l'effet du métalaxyl sur la croissance mycélienne des isolats. Ce test nous a permis d'évaluer la réponse des isolats vis à vis de cette formulation. La figure 14 montre les réactions d'un isolat résistant à différentes concentrations du métalaxyl. Les CI50 déterminées graphiquement pour 99 isolats montrent que le degré de sensibilité au métalaxyl varie selon les isolats (tableau A en Annexe). Quatre groupes peuvent ainsi être distingués selon leur CI50 (tableau 6) :

- groupe 1 : caractérisé par des CI50 comprises entre 0.5 et 1µg/ml et représente 16% des isolats.
- groupe 2 : possède des CI50 variant de 1 à 10 µg/ml et regroupe 37%des isolats issus de toutes les localités prospectées.
- groupe 3 : montre des CI50 allant de 10 et 100µg/ml et rassemble 36% des isolats.
- groupe 4 : manifeste des CI50 supérieures à 100µg/ml et réunit 10 % des isolats.

Les concentrations effectives CI₁₀₀ permettant d'inhiber complètement la croissance mycélienne se sont aussi révélées variables selon les isolats (tableau 5 en annexe). Ces concentrations varient entre 10 et 100µg/ml. Le tableau 7 montre la répartition des isolats en 4 groupes selon leur CI₁₀₀.

Le premier groupe dont la CI_{100} est comprise entre 0.1 et 1 représente 2% des isolats, le deuxième groupe ayant des CI_{100} variant de 1 à 10 $\mu\text{g/ml}$ constitue 12% des isolats, le troisième groupe dont la CI_{100} varie entre 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$ rassemble 24% des isolats, et le quatrième groupe possédant des CI_{100} supérieures à 100 $\mu\text{g/ml}$ constitue 61% des isolats étudiés. Les 7 isolats issus de tomate dans la région de Fès font partie du premier et de deuxième groupes.

Selon l'échelle d'évaluation de niveau de sensibilité de FRAC (Duvauchelle, 1997), 24 % des isolats sont sensibles, 27% sont moyennement sensibles, 29% sont moyennement résistants et 19% sont résistants (tableau 8). Les isolats collectés de la tomate se sont révélés tous sensibles alors que le comportement des isolats collectés de pomme de terre diffère selon les isolats. Les isolats résistants sont rencontrés dans les régions de Ain Cheggag, de Fes, de Meknès, mais sont absents à Sefrou (tableau 9). Par contre, la grande majorité des isolats sensibles est remarquée dans la région de Meknès. Quant aux isolats à sensibilité ou à résistance intermédiaires, ils sont relevés dans les quatre localités.

Le groupement des isolats selon leur type sexuel et leur niveau de résistance au métalaxyl montre que les isolats résistants au métalaxyl se rencontrent plus dans le type sexuel A2 (25%) que dans le type sexuel A1 (10%) (tableau 9). Inversement, il y a plus d'isolats sensibles parmi le type sexuel A1 (29%) que dans le type sexuel A2 (23%). Nous remarquons donc qu'il existe une tendance vers une association entre la résistance au métalaxyl et le mating type A2.

Tableau 6 : Distribution des isolats dans les différentes localités selon leur CI_{50} déterminées *in-vitro*

Localités	Total (isolats)	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
		0.1 - 1	1 - 10	10 - 100	> 100
Fès	24	3	7	12	2
Sefrou	2	0	2	0	0
Ain- Cheggag	17	1	3	8	5
Meknès	56	11	26	16	3

Tableau 7 : Distribution des isolats dans les différentes localités selon leur CI_{100} déterminées *in-vitro*

Localité	Total (isolats)	CI_{100} (ug/ml)			
		0.1 - 1	1 - 10	10 - 100	>100
Fès	24	2	5	5	12
Sefrou	2	0	0	1	1
Ain-Cheggag	17	0	1	2	14
Meknès	56	0	6	16	34

Tableau 8 : Distribution des isolats dans les différentes localités selon leurs niveaux de sensibilité *in-vitro* au métalaxyl.

Localités	Sensible	Moyennement sensible	Moyennement résistant	Résistant	Total (isolats)
Fès	7 *	2	9	6	24
Sefrou	0	1	1	0	2
Ain- Cheggag	1	2	5	9	17
Meknès	16	22	14	4	56

* isolats issus de la tomate.

Tableau 9 : Distribution des classes des phénotypes dans les différentes localités.

Localités	A1-SM	A1-MSM	A1-MRM	A1-RM	A2-SM	A2-MSM	A2-MRM	A2-RM	Total
Fès	-	-	1	1	7	2	8	5	24
Sefrou	-	-	-	-	1	1	-	-	2
Ain-Cheggag	-	-	-	2	1	2	5	7	17
Meknès	11	17	7	1	5	5	7	3	56
Total	11 (27%)	17 (43%)	8 (20%)	4 (10%)	14(23%)	10 (17%)	20 (34%)	15(25%)	99

SM = Sensible au métalaxyl , MSM = Moyennement sensible au métalaxyl, MRM = Moyennement résistant au métalaxyl, RM = Résistant au métalaxyl.

III-3- 2- *In-vivo*

Le test de la sensibilité des isolats au métalaxyl mené sur des disques de feuillage de la variété Désirée (Fig. 15) a pour objectif de confirmer les résultats obtenus *in-vitro*. L'examen des CI_{50} des isolats illustre clairement la grande variabilité des valeurs enregistrées allant de 0.5 jusqu'à des CI_{50} supérieures à 100 $\mu\text{g/ml}$ (tableau A en Annexe). Ces valeurs renseignent déjà sur l'existence des différences de niveaux de sensibilité au métalaxyl *in-vivo* entre les isolats étudiés. Pour les 7 isolats de la tomate, presque les même valeurs de CI_{50} relevées *in-vitro* sont enregistrées *in-vivo*, alors que certains isolats de la pomme de terre n'ont pas manifesté les même niveaux de sensibilité au métalaxyl que dans le test *in-vitro*. Le tableau 10 regroupe les isolats selon leur CI_{50} déterminées *in-vivo*. Quatre classes peuvent aussi être distinguées, la première classe des isolats possèdent des CI_{50} qui varient entre 0.1 et 1 $\mu\text{g/ml}$ (27% des isolats), la deuxième classe dont la CI_{50} est comprise entre 1 et 10 $\mu\text{g/ml}$ (37 %), la troisième classe possède des CI_{50} variant entre 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$ (30%), et la quatrième classe ayant une CI_{50} supérieure à 100 $\mu\text{g/ml}$ (6%). Les isolats collectés de la tomate font partie du premier groupe, tandis que les isolats collectés de la pomme de terre sont répartis sur les quatre groupes.

Tableau 10 : Distribution des isolats dans les différentes localités selon leurs CI_{50} déterminées *in-vivo*.

Localités	Total (Isolats)	CI_{50} (ug/ml)			
		0.1 - 1	1 - 10	10 - 100	>100
Fès	24	6	9	8	1
Sefrou	2	0	1	1	0
Ain-Cheggag	17	1	4	9	3
Meknès	56	19	25	10	2

Tableau 11 : Distribution des isolats dans les différentes localités selon leur CI_{100} déterminées *in-vivo*

Localité	Total (isolats)	CI_{100} (ug/ml)			
		1	10	100	>100
Fès	24	3	4	10	7
Sefrou	2	0	1	1	0
Ain-Cheggag	17	0	2	6	9
Meknès	56	0	9	20	27

Tableau 12 : Distribution des isolats dans les différentes localités selon leurs sensibilité *in-vivo* au métalaxyl.

Localités	Total (Isolats)	Sensibl e	Moyennement sensible	Moyennement résistant	Résistant
Fès	24	8	5	7	4
Sefrou	2	0	1	1	0
Ain-Cheggag	17	3	2	8	4
Meknès	56	37	7	10	2

De même, les concentrations du métalaxyl inhibant la sporulation à 100 % sont variables selon les isolats. En effet, elles varient de 1 µg/ml jusqu'à des valeurs supérieures à 100µg/ml. En ce qui concerne cette dose (CI₁₀₀), 3% des isolats ont des CI₁₀₀ égale à 1µg/ml, 17% ont des CI₁₀₀ approximativement égales à 10µg/ml, 37% ont des CI₁₀₀ égales à 100µg/ml et 42% possèdent des CI₁₀₀ supérieures à 100µg/ml (tableau 11). Ces valeurs renseignent sur la faculté de certaines souches de *Phytophthora infestans* à supporter des doses importantes de ce fongicide.

La détermination *in-vivo* des facteurs de résistance par la méthode du FRAC a révélé que 48% des isolats sont sensibles, 15% sont moyennement sensibles, 26% sont moyennement résistants et 10% sont résistants (tableau 12). Les 7 isolats collectés de tomate se sont révélés ainsi sensibles à ce fongicide. La majorité des isolats de la pomme de terre qui sont sensibles ont pour origine la région de Meknès (77%). Les proportions des isolats résistants sont relativement faibles dans les différentes localités. Les deux isolats collectés de la région de Sefrou sont classés dans le groupe à résistance intermédiaire.

Le groupement des isolats collectés selon leur type sexuel et leur résistance *in-vivo* au métalaxyl est montré dans le tableau 13. Les proportions des différents phénotypes mis en évidence sont les suivant : 29% des isolats sont A1-SM, 5% sont A1-MSM, 5 % sont A1-MRM, 2 % sont A1-RM, 20% sont A2-SM, 10% A2-MSM, 21% A2-MRM et 8% sont A2-RM. Cette distribution des isolats confirme la relation étroite qui existe entre la résistance au métalaxyl et le « mating type » A2.

Ces résultats confirment que les populations de *P. infestans* dans les localités prospectées sont hétérogènes en ce qui concerne les deux caractères étudiés aussi bien au niveau de la même parcelle qu'au niveau de parcelles différentes.

Tableau 13 : Distribution des isolats dans les différentes localités selon leur types sexuels et leur sensibilité *in-vivo* au métalaxyl.

Localité	A1-SM	A1-MSM	A1-MRM	A1-RM	A2-SM	A2-MSM	A2-MRM	A2-RM
Fès	-	-	1	1	8	5	6	3
Sefrou	-	-	-	-	-	1	1	-
Ain- Cheggag	-	-	2	-	3	2	6	4
Meknès	28	5	2	1	9	2	8	1
Total (isolats)	28 (70%)	5 (12,5%)	5 (12,5%)	2 (5%)	20 (34%)	10 (17%)	21 (36%)	8 (13%)

III-4- Croissance mycélienne des isolats sur petits pois

La capacité de croissance mycélienne de 99 isolats a été évaluée sur le milieu à base de petits pois après 10 jours d'incubation (20°C à l'obscurité). Les analyses statistiques ont révélé une différence significative ($P > 0.05$) du facteur isolat (tableau 3 en annexe). Les isolats issus de la tomate ont développé les colonies les plus faibles dont les diamètres moyens varient entre 22 et 34 mm. Pour les isolats de la pomme de terre, le diamètre de la colonie mycélienne est compris entre 23.5 mm et 77 mm.

La figure 16 montre la variabilité des diamètres des colonies des isolats déterminés pour chaque localité. L'analyse de la variance a montré une différence significative ($P < 0.05$) du facteur origine des isolats (tableau 4 en annexe). Les isolats collectés de Ain-Cheggag ont développé les colonies les plus larges (55 mm en moyenne). Par contre, celles observées chez les populations du pathogène prélevées de la région de Fès et de Meknès sont approximativement de 50 et 33 mm de diamètre respectivement. Il est essentiel de noter que la variabilité de la croissance mycélienne est observée chez les isolats collectés d'une même parcelle ou de parcelles différentes.

L'utilisation de ce paramètre de croissance a permis de classer les isolats en 6 groupes selon leur capacité de croissance mycélienne sur le milieu PP (Fig.17) :

- La première classe rassemble 18% des isolats (18 isolats). Ceux ci peuvent développer des colonies de diamètre allant de 20 à 30 mm.
- Le deuxième groupe comprend 30 % (29 isolats). Les colonies mycéliennes de ces derniers ont des diamètres compris entre 30 et 40 mm.
- Le troisième groupe contient 23% des isolats (soit 23 isolats) dont la croissance mycélienne est comprise entre 40 et 50mm de diamètre.
- La quatrième classe regroupe 18 % des souches (18 isolats) dont le diamètre des colonies mycélienne varie entre 50 et 60 mm.
- Le cinquième groupe contient 5% des isolats (5 isolats) dont le diamètre varie entre 60 et 70 mm.
- Le sixième groupe englobe 6 % des isolats testés (6 isolats). Dans ce cas, le diamètre est compris entre >70-80 mm.

La comparaison de la capacité de croissance mycélienne des 8 phénotypes (Cf. III-3) a été réalisée. L'analyse de variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur phénotype (tableau 5 en annexe). Les isolats A1-RM et A2-RM ont une croissance mycélienne plus importante que celles des autres phénotypes (Fig. 18). Les isolats A2-RM ont des colonies plus larges que celles des isolats A1-RM. Le diamètre moyen de la colonie de ces derniers phénotypes est d'environ 62 mm alors que celui des isolats A2-RM peut atteindre 73 mm. Le diamètre des colonies des autres phénotypes à savoir A1-SM, A1-MSM, A1-MRM, A2-MSM et A2-MRM varie entre 35 et 48mm.

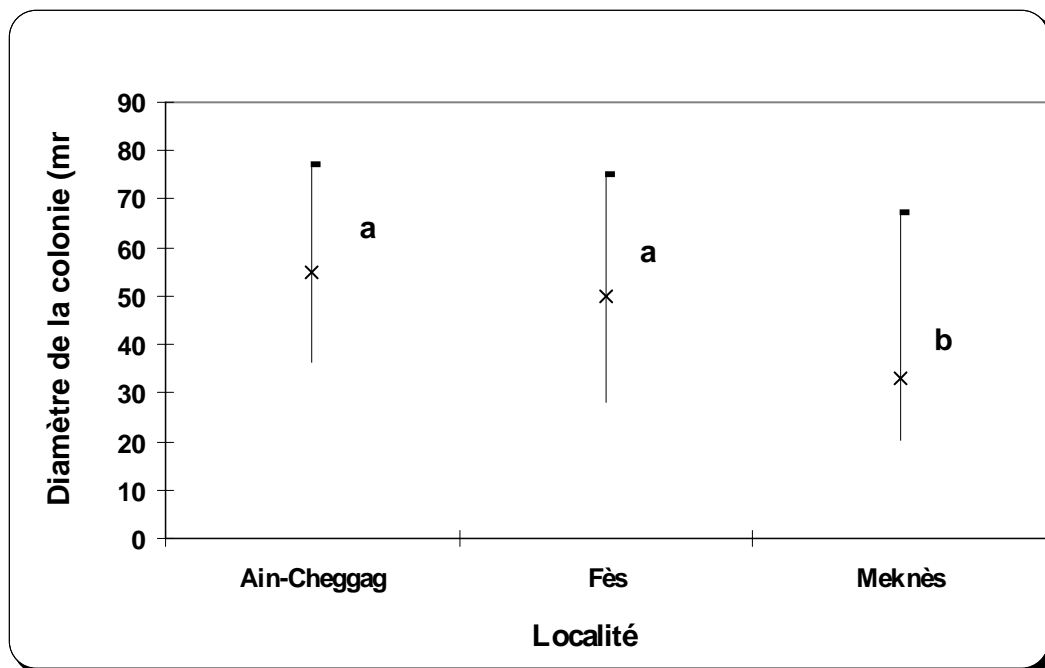


Figure 16 : Croissance mycélienne des isolats selon leur origine (les points de la courbe suivis par les même lettres ne sont pas significativement différents à $P = 0.05$).

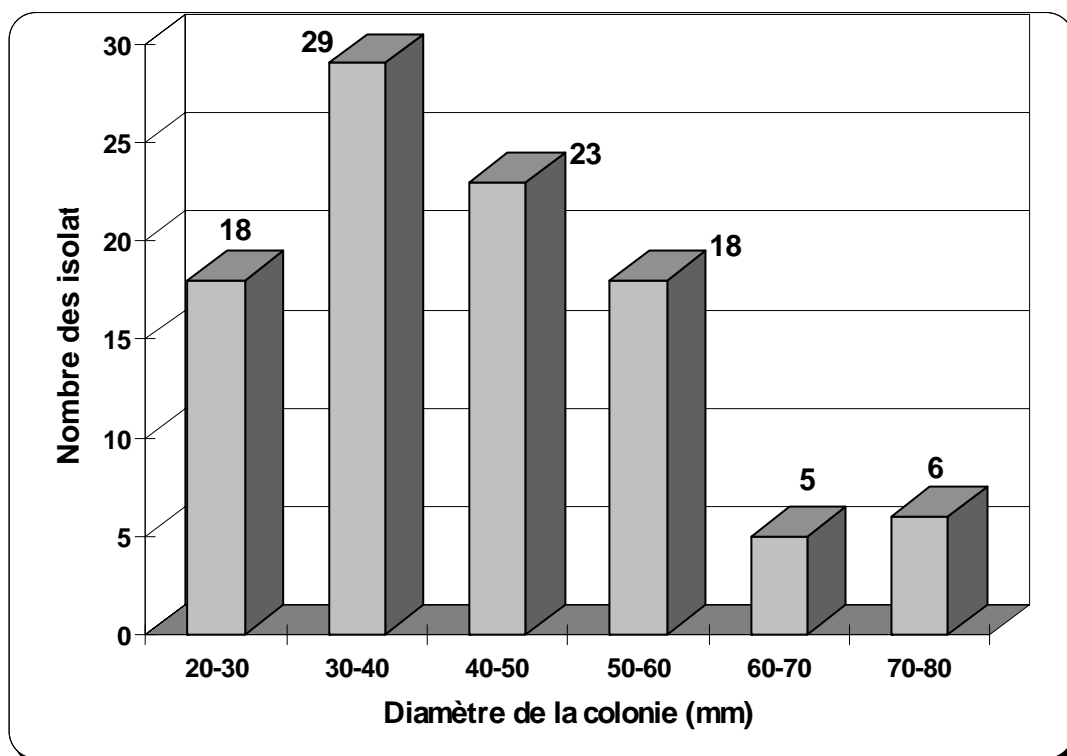


Figure 17 : Distribution des isolats selon leur croissance mycélienne après 10 jours d'incubation

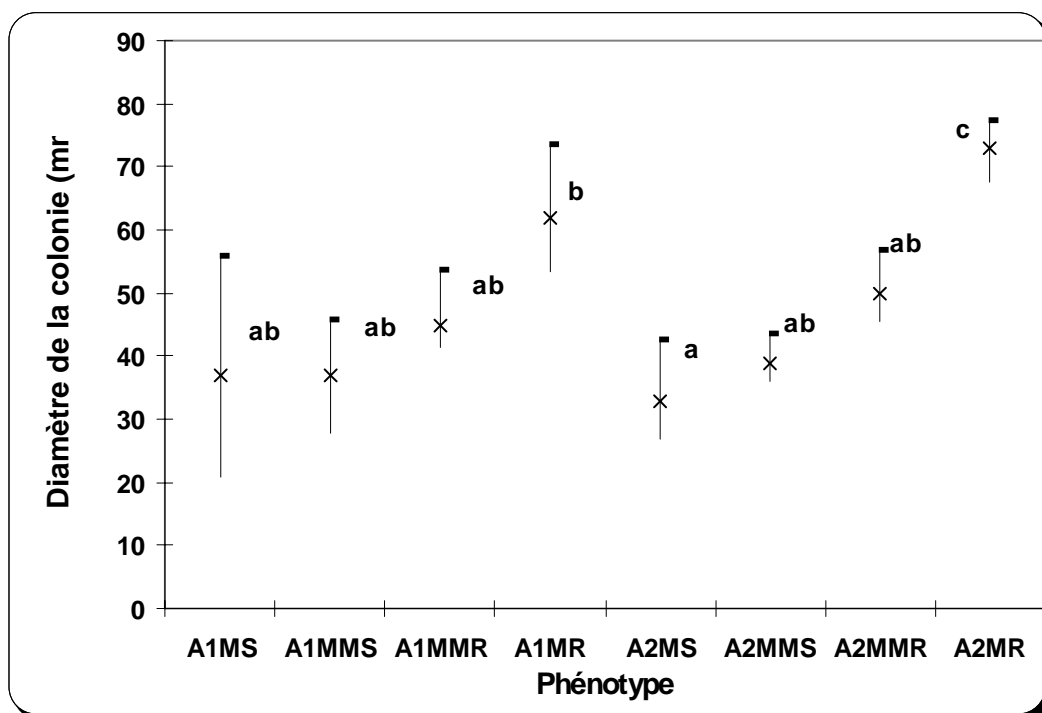


Figure 18 : Croissance mycélienne des isolats selon leur phénotypes (Type sexuel + résistance au métalaxyl) après 7 jours d'incubation (les points de la courbe suivis par les meme lettres ne sont pas significativement différents à $P=0.05$).

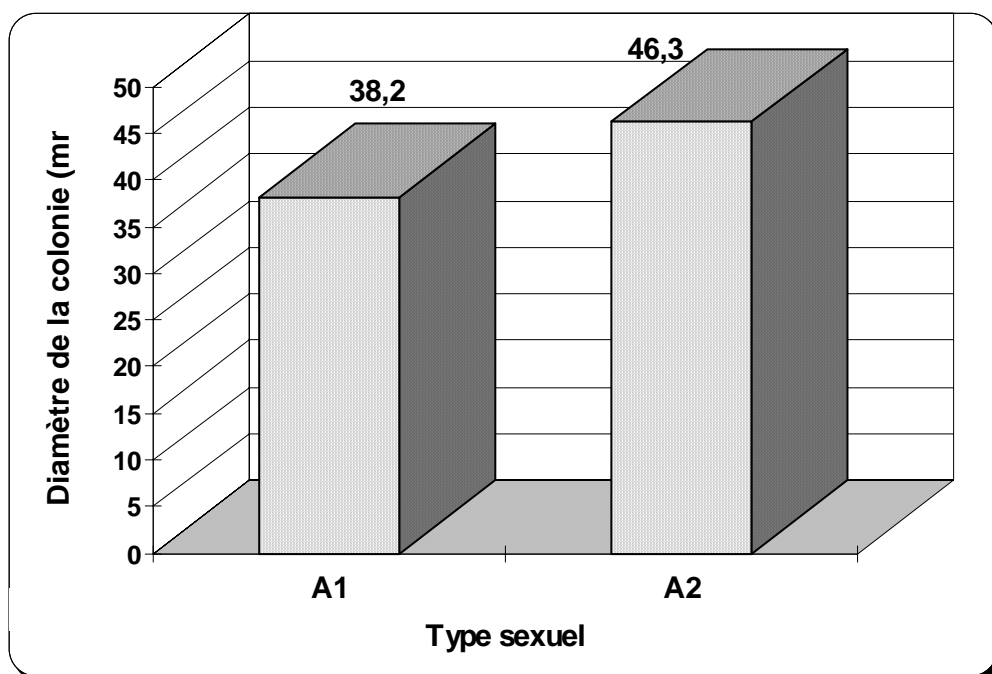


Figure 19 : Croissance mycélienne moyenne des isolats selon leur types sexuels après 10 jours incubation.

Ces résultats montrent que plus le niveau de la sensibilité au métalaxyl est important, plus la croissance mycélienne est faible.

Par ailleurs, Si l'on considère uniquement le mating type, la croissance mycélienne des isolats de type sexuel A1 diffère significativement ($P < 0.05$) de celle de type sexuel A2 (tableau 6 en annexe). Les isolats de type sexuel A1 développent des colonies dont le diamètre moyen est de 38 mm (Fig. 19), alors que le diamètre moyen des isolats de type sexuel A2 est de 46mm.

III-5-Intensité de sporulation *in-vitro*

L'intensité de sporulation des isolats a été déterminée sur des colonies ayant poussée sur le milieu PP pendant 10 jours. La figure 20 montre des sporocystes caractéristiques de *P. infestans*. L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur isolat (Tableau 7 en Annexe). Les isolats collectés de la tomate ont montré les plus faibles capacités de sporulation (tableau en annexe). Ces intensités varient entre 0.2×10^4 et 2×10^4 sporocystes ml^{-1} , tandis que celles déterminées chez les isolats collectés de la pomme de terre varient entre 0.3×10^4 et 21.9×10^4 sporocystes ml^{-1} .

la sporulation *in-vitro* des isolats dépend aussi de la localité d'origine. En effet, les analyses statistiques ont montré l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur origine des isolats (tableau 8 en annexe). Les souches provenant de Meknès sporulent moins que celles qui sont issus de Ain-Cheggag et de Fès (Fig. 21). Il s'agit donc d'une différence de performance.

La caractérisation de nos isolats en utilisant le paramètre de sporulation *in-vitro* a permis de les répartir en 5 groupes (Fig. 22).

La variation de la sporulation des isolats selon leur phénotypes (type sexuel et résistance au métalaxyl) a été examinée et l'analyse de la variance a montré la présence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur phénotype (tableau 9 en annexe). Comme pour la croissance mycélienne, les isolats A1-RM et A2-RM produisent plus de sporocystes que les autres phénotypes (Fig. 23). Nous remarquons la grande performance des isolats A2-RM (20.4×10^4 sporocystes ml^{-1}) à produire les sporocystes en comparaison avec les isolats A1-RM et les autres phénotypes. Comme pour la croissance mycélienne, nos résultats montrent que plus le niveau de la sensibilité au métalaxyl des isolats est grand plus l'intensité de la sporulation est faible. Néanmoins, même les isolats sensibles au métalaxyl sont capables de produire des sporocystes à des concentrations élevées.

Par ailleurs, la figure 24 montre que les isolats de type sexuel A2 produisent plus de sporocystes que ceux de type sexuel A1. En effet, l'analyse de la variance a montré l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur type sexuel (tableau 10 en annexe).

L'utilisation du critère de sporulation *in-vitro* a aussi montré la variabilité qui caractérise le comportement des souches collectées des localités étudiées.

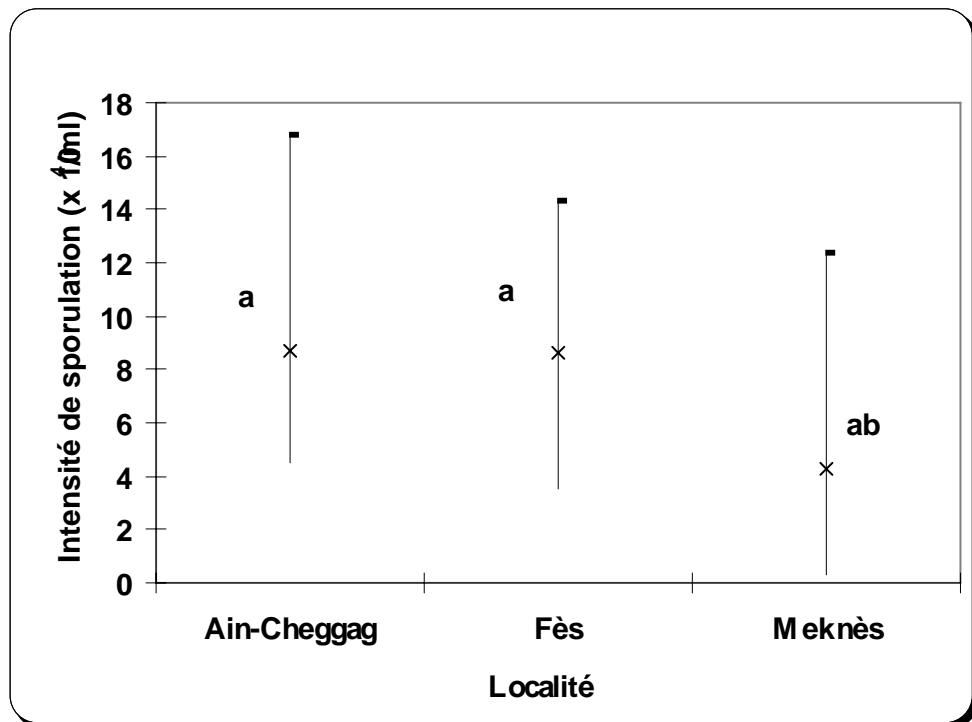


Figure 21 : Sporulation des isolats selon leur origine (les point de la courbes marqués par les même lettres se sont pas significativement différents à P= 0.05)

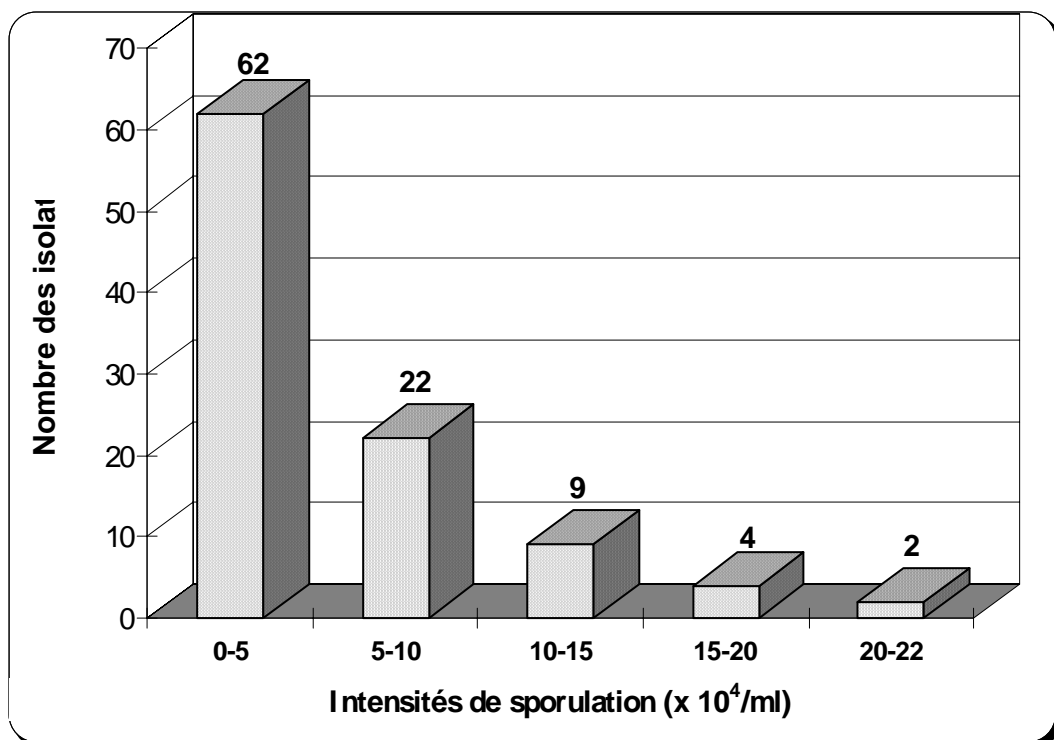


Figure 22: Distribution des isolats selon leurs capacités de sporulation in-vitro (sur milieu PP) 10 jours après incubation.

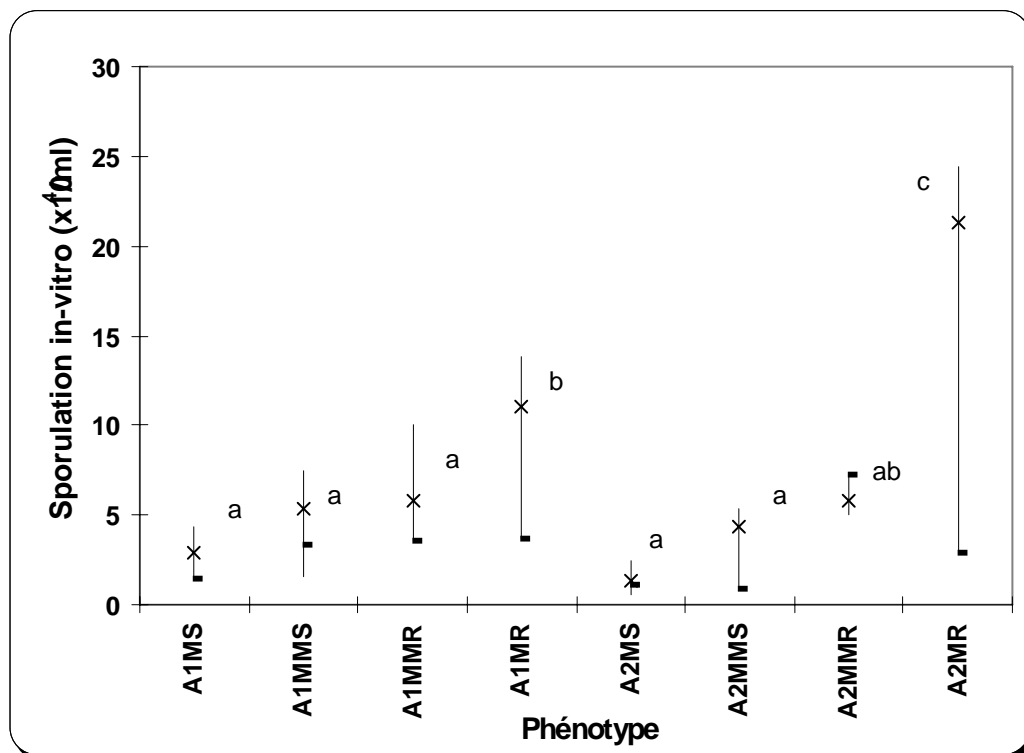


Figure 23 : Sporulation (in-vitro) des isolats selon leur phénotypes (type sexuel + résistance au métalaxyl) (les coordonnés suivis par les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à P=0.05).

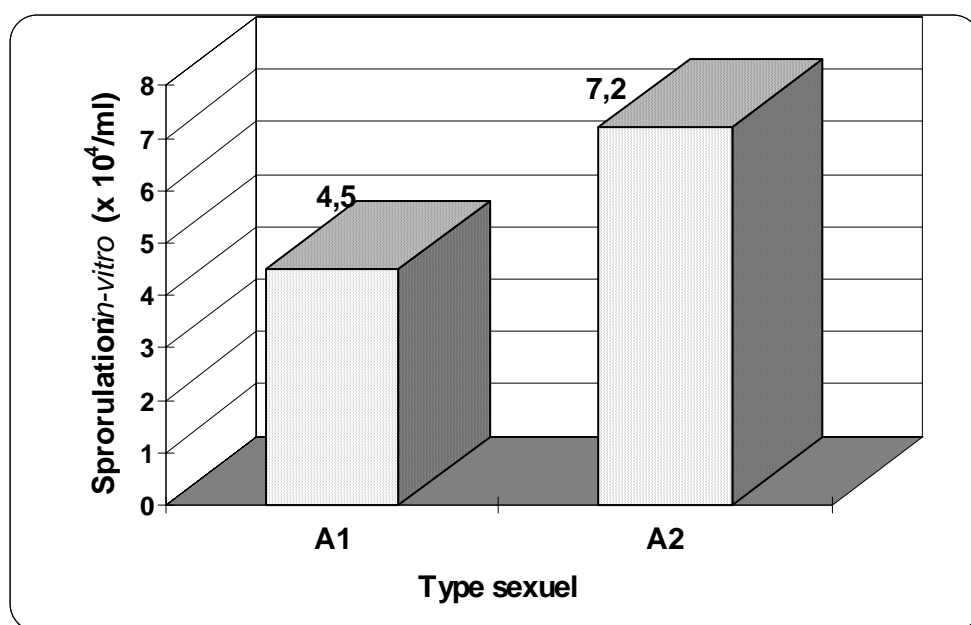


Figure 24 : Sporulation in-vitro des isolats après 10 jours d'incubation selon leur types sexuels.

III-6- Germination des sporocystes

III-6-1- Germination directe

Le taux de germination directe sont déterminés pour les 99 isolats après 4, 8, 12 et 24h d'incubation sur le milieu à base d'eau gélosée (0.2%) à 20°C. Les résultats des taux de germination direct sont illustrés dans le tableau B en annexe pour les 99 isolats testés. Les analyses statistiques ont révélé une différence significative ($P < 0.05$) du facteur isolat pour les périodes d'incubation de 8, 12 et 24 h (tableau 11 en annexe). Les isolats de tomate ont des taux de germination significativement plus faibles que ceux relevés chez les isolats de la pomme de terre. Pour les isolats issus de la tomate, le taux de germination directe moyen est de 2 %, 7 %, 14% et de 27 % après une période d'incubation de 4, 8, 12, et 24 h respectivement. Par contre, chez les isolats de la pomme de terre, ces taux sont 8%, 18 %, 28% et 47 % après 4, 8, 12, et 24h d'incubation respectivement.

La distribution des isolats selon leur taux de germination directe après 24 h d'incubation a été établie et six groupes d'isolats sont ainsi distingués (Fig. 25)

Le facteur origine des isolats a un effet significatif ($P < 0.05$) sur le pouvoir de germination directe des sporocystes (tableau 12 en Annexe). La figure 26 montre la variabilité des taux de germination directe des isolats selon leur localité d'origine. En effet, les isolats collectés de la région de Ain-Cheggag ont des pourcentages de germination (6, 18, 31, et 52% après 4, 8, 12 et 24 heures d'incubation respectivement) plus élevés par rapport aux isolats des deux autres localités.

La variation des taux de germination directe des isolats selon leurs phénotypes (type sexuel et résistance au métalaxyl) a été examinée et l'analyse de la variance a montré l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur phénotype (tableau 13 en annexe). Indépendamment du type sexuel, les isolats moyennement résistants et ceux résistants ont des pourcentages de germination plus important que les isolats moyennement sensibles et ceux sensibles (Fig. 27). La comparaison des taux de germination directe en utilisant uniquement le facteur type sexuel a révélée la présence d'une différence significative de ce facteur (tableau 14 en annexe). Les sporocystes des isolats de type sexuel A2 donnent un taux de germination plus élevé que celui des sporocystes des isolats de type sexuel A1 (Fig. 28).

III-6-2- Germination indirecte

L'évaluation de la germination indirecte est réalisée pour les 99 isolats sur le milieu PP à 4°C après 1h, 2h, 3h et 4h d'incubation (tableau B en annexe). Les analyses de la variance ont révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur isolat pour les périodes 3h et 4h d'incubation (tableau 15 en

annexe).

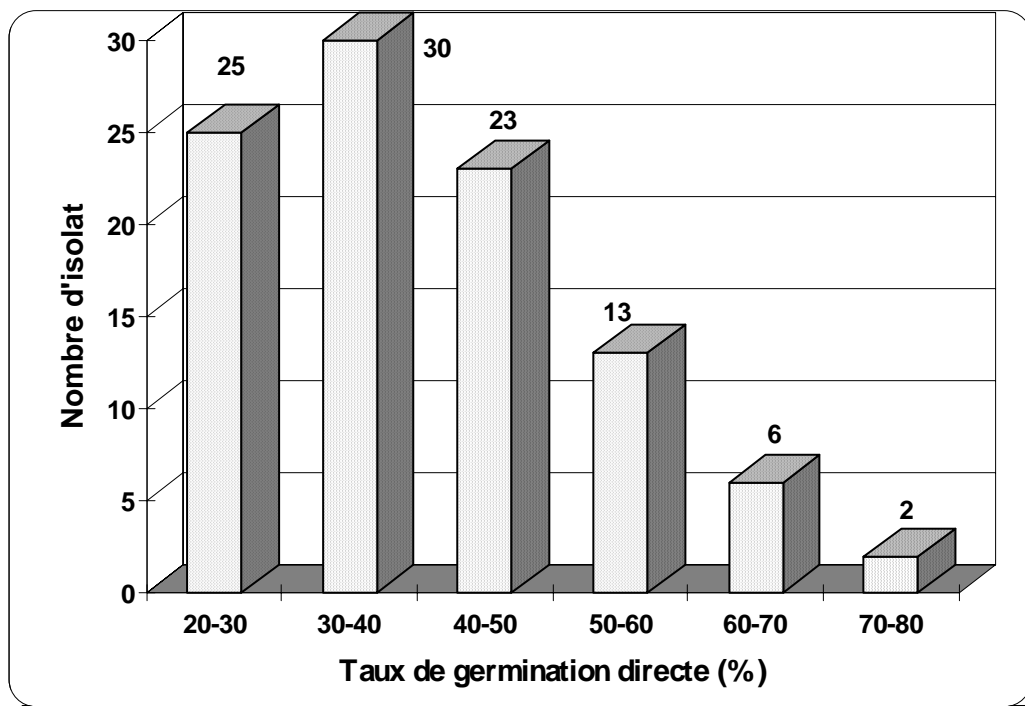


Figure 25 : Distribution des isolats selon le pouvoir de germination directe des sporocystes 24 h après incubation.

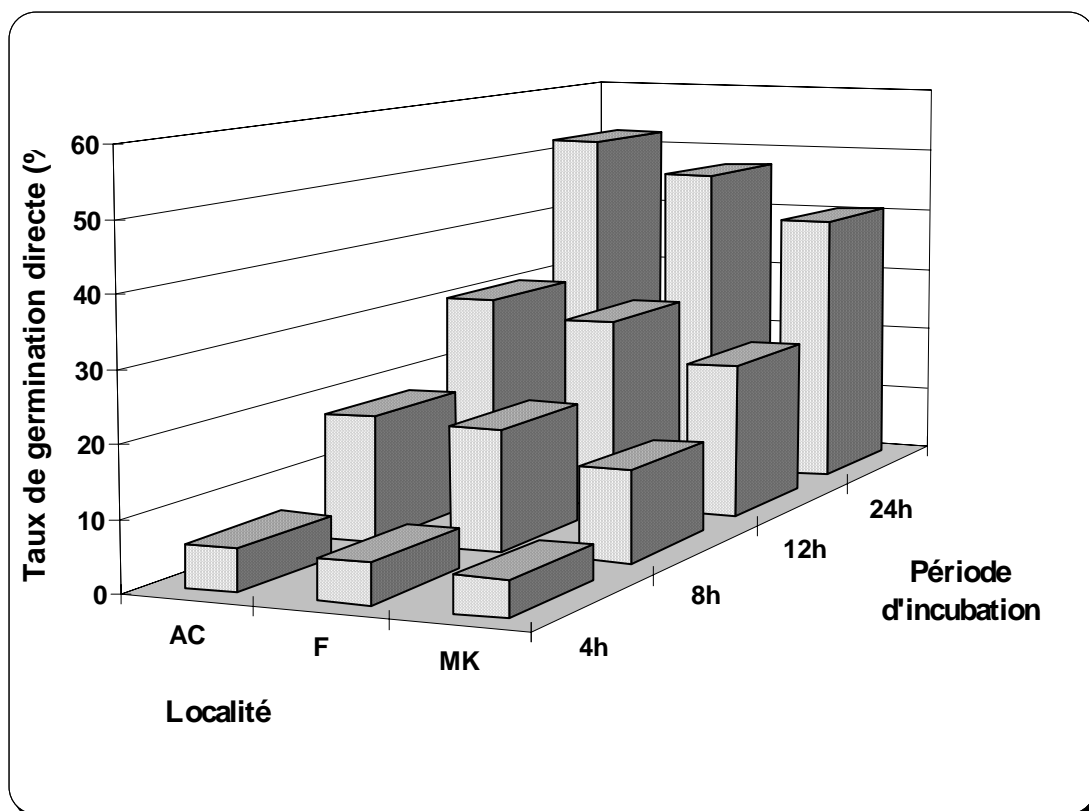


Figure 26 : Germination directe des sporocystes des isolats appartenant aux différentes localités 4, 8, 12 et 24h après incubation (AC = Ain-Cheggag ; F = Fès ; MK = Meknès).

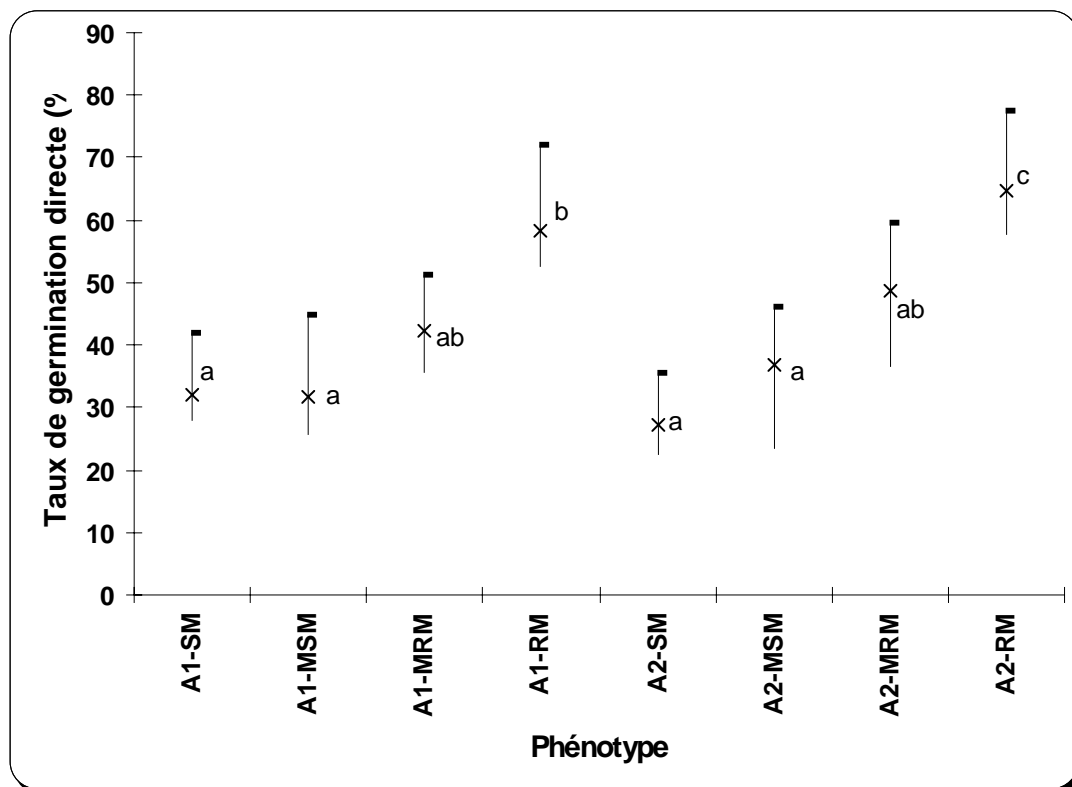


Figure 27 : Germination directe des sporocystes des isolats selon leur phénotypes (type sexuel + résistance au métalaxyl) (les points de la courbe suivis par les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $P=0.05$).

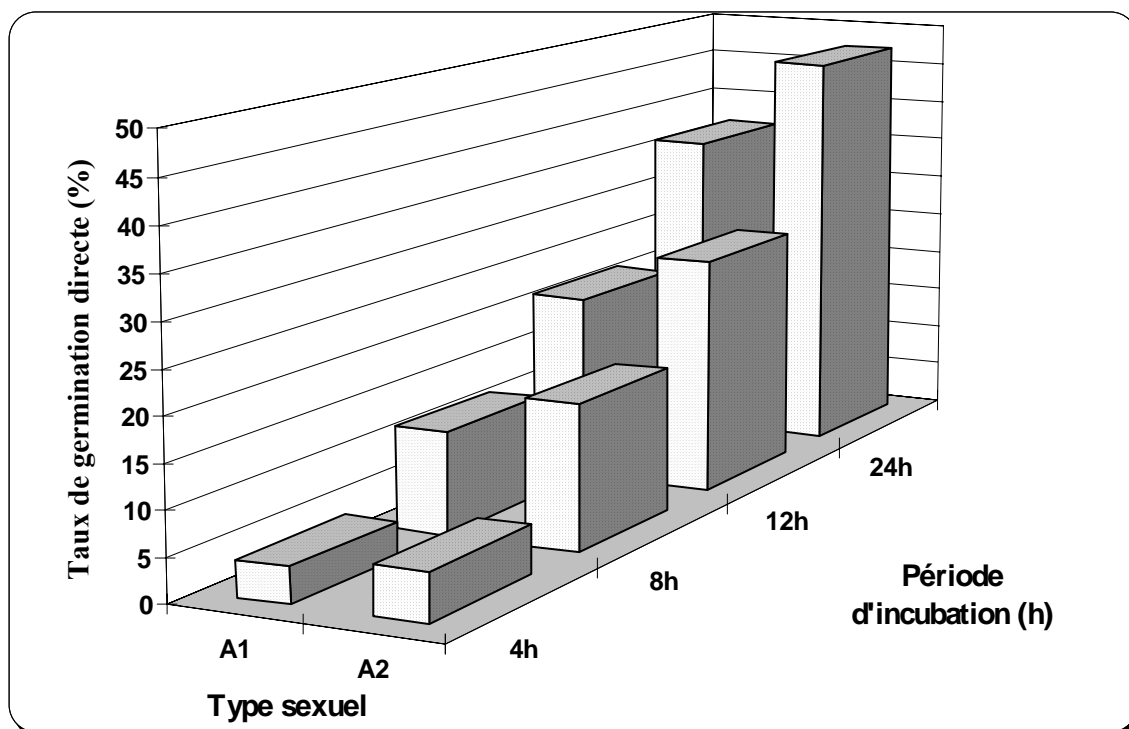


Figure 28 : Germination directe des sporocystes des isolats selon leur types sexuels.

Les résultats montrent que pour la plupart des isolats, plus les sporocystes sont exposés au froid, plus la production des zoospores est importante. La production maximale est obtenue après 4h d'incubation. Cependant, les valeurs enregistrées après 3h et 4h sont relativement comparables. Les productions les plus faibles sont notées chez les isolats issus de la tomate. Le groupement des isolats selon la capacité de germination indirecte des sporocystes a permis de distinguer 5 classes. Il s'agit d'une distribution hétérogène puisque le nombre des isolats est souvent variable d'une classe à l'autre (Fig. 29).

Par ailleurs, l'effet significatif du facteur origine de l'isolat sur la germination indirecte des sporocystes a été relevé uniquement après 3h et 4h d'incubation (tableau 16 en Annexe et figure 30). La production des zoospores chez les isolats collectés de Ain-Cheggag est de 12.9×10^4 et 14.9×10^4 zoospores ml^{-1} après 3 et 4 heures d'incubation respectivement, alors que celles enregistrées pour la population de la région de Fès sont 10.6×10^4 et 11.2×10^4 zoospores ml^{-1} . Chez la population de *P. infestans* de la région de Meknès, les concentrations de zoospores sont plus faibles par rapport aux deux autres localités et sont de 7.2×10^4 et 7.5×10^4 zoospores ml^{-1} après les mêmes périodes d'incubation.

L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence hautement significative du facteur phénotype pour la germination indirecte des sporocystes (tableau 17 en annexe). Les intensités de germination les plus importantes sont notées chez le phénotype A2-RM et A1-RM, tandis que la production des zoospores enregistrée chez les isolats A1-SM et A2-MS est faible (Fig. 31). Les autres phénotypes possèdent des taux de germination indirecte intermédiaire. Ces résultats montrent que plus le niveau de résistance au métalaxyl est élevé, plus le pouvoir de germination indirecte est important.

Par ailleurs, la comparaison des isolats basée uniquement sur leurs types sexuels a révélé que les isolats de type sexuel A2 ont un pouvoir germinatif relativement plus important que celui des isolats de type sexuel A1 (tableau 18 en annexe). En effet, l'intensité moyenne des zoospores relevées chez les isolats de type sexuel A1 est de 6.7×10^4 zoospores ml^{-1} après 3h d'incubation, alors que chez les isolats de type sexuel A2, cette intensité est de 11×10^4 zoospores ml^{-1} approximativement après la même période d'incubation (Fig. 32).

L'étude de ce caractère a encore une fois montré l'existence d'une variabilité des isolats collectés de la même région ou des localités différentes. Ceci indique la nature hétérogène de la population de *P. infestans* présentes dans la zone d'étude.

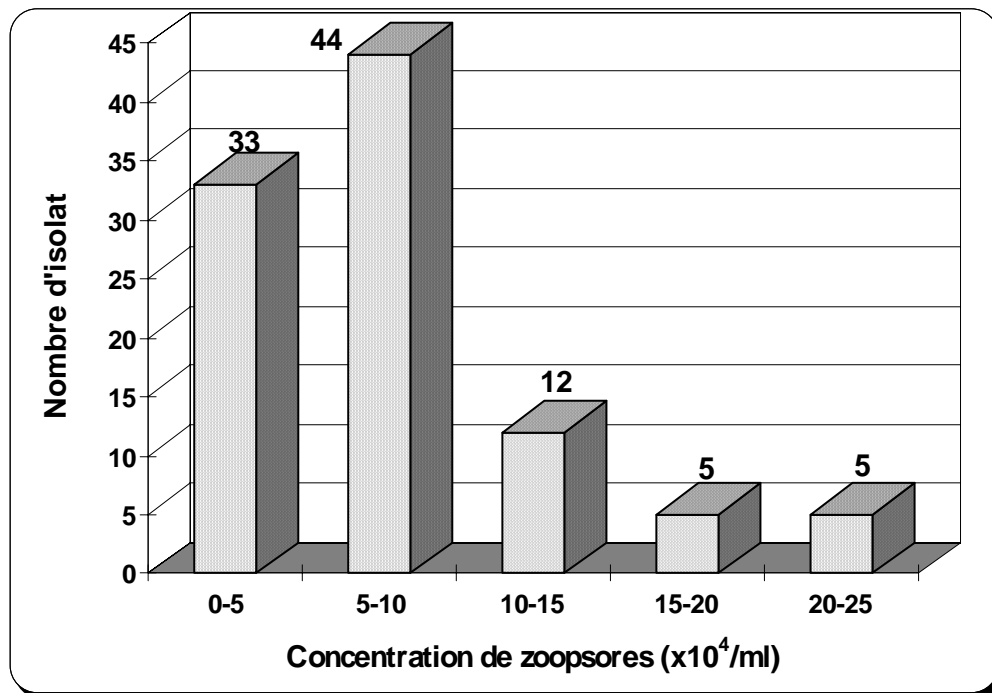


Figure 29: Classes des isolats selon la quantité de zoospores libérées après 3 h d'incubation à 4°C et à l'obscurité.

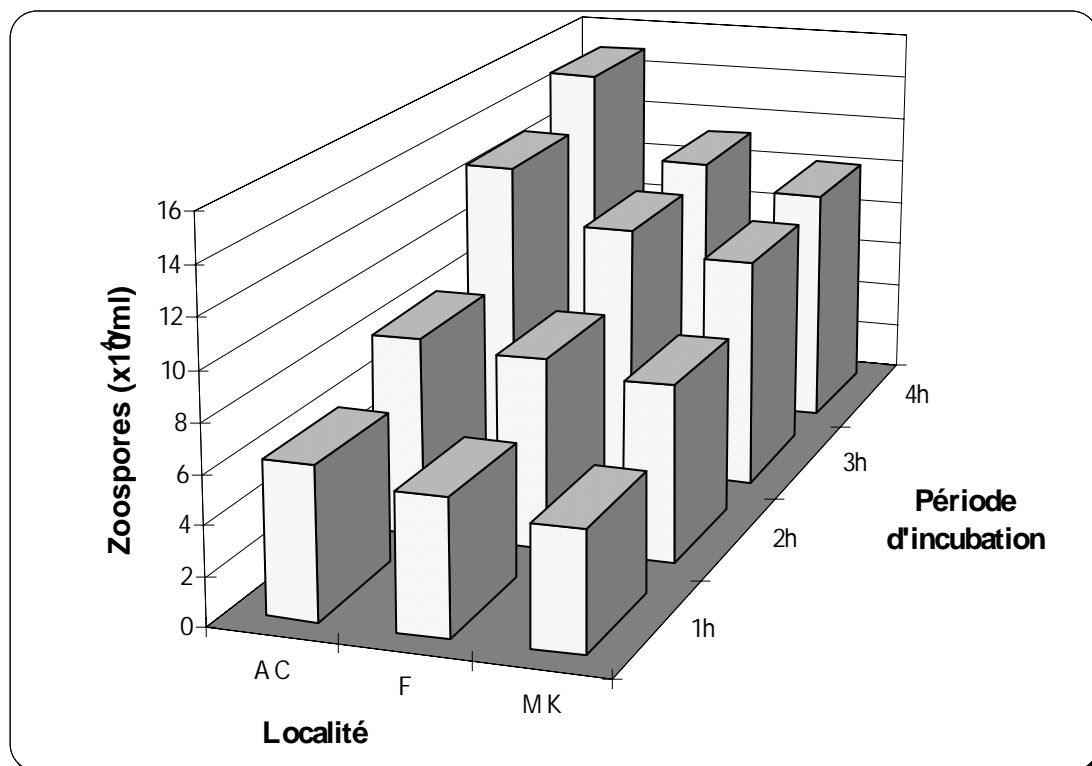


Figure 30 : Germination indirecte des isolats selon leur localité d'origine (AC = Ain-Cheggag, F = Fès, MK = Meknès).

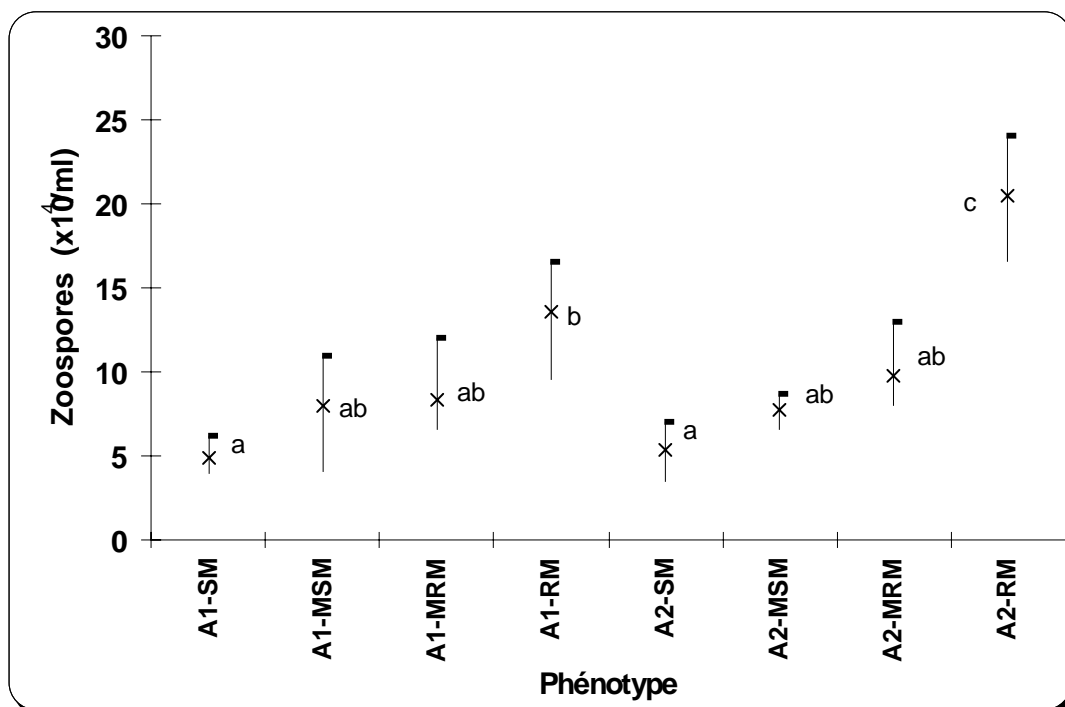


Figure 31 : Germination indirecte des sporocystes des isolats selon leur phénotypes après 3h d'incubation à 4°C et à l'obscurité (les points de la courbe suivis par les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à P=0.05).

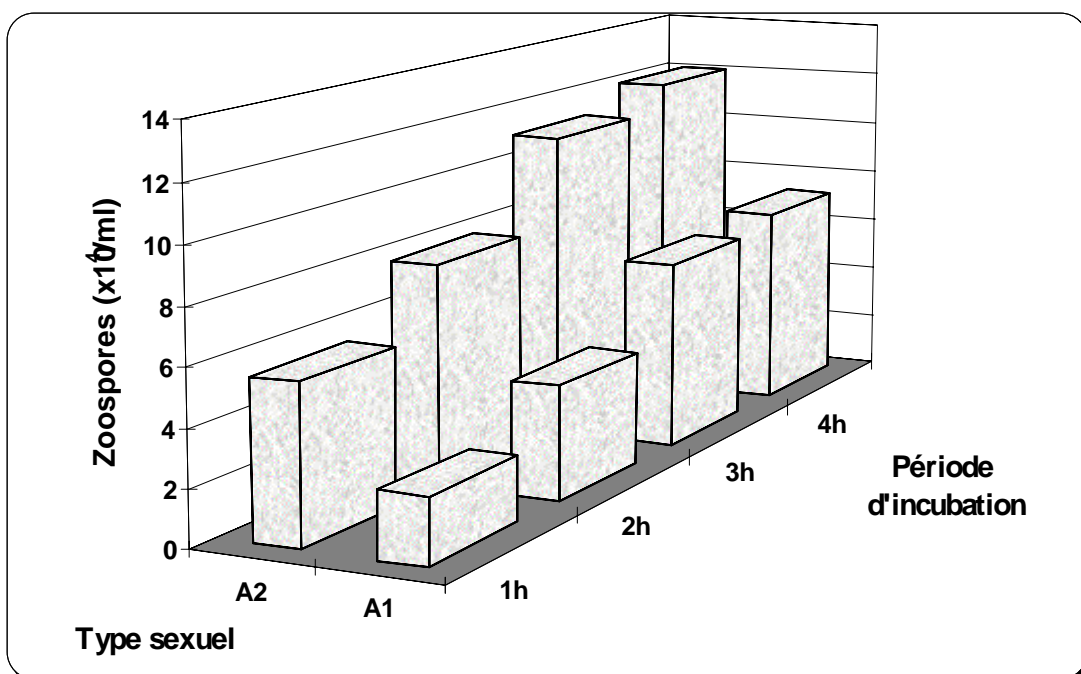


Figure 32 : Germination indirecte des sporocystes des isolats selon leur types sexuels.

III-7- Pouvoir d'agressivité des isolats

III-7-1-Periode de latence

Après 2 à 5 jours d'inoculation des folioles incubées à 20°C et à une photopériode de 16h, tous les isolats ont pratiquement développé des lésions caractéristiques du pathogène sur les différentes variétés testées. Ces symptômes apparaissent sur les tissus du feuillage inoculés après un temps de latence qui diffère selon les isolats. Les valeurs enregistrées pour chaque isolat sont montrées dans le tableau C de l'annexe. Les analyses statistiques réalisées ont révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur isolat et de l'interaction isolat \times variété (tableau 19 en annexe). Chez les isolats de pomme de terre, les temps de latence moyens relevés sur les variétés de pomme de terre sont remarquablement plus courts que ceux notés pour les isolats de la tomate. En effet, chez les premiers, ces temps sont en moyenne de 49, 57, 55 et 63h respectivement sur les variétés Spunta, Désirée, Nicola et Kondor. Par contre, chez les isolats de la tomate ces temps sont de 66, 70, 73 et 79h enregistrés sur les mêmes variétés prise dans le même ordre. Sur la variété de tomate Daniela, le temps de latence moyen enregistré chez les isolats issus de la tomate est plus court (environ 39h) que celui relevé chez les isolats issus de la pomme de terre (45h). La figure 33 montre la distribution des isolats selon leurs temps de latence déterminés sur chaque variété testée. Cette distribution confirme, la différence qui existe dans le comportement des isolats sur une même variété ou sur des variétés différentes. A la lumière de cette distribution hétérogène et en considérant le temps de latence moyen relevé sur les 5 variétés testées, les isolats peuvent être classer en quatre groupes :

- Le groupe A est constitué par les isolats qui occasionnent des infections plus rapidement que les autres isolats. En effet, le temps de latence dans ce groupe est compris entre 30 et 40 heures. Cette classe regroupe 7 isolats (7%)
- Le groupe B comprend les isolats ayant des temps de latence moyens qui varient entre 40 et 50 heures. Ce groupe constitue 20 % des isolats (20 isolats).
- Le groupe C regroupe 48 % des isolats (soit 47 isolats) possédant des temps de latence qui oscillent entre 50 et 60 heures.
- Le groupe D contient 27 % des isolats (27 isolats). Tous les isolats collectés de la tomate sont classés dans ce groupe. Le temps de latence qui caractérise cette classe varie entre 60 et 70 heures.

L'effet du facteur origine des isolats sur le temps de latence a été étudiée et l'analyse statistique a montré l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur origine des isolats mais non de l'interaction origine \times variété (tableau 20 en Annexe). Ceci montre que la même variabilité de temps de latence est observé entre les variétés indépendamment de l'origine.

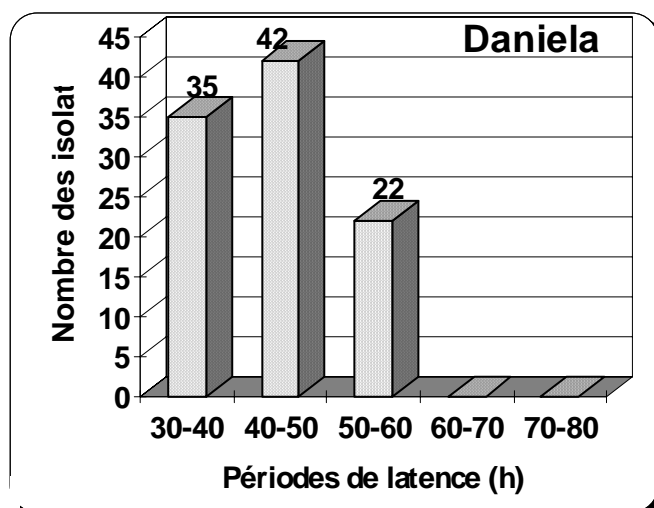
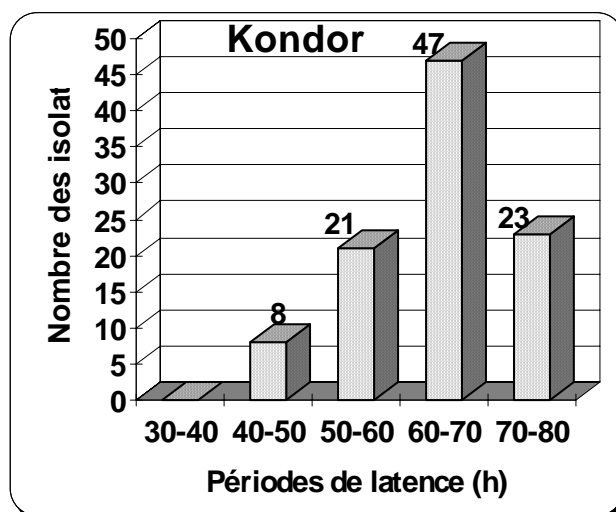
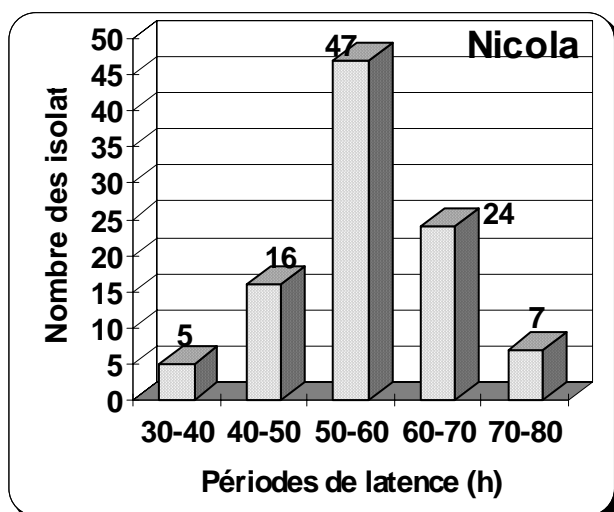
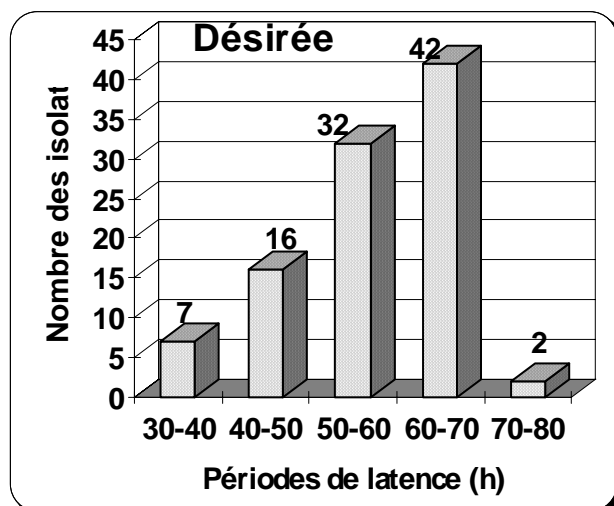
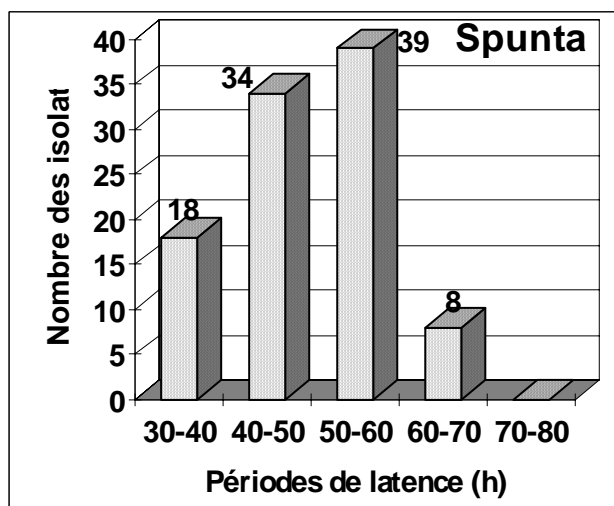


Figure 33 : Distribution des isolats selon leurs périodes de latence enregistrées sur le feuillage des variétés de pomme de terre Spunta, Désirée, Nicola, Kondor et la variété de tomate Daniela.

La figure 34 montre les temps de latence moyens correspondant aux isolats issus de la pomme de terre selon leur origine. Les valeurs moyennes les plus courtes sont observées chez les isolats de pomme de terre collectés de la région de Ain-Cheggag, alors que pour les isolats provenant de la région de Fès, les premiers signes d'infections apparaissent après un temps de latence plus long. Des valeurs intermédiaires des périodes de latence sont relevées chez les isolats collectés de la région de Meknès. Généralement, les infections causées par la majorité des isolats apparaissent plus rapidement sur les feuilles des variétés Spunta et Daniela, alors que sur les folioles de la variété Kondor le champignon met plus de temps pour se manifester. Le temps de latence est intermédiaire sur le feuillage des deux autres cultivars. Néanmoins certaines similitudes sont remarquées entre les isolats provenant de localités différentes tels que les temps de latence enregistrés sur le feuillage de la variété Daniela après inoculation par les isolats collectés de la région de Fès et de Meknès.

La variabilité des temps de latence des isolats selon leurs phénotypes (type sexuel + résistance au métalaxyl) a été examinée, et l'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur phénotype et du facteur variété ; mais pas pour l'interaction phénotype x variété (tableau 21 en annexe). Ceci démontre que le décalage d'apparition de la maladie remarqué entre les variétés est souvent semblable pour tous les isolats indépendamment de leur phénotypes. Les courbes de la figure 35 montrent la distribution des temps de latence des isolats selon leur phénotypes. Sur toutes les variétés testées, les isolats A1-RM et A2-RM ont présenté des temps de latence comparables entre eux mais sont significativement plus courts que ceux des autres phénotypes. Les temps de latence les plus long sont notés chez les isolats sensibles et moyennement sensibles au métalaxyl. Les temps de latence enregistrés chez les autres phénotypes sont souvent des valeurs intermédiaires entre ceux notés chez les isolats sensibles au métalaxyl et ceux observés chez les isolats résistants au métalaxyl. Ceci montre l'existence d'une relation entre le niveau de sensibilité au métalaxyl et la période de latence. En effet, plus le niveau de la résistance au métalaxyl est élevé plus le temps de latence est court.

La comparaison des temps de latence des isolats relative à leur types sexuels a été réalisé, et l'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur type sexuel, mais pas de l'interaction type sexuel x variété (tableau 22 en annexe). Les isolats de type sexuel A1 ont montré des temps de latence moyens plus élevés que ceux des isolats de type sexuel A2 pour toutes les variétés testées (Fig. 36). Ces résultats montrent encore une fois la performance des isolats de type sexuel A2 par rapport aux isolats de type sexuel A1.

Le caractère temps de latence, utilisé fréquemment dans les études d'agressivité des pathotypes, a permis encore une fois de déceler la variabilité régnante au sein des populations de *P. infestans* dans ces régions. cette variabilité est observée même pour les isolats collectés d'une même parcelle.

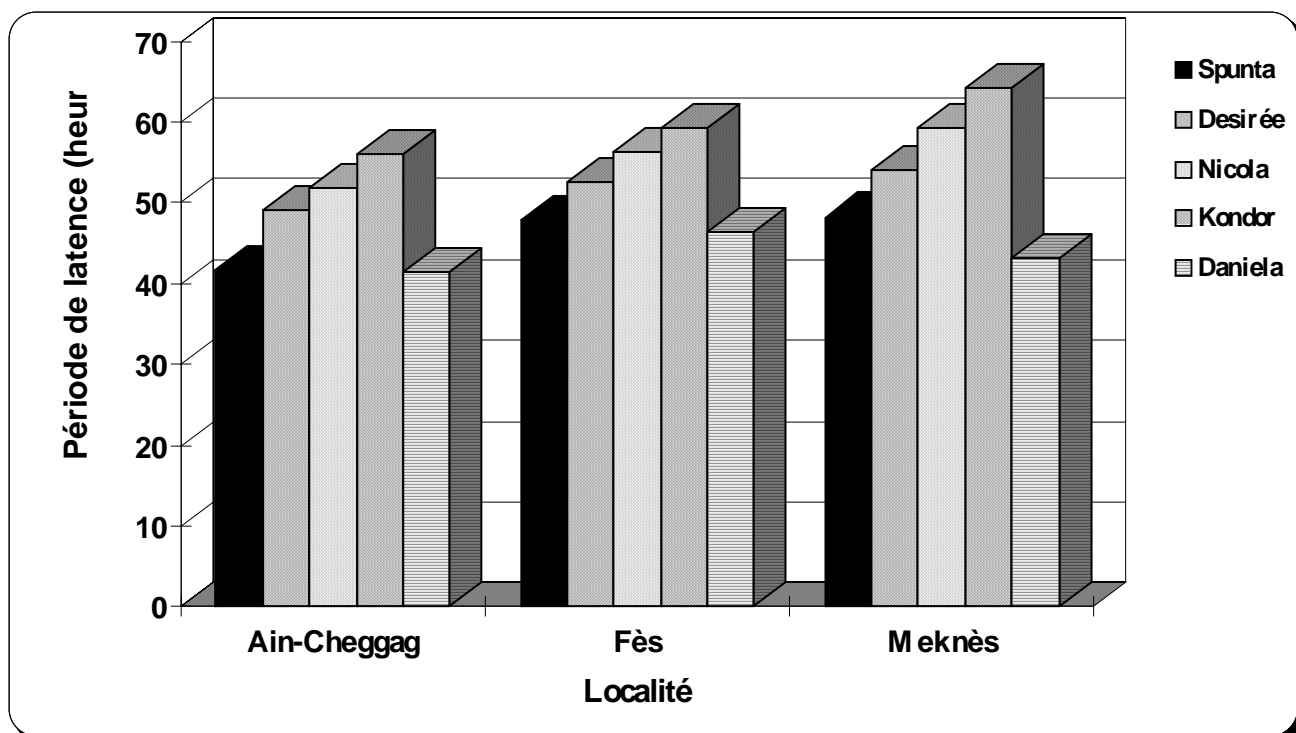


Figure 34 : Temps de latence moyens enregistrés pour les isolats, sur le feuillage des variétés de pomme de terre (Spunta, Désirée, Nicola et Kondor) et de tomate (Daniela), selon leur origine.

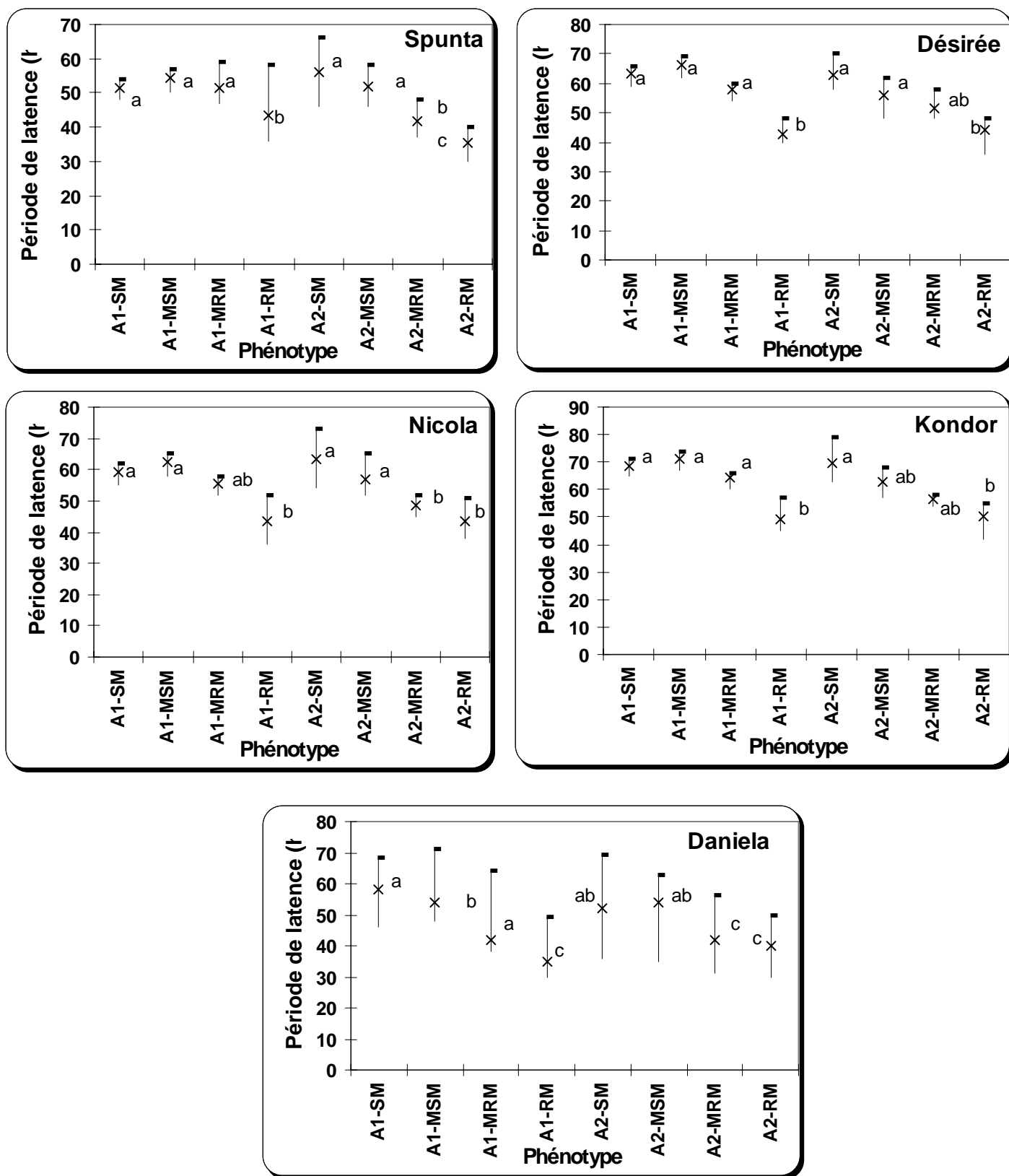


Figure 35 : Périodes de latence des isolats selon leurs phénotypes (Type sexuel +résistance au métalaxyl) sur les 4 variétés de pomme de terre Spunta, Désirée, Nicola et Kondor et de la variété de tomate Daniela (les points suivis par les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $P=0.05$).

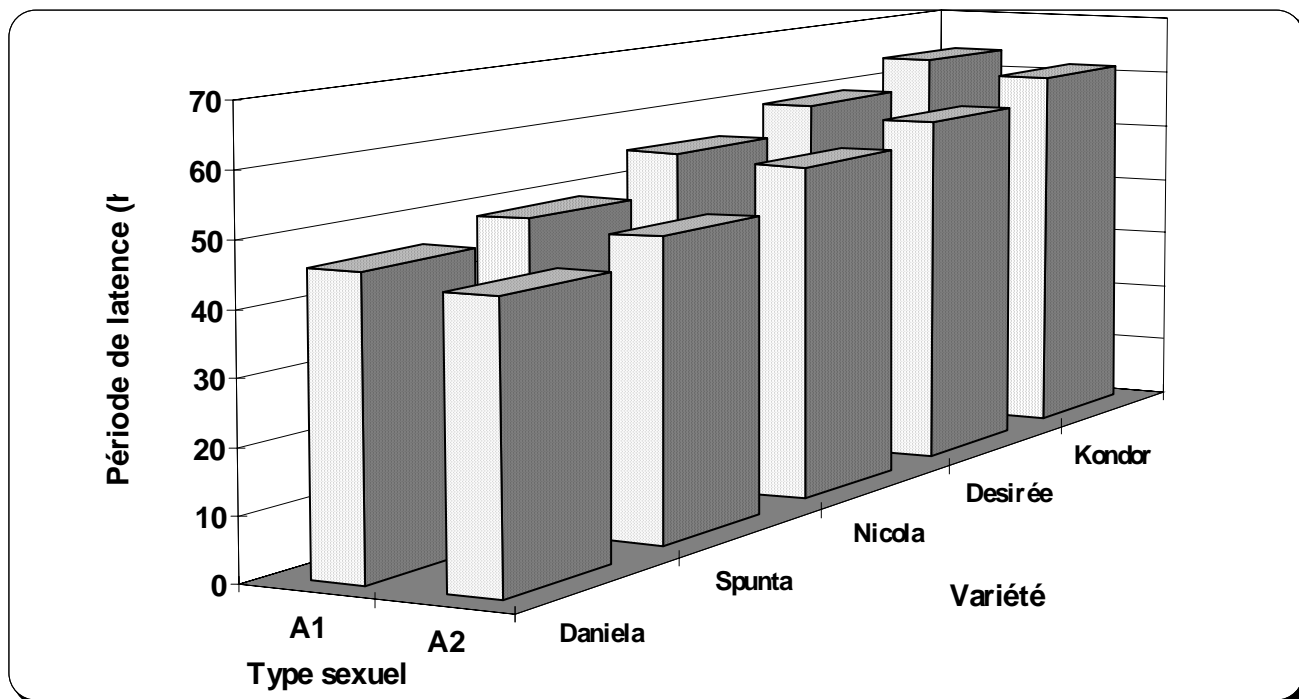


Figure 36 : Temps de latence relevés sur les 5 variétés de la pomme de terre (Spunta, Désirée, Nicola et Kondor) et la variété de tomate (Daniela) par les isolats selon leur types sexuels.

III-7-2-Dimension de la lésion

Les dimensions des lésions développées sur les folioles - inoculées par les différents isolats testés après 7 jours d'incubation à 20°C et à une photopériode de 16h - sont enregistrées dans le tableau C de l'annexe. Ces valeurs montrent que les dimensions des lésions sont variables selon les isolats et le cultivar testé. En effet, l'analyse de variance a montré la présence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur isolat et de l'interaction isolat x variété (tableau 23 en annexe). Les isolats issus de la tomate ont développé des lésions plus petites sur les variétés de pomme de terre, alors que celles qu'elles engendrent sur la variété de tomate Daniela sont significativement plus grandes. Par contre, les isolats issus de la pomme de terre ont développé des lésions importantes sur les deux hôtes. Ceci montre encore une fois la performance des isolats issus de la pomme de terre par rapport aux isolats de la tomate sur les variétés de pomme de terre testées. Les lésions les plus petites se sont formées sur les folioles de la variété Kondor de la pomme de terre, tandis que les lésions développées sur le feuillage des variétés Nicola et Désirée sont intermédiaires et relativement comparables, alors que les lésions manifestées sur la variété Spunta sont plus importantes surtout pour les isolats issu de la pomme de terre. La figure 37 montre les lésions développées par un isolat issu de la pomme de terre sur le feuillage des 5 variétés utilisées.

La figure 38 montre la distribution des isolats selon les dimensions des lésions développées sur chacune des variétés testées. Il s'agit d'une distribution hétérogène illustrant la variabilité du comportement des isolats vis à vis de variétés de sensibilité relativement différentes. En déterminant la dimension moyenne des lésions développées sur toutes les variétés utilisées, les isolats peuvent être distribués en 4 groupes:

- Le premier groupe est constitué par 7 isolats (7%) dont la dimension moyenne des lésions est comprise entre 300 et 500 mm². Ce groupe rassemble uniquement les isolats collectés de la tomate.
- Le deuxième groupe réunit 20 isolats (20%) dont la dimension moyenne des lésions varie entre 500 et 700 mm².
- Le 3^{ème} groupe est formé de 34 isolats (35%) dont la dimension moyenne des lésions est comprise entre 700 et 900 mm².
- le 4^{ème} groupe englobe 23 isolats (23%) avec des dimensions moyennes des lésions qui varient entre 1100 et 1300 mm².
- Le 5^{ème} groupe contient 13 isolats (13%) avec des dimensions qui varient entre 900 et 1100 mm².
- Le 6^{ème} groupe est formé de deux isolats uniquement (2%) dont les dimensions moyennes varient entre 1100 et 1400 mm².

La figure 39 récapitule les résultats des dimensions moyennes des lésions développées sur le feuillage des 5 variétés par les isolats selon leur origine.

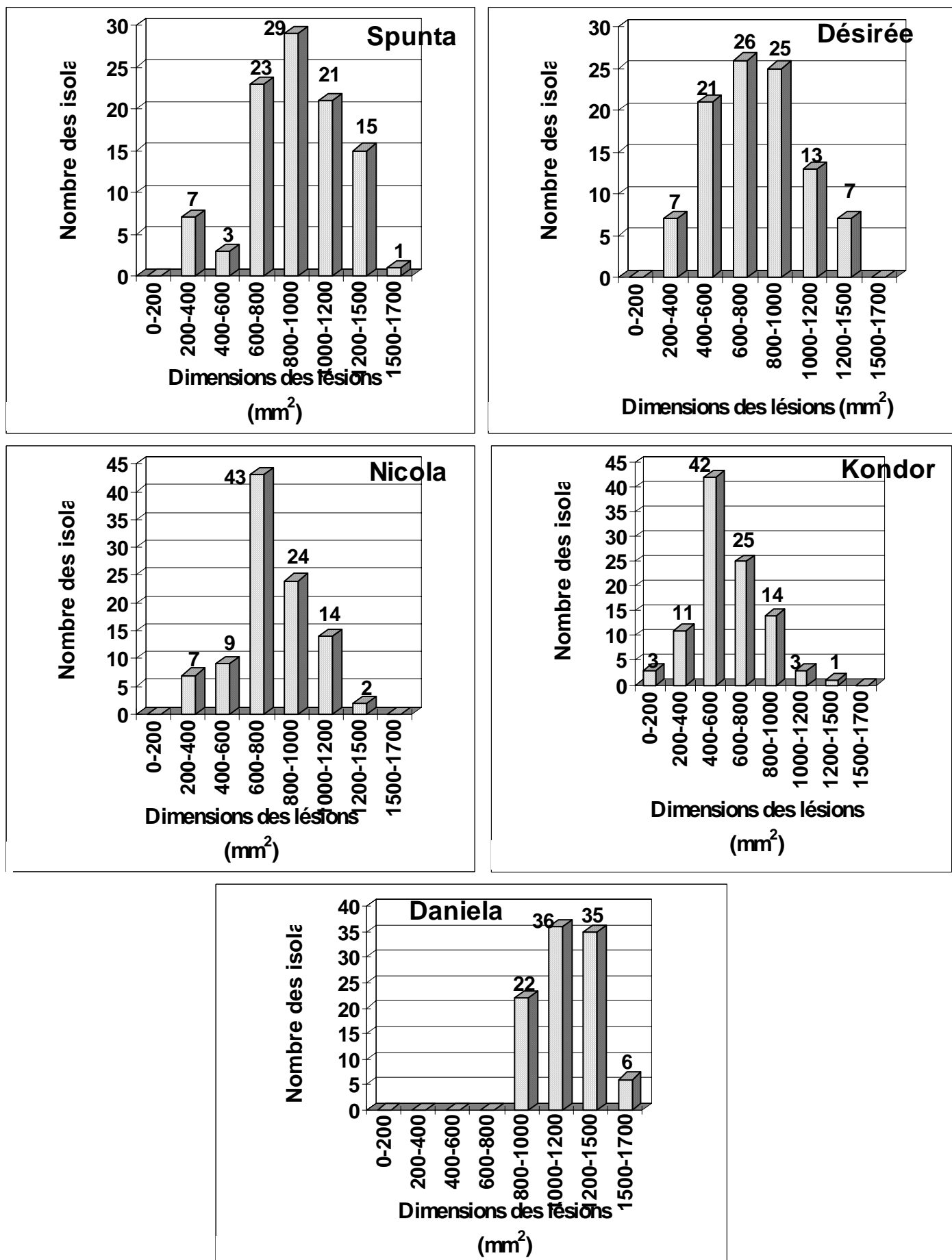


Figure 38 : Distribution des isolats de *P. infestans* selon les dimensions des lésions développées sur le feuillage des variétés de pomme de terre Spunta, Désirée, Nicola et Kondor et sur la variété de tomate Daniela.

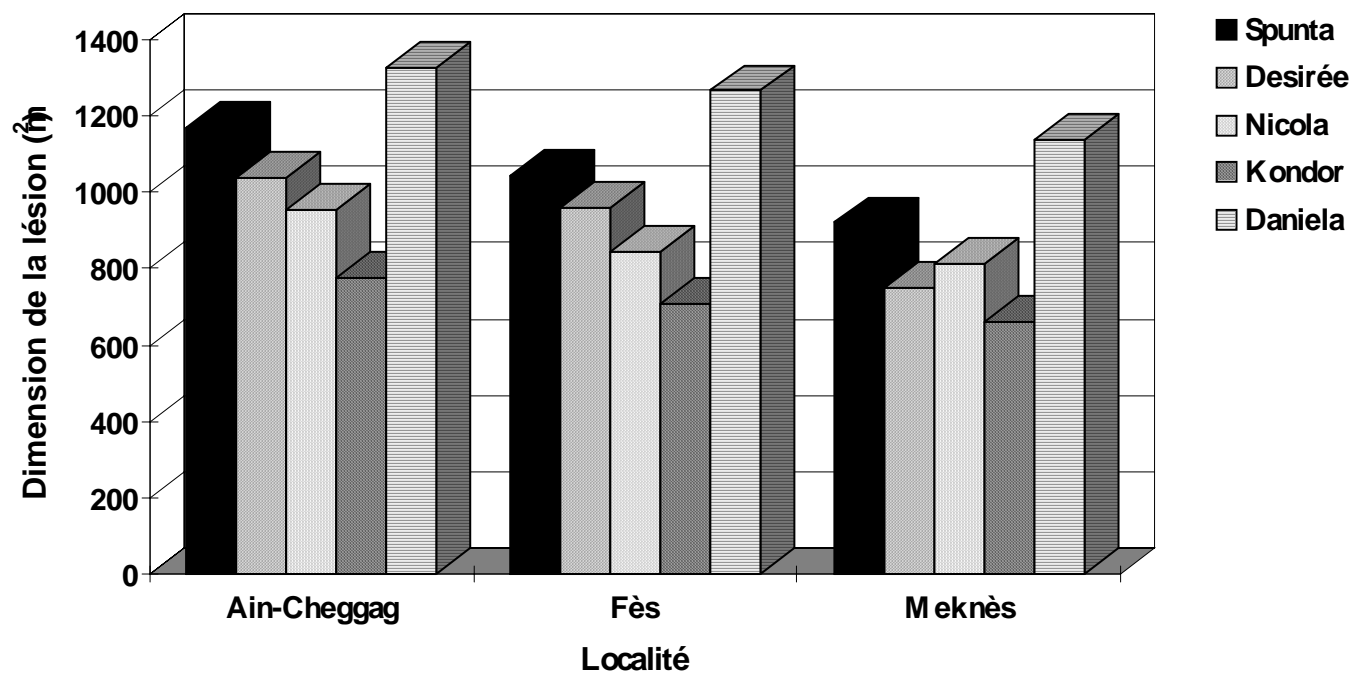


Figure 39 : Dimensions des lésions développées sur le feuillage des 5 variétés de pomme de terre et de tomate par les isolats selon leur

L'analyse de la variance a révélé que le facteur origine et le facteur cultivar peuvent influencer significativement ($P < 0.05$) le niveau d'agressivité des isolats mais pas l'interaction cultivar x origine (tableau 24 en annexe). Ceci montre que la variabilité des dimensions des lésions entre les variétés est souvent semblable entre les isolats indépendamment de leur origine. Comme pour le paramètre d'agressivité précédent (temps de latence), les dimensions des lésions les plus grandes sont enregistrées chez des isolats collectés de la région de Ain-Cheggag sur toutes les variétés testées. Les valeurs enregistrées pour les isolats collectés des deux autres localités sont relativement faibles par rapport à celles des isolats provenant de Ain-Cheggag.

L'étude de la variabilité des dimensions des lésions développées par les isolats en fonction de leur phénotypes a été effectuée et l'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur phénotype (tableau 25 en annexe). De même que pour le temps de latence, il n'existe pas de différence significative de l'interaction phénotype x cultivar. Ceci peut être expliquée par l'existence pour chaque phénotype d'un degré d'agressivité spécifique quelque soit la variété infectée. La figure 40 montre la distribution des dimensions des lésions développées par les isolats selon leurs phénotypes. Comme pour les caractères précédents, il existe une relation entre la dimension des lésions développées par les isolats et leur niveau de résistance au métalaxyl. En effet, sur les variétés de pomme de terre, les isolats A1-RM et A2-RM ont présenté des lésions de dimensions comparables, mais plus grandes que celles des autres phénotypes. Les dimensions les plus petites sont enregistrées sur la variété de pomme de terre Kondor par les phénotypes A1-SM, A1-MSM, A2-SM et A2-MSM. Sur le feuillage de la variété de tomate Daniela, pratiquement tous les 8 phénotypes développent des lésions de grandes dimensions. Celles-ci varient de 982 mm² chez les isolats A1-SM jusqu'à 1412 mm² notée chez le phénotype A2-RM. Néanmoins, bien que les dimensions observées soient de grandes amplitudes, nous avons noté, là aussi une relation entre le degré de sensibilité au métalaxyl et la dimension de la lésion développée sur tomate.

Par ailleurs, l'étude comparative de l'agressivité des isolats fondée sur les dimensions des lésions qu'ils engendrent en considérant uniquement leur types sexuels a montré l'existence d'une différence significative du facteur type sexuel, mais pas de l'interaction type sexuel x variété (tableau 26 en annexe). Les dimensions moyennes des lésions développées par les isolats A1 sont plus réduites que celles causées chez les isolats A2 pour les 5 variétés testées (Fig. 41). Néanmoins, les deux types sexuels ont montré des niveaux d'agressivités très importants.

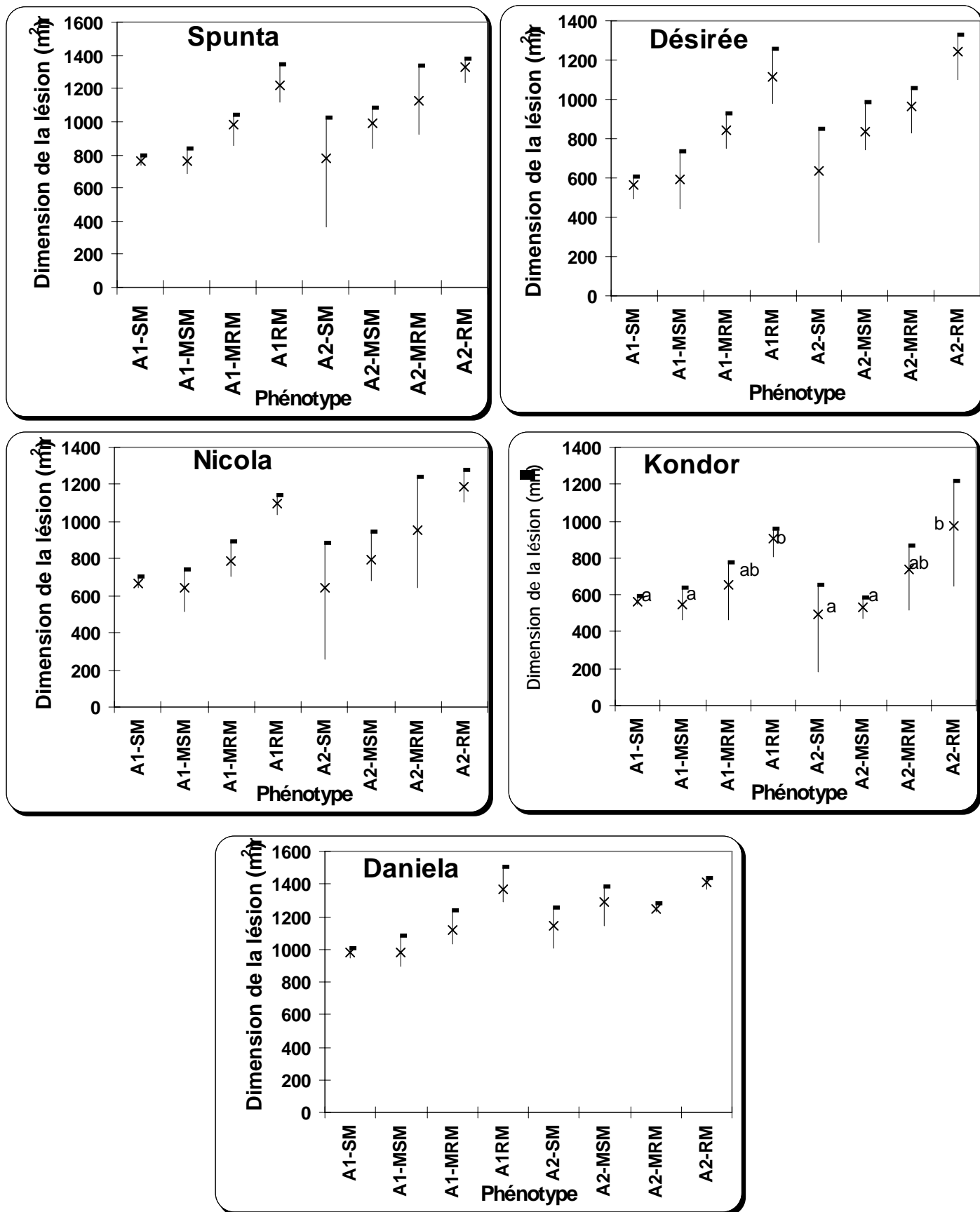


Figure 40 : Dimensions des lésions développées par les isolats selon leurs phénotypes sur le feuillage des variétés de la pomme de terre Spunta, Désirée, Nicola et Kondor et de la variété de tomate Daniela (Les points de la courbe suivis par les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à P=0.05).

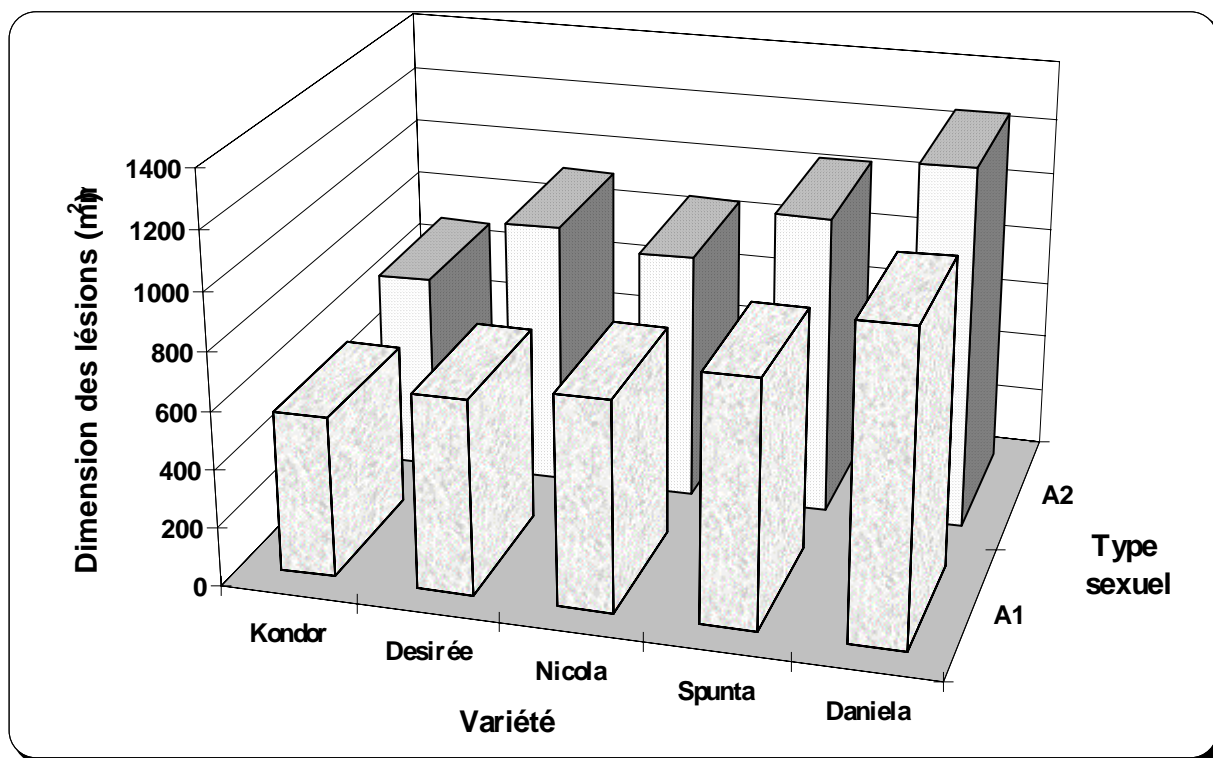


Figure 40 : Dimensions des lésions développées sur le feuillage des 5 variétés par les isolats selon leur types sexuels.

III-7-3-Intensité de sporulation

La production de sporocystes par les isolats sur le feuillage des variétés inoculées a été évaluée après 8 jours d'incubation. Les résultats obtenus pour la totalité des 99 isolats testés sont consignés dans le tableau C en annexe. Cette intensité de sporulation est variable selon les isolats. En effet, l'analyse statistique a montré encore une fois, l'existence d'une différence significative du facteur isolat et de l'interaction isolat x variété (tableau 27 en annexe). Pour les isolats collectés de la pomme de terre, la capacité de sporulation *in-vivo* varie entre 3×10^4 et 25×10^4 sporocystes ml^{-1} sur la pomme de terre et oscillent entre 3×10^4 et 26×10^4 sporocystes ml^{-1} sur tomate. Pour les isolats collectés de tomate la sporulation est plus importante sur la variété de tomate Daniela (9×10^4 à 14×10^4 sporocystes ml^{-1}) que sur les variétés de pomme de terre. (de 0 à 2.5×10^4 sporocystes ml^{-1}).

La figure 42 montre le groupement des 99 isolats selon leurs capacités de sporulation *in-vivo* sur chacune des variétés de pomme de terre et de tomate. Comme pour les autres paramètres de caractérisation précédemment étudiés, la distribution des isolats selon leur sporulation *in-vivo* est très hétérogène pour chacune des variétés. En considérant les moyennes générales relevées sur les 5 variétés, les isolats sont classés en 5 groupes :

- Le groupe A englobe 18% des souches (18 isolats) dont l'intensité de sporulation moyenne est comprise entre 2 et 5×10^4 sporocystes /ml. Les 7 isolats collectés de la tomate font partie de ce groupe.
- Le groupe B contient 32% des isolats (32 isolats) dont la capacité de sporulation est variable entre 5 et 8×10^4 sporocystes /ml.
- Le groupe C contient les isolats dont l'intensité de sporulation varie entre 8 et 11×10^4 sporocystes /ml. Ce groupe est constitué par 39% des isolats (38 isolats).
- Le groupe D rassemble 6 % des isolats (6 isolats). L'intensité de sporulation *in-vivo* varie entre 11 et 14×10^4 sporocystes /ml;
- Le groupe E est constitué par 5 isolats (5%) dont la capacité de sporulation *in-vivo* est maximale et varie entre 14 et 18×10^4 sporocystes /ml

La variabilité du pouvoir de sporulation *in-vivo* des isolats selon leur localité d'origine a été examinée et l'analyse de la variance a montré l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur origine des isolats et aussi de l'interaction origine x variété (tableau 28 en annexe). Quelque soit la variété testée les isolats collectés de la région de Ain-Cheggag ont la plus grande faculté de produire les sporocystes en comparaison avec les isolats des autres localités (Fig. 43). Les capacités de sporulation déterminées pour les isolats collectés à partir des zones de Meknès sont relativement comparables mais sont relativement plus faible que celles des isolats appartenant à la zone de Fès.

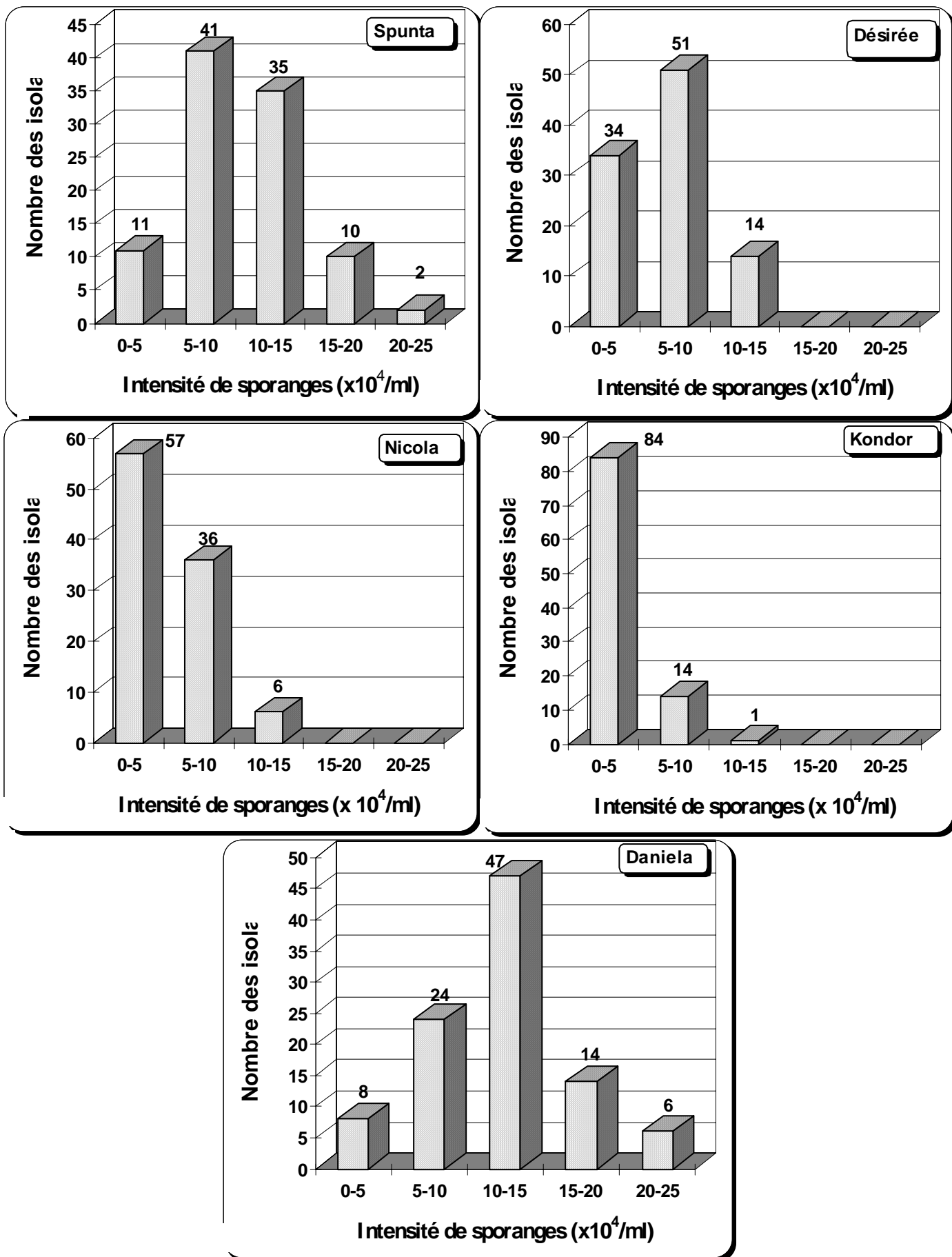


Figure 42 : Distribution des isolats selon leurs intensités de sporulation sur le feuillage des variétés de pomme de terre et de la variété de tomate Daniela.

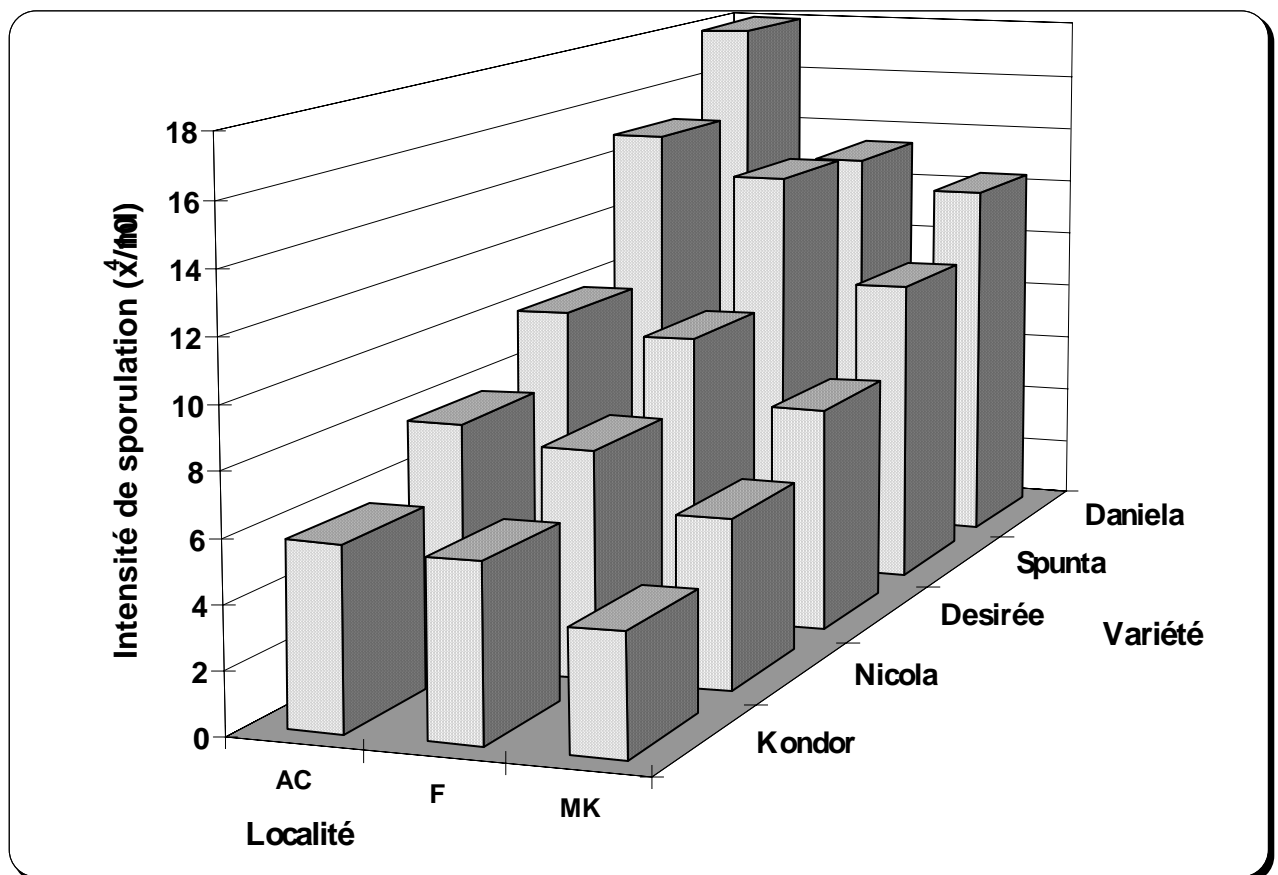


Figure 43 : Sporulation *in-vivo* des isolats sur le feuillage des variétés de pomme de terre et de tomate selon leurs localités d'origine (AC = Ain-Cheggag ; F = Fès ; MK = Meknès).

La variation des intensités de la sporulation des isolats selon leurs phénotypes (type sexuel + résistance au métalaxyl) a été suivie, et l'analyse de la variance a révélé une différence significative ($P < 0.05$) du facteur phénotype et de l'interaction phénotype x cultivar (tableau 29 en annexe). Quelle que soit la variété utilisée, nous remarquons que plus le niveau de sensibilité au métalaxyl est élevé, plus la sporulation est faible (Fig. 44). En effet, les isolats A2-RM et A1-RM ont un pouvoir de production des sporocystes plus important que celui des autres phénotypes. Néanmoins, les intensités de sporulations relevées pour les différents phénotypes sont remarquablement plus importantes sur la variété Daniela que celles enregistrées sur le feuillage des variétés de pomme de terre. Cette production varie entre 8.3 et 18.3 10^4 spores ml^{-1} chez les isolats A1-MRM et les isolats A2-RM respectivement.

Comme pour les deux caractères d'agressivité précédents, les analyses statistiques ont montré la présence d'une différence significative du facteur type sexuel et de l'interaction type sexuel x variété (tableau 30 en annexe). En effet, l'intensité moyenne de sporulation des isolats de type sexuel A1 varie entre 3.5 et 9.5 ($\times 10^4$) sporocystes ml^{-1} d'une variété à l'autre, alors que celles des isolats de type sexuel A2 oscillent entre 5 et 14.6 ($\times 10^4$) sporocystes ml^{-1} pour les mêmes variétés (Fig. 45). Quelle que soit la variété inoculée, les souches du type sexuel A2 sporulent plus que celles du type sexuel A1. C'est sur la variété de pomme de terre Kondor que les deux types d'isolats sporulent le moins, alors que la variété de tomate Daniela donne la plus forte sporulation.

A la lumière de ces résultats enregistrés suite à l'évaluation du temps de latence, de la dimension de la lésion et de l'intensité de sporulation des isolats, la sensibilité des variétés testées est élevée. Néanmoins, un ordre croissant de sensibilité a été mis en évidence qui est le suivant : la variété de tomate Daniela et celle de pomme de terre Spunta sont les plus sensibles au *P. infestans*, Désirée et Nicola ont une sensibilité intermédiaire alors que Kondor possède le niveau de sensibilité le plus faible.

IV- Corrélations entre les différents caractères étudiés

Le tableau 14 présente les différents coefficients de corrélation entre les paramètres utilisés dans cette étude pour caractériser les différents isolats, à savoir, le type sexuel (TS), sensibilité au métalaxyl (SM), la croissance mycélienne *in-vitro* (CMT), l'intensité de sporulation *in-vitro* (IST), la germination directe (TGD), la germination indirecte (IGI), la période de latence (PL), la dimension de la lésion (DL), l'intensité de sporulation *in-vivo* (ISV).

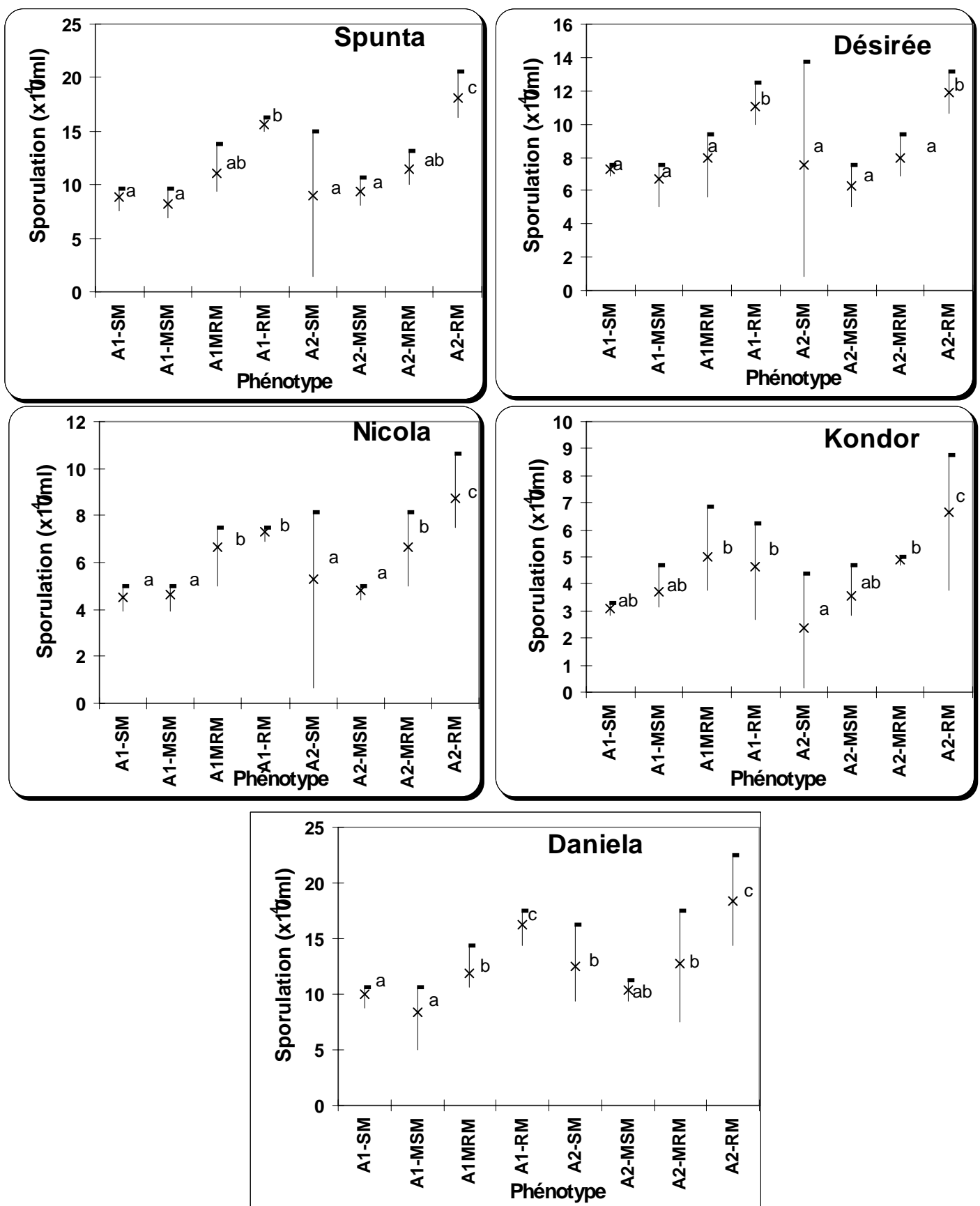


Figure 44 : Sporulation des isolats sur le feuillage des variétés de pomme de terre Spunta, Désirée, Nicola et Kondor et de la variété de tomate Daniela selon leurs phénotypes (type sexuel + Résistance au métalaxyl) (les points de la courbe marqués par les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à P=0.05)

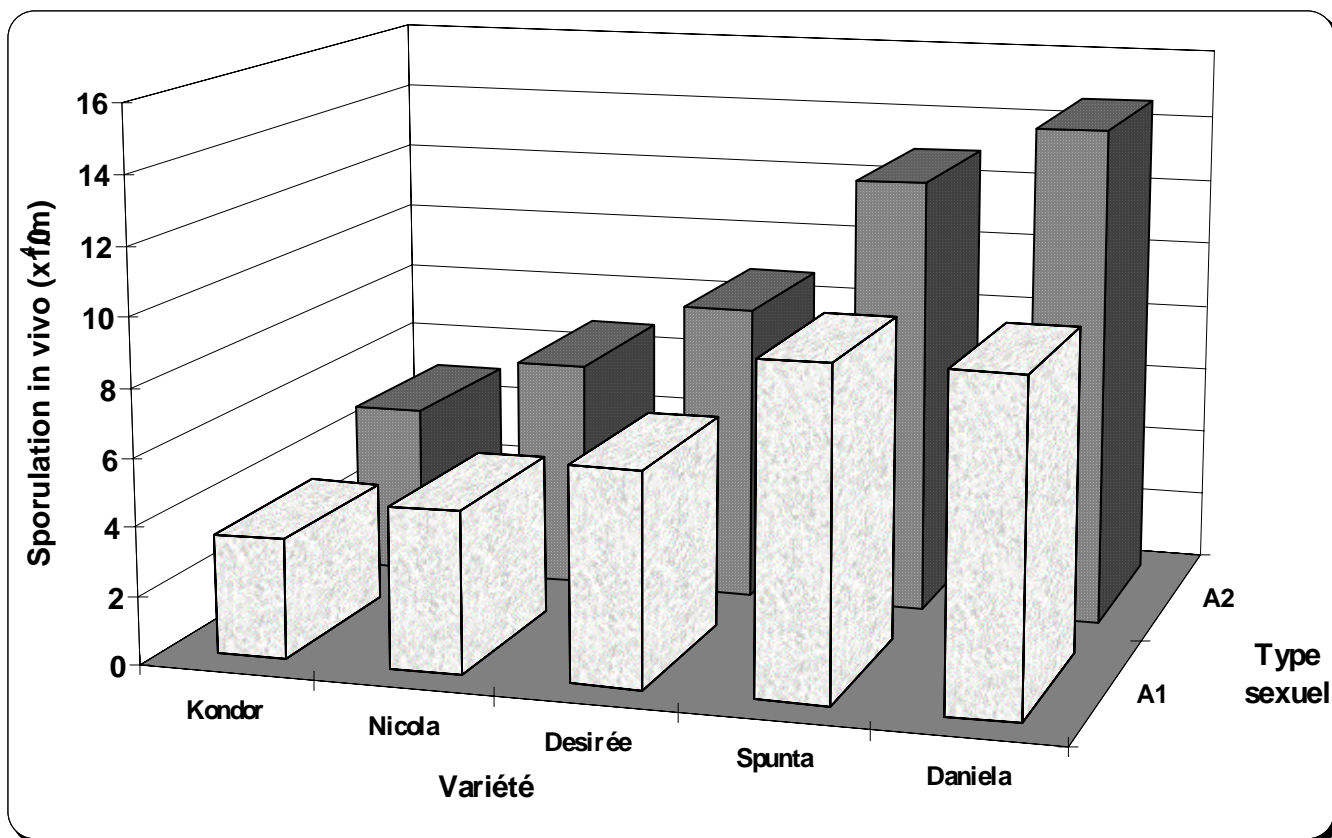


Figure 45 : Sporulation *in-vivo* des isolats sur le feuillage des 5 variétés selon leur types sexuels.

Les coefficients répertoriés dans le tableau 15 montrent que dans certains cas les caractères étudiés sont bien corrélés deux à deux essentiellement entre le niveau de sensibilité au métalaxyl et le type sexuel ($R^2= 0.89$) ; entre l'intensité de sporulation *in-vitro* et le pouvoir de germination indirecte ($R^2=0.93$) ; entre la dimension de la lésion et l'intensité de sporulation *in-vivo* ($R^2=0.74$), entre la croissance mycélienne *in-vitro* et la capacité de sporulation *in vitro* ($R^2=0.79$), entre la croissance mycélienne *in-vitro* et germination indirecte ($R^2 = 0.78$) et entre la croissance mycélienne *in-vitro* et la dimension de la lésion ($R^2 = 0.72$). Des corrélations négatives sont enregistrées entre la période de latence et les autres paramètres dont la meilleure corrélation est notée avec la dimension de la lésion ($R^2 = -0.91$). Par contre, les plus faibles corrélations sont remarquées entre le type sexuel d'une part et les autres caractères à l'exception de la résistance au métalaxyl. Cette faible corrélation obtenue dans ces tests confirment les résultats concernant la comparaison des isolats basée sur leur types sexuels. En effet, Pour la plupart des paramètres étudiés, il existe une légère performance des souches de type sexuel A2 par rapport à celles de type sexuel A1.

Tableau 14 : Coefficients de corrélations des paramètres utilisés pour la caractérisation des isolats

	SM	TS	CMT	IST	TGD	IGI	PL	DL	ISV
SM		0.89	0.40	0.42	0.50	0.48	-0.50	0.50	0.52
TS			0.15	0.15	0.25	0.24	-0.25	0.25	0.31
CMT				0.79	0.63	0.78	-0.67	0.72	0.67
IST					0.61	0.93	-0.64	0.65	0.68
TGD						0.65	-0.64	0.65	0.69
IGI							-0.68	0.69	0.79
PL								-0.91	-0.68
DL									0.74
ISV									

SM = Sensibilité au métalaxyl

TGD = Taux de germination directe

TS = Type sexuel

IGI = Intensité de germination indirecte

PL = Période de

latence

CMT = Croissance mycélienne *in-vitro*

DL = Dimension de la lésion

IST = Intensité de sporulation *in-vitro*

ISV = Intensité de sporulation *in-vivo*

1-Evolution de la maladie dans le périmètre de Saïs

Pendant la période de cette étude (1997-2000) la maladie s'est manifestée pendant quatre campagnes agricoles dans le périmètre de Saïs. Cependant, cette manifestation ne s'est produite que tardivement pendant trois campagnes. Le suivi de l'évolution de l'infection durant la campagne agricole 1997-1998 a permis de déterminer sa répartition dans le temps et dans l'espace. En effet, les conditions climatiques qui ont caractérisé cette période (des heures d'humectage prolongées, des températures journalières moyennes) ont favorisé l'apparition de l'infection. Les trois paramètres étudiés durant cette période à savoir la fréquence, l'incidence et la sévérité sont relativement plus élevés que ceux relevés par El Ismaili (1994) et Laftah (1997) dans deux études menées dans les périmètres Moulwya et de Meknès respectivement. Ces valeurs élevées peuvent être dues à plusieurs facteurs :

- 1- plusieurs parcelles visitées et ayant manifestées la maladie sont de petites superficies et ne sont pas bien entretenues,
- 2- dans une même localité les parcelles de pomme de terre ne sont pas assez éloignées ce qui rend l'infection des parcelles plus facile,
- 3- la variété la plus utilisée est Désirée dont la sensibilité au mildiou devient de plus en plus importante,
- 4- La plupart des parcelles sont soit non traitées contre le mildiou soit traitées par des fongicides de contact même après apparition des symptômes de la maladie.

Durant cette campagne agricole, la distribution des incidences, des sévérités et des fréquences de la maladie dans les stations prospectées s'est révélée hétérogène. Néanmoins, l'importance spatiale de la culture pourrait aussi être un facteur influençant l'importance de la maladie. En effet, dans les régions de Ain-Cheggag et de Fès, les superficies cultivées sont plus importantes que celles des autres localités.

Par ailleurs, le taux de tubercules infectés s'est révélé très faible voir nul dans les différentes parcelles prospectées à la fin du cycle végétatif. En effet, Il n'y a pas eu de pertes de récoltes importantes à cause de cette maladie pendant cette campagne agricole (1997-1998). Néanmoins, les tubercules récoltés des différentes parcelles infectées constitueraient des sources d'inoculum potentielles durant les saisons agricoles suivantes et pourraient contribuer à la dispersion de la maladie après leur commercialisation. L'absence de nécroses sur des tubercules récoltés de parcelles infectées seront due à une apparition tardive du mildiou dans ces parcelles. Malgré la forte attaque du feuillage par le mildiou observée dans certaines parcelles de pomme de terre, une température du sol élevée pourrait empêcher l'infection des tubercules comme il a été

observé par Sato (1979). Sur la base de l'infection des tubercules, la situation notée dans le périmètre de Fès-Saïss est relativement comparable à celle observée par El Ismaili (1994) dans le périmètre de la basse Moulwya.

2- Caractérisation des isolats de *P. infestans* collectés

Les tests de compatibilité sexuelle ont révélé la coexistence des deux types sexuels A1 et A2 au sein des populations de *P. infestans* dans les zones étudiées. En effet, sachant que *P. infestans* est une espèce hétérothallique, l'isolement de souches autofertiles (2 isolats) était une première indication de la présence de souches sexuellement compatibles dans la région. Malgré le nombre limité des isolats (108) collectés dans une surface géographique relativement restreinte, l'isolement de souches de type sexuel A2 dès 1997 est une preuve de la présence d'une nouvelle population de *P. infestans* au Maroc qui a remplacé l'ancienne population constitué par le seul type sexuel A1. La distribution des deux types sexuels est souvent hétérogène par champ. En effet, nous avons souvent remarqué la prédominance de l'un ou l'autre des deux types sexuel dans chaque parcelle. Néanmoins, des taux relativement égaux des types sexuels caractérisent tout le périmètre de Fès-Saïss pris dans sa globalité. Cette distribution hétérogène résulterait de la différence des origines des semences de pomme de terre utilisées dans les zones étudiées. Ces semences seraient infectés par des souches de types sexuels différents. L'utilisation massive des semences de pomme de terre d'origines différents pendant les dernières années expliquerait en partie les taux équivalents des deux types sexuels existant à l'échelle du périmètre de Fès-Saïss malgré l'apparition récente du type sexuel A2. En effet d'autres facteurs pourraient expliquer l'augmentation rapide de la population du type sexuel A2 tels que sa virulence vis à vis des variétés utilisées dans cette étude, sa résistance aux fongicides habituellement utilisés et son pouvoir d'adaptation au milieu.

Cette hétérogénéité de distribution a été rapportée dans plusieurs pays du monde dans lesquels les populations de *P. infestans* sont caractérisées par la prédominance soit du type sexuel A1 (Sekhon et Sokhi, 1998) soit du type sexuel A2 (Young *et al.*, 1994 ; Chycoski et Punja, 1996 ; Fraser *et al.*, 1999, Daayf et Platt, 1999) soit en proportions égales comme au Mexique (Tooley *et al.*, 1985 ; Fry *et al.*, 1992). Cependant, cette distribution des deux types sexuels peut changer d'une année à l'autre (Daayf *et al.*, 1999). Notre étude concernant la compatibilité sexuelle et les données provenant des rares études réalisées précédemment au Maroc (El Ismaili, 1994, Sediqui *et al.*, 1997 ; Sediqui *et al.*, 2000), constituent donc un bon argument de la migration de nouvelles souches de *P. infestans* au moins celles de type sexuel A2 provenant essentiellement de certains pays d'Europe où les deux types sexuels coexistent. La présence des deux types sexuels soit dans la même parcelle soit dans des parcelles différentes

engendrerait la formation des oospores dans le tissu végétal ou dans le sol. Ces propagules sexués constitueront une autre source d'inoculum et de variabilité génétique (Drenth *et al.*, 1993 ; Drenth *et al.*, 1994).

L'évaluation de la sensibilité *in-vitro* et *in-vivo* au métalaxyl des isolats a révélé la présence, dans la population de *P. infestans* de la région étudiée, de quatre phénotypes à savoir des isolats sensibles, moyennement sensibles, moyennement résistants et résistants. Tous les isolats de la tomate sont sensibles, alors que les isolats collectés de la pomme de terre ont des comportements variables vis à vis de ce fongicide. Nous avons relevé que la réaction *in-vitro* de certains isolats de pomme de terre vis à vis du métalaxyl est différente de celle observée *in-vivo*. Plusieurs études ont néanmoins rapporté l'existence d'une bonne corrélation entre l'essai conduit *in-vitro* et celui mené sur les disques de feuillage (Sozzi and Staub, 1987 ; Shattock *et al.*, 1988 ; Shattock *et al.*, 1990 ; Matuszak *et al.*, 1994 ; Chycoski *et al.*, 1996 ; Goodwin *et al.*, 1996). Le test mené *in-vivo* fournit une évaluation plus précise du niveau de la sensibilité au métalaxyl, ce qui le rend nécessaire pour confirmer les résultats du test *in-vitro* (Sozzi et Staub, 1987). Selon ce dernier auteur, il existe parfois des différences dans les résultats obtenus par les deux tests. Dans notre étude, les différences de réaction enregistrées pour certains isolats résulteraient de leur nature hétérogène. Autrement dit, ces isolats pourraient être constitués de deux ou plusieurs souches qui ont des réactions différentes vis à vis du métalaxyl. Bien que le pourcentage des isolats résistants (*in-vivo*) soit relativement faible (10%), la présence de ce phénotype est considérée comme alarmante et très importante si l'on sait que d'une part le nombre d'isolats collectés et étudiés n'est certainement pas représentatif de la population totale de la région, et d'autre part, la majorité des parcelles visitées ne sont pas traitées par le métalaxyl contre le mildiou. L'acquisition de la résistance au métalaxyl par les populations Marocaines de *P. infestans* a été signalée par El Ismaili (1994) Sediqui *et al.* (1997) après des études menées dans la région de Larach. Cela montre que cette présence ne date pas d'aujourd'hui et suggère que la migration des souches résistantes au métalaxyl est très fréquente. En effet, le Maroc importe chaque année de l'Europe environ 40 000 T de semences de pomme de terre (Anonyme, 1999). Par conséquent, l'importation des semences non certifiées indemnes peut entraîner des populations très hétérogènes. Selon Gregory (1983), les tubercules de semences infectées constituent la source principale d'inoculum primaire du mildiou de la pomme de terre. En Europe et aux Etats Unis/Canada, la migration est considérée parmi les causes principales de la diversité génétique dans les populations de *P. infestans* (Fry *et al.*, 1992 ; Daggett *et al.*, 1992 ; Sujkowski *et al.*, 1993 ; Drenth *et al.*, 1993 ; Goodwin *et al.*, 1994). Le problème de l'émergence de souches résistantes au métalaxyl est largement répandu en Europe (Carter *et al.*, 1982 ; Cook, 1991 ; Davise *et al.*, 1981 ; Goodwin *et al.*,

1996) en Asie (Koh *et al.*, 1994 ;Thierrien *et al.*, 1993) et en Amérique (Matusack *et al.*, 1994 ; Chycoski et Punja, 1996 ; Goodwin *et al.*, 1996).

Par ailleurs, l'apparition de souches résistantes au métalaxyl dans cette zone pourrait être aussi le résultat d'un mécanisme d'adaptation suivi d'une migration trans-régionale étant donnée que le métalaxyl est utilisé comme traitement contre le mildiou dans plusieurs zones de production de pomme de terre au Maroc. Il est probable aussi qu'après migration ce phénotype apparaît suite à une rapide évolution des génotypes de la population ancienne par multiplication et sélection.

Par ailleurs, une bonne corrélation ($R^2 = 0.89$) entre la résistance au métalaxyl et le type sexuel A2 a été mise en évidence dans la présente étude. Cependant, cette association ne peut être généralisée puisque le nombre d'isolats testés est relativement faible et n'est pas représentatif de la totalité de la population présente dans la zone étudiée. Par contre, au Canada Daayf *et al.* (1999) ont rapporté qu'une diminution du niveau de résistance au métalaxyl est observée chez les isolats de type sexuel A2. Ces auteurs ont conclu que ce phénomène résulterait de la diminution de l'utilisation de ce fongicide pour le contrôle de la maladie. Par contre, chez les isolats A1 le phénomène de la résistance apparaît suite à une migration des souches à partir de régions où le métalaxyl est largement utilisé. Davise *et al.* (1981) ont remarqué que l'émergence des souches résistantes au métalaxyl coïncide avec l'apparition de type sexuel A2 en Europe. En effet, en analysant les individus de la descendance d'un croisement entre un isolat A1 résistant au métalaxyl et un isolat A2 sensible au métalaxyl, Shaw (1991) a rapporté que tous les souches hybrides de type sexuel A2 se sont révélés résistants au métalaxyl.

Bien que le périmètre de Saïs ne constitue pas une zone de grandes superficies de production de la pomme de terre et que les localités ne sont pas trop espacées, la caractérisation des isolats collectés en utilisant certains paramètres a révélé l'existence d'une grande variabilité d'expression des populations étudiées. Cette variabilité est observée soit à l'intérieur de la même parcelle de pomme de terre soit entre des parcelles situées dans la même localité ou des localités différentes. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré essentiellement que les isolats collectés de la région de Ain Cheggag sont plus performants que les isolats collectés à partir des autres localités. Cette variabilité géographique est rapportée aussi au Mexique (Fry *et al.*, 1992), au Canada (Daayf *et al.*, 2000) et aux Etats Unis (Goodwin *et al.*, 1995).

Pour chaque caractère étudié et souvent indépendamment du type sexuel, les isolats résistants au métalaxyl présentent souvent des performances intrinsèques plus importantes que celles des autres phénotypes. En effet, la croissance mycélienne et l'intensité de sporulation des isolats résistants au métalaxyl sont plus importantes que celles remarquées chez les autres isolats. Cette étude a révélé aussi la grande capacité germinative directe et indirecte des

sporocystes des isolats moyennement résistants et résistants au métalaxyl en comparaison avec le pouvoir germinatif des sporocystes des isolats sensibles et ou moyennement sensibles indépendamment de leur types sexuels. Ce dernier résultat est en accord avec les travaux de Bashan *et al.* (1989). Selon Duniway (1983), la germination indirecte représente le facteur limitant dans le processus d'infection, alors que le stade suivant n'a pas beaucoup d'influence sur la vitesse de la progression du pathogène dans les tissus du feuillage. Sachant que la vitesse de la progression de la maladie dans le champ est étroitement corrélée avec les températures ambiantes et le temps d'humectation du feuillage (Krause *et al.*, 1975), la germination indirecte serait donc essentiellement sous le contrôle de ces deux paramètres. L'obtention des concentrations de zoospores importantes pourrait expliquer que la germination indirecte des sporocystes de *P. infestans* peut contribuer à des infections plus rapide que celle provoquées par la germination directe des sporocystes. Cependant, selon Gees et Hohl (1988), les taux de germination des spores de toutes les races du pathogène sont comparables sur les cultivars résistants ou sensibles. Néanmoins, cette remarque peut être aussi en accord avec nos résultats puisque les isolats de la tomate bien qu'ils possèdent des taux de germination (in-vitro) faibles par rapport aux isolats de la pomme de terre, sont très pathogènes pour la variété de tomate Daniela. Cette importante agressivité implique que le taux de germination de ces isolats de la tomate est relativement élevé sur le feuillage de Daniela.

L'évaluation de l'agressivité des différents isolats sous des conditions contrôlées a révélé l'existence de grandes variations entre ces isolats sur les variétés de la pomme de terre et celle de tomate (Daniela). Cette étude a montré un spectre d'agressivité allant d'un niveau faible (temps de latence long, petite lésion et faible sporulation) qui caractérise essentiellement les isolats de tomate sur pomme de terre, à un niveau élevé notamment remarqué chez la plupart des isolats collectés de la pomme de terre (sur pomme de terre ou sur tomate). Ces variations d'agressivité sont remarquées chez les isolats collectés de la même parcelle/localité et de parcelles/ localités différentes. Les isolats collectés de la région de Ain-Cheggag ont montré une agressivité plus importante (temps de latence court, large lésion et sporulation importante) que les autres isolats. En plus, indépendamment du type sexuel, les isolats résistants au métalaxyl sont plus agressifs que les isolats sensibles au métalaxyl quelque soit le cultivar de pomme de terre testé. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Cohen *et al.* (1990) et Kadich *et al.* (1990).

Sur la variété de tomate, bien que la relation entre la sensibilité au métalaxyl et le degré d'agressivité reste valable, la majorité des isolats collectés de la tomate ou de la pomme de terre ont montré un pouvoir d'agressivité comparable sur le feuillage de cette variété. Certaines études ont, par contre, rapporté que les souches résistantes au métalaxyl sont moins virulentes que les souches sensibles (Day et Shattock, 1997). La restriction de l'utilisation du

métalaxyl dans les champs aboutit à une éradication ou une diminution de la propagation des souches résistantes (Dowley et O'Sullivan, 1985 ; Davidse *et al.*, 1989 ; Day et Shattock, 1997). En effet , en Europe, cette diminution est attribuée à la faible sporulation sur le feuillage caractérisant ces souches résistantes (Dowley *et al.*, 1987) ou la diminution de la durée de l'hibernation de ces souches dans les tubercules (Walker et Cook, 1990 ; Staub, 1994). Cette diminution de la survie des souches résistantes au métalaxyl dans les tubercules a été rapportée dans les populations Israéliennes mais sans perte de leur pouvoir pathogène sur le feuillage (Kadish et Cohen, 1992). Day et Shattock (1997) ont trouvé que les phénotypes intermédiaires sont plus virulentes que ceux sensibles, et ont conclu que l'émergence de la résistance à ce phenylamide n'entraîne pas automatiquement la diminution de la pathogénicité. Cette dernière remarque concorde avec celle que nous avons mis en évidence dans notre étude et qui stipule que les souches intermédiaires et résistantes ont un pouvoir pathogène plus important que celui des souches sensibles.

Les résultats obtenus dans cette étude révèlent l'existence d'au moins deux types d'isolats au sein de la population de *P. infestans* présente dans ces localités. Le premier, constitué par les isolats collectés de la pomme de terre, est adapté aux deux types hôtes (pomme de terre et tomate) ; le deuxième type qui regroupe les isolats collectés de tomate est d'apparence plus adapté à son hôte d'origine (tomate). Cette spécificité pathogénique a été rapporté dans plusieurs pays par Legard *et al.* (1995) ; Oyarzun *et al.* (1997); Lebreton *et al.*, (1999). La différenciation pathogénique des deux types d'isolats contribuera certainement à une distribution hétérogène des populations sur les deux hôtes. Cette étude a montré qu'il existe, au Maroc, une structure de la population de *P. infestans* assez simple sur la tomate mais plus complexe sur la pomme de terre. L'importance des différents hôtes dans l'évolution des structures de populations de *P. infestans* est signalée dans plusieurs études (Andrison, 1997). Aux Etats Unis, les clones du parasite présents sur la tomate appartiennent généralement au type sexuel A2 résistant au métalaxyl et sont très pathogènes sur la tomate comme sur la pomme de terre. En Californie, Coffey *et al.* (1995) ont signalé l'existence sur la tomate d'un ou de quelques clones très pathogènes, résistants au métalaxyl et appartenant au type sexuel A2, alors que sur la pomme de terre, la structure du pathogène est plus complexe avec la coexistence de plusieurs clones souvent très dissemblables. Cependant, un cas inverse semble caractériser les champs Français où les populations sont plus diverses sur la tomate que sur la pomme de terre avec la présence du type sexuel A2 uniquement sur tomate (Andrison *et al.* 1998). Selon ce dernier auteur, les informations concernant les flux de gènes entre les populations du pathogène présentes sur la pomme de terre et sur la tomate restent encore incomplètes. La comparaison de nos souches avec les génotypes détectés aux Etats Unies (Fry et Goodwin, 1997) montre que le comportement de nos souches ressemble à celui des génotypes nouvellement

détectés tels que US-6 et US-11 (types sexuel A1, résistants au métalaxyl, et pathogènes sur pomme de terre et tomate), US-17 (A1, résistants au métalaxyl, et pathogène sur la tomate), US-7 (A2, Résistant au métalaxyl, pathogène sur pomme de terre et tomate) et US-8 (A2, Résistant au métalaxyl, pathogénicité élevée sur la pomme de terre). Par contre, l'ancien génotype, nommé US-1, est de type sexuel A1, sensible au métalaxyl et pathogène uniquement sur la pomme de terre. Ceci confirme la présence dans nos champs d'au moins deux génotypes. En effet, récemment, en déterminant le type sexuel, la résistance au métalaxyl et les génotypes Glucose-6-phosphate isomerase (Gpi) et Peptidase (Pep) de la population de pathogène collectée de la région de Larache, Sediqui *et al.* (2000) ont identifié 4 génotypes MO1, MO2, MO3 et MO4. Ceci est un argument fort de la grande variabilité caractérisant la population Marocaine de *P. infestans*.

Par ailleurs, Cette étude d'agressivité des isolats menée sur les feuilles détachées a montré que les variétés de pomme de terre ou de tomate présentent des niveaux élevés de sensibilité au pathogène. Néanmoins, les quatre cultivars de la pomme de terre peuvent être subdiviser en 3 groupes. La variété Spunta est la plus sensible, Nicola et Désirée sont moyennement sensibles, alors que la variété Kondor a manifesté le plus faible niveau de sensibilité. La variété de tomate Daniela présente un niveau de sensibilité comparable à celui de la variété de pomme de terre Spunta. Cette grande sensibilité remarquée chez les variétés testées suggérerait la présence dans le champ Marocain d'une nouvelle population du pathogène très agressive qui a remplacée l'ancienne population caractérisée par son agressivité relativement faible.

Le nombre des isolats étudiés dans cette étude n'est certainement pas représentatif de la totalité de la population existante au Maroc. Néanmoins, cette investigation constitue une preuve de la nature très hétérogène de la structure de la population de *P. infestans* présente au Maroc. Cette hétérogénéité est remarquée au sein d'une population de pathogène appartenant soit à la même parcelle soit à des parcelles situées dans des zones différentes. Avec la coexistence des deux types sexuels A1 et A2 dans les champs marocains, la nouvelle population du pathogène acquerra la potentialité de reproduction sexuée. Cette évolution serait à l'origine de la variabilité mise en évidence dans cette étude. Cette hétérogénéité de la population se manifestera par l'apparition de plusieurs génotypes très agressifs et génétiquement plus adaptés. Néanmoins, la contribution réelle de la reproduction sexuée dans cette évolution au Maroc reste à confirmer.

Chapitre III

INDUCTION DE LA REPRODUCTION SEXUEE ET ESSAIS SUR LA GERMINATION DES OOSPORES DE DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Les recherches sur le rôle de la reproduction sexuée dans l'épidémiologie de *P. infestans* ont acquis durant ces dernières années une importance primordiale. La coexistence des deux types sexuels A1 et A2 dans une même parcelle ou dans des parcelles conjointes augmente la probabilité de l'accomplissement de la phase sexuée de ce pathogène. Plusieurs études ont confirmé la capacité de ce champignon à produire des oospores dans des cultures pures ou après croisement entre les deux types sexuels A1 et A2 (Ko, 1988). Par ailleurs, les souches A1 de *P. infestans* sont aussi capables de former des oospores lorsqu'elles sont croisées avec des souches A2 appartenant à d'autres espèces de *Phytophthora* même dans le cas où les deux confrontants sont séparés par une membrane de polycarbonate empêchant la pénétration des fragments mycéliens. Il s'agit d'hybridation interspécifique (Skidmore *et al.*, 1984 ; Shen *et al.*, 1983). Selon le premier auteur, chaque type sexuel est caractérisé par la production d'une hormone spécifique. Les réactions de chaque type sexuel vis à vis de l'hormone de l'autre type sont semblables ; la confrontation induit une réduction du mycélium aérien et des sporocystes (Gallegly et Galindo, 1960 ; Shaw, 1987; Judelson, 1997).

Plusieurs études ont signalé le développement des formes sexuées dans les tissus végétaux de pomme de terre ou de tomate, infectés naturellement ou artificiellement (Frinkling *et al.*, 1989 ; Grinberger *et al.*, 1989 ; Drenth *et al.*, 1993 ; Cohen *et al.*, 1997 ; Hermansen *et al.*, 2000). La majorité de ces études ont révélé le faible pouvoir germinatif des oospores issues de la reproduction sexuée (0 à 15%) (Gallegly, 1970 ; Andrivon *et al.*, 1995). Les oospores produites par les espèces homothalliques de *Phytophthora* ont une capacité de germination remarquablement plus importante que celle observée chez les espèces hétérothalliques. En effet, des taux élevés de germination ont été relevés chez *P. cactorum* (Benihashemi et Mitchell, 1976), *P. heveae* (Leal et Gomez-Meranda, 1965), *P. Katsurae* (Ko et Arakawa, 1980), *P. syringae* (Harris et Cole, 1982), *P. citricola* (Plourde et Green, 1982), *P. fragariae* (Duncan, 1985), *P. vignae* (Ishiguro et Ui, 1981) et *P. megasperma* (El Hamalawi et Erwin, 1986 ; Foster *et al.*, 1983). Par contre, des taux de germination faibles et instables ont été enregistrés chez certaines espèces hétérothalliques tels que *P. palmivora* (Chee, 1981 ; Ribeiro *et al.*, 1975 ; Kaosiri *et al.*, 1980), *P. capsici* (Kaosiri *et al.*, 1980 ; Polach et Webster, 1972 ; Ribeiro *et al.*, 1975 ; Sator et Butler, 1969), *P. parasitica* (Boccas, 1981 ; Ribeiro *et al.*, 1975), *P. cambivora* (Ribeiro *et al.*, 1975) et *P. infestans* (Smoot *et al.*, 1958 ; Ribeiro *et al.*, 1975, Shattock *et al.*, 1986 ; Andrivon, 1995). Néanmoins, certains auteurs ont pu obtenir des taux élevés de germination chez quelques une des espèces hétérothalliques de

Phytophthora en utilisant des techniques spéciales. Shattock *et al.* (1986) ont rapporté que le transit des oospores à travers le tube digestif de l'escargot et leur récupération dans les excréments, germent à des taux dépassant 50% après incubation dans l'eau distillée stérile à 20°C et sous lumière continue. Ann et Ko (1988) ont obtenu des taux de germination des oospores de *P. parasitica* voisins de 90% lorsque ces formes sexuées sont traitées par le KMnO₄ et incubées dans un milieu synthétique à 24°C et sous la lumière.

La contribution réelle des ces formes sexuées dans le déclenchement de la maladie en plein champ n'est pas encore bien déterminée jusqu'à présent. Néanmoins, le pouvoir infectieux de ces oospores a été confirmé au laboratoire (Drenth *et al.*, 1995 ; Cohen *et al.*, 1997 ; Anderson *et al.*, 1998).

Dans une étude comparative, Tooley *et al.* (1985) et Skidmore *et al.* (1997) ont rapporté que les populations de *P. infestans* issues de la reproduction sexuée sont plus diverses que celle résultant de la reproduction asexuée. Les oospores sont une forme de conservation du pathogène ; elles constituent une autre source d'inoculum primaire de l'infection. Elles seraient à l'origine d'une diversité génétique très importante (Drenth *et al.*, 1993, 1994 ; Goodwin *et al.*, 1995) et augmenteraient le pouvoir adaptatif du pathogène (Medina et Platt, 1999).

Au Maroc peu d'études ont été menées sur cette maladie. Elles étaient limitées à déterminer les types sexuels des isolats collectés sans évaluer leur comptabilité sexuelle *in-vitro* ou *in-vivo*. Le rôle de ces formes sexuées dans les épidémies n'a pas été non plus étudié.

L'objectif de la présente étude est donc d'examiner la capacité des isolats collectés à produire des oospores *in-vivo*, de tester l'effet de quelques facteurs sur la reproduction sexuée, évaluer le pouvoir germinatif de ces formes sexuées, de vérifier la contribution des oospores dans le déclenchement des infections sur le tissu végétal de pomme de terre et enfin de caractériser des cultures mono-zoospores issues de la reproduction asexuée et celles issues de la reproduction sexuée.

I- Etude de la fertilité des croisements *in-vitro***I- 1-Fertilité des différents croisements sur le milieu PP**

a/ Croisements testés : La fertilité de six croisements cités ci-dessous est évaluée sur le milieu à base de petits pois. Les confrontants interfertiles utilisés ont été prélevés d'une même localité ou de localités différentes. Les croisements testés sont : S2F18 (A1) x S2F25 (A2) ; S2F18 (A1) x P6F11 (A2) ; P6F16 (A1) x S3F12 (A2) ; P6F16 (A1) x P6 F12 (A2) ; F90 (A1) x F91 (A2) et F110 (A1) x S2F22 (A2).

b/ Inoculation et incubation : Une pastille mycélienne de 4 mm de diamètre est prélevée à la périphérie d'une colonie âgée de 10 jours de chaque confrontant. Les deux pastilles sont placées dans une boîte de Petri contenant le milieu de culture à 2 cm l'une de l'autre. Les croisements sont incubés à 20 °C et à l'obscurité pendant 7 à 10 jours

c/ Dénombrement des oospores : Après 10 jours d'incubation, des secteurs de la gélose sélectionnés sous la loupe, contenant des oospores en quantités importantes sont fragmentés en des morceaux (27 mm³ environ). Ces fragments sont broyés à l'aide d'un mortier en ajoutant 5 ml d'eau distillée stérile. Le dénombrement des oospores produites est effectué à l'aide d'un hémaeytomètre en prélevant 1 ml de la suspension (nombre d'oospores par mm³). Dix répétitions sont effectuées pour chaque croisement. Des mesures diamétrales des différents organes sexués (oogones, anthéridies et oospores) sont réalisées à l'aide d'un objectif oculaire PKC à raison de 100 mesures par organe et croisement.

I-2- Estimation de la fertilité en fonction du milieu de culture

La fertilité de 4 croisements (S2F18 (A1) x P6F12 (A2), P6F17 (A1) x S1F35 (A2), F110 (A1) x F108 (A2) et F85 (A1) x S2F22 (A2)) a été estimée sur six milieux de cultures clarifiés. Il s'agit de milieux à base de petits pois, de pois chiche, de haricot, de seigle, de nibier, et de corn meal agar (Cf. III-1 - Matériels et Méthodes - Chapitre II). La technique de culture et le dénombrement des oospores sont signalés dans le paragraphe précédent.

I- 3- Effet du métalaxyl sur la production *in-vitro* des oospores

a / Préparation de milieu amendé de métalaxyl

L'amendement du métalaxyl dans le milieu de culture à base de petits pois est réalisée selon la méthode décrite dans le Chapitre II (Cf. IV-2-1-a, Matériels et Méthodes). Différentes concentrations du fongicide sont utilisées dans ce test à savoir 0 (témoin), 1, 10 et 100 µg /ml.

b / Croisements testés

Les différents confrontants de ces croisements sont choisis de manière qu'ils proviennent de localités différentes et représentent des phénotypes différents. Deux confrontations sont choisis pour chacun des quatre types de croisements testés soit au total 8 croisements qui sont testés dans cette étude :

- * A1-MS x A2-MS : F60 x P7F2 et M7 x M4
- * A1-MS x A2-RM : SP4 x P10F3 et F80 x F108
- * A1-RM x A2-MS : F90 x FO2 et S2F18 x P10F5
- * A1-RM x A2-RM : F90 x F108 et S2F18 x P10F1

Les cultures sont incubées à 20°C et à l'obscurité. Le comptage des oospores formées est réalisée après 10 jours d'incubation(Cf. I-1-c).

II- Induction de la reproduction sexuée *in-vivo*

L'objectif de ces tests est de confirmer la compatibilité sexuelle des isolats sur les tissus de l'hôte.

II-1-Test de Fertilité sur les feuilles de la variété de pomme de terre Désirée

Dans ce test, la production des oospores par les isolats interfertiles est conduite sur des folioles entières et sur des disques de feuilles (2 cm de diamètre) de la variété de pomme de terre Désirée (la plus cultivée au Maroc). Cette dernière est réputé pour sa sensibilité moyenne au mildiou.

a/ Croisements testés

Six croisements cités ci-après révélés fertiles *in-vitro* sont conduits *in-vivo*. Pour ce faire, des suspensions de sporocystes sont préparées pour chaque isolat à partir des cultures mycéliennes âgées de 10 jours et ajustées à une concentration de 5×10^4 sporocystes ml^{-1} . Les croisements testés sont S2F18 (A1) x S2F25 (A2) ; S2F18 (A1) x P6F12 (A2) ; P6F16 (A1) x P6F11 (A2) ; P6F16 (A1) x S2F20 (A2); P6F16 (A1) x S3F12 (A2) ; S2F18 x P10F33 (A2).

b/ Préparation du matériel végétal

➤ **Feuilles entières** : Des feuilles appartenant à l'étage sub-apical des jeunes plants de pomme de terre sont lavées à l'eau de robinet, trempées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% et sont soigneusement lavées à l'eau distillée stérile deux à trois fois. Après séchage, ces organes sont mis dans des boîtes de Petri stériles de 90 mm de diamètre contenant du papier filtre humidifié en plaçant la face supérieure en contact avec le papier filtre.

➤ **Disques de feuille** : Les disques de feuilles sont préparés selon la méthode précédemment décrite (Cf. IV-2-2- c, Matériels et Méthodes, Chapitre II).

c/ Inoculation et incubation :

Pour les folioles entières, une quantité de 30 µl de la suspension de sporocystes de chaque confrontant est déposée sur la face inférieure des organes végétaux placées dans des boîtes de Petri humidifiées. Les deux inoculums sont déposés au centre à 2 cm l'un de l'autre. Après 24 à 48 heures, les folioles sont transférées dans des boîtes de Petri stériles de 90 mm de diamètre contenant 10 ml d'eau distillée stérile pour favoriser l'accomplissement de la reproduction sexuée (Cohen *et al.*, 1997). La face inférieure des feuilles est placée en contact avec l'eau. Les organes végétaux sont ensuite incubées à 15°C à une photopériode de 16h.

Quant aux disques de feuilles, ils sont placées dans des boîtes de Petri stériles contenant 10 ml d'eau distillée stérile ; la face inférieure vers le haut. Ils sont ensuite inoculées en déposant une goutte de 20 µl d'une mixture sporangiale sur la face inférieure. Cette mixture est composée de quantités égales de deux suspensions sporangiales des isolats interfertiles ajustées à une concentration de 5×10^4 sporocystes ml⁻¹. L'incubation est effectuée à 15°C et à une photopériode de 16h. Après 24 à 48 h, les disques de feuillage sont retournés de manière que leur face supérieure soit en haut.

d/ Préparation des tissus végétaux pour les observations microscopiques

A partir du septième jour d'incubation, les folioles entières et les rondelles de feuille sont clarifiées pour permettre une bonne évaluation du nombre d'oospores produits dans le tissu infecté. Pour ce faire, deux techniques sont utilisées : 1) Les tissus infectés sont trempés dans une solution d'éthanol à 90% pendant 48 à 72 heures. 2) les organes infectés sont placés dans une solution de KOH à 10% et incubées à 90 °C pendant une heure.

e/ Dénombrement des oospores

Après clarification, les folioles infectées sont observées directement sous microscope optique en les plaçant à plat sur des lames. Des fragments de feuilles de 2 cm de diamètre sont prélevés à partir des zones de contact des deux lésions ou à partir des surfaces de forte production des oospores. Ces fragments sélectionnés ainsi que les disques de feuilles clarifiés sont soigneusement broyés dans un petit mortier avec 5 à 10 ml d'eau distillée stérile. Les oospores sont comptés à l'aide d'un hémaeytomètre (cellule de THOMA) et le nombre moyen de oospores formés par cm² du tissu de feuillage est calculé. Dix comptages sont effectués par fragment et par croisement.

II-2- Fertilité sur des organes végétaux différents

En vue d'évaluer l'effet de l'hôte sur la fertilité des croisements des isolats de *P. infestans*, cette investigation est conduite sur les différents organes végétaux des deux principaux hôtes de ce pathogène à savoir la pomme de terre et la tomate.

a/ Matériel fongique

Sept croisements fertiles sont testés dans cette évaluation. Les confrontants de chaque croisement sont collectés soit de la même localité soit de localités différentes. Il s'agit des croisements P6F17 (A1) x S2F25 (A2), P6F16 (A1) x F97(A2), S2F19 (A1) x S3F31 (A2), S2F18 (A1) x S1F27 (A2), F110 (A1) x P6F4 (A2), F75 (A1) x P6F14 (A2) et F62 (A1) x FO4 (A2).

b/ Préparation des tissus végétaux

La production des oospores est évaluée sur des disques de feuilles, des fragments de tiges et des rondelles de tubercules de la pomme de terre (Var. Désirée) et sur des disques de feuilles, des fragments de tiges et de la croûte du fruit de tomate (Var. Daniela). Les disques de feuilles sont préparés selon la méthode décrite précédemment. (Cf. IV-2-2-c, Matériels et Méthodes, Chapitre II). La préparation des autres tissus est la suivante :

- Fragments de tige : Des fragments de tige de 4 cm de longueur sont prélevés de l'étage sub-apical des jeunes plants de pomme de terre et de tomate. Ils sont lavés avec l'eau de robinet puis sont trempés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 3 minutes. Ils sont ensuite lavés avec de l'eau distillée stérile deux à trois fois. Après séchage, ces fragments sont placés dans des boîtes de Petri stériles de 90 mm de diamètre contenant du papier humidifié.
- Rondelles de tubercules : Après lavage et désinfection superficielle, des tubercules sains de la variété Désirée sont épluchés. Des rondelles de 1.5 cm de diamètre et 1.5 cm de hauteur sont prélevés. Ces tissus sont trempés dans une

solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 2 à 3 min. Ils sont ensuite lavés trois fois avec de l'eau distillée stérile. Ces fragments sont ensuite séchés et placés dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre contenant de papier humidifié.

- Fragments de la croûte de fruit de tomate : Après lavage et désinfection des fruits de tomate mûres, des petits disques de la croûte de 2 cm de diamètre sont prélevés. Ces tissus sont lavés, désinfectés, séchés et placés dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre contenant du papier humidifié.

c/ Inoculation et incubation

Les différents organes préalablement préparés sont inoculés en déposant au centre une goutte de 20 µl de la mixture des suspensions sporangiales de deux isolats interfertiles (5×10^4 sporocystes ml^{-1}). Les tissus de feuilles, de tige et de fruit de tomate sont incubés à 15°C et sous une photopériode de 16 heures et ceux de tubercules à 20°C et à l'obscurité. Après 24 à 48 h, Ils sont transférés dans des boîtes de Petri stériles de 90 mm de diamètre contenant 5 ml l'eau distillée stérile.

d/ Dénombrement des oospores

Après clarification, le comptage des oospores est réalisé selon la méthode précédemment décrite (Cf. II-1-d/e).

II-3- Effet de la sensibilité des variétés de pomme de terre sur la fertilité.

Quatre croisements parmi ceux révélés fertiles *in-vitro* ont été reconduit *in-vivo* pour évaluer l'effet du niveau de la sensibilité des cultivars vis à vis de ce pathogène sur la fertilité des isolats. Il s'agit des croisements P6F17 (A1) x S2F6 (A2), P6F16 (A1) x S3F25 (A2), S2F19 (A1) x S2F1 (A2) et F90 (A1) x P6F11(A2). Ce test est mené sur des disques de feuilles de variété sensible (Spunta), moyennement sensible (Désirée, Nicola) et moyennement résistante (Kondor). Les conditions d'inoculation et d'incubation sont comparables à celles décrites précédemment (Cf. II-1, Matériels et Méthodes, Chp. III). Le dénombrement des oospores est effectué après 10 jours d'incubation.

II-4 -Effet du métalaxyl sur la fertilité *in-vivo*

a/ Matériel fongique

L'évaluation de l'effet du métalaxyl sur la fertilité de *P. infestans in-vivo* est réalisée avec les mêmes croisements fertiles utilisés dans le test *in-vitro*. Ces confrontants représentent soit les mêmes phénotypes soit des phénotypes différents. Ainsi les croisements testés sont :

- * A1-MS x A2-MS : F60 x P7F2 et M7 x M4
- * A1-MS x A2-RM : SP4 x P10F3
- * A1-RM x A2-MS : S2F18 x P10F5
- * A1-RM x A2-RM : F90 x F108 et S2F18 x P10F1

b/ Matériel végétal

Le test est mené sur des rondelles de folioles de la variété Désirée appartenant à l'étage foliaire sub-apical. La préparation de ces rondelles est réalisée selon la même méthode décrite précédemment (Cf. IV -2-2-c, Matériels et Méthodes, Chp. II).

c/ Solution du fongicide

La solution du fongicide est préparée pour obtenir différentes concentrations, à savoir 0 (témoin), 1, 10 et 100µg/ml ((Cf. IV -2-2, Matériels et Méthodes, Chp. II).

d/ Inoculation et incubation

L'inoculation est réalisée à l'aide d'une mixture de suspensions de sporocystes des deux isolats interfertiles (5×10^4 sporocystes ml^{-1}). L'inoculation et l'incubation sont réalisées selon la méthode décrites dans le paragraphe II-1-c.

Deux tests sont réalisés au cours de cette expérience. Dans le premier, les rondelles sont mises au contact du métalaxyl en même temps que l'inoculation. Dans le deuxième test, les disques de feuille sont incubées dans les boîtes de Petri de 90 mm de diamètre contenant le fongicide, 7 jours après inoculation. Ce deuxième test est réalisé pour vérifier l'effet du métalaxyl sur les oospores en cours de leur formation.

e/ Dénombrement des oospores

Pour chacun des deux tests, la détermination du nombre d'oospores formé par cm^2 de feuilles est réalisé après 7, 14 et 21 jours d'incubation pour le premier test et après 8, 15, et 25 jours d'inoculation pour le deuxième test.

III-Essais de germination des oospores produites *in-vitro*

La germination des oospores constitue une étape très importante du cycle de vie du pathogène. La germination constitue le moyen le plus efficace pour l'évaluation de la survie des formes sexuées. Pour cela, différents tests sont conduits dans le but principal est de déterminer certaines conditions optimales favorables à la germination des oospores à des taux élevés.

III-1- Effet de la lumière

D'après plusieurs études, la lumière constitue le facteur limitant de la germination des oospores pratiquement chez toutes les espèces de *Phytophthora* (Romero et Gallegly, 1969 ; Boccas, 1979) . Le présent test est mené dans le but de vérifier l'effet de la photopériode et de la lumière continue sur le taux de germination des oospores formés par différents croisements.

III- 1-1- Préparation de la suspension des oospores

Après 15 jours d'incubations à 20°C et à l'obscurité, des croisements fertiles de deux isolats interfertiles (S2F18 (A1) x P6F11 (A2)) sont conservés à l'obscurité à 4°C pendant un mois pour la maturation des oospores (Ribeiro, 1983). Ces dernières sont extraites par broyage de la gélose, prélevée dans la zone de contact des colonies compatibles dans de l'eau distillée stérile. Les spores sont filtrées à travers un filtre de 10 µm de porosité. Les oospores retenues sur le filtre sont ensuite lavées avec de l'eau distillée stérile, puis elles sont incubées dans des boîtes de Petri stériles contenant de l'eau distillée stérile.

III-1-2-Incubation des oospores

Les oospores sont incubées à 20°C et à différentes conditions d'éclairage : l'obscurité, une photopériode de 16h et sous lumière continue.

Le taux de germination a été estimé après 2, 3, 5 et 10 jours d'incubation. 10 répétitions sont réalisées pour chaque test (200 oospores sont considérées chaque fois). Ce taux de germination ne prend en considération que les oospores développant un ou plusieurs tubes germinatifs terminés par un sporocyste.

III-2- Effet du milieu de germination

Certaines études, bien qu'elles soient rares, ont rapporté que les milieux de culture naturels peuvent influencer le taux de germination des oospores chez *P. infestans* (Medina et Platt, 2000). Les préparations de ces milieux ne sont pas encore standardisés. Dans cette partie, les milieux de germination seront testé pour évaluer leur rôle stimulateur de la germination des oospores. Les

préparations des substrats décrites ci-après constituent le résultat de plusieurs tests préliminaires. Les oospores utilisées sont prélevées à partir d'un seul croisement.

III-2-1- Préparation des milieux de germination

a/ Infusions des fumiers de mouton et de cheval : 40 g de fumier frais de mouton et 30 g de celui de cheval sont mis en suspension dans 1 litre d'eau distillée tiède. Le contenu est bien mélangé. Les infusions sont ensuite filtrées à travers une mousseline. Le filtrat est centrifugé à 3000 tours/ minute pendant 3 minutes. Le précipité est éliminé. Le pH de la solution obtenue est ajusté à 6.9-7. La solution est autoclavée à 121°C pendant 20 minutes.

b/ Filtrat de sol de pomme de terre : Environ 2 litre d'eau distillée sont versés dans un pot contenant 4 kg de sol de pomme de terre. Une quantité de 100 ml d'eau de filtration est récupérée à la base du pot. L'extrait obtenu est filtré à travers un papier filtre de Wattman N° 1. Le pH de filtrat est ajusté à 5.9-6. L'autoclavage est effectué à 121°C pendant 20 minutes.

c/ Filtrat des exsudats racinaires de la pomme de terre : 12 g de fragments racinaire de la pomme de terre sont broyés dans un omnimixeur pendant 5 minutes. Le produit du broyage est mis en suspension dans 500 ml d'eau distillée. Le contenu est bien mélangé, puis filtré à travers une mousseline. Le pH du filtrat est ajusté à 5.9-6. Le contenu est autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

III-2-2- Préparation et incubation de la suspension des oospores

La préparation de la suspension des oospores (récoltées du croisement S2F18 (A1) x F54 (A2)) âgées d'environ un mois, est semblable à celle décrite dans le paragraphe précédent (Cf. III - 1-1). Les oospores retenues sur le filtre sont lavées dans un premier temps avec de l'eau distillée stérile, puis avec le bouillon de germination à tester. Elles sont ensuite incubées dans des boîtes de Petri stériles de 90 mm contenant 10 ml du milieu de germination à tester. L'incubation est effectuée à 20°C sous une photopériode de 16 heures. Les taux de germination sont déterminés sous un microscope photonique après 5, 10 et 15 jours d'incubation.

III-2-3- Autres substrats naturels

Il s'agit des bouillons de culture clarifiés de petits pois, de haricot, de pois-chiche, de seigle et du nibier. Après 24h d'incubation des oospores dans des boîtes de Petri contenant de l'eau distillée stérile (pour éviter une contamination précoce), une quantité de 5 à 10 ml de bouillon de culture est ajouté dans les boîtes contenant les oospores. L'incubation est effectuée à 20°C sous 16h de photopériode. Le taux des oospores germantes est déterminé après 10 jours.

III-2-4- Milieu synthétique S+L

Selon Ann et Ko (1985), ce milieu permet la germination des oospores de *P. parasitica* après traitement de celles-ci par de KMnO_4 à 0.25% à des taux qui peuvent atteindre 70%. Ce milieu sera utilisé pour vérifier si cette action inductrice de la germination est valable pour les oospores de *P. infestans*. La méthode de la préparation de ce milieu est la suivante :

- solution salée basale (voir ci-dessous)..... 1 ml
- lécithine20 ml
- glucose2 mg.
- eau distilléeq.s.p 100 ml.

Le mélange est mixé dans un omnimixer à 6000 tr/min pendant une minute. Le pH est ajusté à 7. Une quantité de 2g d'agar agar est ensuite ajoutée à 100 ml du bouillon de culture. L'autoclavage est réalisé à 121°C pendant 20 min. Le milieu est maintenu en fusion dans un bain-marie à une température de 40 à 45°C. Les antibiotiques ajoutés au milieu pour limiter le développement des contaminants sont l'ampicilline (10 mg), la nystatine (5 mg), et le PCNB (1 mg). Ensuite, le milieu est coulé dans des boîtes de Petri stériles à raison de 15 ml par boîte.

En raison de la non disponibilité du deuxième antibiotique, celui-ci est remplacé par la pimaricine (2 mg).

La solution salée basale est composée de :

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1100 mg
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mg
- $\text{ZnH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 mg
- K_2HPO_4 60 mg
- eau distillée 100 ml

La suspension des oospores est mélangée avec un volume égal d'une solution de KMnO_4 à 0.25% pendant 20 min. Les oospores sont ensuite filtrées et bien lavées avec de l'eau distillée stérile. Une quantité de 5 à 10µl de la suspension des oospores obtenue est ensemencée sur le milieu synthétique gélosé. L'incubation est réalisée à 20°C sous une photopériode de 16h. Les boîtes sont observées quotidiennement et le pourcentage de germination est déterminé après 10 jours d'incubation.

III-3- Effet de la température et de la durée du stockage sur la germination

Les oospores appartenant à différents croisements fertiles (âgés de 15 jours) sont collectées, lavées et distribuées dans des tubes à hémolyse contenant 10ml d'eau distillée stérile. Ces oospores sont ensuite conservées à la température ambiante (20-24°C) et au réfrigérateur (4°C). Les taux de germination des oospores, stockées pendant 15, 30, 60, 120 jours et 12 mois (pour les deux essais), sont déterminés après 10 jours d'incubation sur le milieu de germination à base d'extrait de sol de pomme de terre. 10 répétitions sont effectuées pour chaque test.

III- 4- Effet du type de croisement sur la germination

Huit croisements interfertiles *in-vitro* sont utilisés dans ce test. Il s'agit de F85 (A1) x S1F27 (A2), F110 (A1) x P6F11 (A2), F42 (A1) x A20 (A2), A18 (A1) x F109 (A2), F90 (A1) x S3F12 (A2), F82 (A1) x A14 (A2), SP11 (A1) x F54 (A2) et A14 (A1) x S1F35 (A2). Les confrontants interfertiles de ces croisements sont choisis de manière à ce qu'ils soient prélevés de la même parcelle ou de parcelles différentes. Ces croisements testés sont Pour chaque croisement, des oospores conservées pendant deux mois à 4°C sont prélevées, filtrées et incubées dans des boîtes de Petri de 90 mm contenant soit l'eau distillée stérile soit le filtrat des exsudats racinaires de pomme de terre. L'incubation est réalisée à 20°C sous une photopériode de 16 heures. Les pourcentages de germination sont déterminés après 10 jours d'incubation. Dix répétitions sont effectuées à chaque fois.

III-4- Effet du transit des oospores à travers le tube digestif de l'escargot sur leur germination

La méthode utilisée dans ce test est celle décrite par Shattock *et al.* (1986). Dans notre test deux milieux de germination sont utilisés, à savoir l'eau distillée stérile et l'extrait de sol de pomme de terre. Les oospores appartenant à quatre croisements sont considérés dans ce test (S2F19 (A1) x P5F4 (A2), F110 (A1) x F54 (A2), S2F18 (A1) x P6F4 (A2) et P6F17 (A1) x P6F11 (A2)). La gélose contenant les oospores est offerte à des escargots ayant jeûné pendant 24 à 48 heures pour la digérer. Après 24 à 72 heures, les excréments rejetés par ces invertébrés sont mis en suspension dans l'eau distillée stérile et broyés dans un mixeur. Le broyât est filtré (pores de 4 µm de diamètre). Les oospores retenues sur le filtre sont soigneusement lavées avec de l'eau distillée stérile, puis mises en suspension dans une solution de bromure de mercure (30µg/ml) pendant 3 à 4

min. Ce produit permet une désinfection superficielle des oospores. Elles sont ensuite immédiatement lavées avec de l'eau distillée stérile. Ces oospores sont ensuite mis en suspension dans les deux milieux de germination cités ci-dessus. Les boîtes contenant ces oospores sont incubées à 20 °C sous lumière continue. Les relevées des taux de germinations sont effectués après 10 jours d'incubations.

III-6- Effet du métalaxyl sur la germination

Des oospores produites par 8 croisements dont les confrontants ont le même phénotype ou des phénotypes différents. Il s'agit des mêmes croisements utilisés dans l'évaluation de l'effet du métalaxyl sur la fertilité *in-vitro* (Cf. I-3). Les oospores utilisées dans ce test sont âgées de 2 mois. Ces oospores sont incubées dans des boîtes de Petri contenant la solution de métalaxyl à des concentrations de 0 (témoin), 1, 10 et 100µg/ml. L'incubation est effectuée à 20°C sous une photopériode de 16 heures. Les taux de germinations sont déterminées après 5, 10 et 15 jours d'incubation

IV- Etude de la Contribution des oospores dans les infections

Ces tests sont réalisés dans le but de vérifier la capacité des oospores produites *in-vitro*, et celles supposées présentes dans le sol naturellement infecté, à induire des infections sur des organes détachés de la pomme de terre, ainsi que de vérifier la pathogénicité des souches mono-oospores établit à partir des oospores produites *in-vitro*.

IV-1- Essais menés sur des sols infestés naturellement ou artificiellement

IV-1- 1- Préparation du sol

IV-1- 1-1- Sol naturellement infesté

Quatre échantillons de sol sont prélevés à partir de la rhizosphère de parcelles de la pomme de terre infectées (où nous avons collecté des isolats interfertiles). Ces échantillons de sols contenant des débris de végétaux infectés sont séchés à l'air ambiant, broyés dans un mortier et tamisés à travers deux tamis dont les pores sont de 5 et 2 mm de diamètre respectivement. 2 kg de sol est récupéré dans une bassine (25 x 25 cm), préalablement désinfectée à l'hypochlorite de sodium à 10% et lavée avec de l'eau distillée stérile. Le sol est ensuite imbibé d'eau distillée stérile jusqu'à obtention d'un film d'eau à la surface. Les bassines sont recouvertes avec du plastique et incubées à 20°C sous

une photopériode de 16 heures pendant 24 à 48 heures pour stimuler la germination des oospores.

IV-1- 1-2- Sol artificiellement inoculé

a/ Désinfection du sol

Le sol récupéré dans la rhizosphère de pomme de terre est séché, broyé et tamisé, avant d'être autoclavé à 121°C pendant une heure. Après refroidissement, l'échantillon est placé dans des bassines désinfectées (25 x 25 cm) à raison de 2 kg par bassine. Le sol est ensuite imbibé d'eau distillée stérile de manière à obtenir un film d'eau à la surface.

b/ Préparation des suspensions des oospores

- **Oospores produites *in-vitro*** : Le test est conduit avec des oospores âgées d'une semaine à 5 mois et stockées soit à la température ambiante (20 à 25°C), soit au réfrigérateur (4°C). Une suspension d'oospores est préparée à partir de plusieurs types de croisements fertiles. La concentration est ajustée à 10^6 spores/ml

- **Oospores produites *in-vivo*** : 15 jours après inoculation de disques de feuilles de la variété Désirée par des isolats interfertiles, ces tissus sont broyés avec de l'eau distillée stérile. Les oospores sont filtrées (pores de 10 µm de diamètre). Les oospores retenues sont traitées (ou non) avec de KMnO_4 pour éliminer les spores asexuées, puis elles sont immédiatement lavées avec de l'eau distillée stérile deux à trois fois. Elles sont ensuite mises en suspension dans de l'eau distillée stérile. La concentration est ajustée à 10^6 spores/ml.

c/Inoculation et incubation des sols

Le sol contenu dans les bassines est inoculé par les suspensions d'oospores à raison de 100 oospores / ml de sol. L'incubation est menée à 15-20°C sous une photopériode de 16h pendant 12 h, 24h, 3 jours, 5 jours, 7 jours et 10 jours. L'objectif étant de stimuler la germination des formes sexuées.

d/ Préparation du matériel végétal

Des disques de feuilles (20 mm de diamètre) et des rondelles de tubercules (20 mm de diamètre et 20 mm d'épaisseur) de la variété Désirée sont désinfectés et lavés avec de l'eau distillée stérile selon les techniques décrites précédemment (Cf. II-2-2). Après séchage, ces tissus végétaux sont placés dans les bassines contenant le sol à tester. La face inférieure des folioles est mise en contact avec le film d'eau. Les bassines sont ensuite couvertes avec du plastique. Celles contenant les folioles sont incubées à 15°C sous une photopériode de 16 h, tandis que celles contenant les rondelles de tubercules

sont incubées à 20°C et à l'obscurité. A partir du deuxième jour d'incubation, les différents tissus sont examinés quotidiennement sous la loupe.

IV-2- Essais de cultures mono-oospores

Les cultures mono-oospores constituent une voie très importante pour étudier les caractéristiques génétiques et évolutives des populations de pathogène issues de la reproduction sexuée. En effet, l'étude de ces populations permet de déterminer le degré de variabilité induite par la recombinaison sexuelle.

Beaucoup d'auteurs ont rapporté la difficulté de la mise en culture des oospores produites *in-vitro* pour obtenir des descendants de la reproduction sexuée. Ceci est due au faible taux de germination des oospores des milieux de cultures sélectifs ou non.

Dans le présent travail, nous avons testé, en essais préliminaires, différentes techniques et milieux de cultures pour maîtriser la mise en culture des oospores.

IV-2-1- Préparation du milieu de culture sélectif

Le substrat sélectionné pour la mise en culture des oospores est le milieu de culture clarifié à base de Petits pois contenant la vancomycine et la rifampicine à des doses de 200µg/ml et 50µg/ml respectivement. Après son autoclavage, le milieu de culture clarifié est maintenu en fusion au bain marie (45°C) pendant 1 à 1 h 30 min. Au cours de cette période, Les antibiotiques sont versés dans un petit flacon stérile contenant 5 ml du solvant dymethyl sulfoxyde (DMSO) pour une bonne dissolution. Ils sont ensuite versés dans le milieu. Après homogénéisation, le milieu est coulé dans des boîtes de Petri stériles de 90 mm à raison de 15 à 20 ml par boîte. Toute ces étapes sont effectuées sous des conditions aseptiques.

IV-2-2- Préparation des oospores et conditions d'incubation

Les oospores âgées d'environ 15 jours à 2 mois et issues de différents croisements sont mises en suspension dans de l'eau distillée stérile. Deux types de tests sont réalisés:

1- dans un premier test, des dilutions de la solution stock des suspensions des oospores sont réalisées (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). Après homogénéisation, 1 ml de la suspension contenant environ 20 à 50 oospores est prélevé à l'aide d'une pipette stérile, puis les oospores sont directement étalées sur le milieu de culture sélectif. Les boîtes inoculées sont ensuite incubées à 20°C sous une photopériode de 16 heures. Les boîtes sont examinées

quotidiennement et les oospores en germination sont repiquées dans des boîtes vierges du milieu de culture.

2- dans le deuxième test, les oospores sont d'abord incubées dans des boîtes de Petri de 90 mm contenant soit la solution stérile d'extrait de sol de pomme de terre, soit la solution stérile d'extrait des exsudats racinaires de pomme de terre (Cf. III-2-1). Elles sont ensuite incubées à 20 °C sous une photopériode de 16 heures. Des observations microscopiques sont effectuées à partir du deuxième jour d'incubation pour détecter les oospores germantes. Ces dernières sont soigneusement repiquées sous un microscope optique à l'aide d'une pipette, et déposées sur le milieu de culture sélectif à raison de 4 à 5 oospores germantes par boîte. Les oospores en germination sont ensuite examinées quotidiennement et des repiquages successifs des secteurs contenant le mycélium qui émerge de l'oospore sont effectuées jusqu'à purification de la souche sexuée.

IV-3-Comparaison entre les cultures mono-zoospores issues de la reproduction asexuée et celles issues de la reproduction sexuée.

IV-3-1- Préparation des cultures mono-zoospores

Des suspensions de sporocystes sont préparées à partir des cultures de deux isolats parentaux (S2F18 (A1) et S1F27 (A2)) ou de souches sexuelle (CMO1 et CMO2) âgées de 10 à 15 jours obtenues à partir de la germination selon la technique précédemment décrites (Cf. IV-2). Les sporocystes sont trempées dans des boîtes de Petri stériles (90 mm) à des concentrations de 10^5 à 10^6 sporocystes ml^{-1} d'eau distillée stérile et sont placées au réfrigérateur à 4 °C pendant 1 à 3h pour la libération des zoospores. La suspension des zoospores est filtrée, puis diluée à une concentration de 0.1×10^2 zoospores ml^{-1} . Une goutte de cette suspension est étalée dans des boîtes de Petri (90 mm) contenant le milieu de culture de petits pois vierge. Après précipitation des zoospores sur la gélose, le film d'eau de la suspension contenu sur les boîtes est soigneusement éliminé à l'aide d'une seringue stérile. Les boîtes préparées sont incubées à 20 °C et à l'obscurité. Après 12 à 24 h, les zoospores en germination sont repiquées aseptiquement en utilisant le microscope optique. Ces zoospores germantes sont ensuite incubés dans des boîtes de Petri contenant le milieu de culture de petits pois pour la purification.

IV-3-2-Caractères de comparaison entre les cultures mono-zoospores

Dans ce test, 15 cultures mono-zoospores sont réalisées pour chacun des deux isolats parentaux (considérées comme la progéniture asexuée) et pour les

deux cultures mono-oosporales obtenues (considérées comme les souches sexuelles) soit au total 60 cultures mono-zoospores. Les paramètres de comparaison choisis dans ce cas sont:

- * le morphotype développé par ces souches.
- * le type sexuel déterminé par croisement de chacune des souches mono-zoospores avec deux isolats de référence de types sexuels connus (A1 et A2).
- * la croissance mycélienne *in-vitro* (sur le milieu de culture PP) après 10 jours d'incubation à 20°C et à l'obscurité (Cf. IV- 3, Matériels et Méthodes, Chp II).
- * le niveau de sensibilité *in-vivo* au métalaxyl en utilisant les disques de feuilles de la variété de la pomme de terre Désirée (Cf. IV- 2-1, Matériels et Méthodes, Chp II).

I- Description des principaux stades de la phase sexuée chez *P. infestans*

Les ébauches des organes sexués apparaissent dans la zone de confrontation des mycéliums, 2 à 3 jours après qu'ils étaient entrés en contact. Le gamétocyte femelle pénètre à travers l'anthéridie ; sa différenciation en oogone nécessite 12 heures environ. Ce dernier présente un aspect sphérique et granuleux. La jeune anthéridie enserme le pied de l'oogone. Cette configuration dite amphigyne est rencontrée exclusivement chez les espèces hétérothalliques du genre *Phytophthora* (Savage *et al.*, 1968). Après fécondation, le protoplasme de l'oogone perd son aspect granuleux et forme des vacuoles réfringentes. Le développement de ces dernières entraîne le rétrécissement du cytoplasme et sa migration vers la périphérie de l'organe. 15 à 30 jours après fécondation, la jeune oospore, de forme sphérique, s'entoure d'une paroi épaisse, (Fig. 46)

L'ensemble des observations décrites sont conformes à celles rapportées par Gallegly (1970) et Drenth *et al.* (1994) chez *P. infestans* et par Boccas (1981) chez *P. parasitica* et *P. cinnamomi*.

II- Stabilité de l'autofertilité chez les isolats

L'obtention d'isolats autofertiles constitue une première indication de la présence de souches sexuellement compatibles dans la zone d'étude. Cette autofertilité est caractérisée par la présence des organes sexuels dans la même culture (oogones, anthéridies et oospores). La formation de ces organes est très importante chez les deux isolats autofertiles collectés (P6F15 et P10F10). Si la morphologie des colonies des souches autofertiles est comparable à celle des souches décrites par (Shattock *et al.*, 1990, Fyfe et Shaw, 1992) (Absence de mycélium aérien et de sporulation et présence abondante des oospores) il n'en est pas le cas pour celles observées par Smart *et al.* (1998). Ce dernier a remarqué que les isolats autofertiles sont caractérisés par un mycélium aérien abondant et un nombre très important de sporocystes qui sont capables de germer et de produire des zoospores. Dans notre étude, cette capacité d'autofertilité disparaît après deux à trois repiquages successifs, ils sont devenus de type sexuel A2.

L'autofertilité des isolats résulterait probablement d'un mélange de souches sexuellement compatibles présentes dans les cultures pures. Au cours des repiquages successifs, l'un des deux types sexuels serait affaibli et aboutit à la prédominance de l'autre type sexuel.

Des isolats autofertiles ont été répertoriés au Japon (Mosa *et al.*, 1989), le Canada (Fabritus *et al.*, 1997), la Grande Bretagne (Tantius *et al.*, 1986 ; Fyfe et Shaw, 1992), le Mexique (Gallegly et Galindo, 1958 ; Galindo et Gallegly, 1960), et dans plusieurs régions aux Etats Unies (Vartanian et Endo, 1985 et Miller *et al.*, 1997). L'instabilité du phénomène d'autofertilité a été signalée par différents auteurs (Shaw *et al.*, 1985 ; Shattock *et al.*, 1990, Smart *et al.*, 2000). Selon le dernier auteur, le type sexuel et la croissance mycélienne sont les deux facteurs déterminants qui contrôlent la faculté d'un isolat à produire des oospores dans les cultures pures. D'après plusieurs études ce sont les isolats de type sexuel A2 qui sont capables de produire des oospores en comparaison avec les isolats de type sexuel A1 (Mosa *et al.*, 1989 ; Shaw *et al.*, 1990 ; Smart *et al.*, 1998 ; Smart *et al.*, 2000). Smart *et al.* (1998) ont rapporté que les isolats mono-zoospores issus de certains nouveaux génotypes (US-7 et US-8) sont de type sexuel A2 ou sont autofertiles alors que l'ancien génotype US-1 est de type sexuel A1 et ne forme pas d'oospores en culture pure. Cette dernière observation concorde avec les résultats trouvés dans notre étude. Selon Judelson *et al.* (1996), le type sexuel est contrôlé génétiquement par un seul locus dont l'hétérozygotie induit l'expression du type sexuel A1 alors que l'homozygotie induit le type sexuel A2.

Nous avons relevé, par ailleurs, que certaines cultures âgées dans notre collection répertoriées de type sexuel A2 ont acquis un pouvoir d'autofertilité qui s'avère instable. Cette observation confirme au moins en partie que certaines de nos souches appartiennent aux classes des nouveaux génotypes régnants dans certains pays. Mortimer *et al.* (1977) ont conclu que l'autofertilité serait due à la présence d'un extra chromosome contenant le locus qui contrôle le type sexuel, alors que Smart *et al.* (1998) ont rapporté que les oospores des cultures pures sont formées soit par voie d'automyxie soit par voie d'autogamie. En analysant les cultures mono-zoospores issues d'oospores prélevées à partir des cultures autofertiles, ces auteurs ont rapporté que l'induction de l'autofertilité ne serait pas due à la contamination ou à la formation de l'hétérocaryon ni à l'âge des cultures, mais résulterait de l'apomixie. D'autres études ont rapporté que la formation des oospores dans ces cultures pures peut être induite après de courtes périodes d'exposition à des produits chimiques commerciaux tels que Ridomil 2E, Ridomil Gold EC (mefenoxame), Manebe, Manzate (Moncozebe), Curzate (cymoxanil + mancozebe) et Acrobat MZ (diméthomorphe + mancozebe) (Ko *et al.*, 1986 ; Ko, 1990 ; Govers et Ristaino, 2000).

A notre avis, sachant que *P. infestans* est une espèce hétérothallique, le phénomène d'autofertilité observé dans les deux isolats de notre collection peut être expliqué de deux manières : il s'agirait d'un mélange de souches de types sexuels compatibles ou alors d'une progéniture mono-oospore autofertile chez *P. infestans* formée dans la nature comme celle observée *in-vitro*. Cette dernière

hypothèse a été aussi proposée par Shattock *et al.* (1986, in Shattock *et al.*, 1990).

III- Fertilité des croisements *in-vitro*

III-1- Evaluation de la fertilité sur le milieu de culture PP

Toutes les confrontations testées ont révélé la formation des formes sexuées (anthéridies, oogones et oospores). Les oospores sont comptées et l'analyse de la variance des valeurs enregistrées montre une différence significative ($P < 0.05$) du facteur type de croisement (tableau 31 en annexe). Le nombre moyen d'oospores formées sur milieu PP dans les six croisements varie de 113 (F110 x S2F22) à 199 oospores/ mm³ (S2F18 x P6F11) (tableau 15). Le pourcentage moyen des oospores abortives varie de 10 à 30% selon les croisements. Les mesures diamétrales des différents organes de la reproduction sexuée (100 mesures/organe/croisement) ont révélé que ces dimensions présentent souvent des similitudes surtout pour les anthéridies et les oospores (tableau 15).

Cette différence de production des oospores entre les croisements a été signalée par Gallegly et Galindo (1958), Hanson et Shattock (1998). Selon Gallegly et Galindo (1960), dans un croisement, il existe une tendance de chaque confrontant à former soit les anthéridies soit les oogones. Cette affinité spécifique des deux types sexuels à l'un ou l'autre des formes sexuées affecterait la quantité des oospores produites dans une confrontation.

Tableau 15 : Evaluation de la fertilité de six croisements menés sur le milieu
petits pois et mensurations des organes sexués produits

Croisements	Nombre moyen d'oospores* / mm ³	Oospores abortives (%)	Diamètre (en µm)		
			Oogone	Oospore	Anthéridie
S2F18 (A1)×S2F25(A2)	138 ± 36.1 b	10%	22.5 - 28.8 - 35	10 - 13 - 20	17.5-23.5- 32.5
S2F18(A1)×P6F11(A2)	199 ± 33.8 a	15%	25 - 29.5 - 35	10 -13.15 - 20	15 - 23.5 - 32.5
P6F16 (A1)×S3F12(A2)	121 ± 45.55 b	10%	25 - 30.37 -37.5	10- 14.23 -22.5	17.5 - 22.5 - 30
P6F16 (A1)×P6F12(A2)	165 ± 29.7 a	30%	20 - 25.5 - 45	10 -14.7 -23.75	15- 22.44- 32.5
F90 (A1) × F91 (A2)	153 ± 31.8 a	25%	25 - 29.5-3 5	10-14.5-22.5	17.5-22.5-32.5
F110 (A1) × S2F22(A2)	113 ± 48 c	28%	25 -29.5 -45	10-14.5-23.75	15- 22.44- 30

* : Le nombre représente la moyenne de 10 répétitions
Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à $P = 0.05$

III-2- Evaluation de la fertilité sur des milieux de culture différents

Les quatre croisements réalisés se sont révélés fertiles sur les différents milieux de culture clarifiés testés (Fig. 47) à l'exception du milieu CMA. Les nombres moyens d'oospores obtenus sont répertoriés dans le tableau 16 et l'analyse de la variance des valeurs obtenues a révélé une différence significative ($P < 0.05$) du facteur milieu de culture ainsi que l'interaction milieu x type de croisement (Tableau 32 en annexe). Le nombre moyen le plus élevé des oospores produites est obtenu sur milieu PP (136 et 233 oospores/ mm^3) (tableau 16). Par contre, le nombre d'oospores le plus faible est remarqué sur le milieu à base de graines de nibier (0 à 94 oospores/ mm^3). Les pourcentages moyens des oospores abortives varient de 10% sur milieu PP jusqu'à 41% sur le milieu à base de graines de seigle. Par ailleurs, souvent le même aspect des formes sexuées a été observé sur les différents milieux testés.

Il en ressort de cette étude que les substrats gélosés naturels favorisent l'accomplissement de la reproduction sexuée chez *P. infestans* et l'importance de la production des oospores *in-vitro* dépend aussi du type de croisement testé.

La production des oospores a été évaluée sur différents substrats naturels ou artificiels par différents auteurs (Gallegly et Galindo, 1958 ; Shaw, 1991 ; Medina et Platt, 1998). Les milieux V8 ou à base de seigle permettent souvent une production abondante des oospores lorsqu'ils sont amendés de β -sistosterol (Romero et Erwin, 1969 ; Shattock *et al.*, 1986 ; Medina et Platt, 1998). Les résultats obtenus dans la présente étude concordent avec ceux des travaux précités puisque la production des oospores évaluée sur seigle sans β -sitosterol est plus faible par rapport à celle relevée dans les autres milieux. La production des formes sexuées, relevée dans tous les croisements, est souvent très importante sur les milieux à base de petits pois et du haricot même non amendé de l'hormone β -sistosterol. Ceci indique que ces milieux contiennent cette molécule ou une autre molécule ayant un effet stimulateur de la reproduction sexuée dans les isolats interfertiles. La performance de deux milieux est comparable à celle de V8 amendé de β -sitosterol. Le pourcentage élevé (70 à 90%) des oospores bien différenciées obtenu dans ces milieux constitue un autre argument en faveur de notre hypothèse..

Tableau 16 : Fertilité de quatre croisements sur des milieux de culture différents (Nombre d'oospores /mm³)

	Petits pois		Haricot		Pois-chiche		Sei
S2F18 (A1) x P6F12 (A2)	233 ± 57 a	90%	142 ± 30 a	85%	106 ± 54 b	61%	115 ± 49 b
P6F17 (A1) x S1F35 (A2)	173 ± 54 b	92%	128 ± 43 b	75%	138 ± 34 a	65%	112 ± 47 b
F110 (A1) x F108 (A2)	136 ± 52 c	85%	107 ± 24 b	70%	93 ± 30 c	83%	125 ± 38 a
F85 (A1) x S2F22 (A2)	154 ± 64 b	80%	85 ± 53 c	65%	76 ± 40 c	75%	93 ± 36 ab

- Les valeurs indiquées dans le tableau représentent les moyennes de 10 répétitions.
- Les pourcentages représentent les taux des oospores bien différenciées.
- Les valeurs suivies par la même lettre, dans une même colonne, ne sont pas significativement différentes à P = 0.05.

III-3- Effet du métalaxyl sur la fertilité *in-vitro*

Etant donnée l'émergence des souches de *P. infestans* résistantes au métalaxyl au Maroc, l'étude de l'effet de ce fongicide sur la reproduction sexuée s'avère essentielle.

Dans notre étude la production des oospores est évaluée pour huit croisements exposés à des concentrations différentes de métalaxyl (0, 1, 10 et 100µg/ml). Les résultats obtenus pour les différents croisements sont résumés dans la figure 48. L'analyse de la variance a montré l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur croisement (tableau 33 en annexe).

* Pour les croisements dont les confrontants sont sensibles au fongicide en question (F60 (A1-SM) x P7F2 (A2-SM) ; M7 (A1-SM) x M4 (A2-SM)) les valeurs enregistrées en absence du métalaxyl varient de 96 à 136 oospores/mm³. A la concentration de 1µg/ml, cette production varie de 44 à 94 oospores / mm³. A la concentration de 10µg/ml, la production des oospores varie entre 0 et 40 oospores/mm³. A la concentration de 100µg/ml, aucune forme sexuée n'a été détectée dans le milieu de culture.

* Pour les croisements dont l'un des confrontants est sensible et l'autre est résistant au métalaxyl (SP4 (A1-SM) x P10F3 (A2-RM) ; F80 (A1-SM) x F108 (A2-RM) ; F90 (A1-RM) x FO2 (A2-SM) et F108 (A1-RM) x P10F5 (A2-SM)), la production maximale des oospores est de 195 oospores/mm³, en absence du métalaxyl. Aux concentrations de 1 et 10µ/ml, la production varie de 103 à 146 oospores/mm³ et de 0 à 75 oospores/mm³ respectivement. En présence d'une concentration élevée de métalaxyl (100µg/ml) les oospores ne sont pas produites sur le substrat.

* Quant aux croisements dont les deux confrontants sont résistants au métalaxyl (F90 (A1-RM) x F108 (A2-RM) ; S2F18 (A1-RM) x P10F1 (A2-RM)), la formation des oospores en absence ou en présence de métalaxyl est remarquablement plus élevée que celle observée pour les autres types de croisements. En effet, en absence du fongicide, la production maximale est d'environ 268 oospores / mm³. En présence du métalaxyl, le nombre d'oospores maximal formées est de 181, 160 et 136 oospores / mm³ aux concentrations de 1, 10 et 100µg/ml respectivement.

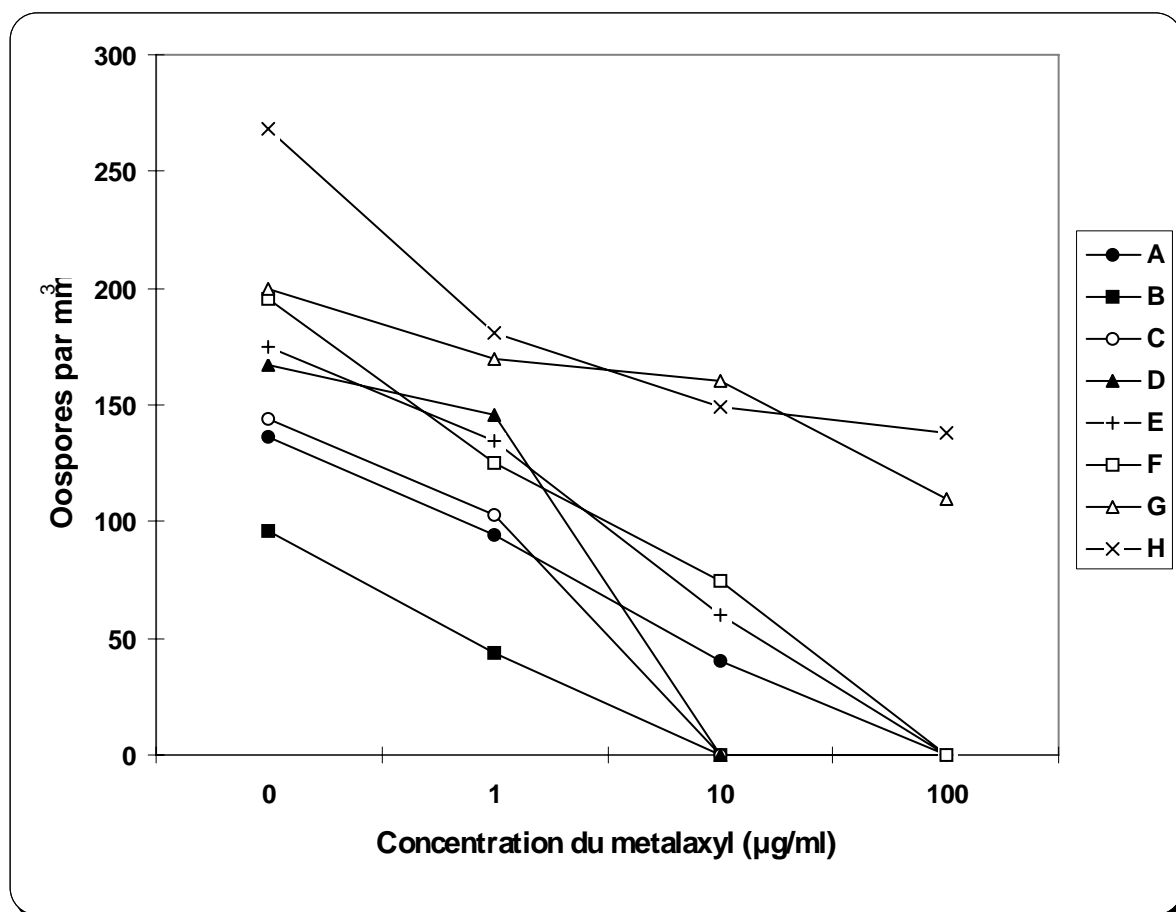


Figure 48 : Evaluation de l'effet du metalaxyl sur la fertilité in-vitro des différents croisements sur le milieu de petits pois (A = F60 (A1-SM) x P7F2 (A2-SM) ; B = M7 (A1-SM) x M4 (A2-SM) ; C = SP4 (A1-SM) x P10F3(A2-RM) ; D = F80 (A1-SM) x F108 (A2-RM) ; E = F90 (A1-RM) x FO2 (A2-SM) ; F =S2F18 (A1-RM) x P10F5(A2-SM) ; G = F90 (A1-RM) x F108 (A2-RM) ; H = S2F18 (A1-RM) x P10F1(A2-RM)).

A la lumière de ces résultats, la production des oospores est influencée par l'amendement du métalaxyl au substrat. En effet, plus la concentration du métalaxyl est importante plus la production des formes sexuées est diminuée. Néanmoins, lorsque les confrontants interfertiles sont résistants, bien que la production des oospores soit diminuée à des concentrations croissantes de métalaxyl, elle n'est pas inhibée par des doses élevées de celui-ci. Cependant, dans les croisements dont l'un ou les deux confrontants sont sensibles, la production de ces formes sexuées est très atténuée ou totalement inhibée à des concentrations élevées du métalaxyl.

Dans une étude récente, Govers et Ristaino (2000) ont rapporté que l'exposition pendant de courtes périodes (2 à 4 semaines) d'isolats résistants, au métalaxyl et à d'autres fongicides, à des concentrations allant de 0.1 à 10µg/ml peut provoquer une légère stimulation de la production des oospores. C'est une chose que nous n'avons pas observé dans notre étude. Par conséquent, on peut dire que le métalaxyl et peut être d'autres formules chimiques peuvent avoir une double action, une inhibitrice et une autre stimulatrice de la reproduction sexuée selon le comportement des deux types sexuels en croisement ou en culture pure.

Rappelons que nous avons remarqué dans le chapitre précédant que les isolats résistants au métalaxyl possèdent une croissance mycélienne sur le milieu PP plus importante que ceux sensibles. Ainsi, la production des formes sexuées est élevée dans les croisements dont les deux confrontants sont résistants au métalaxyl même à des concentrations élevées de ce fongicide, la production des formes sexuées serait positivement corrélée avec la croissance mycélienne. Autrement dit, plus la croissance mycélienne est grande plus la production des oospores est importante.

IV- Induction de la reproduction sexuée *in-vivo*

Les confrontations entre les isolats testés interfertiles sont conduites sur les différents organes végétaux des plantes hôtes (pomme de terre et tomate) les plus utilisés au Maroc (Désirée et Daniela). Certaines études sur la reproduction sexuée chez *P. infestans* ont rapporté que la production des oospores est variable selon l'organe ou l'hôte infecté (Frinking *et al.*, 1987 ; Mosa *et al.*, 1989 ; Drenth *et al.*, 1995 ; Cohen *et al.*, 1997 ; Medina et Platt, 1999).

IV-1- Test sur les feuilles de la variété de pomme de terre Désirée

Selon certaines études, l'évaluation de la fertilité des croisements sur les feuilles des variétés de la pomme de terre ou de la tomate est réalisée soit sur des feuilles entières soit sur des disques de feuilles. Ces derniers sont plus faciles à manipuler que les folioles entières. Néanmoins, dans la présente étude, nous avons examiné la faculté des isolats interfertiles à produire les oospores en utilisant les deux procédés.

IV- 1- 1 - Formation des oospores sur les folioles entières

Les observations microscopiques des lésions développées sur les folioles entières, ont révélé une formation des oogones et des anthéridies dans les six croisements testés 7 jours après inoculation par les isolats interfertiles. Les formes de la reproduction sexuée sont concentrées dans la zone de contact des deux lésions, à l'intérieur du tissu végétal essentiellement au niveau des parties adjacentes aux nervures principales et secondaires (Fig. 49). Cette observation confirme l'affinité de la reproduction sexuée pour l'obscurité. Les oospores sont détectées 10 jours après incubation (Fig. 49). Leur nombre, déterminé après 15 jours d'incubation, varie de quelques oospores à 1275 oospores/cm² du tissu de feuillage selon les croisements (tableau 17). L'analyse de la variance a montré une différence significative ($P < 0.05$) du facteur croisement et de l'interaction croisement x mode d'inoculation (tableau 34 en annexe). Ainsi, des croisements révélés fertiles *in-vitro*, le sont aussi *in-vivo* (S2F18 x P6F12). *In vitro*, la très faible production ou l'absence des formes sexuées dans certains croisements fertiles *in-vitro* (P6F16 x S3F12 et S2F18 x P10F33) peut être expliqué par le fait que certains de ces confrontants sont très agressifs. Par conséquent, l'expansion rapide du champignon a probablement empêché l'établissement de la reproduction sexuelle. Ceci est en accord avec les observations de Drenth *et al.* (1995).

IV-1-2- Production des oospores sur les disques de feuilles

7 jours après inoculation conjointe par des sporocystes des confrontants interfertiles deux à deux, les observations microscopiques des disques de feuilles de la variété Désirée (Fig. 50) ont révélé la production des formes sexuées oogones et anthéridies dans cinq croisements sur les six testés (tableau 17). Le nombre moyen d'oospores, produites 15 jours après incubation, varie de 0 à 1050 oospores / cm² du tissu végétal selon les croisements. Ceci montre que la reproduction sexuée est légèrement plus importante sur les feuilles entières que sur les disques de feuilles.

Tableau 17 : Production des oospores sur des folioles entières et sur des disques de feuilles de la variété de pomme de terre Désirée.

Croisements	Nombre d'oospores formées par cm ² du tissu	
	Feuilles entières	Disques de feuilles
S2F18 (A1) x S2F25 (A2)	1275 ± 322 a	920 ± 247 a
S2F18 (A1) x P6F12 (A2)	930 ± 414 b	721 ± 180 b
P6F16 (A1) x P6F11 (A2)	798 ± 254 b	867 ± 268 a
P6F16 (A1) x S2F20 (A2)	646 ± 339 c	519 ± 276 c
P6F16 (A1) x S3F12 (A2)	***	***
S2F18(A1)x P10F33 (A2)	***	*

Les valeurs montrées dans le tableau représentent la moyenne de 10 répétitions

*** quelques oospores observées;

* aucune oospore n'a été observée

Les valeurs de chaque colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à P = 0.05.

Par ailleurs, cette étude a montré que pour les deux types de tests, l'oosporogenèse chez *P. infestans* nécessite la présence de l'eau libre sous le tissu végétal infecté par les deux confrontants interfertiles. En effet, l'incubation des tissus de feuillage inoculés dans des boîtes ne contenant pas de l'eau n'a pas abouti à l'observation des organes sexués. Ces résultats concordent avec ceux mentionnés par plusieurs auteurs tels que Galindo et Gallegly (1958), Drenth *et al.* (1995) et Cohen *et al.* (1997). Selon ces derniers auteurs, la production des oospores nécessite une humidité supérieure à 90% pendant au moins une semaine. Dans la nature, les pluies continues seraient donc bénéfiques pour l'induction de la reproduction sexuée sur les feuilles de la plante hôte. En absence d'une humidité suffisante sur les feuilles, la production des oospores peut se réaliser sur les feuilles qui se sont détachées du plant et tombent sur le sol humide à condition que l'inoculum des souches interfertiles soit présent en quantités suffisantes. Selon Cohen *et al.* (1997), les oospores sont très rarement observées dans la nature au cours des saisons très pluvieuses.

Néanmoins, nos tests de compatibilité sexuelles conduits *in-vivo* ont prouvé la capacité de nos isolats interfertiles *in-vitro* à produire des oospores sur le tissu végétal si les conditions d'incubation sont favorables.

IV-2- Formation d'oospores sur des organes différents des deux principaux hôtes.

La fertilité des isolats sur les différents organes de la pomme de terre et de la tomate est testé sur sept croisements autres que ceux utilisés pour les précédent test (tableau 18). Six croisements, parmi les sept se sont avérés fertiles sur les disques de feuilles (tableau 18). Les analyses statistiques ont révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur croisement, de l'interaction croisement x organe végétal, de l'interaction croisement x hôte ainsi que de l'interaction croisement x hôte x organe végétal (tableau 35 en annexe). D'une manière générale, nous remarquons que la production des oospores est plus importante sur feuilles de tomate que celle sur feuilles de la pomme de terre, alors que la production des oospores sur tiges de la pomme de terre est plus importante que celle sur tige de la tomate. (tableau 18). Le nombre moyen des oospores le plus élevé est obtenu sur les disques de feuillage de la tomate (entre 0 et 1300 oospores/cm²). Sur les disques de feuillage de la pomme de terre, la production moyenne varie entre 0 et 950 oospores/cm². Par ailleurs, les oospores sont formées en quantités relativement plus importante sur les tiges de la pomme de terre (entre 0 et 850 oospores /cm²) que sur celles de la tomate (entre 0 et 625 oospores /cm²). Quel que soit le croisement, les formes sexuées n'ont pas été observées sur les tubercules de la pomme de terre (Désirée) ; elles sont rarement détectées sur le fruit de la tomate. Ceci résulterait d'un mécanisme de défense mis en jeu dans ces organes qui inhibe la réalisation de la reproduction sexuée. Cette faible détection ou absence des oospores sur les tubercules a été signalé par Grinberg *et al.* (1989) en Israël. En plus, au Mexique où les deux types sexuels coexistent depuis longtemps, les oospores n'ont été observé que récemment sur les tubercules naturellement infectés (Fernandez-Pavia *et al.*, 2002). Les résultats obtenus par d'autres auteurs dans différents pays sont comparables à nos résultats. En effet, les oospores sont produites en quantité importante sur les feuilles de pomme de terre en Allemagne (Göts, 1991 in Cohen *et al.*, 1997) en Hollande (Drenth *et al.*, 1995), en Suède (Andersson *et al.*, 1998), au Canada (Medina et Platt, 1999) et en Norvège (Hermansen *et al.*, 2000). Dans notre étude nous avons trouvé que l'hôte (pomme de terre ou tomate) peut influencer la production des oospores. Cohen *et al.* (1996) ont rapporté que le type de l'hôte n'a aucun effet sur la production des formes sexuées. Néanmoins, ils ont remarqué que la reproduction sexuée est plus importante sur la tomate que sur la pomme de terre, ce qui est en accord avec nos résultats au moins pour les tests de compatibilités conduits sur les feuilles. Cette différence de fertilité des croisements sur les organes végétaux résulterait aussi d'une différence de degré d'affinité spécifique de chacun des deux confrontants vis à vis de l'autre pour stimuler la production des différents formes sexuées.

**Tableau 18 : Fertilité de Sept croisements sur les différents organes
des deux hôtes principaux de *P. infestans***

Nombre d'oospores formées par cm ² du tissu après 15 jours d'incubation					
	Pomme de terre (Var. Désirée)			Tomate (Var. Dani	
	Feuille	Tige		Feuilles	Tige
	Tubercule				
P6F17(A1) x S2F25 (A2)	950 ± 250 a	650 ± 152 b	-	1200 ± 250 a	625 ± 136 a
P6F16 (A1) x F97 (A2)	750 ± 132 b	850 ± 114 a	-	1300 ± 350 a	250 ± 74 b
S2F19 (A1) x S3F31 (A2)	456 ± 96 d	540 ± 73 c	-	1250 ± 250 a	215 ± 128 b
S2F18 (A1) x S1F27 (A1)	650 ± 1103 c	750 ± 98 ab	-	1000 ± 200 ab	450 ± 85 ab
F110 (A1) x P6F4 (A2)	520 ± 350 cd	680 ± 153 b	-	850 ± 150 b	400 ± 157 a
F75 (A1) x P6F14 (A2)	675 ± 251 c	825 ± 75 a	-	950 ± 300 b	500 ± 95 a
F62 (A1) x FO4 (A2)	-	-	-	-	-

*** : Quelques oospores observées après plusieurs observations microscopiques
Les valeurs suivies par la même lettre, dans une même colonne, ne sont pas significativement différentes à P = 0.05

IV-3- Fertilité sur des variétés différentes de la pomme de terre

Les observations microscopiques des lésions développées sur les disques de feuilles des différentes variétés testées ont révélé une formation relativement abondante des oospores dès le 10^{ème} jour d'incubation après inoculation par les isolats interfertiles. Les formes sexuées sont souvent concentrées dans les parties adjacentes aux nervures principales et secondaires. Cette production est essentiellement réalisée à l'intérieur du tissu du feuillage. Le nombre des oospores, détectées 15 jours après incubation varie selon les croisements et les variétés (tableau 19). En effet, l'analyse de la variance a montré une différence significative ($P < 0.05$) du facteur croisement et de l'interaction croisement x cultivar (tableau 36 en annexe). Les oospores sont produites dans la plupart des tests réalisés. Les productions d'oospores enregistrées chez la variété sensible (Spunta) varient entre 0 et 110 oospores/cm² ; chez les variétés moyennement sensibles (Désirée et Nicola), elles varient entre 202 et 1024 oospores/cm². Chez les variétés moyennement résistantes (Kondor), cette production oscille entre 195 et 550 oospores/cm². Il en ressort que les différentes variétés testées permettent l'établissement de la reproduction sexuée de *P. infestans*. Néanmoins, il existe une tendance vers une production maximale des oospores sur les variétés moyennement sensibles. Ce résultat concorde avec les observations de Drenth *et al* (1995) et celles Hanson et Shattock (1998). Les premiers auteurs ont comparé la production des oospores sur les feuilles de trois cultivars Bintje (très sensible), Irène (moyennement sensible) et Pimpernel (moyennement résistante). Ils ont observé que le nombre d'oospores formées sur les feuilles de la variété Irène (4000 oospores/cm²) est plus important que celui noté chez les variétés Bintje (2000 oospores/cm²) et Pimpernel (1750 oospores/cm²). Le nombre d'oospores observées dans notre étude est faible par rapport à celui relevé dans les investigations de Drenth *et al.* (1995) et de celles Hanson et Shattock (1998). Cette différence peut être due à plusieurs facteurs, tels que la viabilité de l'inoculum, la faculté des confrontants interfertiles à produire les oospores et les types d'hôtes utilisés. En effet, selon Pettis et Shattock (1994) les différences de fertilité entre les résultats des expériences conduites au laboratoire sont essentiellement dues à l'utilisation d'isolats parentaux différents. En effet, dans notre étude, nous avons obtenu des quantités variables d'oospores selon les croisements testés.

D'après les travaux de Cohen *et al.* (1997), la production des oospores sur les variétés de pomme de terre possédant les gènes "R" de résistance est similaire à celle sur les variétés ne possédant pas ces gènes. Ces derniers auteurs ont conclu que l'effet de l'hôte varie avec l'âge et la température. En effet, les conditions environnementales peuvent influencer le niveau de la résistance spécifique (Stewart *et al.*, 1990) et celui de la résistance non spécifique (Thurston, 1971). Cette influence se répercute sur la capacité des souches interfertiles à produire les oospores.

Tableau 19 : Fertilité de quatre croisements sur des variétés de pomme de terre ayant des sensibilités différents (après 15 jours d'incubation)

	oospores par cm ² de feuilles			
	Spunta	Désirée	Nicola	Kondor
P6F17 (A1) x S2F6 (A2)	92 ± 71 a	714 ± 217 a	417 ± 135 b	231 ± 137 c
P6F16 (A1) x S3F25 5A2)	74 ± 31 b	396 ± 152 b	347 ± 171 bc	321 ± 134 b
S2F19 (A1) x S2F1 (A2)	***	202 ± 82 c	336 ± 125 c	195 ± 75 d
F90 (A1) x P6F11 (A2)	110 ± 38 a	857 ± 95 a	1024 ± 142 a	550 ± 46 a

Les valeurs représentent la moyenne de 20 répétitions

*** : aucune oospore n'a été observée

Les valeurs suivies par la même lettre dans une même colonne, ne sont pas significativement différentes à P= 0.05

IV-4- Effet du métalaxyl sur la production des oospores *in-vivo*

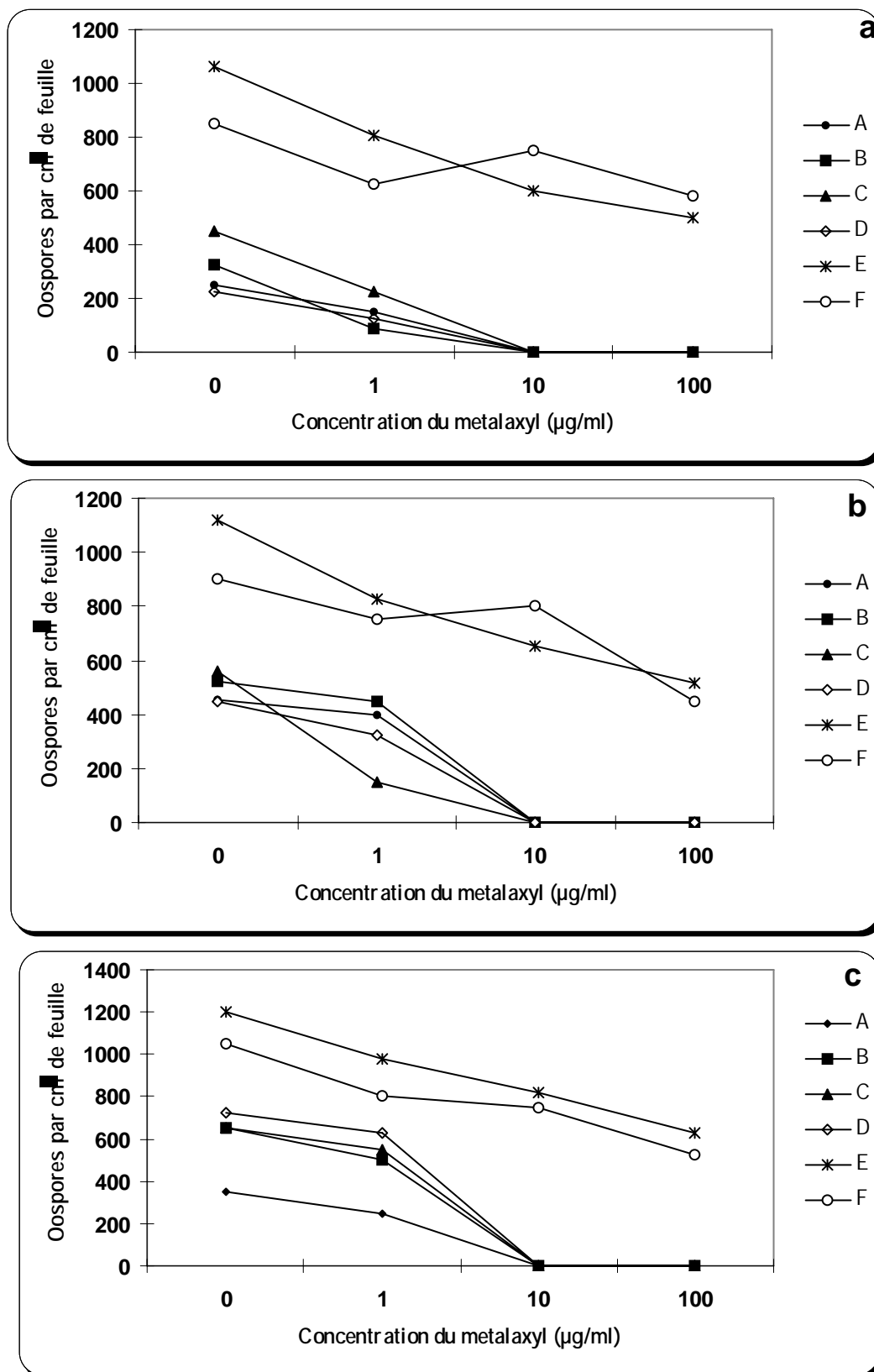
Six croisements parmi les huit testés *in-vitro* sont utilisés *in-vivo* sur les disques de feuilles de la variété Désirée.

a- Test 1 : Dans ce test l'inoculation des feuilles est réalisée en même temps que leur immersion dans la solution du métalaxyl. Les résultats obtenus pour ce test sont illustrés dans la figure 51. L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur croisement et de l'interaction croisement x concentration du métalaxyl (tableau 37a en annexe). En absence du métalaxyl, la quantité des oospores produites dans les croisements où les deux confrontants sont résistants (Fig. 51 : E et F) est remarquablement plus élevée que celle enregistrée dans les croisements dont les deux confrontants sont sensibles (Fig. 51 : A et B), pour les trois durées d'incubation utilisés. Les valeurs sont intermédiaires pour les croisements dont l'un des confrontants est sensible et l'autre résistant (Fig. 51 : C et D). La production des oospores est légèrement atténuée par la dose 1 $\mu\text{g/ml}$ de fongicide en comparaison avec le nombre d'oospores formées en absence du métalaxyl pour les différents croisements testés. Les mêmes différences observées entre les différents croisements en absence du métalaxyl sont notées à cette concentration (1 $\mu\text{g/ml}$). Aux concentrations de 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$, les oospores ne sont pas détectées dans les croisements dont l'un ou les deux confrontants sont sensibles, alors que leur production reste assez importante dans les croisements où les deux confrontants sont résistants au métalaxyl. En effet, à la concentration 100 $\mu\text{g/ml}$, le nombre moyen d'oospores produites dans les croisements où les deux confrontants sont résistants reste supérieure à 50% de sa valeur dans le témoin sans fongicide.

b-Test 2: dans ce test, le métalaxyl est ajouté à différentes concentrations dans le milieu d'incubation 7 jours après inoculation des disques de feuillages. L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur croisement et de l'interaction croisement x concentration du métalaxyl (tableau 37b en annexe). La figure 52 rassemble les résultats obtenus dans ce test. Les valeurs relevées pour chacune des concentrations du métalaxyl sont relativement plus élevées que celles obtenues avec le test précédent.

En absence du métalaxyl, les concentrations d'oospores les plus élevées sont notées dans les croisements où les deux isolats sont résistants (Fig. 52 : A et B) pour les trois durées d'incubation.

A la concentration 1 $\mu\text{g/ml}$ de métalaxyl, la production des oospores est réduite par rapport au témoin pour tous les croisements. Les croisements où les deux confrontants sont résistants restent les plus productifs en oospores et ce pour les trois durées d'incubation.



Figures 51: Fertilité in-vivo des croisements exposés à différentes concentrations du metalaxyl après 10 (a), 15 (b) et 25 jours (c) d'incubation. L'inoculation et l'exposition au metalaxyl sont réalisées simultanément (A = F60 (A1-SM) x P7F2 (A2-SM) ; B = M7(A1-SM) x M4(A2-SM) ; C = SP4(A1-SM) x P10F3(A2-RM) ; D = S2F18 (A1-RM) x P10F5 (A2-SM); E = F90 (A1-RM) x F108(A2-RM) ; F = S2F18 (A1-RM) x P10F1(A2-RM)).

Contrairement au test précédent, les oospores sont observées dans les croisements dont l'un ou les deux isolats confrontés sont sensibles quand ils sont traités au métalaxyl à la concentration de 10µg/ml.

A la concentration de 100 µg/ml, les oospores sont observées uniquement sur les disques de feuillage inoculés par des isolats interfertiles résistants au métalaxyl.

En conclusion, ces tests conduits *in-vitro* et *in-vivo* montrent que les concentrations élevées de métalaxyl (100µg/ml) ne sont pas inhibitrices de la reproduction sexuée chez *P. infestans* lorsque les deux confrontants sont résistants. Cependant, lorsque l'un des deux confrontants est résistant alors que l'autre confrontant est sensible, la production des oospores est détectée en quantité plus importante quand le métalaxyl est additionné au milieu 7 jours après inoculation. La production des oospores est, par contre, très faible ou quasiment inexistante lorsque le métalaxyl est amendé en même temps que l'inoculation du tissu végétal par le pathogène. Il existe donc une corrélation positive entre la formation des oospores et le niveau de résistance au métalaxyl des confrontants. En effet, plus les confrontants sont résistants au métalaxyl plus la production des oospores est importante, même à des concentrations élevées de métalaxyl (allant jusqu'à 200µg/ml). Ces résultats concordent avec les observations de plusieurs auteurs tels que Hanson et Shattock (1997) et Govers *et al.* (2000). Cohen et Coffey (1986) rapportent que la faible production des oospores par diverses espèces de *Phytophthora* sensibles au métalaxyl est essentiellement due à la faible croissance mycélienne observées, même à des faibles concentrations de métalaxyl. Selon Hanson et Shattock (2000) le fongicide (métalaxyl) affecterait l'oosporogénèse en empêchant l'infection et l'établissement des souches sensibles au métalaxyl sur hôte ou en réduisant le nombre d'oospores produites.

Avec l'émergence de souches sexuellement compatibles et résistantes au métalaxyl dans les champs Marocain, la production des oospores risque d'être de plus en plus abondante dans la nature. Cette menace est d'autant plus importante si l'on sait que plusieurs produits chimiques utilisés dans la lutte de certaines maladies cryptogamiques de plusieurs cultures, y compris celle de la pomme de terre, sont des inducteurs de la reproduction sexuée chez *P. infestans in-vitro*. L'origine des formes sexuées (autofertilité, apomixie, recombinaison sexuelle,...) produites après exposition des souches à ces formules chimiques reste indéterminée. Par conséquent, la contribution de ces formes sexuées dans la diversité génétiques des populations de ce pathogène nécessite d'autres investigations.

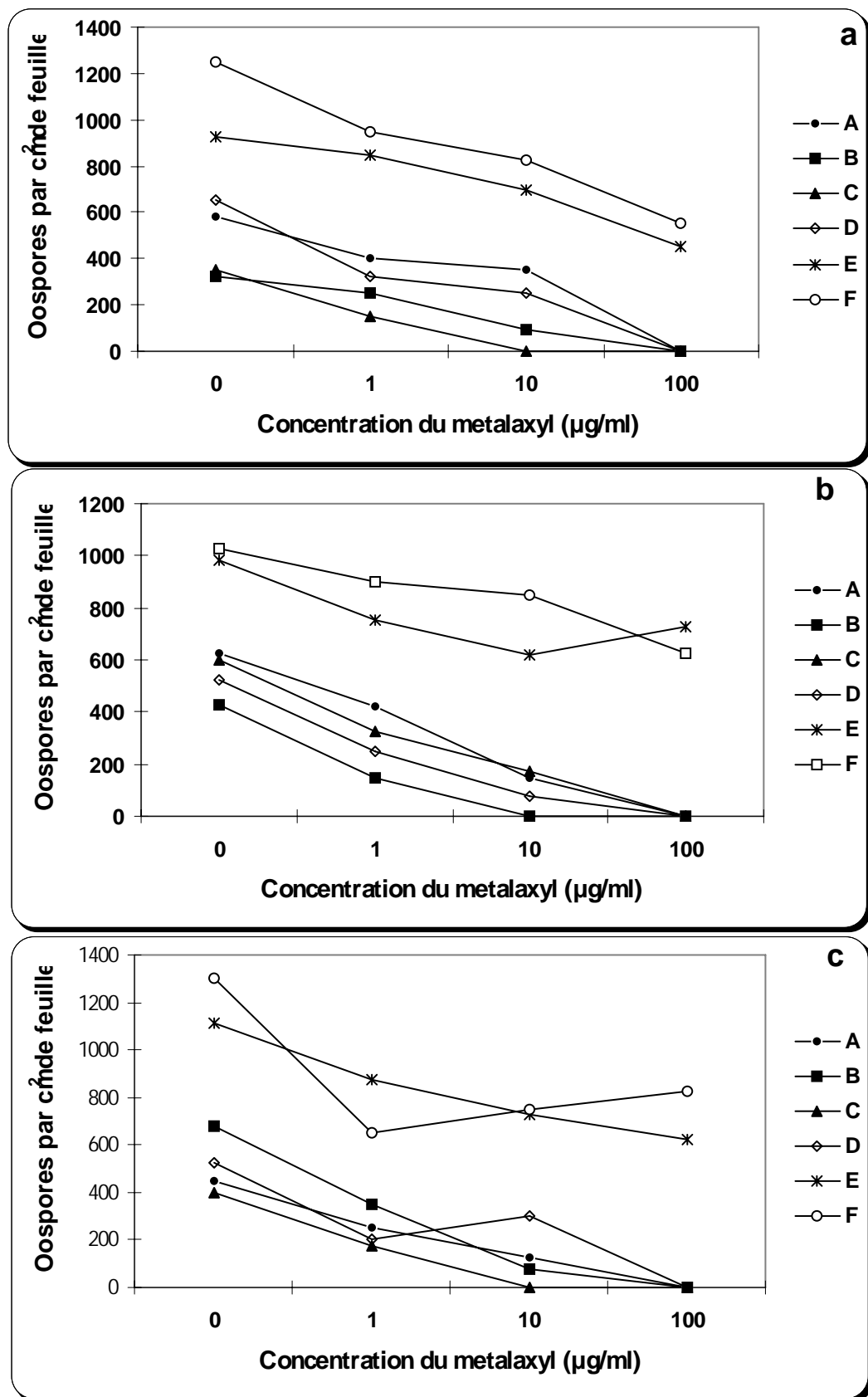


Figure 52 : Fertilité in-vivo des croisements exposés à différentes concentrations du metalaxyl après 7 (a), 15(b) et 25 jours (c) d'incubation. L'exposition au metalaxyl est réalisée après 5 jours d'inoculation (A = F60 (A1-SM) x P7F2 (A2-SM) ; B = M7(A1-SM) x M4(A2-SM) ; C = SP4(A1-SM) x P10F3(A2-RM) ; D = S2F18 (A1-RM) x P10F5 (A2-SM); E = F90 (A1-RM) x F108(A2-RM) ; F = S2F18 (A1-RM) x P10F1(A2-RM)).

IV- 5- Production des oospores dans la nature

Dans notre étude, les observations microscopiques des tissus de plants (folioles et tiges) de pomme de terre naturellement infectés et ayant été prélevés de parcelles où les deux types sexuels coexistent, n'a pas révélé la présence des formes sexuées. Cette absence peut être due à la dominance de l'un ou de l'autre des deux types sexuels (A1 ou A2). En effet, cette homogénéité caractérise la majorité des parcelles étudiées. Des études menées dans certains pays ont annoncé la formation des oospores sur les tissus végétaux de l'hôte dans la nature, essentiellement sur pomme de terre (Drenth *et al.*, 1993 ; Hermansen *et al.*, 2000 ; Fernandez-Pavia *et al.*, 2002) . Ceci suggère la contribution de ces formes sexuées dans des infections. Selon Cohen *et al.* (1997) la présence des deux types sexuels en des proportions différentes n'affecte pas la production des oospores ; la présence d'un taux faible (5%) de type sexuel A2 dans un champ peut être suffisant pour induire la reproduction sexuée chez *P. infestans*. Dans la présente investigation, le nombre relativement faible des isolats étudiés par parcelle ne peut permettre de renseigner sur la structure complète de la population présente dans le champ. Par conséquent, même si la distribution des deux types sexuels tend vers une homogénéité par parcelle, d'autres facteurs peuvent intervenir dans le processus de la reproduction sexuée dans la nature. En effet, les résultats obtenus dans notre étude démontrent que le taux de production des oospores dépend du type de l'hôte et aussi de type de l'organe inoculé. Cette production des oospores signalée dans plusieurs pays serait aussi dépendante de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques (Malajuczuck, 1983 ; Schmitthener et Canaday, 1983, El Malawi et Erwin, 1986 ; Ann et Ko, 1988 ; Mosa *et al.*, 1989 ; Hord et Ristaino, 1991 ; Jiang et Erwin, 1993 ; Cohen *et al.*, 1997 ; Medina et Platt, 1999). Ainsi, si l'on considère que ces oospores peuvent contribuer à des épidémies, l'interaction pathogène-hôte-organe constituerait un autre facteur qui contrôle non seulement l'établissement de la reproduction sexuée dans la nature, mais aussi la vitesse de propagation de la maladie. Cette vitesse peut être importante et assurerait le transfert de la maladie vers des zones non productrices de pomme de terre ou de tomate. Par conséquent, l'inoculum constitué par ces formes sexuées serait présent en état de dormance dans ces zones vierges.

V- Germination des oospores

V-1- Effet de la lumière

Les taux de germination obtenus dans l'eau distillée stérile sont présentés dans le tableau 20. Les oospores exposées à la lumière germent à partir du deuxième jour d'incubation et les pourcentages de germination, bien qu'ils soient faibles, augmentent avec le temps d'exposition à la lumière. Le taux de germination est relativement semblable en lumière continue et sous une photopériode de 16h. Les taux les plus élevés ne dépassent pas 11%. Aucune forme de germination n'a été détectée lorsque les oospores sont incubées dans l'obscurité. Ceci confirme les résultats de Romero et Gallegly (1963), de Romero et Zentmyer (1967), de Romero et Erwin (1969) et de Boccas (1979) selon lesquels la lumière a une action inductrice de la levée de dormance des oospores. Cependant, l'analyse de variance n'a pas révélé de différence significative entre la lumière continue et la photopériode (tableau 38 en annexe).

Les observations microscopiques ont révélé que les oospores germent souvent par émission d'un ou deux tubes germinatifs qui se terminent par un sporange (Fig. 53A, B). Ces formes sexuées peuvent parfois germer en développant trois tubes germinatifs qui se terminent par un sporange (Fig. 53C). Une autre forme particulière de germination de l'oospore a été parfois observée dans laquelle le sporange émerge directement de l'anthéridie sans tube germinatif (Fig. 53 D).

Tableau 20 : Effet de la lumière sur la germination des oospores après 2, 3, 5 et 10 jours d'incubation et à 20°C

	Pourcentages de germination des oospores			
	2jours	3jours	5 jours	10 jours
Obscurité	0	0	0	0
Photopériode de 16 h	1	2	5	9
Lumière continue	1	3	6.5	11

V-2- Effet du milieu de germination

La figure 54 présente les taux de germination des oospores observées sur milieux testés. L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur milieu de germination (tableau 39 en annexe). Durant nos essais préliminaires, nous avons remarqué que le taux de germination qui augmente avec le temps d'exposition à la lumière et devient stable à partir du dixième jour d'incubation. Ainsi pour le commentaire des essais, nous avons considéré uniquement les résultats obtenus après 10 jours d'exposition à la lumière (Fig. 54).

Le taux de germination moyen le plus élevé (25%) est obtenu dans le filtrat de sol de pomme de terre. Les taux de germination des oospores sur le filtrat des exsudats racinaires de pomme de terre, l'infusion de fumier frais de mouton, l'infusion de fumier frais de cheval et l'eau distillée stérile sont de 18, 6, 5 et 4% respectivement. Les taux de germination moyens sur les milieux de Petits Pois, d'Haricot, de Pois chiche, de Seigle et le milieu synthétique sont 15, 10, 8, 12 et 7% respectivement (Fig. 55). Durant nos essais, nous avons remarqué le développement rapide de contaminants essentiellement bactérien. Ceci pourrait expliquer les faibles taux de germination des oospores enregistrés. Toute fois, dans des tests préliminaires nous avons remarqué que les taux de germination des oospores sur certains milieux peuvent atteindre jusqu'à 12% (infusion de fumier de mouton) et 22% (infusion de fumier de cheval) après 10 jours d'incubation. En ce qui concerne le milieu synthétique (S+L), le taux de germination ne dépasse pas 10 % après 10 jours d'incubation. Nos résultats indiquent que ce milieu ne favorise pas la germination des oospores de *P. infestans* comme c'est le cas des oospores de *P. parasitica* (Ann et Ko, 1985).

Comparativement à nos résultats, Medina et Platt (1999) ont aussi obtenu les taux de germination les plus élevés en utilisant le filtrat du sol de la pomme de terre, alors que, contrairement à nos résultats ces auteurs n'ont obtenu aucune forme de germination avec le filtrat de racines de la pomme de terre. Cette différence de résultats pourrait être due à l'utilisation des confrontants interfertiles différents. Le sol de pomme de terre pourrait contenir (en proportion plus importante que dans les racines de pomme de terre) des éléments stimulateurs de la germination des oospores. En effet, Medina et Platt (1999) rapportent que les pourcentages de germination des oospores enterrées dans le sol pendant des périodes de 7 à 12 mois (à des profondeurs allant jusqu'à 15 cm) sont de 6 à 19%.

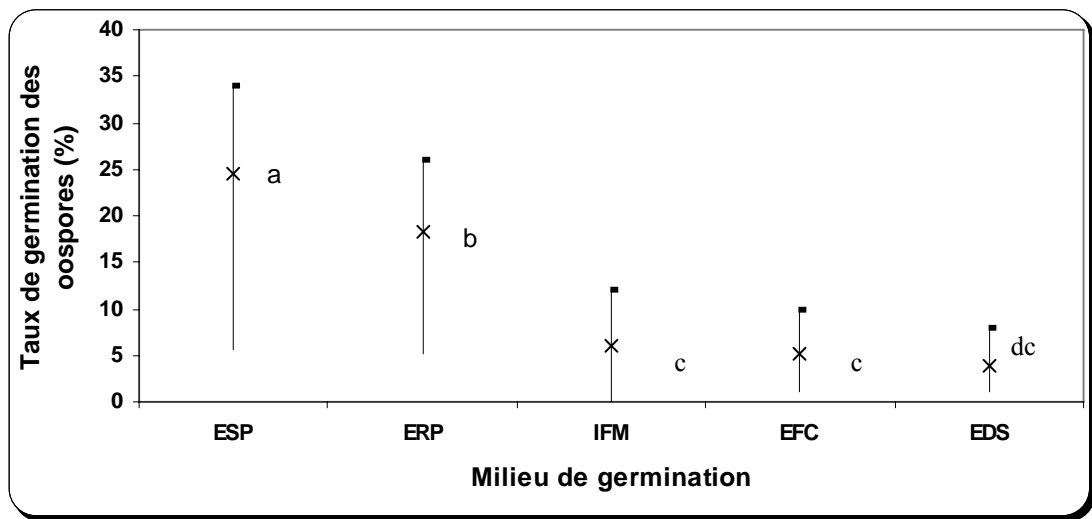


Figure 54 : Germination des oospores sur différents substrats: ESL = Extrait de sol de pomme de terre, ERP =Extrait des racines de pomme de terre, IFM = Infusion de fumier frais de mouton, Infusion de fumier frais de cheval, EDS = Eau distillée stérile. Le temps d'incubation est 10 jours (les points de la courbe marqués par les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $P = 0.05$).

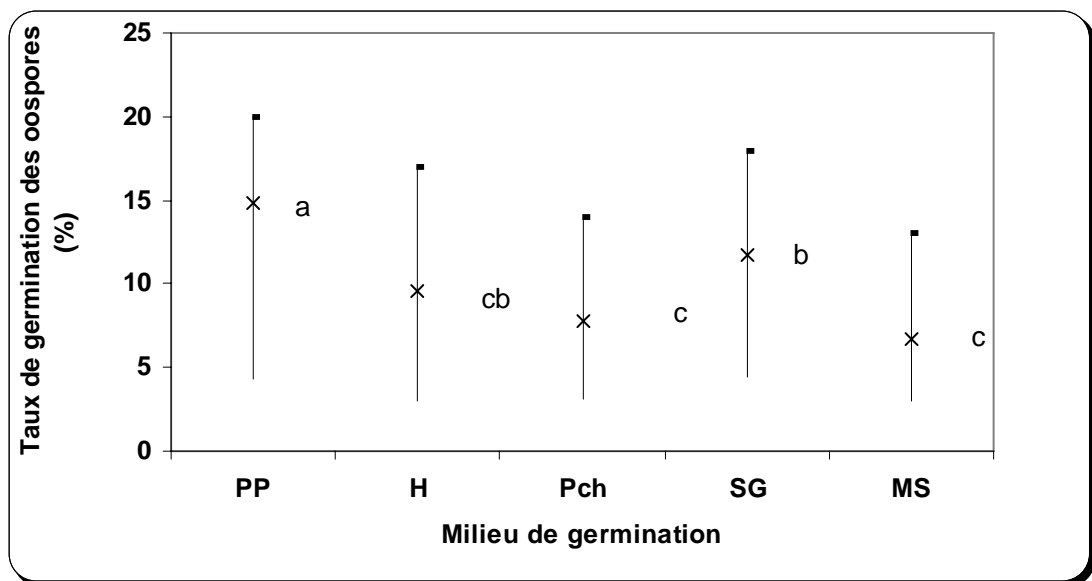


Figure 55 : Germination des oospores sur différents substrats naturels et synthétique : PP = Petits pois, H = Haricot, SG = Seigle, Pch = Pois-chiche, MS = Milieu synthétique. Le temps d'incubation est 10 jours (les points de la courbe marqués par les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $P = 0.05$).

Les auteurs concluent que certains facteurs tels que les micro-organismes du sol, la nature des débris qui y sont présents ainsi que l'humidité du sol affecteraient la germination des oospores. Selon Duncan et Cowan (1980), une faible humidité du sol peut réduire l'infectivité des oospores de *P. fragariae*. Dans notre étude, des faibles taux de germination des oospores (<4%) sont obtenus dans des essais préliminaires en utilisant conjointement différentes quantités de filtrat de sol et d'extrait de racines de pomme de terre. Cette faible capacité germinative dans ces conditions est un autre argument de la complexité de ce phénomène.

En conclusion, la germination des oospores de *P. infestans* est influencé par la nature du substrat utilisé. Dans la nature, il est certain que ce phénomène exige des conditions adéquates où l'interaction plant x sol x climat jouerait le rôle essentiel pour la levée de la dormance de ces formes sexuées.

V-3- Effet de la température et de la durée de stockage des oospores

Les résultats obtenues sont présentés dans la figure 56. L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative du facteur température de conservation, du facteur durée de stockage et de l'interaction entre ces deux facteurs (tableau 40 en annexe). En effet, 11, 6, 8, 7 et 3 % des oospores germent après 7, 30, 60, 120 jours et 12 mois de conservation à la température ambiante de 20°C respectivement. Après ces mêmes périodes de conservation à 4°C, les taux de germination des oospores sont 19, 11, 22, 3 et 1% respectivement. Ces résultats montrent d'abord que les oospores stockées pendant différentes périodes à la température ambiante (20°C) et à 4°C conservent leur capacité germinative. Elles sont capables de germer à des taux relativement élevés lorsqu'elles sont maintenues au froid pendant une période qui ne dépasse pas 2 mois (Fig. 56 b). Après 2 mois, leur capacité germinative est diminuée avec le temps dans les deux tests. En utilisant la technique de plasmolyse, Hansson et Shattock (1998) et Mayton *et al.* (2000), ont trouvé que les oospores stockées à 4°C peuvent survivre pendant de longues périodes allant jusqu'à 18 mois, et que cette viabilité décroît avec le temps. En utilisant la technique de plasmolyse, Medina et Platt (1999) ont trouvé que le taux des oospores vivantes varie de 23 à 36% après exposition à des températures de 0, 4 et 15°C alors que le taux de germination est relativement faible (6 à 19%). Ces derniers auteurs ont conclu que la technique de plasmolyse constitue une estimation maximale de la viabilité des oospores alors que la germination permet une évaluation minimale de la viabilité de ces formes sexuées. Néanmoins, l'évaluation de la capacité

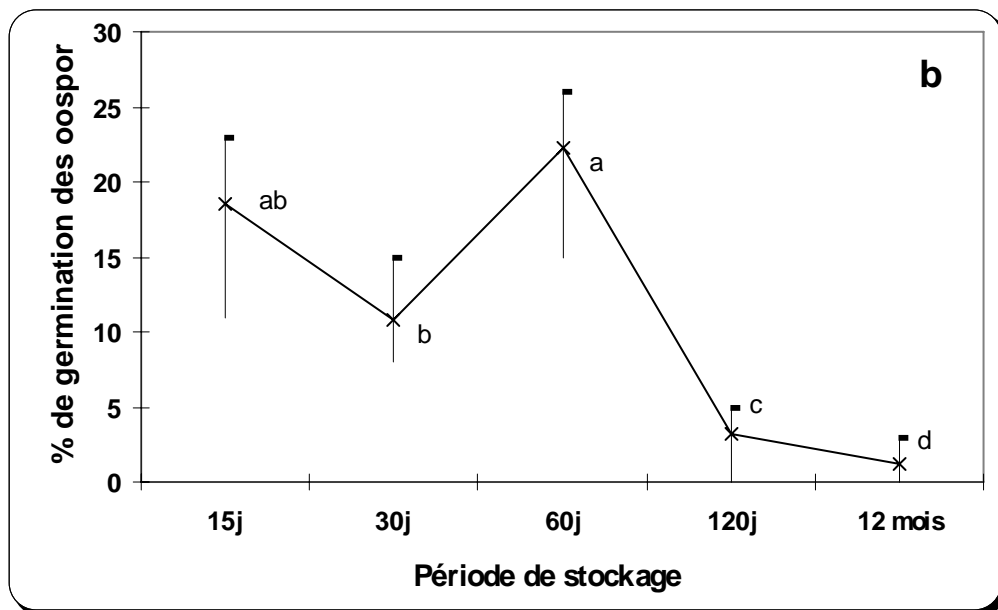
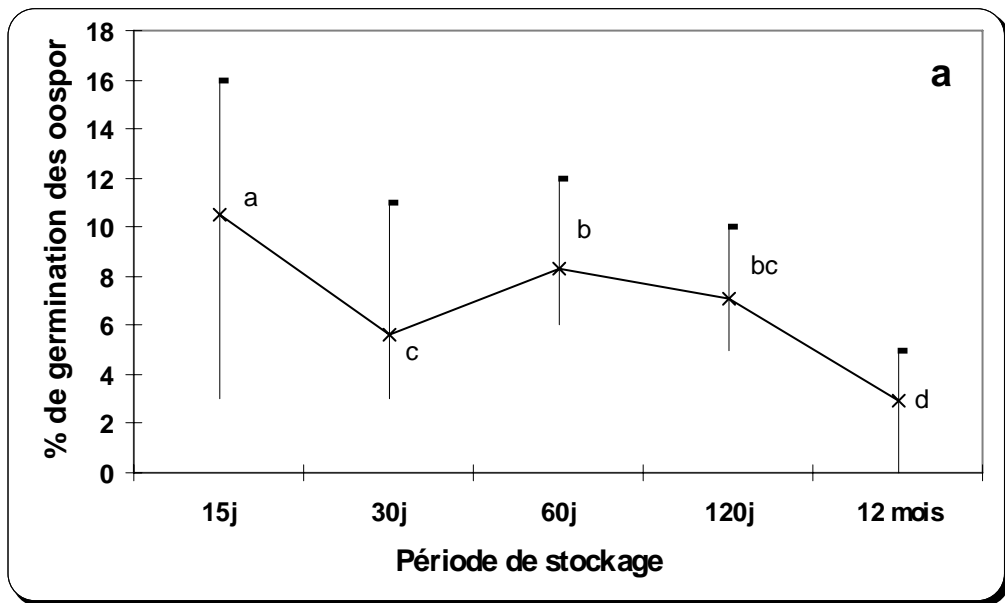


Figure 56: Influence de la durée de conservation des oospores, (a) à la température ambiante de 20°C et (b) au réfrigérateur à 4°C sur la germination (les points de la courbe marqués par les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $P=0.05$).

germinative des oospores constitue le moyen le plus fiable pour estimer leur viabilité.

Par conséquent, malgré la faible capacité germinative des oospores rapportée dans cette étude, elle pourrait être suffisante pour déclencher des infections si les conditions climatiques sont favorables, ce qui constitue une source potentielle de nouvelles souches du pathogène.

Cette étude a révélé, par ailleurs, la faculté de germination des oospores jeunes (âgées de 7 jours) et ce à différentes températures. Ces oospores sont capables de germer à des taux relativement plus élevées que les oospores âgées, surtout lorsque celles-ci sont conservées au réfrigérateur (4°C). Ces résultats indiquent que bien que la maturité des oospores (après 1 à 2 mois) n'ait pas achevée, la germination pourrait se produire dans des conditions d'incubation favorables. Si la fréquence de ces oospores jeunes est importante, elles seront capables d'induire des infections en plein champ, au cours de la même saison de culture. Ce résultat concorde avec les observations de Harrisson (1990 ; 1994). Il rapporte que les oospores âgées de moins de 5 jours germent plus rapidement que les oospores âgées et à des taux relativement plus élevés. Ce même auteur a rapporté, par ailleurs, que les oospores jeunes et germantes ne sont pas des recombinants, mais sont le résultat de l'autofertilité de l'un ou l'autre des deux parents ; leur présence diminue dans les cultures âgées au détriment des oospores formées par recombinaison sexuelle. D'après nos résultats et en tenant compte de cet hypothèse, les oospores âgées de plus de 2 mois et qui germent à des taux relativement faibles constitueraient une source potentielle de recombinants.

La variabilité des taux de germination des oospores, observée dans les différentes investigations, montre la contribution de certains facteurs dans ce processus tels que le type de croisements (types de confrontants), milieu de germination utilisé et les conditions d'incubation. Dans la nature, la germination des oospores serait alors contrôlée par plusieurs facteurs stimulateurs ou inhibiteurs au niveau du tissu végétal et/ou du sol.

V-4- Effet du type de croisement

Rappelons que dans ces tests, nous avons évalué le taux de germination d'oospores âgées de 2 mois produites dans 8 croisements choisis au hasard. La figure 57 représente les taux de germinations des oospores incubées dans le milieu à base d'extrait de sol de pomme de terre et dans l'eau distillée stérile, après 10 jours d'exposition à 20°C et 16 h de photopériode. L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative du facteur type de

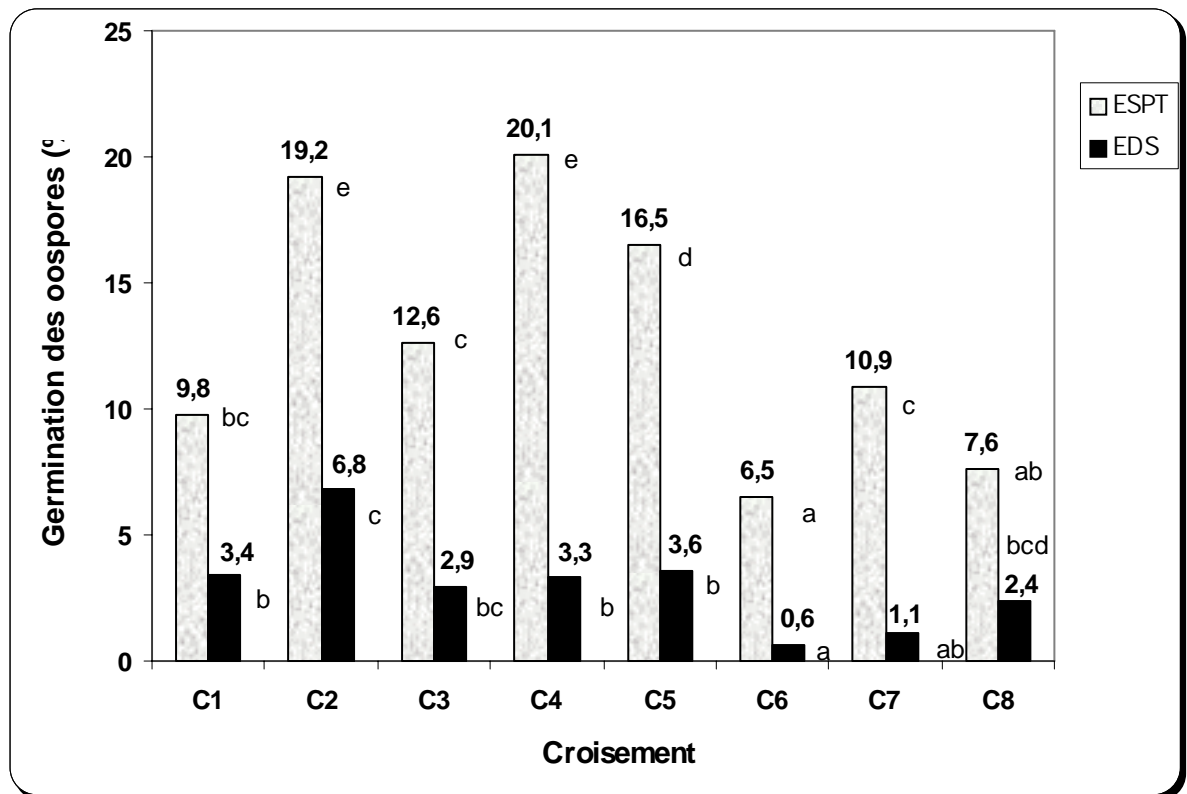


Figure 57 : Germination des oospores issues de 8 croisements et âgées de 2 mois après une incubation de 10 jours à 20°C et à une photopériode de 16h (C1 = F85 (A1) x S1F27 (A2), C2 = F110 (A1) x P6F11(A2), C3 = F42 (A1) x A20(A2), A18 (A1) x F109(A2), C5 = F90 (A1)x S3F12(A2), C6 = F82 (A1)x A14(A2), C7 = SP11(A1) x F54(A2) et C8 = A14 (A1)x S1F35(A2) ; les points marqués par les mêmes lettres dans une même courbe ne sont pas significativement différents à P=0.05 ; ESPT = Extrait de sol de pomme de terre ; EDS = Eau distillée stérile).

croisement et de l'interaction type de croisement x milieu de germination (tableau 41 en annexe). Sur le milieu à base d'extrait de sol de pomme de terre le taux de germination varie entre 7 et 20 %. Sur l'eau distillée stérile, le pourcentage des oospores germantes varie entre 1 et 9%.

La variabilité de performance de certains croisements par rapport à d'autres peut être expliquée par :

1- une différence de production des oospores abortives et donc non viables.

2- une différence de période de dormance des oospores.

3- une différence de la nature génétique de ces formes sexuées (recombinants ou autofertiles).

L'influence de type de croisement sur la germination des oospores a été signalé par certains auteurs tels que Gallegly et Galindo (1958) et Drenth *et al.* (1995)

Par ailleurs, les résultats de ce test ont confirmé les hypothèses annoncées dans le test précédent (Cf. V-2) concernant la relation étroite entre la différence des résultats des taux de germination évoqués dans plusieurs études et l'utilisation des croisements fertiles différents. Selon Christine *et al.* (2000), la formation des oospores peut s'effectuer selon différents mécanismes : autofertilité, apomixie, recombinaison sexuelle, etc. C'est ce qui expliquerait les différences dans les taux de germination des oospores selon les croisements. La confirmation de telles hypothèses nécessite des études plus approfondies du processus de production et de germination des oospores issues de la reproduction sexuée.

V-5- Effet du transit dans le tube digestif de l'escargot

La figure 58 montre les résultats de la germination des oospores après leur passage à travers le tube digestif de l'escargot. L'analyse de la variance a montré l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur croisement et de l'interaction croisement x traitement (tableau 42 en annexe). Sur l'eau distillé stérile, le pourcentage de germination des oospores varie entre 2 et 5 %. Ce taux varie entre 3 et 8% après traitement. Sur le milieu à base d'extrait de sol de pomme de terre, les oospores n'ayant pas reçu le traitement germent à des taux variant entre 7 et 18% (selon les croisements), alors que celles qui ont transité par le tube digestif germent à des taux qui varient entre 10 et 17%.

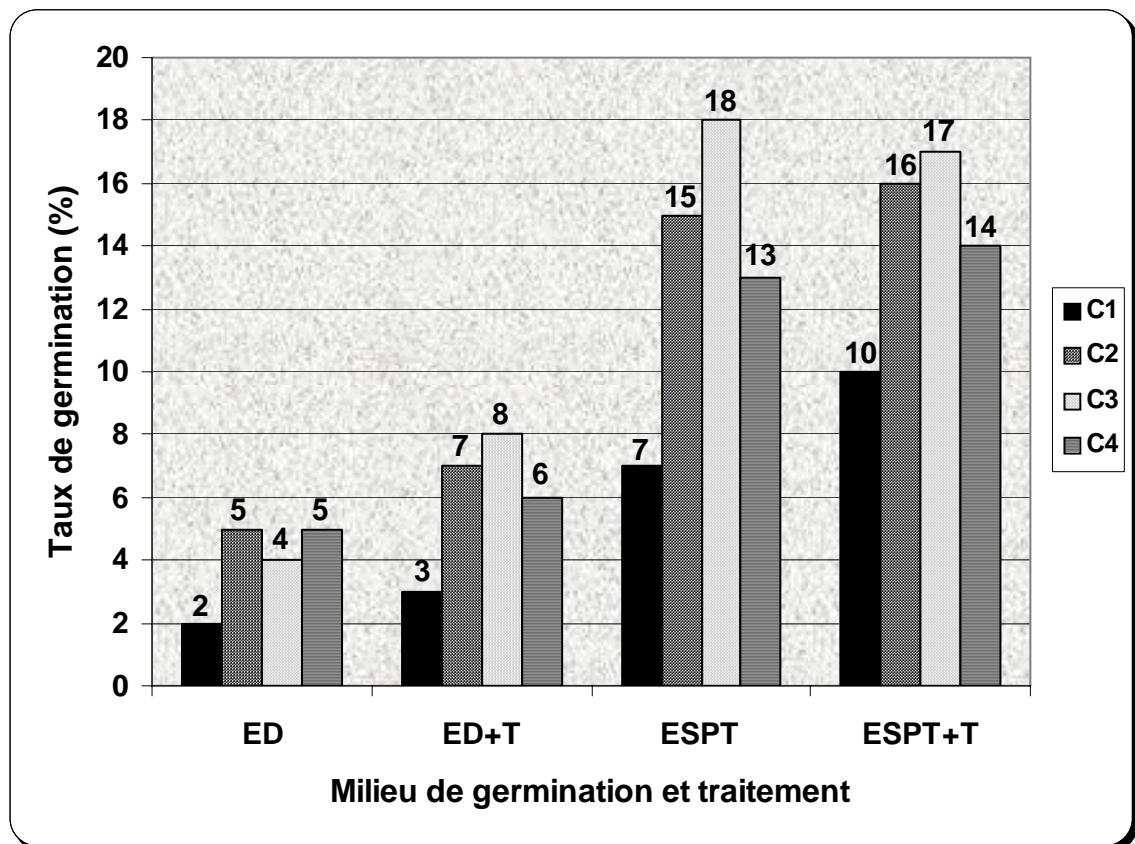


Figure 58 : Germination des oospores produites dans quatre croisements, après ou sans passage à travers le tube digestif de l'escargot (ED = Incubation directe des oospores dans l'eau distillée stérile sans passage à travers le tube digestif de l'escargot, ED+T = Eau distillée stérile avec passage des oospores à travers le tube digestif de l'escargot, ESPT = Incubation directe des oospores dans l'Extrait de Sol de la Pomme de Terre, ESPT+T = Incubation des oospores dans l'ESPT après le transit à travers le tube digestif de l'escargot) (C1 = S2F19 (A1) x P5F4 (A2) ; C2 = F110 (A1) x F54 (A2) ; C3 = S2F18 (A1) x P6F4 (A2) ; C4 = P6F17 (A1) x P6F11(A2)).

Il en ressort que les différences entre les deux derniers traitements ne sont pas significatifs, néanmoins, on constate que les taux de germination des oospores traitées sont relativement plus élevés que ceux relevés dans l'eau distillée stérile. Ce test confirme alors l'existence de l'effet stimulateur du milieu à base d'extrait de sol de pomme de terre et celui du type de croisement. Shattock *et al.* (1986) rapportent que le passage des oospores par le tube digestif a un effet stimulateur de la germination des oospores. Ceci résulterait de l'aptitude de l'invertébré utilisé à lever la dormance des oospores qui traversent son tube digestif. Selon Ribeiro (1983), les oospores ayant traversé le tube digestif de cet invertébré sont soumises à l'action de certaines enzymes tels β -glucuronidase et aryl sulfatase. Ces enzymes affaiblissent la paroi de l'oospore et la rendraient plus accessible à la germination. Ainsi, ça serait la concentration de ces enzymes qui contrôlerait l'effet du tube digestif sur la germination des oospores. Selon ce même auteur des espèces et même des isolats de la même espèce peuvent réagir de manière différente vis à vis de ces enzymes.

En conclusion, pour les oospores produites par nos isolats interfertiles, le passage à travers le tube digestif d'un escargot du genre *Planorbes* ne stimule que légèrement la levée de la dormance des oospores.

V-6- Effet du métalaxyl sur la germination des oospores

Les oospores produites *in-vitro* et âgées de 2 mois sont exposées à différentes concentrations du métalaxyl (0, 1, 10 et 100 μ g/ml) pour évaluer leur capacité germinative. La figure 59 montre l'effet du métalaxyl sur la germination des oospores produites par 6 croisements dont les confrontants possèdent des niveaux de sensibilité différents. L'analyse de la variance a indiqué la présence d'une différence significative du facteur type de croisement, du facteur concentration du métalaxyl et de l'interaction de ces deux facteurs (tableau 43 en Annexe). On constate que plus la concentration du métalaxyl est grande, plus le pouvoir germinatif des oospores est faible. Aucune forme de germination n'a été observée lorsque les oospores sont exposées à une concentration supérieure ou égale à 100 μ g/ml. Bien que les taux de germination enregistrés soient relativement faibles, ces tests ont révélé l'existence d'une faible corrélation entre le niveau de la sensibilité des confrontants au métalaxyl et le taux de germination des oospores qu'ils engendrent. En effet, les oospores formées à l'issue de croisements entre les isolats parentaux sensibles au métalaxyl (Fig. 59 C1, C2) germent à des taux compris entre 0 et 14%.

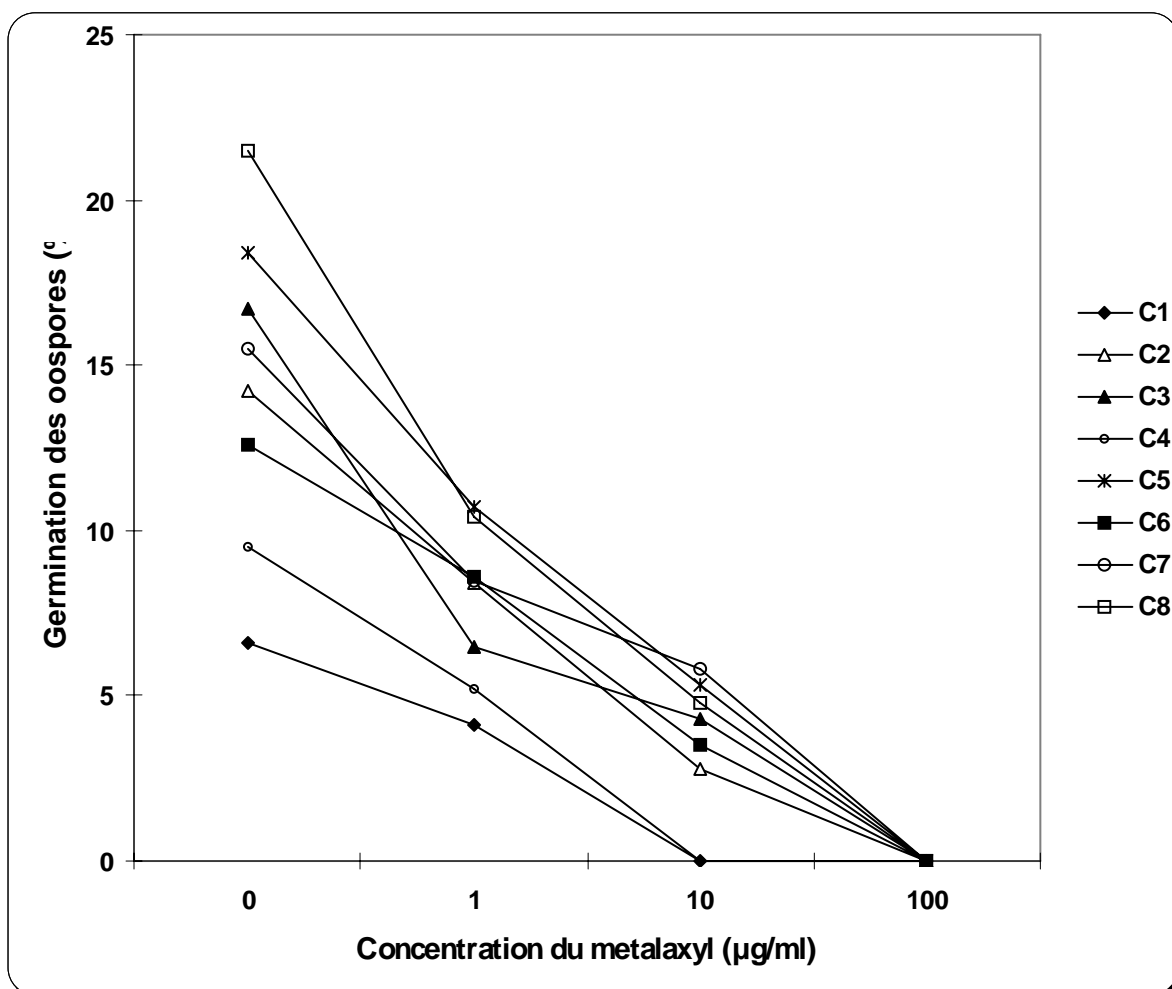


Figure 59 : Effet du metalaxyl sur la germination des oospores de 8 croisements après 10 jours d'incubation (C1 = F60 (A1-SM) x P7F2 (A2-SM) ; C2 = M7 (A1-SM) x M4 (A2-SM) ; C3 = SP4 (A1-SM) x P10F3 (A2-RM) ; C4 = F80 (A1-SM) x F108 (A2-RM) ; C5 = F90 (A1-RM) x FO2 (A2-SM) ; C6= S2F18 (A1-RM) x P10F5 (A2-SM) ; C7 =F90 (A1-RM) x F108 (A2-RM) ; C8 = S2F18 (A1-RM) x P10F1(A2-RM)).

Pour les oospores produites dans les croisements dont les deux confrontants sont résistants au métalaxyl (Fig. 59 : C7 et C8), les taux de germination relevés varient entre 5 et 22 %. Dans les croisements où l'un des deux parents est sensible, l'autre résistant (A1-SM x A2-RM et A1-RM x A2-SM), les taux de germination des oospores sont intermédiaires (compris entre 0 et 17%) (Fig. 59 : C3, C4, C5 et C6).

Ces résultats montrent que l'effet du métalaxyl est moins important sur la production que sur la germination des oospores. Ces résultats concordent, au moins en partie, avec les observations de Hansson et Shattock (1998). Ces auteurs ont remarqué aussi que plus l'exposition des isolats interfertiles et résistants au métalaxyl est précoce, plus la production et la germination des oospores est relativement faible. Les travaux de Duncan (1985) sur les oospores de *P. fragariae* et ceux de Staszet Martin (1988) sur les oospores de *Pythium ultimum*, ont démontré que le métalaxyl, le fosetyl, le captol, le dichlofluanide, le captane, le fenamino-sulfate, le méthyle bromide et le thirame réduisent le taux de germination des oospores actives (ayant une paroi mince), mais n'ont aucun effet sur les oospores inactives (ayant une paroi épaisse). Les résultats indiquent que ces formes sexuées seront capables de germer en absence du fongicide ou à des faibles doses. Elles constituent une source potentielle de nouvelles épidémies. Si l'on considère que les oospores sont présentes dans le plant ou dans le sol, l'application d'un fongicide contre le mildiou doit rendre compte de cette présence. Lorsque la maladie apparaît dans le champ, les fongicides appliqués sont surtout de nature systémique. Sachant que le déplacement de tels fongicides dans le plant se fait par la voie acropétale, et même si ces fongicides affectent leur production ou leur germination, les oospores produites dans les lésions sur la partie inférieure du plant sont protégées de ce fongicide. D'où la nécessité d'utiliser d'autres fongicides ou des techniques nouvelles pour atteindre de tels sites. Bien que le rôle de ces formes sexuées dans les nouvelles épidémies n'est pas encore déterminé, la prise en considération de ces propagules dans les nouveaux programmes de lutte intégrée contre le mildiou de la pomme de terre devient essentielle.

VI- Contribution des oospores dans le déclenchement des infections

L'infectivité des sols naturellement ou artificiellement infestés a été examinée en utilisant des fragments de tubercules ou des folioles de la variété Désirée comme appâts.

VI- 1- Sol naturellement infesté

Pour tous les échantillons de sol testés, aucun signe d'infection ou de sporulation n'a été observé sur les folioles ou sur les morceaux de tubercules après plusieurs observations microscopiques de ces tissus quelles que soit les conditions d'inoculation et d'incubation.

Cette absence d'infection résulterait de la rapide contamination ou colonisation des appâts par des antagonistes. En effet, il existe dans le sol naturellement infesté toute une panoplie de micro-organismes qui peuvent empêcher *P. infestans* de pénétrer le tissu végétal. Ceci peut être dû à la faible compétitivité du pathogène vis à vis de ces antagonistes. D'autant plus que l'expérience n'est pas menée sur des plantes entières qui se protègent naturellement contre l'invasion des saprophytes. Il est possible aussi que l'inoculum présent dans le sol naturellement infecté sous forme d'oospores soit non viable ou en quantité insuffisante. La faible capacité germinative des oospores constituerait une autre raison de l'absence d'infectivité de ces formes sexuées.

Sachant que les formes sexuées n'ont pas été détectées sur des plants naturellement infectés, et en considérant les résultats de ce test, nous pouvons suggérer que les conditions climatiques du Maroc ne permettent pas la reproduction sexuée chez la population de *P. infestans*, au moins dans la région étudiée. Nous pouvons penser que la quantité de l'inoculum sous forme d'oospores dans le sol marocain, au moins dans la région étudiée, est faible ou quasiment nulle. Néanmoins, cette hypothèse reste à confirmer par d'autres investigations.

VI-2- Sol artificiellement infesté

Comme pour le sol naturellement infecté, pratiquement aucun signe d'infection n'a été observé dans les différents tests réalisés malgré l'utilisation de concentrations élevées d'oospores produites *in-vitro* ou *in-vivo*. Ce résultat soutient surtout l'hypothèse préalablement émise et qui est en faveur d'un faible pouvoir germinatif des formes sexuées. Néanmoins, certains auteurs sont parvenus à obtenir au laboratoire des infections par les oospores après inoculation artificielle de sol (Drenth *et al.*, 1995 ; Strömberg *et al.*, 1999). Les oospores de *P. infestans* contenues dans des tiges de pomme de terre ou dans un sol infesté provenant d'une ferme et maintenues dans le sol pendant 7 mois à 12 mois étaient capables d'infecter les disques de feuilles de pomme de terre au laboratoire (Medina et Platt, 1999). Drenth *et al.* (1995) ont rapporté que les analyses de l'ADN des souches isolées de certaines lésions développées sur des folioles suite à une inoculation de sol

par les oospores, montrent qu'il s'agit de recombinants. D'autres études ont rapporté qu'après une attaque sévère d'un sol par le mildiou de la pomme de terre, celui-ci a conservé son pouvoir infectieux pendant environ 3 années (Perches et Galindo, 1969 in Schôber et Turkensteen, 1992 ; Andersson *et al.*, 1998). Ces auteurs ont attribué cette infection aux propagules sexuées.

Au Maroc, bien que la contribution de ces formes sexuées dans le déclenchement des infections n'est pas confirmé, il est essentiel de surveiller le développement des formes sexuées sur les cultures.

VII- Essais de cultures mono-oospores.

VII- 1- Cultures mono-oospores réalisées

La mise en culture, sur milieu sélectif, d'environ 320 oospores n'a permis le développement que de deux souches mono-oospores (Fig. 60). Ce résultat est dû d'abord aux pourcentages de germination qui sont relativement faibles. Des contaminations essentiellement bactériennes ont été observées sur les cultures bien que le transfert des oospores germantes du milieu de germination (l'extrait de sol ou l'extrait racinaire de pomme de terre) vers le milieu sélectif a été réalisé dans des conditions aseptiques. Néanmoins, ces deux cultures mono-oospores obtenues sont capables de produire des sporocystes et d'infecter les folioles de la variété Désirée. La figure 61 montre les lésions développées sur les folioles détachées de la variété Désirée par les isolats parentaux (S2F18 et S1F27) et les deux cultures mono-oosporales (CMO1 et CMO2), après 7 jours d'incubation à 20°C et sous une photopériode de 16 h. Ceci montre bien que ces deux souches sexuées sont pathogènes et peuvent induire des infections. Des résultats similaires ont été rapporté par Shattock *et al.* (1986) ; sur 161 oospores germantes mises en cultures ont pu développés seulement 9 cultures mono-oospores. Selon Mayton *et al* (2000), les cultures mono-oospores issues de la reproduction sexuée peuvent développer de larges lésions sur les folioles détachées comparables à celles produites par les isolats parentaux. Néanmoins, il a remarqué que la majorité des souches sexuelles sont caractérisées par un faible pouvoir pathogène par rapport à celui des parents lorsqu'elles sont testées en plein champ. Si l'on considère ces résultats, on peut dire que la majorité de la progéniture sexuelle ne peut survivre et/ou ne jouera pas un rôle important dans l'épidémie de la maladie. En effet, la faible capacité des oospores germantes à se développer en cultures pures pourrait constituer un autre argument du faible pouvoir infectieux de ces propagules dans la nature. D'où l'importance des facteurs abiotiques dans la levée de la dormance des oospores.

VII- 2 - Caractérisation des souches sexuées et asexuées

Rappelons que l'étude comparative a été conduite entre les deux isolats parentaux (S2F18 et S1F27) et leur descendance sexuée (CMO1 et CMO2) et 15 cultures mono-zoospores issues de chacune des souches citées ci-dessus. Il s'agit des cultures mono-zoospores du groupe S issues de l'isolat parental S2F18 (S1, S2, ..., S15), celles du groupe F issues de l'isolat parental S1F27 et celles des groupes C et M (C1, C2, ..., C15 et M1, M2, ..., M15) issues des deux souches mono-oosporales CMO1 et CMO2 respectivement.

VII- 2- 1- L'aspect des colonies mycéliennes

Les deux souches sexuées (CMO1 et CMO2) ont la même morphologie que l'isolat parental S2F18 (Fig. 60). Les souches mono-zoospores du groupe C (descendance de la souche CMO1), les souches du groupe M (descendance de la souche CMO2) ainsi que les souches du groupe F (descendance végétative de l'isolat S2F18) ont le même morphotype 1 (Cf. III-1, Résultats, Chapitre II). Par contre, les colonies mycéliennes des souches mono-zoospores du groupe S (descendance végétative de l'isolat S1F27) présentent le morphotype 2 (Cf. III-1, Parag. Résultats, Chapitre II). D'une manière générale, les cultures mono-zoospores ont souvent l'aspect de colonies mycéliennes des parents. La figure 62 montre l'aspect des colonies mycéliennes des cultures mono-zoospores issues de la souche mono-oospore CMO1.

VII-2- 2- Type sexuel

La confrontation des cultures mono-oosporales CMO1 et CMO2 avec des isolats de type sexuel A1 et A2 ont révélé qu'elles sont du type de compatibilité A2. Rappelons que le type sexuel de l'isolat parental S2F18 est A1 et celui S1F27 est A2. La confrontation des 60 cultures mono-zoospores issues des isolats parentaux (S2F18 et S1F27) et des deux cultures mono-oosporales (CMO1 et CMO2) avec des isolats A1 et A2 a montré que toutes les souches mono-zoospores, qu'elle soit d'origine sexuée ou asexuée, ont le même type sexuel que la souche dont la zoospore est issue (tableau 21). En effet, les souches mono-zoospores végétatives issues de l'isolat parental S2F18 et celles de S1F27 sont respectivement de type sexuel A1 et A2. Les souches mono-zoospores obtenues de la souche mono-oospore CMO1 et celle issues de la souche mono-oospore CMO2 sont toutes de type sexuel A2.

Les résultats obtenus pour l'aspect des colonies et le type sexuel montrent que toutes les souches mono-zoospores expriment le comportement de la culture mère. Il s'agit d'une hérédité végétative de ce caractère. Cette dernière observation est en accord avec les travaux de Gallegly (1970) sur le type sexuel. L'expression du type sexuel via les oospores dépend de l'affinité des isolats parentaux à former les anthéridies et les oogones et par suite de la nature génétique des oospores formées. En effet, selon Christine (2000), il existe une affinité sexuelle qui s'exprime par une production abondante des gamétanges soit femelles soit mâles qui varie selon les isolats parentaux utilisés. Cet auteur a rapporté que les isolats A1 expriment surtout un caractère femelle alors que les isolats A2 expriment un caractère souvent mâle. selon ce même auteur, les oospores produites dans un croisement peuvent être issues d'un seul parent (autofertilité ou apomixie). Si l'on considère les deux caractères étudiés (type sexuel et Aspect de colonies), les deux cultures mono-oospores obtenues dans notre étude constitueraient une progéniture de recombinants puisque le type sexuel (A2) est celui de l'isolat parental S1F27 et le morphotype celui de l'autre isolat parental S2F18.

Si on considère les hypothèses de Judelson *et al.* (1995 ; 1996) et Fabritius et Judelson (1997), selon lesquels le type sexuel est contrôlé par un seul locus dont l'homozygotie exprime le type sexuel A2 et l'hétérozygotie caractérise le type sexuel A1) ou les suggestions de Drenth *et al.* (1995) concernant la possibilité que le type sexuel A1 se transforme en type sexuel A2, nos souches pourraient être le fruit d'une autofertilité ou apomixie. Selon Spielman *et al.* (1990), Judelson *et al.* (1995) et Fabritius et Judelson (1997), l'expression de type sexuel dans la progéniture sexuée a révélé l'existence d'une ségrégation non Mendélienne de ce caractère puisque les taux de progénitures mono-oospores A1 et A2 obtenues sont inégaux. Les deux derniers auteurs ont rapporté l'existence d'un locus létale, à proximité de celui qui contrôle le type sexuel qui serait responsable de la ségrégation anormale de ce caractère étudié.

En conclusion, ce test que nous avons mené, a confirmé au moins pour les deux cultures mono-oospores obtenues que la descendance sexuée et celle asexuée peuvent toutes exprimer le type sexuel A2 nouvellement détecté au Maroc. Par conséquent, si on considère que la reproduction sexuée est réalisable dans la nature, et que les oospores résultantes sont capables d'infecter le tissu de l'hôte, l'émergence des recombinants de type sexuel A2 pourrait être très importante.

Tableau 21 : Caractéristiques des isolats parentaux et des cultures mono-zoospores sexuées et asexuées.

Souche	Aspect de la colonie	Type sexuel	Croissance mycélienne (mm)	Résistance <i>in-vivo</i> au métalaxyl
S2F18	Morphotype 1	A1	71.00	RM
S1F27	Morphotype 2	A2	43.33	MSM
CMO1	Morphotype 1	A2	73.67	MRM
CMO2	Morphotype 1	A2	72.00	MRM
S1	Morphotype 1	A2	67.67	MRM
S2	"	A2	72.00	RM
S3	"	A2	65.67	SM
S4	"	A2	64.00	MSM
S5	"	A2	66.00	MSM
S6	"	A2	60.00	SM
S7	"	A2	69.67	MRM
S8	"	A2	60.00	SM
S9	"	A2	58.00	SM
S10	"	A2	66.00	MSM
S11	"	A2	72.33	RM
S12	"	A2	66.67	MSM
S13	"	A2	71.00	MRM
S14	"	A2	66.00	MSM
S15	"	A2	71.00	MRM
F1	Morphotype 2	A2	44.00	MSM
F2	"	A2	41.00	SM
F3	"	A2	42.33	SM
F4	"	A2	48.00	MSM
F5	"	A2	46.33	MSM

F6	"	A2	41.33	SM
F7	"	A2	39.00	SM
F8	"	A2	40.00	SM
F9	"	A2	51.00	MSM
F10	"	A2	50.33	MSM
F11	"	A2	39.00	SM
F12	"	A2	55.67	MRM
F13	"	A2	52.00	MRM
F14	"	A2	40.67	SM
F15	"	A2	44.33	SM
C1	Morphotype 1	A2	71.00	MRM
C2	"	A2	73.33	RM
C3	"	A2	74.00	RM
C4	"	A2	64.33	MRM
C5	"	A2	71.00	RM
C6	"	A2	62.67	SM
C7	"	A2	71.67	RM
C8	"	A2	67.33	MSM
C9	"	A2	68.67	MRM
C10	"	A2	68.67	MRM
C11	"	A2	68.67	MRM
C12	"	A2	62.33	SM
C13	"	A2	65.67	MSM
C14	"	A2	66.00	MSM
C15	"	A2	69.33	MRM
M1	Morphotype 1	A1	66.00	RM
M2	"	A1	71.67	RM
M3	"	A1	64.00	RM

M4	"	A1	55.00	MSM
M5	"	A1	55.00	MSM
M6	"	A1	63.67	MRM
M7	"	A1	67.00	RM
M8	"	A1	51.67	SM
M9	"	A1	55.33	MSM
M10	"	A1	71.00	RM
M11	"	A1	53.67	MSM
M12	"	A1	46.67	SM
M13	"	A1	56.33	MRM
M14	"	A1	52.00	SM
M15	"	A1	57.00	MRM

S2F18, S1F27 : Isolats parentaux

CMO1, CMO2 : Cultures mono-oospores

C1, C2,, C15 : Cultures mono-zoospores issues la souche mono-oosporale CMO1

M1, M2,, M15 : Cultures mono-zoospores issues de la souche mono-oosporale CMO2

S1, S2,, S15 : Cultures mono-zoospores issues l'isolat parental S1F27

F1, F2,, F15 : Cultures mono-zoospores issues de l'isolat parental S2F18

SM = Sensible au métalaxyl

MSM = Moyennement sensible au métalaxyl

MRM = Moyennement résistant au métalaxyl

RM = Résistant au métalaxyl

VII- 2 -3 - Croissance mycélienne

Les histogrammes de la figure 63 montrent la distribution des diamètres des colonies mycéliennes chez les 4 groupes des cultures mono-zoospore issues de la reproduction sexuée et asexuée. Cette distribution est relativement hétérogène pour l'ensemble des groupes ; elle est plus importante chez les souches des groupes M. En effet, les analyses statistiques ont révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur origine de la souche (tableau 44 en annexe). Cette variabilité est remarquée aussi bien pour les cultures du même groupe que pour celles appartenant à des groupes différents. Les résultats montrent que les diamètres des cultures mono-zoospores du groupe C et M (C1, C2 , ..., C15 et M1, M2, ..., M15) issues des deux souches mono-oospores (CMO1 et CMO2) et ceux la progéniture végétative de l'isolat S2F18 (S1, S2, ..., S15) sont remarquablement comparables à celui de l'isolat parental S2F18 (Tableau 21). En effet, les diamètres enregistrés chez les souches du groupe C varient de 62 à 74 mm, ceux du groupe M varient de 47 à 72 mm et ceux du groupe S varient de 58 à 73 mm. Par contre, ceux du groupe F évoluent de 39 à 56 mm, ce qui montre que la croissance mycélienne de ce groupe est comparable à la performance de l'isolat parental S1F27 (A2), mais moins importante que celle des autres cultures mono-zoospores.

VII-2- 4- Sensibilité *in-vivo* au métalaxyl

L'évaluation de la sensibilité *in-vivo* au métalaxyl a montré que l'isolat parental S2F18 est classé comme résistant au métalaxyl (RM), l'autre isolat parental S1F27 est moyennement sensible (MSM), tandis que les deux souches sexuelles CMO1 et CMO2 se sont révélées moyennement résistantes au métalaxyl. La distribution des souches mono-zoospores (issues des isolats parentaux et des souches mono-oospores) selon leurs niveaux de sensibilité au métalaxyl s'est révélée très hétérogène (Fig. 64). En effet, pour la progéniture C (issue de la souche CMO1), 2 souches (13%) se sont révélées sensibles (SM), 3 (20%) sont moyennement sensibles (MSM) et 6 (40%) sont moyennement résistants (MRM) et 4 (27%) sont résistants (RM). Pour la descendance sexuelle M (progéniture de CMO2), 3 (20%) sont sensibles (SM), 4 (27%) sont moyennement sensibles (MSM), 3 (20%) moyennement résistants (MRM) et 5 (33%) sont résistants (RM).

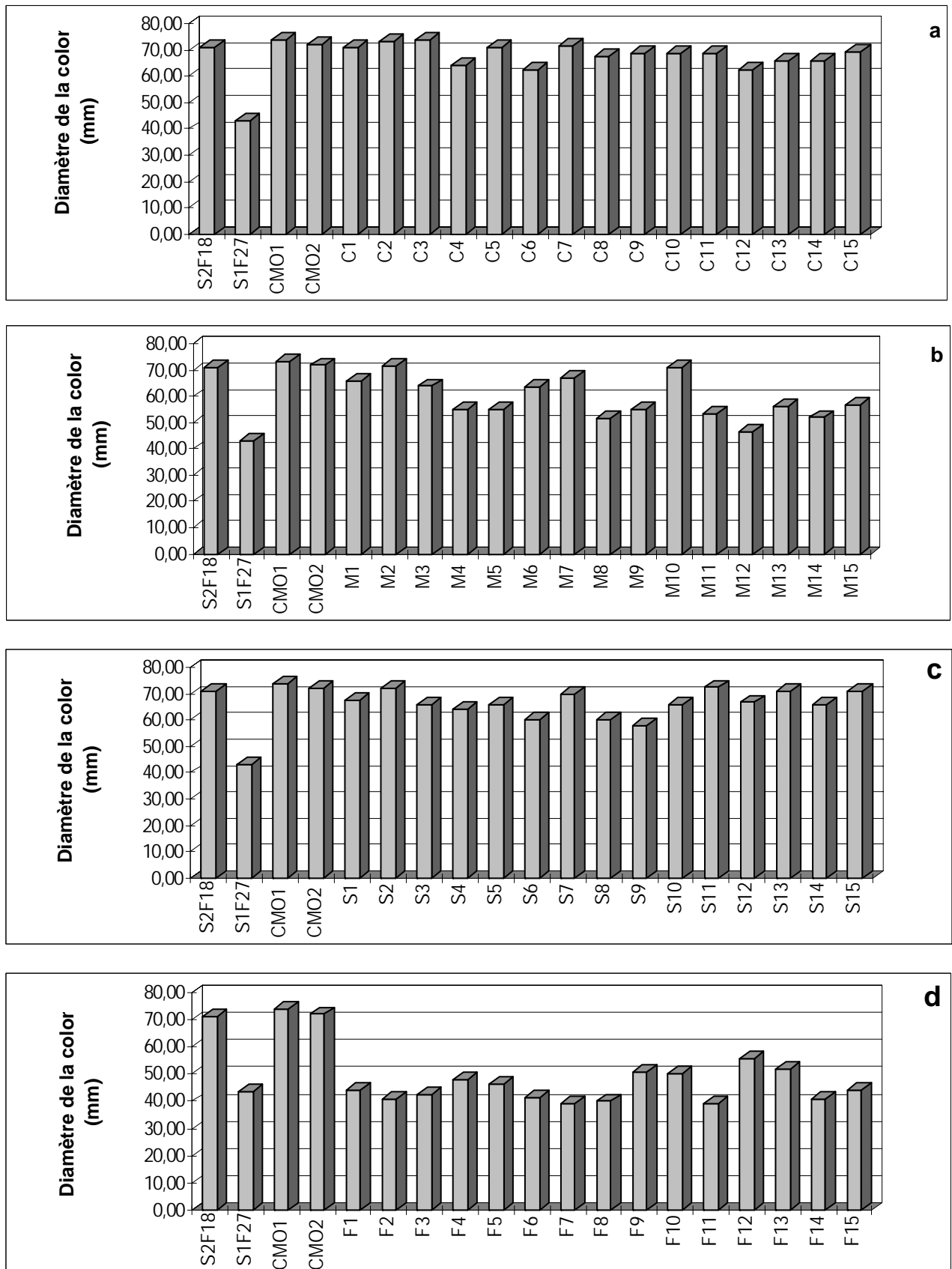


Figure 63 : Diamètres des colonies mycéliennes relevés dans chacun des groupes des souches mono-zoospores issues de a : CMO1, b : CMO2, c : S2F18 (A1) et d : S1F27 (A2). Les colonies mères S2F18, S1F27, CMO1 et CMO2 constituent les témoins.

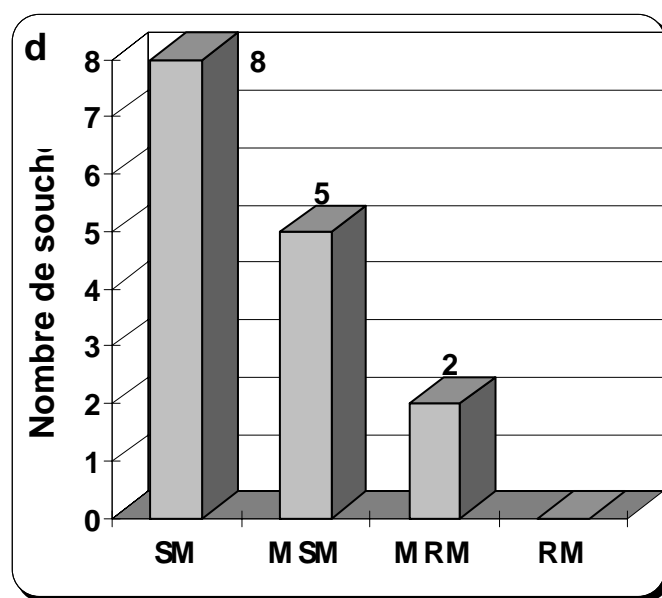
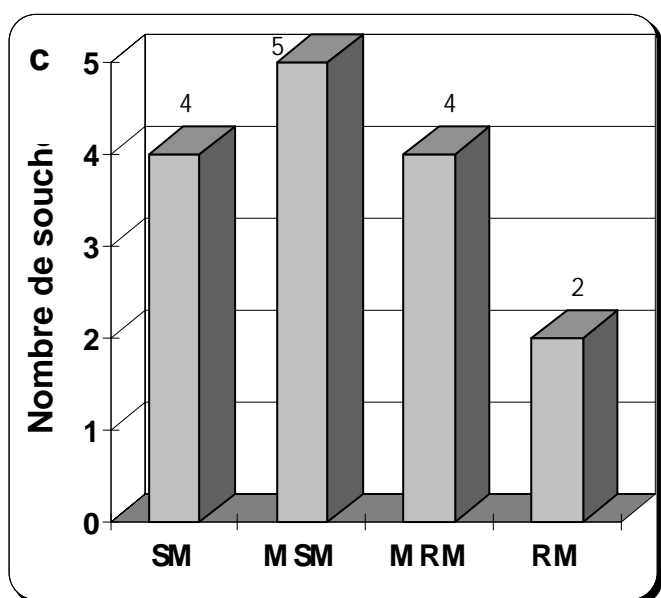
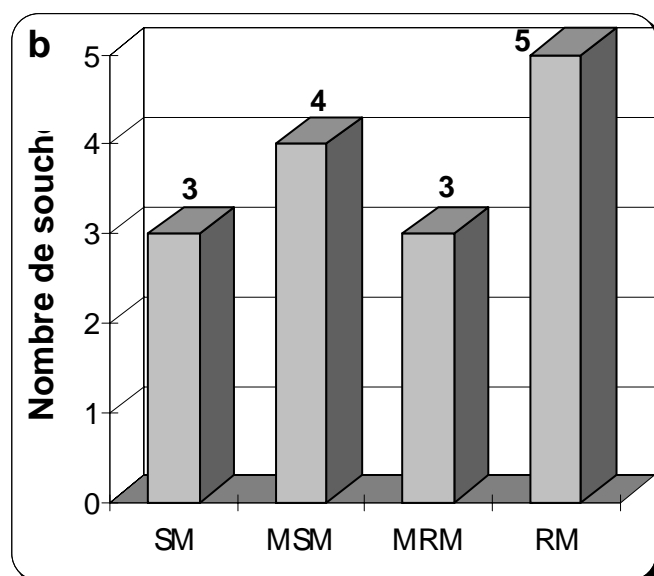
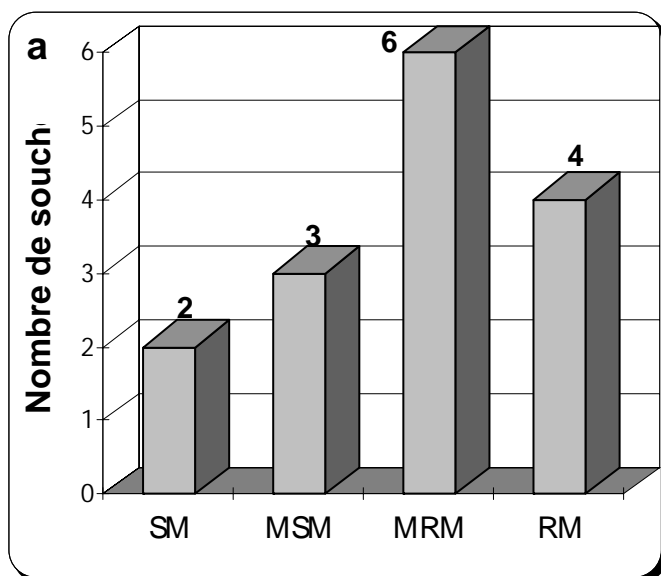


Figure 64 : Distribution de souches mono-zospores selon leur niveau de sensibilité au metalaxyl (a : groupe C issu de CMO1 ; b : groupe M provenant de CMO2 ; c : groupe S venant de S2F18 ; d : groupe F issu de S1F27; MS = Sensible au Metalaxyl, MMS=Moyennement sensible au metalaxyl, MMR = Moyennement résistant au Metalaxyl, RM = Résistant au metalaxyl).

Pour la progéniture asexuée S (issues de S2F18), 4 (27%) souches sont SM, 5 (20%) sont MSM, 4 (26%) sont MRM et 2 (13%) sont RM. Dans la descendance asexuée F (issues de S1F27), la distribution est la suivante : 8 (54%) sont SM, 5 (33%) sont MSM et 2 (13%) sont MRM. D'après cette distribution nous remarquons l'existence de souches sensibles dans la descendance de tous les groupes de souches (C, M et S). Les taux des isolats résistants sont relativement élevés (13 à 33%) dans les groupes des souches C, M et S. Par contre, aucune souche de la descendance végétative de l'isolat S1F27 n'est résistante au métalaxyl, alors que le taux des isolats sensibles est élevé (54%). Il ressort de cette étude que le taux des souches sexuées exprimant le phénotype résistant (27 à 37%) est plus important que celui exprimé par les souches asexuées (0 à 13%).

L'acquisition d'une résistance moyenne au métalaxyl par les deux souches mono-oospores suggère que ces souches constituent une descendance végétative de l'isolat S2F18. Il s'agirait de cultures obtenues par autofertilité ou apomixie de l'isolat S2F18. Cependant, la présence de souches moyennement résistantes dans le groupe F qui représente la progéniture asexuée de l'isolat S1F27 (13%), suggère aussi que ce phénotype (moyennement résistant) peut être hérité de cet isolat parental (S1F27). Nous avons aussi constaté l'expression du phénotype sensible dans la progéniture sexuée et dans la progéniture asexuée de l'isolat parental résistant au métalaxyl bien que leur proportion soit légèrement faible (13 à 27%). Ceci conduit à dire que l'expression des allèles du ou des gènes qui contrôlent ce caractère peut être différente. Ceci concorde avec les résultats de Harrisson (1990) qui a aussi remarqué que la descendance d'un isolat sensible peut contenir jusqu'à 35 % de souches résistantes au métalaxyl. En effet, selon Shattock (1988), pour un seul gène, les isolats résistants sont homozygotes dont l'allèle correspondant est nommé MexMex et les isolats sensibles sont homozygotes dont l'allèle est nommé mexmex, alors que les hybrides sont hétérozygotes (Mexmex.). Par conséquent, c'est le degré d'expression de ces allèles qui aboutit à des phénotypes sensibles ou résistants ou intermédiaires. Généralement, la plupart des études sur l'expression de la résistance au métalaxyl interprètent leurs résultats par l'existence d'un seul gène avec des allèles de sensibilité et/ou de résistance à dominance incomplète. En conclusion, en se basant sur les résultats de l'étude de la sensibilité au métalaxyl et indépendamment de leur origine génétique, les souches sexuées présentent une relative performance que celles asexuées.

VII-2-5- Nature génétique probable des deux souches mono-oospores

Le faible nombre de cultures mono-oospores obtenu ne nous permet pas de conclure sur la ségrégation réelle de différents caractères au sein de la progéniture sexuée F1. Néanmoins, les résultats obtenus pour certains caractères seuls tels que l'aspect des colonies mycéliennes, la croissance mycélienne et la résistance au métalaxyl, montrent que ces propagules sexuées représentent une descendance formée par autofertilité ou apomixie de l'un ou l'autre des isolats parentaux. Mais, ces deux souches mono-oospores expriment une performance qui tend à être comparable à celle de l'isolat S2F18. Par contre, l'analyse des résultats, en considérant dans ce cas l'interaction du type sexuel avec chacun des autres caractères, suggère la possibilité d'une recombinaison sexuelle entre les deux isolats parentaux. Par exemple, l'isolat S2F18 est de type sexuel A1 et exprime le morphotype 1, l'isolat S1F27 est de type sexuel A2 et possède un aspect de la colonie mycélienne de type 2, mais les deux cultures mono-oospores sont de type sexuel A2 et exprime le morphotype 1. Autre exemple est celui de l'hérédité du type sexuel et le niveau de résistance au métalaxyl. En effet, l'isolat parental S1F27 est de type sexuel A2 et moyennement sensible au métalaxyl, l'isolat S2F18 est de type sexuel A1 et résistant au métalaxyl ; alors que les deux souches mono-oospores sont de type sexuel A2 et moyennement résistantes au métalaxyl. Comparativement à ces résultats, Shaw (1990), après croisement d'un isolat européen A1-résistant au métalaxyl avec un isolat Mexicain A2-sensible au métalaxyl, a obtenu une proportion élevée des hybrides avec une résistance intermédiaire, alors que la faible proportion des individus sont résistants ou sensible. Tous les individus hybrides sensibles sont de type sexuel A1 alors que les hybrides résistants sont de type sexuel A2. L'analyse de la descendance végétative (cultures mono-zoospores) des deux souches mono-oospores sur la base de la résistance au métalaxyl, a montré que la distribution des proportions des différents individus est variable. Nous remarquons que les individus résistants présentent une proportion relativement importante allant de 27 à 33% et la proportion des individus sensibles varie de 13 à 20%, alors que les individus dont la résistance est intermédiaire présentent la proportion la plus importante. Cette variabilité d'expression des niveaux de résistance au métalaxyl au sein des cultures mono-zoospores présente un autre argument en faveur de l'hypothèse de la recombinaison génétique de ces souches sexuées.

En outre, sur la base des résultats obtenus pour le type sexuel et le degré d'agressivité seulement, il s'agirait de souches obtenues suite à une recombinaison sexuelle entre les deux parents. En effet, le croisement a été

réalisé entre un parent de type sexuel A1 et très agressif (S2F18) et un parent de type sexuel A2 et possédant un degré d'agressivité moyen. Les deux souches mono-oospores se sont toutes révélées de type sexuel A2 et ayant un degré d'agressivité élevé et comparable à celui de l'isolat parental S2F18 (A1). Néanmoins, même dans ce cas, il est possible que ces deux souches mono-oospores résultent d'apomixie ou de l'autofertilité de l'isolat S1F27 si l'on sait qu'un degré élevé d'agressivité peut être acquis suite à une recombinaison somatique (Shaw, 1991).

En conclusion, bien que l'étude comparative des comportements de la progéniture sexuée et asexuée a concerné un seul croisement et est limitée à la génération F1, les résultats obtenus montrent que la majorité des souches mono-zoospores d'origine asexuée ou sexuée peuvent conserver presque les mêmes performances parentales. D'une manière générale les performances relevées chez les souches sexuées sont relativement plus importantes que celles des souches asexuées.

L'analyse des résultats de croisements n'a pas permis de conclure sur la nature génétique des deux cultures mono-oospores. Néanmoins, certains résultats n'excluent pas la possibilité d'une recombinaison sexuelle entre les deux parents.

Avec la coexistence des deux types sexuels A1 et A2, les recombinants peuvent avoir des caractéristiques épidémiologiques différentes de celles des anciennes populations asexuées. Par ailleurs, il est primordial de considérer l'influence des facteurs abiotiques sur le déroulement de la reproduction sexuée.

La lutte contre le mildiou nécessite donc la prise en considération de l'évolution du pathogène via les oospores (formes nouvelles de conservation et source primaire de l'inoculum). En effet, avant l'élaboration de tels programmes, il faut mener des investigations sur la production, la germination, le pouvoir infectieux des deux types d'oospores (produites par apomixie ou autofertilité et recombinaison sexuelle) et faire une évaluation du degré de variabilité induite par les formes sexuées en plein champ.

Chapitre IV

EVALUATION DE LA SENSIBILITE DES CULTIVARS DE LA POMME DE TERRE VIS A VIS DE NOUVELLES SOUCHES DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

L'évaluation de la résistance variétale au mildiou a toujours constitué une étape essentielle dans les programmes de sélection des variétés de la pomme de terre. Ces programmes se sont longtemps basé sur l'introduction de résistance monogénique provenant de l'espèce *Solanum demissum* (Duvauchelle et Andrivon, 1996). L'évolution rapide des populations de *P. infestans* au cours des années rend ces programmes de sélection d'une importance primordiale pour faire face à ce pathogène. Dans le pathosystème pomme de terre- *P. infestans*, la confrontation entre les deux organismes est jugée inégale puisque l'un possède un patrimoine génétique stable et homogène (l'hôte) et l'autre doté de plusieurs mécanismes de variabilité et d'adaptation aux différentes conditions adverses (Boccas, 1979). En effet, dans plusieurs pays, les nouvelles souches de type sexuel A2 et/ou A1 sont caractérisées par une forte agressivité et une diversité génétique importante par rapport aux souches de la population ancienne du pathogène (Bradshaw *et al.*, 1998 ; Platt, 1999). Au Maroc, cette évolution est confirmée, dans cette étude, au moins pour l'acquisition d'une agressivité très importante. Actuellement, les sélectionneurs se sont intéressés à la résistance non spécifique ou partielle qui réduit la progression de la maladie sans supprimer entièrement les attaques, mais efficace contre toutes les races de pathogène. Ces variétés peuvent atténuer les pertes de récoltes et la progression de la maladie vers des zones vierges. La plantation de variétés résistantes permettrait aussi la réduction de l'utilisation des formules chimiques, d'où la tendance vers la résolution du problème de résidus causée par ces produits chimiques. Actuellement, la résistance variétale est incorporée dans les modèles de prévention et d'avertissement de la maladie (Andrivon et Lebreton, 1997). Malgré la très importante littérature concernant l'étude de la résistance au mildiou, la standardisation des définitions et des méthodes d'évaluation n'est pas encore réalisable (Van Oïgen, 1994). Il en résulte que les interprétations et les conclusions concernant le rôle des différents composants de la résistance sont plus ou moins différentes, d'où la nécessité d'analyser les résultats des tests en utilisant des logiciels statistiques.

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté que la sensibilité du feuillage et des tubercules d'un même cultivar ne sont pas souvent corrélés (Kadich et al., 1990 ; Stewart et al., 1994). Par conséquent, l'estimation de degré de résistance des tubercules doit être inclus dans les tests de screening.

Au Maroc, El Ismaili (1994) a étudié la sensibilité du feuillage de 5 variétés de pomme de terre vis à vis du pathogène dans une étude menée en plein champ.

Il en a conclu que les variétés Timate et Nicola sont les plus résistantes au mildiou, la variété Désirée est moyennement résistante et les variétés Spunta et Rubis sont les plus sensibles. De même, Sediqui et al. (1997), ont montré aussi la grande sensibilité de certaines variétés de pomme de terre et de tomate vis à vis des isolats Marocains. Néanmoins, aussi bien pour les variétés de pomme de terre qui sont largement cultivées au Maroc que celles non encore enregistrées dans le catalogue officiel, les informations concernant le degré de sensibilité au mildiou sous des conditions contrôlées sont quasiment inexistantes ou rares. Le suivi de la maladie au champ réalisé dans cette étude nous a permis de remarquer que la sensibilité des variétés utilisées actuellement vis à vis du pathogène devient plus importante au moins pour les variétés Spunta, Désirée et Nicola. L'objectif de cette étude est d'évaluer la sensibilité du feuillage et des tubercules de 16 variétés commercialisées vis à vis des souches locales de ce pathogène de type sexuel A2 nouvellement introduit au Maroc et d'examiner la corrélation entre les niveaux de sensibilité des deux organes végétaux pour chaque cultivar testé. Certaines de ces variétés, ne sont pas encore inscrites dans le Catalogue Officiel Marocain des variétés de pomme de terre.

L'importance de l'évaluation de la sensibilité des variétés de pomme de terre au mildiou sous des conditions contrôlées réside en la reconnaissance de la capacité de ces variétés à supporter l'infection sous les conditions optimales à la maladie. La technique la plus fiable pour évaluer les composantes de la résistance des génotypes de l'hôte au *P. infestans* est généralement celle conduite après infection naturelle ou après infection artificielle des plants cultivés dans des pots sous des conditions de champ (Guzman, 1964 ; Oïgen, 1994). Cependant, le suivi de la maladie sur les différentes variétés en plein champ nécessite un site à « risque » où les épidémies apparaissent chaque année et où la population de pathogène a une composition complexe non seulement en ce qui concerne les facteurs de virulence mais aussi doit être représentative de la population du champignon (Dorrance et Inglis, 1997). Par conséquent, les tests de screening de résistance conduits au laboratoire ou sous tunnels permettront une évaluation rapide et fiable de la résistance sur un nombre large de plants sous des conditions contrôlées. Dans une étude d'évaluation de la sensibilité de 10 cultivars, Stewart *et al.*, (1996) ont obtenu une bonne corrélation entre les résultats enregistrés sous tunnel et ceux relevés en plein champ. En principe, ces méthodes menées au laboratoire ou sous tunnel ont pour objectif la prévention des futures réactions des génotypes testés avant de les cultiver en plein champ (Dorrance et Inglis, 1997). Ces tests peuvent être conduits soit sur des plants entiers, soit sur des tissus détachés tels que les feuilles, les rondelles de feuilles, les tubercules entiers ou les fragments de tubercules. Selon ce dernier auteur, le test conduit sous tunnel sur des plants entiers est plus fiable pour l'évaluation de la résistance horizontale que celle verticale.

I-Préparation du sol

Le sol, de type " Hamri" (sableux-argileux), utilisé dans ce test est prélevé d'une parcelle cultivée de pomme de terre de la région de Meknès. Le sol est d'abord séché à l'air pendant 24 à 48h, broyé et tamisé à travers un tamis dont les pores ont un diamètre de 5 mm. Le sol est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant une heure. Après refroidissement le sol est mis dans des pots de 22 x 30 cm.

II- Matériel végétal

II-1-Origine et caractéristiques agronomiques des cultivars

Dans ce test d'évaluation de la résistance, nous avons utilisé 16 variétés de pomme de terre dont certaines ne sont pas encore inscrites dans le catalogue officiel marocain des variétés de pomme de terre, à savoir Rodéo, Latona, Asterix, Cicero, Charmante, Exquiza, Mondial, Fabula et Cantate. D'autres variétés sont largement cultivées au Maroc tels que Désirée, Spunta, Nicola et Kondor. Ces cultivars importés de la Hollande et de la France nous ont été fournis par le service régional de la protection des végétaux de Meknès. Les caractéristiques agronomiques de ces cultivars sont illustrées dans l'annexe. Pratiquement toutes les variétés testées ne possèdent pas de gènes R de résistance verticale. La variété Spunta reconnue par sa grande sensibilité au mildiou a été utilisée comme variété de référence.

II-2- Préparation du matériel végétal

II-2-1- Plants entiers

Les variétés testées ont été plantées dans les pots préalablement préparés (à raison d'un tubercule par pot). Les plants sont fertilisés chaque quinzaine avec une solution N : P : K 1% (14 : 28 : 14). L'irrigation est réalisée tous les deux ou trois jours. Le test est conduit en trois blocs à raison de 5 plants par bloc et par cultivar.

II-2-2- Tubercules

Les tubercules des différents cultivars n'ont pas été disponibles en quantités suffisantes pour évaluer le test sur des tubercules entiers. Pour cela, le test est mené sur les rondelles de tubercules d'environ 4 cm de diamètre et 5 mm d'épaisseur.

Après le lavage à l'eau de robinet, les tubercules sains sont trempés dans une solution de d'hypochlorite de sodium 1% pendant 3 minutes. Ils sont ensuite lavés 3 fois avec de l'eau distillée stérile. Après séchage les tubercules sont tranchés à l'aide d'un scalpel stérile en rondelles d'un diamètre d'environ 5 cm et d'une épaisseur de 15 mm sous des conditions aseptiques. Ces rondelles sont séchées en les déposant sur un papier filtre (Wattman N°1) stérile. Elles sont

ensuite placées dans des boîtes de Petri de 20 cm de diamètre contenant du papier filtre imbibé d'eau distillée stérile.

III-Préparation de l'inoculum

Etant donnée que les races du pathogène n'ont pas pu être déterminées vue la non disponibilité des variétés différentielles, l'inoculation est réalisée par une mixture de quatre isolats de type sexuel A2 (P10F1, F108, S3F25 et P7F3). Ces isolats proviennent de localités différentes et ont des degrés d'agressivité très élevés. Les suspensions sporangiales sont préparées à partir de cultures mycéliennes âgées de 10 jours de chacun des quatre 4 isolats. Les quatre suspensions préalablement ajustées à une concentration de 5×10^4 sporocystes/ml chacune sont mélangées.

IV- Conditions d'inoculation et d'incubation

IV-1- Plants entiers

Après 6 à 8 semaines de la plantation soit au stade 6 à 7 feuilles, les plants sont transférés dans la serre. L'inoculation est réalisée en pulvérisant 5 ml de la suspension préalablement préparée. Une trentaine de folioles appartenant aux trois étages du plant (supérieur, moyen et inférieur) sont inoculées à raison de 10 folioles par étage. Une quantité de 50 μ l de la suspension sporangiale est déposée sur la face supérieure des folioles pour chaque variété. Les plants inoculés sont incubés sous serre à 18-21°C et à une humidité relative de 90-100%.

IV-2- Tubercules

L'inoculation des fragments de tubercules est effectuée en déposant 30 μ l de la mixture sporangiale sur une surface des rondelles préalablement placés dans des boîtes de Petri. Les tubercules inoculés sont incubés à 18-20°C et à l'obscurité.

V- 5 - Détermination des composantes de la résistance:

V-1- Plants entiers

Les différentes composantes déterminées pour évaluer la sensibilité des variétés de pomme de terre sont :

a/ Période de latence : C'est le temps nécessaire pour l'apparition de l'infection par le champignon sur le tissu inoculé.

b/ Incidence de la maladie : L'incidence de l'infection est représentée par le rapport : nombre de folioles infectées sur le nombre de folioles inoculées. Ce paramètre est déterminé pour chaque plant inoculé (à raison de 30 folioles/plant)

c/ Taux de croissance des lésions: C'est la vitesse de croissance des lésions développées sur les folioles sélectionnées selon deux directions perpendiculaires (en millimètres par jour). Quatre mesures sont effectuées pour chaque variété pendant les 4 jours qui suivent l'apparition de la lésion. Ces mesures sont conduites sur 20 folioles sélectionnées par variété.

d/ Période d'incubation : Pour chaque variété, la période d'incubation correspondant au temps nécessaire pour l'apparition de la sporulation sur les folioles.

e/ Dimension de la lésion et intensité de sporulation : Après 7 jours d'incubation, les folioles infectées sont soigneusement trempées dans des boîtes de Petri stériles contenant 10 ml d'eau distillée stérile pour libérer les sporocystes formés. Le comptage de ces propagules est réalisé à l'aide d'un hemaecytomètre. Le nombre de sporocystes produits par cm^2 de tissu végétal est déterminé. Pour la mesure des dimensions des lésions développées sur les folioles, un papier transparent est déposé sur les folioles infectées pour tracer les limites de la surface des lésions développées. Ces dimensions sont déterminées à l'aide d'un planimètre (modèle 340 MK, USA). Ces mesures sont réalisées en sélectionnant 10 folioles par plant.

V- 2- Tubercules :

Les composantes déterminées dans ces tests d'évaluation de la sensibilité des tubercules sont les suivants :

a/ Temps de latence : C'est le temps, exprimé, en heures mis par le champignon pour se manifester sur les tubercules

b/ Incidence de la maladie : Il s'agit du nombre de fragments des tubercules infectés sur le nombre total inoculé. Ce paramètre est déterminé par l'inoculation de 30 fragments de tubercules à raison de 10 fragments par bloc (3 blocs) et par variété (16 variétés).

c/ Surface nécrosée : Il s'agit du taux de la surface des fragments de tubercules présentant les symptômes de l'infection après 7 jours d'incubation. Ce paramètre est déterminé pour 20 fragments par variété.

d/ Vitesse de croissance de la nécrose : Ce paramètre est mesuré quotidiennement sur les fragments de tubercules infectés selon deux directions perpendiculaires.

e/ Période d'incubation : C'est le temps mis par le pathogène pour sporuler sur les tubercules. Pour se faire, des fragments de tubercules infectés sont observés sous la loupe chaque 2 à 3 heures dès l'apparition des premiers signes d'infection.

f/ Intensité de sporulation : La détermination de l'intensité de sporulation du pathogène sur les différentes variétés est réalisée sur des disques de tubercules ayant des surfaces bien déterminés.

- **Préparation des disques de tubercules :** Des tubercules de chaque variété sont lavés et désinfectés superficiellement à l'aide d'hypochlorite de sodium 1 %. Ils sont ensuite épluchés. Des rondelles de tubercules de 15 mm de diamètre et 10 mm de profondeur sont prélevés à l'aide d'un emporte pièce. Ces rondelles sont trempées dans une solution d'hypochlorite de sodium 1% pendant 3 minutes. Elles sont ensuite lavées à l'eau distillée stérile deux à trois fois. Ces tissus sont séchés sur du papier filtre et sont placés dans des boîtes de Petri stériles de 90 mm de diamètre contenant du papier filtre imbibé d'eau. Chaque boîte contient 5 à 7 rondelles. Trois répétitions sont effectuées pour chaque variété, avec un total de 30 à 40 rondelles par variété.

- **Inoculation et incubation :** Les disques de tubercules sont immédiatement inoculés en déposant une goutte de 10 μ l de la suspension sporangiale préalablement préparée. Ces tissus sont incubées à 20°C et à l'obscurité pendant 7 jours.

- **Intensité de sporulation :** Les rondelles infectées sont trempées dans 5 ml d'eau distillée stérile. La concentration des sporocystes est déterminée à l'aide d'un hemaeytomètre. Le nombre de sporocystes est déterminé par cm^2 du tissu végétal.

g/ Profondeur de la lésion : Après 8 jours d'incubation, les rondelles de tubercules sont coupées en deux au milieu. La profondeur de la nécrose dans la chair est mesurée pour chaque rondelle au niveau du point de l'inoculation. Ces mesures sont effectuées pour 30 rondelles de tubercules par variété, à raison de 10 mesures/ bloc/ variété.

VI- Aire sous la courbe de la progression de la maladie (ASCPM)

L'estimation du niveau de sensibilité des 16 variétés de pomme de terre est réalisée aussi en calculant l'aire sous la courbe de la progression de la maladie sous serre.

VI-1- Inoculation et incubation des plants

Après transfert dans la serre, les plants de pomme de terre ayant 6 à 7 feuilles sont inoculés par pulvérisation d'une quantité de 10 ml de la suspension de sporocystes de 5×10^4 sporocystes ml^{-1} préalablement préparée à partir des 4 isolats de type sexuel A2. Cette pulvérisation est effectuée d'une manière à inoculer le maximum du tissu végétal. Chaque étage du plant reçoit la même quantité d'inoculum. Les plants inoculés sont incubés sous serre à 18-21°C et à une humidité relative de 90-100%. Une quinzaine de plants est inoculée pour chaque variété distribués en 3 blocs à raison de 5 plant / bloc / variété. Des relevées de la sévérité (pourcentage de tissu infecté par plant) sont réalisées depuis l'apparition des premiers symptômes à des intervalles de temps de quatre jours pendant 4 semaines (jusqu'à la détérioration du feuillage).

VI -2- Calcul de l'aire sous la courbe de la progression de la maladie (ASCPM)

Le calcul de l'ASCPM est réalisé selon la formule de Pandey *et al.* (1989)

$$\text{ASCPM} = D[1/2 (S_1 + S_k) + (S_2 + S_3 + \dots S_{k-1})]$$

D= intervalle régulier des observations

$S_1, S_2, S_3, \dots S_{K-1}, S_k$ = Sévérités relevées au cours de la première, la deuxième, la troisième, la K-1 observation et la K observation.

A la lumière des résultats obtenus dans les différents tests, un classement des variétés testées sera établi selon leur niveau de sensibilité au mildiou. Ce classement sera discuté et comparé avec celui établi selon l'échelle de Malcolmson qui est caractérisé par des indices de 1 à 9 dont l'indice 1 représente le niveau de sensibilité le plus élevé et l'indice 9 correspond au niveau de résistance le plus élevé (Cruickshank *et al.*, 1982).

VII- Analyses statistiques

L'analyse de la variance, la comparaison des moyennes (Test de Newman-Keuls : à $P=0.05$) et l'étude de corrélation entre les différents paramètres utilisés sont réalisées à l'aide du logiciel STAT-ITCF (Ver. 5).

I- Evolution de la maladie sur le feuillage des variétés

Le suivi dans le temps du développement de l'infection sur le feuillage des différentes variétés testées sous tunnel a permis de constater des comportements relativement variables de ces variétés commercialisées. Ce test d'évaluation de la sensibilité au pathogène a montré que toutes les variétés ont développé des symptômes caractéristiques de la maladie à l'exception de la variété Cicéro qui n'a manifesté aucun signe d'infection. En effet, cette variété a exprimé un niveau de résistance très apprécié vis à vis de l'inoculum. Les photos des figures 65, 66 et 67 montrent quelques exemples des infections de feuillage de certaines variétés inoculées sous tunnel. Les différents paramètres d'évaluation utilisés ont permis de classer les variétés testées selon leur niveau de sensibilité au pathogène.

I-1 - Temps de latence et période d'incubation

Le temps de latence et la période d'incubation déterminés dans ces tests d'inoculations artificielles sont variables selon les variétés testées. En effet, l'analyse statistique, des résultats obtenus pour ces deux paramètres, a montré l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) entre les différents cultivars (tableau 45 et 46 en annexe). Le temps de latence le plus court (31h) est noté chez la variété Charmante (tableau 21), tandis que le temps de latence le plus grand (63h) est relevé chez la variété Latona. Le décalage d'apparition de l'infection sur le feuillage des variétés testées peut atteindre approximativement 32h.

Par ailleurs, la période d'incubation, qui correspond au temps nécessaire pour l'apparition des sporocystes sur le feuillage de chacune des variétés, varie entre 0 et 167 heures (tableau 21). La variété Cicéro ayant montré un niveau de résistance au pathogène élevé, aucun sporocyste n'a été observé sur le feuillage de cette variété.. Les périodes d'incubation les plus faibles (101h et 109h) sont notées chez les variétés Liseta et Fabula respectivement. Celles les plus élevées (150h à 167h) sont remarquées sur le feuillage des variétés Exquiza, kondor et Latona. Pour les autres variétés les valeurs obtenues sont intermédiaires.

L'évaluation de ces deux paramètres de sensibilité nous a permis de regrouper les variétés de pomme de terre testés en cinq groupes :

* Le premier groupe est constitué par les variétés Charmante, Fabula, Spunta, Désirée, Liseta et Mondial. Dans ce groupe, le temps de latence est compris entre 30 et 39h et la période d'incubation entre 100 et 111h (à l'exception de la variété Charmante qui a montre une période d'incubation d'environ 118h).

* Le deuxième groupe englobe les variétés Cornado, Astérix. et Nicola dont le temps de latence oscille entre 39 et 51h et la sporulation apparaît après 112 à 129h.

* Le troisième groupe constitué par les trois variétés Rodéo, Cantate et Adretica. Dans ce groupe, les premiers signes d'infection se manifestent sur le feuillage après 51 à 58 h et la période d'incubation est comprise entre 130 à 149h.

* Le quatrième groupe caractérisé par un temps de latence compris entre 58 et 63 h et une période d'incubation de 150 à 165h. Ce groupe est constitué par trois variétés, à savoir Latona, Kondor et Exquiza.

* Le cinquième groupe constitué par la variété Cicéro qui n'a pas manifesté de signes d'infection et donc caractérisée par un temps de latence et une période d'incubation nuls.

I-2 - Incidence ou Intensité d'infection

Les résultats obtenus pour ce paramètre sont consignés dans le tableau 21. L'analyse de variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur cultivar (tableau 47 en annexe). En effet, à l'exception de la variété Cicéro, presque toutes les folioles appartenant aux différentes variétés et inoculées par le champignon ont manifesté des signes d'infection par le pathogène. Les pourcentages élevés d'infection obtenus (80 à 100%) sur certaines variétés testées renseignent sur la capacité d'agressivité des nouvelles souches de *P. infestans* existantes dans les champs des zones prospectées.

A la lumière de ces résultats obtenus pour ce critère d'évaluation, les variétés testées peuvent être classées en quatre groupes distinctes:

♣ le premier groupe dont l'incidence est nulle. Seule la variété Cicéro n'a pas manifesté des signes d'infection même après 10 jours d'inoculation et elle est donc considérée comme la plus résistante.

♣ Le deuxième groupe est constitué par les variétés Latona, Kondor et Exquiza. Dans ce cas l'incidence varie entre 30 et 50%.

♣ Le troisième groupe dont le taux d'infection est compris entre 50 et 80% regroupe les variétés Adretica, Cantate, Rodéo.

♣ Le quatrième groupe constitué par les variétés Astérix, Cornado, Mondial, Liseta, Nicola, Désirée, Spunta, Fabula et Charmante est caractérisé par une incidence comprise entre 80 et 100%. Ce groupe représente donc les variétés dont le niveau de sensibilité au mildiou est le plus élevé.

I-3- Vitesse de croissance des lésions développées sur le feuillage

La vitesse d'expansion des lésions sur le feuillage a été déterminée pour chacune des variétés au cours des 10 premiers jours d'incubation. Cette vitesse s'est révélée variable selon les variétés testées. En effet, sur la base de ce paramètre, l'analyse de variance a montré, encore une fois, que les variétés sont significativement différentes ($P < 0.05$) (tableau 48 en annexe). La vitesse moyenne la plus faible (1.54 mm / jour) est notée sur le feuillage de la variété Exquiza (tableau 21). Par contre, le champignon se développe plus rapidement dans le feuillage des variétés Spunta, Mondial, Liseta et Fabula. Sur le feuillage des variétés Kondor, Latona, Adretica, Cantate, Rodeo, Cornado, Désirée, Astérix, Nicola et Charmante, les vitesses de croissance des lésions sont intermédiaires.

4- Dimensions des lésions

L'inoculation du feuillage des différentes variétés testées a permis d'obtenir des lésions caractéristiques de *P. infestans* de dimensions variables à l'exception de la variété Cicéro qui présente une résistance remarquable vis à vis de l'inoculum. En effet, l'analyse de la variance a montré la présence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur variété (tableau 49 en annexe). Les dimensions des lésions relevées après 7 jours d'incubation varient entre 167 mm² (Var. Exquiza) et 831 mm² (Var. Liseta) (tableau 21). Pour les autres variétés, les valeurs enregistrées sont intermédiaires.

Quatre groupes de variétés sont distingués selon la gamme des dimensions des lésions et de la vitesse d'expansion de ces lésions :

- ♠ Le premier groupe constitué par la variété Cicéro qui, même après 10 jours d'incubation n'a montré aucun signe d'infection. Cette variété présente donc un niveau de résistance le plus élevé en comparaison avec les autres variétés.

- ♠ Le deuxième groupe est constitué par les variétés Exquiza, Kondor, Latona et Adretica. La dimension de la lésion pour ces variétés est comprise entre 100 et 300 mm² et la vitesse d'expansion de la lésion varie de 1 à 2.5 mm/jour. Ces variétés sont donc moyennement résistantes à moyennement sensibles

- ♠ Le troisième groupe comprend 6 variétés Cantate, Rodéo, Astérix, Cornado, Nicola et Désirée dont les dimensions des lésions varient de 300 à 600 mm² et la vitesse de croissance des lésions est comprise entre 2.5 et 4.5 mm/jour. Ces variétés sont moyennement sensibles à sensibles.

Tableau 21 : Paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage des 16 variétés commercialisées testées

	INC (%)	TL (h)	VCL (mm/j)	DL (mm²)	PI (h)	IS (spores/cm²)
Charmante	100% a	31.67 f	4.99 abc	785.00 a	118.00 e	472.33 bc
Fabula	99% a	35.00 ef	5.04 abc	691.00 a	109.00 fg	505.33 bc
Spunta	100% a	36.00 ef	5.31 ab	728.00 a	114.33 f	341.33 ab
Désirée	100% a	39.00 e	4.44 c	542.33 ab	118.33 e	345.33 ab
Nicola	96% a	41.33 e	4.70 c	520.00 ab	112.33 f	311.33 bc
Liseta	92% a	37.00 ef	5.68 a	830.67 a	100.67 fg	367.00 a
Mandial	100% a	33.33 f	5.42 ab	793.67 a	113.00 f	201.67 bc
Cornado	93% a	44.67 d	4.20 cd	443.33 ab	122.33 e	276.00 d
Astérix	83% b	47.33 d	4.54 c	473.00 ab	125.33 de	171.67 d
Rodéo	77% bc	53.33 c	3.99 cd	422.00 ab	130.67 de	258.00 d
Cantate	75% c	56.00 ab	3.65 d	481.00 ab	136.67 cd	218.00 d
Adretica	77% bc	52.67 c	3.56 d	263.33 bc	141.67 c	150.33 de
Latona	32% e	62.67 a	2.16 e	204.00 bc	150.00 b	118.33 de
Kondor	42% d	59.67 ab	1.77 e	211.33 bc	158.33 a	95.00 e
Exquiza	32% e	59.00 ab	1.54 e	166.67 bc	164.67 a	86.33 ef
Cicéro	0 f	0.00 g	0.00 f	0.00 c	0.00 g	0.00 f
Moyenne	75%	43.04	3.81	472.21	119.71 f	244.88

INC = Incidence de l'infection ; TL = Temps de latence ; VCL = Vitesse de la croissance de la lésion ; DL = Dimension de la lésion ; PI = Période d'incubation ; IS = Intensité de sporulation

Les valeurs suivies par les même lettres dans une même colonne ne sont pas significativement différentes à P=0.05

♠ Le quatrième groupe est formé de 4 variétés à savoir Charmante, Fabula, Mandial, Spunta et Liseta. Dans ce cas, les dimensions des lésions sont les plus élevées et sont comprises entre 600 et 900 mm² et la vitesse d'expansion de la lésion varie entre 4.5 à 6 mm/jour. Ces variétés sont donc les plus sensibles au pathogène.

I-5- Intensité de sporulation sur le feuillage

L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) entre les taux de sporulation du pathogène sur le feuillage des différentes variétés de pomme de terre (tableau 50 en annexe). L'intensité de sporulation la plus élevée (505 sporanges/cm² de feuillage) est noté chez la variété Fabula (tableau 21), tandis que la plus faible est enregistrée chez la variété Exquiza, soit environ 86 spores /cm² du tissu de feuillage.

L'estimation des capacités de sporulation, déterminées après 7 jours d'inoculation, a permis de distribuer ces variétés en quatre classes :

- la classe à sporulation nulle représente la seule variété Cicéro.
- les variétés Exquiza et Kondor dont les intensités de sporulation sont inférieures à 100 spores/cm².
- La classe des variétés Latona, Adretica, Cantate, Rodeo, Astérix, Cornado et Mondial ayant une intensité de sporulation qui varie de 100 à 300 spores/cm².
- Le groupe des variétés Liseta, Nicola, Desirée, Spunta, Fabula et Charmante caractérisé par une sporulation allant de 300 à 500 spores/cm².

I-6- Corrélation entre les paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage des variétés de pomme de terre.

Le tableau 22 montre les coefficients de corrélations entre les différents paramètres utilisés pour évaluer le niveau de sensibilité du feuillage des variétés de pomme de terre. Nous remarquons que pour l'ensemble des variétés testées il existe des corrélations très importantes. En effet, les coefficients de corrélation les plus forts sont notés entre l'incidence et la vitesse de la croissance de la lésion ainsi qu'entre le temps de latence et la période d'incubation. La corrélation est également importante entre l'incidence et la dimension de la lésion, entre la vitesse de la croissance de la lésion et la dimension de la lésion, entre la vitesse de la croissance de la lésion et l'intensité de sporulation ainsi qu'entre la dimension de la lésion et l'intensité de sporulation. Par contre, les plus faibles coefficients de corrélations sont obtenus entre le temps de latence et la vitesse de la croissance de la lésion et entre le temps de latence et l'intensité

de sporulation. Cette faible corrélation est remarquée aussi entre la dimension de la lésion et la période d'incubation et entre ce dernier paramètre et l'intensité de sporulation.

Tableau 22: Coefficients de corrélation entre les paramètres d'évaluation de la sensibilité de feuillage des variétés testées.

	INC	T L	VCL	DL	PI	IS
INC		0.01	0.95**	0.82**	0.20	0.78**
T L			-0.01	-0.34	0.93**	-0.14
VCL				0.84**	0.16	0.76**
DL					0.03	0.71
PI						0.04
IS						

INC = Incidence de l'infection ; TL = Temps de latence ; VCL = Vitesse de la croissance de la lésion ; DL = Dimension de la lésion ; PI = Période d'incubation ; IS = Intensité de sporulation

** les meilleurs corrélations

II- Evaluation de la sensibilité des tubercules au mildiou

Les symptômes caractéristiques de *P. infestans* apparaissent souvent sur les fragments de tubercules à partir du deuxième jours d'inoculation. Après 6 à 7 jours d'incubation, l'infection se manifeste sous forme de lésions brunâtres à noirâtre avec une fructification souvent abondante (Fig. 68). Toutes les variétés testées ont souvent présenté les même symptômes. Cependant, les vitesses de réactions des différentes variétés vis à vis du pathogène sont relativement variables.

II-1 - Temps de latence et période d'incubation

L'analyse de la variance des résultats obtenus pour ces deux paramètres a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) entre les différentes variétés testées (tableau 51 et 52 en annexe). Le temps de latence le plus court (27 h) est enregistré sur les tubercules de la variété Spunta (tableau 23), alors que le temps de latence le plus long est relevé chez la variété Cantate (42h). Pour les autres variétés, les premiers signes d'infections apparaissent après des temps

de latence allant de 29 à 40h. Le décalage d'apparition des nécroses sur les tubercules entre les différentes variétés peut donc atteindre 15 h, tandis que le décalage d'apparition de la sporulation sur les tubercules des différentes variétés dépasse 34 h. En effet, les périodes d'incubation les plus faibles, à savoir 78 et 79 h sont relevées sur les fragments de tubercules des variétés Mondial et Rodéo respectivement (tableau 23). Celle la plus élevée est remarquée sur les tubercules de la variétés Cantate (112h).

L'évaluation du temps de latence sur les tubercules a permis de grouper les variétés de pomme de terre en deux classes :

- ◆ Le premier groupe, dont le temps de latence est compris entre 27 et 35h, est constitué par les variétés Charmante, Fabula, Nicola, Latona, Cicero, Mondial, Spunta, Rodéo et Kondor

- ◆ Le deuxième groupe caractérisé par un temps de latence compris entre 35 et 42 comprend les 7 autres variétés.

Cependant, sur la base des résultats obtenus pour la période d'incubation, les variétés de pomme de terre peuvent être distribuées en trois groupes :

- ♠ Le premier est constitué par les variétés Spunta, Liseta, Mondial, Rodéo, Latona, Nicola, Astérix et Exquiza dont la période d'incubation est comprise entre 78 et 90h.

- ♠ Le deuxième groupe, dont la sporulation apparaît après des périodes comprises entre 90 et 100h est constitué par les variétés Charmante, Fabula, Cornado, et Kondor et Cicero.

- ♠ Le troisième groupe constitué par les trois variétés Cantate, Desirée et Adretica. La période d'incubation dans ce cas est comprise entre 100 et 112h.

II-2- Taux d'infection ou Incidence

Les taux d'infection des tubercules des 16 variétés testées sont relevés après 7 jours d'incubation. Pour la majorité des variétés testées, l'incidence, basée sur le nombre de fragments de tubercules infectés, est très élevée allant de 85 à 100% (tableau 23). Néanmoins, l'analyse de la variance a révélée l'existence d'une différence relativement significative ($P < 0.05$) entre les différentes variétés (tableau 53 en annexe). En effet, en considérant uniquement cette composante (incidence), les variétés peuvent être groupées en deux groupes. Le premier groupe, dont l'incidence est comprise entre 85 et 95%, comprend 7 variétés à savoir Astérix, Désirée, Exquiza, Kondor, Adretica, Cantate et Cornado. Le deuxième groupe est constitué des 9 autres variétés dont l'incidence est comprise entre 95 et 100%.

L'étude de cette composante a donc montré que les tubercules des variétés testées ont un niveau de sensibilité élevé vis à vis du mildiou.

Tableau 23 : Paramètres d'évaluation de la sensibilité des tubercules des 16 variétés testées

Variété	IN	TL	PI	TSN	VCN	IS	PrN
Charmante	100% a	30 ef	92 ef	100% a	7.33 ab	428 a	3.67 cd
Fabula	100% a	31 e	92 ef	95% ab	6.20 cd	360 ab	3.33 de
Spunta	100% a	27 g	80 j	100% a	7.83 a	305 ab	6.00 a
Desirée	93% ab	40 b	108 b	77% ab	3.90 g	177 cdef	1.67 f
Nicola	100% a	30 ef	87 gh	92% abc	4.53 fg	203 cdef	4.50 bcd
Liseta	98% a	35 d	85 h	90% abc	4.50 fg	192 cdef	4.00 cd
Mondial	100% a	32 e	78 k	95% abc	5.47 de	245 cde	6.50 a
Cornado	95% ab	35 d	96 d	90% abc	4.40 fg	122 efg	4.33 bcd
Astérix	91% ab	38 c	88 g	75% bc	3.77 g	65 g	1.33 f
Rodeo	99% a	29 f	79 jk	100% a	6.80 bc	291 bc	5.50 ab
Cantate	85% c	42 a	112 a	73% c	3.95 fg	108 fg	1.33 f
Adretica	93% ab	37 a	101 c	82% abc	4.1 fg	138 defg	2.00 f
Latona	98% a	31 ef	82 i	90% abc	4.57 fg	185 cdef	2.33 ef
Kondor	92% ab	32 e	91 f	93% abc	5.17 ef	239 cde	1.33 f
Exquiza	93% ab	35 d	86 h	93% abc	5.53 de	213 cdef	3.33 de
Cicéro	100% a	31 ef	93 e	97% ab	5.50 de	288 cd	4.83 b
Moyenne	96%	32.69	83.63	90%	5.25	222.33	3.50

INC = Incidence de l'infection ; TL = Temps de latence ; PI = Période d'incubation ; TSN = Taux de la surface nécrosée ; VCN = Vitesse de la croissance de la nécrose ; IS = Intensité de sporulation ; PrN = Profondeur de la nécrose.

Les valeurs suivies par les même lettres dans une même colonne ne sont pas significativement différentes à P = 0.05.

II-3- Sévérité : surface nécrosée des fragments de tubercules

La sévérité du *P. infestans*, exprimée en surface nécrosée des fragments de tubercules après 7 jours d'inoculation, est très importante pour la majorité des

variétés testées (tableau 23). L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence relativement significative ($P < 0.05$) entre les différentes variétés (tableau 54 en annexe). En effet, pour les variétés Charmante, Spunta et Rodeo, la sévérité est approximativement de 100% (tableau 24). Les plus faibles sévérités sont enregistrées sur le tissu de tubercules des variétés Cantate, Astérix, Désirée et Adretica.

II-4- Vitesse de la croissance de la nécrose

En ce qui concerne ce paramètre, l'analyse de la variance a montré l'existence d'une différence hautement significative ($P < 0.05$) entre les différentes variétés testées (tableau 55 en annexe). Les vitesses d'expansion des nécroses les plus élevées sont enregistrées chez les variétés Spunta et Charmante (tableau 23). Par contre, le pathogène se développe plus lentement sur les tubercules des variétés Astérix et Désirée. Les autres variétés possèdent des vitesses de croissance des nécroses moyennes intermédiaires.

Le regroupement des variétés testées en utilisant les deux composantes de la résistance, à savoir la sévérité et la vitesse d'expansion de la nécrose sur les tubercules, a permis de distinguer trois groupes de variétés :

- ♣ Le premier groupe est constitué par les trois variétés Cantate, Astérix, Désirée et Adretica. Dans ce cas la sévérité varie de 70 à 90% et la vitesse de la croissance de la nécrose est comprise entre 3 et 4 mm/jour à l'exception de la variété Adretica dont la vitesse de la nécrose enregistrée est environ 4.1 mm/jour

- ♣ Le deuxième groupe, constitué par les variétés Fabula, Exquiza, Cornado, Mondial, Latona, Nicola, , Kondor, Liseta et Adretica, est caractérisé par une sévérité comprise entre 90 et <100% alors que la vitesse d'expansion de la lésion varie de 4 à 6,2 mm/jour.

- ♣ Le troisième groupe, dont la sévérité est égale à 100% et la vitesse d'expansion de nécrose est comprise entre 6.2 et 8 mm/jour. Les variétés constituant ce groupe sont Charmante, Spunta et Rodéo. Les tubercules de ces variétés possèdent donc la plus grande sensibilité au mildiou.

II-5- Intensité de sporulation

L'analyse de la variance des résultats obtenus pour ce paramètre a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) entre les différentes variétés de pomme (tableau 56 en annexe). Les intensités moyennes les plus élevées à savoir 428 et 360 spores/cm² du tissu végétal, sont obtenues chez les variétés Charmante et Fabula respectivement (tableau 23), tandis que celles les plus faibles sont relevées sur le tissu des tubercules des variétés Astérix et Cantate à savoir 65 et 108 spores/cm² du tissu végétal. La capacité de sporulation sur les tubercules des autres variétés est intermédiaires (tableau 23).

A la lumière des résultats obtenus pour cette composante (intensité de sporulation), les variétés testées peuvent être classées en trois groupes :

♠ le premier groupe est constitué par les 7 variétés de pomme de terre, à savoir Astérix, Latona, Désirée, Cantate, Liseta, Cornado et Adretica. Les intensités de sporulation sont comprises entre 65 et 200 sporanges/cm² du tubercule de ces variétés

♠ Le deuxième groupe dont la capacité de sporulation varie entre 200 et 300 sporanges /cm², regroupe les variétés Cicéro, Nicola, Exquiza, Kondor, Mondial et Rodéo.

♠ Le troisième groupe comprend les variétés Fabula, Charmante et Spunta et dont la capacité de sporulation sur les fragments de tubercules est supérieure à 300 spores/ cm².

II-6- Profondeur des nécroses

L'étude de la profondeur des nécroses permet de vérifier la consistance de la chair des tubercules face au pathogène. L'analyse de variance a révélé la présence d'une différence significative ($P < 0.05$) entre les différentes variétés de la pomme de terre (tableau 57 en annexe). Le pathogène peut envahir les tubercules à une profondeur allant jusqu'à 6.5 mm (tableau 23) La plus faible invasion remarquée dans les tubercules des variétés Kondor, Cantate et Astérix, est 1.3 mm.

A la lumière des résultats obtenus pour ce paramètre, les variétés de pomme de terre peuvent être classées en quatre groupes:

⇒ Le premier groupe dont l'épaisseur de l'invasion par le pathogène est comprise entre 1 et 2.5 mm, est constitué par les 6 variétés, à savoir Kondor, Cantate, Astérix, Adretica, Latona et Désirée.

⇒ Le second groupe est caractérisé par une épaisseur de la nécrose variant entre 2.5 et 4 mm. Les variétés constituant ce groupe sont Exquiza, Liseta, Cornado et Fabula.

⇒ Le troisième groupe dont l'épaisseur de la nécrose varie entre >4 et 5.5 regroupe les trois variétés Nicola, Cicéro et Charmante.

⇒ Les trois variétés Rodeo, Mondial et Spunta constituent le quatrième groupe. Dans ce cas le pathogène peut s'introduire dans les tubercules à des épaisseurs supérieures à 5.5 mm.

II-7- Corrélations entre les paramètres d'évaluation de la sensibilité des tubercules au mildiou

Le tableau 24 présente les différents coefficients de corrélation entre les composantes de la sensibilité des tubercules pour l'ensemble des variétés testées. Les meilleures corrélations sont enregistrées entre d'une part le temps de latence et d'autre part les paramètres suivants : l'incidence, la surface nécrosée, la vitesse d'expansion de la nécrose et la période d'incubation. De même, une corrélation positive est remarquée entre d'une part la surface nécrosée et d'autre part la vitesse d'expansion de la nécrose. La plus faible corrélation positive est relevée entre la période d'incubation et l'intensité de sporulation.

Tableau 24 : Coefficients de corrélation entre les différents paramètres d'évaluation de la sensibilité des tubercules

	INC	TL	TSN	VCN	PI	IS	PrN
INC		-0.70**	0.65	0.45	-0.63	0.45	0.55
TL			-0.74**	-0.75**	0.76**	-0.58	-0.68
TSN				0.65	-0.55	0.64	0.52
VCN					-0.49	0.63	0.58
PI						0.28	-0.63
IS							0.35
Pr N							

INC = Incidence de l'infection ; TL = Temps de latence ; PI = Période d'incubation ; TSN = Taux de la surface nécrosée ; VCN = Vitesse de la croissance de la nécrose ; IS = Intensité de sporulation ; PrN = Profondeur de la nécrose.

** les meilleurs coefficients de corrélation

III- Corrélation entre les paramètres de la résistance du feuillage et ceux des tubercules

Les coefficients de corrélation entre les paramètres d'estimation de la sensibilité des variétés sur le feuillage et ceux déterminés sur les tubercules sont établis pour chaque variété (tableau 25). Pour toutes les variétés testées, les coefficients de corrélation entre ces paramètres sont souvent très faibles et/ou négatifs. Ces résultats démontrent que pour une même variété le niveau de sensibilité du feuillage peut être différent de celui des tubercules. Par exemple, la variété Astérix dont le coefficient de corrélation est le plus faible ($r^2 = -74$) possède vraisemblablement un niveau de sensibilité du feuillage très élevé mais leurs tubercules sont moyennement sensibles, alors que le coefficient le plus important est obtenu chez la variété Kondor ($r^2 = 0.12$).

Par ailleurs, le tableau 26 présente les coefficients de corrélation entre les différents paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage et ceux des tubercules de l'ensemble des variétés testées. Ces coefficients confirment la faible corrélation qui existe entre les niveaux de la sensibilité au mildiou de ces deux tissus. Par conséquent, le feuillage et les tubercules ont des comportements relativement différents vis à vis du pathogène.

Tableau 25 : Coefficients de corrélation entre les paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage et ceux des tubercules de chacune des variétés testées.

Désirée	Spunta	Fabula	Charmante	Cornado	Mondial	Liseta	Nicola
-0.59	-0.39	-0.41	-0.35	-0.68	-0.38	-0.55	-0.44
Adretica	Cantate	Rodeo	Astérix	Latona	Kondor	Exquiza	Cicero
-0.43	-0.70	-0.28	-0.74	-0.16	0.01	0.12	-

Tableau 26: Coefficients de corrélation entre les paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage et ceux des tubercules pour l'ensemble des variétés testées

Paramètres de la résistance des tubercules	Paramètres de la résistance du feuillage					
	INC	TL	VCL	DL	PI	IS
INC	0.2	-0.57	0.22	0.39	-0.46	0.33
TL	0.06	0.28	0.01	-0.09	0.22	0.02
PI	0.04	0.02	-0.12	-0.06	-0.01	-0.04
TSN	-0.1	-0.03	-0.06	0.06	-0.24	-0.07
VCN	0.14	-0.28	0.11	0.24	-0.13	0.07
IS	0.06	-0.44	0.03	0.24	-0.28	0.09
Pr N	0.21	-0.51	0.28	0.31	-0.42	0.22

INC = Incidence de l'infection ; TL = Temps de latence ; PI = Période d'incubation ; VCL = Vitesse de la croissance de la lésion , DL = Dimension de la lésion ; IS = Intensité de sporulation ; TSN = Taux de surface nécrosée ; VCN = Vitesse de la croissance de la nécrose ; Pr N = Profondeur de la nécrose.

IV- Aire sous la courbe de la progression de la maladie (ASCPM)

La détermination des ASCPM pour les différentes variétés est conduite sous des conditions contrôlées. L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) entre les différents cultivars testés (tableau 58 en annexe). Les ASCPM les plus importantes sont enregistrées chez les variétés Charmante (498), Cantate (485) et Spunta (480) (Fig. 67). Ces trois variétés possèdent donc le niveau de sensibilité le plus important, tandis que la variété Cicéro possède des ASCPM nulles. En effet, comme pour les tests précédents, cette variété n'a pas montré de signes d'infection et confirme son niveau élevé de résistance vis à vis du mildiou. Les ASCPM manifestées par les autres variétés sont dans l'ordre décroissant : 464 (Fabula), 420 (Liseta), 380

(Désirée), 332 (Mondial), 311 (Nicola), 217 (Cornado), 198 (Astérix), 119 (Adretica), 102 (Rodéo), 68 (Kondor), 50 (Latona) et 46 (Exquiza).

A la lumière des valeurs des ASCPM, les variétés testées peuvent être classés en quatre groupes homogènes:

- * Le premier groupe est constitué par les variétés Charmante, Cantate, Spunta, Fabula, Liseta, Désirée, Mondial et Nicola. Ces variétés sont les plus sensibles au mildiou

- * Le deuxième groupe constitué par les variétés Cornado, Astérix, Adretica et Rodéo.

- * Le troisième groupe est constitué par les variétés Kondor, Latona et Exquiza.

- * Le quatrième groupe est constitué par la seule variété Cicéro dont le niveau de résistance est le plus élevé.

A l'exception de la variété Cantate, le classement des niveaux de sensibilité des variétés au mildiou selon la méthode des ASCPM est semblable à celui établi en évaluant les différents paramètres de la sensibilité du feuillage.

V- Corrélation entre l'ASCPM et les paramètres d'évaluation de la résistance du feuillage

La comparaison entre les coefficients de corrélation entre les ASCPM et les paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage de l'ensemble des variétés a montré que les résultats obtenus en calculant l'ASCPM concordent avec ceux obtenus par la détermination des différents paramètres d'évaluation de la sensibilité du feuillage. En effet, les meilleurs coefficients de corrélation sont relevés avec l'incidence ($r^2 = 0.78$), la vitesse de la croissance des lésions ($r^2 = 0.75$), la dimension de la lésion ($r^2 = 0.70$) et la capacité de sporulation ($r^2 = 0.72$). Par contre, une corrélation faible ou négative existe entre d'une part l'ASCPM et d'autre part le temps de latence ($r^2 = -0.18$) et la période d'incubation ($r^2 = -0.20$). Par conséquent, ces deux derniers paramètres ne reflètent pas l'ASCPM.

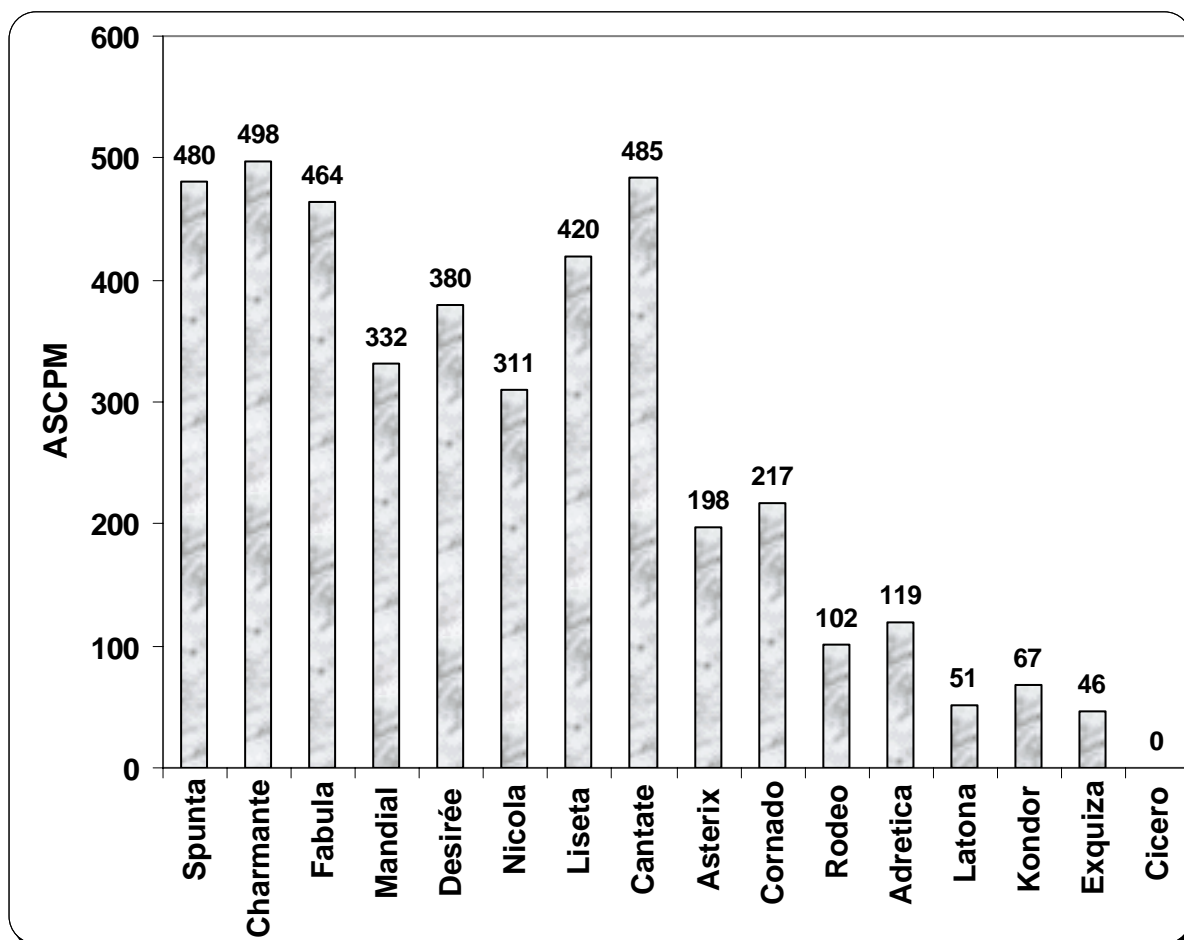


Figure 69 : L' Aire Sous la Courbe de la Progression de la Maladie des variétés commercialisées de pomme de terre déterminées sous tunnel.

VI- Corrélation entre l'ASCPM et les paramètres d'évaluation de la résistance des tubercules

Les tests de corrélation entre les résultats obtenus par le calcul de l'ASCPM et les différents paramètres d'évaluation de la sensibilité des tubercules a montré l'existence d'une très faible corrélation entre ces deux moyens d'évaluation. En effet, ces coefficients sont respectivement de -0.03, 0.06, 0.20, -0.07, 0.18, 0.20 et 0.15 entre d'une part l'ASCPM et d'autre part l'incidence, le temps de latence, la période d'incubation, la surface nécrosée, la vitesse de la croissance de la nécrose, l'intensité de sporulation et la profondeur de la nécrose. Ces faibles corrélations montrent que le comportement du feuillage pour la plupart des cultivars testés est souvent différents de celui des tubercules.

L'estimation des différents paramètres de la résistance du feuillage et des tubercules au mildiou et la détermination de l'aire sous la courbe de la progression de la maladie pour chacune des variétés testées ont été conduites en utilisant des souches appartenant à la nouvelle population de ce pathogène. L'évaluation de l'ASCPM a été menée sous serre pour différentes raisons : la difficulté de sélectionner une zone « à risque permanent », les conditions climatiques durant la période de l'essai non favorables pour mener ce test en plein champ où l'infection se produit souvent à la fin du cycle végétatif de la culture. En effet, Ceci peut influencer considérablement la quantité de l'inoculum existante dans le champ. Selon Fry (1978), les résultats obtenus par la détermination de l'ASCPM ne peut être d'une importance que si la quantité de l'inoculum est stable. Par conséquent, la conduite de ce test sous des conditions contrôlées (sous tunnel) s'avère le moyen le plus efficace pour évaluer la progression de la maladie sur les différentes cultivars.

Sachant que les variétés testées dans cette étude ne possèdent pas de gènes R, le niveau de résistance évalué serait à caractère horizontal. Les résultats obtenus ont montré que certaines variétés telles que Désirée, Nicola et Spunta utilisées actuellement dans les champs marocains, sont sensibles au mildiou. La détermination du niveau de sensibilité du feuillage des variétés en utilisant les techniques de l'estimation des composantes de la résistance de feuillage et de l'ASCPM a permis d'obtenir des résultats comparables. La majorité des paramètres d'estimation de la sensibilité de feuillage sont bien corrélés entre eux et avec l'ASCPM. Il s'agit de l'incidence, la vitesse de la croissance de la lésion, la dimension de la lésion et la capacité de sporulation. Les plus faibles corrélation sont enregistrées entre d'une part l'ASCPM et d'autre part le temps de latence et la période d'incubation. A la lumière de ces résultats concernant le feuillage, les variétés les plus sensibles sont Charmante, Fabula, Spunta, Désirée, Mondial, Nicola, Liseta, Cornado et Asterix (tableau 21) avec un degré de sensibilité de l'ordre de 3 selon l'échelle de Malcolmson. Les variétés possédant un feuillage moyennement sensible (degré de sensibilité 3 à 5) sont Rodeo, Cantate et Adretica. Les variétés Latona, Kondor et Exquiza sont moyennement résistantes (degré 6 à 7). La variété Cicéro a montré le niveau de résistance le plus élevé avec les deux tests ($7 < \text{degré} < 9$) puisque aucun signe d'infection n'a été observé sur le feuillage de cette variété. Ce classement établi dans notre investigation est relativement comparable à celui mentionné dans certains catalogues des variétés de pomme de terre. Néanmoins, certaines variétés telles que les variétés Désirée, Nicola, Fabula et Mondial, considérées

comme moyennement sensible d'après le catalogue néerlandais des variétés de pomme de terre (Coumou, 2000), se sont révélées très sensibles dans notre étude. Selon ce catalogue, la variété Latona est considérée comme sensible au pathogène soit un degré de 4,5, alors que les tests menés sur le feuillage de cette variété dans la présente étude ont montré qu'elle est moyennement résistante soit un degré de 6 à 7 selon l'échelle de Malcolmson.

Par ailleurs, bien que la majorité des variétés tend à avoir des tubercules sensibles au mildiou, l'estimation de certains paramètres de la résistance a révélé l'existence de différences importantes de comportement entre les variétés vis à vis du pathogène. Si l'on considère les résultats obtenus pour les différents paramètres utilisés au niveau des tubercules, les variétés de pomme de terre testées sont classées en quatre groupes selon le degré de sensibilité des tubercules au mildiou (tableau 23). Les variétés Rodeo, Mondial, Spunta, Charmante, Fabula et Nicola se sont révélées très sensibles au mildiou avec un degré de sensibilité inférieur à 3 selon l'échelle de Malcolmson. Les variétés, Kondor, Latona, Liseta, Cornado, Cicero et Exquiza sont sensibles ($3 < \text{degré de sensibilité} < 4$). Les variétés Cantate, Asterix, Adretica et Désirée sont moyennement sensibles ($4 < \text{degré de sensibilité} < 5$).

En comparant nos résultats avec le classement des variétés de pomme de terre mentionné dans le catalogue néerlandais de l'an 2000 (Coumou, 2000), nous pouvons remarquer que la différence de sensibilité des variétés vis-à-vis des souches marocaines et celle de Hollande oscille entre 0 et 4 degrés. Pour la majorité des variétés testées les différences de niveaux de sensibilité avec ceux établis dans ce catalogue sont plus importantes pour les tubercules que pour le feuillage. Selon Swiezynski (2001), les différences de niveaux de résistance déterminés chez une même variété dans certains pays peuvent aller de 3 à 6 degrés de l'échelle de Malcolmson. Selon ce même auteur, la différence entre les niveaux de sensibilité déterminés chez les mêmes variétés de pomme de terre rapportée en Hollande et en Allemagne est souvent d'un seul degré, alors que cette différence est plus importante entre les résultats obtenus dans ces deux pays et ceux rapportés en Pologne. Ces différences de degré de sensibilité des variétés peuvent être expliquées par une différence des conditions dans lesquelles le test d'évaluation est mené (laboratoire ou en plein champ) et le génotype de l'hôte, la quantité et le degré d'agressivité de l'inoculum utilisé et la technique d'évaluation utilisée (sur des plants entiers ou des tissus de plants détachés).

La présente étude a montré que pour chaque type de tissu (feuille ou tubercule), la majorité des paramètres sont bien corrélés entre eux, mais il n'existe pas une corrélation importante entre le niveau de sensibilité du feuillage

et celui des tubercules aussi bien pour une même variété que pour l'ensemble des variétés testées (tableaux 25 et 26). En effet, les coefficients de corrélation varient entre -0.51 et +0.39, ainsi, la variété Cicero possède un niveau élevé de résistance du feuillage, alors que les tubercules sont sensibles. Quant à la variété Désirée, elle est très sensible au niveau du feuillage, alors que les tubercules sont moyennement sensibles. Ces résultats sont en accord avec ceux de Yashina *et al.* (1975 in Swiezynski et Zimnoch-Guzowska, 2001) qui ont évalué la corrélation entre la résistance des folioles et celle des tubercules chez 10 clones et ont trouvé des coefficients de corrélation allant de +0.01 à +0.32. Par contre Stewart *et al.* (1994) ont trouvé des coefficients de corrélations élevés (de +0.66 à +0.88) après avoir évalué la résistance d'une progéniture qui résulte d'un croisement entre une variété résistante et une autre sensible. Swiezynski *et al.* (1991, 1997), ont souvent trouvé une corrélation positive entre la résistance des tubercules entiers et celle des fragments de cet organe. Cependant, certains facteurs, tel que le pouvoir pathogène des isolats, peuvent influencer cette corrélation (Flier *et al.*, 1998). Swiezynski *et al.*, (2001) ont remarqué que la majorité des génotypes de pomme de terre disposent souvent d'un feuillage résistant et de tubercules sensibles, alors que les génotypes ayant un feuillage sensible et des tubercules résistants sont très rares. Certaines études ont montré que même dans le cas où la corrélation entre la résistance du feuillage et celle des tubercules est positive, elle est relativement faible (Toxopeus, 1958 ; Durska, 1975 in Swiezynski et Zimnoch-Guzowska, 2001 ; Platt et Tai, 1998). Cette observation concorde avec nos résultats. En effet, d'après les deux types de corrélation conduites dans notre étude (tests de corrélation conduits pour chacune des variétés ou l'ensemble des variétés), les coefficients de corrélation déterminés entre les différents paramètres de résistance du feuillage et ceux de tubercules sont faibles ou négatifs (tableaux 25 et 26). Durska (1975 in Swiezynski et Zimnoch-Guzowska, 2001) a trouvé, par exemple, que le coefficient de corrélation entre la résistance des folioles détachées et les fragments de tubercules est de +0.628 et celui existant entre la résistance des folioles détachées et celles des tubercules entiers est de +0.570. Cette absence ou faible corrélation entre les organes d'une même variété mise en évidence dans notre étude peut aussi être expliquée par l'existence de gènes, contrôlant la résistance du feuillage, différents de ceux mis en jeu dans les tubercules. Cette hypothèse nécessite une étude génétique et moléculaire plus approfondie. Néanmoins, la présente investigation nous a au moins permis d'analyser les premières réactions des variétés nouvellement introduites au Maroc et celles non encore inscrites dans le catalogue officiel marocain des variétés de pomme de terre suite à leur confrontation à de nouvelles souches de pathogène très agressives.

Etant donnée que la variabilité des conditions dans lesquelles sont menés ces tests sous tunnel est très faible, il est probable que les variations des réactions des variétés vis à vis du pathogène soient plus importantes en plein champ. En effet, l'interaction variété - pathogène - climat - micro-organismes antagonistes peut influencer le niveau de sensibilité de la variété au pathogène et la transformer d'une variété sensible à une variété résistante ou vis versa. Il est nécessaire de vérifier le comportement des variétés, surtout celles qui ont montré un niveau de résistance apprécié vis à vis du pathogène, en plein champ pendant au moins trois à quatre ans.

Le pathogène *P. infestans* exploite son patrimoine génétique qui lui offre un potentiel de variabilité très important face à une population de l'hôte qui est homogène et génétiquement stable. Cette confrontation inégale va rapidement dans le sens favorable au pathogène. Par conséquent, la résistance verticale ou même horizontale sera surmontée suite à des changements dans la structure ou le mode d'expression d'un ou de plusieurs gènes du complexe contrôlant la virulence du pathogène. En effet, la grande variabilité qui caractérise le champignon *P. infestans* limiterait la différence de sensibilité entre les différents génotypes de l'hôte en rendant une variété sensible aussi bien sous serre qu'en plein champ. Cette variabilité de pathogène se manifeste souvent par l'apparition de souches dont le pouvoir d'agressivité est plus important comme il a été démontré dans notre étude et celle de Platt *et al.*, (1999).

Bien que le Maroc soit considéré comme un pays à climat aride ou semi-aride, le mildiou reste un des problèmes les plus redoutés des cultures de la pomme de terre. La sélection des variétés résistantes au pathogène constitue l'un des moyens les plus efficaces pour éradiquer cette maladie. Cependant, cette sélection doit prendre en considération les nouvelles souches du pathogène issues de la reproduction sexuée. En effet, ces souches de *P. infestans* seront plus agressives avec une diversité génétique plus importante que la population issue de la reproduction asexuée. Cette évolution de la population de *P. infestans* est démontrée dans différents pays du monde (Drenth *et al.*, 1994 ; Gavino *et al.*, 2000). Parmi les moyens qui ont été testés dans la lutte intégrée contre ce fléau est l'association de variétés sensibles et résistantes dans une même parcelle (Duvauchelle et Andrivon, 1998, Garrett et Mundt., 2000 ; Garrett *et al.*, 2001). Cette association permettrait de limiter la progression de la maladie mais aussi de limiter la prédominance des souches agressives. Il en résulterait une distribution hétérogène mais équilibrée de la population de *P. infestans* contenant des souches à pouvoir agressif important et celles ayant un faible pouvoir d'agressivité. Autrement dit, cette association de variétés sensibles et résistantes limiterait le problème de sélection de souches au dépend des autres.

La sélection des variétés ou des clones de pomme de terre constitue un problème plus complexe. Il nécessite des études épidémiologiques et génétiques de longues périodes prenant en considération le pathosystème Pomme de terre-*P. infestans* en interaction avec les facteurs du milieu.

CONCLUSION GENERALE & RECOMMANDATIONS

En possession des résultats obtenus, nous avons évoqué un certain nombre de conclusions sur la nature et les caractéristiques de la population de *P. infestans* dans la région de Saïs et Moyen Atlas.

1- Importance de la maladie dans la région de Saïs

Au cours des prospections réalisées, nous avons remarqué que les attaques du mildiou de la pomme de terre dû à *P. infestans* dans ce périmètre peuvent prendre une grande ampleur durant certaines saisons lorsque l'apparition de la maladie est précoce et les conditions climatiques sont favorables. Ainsi, au cours de la campagne agricole 1997-1998, les fréquences, les incidences et les sévérités déterminées dans ce périmètre sont élevées surtout dans la localité de Ain-Cheggag. Cependant au cours des campagnes agricoles 1998-2000, nous avons noté que le mildiou ne s'est pas manifesté (à cause surtout de la sécheresse) ou que la maladie apparaît tardivement coïncidant avec la sénescence de la culture de pomme de terre.

2- Caractérisation de la population de *P. infestans*

- Au cours de cette étude, nous avons maîtrisé l'isolement de *P. infestans* sans utilisation des antibiotiques par la technique de repiquage directe de sporanges développés sur les lésions. Ainsi, nous avons obtenu une collection de 108 isolats.
- La caractérisation des isolats collectés de différentes localités de la région de Saïs confirme l'existence des deux types sexuels A1 et A2 au Maroc, signalée depuis au moins 1997.
- Cette étude a confirmé l'émergence des souches de *P. infestans* résistantes (*in vitro* et *in vivo*) au métalaxyl. Un taux de 10% des isolats collectés se sont révélés résistants au métalaxyl (*in-vivo*).
- Une grande variabilité des paramètres de caractérisation existe au sein de la même parcelle ou des parcelles différentes à savoir le type sexuel, la résistance au métalaxyl (*in-vitro* et *in-vivo*), la croissance mycélienne sur

petit pois, l'intensité de sporulation *in vitro*, la capacité de germination directe et indirecte des sporocystes et le pouvoir pathogène sur 4 variétés de pomme de terre et une variété de tomate. Cette hétérogénéité varie d'une localité à l'autre. Ainsi la distribution des deux types sexuels A1 et A2 est souvent homogène au niveau d'une même parcelle mais hétérogène dans toute la région étudiée. Sur la base des deux paramètres à savoir la sensibilité au métalaxyl et le type sexuel, les isolats collectés peuvent être subdivisés en 8 phénotypes (A1-SM, A1-MSM, A1-MRM, A1-RM, A2-SM, A2-MSM, A2-MRM et A2-RM). Cette étude a montré l'existence d'une bonne corrélation entre la résistance au métalaxyl et le type sexuel A2. Pour les différents paramètres étudiés le comportement des isolats est variable selon leur origine puisque les isolats collectés de la localité de Ain-Cheggag sont plus performants que ceux collectés des autres localités. Les isolats collectés de la pomme de terre ont présenté des performances plus remarquables que ceux collectés de la tomate à l'exception de l'étude de l'agressivité sur la variété de tomate où nous avons observé des pouvoirs d'agressivité comparables. Une grande variabilité est aussi observée chez les isolats selon leurs phénotypes. En effet, les isolats résistants au métalaxyl (A1 ou A2) possèdent des caractéristiques biologiques et épidémiologiques plus importantes que ceux sensibles au métalaxyl. En ce qui concerne l'étude comparative des isolats sur la base de leur types sexuels, les isolats A2 sont relativement plus performants que les isolats de type sexuel A1.

- En ce qui concerne les résultats relatifs à l'étude de la pathogénicité, dans laquelle nous avons déterminé pour les différents isolats le temps de latence, la dimension de la lésion et l'intensité de sporulation sur quatre variétés de la pomme de terre et une variété de tomate, Nous avons distingué au moins deux génotypes constituant la structure de la population de *P. infestans* dans la région de Saïs : des isolats adaptés à la pomme de terre et à la tomate représentés par la plupart des isolats collectés de la pomme de terre et des isolats adaptés à la tomate qui correspondent aux isolats collectés de la tomate. Il s'agit d'une spécificité pathogénique vis-à-vis de l'hôte.

2-Reproduction sexuée et germination des oospores

La présente étude nous a permis de clarifier un aspect particulièrement important de l'épidémiologie du *P. infestans*. Il s'agit de la capacité de reproduction sexuée et le pouvoir de germination des oospores qui en résultent.

- ❖ Les tests d'induction de la reproduction sexuée *in-vitro* et *in-vivo* ont montré que:

- les isolats interfertiles de notre collection appartenant à la même parcelle ou à des parcelles différentes sont capables de produire des oospores en quantité souvent importante.
- la production des formes sexuées dépend de plusieurs facteurs tels que :
 - *in-vitro* : le milieu de culture, le type de croisement et le niveau de résistance au métalaxyl des isolats interfertiles. En effet, nos résultats ont montré que plus le niveau de résistance au métalaxyl est élevé, plus la production des oospores est importante.
 - *in-vivo* : le type des isolats interfertiles croisés, le type de l'hôte inoculé (pomme de terre ou tomate), les organes végétaux, le niveau de sensibilité des cultivars de pomme de terre et le niveau de résistance au métalaxyl des confrontants interfertiles. Ainsi la production des oospores est plus importante sur les feuilles pomme de terre que sur celle de la tomate, alors que sur les tiges, les oospores sont détectées en quantité plus importante sur tomate que sur pomme de terre. La production des oospores est aussi plus importante sur le feuillage des variétés moyennement résistantes au mildiou que sur celles sensibles. En outre, en présence du métalaxyl les oospores sont produites en quantités importantes lorsque les confrontants interfertiles sont résistants au métalaxyl.

❖ Les tests de germinations réalisées ont démontré que les oospores formées *in-vitro* sont capables de germination. Néanmoins, le taux de cette germination dépend du milieu de germination, de type de croisement, de la température et la durée de stockage des oospores ainsi que du niveau de résistance au métalaxyl des isolats parentaux. Les meilleurs taux de germination des oospores sont obtenus sur le milieu à base d'extrait de sol de pomme de terre. Les jeunes oospores (âgées de 7 jours) sont aussi capables de germer à des taux plus élevées que celles âgées (12 mois) surtout pour les oospores stockées à 4°C. La germination des oospores est plus influencée par l'amendement du métalaxyl au milieu de germination en comparaison avec à leur production. Généralement, le taux de la germination de ces formes sexuées ne dépasse pas 25%.

❖ L'inoculation d'un sol par des oospores et l'utilisation d'un sol naturellement infecté (où les deux types sexuels ont été collectés) n'a pas permis l'obtention d'infections sur les différents organes végétaux incubées dans ces sols. Cependant, les deux cultures mono-oospores établies se sont révélées très pathogènes et cette pathogénicité est comparable à celle de l'un des deux parents.

❖ La comparaison des cultures mono-zoospores issues de la reproduction asexuée et celles issues de la reproduction sexuée est réalisée en utilisant différents paramètres, à savoir l'aspect de la colonie mycélienne, le type sexuel, la croissance mycélienne sur petit pois, et la résistance *in-vivo* au métalaxyl. Cette étude comparative a montré une variabilité de comportement des types de souches mono –zoospores. Nous avons noté qu'il existe une tendance vers une performance des souches mono-zoospores sexuées par rapport à celle issues de la reproduction asexuée. L'origine génétique réelle des deux souches mono-oospores n'est pas déterminé dans cette étude. Cependant, il n'est pas exclu que ces deux cultures constituent le fruit d'une recombinaison sexuelle entre deux isolats parentaux.

3- Tests d'évaluation de la sensibilité variétale au mildiou

✓ L'évaluation de la sensibilité de 16 variétés de pomme de terre a été déterminé en utilisant différentes techniques. Au niveau du feuillage, deux méthodes ont été utilisées à savoir l'estimation des composantes de sensibilité de feuillage (temps de latence, période d'incubation, incidence, vitesse de la croissance de la lésion, dimension de la lésion et l'intensité de sporulation) et la détermination de l'aire sous la courbe de la progression de la maladie sous tunnel pour chaque variété. Au niveau des tubercules, différents paramètres de résistance ont été évalués à savoir le temps de latence, la période d'incubation, l'incidence, taux de la surface nécrosée, vitesse de la croissance de la nécrose, intensité de sporulation et la profondeur de la nécrose. Les résultats obtenus ont montré que la plupart des variétés testées possèdent un degré de sensibilité du feuillage et des tubercules élevé vis à vis de l'inoculum constitué par les nouvelles souches du pathogène.

✓ Au niveau de feuillage, pour la plupart des variétés, il existe une bonne corrélation entre les niveaux de résistance déterminés par les deux méthodes (composantes de la sensibilité de feuillage et l'ASCPM). Cependant, cette corrélation est très faible entre le niveau de sensibilité des tubercules et celui du feuillage.

✓ Le classement des variétés selon le comportement de leur feuillage vis à vis du pathogène est le suivant :

⇒ très sensibles : Spunta, Charmante, Désirée, Fabula, Nicola, Liseta, et Mondial

⇒ sensibles : Cornado et Asterix

- ⇒ moyennement sensibles : Rodeo, Cantate et Adretica
- ⇒ moyennement résistantes : Latona, Kondor et Exquiza
- ⇒ résistantes : Cicéro

✓ Le classement des variétés dans l'ordre décroissant de sensibilité des tubercules est le suivant :

- très sensible : Rodeo, Mondial, Spunta, Charmante, Fabula et Nicola
- sensible : Kondor, Latona, Liseta, Cornado, Cicero et Exquiza
- moyennement sensible : Cantate, Asterix, Adretica et Désirée.

À la lumière de ces résultats, certaines recommandations sont suggérées pour maîtriser l'expansion de cette maladie au Maroc. Il s'agit de :

♠ déterminer la distribution annuelle des deux types sexuels (A1 et A2) dans toutes les zones de production de la pomme de terre au Maroc.

♠ continuer à tracer la cartographie de la distribution des populations du pathogène résistantes au métalaxyl.

♠ déterminer les différents génotypes du pathogène existants au Maroc et leur distribution annuelle en utilisant des marqueurs moléculaires et comparer leur évolution à celles des génotypes existant dans les autres pays où la maladie est largement distribuée.

♠ continuer à vérifier la formation des oospores au champ sous les conditions climatiques marocaines et déterminer leur contribution réelle dans l'épidémiologie de la maladie.

♠ Déterminer les caractéristiques des cultures mono-oospores formées par les différentes formes de germination et ayant des origines génétiques différentes (recombinaison sexuelle ou apomixie).

♠ continuer la sélection de nouvelles variétés de pomme de terre ayant des niveaux de résistance horizontale très appréciée vis à vis des nouvelles souches de pathogène au laboratoire et en plein champ. Cette sélection doit être assurée par un suivi épidémiologique annuel pour évaluer l'évolution de leur niveau de sensibilité. Ce suivi peut être réalisé en association avec un système de prévision de la maladie adapté aux conditions climatiques marocaines.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achouri, M. 1979. Quelques aspects épidémiologiques de l'alternariose et du mildiou de la pomme de terre sur la culture de la pomme de terre primeur dans la région de Temara. Mémoire de 3^{ème} cycle phytiairie. I. A. V. Hassan II 115pp.
- Alexopoulos, C. J. Mims, C. W. and Blacwell, M. 1996. Intoductory to Mycology. Jon Wiley & Sons, Inc. New York, USA, pp154
- Andersson, B., Sandstrom, M., Stromberg, A. 1998. Indications of soil borne inoculum of *Phytophthora infestans*. Potato Research 41 : 305-310.
- Andrison, D. 1994. Dynamics of the survival and infectivity to potato tubers of sporangia of *Phytophthora infestans* in three different soils. Soil Biologie and biochemistry 26 : 945-952.
- Andrison, D. 1995. Biology, ecology and epidemiology of late blight potato pathogen *Phytophthora infestans* in soil. Phytopathology 85: 1053-1056.
- Andrison, D. 1996. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1980s : a critical review of historical and sientific evidence. Plant Pathology 45: 1027-1035.
- Andrison, D. et Lebreton, L. 1997. Mildiou de la pomme de terre, ou en somme-nous après 150 ans ?. Phytoma, 494 (Mai 1997) p: 24-27.
- Andrison, D. et Lucas, M. J. 1998. Des associations de variétés pour lutter contre le mildiou de la pomme de terre: est-ce possible ?. Premier colloque transnational sur les luttes biologiques, intégrée et raisonnée. 21, 22, 23 janvier 1998 p: 55-56.
- Ann, P. J., Chang, T. T. and Chern M. 1998. Mating type distribution and pathogeneicity of *Phytophthora infestans* in Tawain. Botanical Bulletin of Academic Sinica 39 : 33-37.
- Ann, P. J. and Ko, H. W. 1988. Induction of germination of *Phytophthora Parasitica*. Phytopathology 78: 335-338
- Anonyme. 1999. Bilan Activité, SONACOS, Maroc.
- Anonyme. 2002. Pomme de terre, Bilan Activité. M. A. R. A. Maroc.
- Bach, T. J. 1987. Synthesis and metabolism of mevalonic acid in plants. Plant Physiology and Biochemistry 25 : 163-178.
- BaKonyi, J., Laday, M., Dula, T., and Ersek, T. 2002. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from Hungary. European Journal of Plant Pathology 108 : 139-146.

Banihashemi, Z., and Mitchell, J. E. 1976. Factors affecting oospore germination in *Phytophthora cactorum*, the incitant of apple collar rot. *Phytopathology* 66 :443-448.

Bashan, B., Kadish, D., Levy, Y. and Cohen, Y. 1989. Infectivity to potato, sporangial germination and respiration of isolates of *Phytophthora infestans* from metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant populations. *Phytopathology* 79: 832-836.

Birch, P. R. J., Avrova, A.O., Duncan, J. M., Lyon, G. D. and Toth, R. L. 1999. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 356-361 (abstract).

Blaeser, P., and Steiner, U. 1999. Antifungal activity of plant pathology extracts against potato late blight (*Phytophthora infestans*). In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds II*. 12th International Reinhardtbrunn Symposium, Freidrichroda, Thuringia, Germany, 24th-29th May 1998. *Review of Plant Pathology* 78 : 936.

Boccas, B. 1979. La reproduction sexuelle chez *Phytophthora*, ses voies et quelques unes des conséquences génétiques. *Travaux et documents de l'O. R. S. T. O. M. N° 100*, Paris, 188pp.

Boccas, B. R. 1981. Interspecific crosses between closely related heterothallic *Phytophthora* species. *Phytopathology* 71 : 60-65.

Boccas, B, et Laville, 1978. Les maladies à *Phytophthora* des agrumes. Publication IRFA- Paris pp

Bogulavskaya, N. V. and Filippov, A. V. 1977. Survival rates of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in different soils. *Mycology and Phytopathology (Russie)* 11 : 239-241.

Bostock, R. M., Kuc, J. A., and Laine, R. A. 1981. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science* 212 : 67-69.

Bradshaw, N., D. Jenny, R. Shattock (1998): Recombinant blight strains more virulent. *Potato Review* 23: 42-44.

Bruck, R. I., Fry, W. E., and Apple, A. E. 1980. Effect of metalaxyl, an acylalanine fungicide, on developmental stages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 70: 597-601.

Bruin, G. C. A., Edgington, L. V., and Ripley, B. D. 1982. Bioactivity of fungicide metalaxyl in potato tubers after foliar sprays. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4 : 353-356..

Bhatia, S. K., and Young, R. J. 1985. Reaction of potato tuber slices to *Phytophthora infestans* in relation to physiological age. *American Potato Journal* 62 : 471-478.

Carnegie, S. F., and Calhoun, J. 1983. Effects of plant nutrition on susceptibility of potato leaves to *Phytophthora infestans*. *Phytopathologische Zeitschrift* 108: 242-250 (abstract).

Carter, D. A., Archer, S. A., Buck, K. W., Shaw, D. S., and Sattock, R. C. 1990. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. Mycological Research 94 : 1123-1128.

Chee, K. H. 1973. Phenotypic differences among single oospore cultures of *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora botryosa* from *Hevea brasiliensis*. Mycopathology and Mycology Applied 50 :275-292.

Chrif, B. 1992. Influence de quelques techniques culturales sur l'état sanitaire des plantes de pomme de terre dans la région de Berkane. Mémoire de 3^{ème} cycle. IAV. Hassan II. 172pp.

Chycoski, C. I., and Punja Z. K. 1996. Characteristics of populations of *Phytophthora infestans* from potato in British Colombia and others regions of Canada during 1993 to 1995. Plant Disease 80: 579-589.

Cohen, Y., Farkash, S., Reshit, Z., and Baider, A. 1997. Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves. Phytopathology 87: 191-196.

Cohen, Y., and Reuvni, M. 1983. Occurrence of metalaxyl-resistant isolates *Phytophthora infestans* in potato fields in Israel. Phytopathology 73 : 925-927.

Cohen, Y., and Rotem, J. 1987. Sporulation of foliar pathogens, in Pegg, G. F. And Ayres ; P. G. (Eds), Fungal Infection of Plants. Cambridge University Press, Cambridge : 314-333.

Christine, D. S., Roberts, W. S., and Fry, W. E.. 2000. Molecular Techniques and the mystery of the popato late blight, in Potato Late Blight Pathogen p: 21-42

Cole, A. L. J. 1970. Pectic enzyme activity from *Phytophthora infestans*. Phytochemistry 9 : 337-340.

Conce, G. et Duvauchelle, S. 1982. Le mildiou : biologie et méthodes de lutte. Phytoma 337 : 31-34.

Cristinzio, G., and Testa, A. 1997. Occurrence of the A2 mating type and self isolates of *Phytophthora infestans* in Italy. Journal of Plant Pathology 79:121-123

Crosier. W. 1934. Studies in the biology of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Cornell University Agricultural Experiment Station Memoir 155pp.

Cruickshank, G., Stewart, H. E., and Wastie, 1982. An illutrated assessment key for foliage blight of potato. Potato Research 26 :41-48.

Cuypers, B., and Hahlbrock, K. 1988. Immunohistochemical studies of compatible and incompatible interactions of potato leaves with *Phytophthora infestans* and of the nonhost response to *Phytophthora megasperma*. Canadian Journal of Botany 66 : 700-705

Daayf, F., and Platt (Bud), W. H. 1999. Assessment of mating types and resistance to metalaxyl of canadian populations of *Phytophthora infestans* in 1997. American Journal of Potato Research 76: 287-295.

- Daayf, F., and Platt (Bud), W. H. 2000. Changes in metalaxyl resistance among glucose phosphate isomerase genotypes of *Phytophthora infestans* in Canada during 1997-1998. *American Journal of Potato Research* 77 : 311-318.
- Daggett, S. S., Gtz, E., and Therrien, C. D. 1993. Phenotypes changes in population of *Phytophthora infestans* from eastern Germany. *Phytopathology* 83 : 319-323.
- Davidse, L. C., Daniel, D. L., and Van Westen, C. J. 1983. Resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 89 : 1-20.
- Davidse, L. C. D. Looijen, L. K. Turkensteen, D., and Van der Wal, D. 1981. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Plant Protection Organisation Bulletin* 15: 403-409.
- Day, J. R., and Shattock, R. C. 1997. Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology* 103: 379-391.
- Deahl, K. L., Demut, S. P., Sinden, S. L., and Weingartner, D. P. 1994. Characterization of oospore formation by *Phytophthora infestans* in host tissue after inoculation with isolates of opposite mating type collected in the United States. *ARS report of National Agricultural Library, USA* (abstract).
- Dekker, J. 1976. Acquired resistance to fungicides. p. 176-197. In: Marsh, R. W. (ed) *systemiques fungicides*. Lomgman, London. 401pp.
- Doke, N. Ramirez, A.V. and Tomiyama, K. 1987. Systemic induction of resistance in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment with hyphal cell wall components of fungus. *Journal of Phytopathology* 119: 232-239.
- Dorrance, A. E., and Inglis, A. A. 1997. Assessment of greenhouse and laboratory screening methods for evaluating potato foliage for resistance to late blight. *Plant Disease* 81 : 1026-1213.
- Dorrance, A. E., Inglis, A. A., Brown, C. R, Goodwin, S. B. and Fry, W. E. 1999. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Western Washington. *Plant Disease* 83: 423-428.
- Dowly, L. J., 1987. Factors affetcng the survival of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Irland. *Potato Research* 30 : 473-478.
- Dowly, L. J., and O'Sullivan, 1985. Monitoring metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ireland. *Potato Research* 28 : 531-534.
- Drenth, A., Janssen, E. M, and Govers, F. 1995. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under naturel conditions. *Plant pathology* 44: 86-94.

Drenth, A., Taq, I. C. Q., Govers, F. 1994. DNA Fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. European Journal of Plant Pathology 100: 97-107.

Drenth, A., Turkensteen, L. J. and Govers, F. 1993. The Occurrence of the A2 Mating Type of *Phytophthora infestans* in the Netherlands; Significance and consequences. Netherlands Journal of Plant Pathology 99: 57-67.

Duncan, J. M. 1985. Effect of temperature and others factors on *in-vitro* germination of *Phytophthora fragariae* oospores. Transactions of the British Mycological Society 85 : 455-462.

Duncan, J. M. 1985. Effect of temperature and other factors on *in vitro* germination of *Phytophthora fragariae* oospores. Transactions of the British Mycological Society 85 : 455-462.

Duncan, J. M., and Cowan, J. B. 1980. Effect of temperature and soil moisture content of persistence of infectivity of *Phytophthora fragariae* in naturally infested field soil. Transactions of the British Mycological Society 75 : 133-139.

Duvauchelle, S et Andrivon, D. 1996. Maladies à distribution géographiques mondiale : Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. In La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. et Croisnier J. C. ed. INRA et ITCF. France. 607p

Duvauchelle, S., Lherbier, V., Sarniguet, C., Lebreton, L. and Andrivon D. 1997. Evolution of phenylamide resistance in French populations of *Phytophthora infestans*, 1981-1996. ANPP- Cinquième Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes. Tours- 3-4-5 Décembre 1997, p: 471-478.

El Hamalawi, Z. A., and Erwin. D. C. 1986. Components in alfalfa root extract and root exudate that increase oospores germination of *Phytophthora megasperma* f. sp. *Medicaginis*. Phytopathology 76 : 508-513.

El Kharbotly, A., Leonards-Schippers, C., Huigen, D. J., Jacobsen, E., Pereira, A., Stiekema, W. J., Salamini, F., and Gebhardt, C. 1994. Segregation analysis and RFLP mapping of the R1 and R3 alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in progeny of dihaploid potato parents. Molecular and General Genetic 242 : 749-754.

El Kharbotly, A., Palomino-Sanchez, C., Salamini, F., Jacobsen, E., and Gebhardt, C. 1996. R6 and R7 alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary identified genetic loci clustering with the R3 locus on chromosome XI. Theoretical and Applied Genetics 92 : 880-884.

El Ismaili, A. 1994. Le Mildiou de la Pomme de Terre: Epidémiologie dans le périmètre de la base Moulouya et niveaux de sensibilité au metalaxyl. Mémoire de 3^{ème} cycle. ENA Meknès. 129 pp.

Elliot, C. G. 1983. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. (pp71-80). In : Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P. H.(eds); *Phytophthora*, Its Biology,

Taxonomy, Ecology and Pathology. American Phytopathology Society, St. Paul, MN. pp392.

Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN., 562pp.

Fabritius, A.-L., and Judelson, H. S. 1997. Mating type loci segregate aberrantly in *Phytophthora infestans* but normally in *Phytophthora parasitica* : Implications for models of mating type determination. *Current Genetics* 32 : 60-65.

Fairclough, R. W. 1995. An investigation of factors influencing the incidence of potato tuber blight caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. PhD Thesis, University of Glasgow, USA (abstract).

Fairclough, R. W., Bain, R. A. and Holmes, S. J. 1993. The effect of soil moisture content on the infection of daughter tubers by *Phytophthora infestans* and subsequent disease transmission. *Production Crop Protection in North Britain, 1993*, 325-330p

Fernandez-Pava, S. P., Grünwald, N. J. and Fry, W. E. 2002. Formation of *Phytophthora infestans* oospores in nature on tubers in central Mexico. *Plant Disease* 86: 73.

Fischer, W., Schweizer, P., Christ, U, Mozinger, E., Kovats, K, Baer, G., and Binder, A. 1988. Mechanisms in systemic induced resistance. *Phytoparasitica* 16: 211.

Flier, W. G., and Turkensteen, L. J. 1999. Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 105: 381-388.

Flier, W. G., Turkensteen, L. J., and Mulder, A. 1998. Variation in tubers pathogenicity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Potato Research* 41 : 345-354.

Fohner, G. R. Fry, W. E., and White, G. B. 1984. Computer simulation raises question about timing protectant fungicide application frequency according to potato late blight forecast. *Phytopathology* 74 : 1145-1147.

Forbes, G. A., Escobar, X. C., Ayala, C. C., Revelo, J., Ordonez, M. E., Fry, B. A., Doucett, K., and Fry, W. E. 1997. Populations genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* 87 : 375-380.

Foster, H. Ribeiro, O. K., and Erwin, D. C. 1983. Factors affecting oospores germination of *Phytophthora megasperma* f. sp. *Medicaginis*. *Phytopathology* 73 : 442-448.

Frinking, H. D., Davidse, L. C. and Limburg, H. 1987. oospores formation by *Phytophthora infestans* in host tissue after inoculation with isolates of opposite mating type found in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 93 : 147-149.

Fry, W. E. 1977. Integrated control of potato late blight- effects of polygenic resistance and techniques of timing forecast. *Phytopathology* 74 : 1145-1147.

Fry, W. E., Apple, A. E., and Bruhn, J. A. 1983. Evaluation of potato late blight forecasts modified to incorporate host resistance and fungicide weathering. *Phytopathology*, 73 : 1054-1059.

Fry, W. E., and Goodwin, S. D. 1997. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Disease* 81 : 1349-1357.

Fry, W. E., Goodwin, S. D., Matuszak, J. M., Spielman, L. J., and Milgroom, M. G. 1992. Population genetics and intercontinental migration of *Phytophthora infestans*. *Annual Review of Phytopathology* 30 : 107-129.

Fry, W. E., Goodwin, S. D., Drenth, A., Tooley, P. W., Sujowski, L. S., Koh, Y. L., Cohen, B. A., Spielman, L. J., Deahl, K., L., Inglis, D. A. and Sandlan, K. P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways and implications. *Plant Disease* 77 : 653-661.

Furuse, K., Takemoto, D., Doke, N. and Kawakita, K. 1999. Involvement of actin filament association in hypersensitive reaction in potato cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54 : 51-61 (Abstract).

Fyfe, A. M., and Shaw, D. S. 1992. An analysis of self-fertility in field isolates of *Phytophthora infestans*. *Mycological Research* 96 : 390-400.

Galindo, J., and Gallegly, M. E. 1960. The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 50 : 123-128.

Galindo, J., and Zentmyer, G. A., 1967. Genetical and cytological studies of *Phytophthora* strains pathogenic to pepper. *Phytopathology* 57 : 1300-1304.

Gallegly, M. E. 1970. Genetic of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 60 : 375-396.

Gallegly, M. E., and Galindo, J. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* 48 : 274-277.

Garrett, K. A., and Mundt, C. C. 2000. Host diversity can reduce potato late blight severity for local and general patterns of primary inoculum. *Phytopathology* 90 : 1307-1312.

Garrett, K. A., Nelson, R. J., Mundt, C. C., Chacon G., Jaramillo, R. E., and Forbes, G. A. 2001. the effects of host diversity and other management components on epidemics of potato late blight in the humid highland tropics. *Phytopathology* 91 : 993-1000.

Gavino, P. D., Smart, C. D., Sandrock, R. W., Miller, J. S., Hamm, P. B., Lee, T. Y., Davis, R. M. and Fry, W. E. 2000. Implication of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States : Generation of an aggressive lineage. *Phytopathology* 84 : 731-735.

Gees, R., and Hohl, H. R. 1988. Cytological comparison of specific (R3) and general resistance to late blight in potato leaf tissue. *Phytopathology* 78 : 350-357.

Goodwin, S. B., 1991. DNA polymorphism in *Phytophthora infestans* : The cornell experience. In *Phytophthora* Lucas, J. A., Shattock, R. C., Shaw, D. S. and Cooke, L. R. , Eds. Cambridge, cambridge University Press, 256-271.

Goodwin, S. B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87 : 462-473.

Goodwin, S. B., Cohen, B. A., Deahl, K. L., and Fry, W. E. 1993. Migration from northern Mexico as probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. *Phytopathology* 84 : 553-558.

Goodwin, S. B., Cohen, B. A., and Fry, W. E. 1994. Pantaglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 91 : 11591-11595.

Goodwin, S. B., Spielman, L. J., Matuszak, J. M., bergeron, S. N. and Fry, W. E. 1992a. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations on northern and Central Mexico. *Phytopathology* 82 : 955-961.

Goodwin, S. B., Drenth, A. and Fry, W. E. 1992b. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Current Genetic* 22 : 107-115.

Goodwin S. B., Ludwik, S., Sujkowski, L. S., and Fry, W. E. 1995a. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology*, 85 : 669-675.

Goodwin S. B., Shneider, R. E. and Fry, W. E. 1995b. Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 79 : 1181-1185.

Goodwin S. B., Sujkowski, L. S., Dyer, A. T., Fry, B. A., and Fry, W. E. 1995c. Direct detection of gene flow and global sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in the Northern North America. *Phytopathology* 85 : 473-479.

Goodwin S. B., Sujkowski, L. S., and Fry, W. E. 1996. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathology* 86 : 793-800.

Govers, C. T. and Ristaino, J. B. 2000. Commercial fungicide formulations induce in vitro oospore formation and phenotypic change in mating type in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 90 : 1201-1207.

Gray, F. A., Hine, R. B., Schonhorst, M. H., and Naik, J. D. 1973. A screening technique useful in selecting for resistance in alfalfa to *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology* 63 : 1185-1188.

Gregory, D. S. 1983. Some major epidemics caused by *Phytophthora*. In : Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P. H. (eds); *Phytophthora* , Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. American Phytopathology Society, St. Paul, MN. p. 9-40.

Grinberg, M., Kadish, D., and Cohen, Y. 1989. Occurrence of the A2 mating type and oospores of *Phytophthora infestans* in potato crops in Israel. *Phytoparasitica* 17 : 197-204.

Guzman, N. J. 1964. Nature of partial resistance of certain clones of three *Solanum* species to *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 54 : 1398-1404.

Hahlbrock, K., and Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40 : 347-369.

Hanson, K. and Shattock, R. C. 1998a. Effect of metalaxyl on formation and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 47 : 116-122.

Hanson, K. and Shattock, R. C. 1998b. Formation of oospores of *Phytophthora infestans* in cultivars of potato with different levels of race-nonspecific resistance. *Plant Pathology* 47 : 123-129.

Harris, D. C. 1979. The occurrence of *Phytophthora syringae* in fallen apple leaves. *Annals of Applied Biology* 91 : 309-312.

Harris, D. C., and Cole, D. M. 1982. Germination of *Phytophthora syringae* oospores. *Transactions of the British Mycological Society* 79 : 527-530.

Harrison, J. G. 1992. Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage. *Plant Pathology* 41 : 384-416.

Harrison, J. G. and Lowe, R. 1989. Effects of humidity and air speed on sporulation of *Phytophthora infestans* on potato leaves. *Plant Pathology* 38 : 585-591.

Henfling, J. W. 1987. Le mildiou de la pomme de terre. *Bulletin d'information technique*, C. I. P., Lima Pérou, p: 23-30.

Hermansen, A., Hannukkala, A., Hafskjold, N. R., and Brurberg, M. B. 2000. Variation in population of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway : mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. *Plant Pathology* 49 : 11-22.

Hilali, A. 1987. La pomme de terre : situation au Maroc et dans le monde. *Cours national sur la pomme de terre*. I. A. V. Hassan II. Agadir 3pp.

Hohl, H. R. 1983. Nutrition of *Phytophthora*. (pp41-54). In : Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P. H. (eds); *Phytophthora*, Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. American Phytopathology Society, St. Paul, MN. pp392.

Hohl, H. R. and Islin, K. 1984. Strains of *Phytophthora infestans* Switzerland's with A2 mating type behaviour. *Transactions of the British Mycological Society* 83 : 529-530.

Holmes, S. J. I., and Shannon, A. G. 1984. Studies on metalaxyl-resistance in potato crops in south-West Scotland. *Plant Pathology* 33: 516-519.

Hord, M. J., and Ristaino, J. B. 1991. Effects of physical and chemical factors on the germination of oospores of *Phytophthora capsici* *in vitro*. *Phytopathology* 81 : 1541-1546.

Hugenin, B., et Boccas, B. 1971. Rôle de quelques facteurs dans la formation et la germination des oospores chez *Phytophthora palmivora*. *Annals of Phytopathology* 3 : 353-371.

Hunter, J.E. and Kuminoto, R. K. 1974. Dispersal of *Phytophthora palmivora* sporangia by wind-blown rain. *Phytopathology* 64 : 202-206.

JaeHoon, A., YoungIl, H., and Kwanyong, H., 1998. Modeling for prediction of potato late blight (*Phytophthora infestans*) progress. *Korean Journal of Plant Pathology* 14 : 331-338.

Jeffrey, S. M., Dennis, A. J. and Hamm, P. B. 1998, Aggressiveness of isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. *Phytopathology* 88 : 190-197.

Jiang, J., and Erwin, D. C. 1993. The effects of nutrients on germination of cold-treated oospores of *Phytophthora cactorum* *in vitro*. *Mycological Research* 97 : 293-298.

Judelson, H. S., 1997, Expression and inheritance of sexual preference and selfing potential in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetic and Biologic* 21 : 188-187.

Judelson, H. S. 1996. Genetic and physical variability at the mating type locus of the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics* 144 : 1005-1013.

Judelson, H. S., Spielman, L. J., and Shattock, R. C., 1995. Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics* 141 : 503-512.

Judelson, H. S. and Roberts, S. 1999. Multiple loci determining insensitivity to phenylamide fungicide in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 89 : 754-759.

Judelson, H. S. and Yang, G. 1998. Recombination pathways in *Phytophthora infestans* : polyploidy resulting from aberrant sexual development and zoospore-mediated heterokaryosis. *Mycology Research* 102 : 1245-1253.

Ishiguro, K., and Ui, T. 1981. Factors influencing the germination of oospores of *Phytophthora vignae* Purss. *Annual Phytopathological Society of Japan* 47 : 213-217 (abstract).

Kable, P.E., and Mackenzie, D. R. 1980. Survival of *Phytophthora infestans* in potato stem lesions at high temperatures and implications of disease forecasting. *Plant Disease* 64 : 165-167.

Kadish, D. And Cohen, Y. 1988. Estimation of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 78 : 915-919.

Kadish, D., and Cohen, Y. 1992. Overseasoning of metalaxyl-resistant and metalaxyl-sensitive isolates of *Phytophthora infestans* in potato tubers. *Phytopathology* 82 : 887-889.

Kadish, D., Grinberger, M., and Cohen, Y. 1990. Fitness of Metalaxyl-Sensitive and Metalaxyl-Resistant Isolates of *Phytophthora infestans* on Susceptible and Resistant Potato Cultivars. *Phytopathology* 80 : 200-205.

Kamoun, S., West, P. V., Jong, A. J. D., Groot, K. E. D., Vleeshouwers, V. G. A. A. and Govers, F. 1997. A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 10 : 13-20 (Abstract).

Kaosiri, T., Zentmyer, G. A., and Erwin, D. C. 1980. oospore morphology and germination in the *Phytophthora palmivora* complex from cacao. *Mycologia* 75 : 888-907.

Kiru, S. D. and Vavilov. 2002. Sources of horizontal resistance to late blight from solanum andeginea accessions. In Global Initiative on Late Blight, Newsletter May 2002, 1-8pp.

Ko, W. H. 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* 26 : 57-73.

Ko, W. H., and Arakawa, D. K. 1980. Oospore germination of *Phytophthora katsurae*. *Transactions Mycological Society of Japan* 21 :215-219 (Abstract).

Ko, W. H., Lee, C. J., and Su, H. J. 1986. Chemical regulation of mating type in *Phytophthora parasitica*. *Mycologia* 78 : 134-136.

Koh, Y., J., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Cohen, Y., Ogoshi, A., Sato, N., and Fry, W. E. 1994. Migration and displacement of *Phytophthora infestans* populations in east Asian countries. *Phytopathology* 84 : 922-927.

Kolobaev, V. A., Rogozina, E. V. and Vavilov, N. I. 2002. In Global Initiative on Late Blight, Newsletter May 2002, 1-8pp.

Krombrink, E., Schroder, M., and Hahbrock, K. 1989. Several "pathogenesis-related" proteins in potato are 1, 3- glucanases and chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85 : 782-789

Krause, R. A. Massie, L. B., and Hyre, R. A., 1975. Blightcast, a computerised forecast of potato late blight. *Plant Disease* 59 : 95-98.

Lacey, J. 1965. The infectivity of soils containing *Phytophthora infestans*. *Annals of Applied Biology* 59 : 363-380.

- Laftah, M., 1997. Situation phytosanitaire de la pomme de terre dans le Saïs durant la campagne agricole 1996-1997. Mémoire de 3^{ème} cycle, phytiairie, E.N.A. Meknès. 121pp.
- Laing, C, 1998. Le mildiou de la pomme de terre. Bulletin d'information de la Division de la Gestion des Demandes d'Homologation et de l'Information, Agence de Réglementation de la Lutte Parasitaire, Canada, juin 1996.
- Lapwood, D.H. 1977. Factors influencing the field infection of potato tubers of different cultivars by blight (*Phytophthora infestans*). Annals of Applied Biology 85 : 23-45.
- Lebreton, L. and Andrivon, D. 1998. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. European Journal of Plant Pathology 104 : 583-594.
- Lebreton, L, Duvauchelle, S., and Andrivon, D. 1996. Occurrence in France and Belgium of A2 mating type isolates of *Phytophthora infestans* in 1995. pp 262-263. In Abstracts of conference papers, 13th Triennial Conference, European Association of Potato Research Veldhoven, The Netherlands.
- Lebreton, L., Lucas, J. M and Andrivon, D. 1999. Aggressiveness and Competitive Fitness of *Phytophthora infestans* Isolates Collected from Potato and Tomato in France. Phytopathology 89 : 679-686.
- Legard, D. E., Lee, Y. T. and Fry, W. E. 1995. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans* : Aggressiveness on tomato. Phytopathology 85 : 1356-1361.
- Leonard-Schippers, C., Gieffers, W., Salamini, F., and Gebhardt, C. 1992. The R1 gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V. Molecular and General Genetics 233 : 278-283.
- Levy, Y., Levi, R., and Cohen, Y.. 1993. Buildup of a pathogen sub-population resistant to systemic fungicide under various control strategies : a flexible simulation model. Phytopathology 67 : 675-677.
- Li, X., Van Eck, H. J. Rouppe, Van der Voort, J. N. M., Huigen, D. J., Stam, P., and Jacobsen, E. 1998. Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers : the R2 allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. Theoretical of Applied Genetic 96 : 1121-1128.
- Long, M., and Keen, N. T. 1977. Genetic evidence for diploidy in *Phytophthora megasperma* var. *Sojae*. Phytopathology 67 : 675-677.
- Madden, L. V., Ellis, M. A., Gove, G. G., Reynolds, K. M., and Wilson, L. L. 1991. Epidemiology and control of leather rot of strawberries. Plant Disease 75 : 439-446.
- Malajczuk, N, 1983. Microbial antagonism to *Phytophthora*. pp197-218. In Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P. H.(eds); *Phytophthora*, Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. American Phytopathology Society, St. Paul, MN. pp392.

Malcolmson, J. F. 1969. Factors involving in resistance to blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) in potato and assessment of resistance using detached leaves. *Annals of Applied Biology* 64 : 461- 468.

Matuszak, J. M., and Fernandez, E. W. —K. Gu, Villareal, G. M., and Fry, W. E. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico : distribution and dynamics. *Plant Disease* 78 : 911-916.

Mayton, H. Smart, C. D., Moravec, B. C., Mizubuti, E. S. G., Muldoon, A. E. and Fry, W. E. 2000. Oospore survival and pathogenicity of single oospore recombinant progeny from a cross involving US-17 and US-8 genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 84 : 1190-1196.

McLeod, A., Denman, S., Sadie, A., and Denner, F. D. N. 2001. Characterization of South African isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 85 : 287-291.

Medina, M. V. and Platt (Bud), H. W. 1999a. Comparison of different culture media on the mycelial growth, sporangia and oospore production of *Phytophthora infestans*. *American Journal of Potato Research* 76 : 121-125.

Medina, M. V. and Platt (Bud), H. W. 1999b. Viability of oospores of *Phytophthora infestans* under field conditions in northeastern North America. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21 : 137-143.

Medina, M. V., Platt (Bud), H. W. and Peters, R. D. 1999. Severity of late late blight tuber infection caused by US-1 and US-8 genotypes of *Phytophthora infestans* in 12 potato cultivars. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21 : 388-390.

Milgroom, M. G., and Fry, W. E. 1988. A simulation analysis of the epidemiology principles for fungicide resistance management in pathogen populations. *Phytopathology* 78 : 565-570.

Miller, J. S., Hamm, P. B., and Johnson, D. A. 1997. Characterization of *Phytophthora infestans* population in the Columbia basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995. *Phytopathology* 87 : 656-660.

Moon, R. P., Unkles, S. E., Duncan, J. M., Hawkins, A. R. and Kinghorn, J. R. 1992. Sequence of the *Phytophthora infestans* glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase-encoding gene. *Plant Molecular Biology* 18 : 1209-1211.

Moreau, R. A., Young, D. H., Danis, P. O., Powell, M. J., Quinn, C.J., Beshah, K., Slawek, R. A., and Dilliplane, R. L. 1998. Identification of ceramide-phosphorylethanolamine in oomycete plant pathogens : *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans* and *Phytophthora capsici*. *Lipids* 33 : 307-317.

Mortimer, A. M., Shaw, D. S., and Sansome, E. R., 1977. Genetical studies of secondary homothallicism in *Phytophthora drehsleri*. *Archives of Microbiology* 11 : 255-359

- Mosa, A. A., Tsao, M., Sato, N., Kobayashi, K., and Oghoshi, A. 1989. Occurrence of A2 mating type of *Phytophthora infestans* on potato in Japan. Annals of the phytopathological Society of Japan 55 : 615-620.
- Mukalazi, J. Adipala, E., Sengooba, T., Hakiza, J. J., Olanya, M., and Kidanemariam. 2001. Metalaxyl resistance, mating type and pathogenicity of *Phytophthora infestans* in Uganda. Crop Protection 20 : 379-388.
- Niederhauser, J. S. 1991. *Phytophthora infestans* : the Mexican connection. In : Lucas, J. A., Shattock, R. C., Shaw, D. S., Cook, L. R., eds. *Phytophthora*, pp 25-45, Cambridge University Press, Cambridge, U. K.
- Oyarzun, P. J., Ordonez, M. E., and Forbes, G. A. 1998. First report of *Phytophthora infestans* A2 mating type in Ecuador. Plant Disease 81 : 311.
- Oyarzun, P. J., Pozo, A., Ordonez, M. E., Doucett, K. and Forbes, G. A. 1998. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. Phytopathology 88 : 265-271.
- Paitier, G. 1980. Le mildiou de la pomme de terre. Phytoma, Avril 1980, p: 23-27.
- Paquin, B. , Laforest, M. J., Forget, L., Roewer, I, Wang, Z., Longcore, J., and Lang, B. F. 1997. The fungal mitochondrial project : evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. Current Genetic 31 :380-395
- Pappas, A. C. 1985. Metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans* on greenhouse tomatoes in Greece. Plant Pathology 34 : 293-296.
- Pathak, N., and Clarke, D. D. 1987. Studies on the resistance of the outer cortical tissues of the tubers of some potato cultivars to *Phytophthora infestans*. Physiological and Molecular of Plant Pathology 31 : 57-73.
- Peirce, L. C. 1971. Linkage test Ph conditioning resistance to race O of *Phytophthora infestans*. Rep. Tomato Genetic Coop. 21 : 30.
- Perez, W. G., Gomboa, J. S., Falcon, Y. V., Coca, M., Raymundo, R. M., and Nelson, R. J. 2001. Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 91 : 956-965.
- Peters. R. D. and Platt (Bud), H. W. 1998. Characterization of changes in populations of *Phytophthora infestans* in Canada using mating type and metalaxyl sensitivity markers. Canadian Journal of Plant Pathology 20 : 259-273.
- Peters. R. D., Platt (Bud), H. W. and Hall, R. 1998. Long-term survival of *Phytophthora infestans* in liquid media prepared from autoclaved seeds. Canadian Journal of Plant Pathology 20 : 165-170.
- Pieterse, C. M. J., Dewit, P. J. G. M., and Govers, F. P. M. 1992. Molecular aspects of the potato - *Phytophthora infestans* interaction. Netherlands Journal of Plant Pathology 98 : 85-92.

Pieterse, C. M. J., Derksen, A. -M. C. E., Folders, J. and Govers, F. 1994a. Expression of putative pathogenicity genes ipiB and ipiO of *Phytophthora infestans* in planta and in vitro. Molecular Gen Genetic 244 : 269-277.

Pieterse, C. M. J., Riach, M. B. R., Bleker, T., van der Berg-Velthuis, G. C. M. and Govers, F. 1993b. Isolation of putative pathogenicity genes of potato late blight fungus *Phytophthora infestans* by differential hybridization of genomic library. Physiological and Molecular Plant Pathology 43 : 69-79.

Pieterse, C. M. J., Risseuw, E. P. and Davidse, L. C. 1991. An in planta induced gene of *Phytophthora infestans* codes for ubiquitin. Plant Molecular Biology. 17 : 799-811.

Pieterse, C. M. J., van West, P., Verbakel, H. M., Brassé, P. W. H. M., van der Berg-Velthuis, G. C. M. and Govers, F. 1994b. Structure and genomic organisation of ipiB and ipiO gene clusters of *Phytophthora infestans*. Gene 138 : 67-77.

Pieterse, C. M. J., Verbakel, H. M., Hoek Spaans, J., Davidse, L. C. and Govers, F. 1993d. Increased expression of the calmodulin gene of the late blight fungus *Phytophthora infestans* during pathogenesis on potato. Molecular Plant-Microbe Interactions 6 : 164-172.

Pittis, J. E., and Shattock, R. C. 1994. Viability, Germination and infection potential of oospores of *Phytophthora infestans*. Plant Pathology 43 : 387-396.

Platt, H. N. 1999. Response of solanaceous cultivated plants and weed species to inoculation with A1 and A2 mating type strains of *Phytophthora infestans*. Canadian Journal of Plant Pathology 21 : 301-307

Platt, H. W., Peters, R. D., Medina, M., and Arsenault, W. 1999. Impact of seed potatoes infected with *Phytophthora infestans* (US-1 or US-8 genotypes) on crop growth and disease risk. American Journal of Potato Research 75 : 67-73.

Platt, H. W. and Tai, G. 1998. Relationship between resistance to late blight in potato foliage and tubers of cultivars and breeding selections with different resistance levels. American Journal of Potato Research 75 : 173-177.

Plourde, D. F. and Green, R. J. Jr. 1982. Effect of monochromatic light on germination of oospores and formation of sporangia of *Phytophthora citricola*. Phytopathology 72 : 58-61.

Polach, F. J. And Webster, R. K. 1972. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capsici*. Phytopathology 62 : 20-26.

Pristou, R., and Gallegly, M. E. 1954. Leaf penetration by *Phytophthora infestans*. Phytopathology 44 : 81-86.

Reuveni, M, Eyal, H., and Cohen, Y. 1980. Development of resistance to metalaxyl in *Pseudoperonospora cubensis*. Plant Disease 64 : 1108-1109.

Ribeiro, O. K. 1983. Physiology of asexual sporulation and spore germination (pp55-77). In : Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P. H. (eds); *Phytophthora*, Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. American Phytopathology Society, St. Paul, MN. p:55-70.

Ribeiro, O. K., Erwin, D. C., and Zentmyer, G. A. 1975. An improved synthetic medium for oospore production and germination of several *Phytophthora* species. *Mycologia* 67 : 1012-1019.

Romero, S. and Erwin, D. C. 1969. Variation in pathogenicity among single-oospores cultures of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 59 : 1310-1317.

Romero, S., and Gallegly, M. E. 1963. Oogonium germination in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 53 : 899-903.

Rotem, J. and Cohen, Y. 1974. Epidemiological patterns of *Phytophthora infestans* under semi-arid conditions. *Phytopathology* 64 : 711-714.

Sato, N. 1979. Effect of soil temperature on the field infection of potato tubers by *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 69 : 989-993.

Satur, M. M., and Butler, E. E. 1968. Comparative morphological and physiological studies of the progenies from intraspecific matings of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 58 :183-192.

Savage, E. J., Clayton, C. W., Hunter, J. H., Brenneman, J. A., Laviola, C., and Gallegly, M. E. 1968. Homothallism, heterothallism, and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology* 58 : 1004-1021.

Schmittthener, A. F. And Canaday, C. H. 1983. Role of the Chemical factor in development of *Phytophthora* diseases. (pp189-196). In : Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P. H.(eds); *Phytophthora*, Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. American Phytopathology Society, St. Paul, MN.

Schöber, B., and Turkensteen, L. J. 1992. Recent and future developments in potato fungal pathology. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98 : 73-83.

Schwinn, F. J., and Margot, P. 1991. Control with chemicals. *Advances in Plant Pathology. Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potatoes. Ed Ingran and Williams. Academic Press, London. 255pp.

Serrhini, M. N. 1986. La résistance de *Phytophthora citriphthora* (Sm & Sm) Leon au metalaxyl. Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles. Université Catholique de Louvain. Belgique. 150pp.

Sediqui M., Carroll, R. B. and Morehart, A. L. 1997. First report from Morocco of *Phytophthora infestans* isolates with metalaxyl resistance. *Plant Disease*. 81 : 831.

Sediqui M., Carroll, R. B. and Morehart, A. L., Evans, T. A., Kim, S. H. Lakhdar, R., and Arifi, A. 2000. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population in Morocco. Plant Disease 84 : 173-176

Sekhon, P. S. and Sokhi, S. S. 1998. Identity of mating types of *Phytophthora infestans* in cultures from potato and tomato. Indian Phytopathology 51 : 237-239 (Abstract).

Shattock, R. C., Shaw, D. S., Fyfe, A. M., Dunn, J. R., Loney, K. H., and Shattock, J. A. 1990. Phenotypes of *Phytophthora infestans* collected from England and Wales from 1985 to 1988 : mating type, response to metalaxyl and isoenzyme analysis. Plant Pathology 39 : 242-248.

Shattock, R. C., Tooley, P. W. and Fry, W. E. 1986. Genetics of *Phytophthora infestans*: Characterization of single-oospore cultures from A1 isolates induced to self intraspecific simulation. Phytopathology 76 : 407-413.

Shaw, D. S. 1991. Genetics of *Phytophthora infestans*. Advances in Plant Pathology 7 : 131-167.

Shaw, D. S. 1987. The breeding system of *Phytophthora infestans* : the role of the A2 mating type. In Genetics and Plant Pathogenesis. Day, P. R., and Jellis, G. J. Eds, Boston, Blackwell Scientific Publications, 161-174.

Shaw, D. S. 1983. The cytogenetics and genetics of *Phytophthora* (pp 81-94). In: Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P. H.(eds); *Phytophthora*, Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. American Phytopathology Society, St. Paul, MN. pp392.

Shaw, D. S. 1996. Genetic analysis on the oomycetous fungus *Phytophthora infestans*. in : Fungal Genetics : Principles and Practice (Cees J. B. Edition) 1996, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

Shaw, D. S., Fyfe, A. M. and Hibberd, P. G. 1985. Occurrence of the race A2 mating type of *Phytophthora infestans* on imported Egyptian potatoes and the production of sexual progeny with A1 mating types from the UK. Plant Pathology 34 : 552-556.

Shen, C. Y., Bower, L. A., Erwin, D. C. D Tsao, P. H. 1983. Formation of sex organs in the A1 mating type of *Phytophthora infestans* induced chemically by A2 isolates of others species of *Phytophthora*. Canadian Journal of Botanic 61 : 1462-1466.

Shrestha, S.K., Shrestha, K., Kobayshi, K., Kondo, N., Sato, K. and Oghoshi, A. 1998. First report of A1 and A2 mating types of *Phytophthora infestans* on potato and tomato in Nepal. Plant Disease 82 : 1064.

Shtienberg, D., Doster, M. A., Pelletier, J. R., and Fry, W. E. 1989. Use of simulation models to develop a low risk strategy to suppress Early and Late blight in potato foliage. Phytopathology 79 : 590-595.

Shtienberg, D., and Fry, W. E. 1990. Field and computer simulation evaluation of spray-scheduling methods for control of early and late blight of potato. Phytopathology 80 : 772-777.

Skidmore, D. I., Shattock, R. C. and Shaw, D. S. 1984. Oospores in culture of *Phytophthora infestans* resulting from induced by the presence of *P. Drechsleri* isolated from blighted potato foliage. Plant Pathology 33 : 173-183.

Smart, C. D., Mayton, H., Mizubuti, E. S. G., Willmann, M. R. and Fry, W. E. 2000. Environmental and genetic factors influencing self-fertility in *Phytophthora infestans*. Phytopathology 90 : 987-994.

Smart, C. D., Willmann, M. R., Mayton, H., Mizuruti, E. S. G., Sandrock, R. W., Muldoon, A. E. and Fry, W. E. 1998. Self-fertility in the two clonal lineages of *Phytophthora infestans*. Fungal Genetic and Biology 25 : 134-142.

Smoot, J. J., Gough, F. J., Lamey, H. A., Eichenmuller, J. J. and Gallegly, M. E. 1958. Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 48 : 165-171.

Sozzi, D. And Staub, T. 1987. Accuracy of methods to monitor sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenylamide fungicides. Plant Disease 71 : 422-425.

Spielman, L. J. 1991. Isozymes and the population genetics of *Phytophthora infestans*. In: Lucas, J. A., Shattock, R. C., Shaw, D. S. and Cooke, L. R. (Eds) , *Phytophthora*. Cambridge University Press, Cambridge, British Mycological Society pp: 231-241.

Spielman, L. J., Drenth, A., Davidse, L.C., Sujowski, L. S., Gu, W. K., Tooley, P. W. and Fry, W. E. 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? Plant Pathology 40 :422-430

Spielman, L. M., MacMaster, B. J., and Fry, W. E. 1989. Dominance and recessiveness at loci for virulence against potato and tomato in *Phytophthora infestans*. Theoretical and Applied Genetics 77 : 832-838.

Stasz, T. E. and Martin, S. P. 1988. Insensitivity of thick-walled oospores of *Pythium ultimum* to fungicides, methyl bromide and heat. Phytopathology 78 : 1094-1100.

Staub, T., Dahmen, H., and Shwinn, F. 1980. Effects of ridomil on the developpement of *Plasmopara viticola* and *Phytophthora infestans* on their host plants. Journal of Plant Disease and Protection 87 : 83-91.

Stephensen, L. W., Erwin, D. C. and Levy, J. V. 1974. Hyphal anastomosis in *Phytophthora capsici*. Phytopathology 76 : 410-413.

Stewart, H. E. 1990. Effect of plant age and inoculum concentration on the expression of the major gene resistance to *Phytophthora infestans* in detached potato leaflets. Mycological Research 94 : 823-826.

Stewart, H. E., Bradshaw, J. E., and Wastie, R. L. 1994. Correlation between resistance to late blight in foliage and tubers in potato clones from parents of contrasting resistance. Potato Research 37: 429-434.

Stewart, H. E., McCalmont, D. C., and Wastie, R. L. 1983. The effect of harvest date and the interval between harvest and inoculation on the assessment of the resistance of potato tubers to late blight. *Potato Research* 26 : 101-107.

Stewart, H. E., Wastie, R. L., Bradshaw, J. E. 1996. Susceptibility of *Phytophthora infestans* of fields and greenhouse-grown potato tubers. *Potato Research* 39 : 283-288.

Stewart, H. E., Wastie, R. L. and Bradshaw, J. E. 1993. The effect of soil moisture level of potting compost on the susceptibility of glasshouse-grown tubers to late blight. *Potato Research* 36 : 29-33.

Stewart, H. E., Wastie, R. L., Bradshaw, J. E. and Brown, J. 1992. Inheritance of resistance to late blight in foliage and tubers of progenies from parents differing in resistance. *Potato Research* 35 : 313-319.

Stiki, A. 1983. Recherches sur le mildiou à *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Mémoire de 3ème cycle, IAV Hassan II, Rabat. 70pp.

Strömberg, A. Person, L., and Wikström, M. 1999. Infection of potatoes by oospores of *Phytophthora infestans* in soil. *Plant Disease* 83 : 876.

Sujowski, L. S., Goodwin, S. B., Dyer, A. T. and Fry, W. E. 1994. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology* 84: 201-207.

Swiezynski, K. M., Domanski, L., Flis, B., Osiecka, M., and Sieczka, M. T. 1997. Resistance to *Phytophthora infestans* in diploid and tetraploid potato families : Correlation between Characters. *Journal of Applied Genetics* 38 : 161-171.

Swiezynski, K. M., Chrazanowska, M., Domanski, L., and Zimonoch-Guzowska, E. 2001. Comparison of resistance evaluation in potato variety assessment. *Potato Research* 44 : 25-31.

Swiezynski, K. M., Sieczka, M. T., Sujowski, L. S., Zarzycka, H., and Zimonoch-Guzowska, E. 1991. Resistance to potato genotypes originating from wild species. *Plant Breeding* 107 : 28-38.

Swiezynski, K. M. and Zimonoch-Guzowska, E. 2001. Breeding potato cultivars with tubers resistant to *Phytophthora infestans*. *Potato Research* 44 : 97-117.

Takase, N. 1968. Studies in breeding potatoes for resistance to *Phytophthora infestans* with special reference to laboratory assessment of resistance. Hokaido National Agricultural Experiment Station Report 71, 118pp.

Tantius, P. H., Fyfe, A. M., Shaw, D. S., and Shattock, R. C. 1986. Occurrence of A2 mating type and self fertile isolates of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *Plant Pathology* 35 : 578-581.

Terrence, . Late Blight : A hundred and fifty years ago a fungus dramatically changed history. 1997. College of Agriculture and Home Economics Publications. August, 1997.

Tooley, P. W., Fry, W. E., and Villarreal G. M. J. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. Journal of Heredity 76 : 431-435.

Tooley, P. W., Sweigard, J. A. and Fry, W. E. 1986. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual population. Phytopathology 76 : 1029-1212.

Tooley, P. W., Thierrien, C. D., and Ritch, D. L. 1989. Mating type, race composition, nuclear DNA content, and isozyme analysis of Peruvian isolates of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 79 : 478-481.

Toxopus, H. J. Studies on the resistance of tuber-bearing Solanaceae from Mexico to *Phytophthora infestans*. Euphytica 9 : 39-56.

Thurston, H. D. 1971. Relationship of general resistance to late blight of potato. Phytopathology 75 : 982-988.

Thurston, H. D., Schlitz, O. 1981. Late blight in compendium of potato disease. Hooker Eds. APS Press Michigan (USA). pp 40-42.

Turkensteen, L. J. 1993. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. In Jacobs, Th., and Parlevliet (eds), Durability of Disease Resistance, pp: 115-124.

Unkles, S. E., Moon, R. P., Hawkins, A. R. Duncan, J. M. And Kinghorn, J. R. 1991. Actin in the oomycetous fungus *Phytophthora infestans* is the product of several genes. Gene 100 : 105-112.

Van Oigen, M. 1991. Identification of the major characteristics of potato cultivars which affect yield loss caused by late blight. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University. pp116

Vartanian, V. G., and Endo, R. N. 1985. Overwintering hosts, compatibility types, and races of *Phytophthora infestans* on tomato in Southern California. Plant Disease 69 : 516-519.

Walker, A. S. L., and Cooke, L. R. 1990. The survival of *Phytophthora infestans* in potato tubers - The influence of phenylamide resistance. Pests Diseases 3 : 1109-1116.

Walmsley-Woodward, D. J., and Lewis, B. G.. 1977. Laboratory studies of potato tubers resistance to infection by *Phytophthora infestans*. Annual of Applied Biology 85 : 43-49.

Warren, R.C., King, J. E., and Colhoon, J. 1971. Reactions of potato leaves to infection by *Phytophthora infestans* in relation to position of the plant. Transactions of the British Mycological Society 57: 501-514.

Waterhouse, M. G. 1963. Key of the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological papers N° 92. Commonwealth Mycological Institute.

Watsie, R. L. 1991. Breeding for resistance. In Ingram, D. S. & Williams, P. H. eds. *Advances in Plant Pathology* Vol. 7. London : Academic Press, 193-224.

Weste, G . 1983. Population dynamics and survival of *Phytophthora* (pp 237-257). In : Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P. H.(eds); *Phytophthora*, Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. American Phytopathology Society, St. Paul, MN.

Whittaker, S. L., Shattock, R. C., and Shaw, D. S. 1991. Inheritance of DNA contents in sexual progenies of *Phytophthora infestans*. *Mycology Research* 95 : 1094-1100.

Zan, K. 1962. Activity of *Phytophthora infestans* in soil in relation to tuber infection. *Transactions of the British Mycological Society* 45 : 205-208.

Zwankhuijzen, M. J. 1998. Potato late blight epidemics and population structure of *Phytophthora infestans*. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Netherlands. 147 pp.

ANNEXES

Les caractéristiques techniques du métalaxyl sont :

- Nom commercial : Apron 35
- Matière active : Métalaxyl
- Formule chimique : $C_{15}H_{21}N_4O_4$ ou D, L-N (2, 6-diméthyl phényl) – N – (2' methoxy acétyl) alalinate de méthyl.
- Famille chimique : Phenylalamide ou Acylalanine
- Teneur en matière active : 35%
- Forme : Cristaux blancs à beiges.
- DL_{50} : 669 mg / kg
- DJA : 0.03 mg / kg
- Caractéristiques : Soluble dans la plupart des solvants organiques, stable en condition neutre et acide.
- Solubilité dans l'eau : 7100 mg / l à 20°C.

Tableau A : DE₅₀, CI₁₀₀ (relevés in-vitro et in-vivo), la croissance mycélienne (CM) et la capacité de sporulation (SPT) in-vitro des isolats collectés.

Isolat	DE ₅₀ et CI ₁₀₀ <i>in-vitro</i>		DE ₅₀ et CI ₁₀₀ <i>in-vivo</i>		CM (mm) SPT (x10 ⁴ spores/ml)	
	DE ₅₀	CI ₁₀₀	DE ₅₀	CI ₁₀₀		
I1S67	0,6	1	1,5	10	26,75	0,625
I2S68	1,8	10	0,9	10	22,25	0,15625
I3S67	0,5	1	0,7	1	30,5	0,15625
I4S67	1,2	10	0,7	10	27,75	0,625
I5S67	1,5	10	0,5	1	25,5	0,3125
I6S67	1,6	10	0,5	1	31,25	1,875
I7S67	0,5	10	0,8	10	34,25	0,625
S2F1	25	>100	3,5	100	42,25	5
S2F5	60	>100	40	>100	51,5	8,75
S2F6	27	100	8	100	45,5	6,25
S2T9	70	>100	>100	>100	75,25	20,625
S2F14	3,5	100	1,5	100	33,25	4,375
S2F18	>100	>100	75	>100	73,5	13,75
S2F19	12	100	25	>100	53,75	10
S2F20	3,2	100	5	100	43,5	3,75
S2F22	16	>100	15	100	50,75	9,375
S2F25	75	>100	18	>100	41,25	2,03125
S3F12	25	>100	2,9	100	47,75	5
S3F21	14,5	100	12	100	35,5	8,125
S3F25	65	>100	60	>100	66,25	20
S3F28	18,5	>100	4,5	100	38,25	3,75
S3F31	45	>100	6,5	100	42	3,75
S3F39	12,5	>100	3,2	100	28	1,875
S3T40	>100	>100	75	>100	72	19,375
P5F4	35	>100	3	100	48	2,5
P6F4	45	>100	13	100	52,25	4,375
P6F11	30	>100	16	100	56,75	7,5
P6F12	60	>100	33	>100	54,25	6,25
P6F14	75	>100	20	>100	57,25	8,125
P6F15	80	>100	28	>100	60,25	12,5
P6F16	75	>100	14	>100	62,75	10,625
P6F17	>100	>100	12	100	53,25	6,875
P7F2	0,9	10	1	10	42,75	0,625
P7F3	>100	>100	>100	>100	70,25	13,75
P10F1	>100	>100	75	>100	75,75	16,875
P10F2	25	>100	3,5	100	48	3,125
P10F3	>100	>100	>100	>100	53,5	15
P10F4	10	>100	20	>100	47,75	11,25
P10F5	2,5	100	2	10	36,25	4,0625
P10F6	3	100	2,5	100	40,75	2,03125
P10F10	>100	>100	>100	>100	77,25	21,875
S1F27	3	100	4,2	10	46,75	5
S1F35	12,5	>100	18	100	53,5	6,875
FO1	2,3	10	1,5	100	33,25	5
FO2	3	100	1,5	100	29,25	2,5

FO3	0,8	10	1	100	34,25	2,96875
FO4	3,5	100	2,9	>100	36	5,3125
FO5	25	>100	12,5	>100	41,25	6,25
F10	4	100	0,9	10	24	1,875
F13	3,5	>100	2	100	29	3,125
F38	5	>100	0,7	10	23,5	1,40625
F42	15	>100	3,2	>100	25	1,25
F45	4,5	100	1	100	28,75	1,09375
F48	30	>100	1	100	23,5	6,25
F50	35	>100	0,5	10	25,5	1,25
F52	4,5	>100	0,6	10	24,25	3,75
F54	40	>100	32	>100	27,75	0,9375
F55	1,4	100	0,7	10	55,75	3,125
F58	0,9	10	2,5	>100	50,5	4,375
F59	2,9	100	2	>100	41,25	1,875
F60	3,2	100	1	100	35,75	0,9375
F61	4,7	>100	1	100	45,75	1,5625
F62	19	>100	3,5	>100	51,5	4,375
F63	3,6	100	2	>100	31,5	1,5625
F70	0,8	10	1,5	100	45,5	3,125
F73	1	100	1,5	100	23,5	2,5
F75	28	>100	4,2	>100	43	8,125
F77	0,8	10	2	100	35,25	1,25
F78	2,3	100	2	>100	34,25	5
F80	4,2	100	0,6	10	32,75	0,9375
F82	3,7	100	3	>100	39,25	2,5
F83	4,5	>100	2,5	>100	35,75	6,875
F85	38	>100	19	>100	41,25	3,75
F90	>100	>100	>100	>100	59,5	12,5
F91	45	>100	28	>100	61,25	7,75
F93	4,5	>100	0,9	100	34,75	11,875
F94	3,5	>100	0,7	100	27,75	6,875
F96	65	>100	13	>100	27,75	2,96875
F97	>100	>100	15	>100	38,75	11,25
F98	5	>100	0,5	10	35	1,71875
F108	>100	>100	>100	>100	67,5	18,75
F109	45	>100	25	>100	25,5	1,40625
F110	32	>100	14	>100	41,25	3,75
A12	1,5	100	1	100	31,25	2,96875
A13	2,8	>100	2,5	100	35,75	8,75
A14	25	>100	3,3	>100	24,25	3,125
A20	30	>100	15,5	>100	23,75	2,5
M4	0,7	100	2,5	>100	24,75	3,75
M7	0,9	100	0,9	100	23,5	4,375
M15	1	>100	1,7	100	23,5	0,78125
M18	12	>100	4	>100	36,75	7,5
SP1	13,5	>100	19,5	>100	41,25	5,625
SP4	2,2	>100	0,7	>100	23,75	0,9375
SP10	1,5	>100	2	100	34,25	1,40625
SP11	1	>100	0,6	10	47,25	3,75
SP16	0,8	100	1,5	100	27,75	0,3125
SP20	4,2	>100	2	100	23,5	0,9375
SP31	3,5	>100	0,9	10	43,75	8,75
SP33	0,6	10	2,5	>100	38,75	1,71875

Tableau B : Germination directe et indirecte des isolats collectés.

Isolat	Germination directe (%)				Germination indirecte (x10 ⁴ zoopsores/ml) après			
	après : 4h	8h	12h	24h	: 1h	2h	3h	4h
I1S67	1,8	5,6	13,4	25,6	0,125	1	3,5	4
I2S68	1,8	7	12,2	31,2	0,25	0,375	2,875	3,125
I3S67	2,2	4,4	10	29,2	0	0,625	3,125	3,5
I4S67	1,2	8,2	14,8	27,6	0,5	0,75	3	3,25
I5S67	1,8	8,6	17,2	23	0,25	0,75	3,25	3,775
I6S67	3	5,6	10,4	26	1,5	2	4,5	5,5
I7S67	2,2	8,2	10,6	23,4	0,5	0,75	3,25	3,5
S2F1	3,8	10,8	21,2	32,6	2,5	5	7,5	8
S2F5	12	30,2	35,4	52,4	6,5	9	11,5	11,75
S2F6	4	12,6	22,2	36,6	3	5,5	8	8,5
S2T9	7	23,8	38	57,6	16	18,5	21	21,5
S2F14	2,8	8,2	16,8	39,2	2,5	5	7,5	7,75
S2F18	7,4	20,4	33,2	63,4	11	12,5	16,5	17
S2F19	5,4	16,6	28,6	47,2	7	9,5	12	12,5
S2F20	4,2	17,4	30	46	1,5	4	6,5	6,75
S2F22	5,6	13,6	26,4	43,2	6,5	9	11,5	12
S2F25	4	16	28,4	55,2	0,125	2,125	4,625	5,125
S3F12	6,4	21,4	31,6	48,2	2,5	5	7,5	8
S3F21	4,2	20,8	37	57,6	5	7,5	10	10,5
S3F25	8,4	20,2	31,6	54,4	12,5	15	17,5	18
S3F28	6,8	23,2	35	54,4	1,5	4	6,5	7
S3F31	5,4	10,2	18,6	31	1,5	4	6,5	7,5
S3F39	6	10	11,6	29,6	0,375	2	4,5	5
S3T40	3,8	24	35,2	55	13,5	16	21	23,5
P5F4	6,2	13,8	30,8	46,2	1,625	3	8	10,5
P6F4	7,8	23,8	33,8	47,2	3,25	5	10	12,5
P6F11	7,2	21,8	34,6	53,8	5,5	8	13	15,5
P6F12	5,8	15,8	36	54,6	2,125	3,5	8,5	11
P6F14	6,6	14,6	25	56,8	4,5	7	12	14,5
P6F15	3	9,6	18,4	52	3	5,5	10,5	13
P6F16	5,4	14,2	26,8	45,6	6	8,5	13,5	16
P6F17	5	23	36,2	59,6	2	4,5	9,5	12
P7F2	3,4	12,8	21,2	28,4	1,25	2	7	9,5
P7F3	6,2	21,4	34,4	60,6	12	14,5	19,5	22
P10F1	8	30	45,2	73	18,5	21	23,5	24,5
P10F2	5,6	18	36,6	60,2	1,75	3,5	8,5	11
P10F3	7,2	23	38,6	63,2	17	19,5	22	22,5
P10F4	4,8	8,8	15,6	39,8	6,25	8	13	13
P10F5	8,4	17,8	27,8	42,4	3,125	4,75	9,75	12,25
P10F6	3,8	12,8	21,6	33,8	1,25	2,625	7,625	10,125
P10F10	8,4	26,4	37,4	70,2	16,5	19	24	24
S1F27	4	7,8	11,8	23,4	2,5	5	8	8,5
S1F35	4,2	18,6	25,6	40,4	4,5	7	11	11,75
FO1	7,2	8,4	13,4	28,6	3	5,5	8	8,5
FO2	5,2	10	15,4	28	0,5	3	5,5	5,625
FO3	6,2	12,2	15	29	0,625	2,25	4,75	4,5
FO4	4,8	11,2	22,8	41,4	4,25	6,25	8,75	9,5

FO5	6,4	15,6	27	49,8	3,5	6	8,5	9
F10	4,6	11,8	22,2	31,6	0,5	3	5,5	6
F13	4,4	14,4	26	43,2	1,25	3	5,5	6
F38	3,4	14	23,2	31,8	0,5	1,625	4,125	5
F42	3,2	8	11,4	37	0,25	1,5	4	4,25
F45	4,6	14	20	31,4	1,5	3,5	6	6,25
F48	2,4	6,8	16,2	28,4	1,5	3,125	5,625	6
F50	5	13	27,2	34	0,5	2	4,5	5
F52	3,4	8,2	14,2	32	3	4,5	7	7,5
F54	8,8	18	23,4	31,2	0,625	2,5	5	5,25
F55	4	7,4	10,4	30,4	0,25	2	4,5	5
F58	3,4	12,4	19,6	28,2	2	4,5	7	7,5
F59	3,8	10	20,8	29,2	0,125	2	4,5	4,75
F60	4,6	9	12,4	23,8	0,375	1	3,5	3,75
F61	5,6	13,4	25,4	38,6	0,125	1,5	4	5,5
F62	6,4	18,6	31,8	49	2,625	4,75	7,25	7,5
F63	4,4	14,2	28,6	46,8	0,25	2	4,5	4,75
F70	4,6	14,4	27,4	38	0,125	1,125	3,625	3,875
F73	2,4	10,4	18,8	29,2	0,25	1,625	4,125	4,125
F75	2,4	9,8	17,4	23,8	5	7,5	10	10,5
F77	4,8	12,6	23,8	34,8	0,75	2	4,5	4,751
F78	4,6	16,4	25,6	39,6	0,125	0,875	3,375	4,25
F80	1,4	5,8	14,6	24,8	0,125	1,25	3,75	3,625
F82	2,8	9,4	19,4	26,6	0,5	2,5	5	5
F83	5,4	11,8	25,4	36,4	2,25	3,5	6	5,75
F85	5,2	16	27,4	43,8	1,5	4	6,5	7
F90	4	14	28,2	52,2	10	12,5	15	15,5
F91	8,2	18,4	29,4	39,4	2,3	3,55	7,6	7,9
F93	4	9,2	19,2	27,8	11	13,5	16	16,125
F94	3,8	12,6	16,2	25,6	5	6,5	9	10
F96	7,4	14,8	26,8	43,2	0,75	2	4,5	4,25
F97	5,8	11,8	20,2	31,2	8	10,5	13	13,5
F98	4,8	13,6	26,6	36	0,625	2,375	4,875	5,25
F108	5,8	12,8	25,4	66,2	11,5	15	16,5	18
F109	4,4	14,2	32,4	62,6	1,75	3	5,5	5,25
F110	3,4	12,6	23	35,6	1,5	4	6,5	6
A12	2,4	10,4	19,2	34,4	1,75	3,375	5,875	6,5
A13	3,4	12,8	21,2	46	4,5	7	9,5	9,625
A14	2,4	12	20	42,8	0,125	0,875	3,375	4,25
A20	3,2	9	14,2	44	1,5	4	6,5	6
M4	2,2	6,2	14	25,6	1,5	4	6,5	7
M7	5	11,2	17,4	33	2	3,75	6,25	6,5
M15	3	7,2	23	39,4	0,5	2,5	5	5
M18	3,4	8,8	16,8	31	6	8,5	11	11
SP1	4,4	8,8	20,6	35,8	4	6,5	9	9,5
SP4	6,2	13	28,2	49,8	0,75	1,75	4,25	5
SP10	3,6	6,6	13,4	32,4	0,25	1,375	3,875	4,25
SP11	2,6	7	18	26,2	0,375	0,75	3,25	3,75
SP16	6,4	11,8	13,2	26,2	1,125	2,875	5,375	5,75
SP20	3,8	11,4	24,8	41,8	1,25	2,5	5	4,75
SP31	3	7,4	16,6	41,2	2,5	3,875	6,375	7
SP33	2	8,6	13,4	45,4	1	2,875	5,375	6

Tableau C : Temps de latence et dimension des lésions des isolats testés sur le feuillage des différentes variétés.

Isolat	Temps de latence (h)					Dimension des lésions (mm2)				
	Spunta	Désirée	Nicola	Kondor	Daniela	Spunta	Désirée	Nicola	Kondor	Daniéla
I1S67	66	70	73	79	36	360	268,75	258	182,75	1003
I2S68	67	71	74	80	42	383,25	288,25	281,25	246,25	1026,25
I3S67	66	70	73	79	36	310,25	215,25	208,25	193,75	953,25
I4S67	66	70	73	79	45	335,25	240,25	233,25	198,25	978,25
I5S67	65	69	72	78	36	391,75	291	277,25	237,25	1049,5
I6S67	66	70	73	79	40	332	237	230	228,75	975
I7S67	66	70	73	79	36	392,75	297,75	290,75	255,75	1035,75
S2F1	45	48	50	54	48	971,25	876,25	763	677,25	1275,25
S2F5	40	50	50	54	42	1029,75	967,75	817	504,75	1237,75
S2F6	48	58	48	58	42	922,25	827,25	644,5	515,5	1226,25
S2T9	40	48	51	55	40	1378	1325,25	1276	1216,25	1425,5
S2F14	57	60	64	67	53	818	746	714	423,25	1026
S2F18	36	40	42	46	30	1350,25	1255,25	1145,5	943,75	1315,5
S2F19	47	54	58	63	41	1045,325	926,25	701,25	776,85	1236,5
S2F20	52	62	65	68	54	840	745	683,5	470	1144
S2F22	42	48	52	56	40	1045,75	950,75	862,75	539,5	1349,75
S2F25	38	42	46	49	34	1134,25	1039,25	890,25	997,25	1347
S3F12	50	60	63	67	48	934	839	697,75	797	1238
S3F21	56	65	68	71	57	629,75	534,75	471,25	317,5	1142,75
S3F25	47	54	58	63	41	1133,5	1117,75	1031,5	687,25	1270,5
S3F28	30	50	53	57	36	1311,25	1216,25	976,25	809,25	1295,5
S3F31	50	60	63	67	48	912,5	817,5	708	775,5	1216,5
S3F39	51	54	57	61	46	1039,25	1017,5	935,25	682,5	1247,25
S3T40	40	48	51	55	40	1221,75	1126,75	1068	872,75	1525,75
P5F4	32	38	42	45	34	1172	1077	985,75	854,75	1476
P6F4	52	60	64	69	50	1008,5	913,5	741	426,5	1521,5
P6F11	40	48	52	57	34	1113,5	1018,5	969,5	868,25	1239,75
P6F12	38	48	50	54	46	1170,75	1075,75	896,25	873,75	1474,75
P6F14	40	48	51	55	40	1245,75	1150,75	1032,25	801,5	1101
P6F15	32	36	39	42	36	1323,5	1228,5	1023,75	788,75	1375,5
P6F16	41	45	49	52	40	1257,5	852,25	1089	810,75	1194,25
P6F17	58	48	52	57	35	1204,5	1109,5	1102,5	961,75	1508,5
P7F2	56	60	63	66	52	1024,25	786,75	779,75	655,75	1185,75
P7F3	41	45	49	52	40	1318,25	1212	944,25	1053	1369
P10F1	30	36	39	42	36	1508	1413	1128,75	1181,5	1664,25
P10F2	56	60	64	67	52	826	750,5	832,25	495,5	989,25
P10F3	30	36	38	42	36	1258	1180	1078,75	757,5	1562
P10F4	50	60	63	67	44	1005,5	910,5	904,5	868,5	1253,5
P10F5	52	60	64	69	46	942,25	898	840,25	669,5	1246,25
P10F6	56	60	64	67	52	1151,5	807,25	667,5	478,75	915,25
P10F10	30	36	38	42	30	1382,5	1297,25	1187,75	649,25	1440,25
S1F27	58	52	48	57	35	1081,25	986,25	761,75	536,5	1385,25
S1F35	40	51	48	55	40	1183,5	1088,5	849,5	617,75	1487,5
FO1	41	49	45	52	40	1214	944,75	1119	721,5	1518
FO2	46	58	54	63	50	950,5	849,5	882	644	1254,5
FO3	55	66	62	71	49	798,25	697,25	703,25	585,5	1102,25
FO4	46	58	54	63	50	1041,25	786,5	946,25	588,5	1345,25

FO5	37	49	45	54	31	1338,75	1054,75	1243,75	831,25	1282,75
F10	58	66	62	69	54	773,5	604,25	678,5	463,75	1077,5
F13	56	68	64	73	50	627,25	486,75	532,25	359	931,25
F38	50	62	58	67	58	728,5	541,25	633,5	359,75	1032,5
F42	58	66	62	71	49	561,5	460,5	466,5	491,75	865,5
F45	49	54	52	60	53	926	825	831	549,25	1230
F48	55	66	62	71	52	677,25	478	582,25	340	981,25
F50	58	66	62	71	49	737	575,5	642	412,75	1041
F52	50	62	58	67	50	829	628,75	734	410	1133
F54	50	60	56	65	50	942,5	726,5	727,75	614,25	1082
F55	52	64	60	69	46	758,75	603,75	663,75	597	1006,75
F58	64	71	68	74	60	578,75	415,25	483,75	380,5	826,75
F59	54	66	62	71	48	780,5	471,75	685,5	355	1028,5
F60	47	58	54	63	62	982	751	887	457,5	1230
F61	50	62	58	67	50	837	736	742	638,75	1085
F62	50	62	58	67	50	1023	922	644,75	521,75	1271
F63	57	64	60	67	53	802,5	488,5	707,5	449	1050,5
F70	57	69	65	74	51	668	515	573	411,75	916
F73	56	68	64	73	50	702,5	535,75	607,5	461,75	950,5
F75	50	57	53	62	50	975,25	874,25	555,75	556,75	1223,25
F77	56	64	60	67	52	740	591,25	645	562	948
F78	47	58	54	63	62	838,5	677,5	743,5	578,75	1046,5
F80	56	64	60	67	52	715,5	614,5	620,5	443,25	923,5
F82	58	56	52	61	39	816,25	715,25	818,5	682,75	1024,25
F83	52	64	60	69	46	716,75	567,5	621,75	707,75	924,75
F85	59	60	52	65	40	853,75	752,75	758,75	462,25	1035,75
F90	36	40	36	45	32	1113,75	978,25	1036,75	804,5	1287,25
F91	43	54	50	59	37	1019	917	924	715,5	1323
F93	47	58	54	63	41	864,5	682,75	706,5	552,5	1059,75
F94	56	68	64	73	50	759,75	599	664,75	543	967,75
F96	44	56	52	61	38	841,5	690	746,5	704,5	1145,5
F97	50	62	58	67	54	906	699,5	811	424	1114
F98	54	66	62	71	48	707,5	419	612,5	423	915,5
F108	36	48	42	53	30	1237	1097,25	1106,25	1064,25	1369,5
F109	46	58	54	63	60	844,25	645,75	749,25	707,25	1148,25
F110	48	60	56	65	42	1043,75	842,365	896,75	726,25	1071,25
A12	50	62	58	67	54	771,5	667,5	728	443,75	979,5
A13	52	64	60	69	46	710,25	606,25	615,25	573,25	918,25
A14	52	63	59	68	50	871,25	663,25	776,25	566	1079,25
A20	58	68	56	73	42	714,25	557	619,25	577,25	922,25
M4	52	64	60	69	46	838,75	655,5	743,75	497,75	1046,75
M7	50	62	58	67	58	734,5	589,5	639,5	549,5	942,5
M15	50	62	58	67	44	910,75	806,75	815,75	740	1118,75
M18	57	69	65	74	51	684	441,25	513,5	465,5	892
SP1	42	54	50	59	36	1207	925,5	1112	873,15	1415
SP4	46	60	54	65	40	1079,75	813	984,75	637,5	1287,75
SP10	52	64	60	69	46	796,75	494	701,75	551,5	1004,75
SP11	59	60	52	65	40	918,75	814,75	866,75	686	1126,75
SP16	58	68	52	73	38	720	465,25	625	583	1024
SP20	53	65	56	70	42	525	423	430	297	829
SP31	50	62	58	67	44	876,5	670,25	781,5	564,5	1084,5
SP33	58	68	56	73	42	825,25	664,75	730,25	524,5	1033,25

Tableau D : Sporulation in-vivo des isolats sur le feuillage des variétés testées

Isolat	Sporulation sur feuilles (x10 ⁴ spores/ml)				
	Spunta	Désirée	Nicola	Kondor	Daniela
I1S67	1,41	0,83	0,63	0,16	9,38
I2S68	0,63	0,31	0,00	0,00	13,75
I3S67	1,88	0,63	0,31	0,31	12,50
I4S67	2,50	0,78	1,41	0,21	11,25
I5S67	2,50	1,25	0,63	0,31	11,88
I6S67	2,50	1,88	0,94	0,47	10,63
I7S67	0,99	0,78	0,63	0,52	13,13
S2F1	13,13	8,13	6,88	6,23	14,38
S2F5	15,00	11,25	7,50	3,13	20,63
S2F6	11,25	9,38	8,13	5,00	7,50
S2T9	17,50	11,88	8,13	7,50	18,13
S2F14	11,88	8,13	6,88	6,23	12,50
S2F18	15,63	12,50	6,88	5,00	14,35
S2F19	13,75	8,75	7,50	6,88	14,38
S2F20	10,63	7,50	5,00	4,69	9,38
S2F22	11,25	8,13	7,50	6,88	8,75
S2F25	9,38	6,88	5,00	4,88	14,38
S3F12	15,63	9,38	6,88	5,00	8,13
S3F21	17,50	11,25	9,38	4,88	10,63
S3F25	16,88	10,63	8,75	6,88	17,50
S3F28	10,00	6,88	5,00	3,75	14,38
S3F31	13,13	3,75	6,25	2,50	11,25
S3F39	13,13	11,25	7,50	6,88	10,65
S3T40	17,50	14,38	10,63	8,13	20,63
P5F4	15,00	8,75	3,75	3,13	18,13
P6F4	11,25	6,25	5,00	4,38	16,88
P6F11	13,13	7,50	6,88	5,00	17,50
P6F12	11,88	6,88	3,44	3,13	16,25
P6F14	14,38	10,63	13,13	5,00	20,00
P6F15	12,50	8,13	3,75	3,13	18,75
P6F16	15,00	9,38	6,88	4,69	16,25
P6F17	16,25	10,00	7,50	6,23	17,50
P7F2	15,00	13,75	8,13	4,38	16,25
P7F3	19,38	13,13	11,25	8,75	24,38
P10F1	25,00	14,38	13,13	10,63	21,25
P10F2	10,00	7,50	5,00	4,38	15,63
P10F3	23,13	15,00	12,50	9,38	25,63
P10F4	11,25	9,38	7,50	5,00	13,13
P10F5	9,38	8,75	7,50	5,63	11,25
P10F6	11,88	8,13	6,88	6,23	14,38
P10F10	20,63	13,13	10,63	8,75	22,50
S1F27	9,38	6,25	5,00	2,81	11,25
S1F35	8,13	5,00	4,38	3,18	8,75
FO1	12,50	9,38	8,75	4,38	13,75
FO2	10,63	8,13	7,19	2,66	11,88
FO3	10,00	7,50	5,00	2,66	10,63
FO4	8,13	5,00	4,38	3,13	10,63
FO5	10,00	6,88	5,00	4,69	13,13
F10	3,91	2,81	2,66	2,50	7,50

F13	3,75	2,81	2,50	2,50	8,13
F38	6,88	5,00	4,69	2,66	6,88
F42	13,75	6,25	4,38	3,13	13,75
F45	6,88	3,75	2,50	4,38	10,00
F48	5,63	4,69	2,66	3,13	5,00
F50	7,66	6,88	5,00	3,13	5,00
F52	8,13	5,00	4,69	3,91	7,50
F54	7,50	5,00	4,38	3,13	7,50
F55	9,69	7,50	4,69	3,28	10,63
F58	7,66	3,13	3,28	2,66	5,63
F59	6,88	4,69	3,13	2,81	5,94
F60	7,50	4,69	3,91	2,97	11,88
F61	6,88	5,00	3,91	3,13	5,00
F62	15,00	8,13	5,00	2,81	12,50
F63	7,50	3,13	1,88	2,66	4,69
F70	11,25	7,50	5,78	4,69	3,28
F73	8,13	2,19	2,81	2,97	5,63
F75	13,13	7,50	6,25	4,69	15,00
F77	5,63	4,69	3,91	2,97	11,88
F78	7,50	4,69	3,91	2,97	11,88
F80	10,63	5,00	4,69	2,81	4,09
F82	12,50	6,25	4,38	3,75	13,13
F83	11,25	9,38	6,88	3,91	9,38
F85	9,38	5,63	5,00	3,75	10,63
F90	15,00	10,63	7,50	2,66	16,88
F91	8,13	5,00	6,88	4,69	11,25
F93	13,75	7,50	5,00	2,81	6,25
F94	9,69	7,50	5,00	3,28	10,63
F96	9,38	7,50	3,13	3,75	10,63
F97	9,38	4,38	5,00	3,13	11,88
F98	8,13	3,13	3,91	2,81	11,25
F108	16,25	10,63	7,50	3,75	14,38
F109	11,25	9,38	7,50	5,00	19,75
F110	10,00	9,38	7,50	4,38	10,63
A12	9,38	5,63	6,25	3,75	14,38
A13	14,38	8,75	6,88	3,13	12,50
A14	7,50	5,00	6,88	3,75	12,50
A20	5,63	4,38	3,13	3,75	10,00
M4	4,38	2,81	4,38	3,13	8,75
M7	9,38	7,50	5,00	3,13	8,75
M15	10,00	7,50	5,00	3,75	11,88
M18	8,13	7,50	5,00	4,69	9,38
SP1	10,63	8,13	7,50	5,00	9,38
SP4	8,13	5,00	4,69	3,91	6,88
SP10	7,50	6,88	3,91	2,81	10,63
SP11	5,00	4,69	3,13	2,81	5,94
SP16	15,63	10,00	6,88	4,38	16,88
SP20	11,25	9,38	4,38	3,75	13,13
SP31	5,78	3,13	2,50	2,50	4,38
SP33	15,00	10,63	5,63	4,69	15,00

Analyses statistiques des résultats de caractérisation des isolats

Tableau 1 : Régression des sévérités sur les incidences

Sources de variation	SCE	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	4994.513	9			
Régression	4773.033	1	4773.0327	172.4051	0.0000
Var. Résid.	221.480	8	27.6850		

Tableau 2a: Croissance mycélienne des 8 isolats selon le substrat après 5 jours

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	239	93.43		
Isolat (F1)	7	556.17	528.64	0.0000
Substrat (F2)	5	3277.73	3115.47	0.0000
Inter F1 x F2	35	52.05	50.12	0.0000
Var. résid.	192	1.05		

Tableau 2b : Croissance mycélienne des 8 isolats selon le substrat après 10 jours

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	239	260.76		
Isolat (F1)	7	1348.72	542.20	0.0000
Substrat (F2)	5	9582.50	3852.50	0.0000
Inter F1 x F2	35	128.28	51.57	0.0000
Var. résid.	192	2.49		

Tableau 3 : Croissance mycélienne selon les isolats

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	395	183.93		
Isolat	98	730.86	211.79	0.0000
Var. résid	297	3.45		

Tableau 4 : Croissance mycélienne sur substrat (PP)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	50	251.31		
localité	2	2194.33	15.94	0.0000
Blocs	16	235.67	1.71	0.0956
Var. résid.	32	137.67		

Tableau 5 : Croissance mycélienne *in-vitro* selon le phénotype

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	23	241.49		
Phénotype	7	579.93	7.18	0.0010
Blocs	2	182.13	2.26	0.1401
Var. résid.	14	80.74		

Tableau 6 : Croissance mycélienne selon le type sexuel

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	79	216.63		
Type sexuel	1	1320.31	6.88	0.0119
Blocs	39	213.00	1.11	0.3734
Var. résid.	39	161.96		

Tableau 7 : Intensité de sporulation *in-vitro* selon les isolats

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	395	4806289408.00		
Isolat	98	12275420160.00	5.36	0.0000

Var. résid.	297	2292319488.00		
Tableau 8 : Intensité de sporulation <i>in-vitro</i> selon l'origine				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	50	3777207040.00		
localité	2	10756702208.00	3.76	0.0240
blocs	16	4735488000.00	1.65	0.1100
Var. résid.	32	2861848064.00		

Tableau 9 : Sporulation <i>in-vitro</i> selon le phénotype				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	23	3706475008.00		
Phénotype	7	10917024768.00	19.78	0.0000
Blocs	2	25128960.00	3.21	0.4610
Var. résid.	14	627106944.00		

Tableau 10 : Sporulation <i>in-vitro</i> selon le type sexuel				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	79	2788147712.00		
Type sexuel	1	14428520448.00	5.01	0.0294
Blocs	39	2396291072.00	0.85	0.5164
Var. résid.	39	2881533184.00		

Tableau 11a : Germination directe après 4h d'incubation selon les isolats				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	494	6.25		
Isolat	98	18.82	6.69	0.0000
Var. résid.	396	2.82		

Tableau 11b : Germination directe après 8h d'incubation selon les isolats				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	494	36.79		
Isolat	98	152.22	19.54	0.0000
Var. résid.	396	7.79		

Tableau 11c : Germination directe après 12h d'incubation selon les isolats				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	494	71.15		
Isolat	98	317.27	31.55	0.0000
Var. résid.	396	10.06		

Tableau 11d : Germination directe après 24h d'incubation selon les isolats				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	494	168.88		
Isolat	98	755.55	31.27	0.0000
Var. résid.	396	23.63		

Tableau 12a : Germination directe des isolats selon leur origine après 4 h d'incubation				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	50	3.81		
localité	2	3.98	0.88	0.4269
blocs	16	2.36	0.52	0.6152
Var. résid.	32	4.52		

Tableau 12b : Germination directe des isolats selon leur origine après 8 h d'incubation				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	50	31.45		
localité	2	131.87	5.32	0.0101
Blocs	16	32.26	1.30	0.2545

Var. résid.	32	24.77
-------------	----	-------

Tableau 12c : Germination directe des isolats selon leur origine après 12h d'incubation

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	50	61.60		
localité	2	284.62	7.40	0.0075
Blocs	16	79.97	2.08	0.0382
Var. résid.	32	38.48		

Tableau 12d : Germination directe des isolats selon leur origine après 24 h

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	50	139.87		
localité	2	579.83	3.14	0.0022
Blocs	16	210.84	2.74	0.0074
Var. résid.	32	76.90		

Tableau 13a : Germination directe des isolats selon leur phénotype après 4 h.

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	23	2.16		
Phénotype	7	3.58	2.31	0.0935
Blocs	2	1.22	0.77	0.4871
Var. résid.	14	1.59		

Tableau 13b : Germination directe des isolats selon leur phénotype après 8 h.

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	23	32.67		
Phénotype	7	62.83	4.15	0.0115
Blocs	2	49.86	3.29	0.0662
Var. résid.	14	15.14		

Tableau 13c : Germination directe des isolats selon leur phénotype après 12 h.

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	23	71.52		
Phénotype	7	160.08	4.96	0.0055
Blocs	2	36.32	1.13	0.3533
Var. résid.	14	32.27		

Tableau 13d : Germination directe des isolats selon leur phénotype après 24 h.

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	23	203.29		
Phénotype	7	544.48	8.90	0.0004
Blocs	2	13.65	2.06	0.5202
Var. résid.	14	61.21		

Tableau 14 : Germination directe des isolats selon leur type sexuel après 24h .

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	79	147.74		
Type sexuel	1	2012.02	16.21	0.0003
Blocs	39	123.57	1.42	0.5045
Var. résid.	39	124.12		

Tableau 15a : Germination indirecte selon les isolats après 1h d'incubation.

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	494	2471576320.00		
Isolat	98	8857158656.00	9.98	0.0000
Var. résid.	396	887474304.00		

Tableau 15b : Germination indirecte après 2h d'incubation selon les isolats.

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	494	4047514880.00		
Isolat	98	11512267776.00	5.30	0.0000
Var. résid.	396	2171197696.00		

Tableau 15c : Germination indirecte après 3h d'incubation selon les isolats.

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	494	4065878272.00		
Isolat	98	125162899536.00	6.52	0.0000
Var. résid.	396	1920506368.00		

Tableau 15d : Germination indirecte après 4h d'incubation selon les isolats.

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	494	430591584.00		
Isolat	98	14320581632.00	7.86	0.0000
Var. résid.	396	1823037952.00		

Tableau 16a : Germination indirecte après 1h d'incubation selon l'origine

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	50	2479929344.00		
localité	2	5469843456.00	2.50	0.0962
Blocs	16	2690015744.00	1.23	0.2995
Var. résid.	32	2188016384.00		

Tableau 16b : Germination indirecte après 2h d'incubation selon l'origine des isolats

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	50	2775518464.00		
localité	2	6416867328.00	2.55	0.0919
Blocs	16	284315552.00	1.13	0.3702
Var. résid.	32	2514113536.00		

Tableau 16c : Germination indirecte après 3h d'incubation selon l'origine des isolats

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	50	2639815424.00		
localité	2	3005878272.00	5.21	0.0319
Blocs	16	1713118720.00	0.63	0.6362
Var. résid.	32	2345867008.00		

Tableau 16d : Germination indirecte après 4h d'incubation selon l'origine des isolats

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	50	3287916544.00		
localité	2	23616561152.00	10.56	0.0003
Blocs	16	2850999296.00	1.28	0.2706
Var. résid.	32	2235834880.00		

Tableau 17a : Germination indirecte après 1h d'incubation selon le phénotype

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	23	2410179072.00		
Phénotype	7	6292968960.00	8.87	0.0004
Blocs	2	726822912.00	1.02	0.3861
Var. résid.	14	709263360.00		

Tableau 17b: Germination indirecte après 2h d'incubation selon le phénotype

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	23	2718724352.00		
Phénotype	7	7370005504.00	10.75	0.0001
Blocs	2	672069632.00	0.98	0.4015

Var. résid.	16	685463232.00		
Tableau 17c : Germination indirecte après 3h d'incubation selon le phénotype				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	23	2950201088.00		
Phénotype	7	7853190144.00	11.08	0.0001
Blocs	2	1477799936.00	2.09	0.1599
Var. résid.	14	709049472.00		

Tableau 17d : Germination indirecte après 4h d'incubation selon le phénotype				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	23	7024386560.00		
Phénotype	7	8439502336.00	9.29	0.0324
Blocs	2	5359845376.00	0.82	0.4646
Var. résid.	16	6405273088.00		

Tableau 18 : Germination indirecte après 3h d'incubation selon le type sexuel				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	79	2558598656.00		
Type sexuel	1	38281232384.00	15.43	0.0004
Blocs	39	1720462464.00	0.85	0.4713
Var. résid.	39	2480769792.00		

Tableau 19 : Temps de latence selon les isolats				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	1979	145.36		
Isolat	98	973.62	24.41	0.0000
variété	4	28672.58	65.23	0.0000
Isolat x Variété	392	116.71	4.13	0.0000
Var. résid.	1485	234.54		

Tableau 20 : Temps de latence selon l'origine				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	254	109.52		
Localité	2	615.48	8.99	0.0002
Variété	4	2392.75	34.94	0.0000
Localité x Variété	8	72.39	3.65	0.1942
Var. résid.	240	68.49		

Tableau 21 : Temps de latence selon le phénotype				
Sources de variati	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	119	126.20		
Phénotype	7	921.83	25.95	0.0000
Variété	4	1339.30	37.70	0.0000
Phénotype x Variété	28	13.05	43.37	0.1990
Var. résid.	80	35.53		

Tableau 22 : Temps de latence selon le type sexuel				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	339	107.55		
type sexuel	1	4006.54	66.32	0.0000
Variété	4	3812.63	63.21	0.0000
Type sexuel x Variété	4	34.37	1.57	0.6879
Var. résid.	339	60.32		

Tableau 23 : Dimension de la lésion selon les isolats				
Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	1979	98524.00		
Isolat	98	723428.37	32.17	0.0000
variété	4	2389283.41	173.43	0.0000
Isolat x Variété	392	953547.00	1.76	0.0000

Var. résid.	1485	637524.00
-------------	------	-----------

Tableau 24 : Dimension de la lésion selon l'origine

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	254	72738.73		
localité	2	447383.00	11.75	0.0000
Variété	4	2075844.25	54.50	0.0000
localité x Variété	8	17032.13	6.45	0.0020
Var. résid.	240	38088.49		

Tableau 25 : Dimension de la lésion selon le phénotype

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	119	16.96		
Phénotype	7	67.78	7.71	0.0000
Variété	4	130.48	14.84	0.0000
Phénotype x Variété	28	18.38	3.29	0.0024
Var. résid.	80	8.79		

Tableau 26 : Dimension de la lésion selon le type sexuel

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	339	78525.56		
Type sexuel (F1)	1	3229068.00	85.18	0.0000
Variété (F2)	4	3277569.00	86.46	0.0000
Inter. F1x F2	4	51863.75	1.37	0.2433
Var. résid.	339	37910.00		

Tableau 27 : Intensité de sporulation *in vivo* selon les isolats

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	1979	5341872128.00		
Isolat	98	46087163904.00	23.72	0.0000
variété	4	429481000960.00	221.05	0.0000
Isolat x Variété	392	3703643904.00	1.91	0.0000
Var. résid.	1485	1942943232.00		

Tableau 28 : Intensité de sporulation *in-vivo* selon l'origine

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	254	2401732352.00		
Localité	2	225765871616.00	28.95	0.0001
Variété	4	482443329536.00	92.63	0.0000
Localité x Variété	8	1892179968.00	2.13	0.0329
Var. résid.	240	889989696.00		

Tableau 29 : Intensité de sporulation *in-vitro* selon le phénotype

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	119	2291948032.00		
Phénotype	7	6687476224.00	5.95	0.0000
Variété	4	25446735872.00	22.64	0.0000
Phénotype x Variété	28	1222538368.00	6.15	0.0339
Var. résid.	80	1123893504.00		

Tableau 30 : Sporulation *in-vivo* selon le type sexuel

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	339	2134905984.00		
Type sexuel	1	87042752512.00	83.20	0.0000
Variété	4	85126545408.00	81.37	0.0000
Type sexuel x Variété	4	4070072320.00	3.89	0.0043
Var. résid.	339	1046149376.00		

Analyses de variance des résultats de la production et la germination des oospores

Tableau 31 : Effet de type de croisement sur la production des oospores sur Petits pois

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	59	3370.91		
Croisement	5	9982.22	3.62	0.0069
Var. résid.	54	2758.75		

Tableau 32 : Effet de milieu de culture et de type de croisement sur la production des oospores

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	199	4339.85		
Croisement (F1)	3	23001.50	12.80	0.0000
Milieu de culture (F2)	4	95194.50	52.98	0.0000
Inter. F1 x F2	12	7534.31	4.19	0.0000
Var. résid.	180	1796.86		

Tableau 33 : Effet du metalaxyl sur la production *in vitro* des oospores (sur PP).

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	319	12120.02		
Croisement (F1)	7	189285.14	30.64	0.0000
[Metalaxy] (F2)	3	149881.00	24.26	0.0000
Inter F1 x F2	21	3259.36	0.53	0.9579
Var. résid.	279	6176.85		

Tableau 34 : Production des oospores sur des folioles complets et sur les disques de feuilles de pomme de terre

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	79	132662.52		
Croisement (F1)	3	889491.69	9.44	0.0000
Technique (F2)	1	383365.00	4.07	0.0000
Inter. F1 x F2	3	214829.83	2.28	0.0853
Var. résid.	72	94222.35		

Tableau 35 : Effet de type d'hôtes et d'organes végétaux sur la production des oospores

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	143	178711.84		
Croisement (F1)	7	123225.20	3.75	0.0037
Hôte (F2)	2	15024798.00	342.64	0.0000
Organe (F3)	6	3834690.50	116.83	0.0001
F1 x F2	14	5782635.35	5.23	0.0002
F1 x F3	42	82329.04	2.83	0.0006
F2 x F3	12	1648099.00	37.14	0.0000
F1 x F2 x F3	84	2468792.42		
Var. résid.	59	44375.95		

Tableau 36 : Effet des variétés de pomme de terre sur la production des oospores

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	127	40635.18		
Croisement (F1)	3	292945.50	32.21	0.0000
Variété (F2)	7	353038.16	38.81	0.0000
Inter F1 x F2	21	33096.86	3.64	0.0000
Var. Blocs	3	89821.50	9.87	0.0000

Var. résid.	93	9097.49
-------------	----	---------

Tableau 37a : Effet du metalaxyl sur la production *in vivo* des oospores (l'inoculation est réalisée simultanément avec l'exposition au metalaxyl)

Après 7 jours :

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	239	233792.91		
Croisement (F1)	5	4813456.50	44.46	0.0000
[Metalaxyl] (F2)	3	2316562.75	21.40	0.0000
Inter. F1 x F2	15	98152.93	0.91	0.5581
Var. résid.	216	108274.32		

Après 15 jours

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	239	245913.25		
Croisement (F1)	5	5732723.17	52.36	0.0000
[Metalaxyl] (F2)	3	2839575.32	32.27	0.0000
Inter. F1 x F2	15	95374.83	0.85	0.5235
Var. résid.	216	123564.57		

Après 21 jours

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	239	326857.46		
Croisement (F1)	5	6932586.54	67.48	0.0000
[Metalaxyl] (F2)	3	3423518.92	43.31	0.0000
Inter. F1 x F2	15	126724.65	1.66	0.3421
Var. résid.	216	154682.33		

Tableau 37b : Effet du metalaxyl sur la production *in-vivo* des oospores (l'exposition au metalaxyl est réalisée après 5 jours d'inoculation)

Après 7 jours d'exposition au metalaxyl

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	239	147683.09		
Croisement (F1)	5	3681619.25	85.90	0.0000
[Metalaxyl] (F2)	3	2207036.00	51.49	0.0000
Inter. F1 x F2	15	67277.47	1.57	0.0836
Var. résid.	216	42860.62		

Après 15 jours de l'inoculation

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	239	129329.27		
Croisement (F1)	5	2976538.54	67.29	0.0000
[Metalaxyl] (F2)	3	2097251.39	45.78	0.0000
Inter. F1 x F2	15	58926.62	1.25	0.0928
Var. résid.	216	39652.93		

Après 21 jours

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	239	168527.13		
Croisement (F1)	5	3973246.71	92.27	0.0000
[Metalaxyl] (F2)	3	2738136.37	63.58	0.0000
Inter. F1 x F2	15	75336.82	2.49	0.0653
Var. résid.	216	51784.48		

Tableau 38 : Effet de la lumière sur la germination des oospores

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	19	5.12		
Type de lumière	2	24.20	3.90	0.0773
Blocs	10	1.91	0.31	0.8524

Var. résid.	8	6.20
-------------	---	------

Tableau 39 : Effet du substrat sur la germination des oospores

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	99	54.53		
Substrat	9	430.61	25.56	0.0000
Blocs	9	17.61	1.04	0.4126
Var. résid.	81	16.85		

Tableau 40 : Effet de la température et la durée de stockage sur la germination des oospores

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	99	50.27		
Temperature	1	462.25	53.29	0.0000
Durée de stockage	4	668.25	77.11	0.0000
Inter. Temp * Stockage	4	264.58	30.50	0.0000
var. résid.	90	8.67		

Tableau 41 : Effet du type de croisement sur la germination

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	79	31.89		
Croisement	7	267.49	30.70	0.0000
Blocs	9	10.88	1.25	0.2820
Var. résid.	69	8.71		

Tableau 42 : Effet du tube digestif de l'escargot sur la germination des oospores

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	159	37.12		
Croisement (F1)	3	279.61	22.59	0.0000
Traitement (F2)	3	1019.27	82.36	0.0000
Inter. F1 x F2	9	24.89	2.01	0.0000
Var. résid	144	12.38		

Tableau 43 : Effet du metalaxyl sur la germination des oospores

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	319	47.69		
Croisement (F1)	7	192.90	15.15	0.0000
Concentration du metalaxyl (F2)	3	3100.97	243.60	0.0000
Inter. F1 x F2	21	42.58	3.34	0.0000
Var. résid.	288	12.73		

Tableau 44 : Croissance mycélienne des souches mono-zoospores selon leur origine (sexuée ou asexuée)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	59	113.26		
Origine	1	954.81	18.88	0.0002
Blocs	29	146.92	2.90	0.0027
Var. résid.	29	50.58		

Analyses de Variance des résultats d'évaluation de la résistance de feuillage des 16 variétés de pomme de terre testées sous tunnel

Tableau 45 : Temps de latence

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	229.57		
Variété	15	709.99	178.68	0.0000
Bloc	2	10.40	2.62	0.0880
Var. résid.	30	3.97		

Tableau 46 : Période de latence

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	1309.03		
Variété	15	4060.64	210.65	0.0000
Bloc	2	18.19	0.94	0.4028
Var. résid.	30	19.28		

Tableau 47 : Incidence ou intensité d'infection

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	0.09		
Variété	15	0.29	210.10	0.0000
Bloc	2	0.00	0.55	0.5856
Var. résid.	30	0.00		

Tableau 48 : Vitesse d'expansion de la lésion

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	2.69		
Variété	15	7.96	34.64	0.0000
Bloc	2	0.06	0.27	0.7649
Var. résid.	30	0.23		

Tableau 49: Dimension de la lésion (mm²)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	77916.73		
Variété	15	190001.86	7.95	0.0000
Bloc	2	40667.13	1.70	0.19778
Var. résid.	30	23887.47		

Tableau 50 : Intensité de sporulation (sporangies /mm²)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	23244.41		
Variété	15	59981.11	9.83	0.0000
Bloc	2	4844.44	0.79	0.4649
Var. résid.	30	6102.73		

Analyses de Variance des résultats d'évaluation de la résistance des tubercules des 16 variétés de pomme de terre testées

Tableau 51: Temps de latence (h)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	13.92		
Variété	15	39.62	21.18	0.0000
Bloc	2	1.94	1.04	0.36
Var. résid.	30	1.87		

Tableau 52 : Période d'incubation (h)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	105.74		
Variété	15	326.33	135.97	0.0000

Bloc	2	1.33	0.56	0.5842
Var. résid.	30	2.4		

Tableau 53 : Incidence ou taux d'infection (%)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	0.00		
Variété	15	0.00	2.98	0.0053
Bloc	2	0.01	4.44	0.0202
Var. résid.	30	0.00		

Tableau 54 : Sévérité (%)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	0.01		
Variété	15	0.02	3.67	0.0012
Bloc	2	0.00	0.03	0.9682
Var. résid.	30	0.01		

Tableau 55 : Vitesse d'expansion de la nécrose (mm/j)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	1.62		
Variété	15	4.68	35.36	0.0000
Bloc	2	0.91	6.88	0.0036
Var. résid.	30	0.13		

Tableau 56 : Intensité de sporulation (spores/mm² de tubercule)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	12466.49		
Variété	15	28915.32	7.62	0.0000
Bloc	2	19169.28	5.05	0.128
Var. résid.	30	3795.23		

Tableau 57 : Profondeur de la lésion (mm)

Sources de variation	DDL	CM	Test F	Prob
Var. totale	47	3.02		
Variété	15	8.82	28.58	0.0000
Bloc	2	0.20	0.66	0.5298
Var. résid.	30	0.31		