

UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de
MASTER ACADEMIQUE**

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologique

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

**Isolement et identification des champignons
phytopathogènes affectants la luzerne (*Medicago sativa L.*)
dans la région de Ouargla.**

Réalisé par : HABHOUB Meriem et SALHI Bouchra

Soutenu publiquement

Le : 29/09/2020

Devant le jury :

M^{me} SALHI N.	Pr.	Présidente	UKM Ouargla
M. AZIB S.	M.A.A	Encadreur	UKM Ouargla
M. SAADI S.A.	M.A.A	Examineur	UKM Ouargla

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous a aidé et nous a donné le courage de tout faire.

Nous tenons à exprimer notre gratitude et nos remerciements pour toutes les personnes qui ont participé à l'accomplissement de ce travail, qui nous ont appris une infinité de choses et qui nous ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail.

En premier lieu, nous adressons nos vifs et sincères remerciements à M. **AZIB S.** pour l'intérêt qu'il a porté au sujet proposé ; mais également pour nous avoir fait l'honneur de nous encadrer et nous orienter. Nous lui devons beaucoup pour ses encouragements, sa patience et les conseils qu'il nous a prodigué. Nous ne saurions le remercier assez pour son soutien et son suivi scientifique le long de la réalisation de ce travail. Qu'il reçoive l'expression de nos vives gratitudees.

Nos vifs remerciements vont à Mlle. **SALHI N.**, pour l'honneur qu'elle nous fait en présidant ce jury.

Nous remercions également Monsieur **SAADI S.A.**, pour le temps qu'il nous accorde en acceptant d'examiner ce modeste travail.

Tous nos sincères remerciements pour Monsieur **BRADAI L.** et les ingénieurs du laboratoire microbiologique de la faculté de médecine université Kasdi Merbah Ouargla, de nous avoir accueilli au sein du laboratoire.

Un immense merci est adressé également à Monsieur **BOUZEGUAGUE S.**, du laboratoire BioRessources Sahariennes (BRS).

Sans oublier Monsieur **BEN DAHMANE W.**, ainsi que le personnel de la Station de Surveillance de l'Environnement – ONEDD.

Nos remerciements s'adressent aussi aux ingénieurs des laboratoires pédagogiques, FSNV, université KASDI Merbah-Ouargla, pour leur gentillesse, leurs précieux conseils, leur disponibilité et pour nous avoir fourni une aide matérielle et technique, ou tout simplement humaine.

Dédicaces

*A mes chers parents El-Djazair et
Mimoune, pour tous leurs sacrifices,
leur amour, leur soutien et leurs prières
tout au long de mes études.*

*A ma sœur Djamila et mes frères, pour
leur soutien infailible.*

*A mes amies Imane et Sana, pour leurs
encouragements et leur aide.*

A ma directrice Mme. RAHEM S.

A mon binôme Bouchra.

Meriem

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père « KAMEL ».

A maman « RAZIKA » pour l'amour qu'elle m'a toujours accordé en témoignage de ma reconnaissance envers sa confiance, ses sacrifices et sa tendresse.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, ma deuxième maman « Radia » que Dieu ait pitié de vous.

A mon soutien moral et source de joie et de bonheur, mon mari « SEYF EDDINE BELHEINE » pour l'encouragement et l'aide qu'il m'a toujours accordé.

A mes sœurs « Meryem », « Loubna », « Ahlem », « Nessrine » et mes frères, je leurs souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

A Mon cher binôme « MERIEM » et à toute sa famille.

A mes amis et mes proches et tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail. J'espère qu'un jour, je pourrai leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu leur prête bonheur et longue vie.

Bouchra

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction 1

Chapitre I: Revue bibliographique

I.1	La luzerne	2
I.1.1	Taxonomie de la luzerne	2
I.1.2	L'aire de répartition.....	3
I.1.3	Importance de la luzerne	3
I.1.3.1	Importance nutritionnelle.....	3
I.1.3.2	Importance fourrager	4
I.1.3.3	Importance en agriculture	4
I.1.3.4	Importance écologique.....	5
I.1.3.5	Importance socio-économique	5
I.2	Les maladies cryptogamiques des plantes	5
I.2.1	Les maladies cryptogamiques de la luzerne.....	5
I.2.1.1	La Fusariose	6
I.2.1.2	L'alternariose	7
I.2.1.3	La curvulariose	8
I.2.1.4	La stemphyliose	9
I.2.1.5	L'antracnose.....	10
I.2.1.6	Le rhizoctone Violet (<i>Rhizoctonia violacea</i>)	11
I.2.1.7	Le Pepper-spot (<i>Pseudopeziza medicaginis</i>)	12
I.2.1.8	Le mildiou (<i>Peronosphora trifoliorum</i>).....	13

I.2.1.9	La verticilliose	14
---------	------------------------	----

Chapitre II: Matériel et méthodes

II.1	Echantillonnage	15
II.2	Isolement des agents pathogènes	16
II.3	Purification des champignons	17
II.4	Identification des champignons	17
II.4.1	Etude macroscopique.....	18
II.4.2	Etude microscopique	18

Chapitre III: Résultats et discussion

III.1	Identification des champignons isolés des plantes infectées	19
III.1.1	Le Fusarium.....	19
III.1.1.1	Symptômes sur plantes.....	19
III.1.1.2	Observations macroscopique et microscopique	20
III.1.2	L'Alternaria	22
III.1.2.1	Symptômes sur plantes.....	22
III.1.2.2	Observations macroscopique et microscopique	22
III.1.3	Le Curvularia.....	24
III.1.3.1	Symptômes sur plantes.....	24
III.1.3.2	Observations macroscopique et microscopique	24
III.1.4	Le Stemphylium	26
III.1.4.1	Les symptômes sur les plantes :.....	26
III.1.4.2	Observations macroscopique et microscopique	26
Conclusion et perspectives		28
Références bibliographiques		29
Annexes.....		37

Résumé

Liste des abréviations

pH : potentiel d'Hydrogène

FRR : Fusarium Root Rot

A. : *Alternaria*

C. : *Curvularia*

S. : *Stemphylium*

F. : *Fusarium*

V. : *Verticillium*

SNV : Science de la Nature et de la Vie

NaClO : Hypochlorite de sodium

PDA : Potato Dextrose Agar

G : Grossissement

CL : Chlamyospore

MI : Microconidie

RM : Ramification

Liste des figures

Figure 1: <i>Medicago sativa</i> L.	2
Figure 2: Symptômes de la pourriture fusarienne des racines observés après l'inoculation sur la luzerne.....	7
Figure 3: Coupe longitudinale d'une racine infectée par le <i>Fusarium</i> présentant une décoloration brune rougeâtre foncée dans la stèle, ou au centre de la racine	7
Figure 4: Evolution des symptômes de lésion foliaire causés par l' <i>Alternaria</i> sur les feuilles de la luzerne.	8
Figure 5: Brûlure des feuilles par <i>Curvularia</i>	9
Figure 6: Des taches sur les feuilles de luzerne causées par le <i>Stemphylium</i>	10
Figure 7: L'antracnose forme des lésions à la base des tiges	11
Figure 8: Pieds attaqués par rhizoctone violet	12
Figure 9: Tache commune des feuilles (Pseudopeziza)	13
Figure 10: Les symptômes de mildiou sur les feuilles de la luzerne. (A) tache chlorotique sur la face supérieure	13
Figure 11: Jaunissement de la nervure centrale des feuilles de la luzerne par la verticilliose.	14
Figure 12: La luzerne cultivée.....	15
Figure 13: Des plantes de la luzerne présentent quelques symptômes des maladies cryptogamiques.....	16
Figure 14: Boîtes de pétri contenant des fragments des échantillons cultivés sur milieu PDA.....	17
Figure 15: Flétrissement d'une plante infectée par le <i>Fusarium</i>	19
Figure 16: Les symptômes de <i>Fusarium</i> sur les racines.....	20
Figure 17: Morphologie des colonies de <i>Fusarium</i> sur milieu PDA.	20
Figure 18: Aspect microscopique de <i>Fusarium</i> (Gx100).	21
Figure 19: L'aspect microscopique de <i>Fusarium</i> (Gx40)	21
Figure 20: Les brûlures d' <i>Alternaria</i>	22
Figure 21: Morphologie des colonies d' <i>Alternaria</i> sur milieu PDA.....	22
Figure 22: aspect microscopique d' <i>Alternaria</i> (Gx100).....	23
Figure 23: L'aspect microscopique d' <i>Alternaria</i> (Gx40).....	23
Figure 24: Les symptômes de <i>Curvularia</i> sur les feuilles.	24
Figure 25: Morphologie des colonies de <i>Curvularia</i> sur milieu PDA.....	24

Figure 26: L'aspect microscopique de <i>Curvularia</i> (Gx100).....	25
Figure 27: L'aspect microscopique de <i>Curvularia</i> (Gx40).....	25
Figure 28: Symptômes de <i>Stemphylium</i> sur la tige.....	26
Figure 29: Morphologie des colonies de <i>Stemphylium</i> sur milieu PDA.	26
Figure 30: L'aspect microscopique de <i>Stemphylium</i> (Gx100).	27
Figure 31 : Milieu PDA dans boîtes Pétri.....	37

Introduction

Introduction

La luzerne cultivée (*Medicago sativa L.*) est la plus importante culture de légumineuses fourragères dans les zones arides et semi-arides de l'Afrique du Nord (**Elboutahiri et al., 2010**). Dans le Sahara algérien, sa culture est de loin la principale espèce fourragère cultivée (**Chaabena et al., 2012**) . Cette espèce est une légumineuse fourragère vivace qui a une excellente valeur nutritive, une digestibilité élevée et un rendement de biomasse élevé et contribue à l'incorporation de grandes quantités d'azote (jusqu'à 250 kg / ha / an), avec un avantage économique conséquent, aidant à réduire l'application d'engrais synthétiques (**Campillo et al., 2003 ; Carlson et Huss-Danell, 2003 ; Jensen et Hauggaard Nielsen, 2003**).

Comme toutes les cultures agricoles, la luzerne est sujette à des maladies infectieuses qui peuvent limiter la production fourragère. La gestion de ces maladies est une partie importante de la production économique de luzerne. Les maladies de la luzerne peuvent réduire le rendement fourrager, réduire la qualité du fourrage et diminuer la persistance des peuplements. Parfois, les effets des maladies infectieuses peuvent être dramatiques, comme la perte du peuplement (**Vincelli et al., 2014**).

Une excellente connaissance des agents fongiques affectant la luzerne est une étape primordiale qui permet d'orienter les interventions de lutte pour réduire les pertes de rendement et le déclin de la qualité de la luzerne, résultant de ces maladies (**Qin et al., 2016**).

Dans cette optique, l'objectif assigné à ce travail est de faire un inventaire des maladies fongiques de la luzerne dans la région de Ouargla, à travers la connaissance des agents causaux. Ainsi, nous commencerons par **isoler les souches** de champignons phytopathogènes infectant les plantes malades, puis **les identifier**.

Chapitre I
Revue bibliographique

I.1 La luzerne

La luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) est la légumineuse fourragère la plus importante dans le monde (Fu et al., 2014), caractérisée par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique, grâce à une symbiose existante entre la plante et une bactérie qui se développe dans son système racinaire. La luzerne est cultivée pure ou en association avec une autre graminée (Mauriès, 1994).



Figure 1: *Medicago sativa* L. (Lauber et al., 2012)

I.1.1 Taxonomie de la luzerne

D'après l'Angiosperm Phylogenic Group III (2009) (APG III, 2009), la classification botanique de la luzerne pérenne cultivée est comme suit :

- Domaine : Eukaryota
- Règne : Plantae (Lignée verte)
- Sous règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Embranchement : Spermaphyta;
- Clade : Fabidae ou Eurosidae
- Ordre : Fabales

- Famille : Fabaceae (Légumineuses)
- Sous famille : Papilionaceae
- Tribu : Trifolieae
- Genre: *Medicago*
- Espèce: *Medicago sativa* L.

I.1.2 L'aire de répartition

Les luzernes s'accoutument des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides. Elles sont distribuées dans le bassin méditerranéen (le sud de l'Europe, l'Afrique du Nord, le proche Orient). Certaines ont été introduites en Amérique du Nord, en Australie et en Europe du Nord (**La peyronie, 1982**).

D'après **Derek et Ernest (1997)**, elles sont originaires d'Europe, d'Asie et d'Afrique et se sont répandues dans d'autres continents sous forme de mauvaises herbes. Les travaux de **Mathieu (2003)** et **Hireche (2006)** affirment qu'au cours du XIX^{ème} siècle, Les luzernes (les espèces du genre *Medicago*) ont conquis l'ensemble de la zone méditerranéenne, elles ont ensuite envahi d'autres parties du monde en particulier les continents américaines et australiens à l'occasion des différents courants de la colonisation humaine (**Delalande et al., 2007**).

Les luzernes annuelles ont parfois des distributions très limitées. Certaines espèces étant endémiques, alors que d'autres sont colonisatrices. Une étude plus précise de la distribution des espèces a été faite à partir des prospections de matériel spontané entreprise depuis de nombreuses années sur l'ensemble du bassin méditerranéen (**Prosperi et al., 1993**).

I.1.3 Importance de la luzerne

I.1.3.1 Importance nutritionnelle

La culture de la luzerne suit la présence du cheptel et plus particulièrement le cheptel bovin. Elle est consommée en vert, en foin, en déshydratée et aussi en ensilage. C'est un aliment de qualité très recherché qui permet de bons rendements laitiers (**Messioughi, 2015**).

La luzerne a une remarquable composition en acides aminés qui la rend supérieure, sur ce critère, au tourteau de soja. En plus, la Rubisco est une protéine blanche extraite des feuilles de la luzerne utilisée comme diététique en pharmacie. Elle comporte aussi une

combinaison particulièrement intéressante de minéraux et d'oligo-éléments et riche en vitamines du groupe B, C, D, E et A (**Schoutteten, 2004**).

I.1.3.2 Importance fourrager

Parmi les nombreuses utilités de la luzerne, la plus importante est celle liée à l'alimentation du bétail. La luzerne est une plante fourragère par excellence car elle est une véritable source de protéines et de carotène (**Zanin, 1998**).

I.1.3.3 Importance en agriculture

L'intérêt de luzerne réside également dans le rôle important qu'elle joue dans l'amélioration de la structure des sols liée à son important système racinaire et qui laisse aussi un tonnage important de matière organique humifiable (**Adem, 1974 ; Pousset, 2002**).

La luzerne a la capacité d'assurer sa nutrition azotée grâce à la fixation symbiotique et aussi par la voie de l'absorption de l'azote minérale de sol. Son rôle d'espèce épuratrice de nitrates grâce à ses possibilités de captage d'azote en profondeur est du plus vif intérêt (**Genier et Al., 1992**).

La luzerne peut s'adapter à de nombreux types de sol mais elle tolère mal les sols acides (pH inférieur à 5) ou très humides, qui sont plus propices au trèfle violet. Sa préférence va aux sols sains et profonds qui lui permettent de développer son enracinement pivotant. C'est cet enracinement, qui peut descendre jusqu'à 10 m de profondeur, qui lui donne une grande facilité d'adaptation en lui permettant de résister à des conditions extérieures défavorables, notamment la sécheresse. Une grande variabilité génétique lui a également permis de s'imposer dans des milieux très contrastés des plus chauds aux plus froids (**Chedjerat, 2017**).

La luzerne est caractérisée par une teneur en Matière Azotée Totale (MAT) importante qui peut varier de 14 à 29 % de la Matière Sèche (MS) selon le stade, les époques et les modes de récolte. La luzerne fixe l'azote atmosphérique mais elle utilise préférentiellement l'azote nitrique présent dans le sol, la concentration en azote nitrique du sol diminue d'année en année lors d'une culture de luzerne. La luzerne permet donc de récupérer et de soustraire au lessivage les surplus de nitrates présents dans le sol, protégeant ainsi les nappes phréatiques (**Zanin, 1998**).

I.1.3.4 Importance écologique

La luzerne est caractérisée par une teneur en Matière Azotée Totale (MAT) importante qui peut varier de 14 à 29 % de la Matière Sèche (MS) selon le stade, les époques et les modes de récolte. La luzerne fixe l'azote atmosphérique mais elle utilise préférentiellement l'azote nitrique présent dans le sol, la concentration en azote nitrique du sol diminue d'année en année lors d'une culture de luzerne. La luzerne permet donc de récupérer et de soustraire au lessivage les surplus de nitrates présents dans le sol, protégeant ainsi les nappes phréatiques (Zanin, 1998).

I.1.3.5 Importance socio-économique

Le rôle socio-économique de la luzerne est important. Il est dû essentiellement à sa grande productivité et, surtout, au fait que son produit est destiné à des utilisations très différentes. L'utilisation alimentaire, et plus précisément l'utilisation fourragère même s'il y a des usages pour la nourriture de l'homme, est de loin la plus importante, soit comme fourrage vert (affouragement à l'auge, pâture), soit comme fourrage conservé (foin, ensilage), soit comme concentré (luzerne déshydratée) (Thiébeau et al., 2003).

I.2 Les maladies cryptogamiques des plantes

Une maladie cryptogamique ou fongique est une maladie causée par un champignon parasite et représente 90 % des maladies affectant les plantes. Les effets de la maladie sur la plante sont d'abord invisibles car elles affectent seulement quelques cellules dans le tissu. Mais peu après, les changements deviennent visibles à l'œil nu (tache sur feuille, tige... etc.) car les réactions deviennent plus développées. Ces changements visibles sont appelés symptômes et la maladie peut être considérée comme toutes les réponses visibles et invisibles des cellules et tissus de la plante aboutissant à une malformation partielle ou totale et la mort de la plante (Lepoivre, 2006).

I.2.1 Les maladies cryptogamiques de la luzerne

Les maladies de la luzerne peuvent entraîner des pertes importantes sur le rendement et la qualité à la fois. Les maladies des semis peuvent obstruer la création de support. Les maladies du flétrissement réduisent le peuplement densité et rendements. Les maladies des feuilles et des tiges provoquent une perte prématurée de feuilles et donc réduire la valeur

nutritive du fourrage. Les pourritures des racines et du collet affaiblissent les plantes et sont un facteur limitant de la persistance des peuplements (**Bowden, 1998**).

I.2.1.1 La Fusariose

Divers agents pathogènes fongiques transmis par le sol peuvent attaquer les plants de luzerne, entraînant des réductions de l'établissement du peuplement, du rendement, de la qualité du fourrage et de la longévité. Les maladies de la pourriture causées par les espèces de *Fusarium* sont un problème courant dans de nombreuses régions productrices de luzerne dans le monde, notamment aux États-Unis, au Canada, en Australie et en Russie (**Uddin et Knous, 1991; Samac et al., 2013**). En Chine, la pourriture des racines induites par *Fusarium* (FRR) de la luzerne a été identifiée pour la première fois en 1991 (**Wang et al., 1996; Wang et al., 2005; Cao et al., 2008; Li et al., 2009**). La présence de FRR a progressivement augmenté dans les régions de production de luzerne et entraîné des pertes économiques considérables (**Yi et al., 2017**).

La FRR du luzerne est caractérisée par la présence de lésions nécrotiques en forme de coin brun foncé à noires dans le cortex des racines des branches et de la racine pivotante (**Salter et al., 1994**).

Les symptômes de la maladie au-dessus du sol comprennent la chlorose des feuilles et la canopée inférieure (**Couture et al., 2002; Zaccardelli et al., 2006**). Les plants de luzerne touchés présentent également une décoloration brunâtre et des symptômes de trempage dans l'eau (water-soaking symptoms), ainsi que la pourriture des graines (**Al-Askar et al., 2013**). Le développement du FRR s'accompagne souvent de pourriture du collet (**Samac et al., 2013**) et les champignons ont tendance à endommager les plantes qui sont déjà affaiblies ou endommagées par d'autres facteurs de stress (**Wang et al., 2010; Al-Askar et al., 2012**).

Généralement, les peuplements de luzerne sont capables de survivre pendant 10 ans ou plus (**Liu et al., 2015**). Une fois touchés par *Fusarium sp.*, la majorité des champs de luzerne ont montré des baisses de rendement même au cours de la deuxième année (**Wallenhammar et al., 2008**). L'utilisation de variétés résistantes est la méthode la plus économique et la plus écologique pour lutter contre la pourriture des racines (**Cong et al., 2017**).

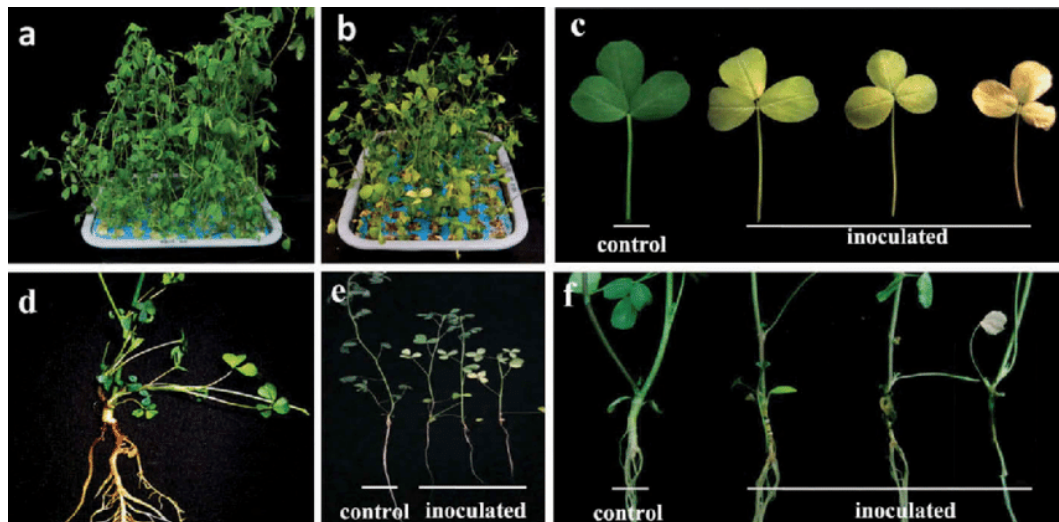


Figure 2: Symptômes de la pourriture fusarienne des racines observés après l'inoculation sur la luzerne. (a) Groupe témoin; (b) Deux semaines après l'inoculation; (c) Les troisièmes feuilles présentant une gravité variable de l'infection; (d) Symptômes de la pourriture fusarienne des racines 2 semaines après l'inoculation; (e) Plantes de luzerne présentant une gravité d'infection variable après l'inoculation; (f) Racines 2 semaines après l'inoculation (**Cong et al., 2017**).

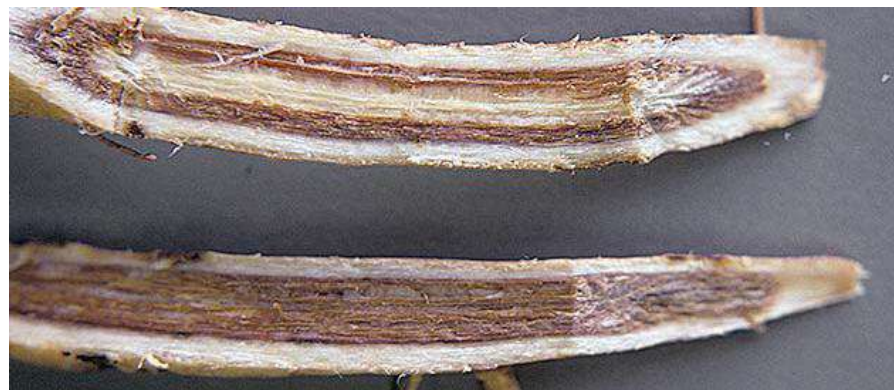


Figure 3: Une coupe longitudinale d'une racine infectée par le *Fusarium* présentant une décoloration brune rougeâtre foncée dans la stèle, ou au centre de la racine (**Orloff, 1996**).

I.2.1.2 L'alternariose

Alternaria est un champignon phytopathogène commun trouvé dans le monde entier. Il provoque des symptômes distincts sur les feuilles de différents hôtes. De nouveaux rapports sur les pathogènes d'*Alternaria* causant des taches foliaires et des symptômes de brûlure sur la

luzerne ont également été signalés au Brésil (Ávila *et al.*, 2015), en Chine (Wang et Wang, 2010), en Canada (Abbasi *et al.*, 2018) et en Inde (Maiti *et al.*, 2007). Les rapports du Brésil, de Chine et du Canada ont trouvé *A. alternata* comme l'agent causal, alors que le premier rapport de l'Inde décrivait l'agent pathogène comme étant *A. longipes* sur la base des observations culturales et morphologiques uniquement, mais aucune confirmation n'a été faite par des méthodes moléculaires (Abbasi *et al.*, 2018).

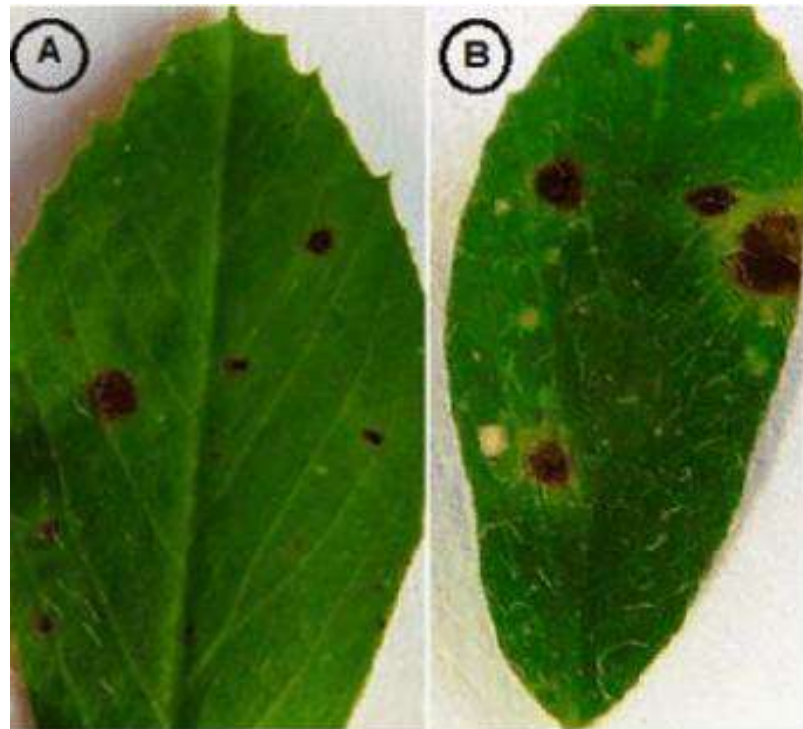


Figure 4: Evolution des symptômes de lésion foliaire causés par l'*Alternaria* sur les feuilles de la luzerne. (A) 7 jours après l'inoculation ; (B) 14 jours après l'inoculation (Miguel *et al.*, 2015).

I.2.1.3 La curvulariose

Le champignon hyphomycète *Curvularia geniculata* est un pathogène foliaire facultatif pour de nombreuses espèces végétales: notamment le pâturin des prés (*Poa pratensis*) (Rogerson, 1956), les herbes en Floride (Bailey et Muchovej, 2001), l'herbe des Bermudes au Mississippi (Pratt, 2005), le riz en Chine (Jin, 1989) et les céréales en Ouzbékistan (Khasanov *et al.*, 1990). Les agents pathogènes foliaires fongiques de la luzerne, y compris *C. geniculata*, causent des dommages en réduisant les performances générales de la plante en

tant que fourrage en affectant des facteurs tels que le cycle de vie et la densité de population de la plante et donc la qualité du fourrage (Elgin et al., 1988).

Les lésions apparaissent d'abord comme des parties décolorées jaunes puis brunes et deviennent des lésions caractéristiques en forme de V divisées par la nervure foliaire. Lorsque le pétiole est infecté, la feuille se flétrit et est rapidement morte. Lorsqu'elle survient sévèrement, la plante entière ressemble à une brûlure et le rendement diminue beaucoup. Les dégâts sont plus importants sur feuilles jeunes que sur les vieilles (NILGS, 2001).



Figure 5: Brûlure des feuilles par *Curvularia* (NILGS, 2001).

I.2.1.4 La stemphyliose

Les tâches des feuilles et de tige de *Stemphylium* sont causées par le champignon *Stemphylium botryosum*. Cette maladie est également appelée «Target spot». Cet agent est plus fréquent dans les peuplements luxuriants après un temps chaud et humide et lorsque la récolte est retardée. Le symptôme le plus notable est la formation de lésions brunes ovales à allongées avec des centres plus clairs, s'agrandissant pour former des zones concentriques claires et brun foncé (Isleib, 2011; Telenko et Johnson, 2019). Une seule grande lésion peut faire jaunir et tomber la feuille. Les lésions plus anciennes peuvent être recouvertes d'un moule semblable à de la suie. La maladie hiverne sur de vieilles tiges infectées ou sur des graines (Isleib, 2011).



Figure 6: Des taches sur les feuilles de luzerne causées par le *Stemphylium* (Telenko et Johnson, 2019).

I.2.1.5 L'anthraxose

C'est une maladie causée par le champignon *Colletotrichum trifolii* dans les peuplements de luzerne plus âgés. L'anthraxose provoque dans les parcelles des pieds malades. A la base des tiges des plantes atteintes se forment des lésions beiges, d'un ou plusieurs centimètres, de forme losangique ou fusiforme, bordées de brun. Au centre de ces lésions, la teinte est gris clair et ponctuée de brun foncé. La tige reste verte alors que les feuilles se flétrissent et deviennent jaunes. Puis la tige se dessèche en se courbant en crosse au sommet (Frate et Davis, 2008 ; Simonneau et al., 2011).

Le champignon se conserve sous forme de mycélium dans les débris végétaux morts et dans les tissus malades des collets de la luzerne en place. Il émet ensuite des spores par forte humidité et des températures voisines de 20°C (Simonneau et al., 2011).



Figure 7: L'anthracnose forme des lésions à la base des tiges (Simonneau et *al.*, 2011).

I.2.1.6 Le rhizoctone Violet (*Rhizoctonia violacea*)

Champignon signalé dans de nombreux pays sur différentes plantes, et notamment diverses espèces légumières, ceci plus ou moins gravement, Pérenniser sur différents substrats et hôtes alternatifs, cultivés ou non : luzerne, safran et de nombreuses mauvaises herbes (*Agropyron repens*, *Rumex acetosella*) (Blancard, 2015).

Dans le champ, la maladie se répartit par taches. Les plantes malades jaunissent, flétrissent ou dessèchent. Le collet et le pivot racinaire sont cernés par un manchon de pourriture plus ou moins sèche, violacée, parcourue par des filaments violets et évoluant vers une pourriture plus molle (Simonneau et *al.*, 2011).



Figure 8: Pieds atteints par rhizoctone violet (Simonneau et al., 2011).

I.2.1.7 Le Pepper-spot (*Pseudopeziza medicaginis*)

C'est une maladie cryptogamique de luzerne qui est surtout visible en hiver et au début de printemps (Frate et Davis, 2008).

Les symptômes apparaissent sur les feuilles. La maladie provoque des petites ponctuations noires ou brunes (Pepper-spot ou tache de poivre), de 0.3 cm de diamètre, entourées d'un halo clair. Lorsque ces taches sont nombreuses, elles confluent et la feuille se dessèche partiellement ou totalement. À la fin du printemps et en automne, à la suite de périodes humides et fraîches, le champignon produit des fructifications circulaires, brunes appelées « apothécies » à l'intérieur des taches (Frate et Davis, 2008).



Figure 9: Tache commune des feuilles (*Pseudopeziza*) (Telenco et Johnson, 2019).

I.2.1.8 Le mildiou (*Peronospora trifoliorum*)

Le mildiou est fréquent sur les jeunes cultures et les repousses de la luzerne dans les zones tempérées à climat humide vers la fin du printemps et en automne car le champignon a besoin d'humidité pour former des spores (Yang, 2009).

La maladie présente des symptômes de feutrage gris violacé sur la face inférieure de la feuille et à l'extrémité de la tige, et la surface supérieure des feuilles devient vert claire (Frate et Davis, 2008).

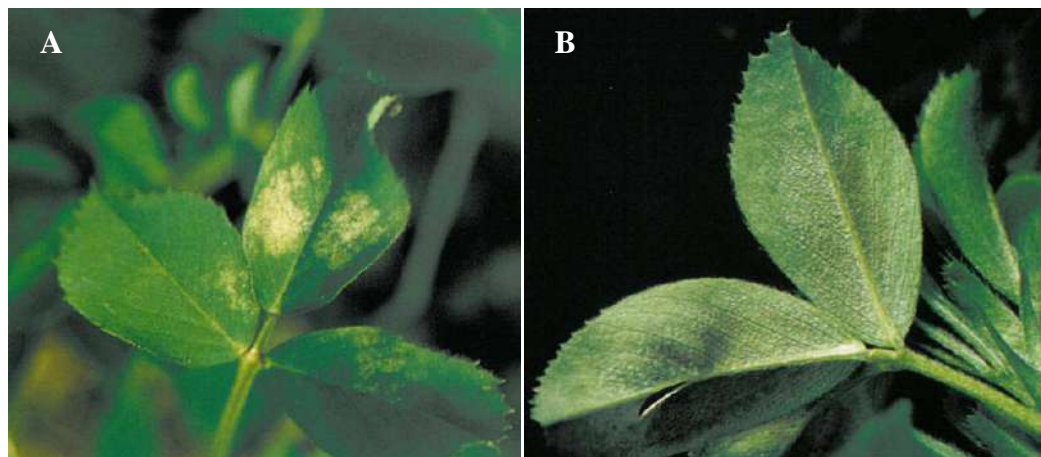


Figure 10: Les symptômes de mildiou sur les feuilles de la luzerne. (A) tache chlorotique sur la face supérieure ; (B) fructification grises sur la face inférieure (Simonneau et al., 2011).

I.2.1.9 La verticilliose

La verticilliose de la luzerne est une maladie causé par le champignon *verticillium albo-atrum*, une maladie grave comprennent le jaunissement des extrémités des feuilles, parfois en forme de V. il est important de remarquer que la tige demeure verticale et verte **(Frate et Davis, 2008)**.

Les symptômes comprennent le jaunissement et la défoliation de quelques branches jusqu'à un flétrissement massif de la plante entière, les bords des feuilles ont tendance à rouler vers l'intérieur, Une décoloration du tissu vasculaire peut être observée lorsqu'une plante infectée est coupée longitudinalement **(DeSavigny, 2005)**.



Figure 11: Jaunissement de la nervure centrale des feuilles de la luzerne par la verticilliose **(Simonneau et al., 2011)**.

Chapitre II
Méthodologie de travail

II.1 Echantillonnage

Les plantes de luzerne ont été prélevées au niveau de l'exploitation agricole de la faculté SNV, en mois de décembre 2019, sous une température de 16 °C. L'échantillonnage est effectué de façon ciblée sur des plantes malades qui présentaient des symptômes de maladies cryptogamiques. Une fois la collecte terminée, les plantes sont transportées, au laboratoire pédagogique de microbiologie appliquée, pour l'isolement des agents pathogènes.



Figure 12: La luzerne cultivée



Figure 13: Des plantes de la luzerne présentent quelques symptômes des maladies cryptogamiques.

II.2 Isolement des agents pathogènes

Les plantes de luzerne collectées et présentant divers symptômes de maladies sur feuilles, tiges, collets et racines ont été découpées séparément en petits fragments (2 à 5 mm). Ces fragments sont rincés à l'eau distillée puis désinfectés superficiellement à l'hypochlorite de sodium 5° (NaClO) et rincés encore à l'eau distillée stérile (chaque étape a été faite pendant 5 min) (Dongmo *et al.*, 2017).

Les fragments sont ensuite déposés dans des boîtes de pétri, contenant le milieu PDA (Annexe 1). Les boîtes sont mises à incuber sous une température de 28°C pendant 5 à 7 jours (Dongmo et al., 2017).



Figure 14: Boîtes de pétri contenant des fragments des échantillons cultivés sur milieu PDA.

II.3 Purification des champignons

La purification a été réalisée par transfert des mycéliums des colonies développées sur de nouvelles boîtes contenant le milieu de culture PDA (chaque colonie repiquée dans une boîte) à raison de trois répétitions. Les boîtes sont incubées à une température de 28°C pendant 7 à 15 jours.

Les souches pures ont été conservées à 4°C pour leur identification ultérieure (Dongmo et al., 2017).

II.4 Identification des champignons

Les champignons microscopiques présentent une grande variabilité physiologique, mais aussi une grande variabilité génétique. Conventionnellement, l'identification des genres fongiques repose sur l'observation des critères morphologiques par l'observation macroscopique et microscopique (Leslie et Summerell, 2006).

II.4.1 Etude macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation des colonies à l'œil nu. L'observation des caractères porte sur : l'aspect de la colonie qui représente un critère clef d'identification (couleur de la surface et du revers de la boîte, texture de la surface des colonies...etc.) et l'aspect des bordures des colonies (**Botton et al., 1990**).

II.4.2 Etude microscopique

Afin de prélever des spores et des filaments mycéliens de la souche fongique à identifier, un morceau de scotch est mis sur la culture puis déposé sur une lame contenant une goutte de l'eau physiologique ou bien une goutte de rouge Congo qui permet la coloration de la chitine et de la callose et donner une meilleure observation. L'observation microscopique permet la visualisation de la forme du mycélium, la présence ou l'absence de septum et les caractéristiques des fructifications et des spores (**Leslie et Summerell, 2006**).

Cette étape a été faite au niveau de laboratoire microbiologique de la faculté de médecine –université Kasdi Merbah Ouargla-.

Chapitre III
Résultats et Discussion

III.1 Identification des champignons isolés des plantes infectées

L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de (Leslie et Summerell, 2006), en se basant sur les caractères macroscopiques culturaux et ceux retenus après l'observation au microscope optique. En effet, les genres fongiques purifiés et identifiés au cours de cette étude sont représentés par le cas des espèces de: *Alternaria*, *Fusarium*, *Curvulria*, *Stemphylium*.

III.1.1 Le *Fusarium*

III.1.1.1 Symptômes sur plantes

Commence par le jaunissement et le flétrissement de la plante, jusqu'à ce que la plante entière sèche, en raison de la pourriture de la racine et du collet (Teixeira et al., 2017).



Figure 15: flétrissement d'une plante infectée par le *Fusarium*.
(Le cercle indique le jaunissement de la plante infectée).

Sur les racines, le flétrissement peut être identifié par la coloration rougeâtre brune foncé dans le centre de la racine pivotante (Orloff, 1996).



Figure 16: Les symptômes de *Fusarium* sur les racines.

III.1.1.2 Observations macroscopique et microscopique

Les isolats ont produit des pigments jaunes à brun clair principalement au centre de la colonie recouverts de coton blanc riche en mycélium comme indiqué par Ignjatov *et al.* (2018).

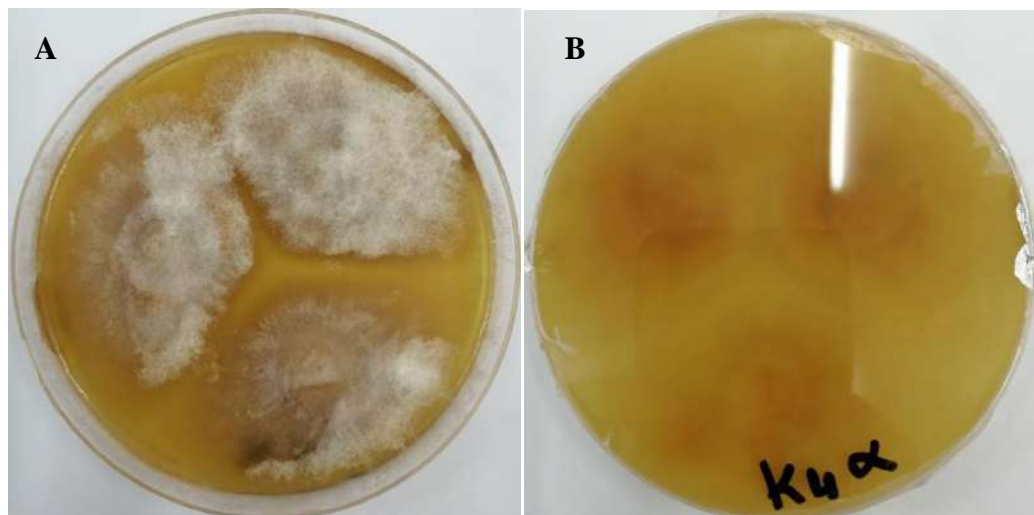


Figure 17: Morphologie des colonies de *Fusarium* sur milieu PDA. (A) la surface des colonies; (B) le revers des boites.

L'analyse morphologique de la structure microscopique des isolats obtenus a montré des hyphes fins, cloisonnés qui présentent de nombreuses ramifications (Sedra et Djerbi, 1986), des microconidies de forme variée, de forme elliptique à cylindrique, des chlamydospores rondes, lisses, isolées ou par paires aux extrémités des hyphes ou avec eux (Teixeira et al., 2017).

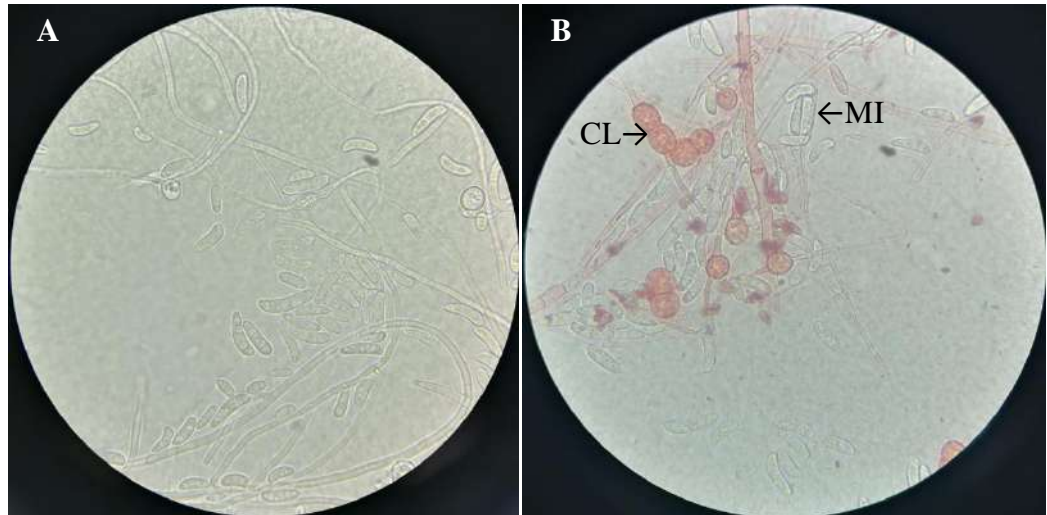


Figure 18: L'aspect microscopique de *Fusarium* (Gx100). (A) à l'état frais ; (B) après la coloration avec rouge Congo : CL-Chlamydospores ; MI- microconidie.

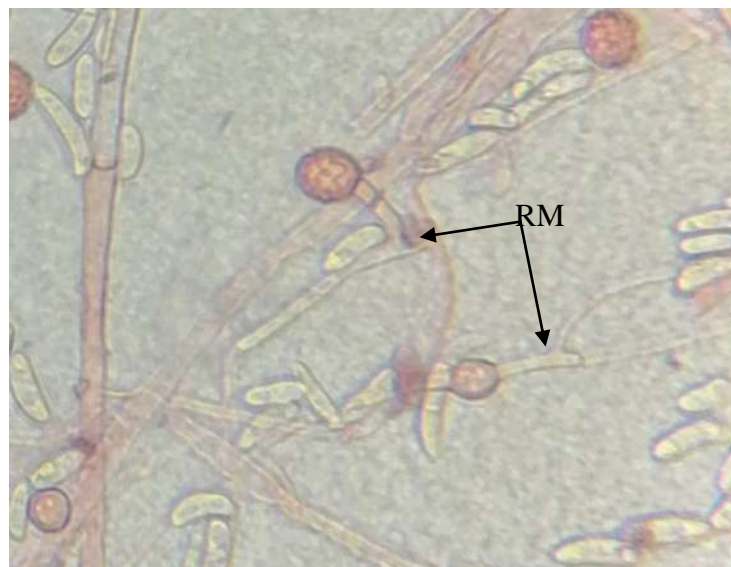


Figure 19: L'aspect microscopique de *Fusarium* (Gx40) après la coloration avec rouge Congo : RM- Ramification

III.1.2 L'Alternaria

III.1.2.1 Symptômes sur plantes

La brûlure d'*Alternaria* est caractérisée par des lésions nécrotiques avec un centre brun grisâtre entouré d'un halo sur les feuilles et la tige (Kgatle et al., 2020).

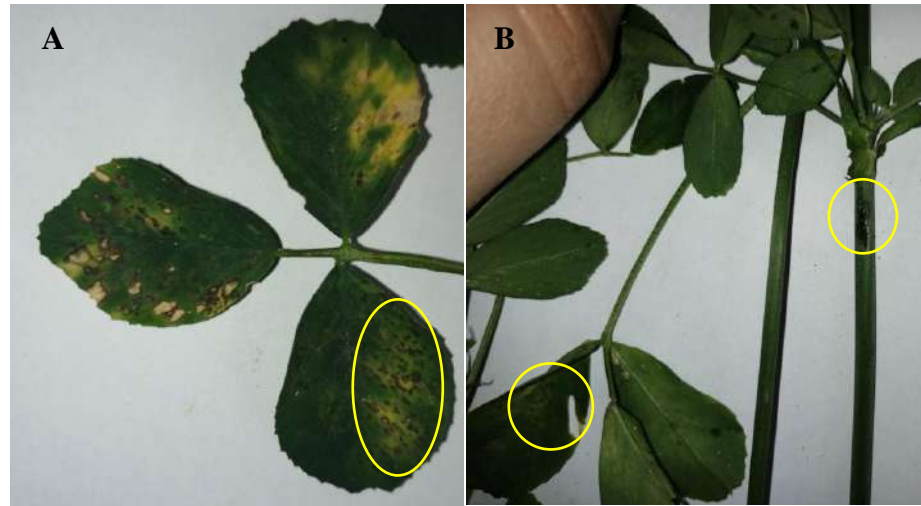


Figure 20: Les brûlures d'*Alternaria*. (A) sur les feuilles ; (B) sur la tige.
(Les cercles présentent les symptômes d'Alternariose)

III.1.2.2 Observations macroscopique et microscopique

L'isolat sur milieu PDA présente des colonies de couleur gris clair puis virent du vert foncé au noir avec une marge blanche. Leurs revers sont noirs et leurs croissances est rapide (trois jours d'incubation) (Yu et al., 2015).

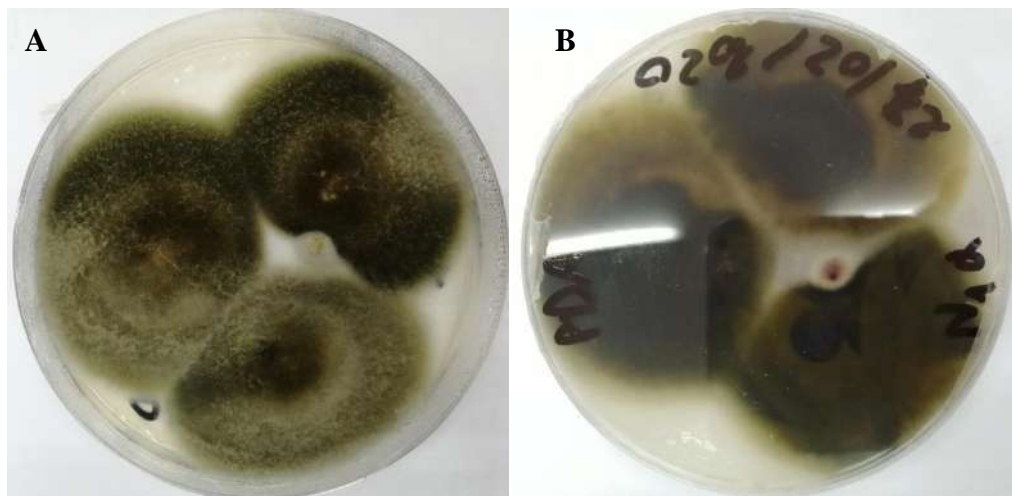


Figure 21: Morphologie des colonies d'*Alternaria* sur milieu PDA. (A) la surface des colonies ; (B) le revers des boîtes.

A l'échelle microscopique, le champignon présente un mycélium cloisonné associé à la présence de conidies pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières, souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement avec des conidiophores à croissance sympodiale foncées, simples ou ramifiés. Basé sur ces caractéristiques morphologiques et la description d'*Alternaria* comme cité par **Woudenberg et al. (2013)**, le pathogène a été identifié comme *Alternaria*.

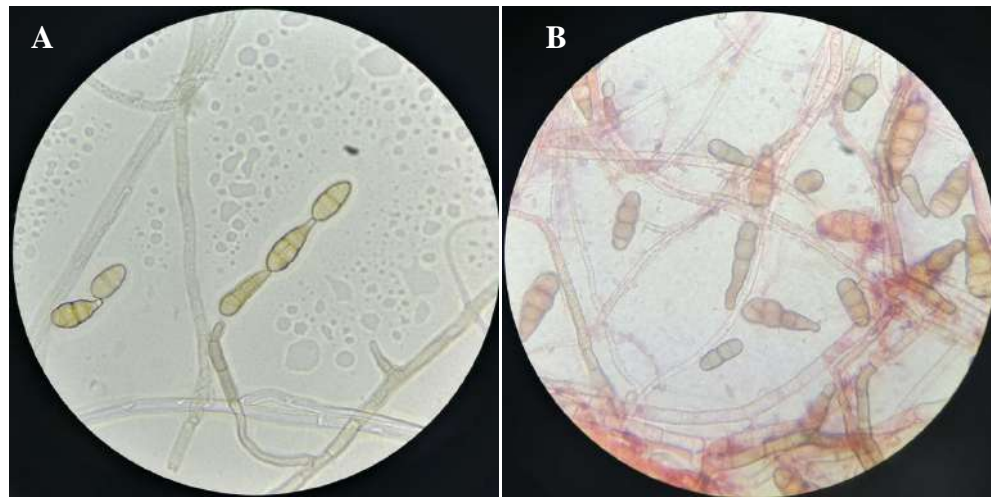


Figure 22: L'aspect microscopique d'*Alternaria* (Gx100). (A) à l'état frais ; (B) après la coloration avec le rouge Congo.



Figure 23: L'aspect microscopique d'*Alternaria* (Gx40) à l'état frais : RM- Ramification

III.1.3 Le *Curvularia*

III.1.3.1 Symptômes sur plantes

Des taches bruns foncés circulaires ou de forme V entourées par des marges jaunes sont observées (Zhang *et al.*, 2017).



Figure 24: Les symptômes de *Curvularia* sur les feuilles.
(Les cercles présentent les symptômes de Curvulariose)

III.1.3.2 Observations macroscopique et microscopique

Les colonies de *Curvularia* sont circulaires à marge légèrement ondulée, brun verdâtre à bord incolore, plus pâle avec l'âge, mycélium aérien abondant, très floconneux avec l'âge, revers brun foncé à noir verdâtre, plus noir avec l'âge (Mehrabi-Koushki *et al.*, 2018; Kiss *et al.*, 2019; Kee *et al.*, 2020).

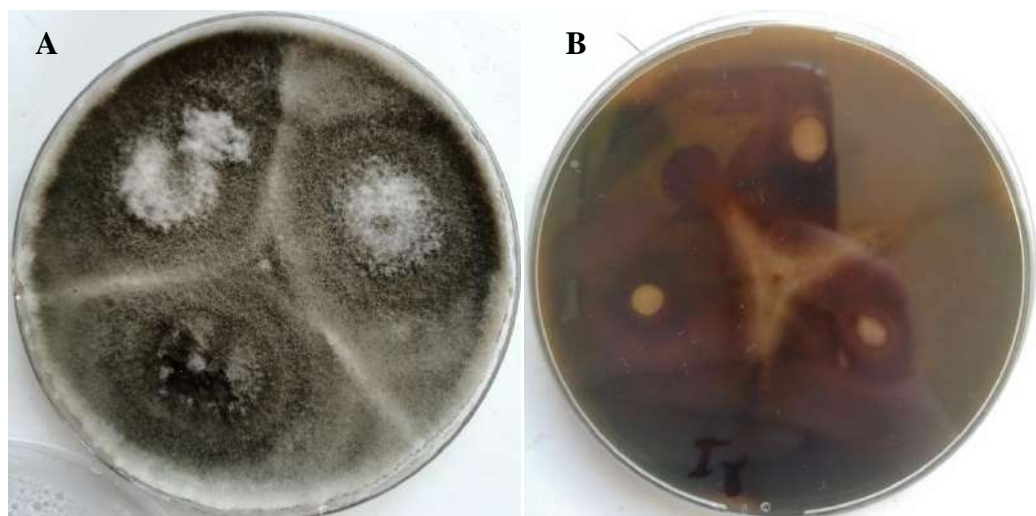


Figure 25: Morphologie des colonies de *Curvularia* sur milieu PDA. (A) la surface des colonies ; (B) le revers des boîtes.

Selon (Kiss *et al.*, 2019), les caractéristiques morphologiques de *Curvularia* montrent des hyphes cloisonnés, lisses, conidiophores érigés, souvent ramifiés, dans la plupart des cas géniculées vers l'apex, cellules conidiogènes intégrées, terminales ou intercalaires avec prolifération sympodiales, lisse, polytrétique. Les chlamydospores non observées. Les conidies ellipsoïdales à obovoïde, asymétrique avec des cellules terminales.

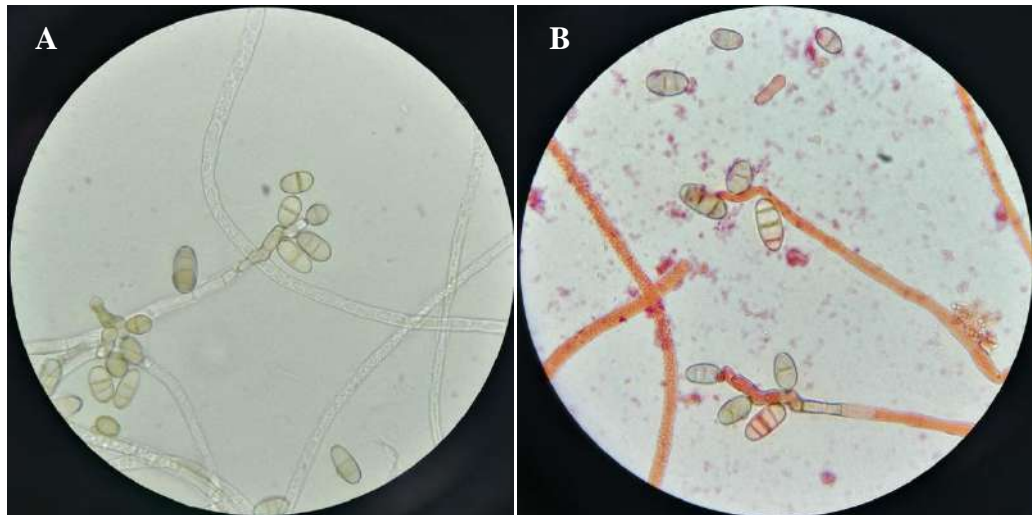


Figure 26: L'aspect microscopique de *Curvularia* (Gx100). (A) à l'état frais ; (B) après la coloration avec rouge Congo.

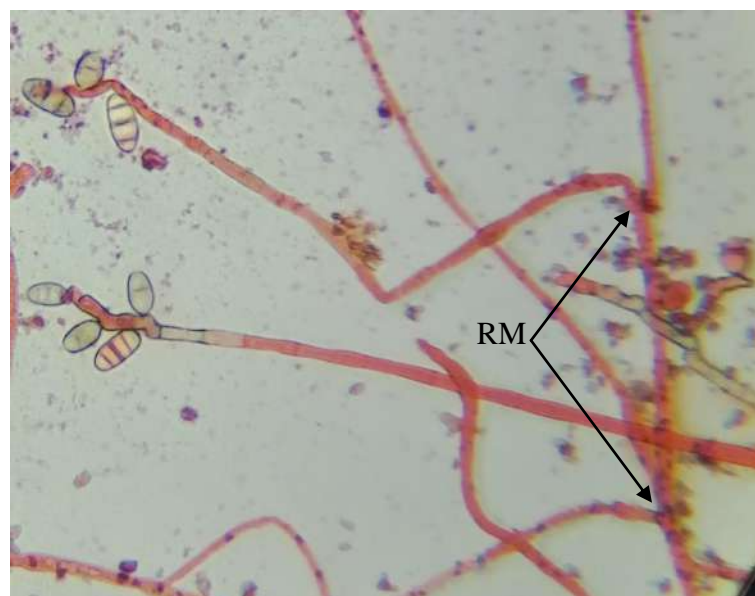


Figure 27: L'aspect microscopique de *Curvularia* (Gx40) après la coloration avec rouge Congo : RM- Ramification

III.1.4 Le Stemphylium

III.1.4.1 Les symptômes sur les plantes :

Des taches brun foncé ou de couleur beige avec une marge sombre apparaissant sur les tiges (Isleib, 2011).



Figure 28: Symptômes de *Stemphylium* sur la tige.
(Les cercles présentent les symptômes de Stemphyliose)

III.1.4.2 Observations macroscopique et microscopique

Les colonies de *Stemphylium* ont des marges ondulées. Elles étaient caractérisées par une pigmentation mycélienne hétérogène (de couleur brun jaunâtre à rose et veloutée). Au revers de la boîte, le pigment est brun jaunâtre qui vire progressivement au brun rougeâtre, avec présence d'un pigment orange diffusant dans le milieu de culture (Nasehi et al., 2015; Franco et al., 2017; Kee et al., 2018).

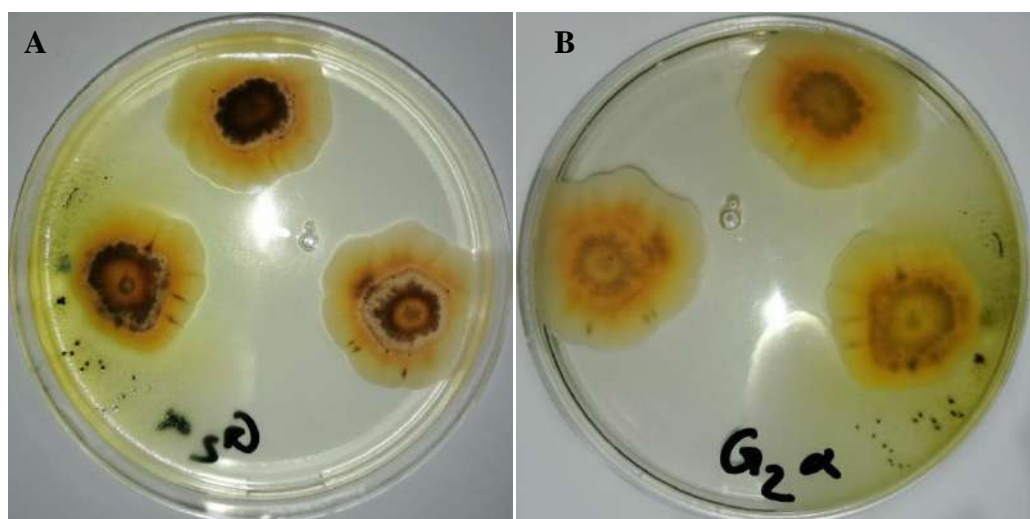


Figure 29: Morphologie des colonies de *Stemphylium* sur milieu PDA. (A) la surface des colonies ;(B) revers des boîtes.

Les conidiophores sont érigés, simples à formation nodale, portant une seule conidie. Des conidies solitaires, ovoïdes à cylindriques avec extrémité arrondie, une à deux cellules lorsqu'elles sont immatures (**Donayer et Dalisay, 2016**).

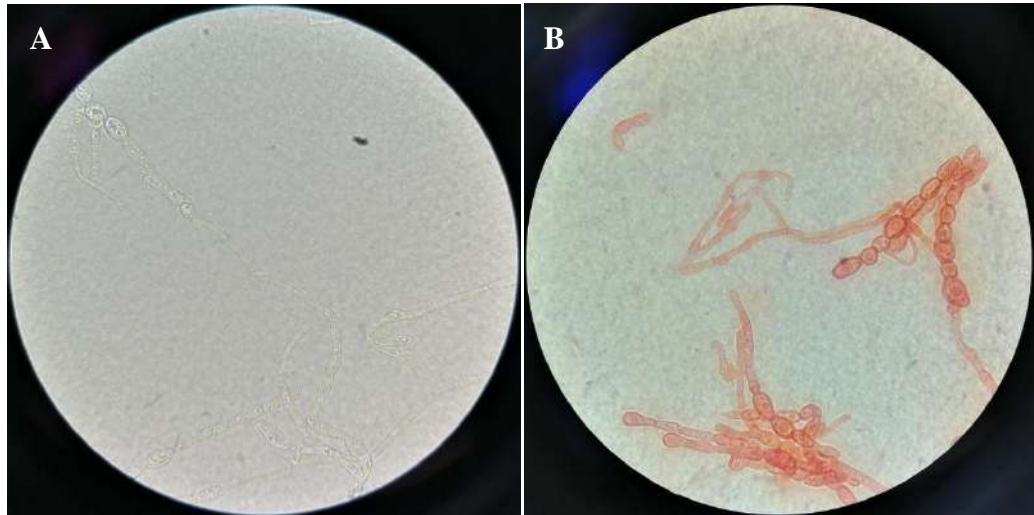


Figure 30: L'aspect microscopique de *Stemphylium* (Gx100). (A) à l'état frais ; (B) après la coloration avec rouge Congo.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

Le travail présenté dans cette étude porte sur l'isolement et l'identification des genres fongiques phytopathogènes à partir des feuilles, tiges et les racines de la luzerne.

Les résultats de l'examen macroscopique et microscopique de ces champignons ont mis en évidence 4 souches fongiques appartenant à 4 genres différents, qui sont : *Alternaria*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Stemphylium*.

Nous estimons que les résultats auxquels nous sommes parvenus restent partiels et méritent d'être poursuivis par :

- L'élargissement de notre champ d'investigation sur d'autres stations de la région de Ouargla ;
- L'isolement et l'identification d'autres genres des champignons phytopathogènes pour la luzerne susceptibles d'être présents dans la région d'étude pour faciliter l'intervention du lute et diminuer les pertes de rendement ;
- L'introduction de souches bactériennes antagonistes (les rhizobia) pour la réalisation d'essais de biocontrôle de ses maladies fongiques.

Références bibliographiques

Abbasi, P. A., Ali, S., Renderos, W., Naeem, H. A., et Papadopoulos, Y. (2018). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot and blight symptoms on alfalfa in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(3), 451-455.

Adem L. (1974). Etude du comportement des luzernes annuelles (écotypes locaux et populations étrangères) dans les régions de Sétif, Médéa, Tiaret et Alger. Mémoire Ing. INA.Alger. 95p.

Al-Askar A.A., Ghoneem K.M. et Rashad Y.M. (2013). Management of some seed-borne pathogens attacking alfalfa plants in Saudi Arabia. *Afr J Microbiol Res.* 7:1197-1206.

Al-Askar A.A., Ghoneem K.M. et Rashad Y.M. (2012). Seed-borne mycoflora of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in the Riyadh region of Saudi Arabia. *Ann Microbiol.* 62:273-281.

APG III (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.

Ávila M.R., Agnol M.D., Koshikumo E.S.M., Martinelli J.A., Silva G.B.P. et Schneider-Canny R. (2015). First report in southern Brazil of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* leaf spot in alfalfa (*Medicago sativa*). *African J Agric Res.* 10:491–493.

Bailey C.C. et Muchovej J.J. (2001). Seed pathology of native scrub grasses. Proceedings of the 114th Annual Meeting of the Florida State Horticultural Society, Stuart, Florida, 114: 236-237.

Blancard D. (2015). *Helicobasidium purpureum* (Tul.)Pat. Pourriture racinaire violette. Ephyteria-tous droit réservés.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ème Ed. Masson 426p.

Bowden R.L. (1998). Alfalfa Production Handbook : Disease Management. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. 36p.

- Campillo R.R., Urquiaga C.S., Pino N.I. et Montenegro B.A. (2003).** ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS FORRAJERAS MEDIANTE LA METODOLOGÍA DEL 15N. *Agricultura Técnica*, 63(2).
- Cao L.X., Zhao C.H., Bai Q.J. et Shao ZZ. (2008).** Identification of the pathogens causing root rot of alfalfa in Inner Mongolia. *Acta Agriculture Boreali-Sinica*.23:105-107.
- Carlsson G. et Huss-Danell K. (2003).** Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant and Soil*, 253(2), 353-372.
- Chaabena A., Laouar M., Boudebbous I., Cahouki I., Bentebba F., Madani H. et Abdelguerfi A. (2012).** Behaviour of some alfalfa populations from algerian oasis. In : Acar Z. (ed.), López-Francos, A. (ed.), Porqueddu, C. (ed.). *New approaches for grassland research in a context of climate and socioeconomic changes*. Zaragoza : CIHEAM. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 102, 191-196
- Chedjerat A. (2017).** Comportement de seize cultivars de luzerne pérenne (*Medicago sativa L.*) conduits en pluvial et en irrigué dans les conditions du Bas Chélif. Ecole nationale supérieure d'agronomie (ENSA d'El-Harrach) <http://dspace.ensa.dz:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1962/CHEDJERAT%2c%20Abed.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Cong L.L., Sun Y., Wang Z., Kang J.M., Zhang T.J., Biligetu B. et Yang Q.C. (2017).** A rapid screening method for evaluating resistance of alfalfa (*Medicago sativa L.*) to Fusarium root rot. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(1), 61-69.
- Couture L., Dhont C., Chalifour F.P., Drapeau R., Tremblay G., Castonguay Y., Bélanger G. et Nadeau P. (2002).** Fusarium root and crown rot in alfalfa subjected to autumn harvests. *Can J Plant Sci*. 82:621-624.
- Delalande M., Greene S., Hughes S., Nair R., Huguet T., Aouani M.E., et Prospero J.M. (2007).** Wild accessions / populations. *Medicago truncatula handbook* 1-27
- Derek M.B., Ernest S. (1997).** Les légumes du Canada. NRC Research Press, Amazon France.

- DeSavigny T. (2005).** *Verticillium albo-atrum*. Soilborne plant pathogens. North Carolina State University. PP 728
- Donayre D.K.M. et Dalisay T.U. (2016).** Identities, characteristics, and assemblages of dematiaceous-endophytic fungi isolated from tissues of barnyard grass weed. *Philipp J Sci.* 145 (2): 153–164.
- Dongmo G.Z., Djeugap J.F., Fenohi N., Kenfack N. D., Takuete R. et Teguefouet P. (2017).** Contribution à l'identification des champignons de post-récolte associés aux amandes de *Ricinodendron heudelotii* et *Garcinia kola* collectées dans les Hauts Plateaux de l'Ouest Cameroun. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(4), 1840.
- Elboutahiri N., Thami-Alami I. et Udupa, S.M. (2010).** Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology*, 10(1), 15.
- Elgin J.R., Welty R.E. et Gilchriti D.B. (1988).** Breeding for disease and nematode resistance. In: alfalfa and alfalfa improvement. *Agronomy* 29: 827-858.
- Franco M.E.E., López S. M. Y., Lucentini G., Troncozo M. I., Saparrat M. C. N. et Ronco B. L. et Balatti P. A. (2017).** *Corynespora cassicola* and *Stemphylium lycopersici* infection and disease development on tomatoes in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes*, 12(1), 2.
- Frat C.A. et Davis M.R. (2008).** Alfalfa diseases and management. University of California. Division of agriculture and natural resources. ANA publication 8296.21p
- Fu C., Hernandez T., Zhou C. et Wang Z.Y. (2014).** Alfalfa (*Medicago sativa L.*). *Methods in Molecular Biology*, 213.
- Génier G. Guy P. et Prospero J.M. (1992).** Les luzernes. In: Gallais A et Bannerot H (Eds): amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et critères de sélection. Ed. Quae. 768p.
- Hireche Y. (2006).** Réponse de la luzerne (*Medicago sativa L.*) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Université al hadj lakhdar. Thèse de magistère, Batna.

Ignjatov M., Milosević D., Ivanović Ž., Karaman M., Vlajić S., Nikolić Z. et Gvozdanović-Varga J. (2018). Morphological and pathogenic properties of *Fusarium proliferatum* isolates : The causal agent of garlic (*Allium sativum L.*) : Rot in Serbia. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 55(3), 125-129.

Isleib J. Michigan State University Extension, (2011). A closer look at leaf diseases of alfalfa.

https://www.canr.msu.edu/news/a_closer_look_at_leaf_diseases_of_alfalfa#:~:text=Along%20with%20disease%20pathogens%2C%20other,identify%20and%20manage%20their%20crop

Jensen E. S. et Hauggaard-Nielsen H. (2003). How can increased use of biological N₂fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil*, 252(1), 177-186.

Jin M.Z. (1989). Preliminary study of discoloured rice grains caused by *Curvularia*. *Acta Phytopathol Sinica* 19(1): 21-26.

Kee Y. J., Latiffah Z. et Masratul Hawa M. (2018). First Report of *Stemphylium lycopersici* Causing Leaf Spot on *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Plant Disease*, 102(2), 445-446.

Kee Y. J., Latiffah, Z. et Masratul Hawa M. (2020). *Curvularia asianensis* and *Curvularia eragrostidis* associated with leaf spot of *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Journal of Phytopathology*, 168(5), 290-296.

Kgatle M. G., Flett B., Truter M. et Aveling, T. A. S. (2020). Control of *Alternaria* leaf blight caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection*, 132, 105146.

Khasanov B.A., Shavarina Z.A., Vypritskaya A.A. et Terent'ev D.V. (1990). Characteristics of the fungi from the genus *Curvularia* Boedijn and their pathogenicity to cereals. *USSR. Mikol Fitopatol* 24(2): 165-173.

Kiss N., Homa M., Manikandan P., Mythili A., Krizsán K., Revathi R., Varga M., Papp T., Vágvölgyi C., Kredics L. et Kocsubé S. (2019). New Species of the Genus *Curvularia* : *C. tamilnaduensis* and *C. coimbatorensis* from Fungal Keratitis Cases in South India. *Pathogens*, 9(1), 9.

- La pevronie A., (1982).** Les productions fourragères méditerranéennes. Eds. Maisonneuve
- Lauber K., Wagner G. et Gygax A., (2012).** Flora Helvetica -Flore illustrée de Suisse- 4eme édition.
- Lepoivre P. (2003).** Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte.1^{er} éd. Bruxelles : De Boeck Université. 427 p.
- Leslie J.F. et Summerell B.A. (2006).** Techniques for Growing and Maintaining Fusarium. The Fusarium Laboratory Manual, 21-30.
- Li K.M., Guo Q.Y., Zhao L. et Chen X.Z. (2009).** Study on anastomosis group and their pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolated from alfalfa in Xinjiang. Pratacultural Sci. 26:151-154.
- Liu D.X., Liu G.H. et Yang Z.M. (2015).** The effect of planting and harvesting factors on hay yield and stem leaf ratio of *Medicago sativa*. Acta Prataculturae Sinica. 24:48-57.
- Maiti C.K., Sen S., Paul A.K. et Acharya K. (2007).** First report of leaf blight of *Medicago sativa* caused by *Alternaria longipes*. J Plant Pathol. 89 (Supplement 3):S69.
- Mathieu M. (2003).** Luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. France agricole 11-16
- Mauriès M., (1994).** La luzerne aujourd'hui : vaches laitières, vaches allaitantes, brebis, chevaux, chèvres. Ed. France Agricole. Paris 254p.
- Mehrabi-Koushki M., Pooladi P., Eisvand P. et Babaahmadi G. (2018) –** *Curvularia ahvazensis* and *C. rouhanii* spp. nov. from Iran. Mycosphere 9(6), 1173–1186,
- Messioughi A. (2015).** Etude d'une plante fourragère la luzerne *Medicago sativa*.L : importances phytochimiques, aspects thérapeutiques et essais microbiologiques. Université Badji Mokhtar – Annaba. <http://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2016/09/These-Messioughi-Amel.pdf>
- Miguel D. A., Mariana R. A., Jose A. M., Gerarda B. P. S., Raquel S. C., Jose A.R.S., Debora A. M., Naiara M. C., Wanderbeth B. C. et Aluizio A. F. (2015).** First report in Southern Brazil of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* leaf spot in alfalfa (*Medicago sativa*). *African Journal of Agricultural Research*, 10(6), 491-493.

Nasehi A., Kadir J., Nasr-Esfahani M., Abed-Ashtiani F., Golkhandan E. et Ashkani S. (2015). Identification of the New Pathogen (*Stemphylium lycopersici*) Causing Leaf Spot on Pepino (*Solanum muricatum*). Journal of Phytopathology, 164(6), 421-426.

NILGS (2001). The Institute of Livestock and Grassland Science NARO -National Agriculture and Food Research Organization- Diseases of Forage Crops Curvularia leaf blight <http://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/diseases/contents/de34.htm>

Orloff S. (1996). Intermountain Alfalfa Management. Agriculture & Natural Resources.

Pousset J. (2002). Engrais vert et fertilité des sols. Ed. France. Agricole. Paris. 303p.

Pratt R.G. (2005). Variation in occurrence of dematiaceous hyphomycetes on forage bermudagrass over years, sampling times, and locations. Phytopathol 95(10): 1183-1190.

Prosperi J.M., Isabelle O., Angevain M., Génier G., et Nansat P. (1993). Diversité génétique, Conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes INRA. Mauguio. N°4: 1-5.

Qin F., Liu D., Sun B., Ruan L., Ma Z. et Wang, H. (2016). Identification of Alfalfa Leaf Diseases Using Image Recognition Technology. PLOS ONE, 11(12), e0168274.

Robert L. (1998). Disease Management. Dans *Alfalfa Production Handbook* (p. 19-20). Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service Manhattan, Kansas.

Rogerson C.T. (1956). Diseases of grasses in Kansas: 1953-55. J Plant Disease Report 40(5): 388-397.

Salter R., Miller-Garvin J.E. et Viands D.R. (1994). Breeding for resistance to alfalfa root rot caused by *Fusarium* species. Crop Sci. 34:1213-1217.

Samac D.A., Lamb J.F.S., Kinkel L.L. et Hanson L. (2013). Effect of wheel traffic and green manure treatments on forage yield and crown rot in alfalfa (*Medicago sativa*). Plant Soil 372:349-359.

Schoutteten F. (2004). La Luzerne. Ed. CRCI/ARIST Champagen-Ardenne. 3-5p.

Sedra M.H. et Djerbi M., (1986). Comparative study of morphological characteristics and pathogenicity of two *F. oxysporum* causing respectively the vascular wilt of date palm (Bayoud) and canary Island. 2nd symposium on date palm, King Faycal University, Eastern province, Kingdom of Saudi Arabia

Simonneau D., Besnard A., Maleplate T. et Larbre D. (2011). Protocole observations Luzerne fourrage. Vigicultures@.15p

Teixeira L.M., Coelho L. et Tebaldi N.D. (2017). Characterization Of *Fusarium Oxysporum* Isolates And Resistance Of Passion Fruit Genotypes To Fusariosis. *Revista Brasileira De Fruticultura*, 39(3), 2.

Telenko D. et Johnson K. (2019). Foliar diseases of Alfalfa. Pest and crop newsletter. ENTM newsletters. Purdue University, IN 47907, (765) 494-4600.

Thiébeau P., Parnaudeau V., et Guy P., (2003). Quel avenir pour la luzerne en France et en Europe ? *Courrier de l'environnement de l'INRA* n°49. 18p.

Uddin W. et Knous T. (1991). *Fusarium* species associated with crown rot of alfalfa in Nevada. *Plant Dis.* 75:51-56.

Vincelli P., Lacefield G. et Henning J. (2014). Managing Diseases of Alfalfa. *University of Kentucky, College of Agriculture.* ID-104.

Wallenhammar A.C., Nilsson-Linde N., Jansson J., Stoltz E. et L-Baekstrom G. (2008). Influence of root rot on the sustainability of grass/legume leys in Sweden. In: Hopkins A, Gustafsson T, Bertilsson J, Dalin G, Nilsson-Linde N, Sporndly E, editors. Biodiversity and animal feed: future challenges for grassland L.L. Cong et al. Evaluating alfalfa for resistance to *Fusarium* root rot.

Wang D.C., Meng Y.R., Li W.M. et Li W.C. (2005). Isolation and identification of pathogens causing root rot in lucerne. *Pratacultural Sci.* 22:78-81.

Wang L.Y., Xu L.B., He Y. et Wu L. (2010). Separation and screening of biocontrol actinomyces against alfalfa root rot. *Plant Dis Pests* 1:10-37.

Wang T. et Wang S. (2010). The pathogen of the *Medicago sativa* leaf spot in Gansu Province. *Acta Agrestia Sinica.* 18:372–377.

Wang X.W., Wang C.L., Zhou G., Huang C.F., Xu L.Z. et Wang DM. (1996). Investigation and analysis on Lucerne diseases from altay newly-established areas in northern Xinjiang. *J Xinjiang Agr Univ.* 19:40-43.

Woudenberg J.H., Groenewald J.Z., Binder M. et Crous P.W. (2013). *Alternaria* redefined. *Stud Mycol* 75:171–212.

Yang X.B. (2009). Spring is Time to Check Alfalfa for Foliar Diseases. IOWA State University extension and outreach. Integrated crop managment. Department of plant pathology.

Yi M., Liang J., Shi J., Li H., Cheng J. et Jiao F. (2017). Identification of *Fusarium acuminatum* isolated from *Medicago sativa* root using the EF-1 α sequence analysis method. *Acta Prataculturae Sinica* 26:61-68.

Yu Y., Zeng L., Huang L., Yan Z., Sun K., Zhu T. et Zhu A. (2015). First Report of Black Leaf Spot Caused by *Alternaria alternata* on Ramie in China. *Journal of Phytopathology*, 164(5),

Zaccardelli M., Balmas V., Altomare C., Corazza L. et Scotti C. (2006). Characterization of Italian isolates of *Fusarium semitectum* from alfalfa (*Medicago sativa* L.) by AFLP analysis, morphology, pathogenicity and toxin production. *JPhytopathol.* 154:454-460.

Zanin V. (1998). Un nouveau concept nutritionnel pour l'homme l'extrait foliaire de luzerne. Association pour la promotion des extraits foliaires en nutrition APEF Paris. 6-21 p.

Zhang W., Liu J., Huo P. et Huang Z. (2017). *Curvularia malina* causes a foliar disease on hybrid Bermuda grass in China. *European Journal of Plant Pathology*, 151(2), 557-562.

Annexes

Annexe 1

Milieu PDA : Potato Dextrose Agar

- Poudre 40g
- Eau distillée 1000ml

Principes

- Les teneurs en glucose et en extrait de pomme de terre favorisent la culture des levures et des moisissures.
- Le pH acide inhibe la plupart des bactéries.
- L'extrait de pomme de terre utilisé permet d'éviter la préparation de l'infusion de pomme de terre.

Formule-type

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait de pommes de terre 5,0 g
- Glucose 20,0 g
- Agar agar bactériologique 15,0 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : $5,6 \pm 0,2$.



Figure 31 : Milieu PDA dans boîtes de Pétri

Annexe 2

Matériel utilisé

1) Appareillage

- Autoclave
- Bain marie
- Etuve
- Plaques chauffantes agitatrices
- Balance
- Becs benzène
- Réfrigérateur
- Microscope optique photographique

2) Instruments

- Boites Petri
- Erlen mayer
- Flacons
- Pipettes Pasteur
- Micropipette
- Spatule
- Scalpels
- Coupelle
- Lames et lamelles

Résumé

Le présent travail traite de l'isolement et de l'identification des champignons phytopathogènes de la luzerne (*Medicago saliva* L.) dans l'exploitation agricole de l'université de Ouargla.

Les champignons ont été isolés à partir de parties de plantes infectées et ont été identifiés sur la base des symptômes causés, de la morphologie des colonies et de l'examen microscopique. Les caractéristiques morphologiques de ces éléments fongiques ont montré divers types de spores et ont été identifiés au niveau du genre.

Les isolats ainsi obtenus appartenaient aux genres fongiques: *Alternaria*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Stemphylium*.

Les mots clés: La luzerne cultivée, champignon phytopathogène, identification, isolement, Ouargla.

Abstract

Subject: isolation and identification of phytopathogenic fungi from alfalfa (*Medicago saliva* L.) in the region of Ouargla.

The present work deals with the isolation and identification of phytopathogenic fungi from alfalfa (*Medicago saliva* L.).

The fungus were isolated from infected plant parts and were identified on the basis of the symptoms, colony morphology, and microscopic examination. The morphological characteristics of these fungal elements showed various kinds of spores have been identified up to genus.

The fungal isolates were *Alternaria*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Stemphylium*.

Keywords: Alfalfa, phytopathogenic fungus, identification, isolation, Ouargla.

المخلص

الموضوع: عزل و تحديد الفطريات الممرضة لنبات البرسيم (*Medicago saliva* L.) في منطقة ورقلة.

يتناول العمل الحالي عزل و تحديد الفطريات الممرضة لنبات البرسيم (*Medicago saliva* L.).

تم عزل الفطريات من أجزاء النباتات المصابة وتم التعرف عليها على أساس الأعراض وتشكل المستعمرة والفحص المجهرى. أظهرت الخصائص المورفولوجية لهذه العناصر الفطرية أن أنواعًا مختلفة من الفطريات قد تم تحديدها حتى النوع.

العزلات الفطرية تنتمي الى الأنواع التالية: *Stemphylium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Alternaria*.

الكلمات المفتاحية: البرسيم، الفطريات الممرضة للنباتات، تحديد، عزل، ورقلة.