

## Étude histocytochimique des cals de *Cicer arietinum* L. confrontés au mycélium d'*Ascochyta rabiei*

Amina Kadiri, Zohra Ighilhariz, Louiza Bouabdallah & Zoubida Benbayer

Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d'Oran, Algérie.

Révisé le 15/02/2012

Accepté le 27/02/2012

### ملخص

ان استخدام نظام يضم كالوسات منحدره من اقسام مختلفة من صنفين من الحمص (*Cicer arietinum*)، مقاوم (INRA 199) و متحمل (Twist) لفطر *Ascochyta rabiei*، من شأنه ان يسهل دراسة اليات مقاومة المضيف لفيلي . ان متابعة هذا التفاعل بواسطة دراسة كيميائية خلوية و نسيجية بعد مرور 24, 48, 72 ساعة و 7 ايام من المواجهة تبين ان كالوسات INRA 199 استجابة لتفاعلها مع الفطر تخزن مواد فينولية تحد من انتشار الميسيليوم اذ يقتصر تواجد على الطبقات الخلوية الخارجية للكالوس . بالنسبة للصنف الثاني Twist يغزو الفطر الكالوسات سريعا بالرغم من انتاجها لتلك المركبات الفينولية ولكن بنسبة اقل مقارنة بالصنف الاول .

الكلمات المفتاحية: كالوسات - *Cicer arietinum* - *Ascochyta rabiei* - دراسة كيميائية خلوية و نسيجية مركبات فينولية.

### Résumé

Un système qui utilise des cals issus de différents explants de génotypes de pois chiche (*Cicer arietinum*), résistant (INRA 199) et tolérant (Twist) à *Ascochyta rabiei* agent de l'anthracnose est établi pour faciliter l'étude des mécanismes de défense de l'hôte contre le parasite. Le suivi de cette interaction par le biais d'une étude cytohistochimique après 24h, 48h, 72h et 7 jours de confrontation montre que les cals d'INRA 199 en réponse à la confrontation, accumulent *de novo* des composés phénoliques et semblent limiter la prolifération des hyphes aux assises cellulaires externes des cals. Dans le cas du génotype Twist, les cals sont rapidement colonisés et le taux des composés phénoliques est réduit par rapport au deuxième génotype.

**Mots clés :** Cals - *Cicer arietinum* - *Ascochyta rabiei* - Histocytochimie - Composés phénoliques.

### Abstract

A system that uses callus from different explants of chickpea genotypes (*Cicer arietinum*), resistant (INRA 199) and tolerant (Twist) to *Ascochyta rabiei* agent of anthracnose disease is established to facilitate the study of defense mechanisms of the host against the parasite. This interaction is followed by means of histological and cytochemical after 24h, 48h, 72h and 7 days of confrontation show that in response to the confrontation the calluses of INRA 199, accumulate phenolic compounds and appear to limit the proliferation of hyphae to the external callus cell layers. In the case of genotype Twist, calluses are rapidly colonized and the rate of accumulated phenolic compounds is reduced compared to the other genotype.

**Key words:** callus - *Cicer arietinum* - *Ascochyta rabiei* - Histocytochemistry - Phenolic compounds.

## 1. INTRODUCTION

L'antracnose est considérée comme une des maladies les plus dévastatrices qui affectent le pois chiche *Cicer arietinum*, une légumineuse à grand intérêt économique, alimentaire et écologique. Son agent causal *Ascochyta rabiei* (Teleomorphe *Didymella rabiei*) est un champignon imparfait pléomorphique qui regroupe dans son cycle biologique deux stades de reproduction. L'existence de ces deux formes favorise l'apparition continue de nouveaux pathotypes rendant ainsi la sélection, via les méthodes conventionnelles, de génotypes stables résistants à l'antracnose quasiment impossible.

L'établissement d'une stratégie de lutte contre cette maladie nécessite la compréhension des mécanismes déployés lors de l'interaction entre l'hôte et le pathogène notamment les réactions de défense. La culture de tissus *in vitro* de par ses nombreux avantages ouvre de nouvelles perspectives en phytopathologie en utilisant comme hôte des cellules, des tissus ou des organes [1 - 3]. Depuis les premiers travaux de Morel en 1948 sur la vigne et son parasite *Plasmopara viticola*, les études se sont élargies à d'autres plantes [4, 5].

L'utilisation d'un tissu ou quelques cellules comme hôte fournit un système relativement simple et facile à manipuler pour étudier l'interaction entre *Ascochyta rabiei* et *Cicer arietinum*. Elle est suivie par le biais d'une étude histologique et cytochimique en utilisant comme hôte des cals issus d'une culture d'explants de plants de pois chiche confrontés au mycélium du champignon dans le but de mettre en évidence les mécanismes induits suite à cette interaction et éventuellement sélectionner des clones résistants.

## 2. MATERIEL ET METHODES

Le pathosystème utilisé comprend des cals issus d'entrenœuds et de folioles de *Cicer arietinum* (hôte) et de mycélium d'*Ascochyta rabiei*.

### 2.1 Matériel végétal et initiation des cals

Les entrenœuds de 0.5mm de long et les folioles de deux génotypes de pois chiche sont utilisés : les génotypes INRA 199 et Twist caractérisés successivement comme résistants et tolérants à *A. rabiei*. Les explants sont mis en culture sur milieu MS [6] additionné de 3mg.L<sup>-1</sup> d'acide 2.4-Dichlorophénoxyacétique (2.4-D) et

de 3mg.L<sup>-1</sup> de Benzyle aminopurine (BAP), à pH ajusté à 5.8. Ils sont incubés sous une température de (22 ± 2) °C et une photopériode de 16 heures, des repiquages sont effectués à un mois d'intervalle. Pour chaque type d'organes 10 explants/boîte sont mis en culture avec 6 répétitions.

### 2.2 Matériel fongique et préparation de l'inoculum

L'inoculum provient d'une culture monospore obtenue à partir de plantes de pois chiche atteintes d'antracnose et prélevées dans la région d'Ain Temouchent dans l'Ouest algérien. Le champignon est cultivé sur un milieu à base de pois chiche (50g de farine de pois chiche, 20g de glucose, et 12g d'agar par litre d'eau distillée) et à pH ajusté à 5.8. L'incubation se fait sous une température ambiante de (23 ± 2)°C et une photopériode de 12 heures.

### 2.3 Inoculation des cals

Après deux semaines d'incubation et sous des conditions stériles, des disques de 3mm de diamètre sont prélevés dans la périphérie de la colonie fongique puis déposés sur les sommets de pièces de cals de 5mm de diamètre. Les pathosystèmes ainsi préparés sont mis en culture sur le milieu MS dépourvu d'hormones, et sous les mêmes conditions d'incubation du champignon. Des cals non inoculés sont utilisés comme témoin. Pour les deux types d'explants des deux génotypes, des prélèvements de tissus sont effectués après 24h, 48h, 72h et 7 jours de l'inoculation à raison de trois cals par boîte répétés deux fois. Le suivi de la confrontation hôte-pathogène se fait par une étude histologique afin d'évaluer le degré de la prolifération mycélienne et son effet sur les cellules du cal. Une étude histocytochimique est également effectuée pour détecter la présence de molécules accumulées par l'hôte suite à l'interaction avec le pathogène.

### 2.4 Fixation et confection des coupes

Les cals sont fixés dans un mélange d'éthanol acide acétique glacial (3:1/v: v) pendant 24h. Les échantillons sont ensuite déshydratés puis inclus dans la paraffine. Des coupes sériées de 7 à 10µm sont confectionnées grâce à un microtome de type Spencer 820.

## 2.5 Étude histocytochimique

Pour la détermination de l'effet de l'inoculation sur les cellules des cals, les lames sont colorées au bleu de toluidine O selon la méthode d'O'Brien et Feder [7]. C'est un colorant histologique permettant de distinguer entre les cellules vivantes (colorées en rose) et les tissus morts (en bleu). C'est également un colorant histochimique qui permet la mise en évidence des polyphénols qui prennent une couleur verte. L'utilisation du test nitroso selon la méthode décrite par Bashir [8] permet spécifiquement la mise en évidence des polyphénols. Les lames sont placées dans un mélange de nitrate de sodium à 10%, urée à 20% et acide acétique à 10% (v : v : v). Après 15 minutes, 2 volumes d'une solution de NaOH à 2% sont ajoutés à la solution précédente. Les polyphénols prennent une coloration jaune ocre dont l'intensité est proportionnelle à la quantité produite. Les lignines, qui prennent une coloration rouge pourpre, sont révélées par l'utilisation du phloroglucine à 2% dans l'éthanol 95° suivi d'un montage dans l'HCl à 30% [9]. La subérine est révélée en rose par le Soudan IV saturé dans l'éthanol à 70° [10]. Dix lames sont observées par échantillon à l'aide d'un microscope photonique de type Olympus, des photos représentatives des différents résultats sont prises avec un appareil photos numérique de marque Kodak (8-pixels).

## 3. RÉSULTATS

### 3.1 Étude des cals témoins

L'étude histologique des cals témoins (Fig. 1) montre qu'ils ont la constitution habituelle des tissus néoformés à savoir des cellules parenchymateuses de différentes tailles avec la présence de quelques amas de cellules rondes de petite taille à noyau contrasté en bleu foncé dont les caractéristiques rappellent celles des cellules méristématiques. Il est remarqué également la présence de cellules de conduction spécialisées, ce sont des trachéides courtes néoformées en abondance.

### 3.2 Étude des cals confrontés au pathogène

Dans le cas des cals foliaires et d'entre-nœuds du génotype INRA 199 une prolifération mycélienne est observée après 48h de l'inoculation (Fig. 2a et 2b). Néanmoins elle reste limitée à la périphérie du cal avec la présence de plusieurs cellules dont le contenu est coloré en vert par le bleu de toluidine O traduisant la présence de composés phénoliques.

Ces cellules semblent former une zone qui délimite la région où prolifère le pathogène 7 jours après l'inoculation, le pathogène forme des pycnides (Fig. 2c et 2d) qui libèrent plusieurs spores.

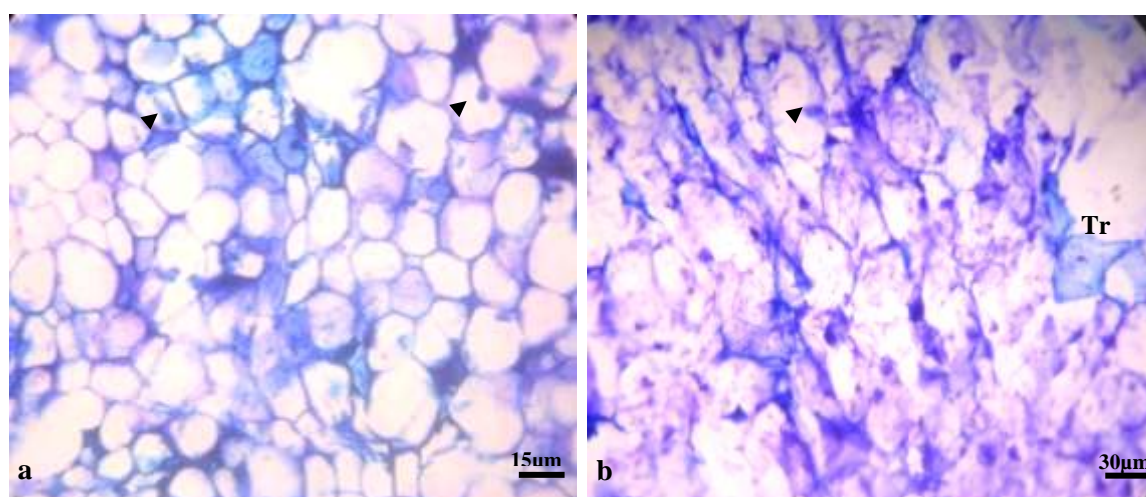


Figure 1. Étude histologique de cals témoins issus des deux génotypes de *Cicer arietinum* INRA 199 et Twist. Coupes séries de 8µm d'épaisseur, coloration au bleu de toluidine O; cellules parenchymateuses de différentes tailles dont certaines à noyau (flèches) et des trachéides (Tr), (a) INRA 199, (b) Twist.

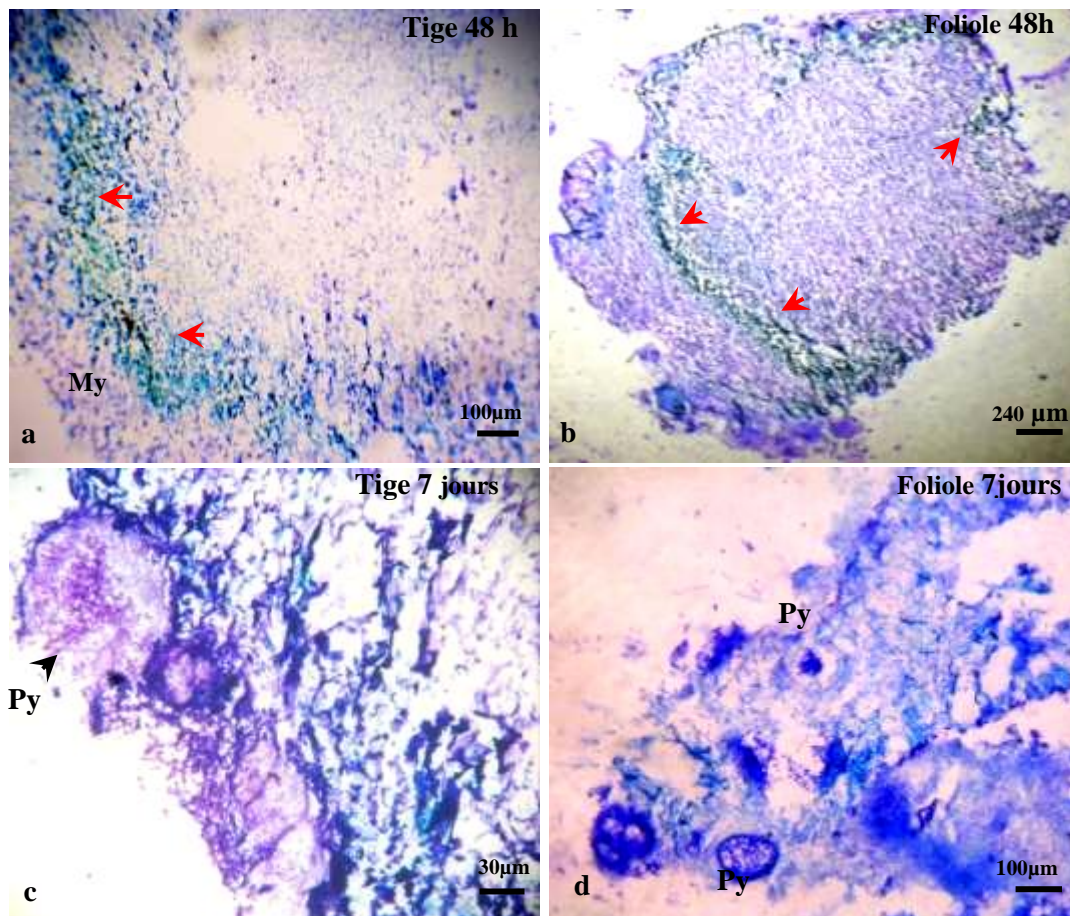


Figure 2. Étude histologique de cals inoculés issus des tiges et folioles du génotype INRA 199 de *Cicer arietinum* inoculé avec le mycélium d'*Ascochyta rabiei*. Coupes sériées de 8µm d'épaisseur, coloration au bleu de toluidine O; **a** et **b** : prolifération mycélienne (en bleu) à la périphérie du cal et formation de zones de composés phénoliques (en vert); **c** et **d** : formation de pycnides (Py).

Dans le cas des cals de folioles et d'entre-nœuds du génotype Twist, une réaction différente est observée par rapport au génotype précédent. Déjà après 24h de l'inoculation, les hyphes mycéliens sont présents en abondance à la périphérie des cals. Après 48h, le mycélium occupe l'intérieur du cal (Fig. 3a et 3b) et forme quelques pycnides dont le nombre augmente pour entourer tout le cal au septième jour (Fig. 3c). Cette réaction se traduit par l'accumulation de composés phénoliques dans les cellules du cal (Fig. 3d).

Le test nitroso spécifique aux composés phénoliques renforce les observations précédentes et révèle, comparé au témoin, la présence importante de ces substances chez les cals des deux génotypes confrontés au mycélium d'*Ascochyta rabiei*.

Par ailleurs, l'intensité de la coloration jaune ocre corrélée à la quantité de composés phénoliques accumulée lors de l'infection n'est pas identique chez les deux génotypes.

Cette réaction est plus prononcée chez le génotype INRA 199 (Fig. 4) alors que dans le cas des cals du génotype Twist, l'intensité de la coloration jaune ocre est relativement équivalente avant et après inoculation (Fig. 5a, 5b, 5c et 5d).

Concernant les résultats des tests histochimiques, les cals étudiés réagissent négativement au phloroglucinol chlorhydrique ce qui signifie que, la lignification ne semble pas être une des réactions déployées suite à l'inoculation. Le même résultat est observé quant à l'absence de subérisation, le test au Soudan IV est négatif pour tous les cals étudiés.

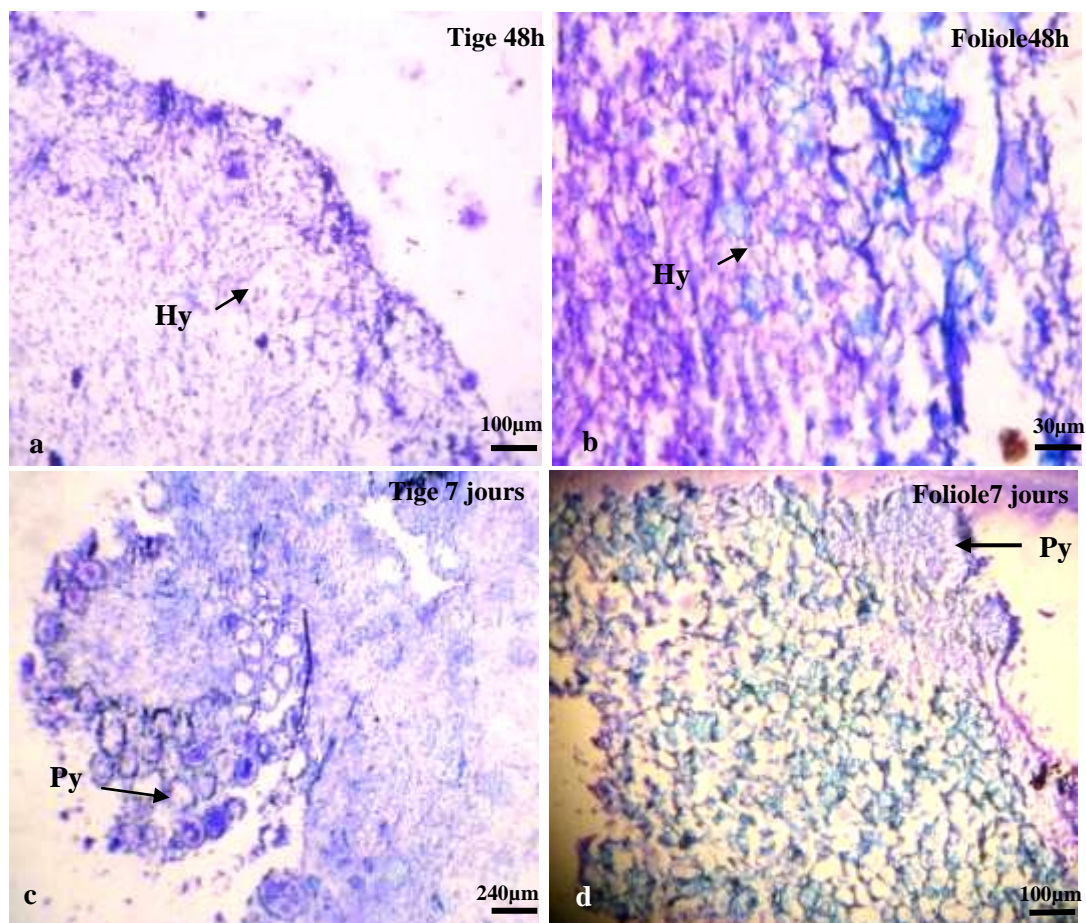


Figure 3. Étude histologique de cals issus de tiges et de folioles de *Cicer arietinum* génotype Twist après inoculation avec le mycélium d'*Ascochyta rabiei*.

Coupes séries de 8µm d'épaisseur, coloration bleu de toluidine O; **a** et **b** : prolifération des hyphes (Hy) à l'intérieur des tissus du cal, **c** et **d** : formation de pycnides (Py) et accumulation de composés phénoliques (en vert).

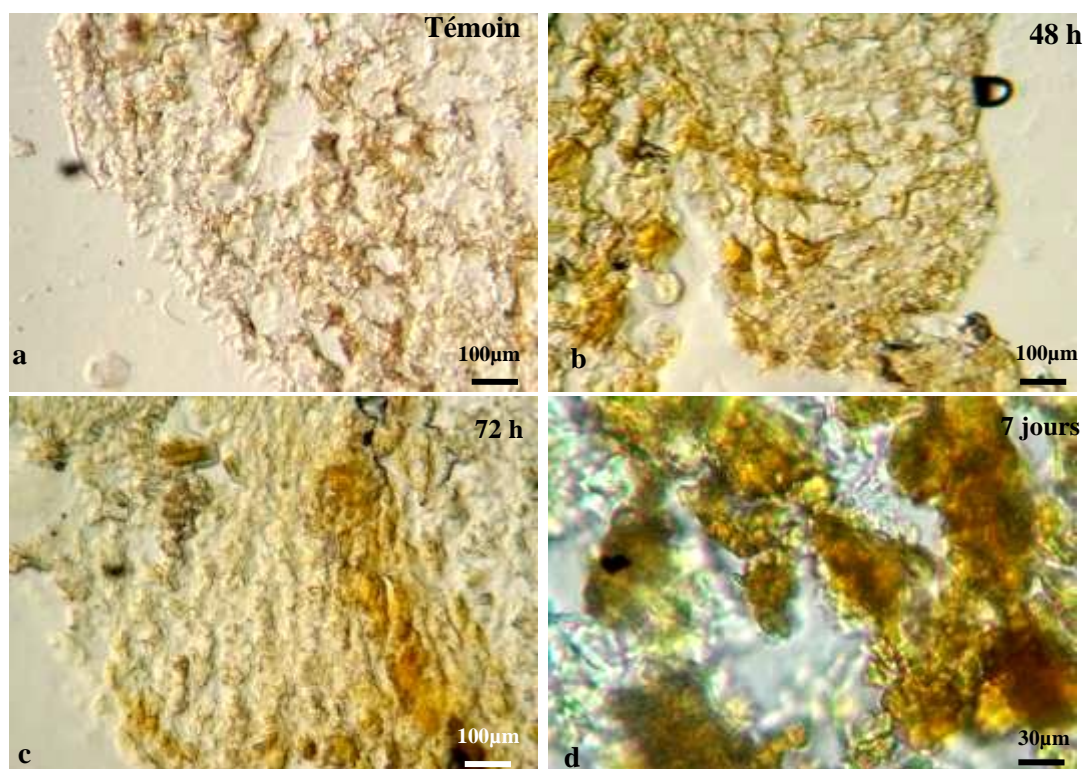


Figure 4. Étude histocytochimique de cals issus de folioles de *Cicer arietinum* (INRA 199). Coupes sériées de 8µm d'épaisseur, coloration jaune ocre des composés phénoliques mis en évidence par le test nitroso, chez le cal témoin non inoculé (a), après 48 heures (b), 72 heures (c) et 7 jours (d) d'incubation avec le mycélium d'*Ascochyta rabiei*.

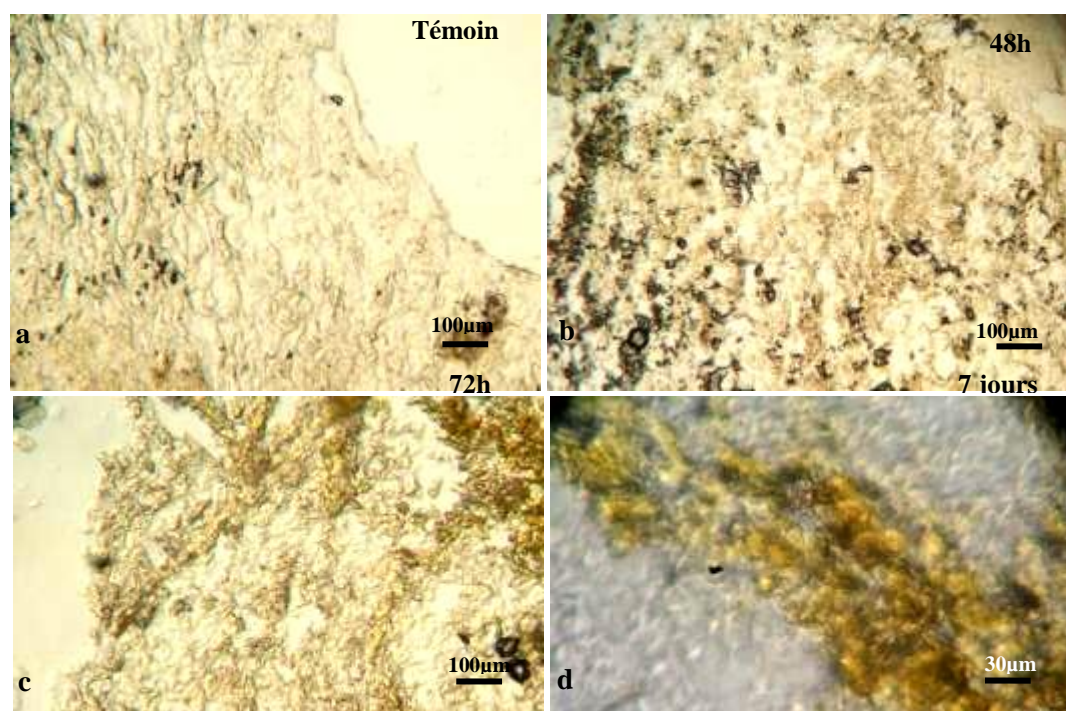


Figure 5. Étude histocytochimique de cals issus de folioles du génotype Twist de *Cicer arietinum*. Coupes sériées de 8µm d'épaisseur, mise en évidence des composés phénoliques par le test nitroso, chez les cals témoins non inoculés (a), après 48 heures (b), 72 heures (c) et 7 jours (d) d'incubation avec le mycélium d'*Ascochyta rabiei*.

#### 4. DISCUSSION

L'étude de l'interaction entre *Cicer arietinum* et *Ascochyta rabiei* à l'échelle microscopique est menée en utilisant comme pathosystème des cals foliaires et d'entrenœuds de la plante hôte inoculés avec le mycélium de l'agent pathogène. L'évaluation de l'expression de la résistance ou de la sensibilité des deux génotypes de pois chiche INRA 199 (résistant) et Twist (tolérant) à *Ascochyta rabiei* est effectuée grâce à une étude histocytochimique de coupes sériées d'échantillons de cals témoins et de cals incubés pendant 24h, 48h, 72h et 7j en présence du mycélium.

De nombreux travaux sur l'interaction plante hôte - parasites ont montré que les gènes de résistance et de sensibilité sont exprimés aussi bien chez la plante entière que dans une culture tissulaire ou cellulaire [11 - 13].

L'étude de la confrontation de cals de *Cicer arietinum* au mycélium d'*Ascochyta rabiei* montre que, durant les premières 24 heures, les hyphes du champignon sont observés chez les deux génotypes inoculés avec toutefois une légère abondance dans les cals du génotype Twist. Après 48h, une nette différence peut être remarquée dans le comportement des cals des deux génotypes vis-à-vis du parasite. En Effet, Kavousi et al. [14] rapportent qu'une réelle expression des gènes de résistance chez *Cicer arietinum* à *Ascochyta rabiei* n'est occasionnée qu'après 48h de l'infection. C'est le temps requis au déclenchement de nombreuses réactions en réponse à l'attaque. Après cet intervalle de temps, les cals du génotype INRA 199 montrent une réaction de défense caractérisée par une croissance limitée des hyphes. Ce même type de comportement lors d'une réaction de résistance est observé également chez plusieurs couples hôte - parasite : *Beta vulgaris* - *Peronospora farinosa* f. sp. *betaei* [15], *Nicotiana tabacum* - *Phytophthora parasitica* var. *nicotinae* [16], *Nicotiana tabacum* - *Phytophthora cinnamomi*, *Zea mays* - *Phytophthora cinnamomi* et *Triticum* sp. - *Phytophthora cinnamomi* [17]. Le même type de réaction est remarqué chez plusieurs plantes ligneuses résistantes cultivées *in vitro* et inoculées avec des parasites [1, 4, 17-19]. L'étude histocytochimique montre que les cals d'INRA 199 inoculés réagissent également par la formation *de novo* de composés phénoliques révélés par le test au bleu de toluidine O et par la réaction nitroso. Ces composés s'accumulent dans des cellules qui semblent former une couche intermédiaire entre

la zone de prolifération du mycélium et le centre du cal. Selon Ameziane El Hassani [25], lors d'une réaction de résistance entre *Cicer arietinum* et *Ascochyta rabiei* la prolifération mycélienne à travers les cellules de l'hôte est stoppée par la formation d'une bande appelée « boundary zone » dont les cellules accumulent des composés de nature phénolique. Ces derniers jouent un rôle important dans la résistance des plantes [26, 27]. Ils sont mis en évidence chez les cals des deux génotypes par la réaction nitroso et dont l'intensité de la coloration, corrélée à la résistance ou la sensibilité de l'hôte au pathogène est plus importante chez INRA 199. Kessmann et Barz [28] et Weidmann et al. [26] décrivent le même comportement chez des cultures cellulaires de *Cicer arietinum* inoculées avec *Ascochyta rabiei* d'où l'intérêt d'une étude qualitative et quantitative de ces composés.

Ces substances seraient probablement des phytoalexines dont le rôle est connu dans la résistance aux stress [20]. Elles sont retrouvées dans tous les exemples de cultures tissulaires ou cellulaires de type résistant, elles sont élicitées chez *Solanum tuberosum* - *Phytophthora infestans* [11, 21], *Oryza* - *Piricularia oryzae* [22], *Panicum miliacum* - *Sclerospora graminicola* [23] et *Vitis vinifera* - *Plasmopara viticola* [24].

La formation de quelques pycnides sur les cals d'INRA 199 est observée au 7<sup>ème</sup> jour comme il a été rapporté par Höhl et al. [29] chez les plantes entières confrontées à *Ascochyta rabiei* contrairement aux travaux d'Ameziane El Hassani [25] selon qui aucune fructification n'est formée sur les génotypes résistants de *Cicer arietinum*.

Chez le génotype Twist considéré comme tolérant, la prolifération des hyphes est précoce. Ces dernières colonisent rapidement les tissus de l'hôte aussi bien à la périphérie qu'en profondeur et y forment plusieurs pycnides. Cette colonisation par formation massive de fructifications est une caractéristique commune rapportée dans tous les groupes hôte - parasite caractérisés par une réaction de sensibilité tels, *Triticum sativum* - *Nevossia indica* [30] et *Castanea sativa* - *Phytophthora cambivora* [18]. Concernant la lignification, phénomène rencontré lors de l'interaction entre les génotypes résistants de *Cicer arietinum* et *Ascochyta rabiei* [8, 25, 30], la réaction au phloroglucinol chlorhydrique se révèle négative. D'un autre côté, la subérification ou réaction déployée lors d'attaques de pathogènes [3, 31] n'est pas observée dans notre cas. Rea et

al. [32] rapportent que chez le génotype de pois chiche «Sultano» résistant à *A. rabiei*, la mise en évidence du phénomène de subérification n'est perceptible qu'au 10<sup>ème</sup> jour suivant l'inoculation.

A la lumière des résultats obtenus, les cals des deux génotypes réagissent différemment au pathogène. Les cals du génotype Twist sont rapidement colonisés par les hyphes du champignon qui y forment des pycnides en abondance alors que la prolifération mycélienne sur les cals du second génotype INRA 199 est restreinte aux assises externes avec une accumulation abondante de composés phénoliques. Ces mêmes mécanismes sont rencontrés lors d'une interaction entre la plante et le pathogène *in vivo* ce qui montre que la culture de tissus *in vitro* s'avère un moyen rapide et facile pour étudier les différents aspects de l'interaction hôte – parasite et qui peut être parachevé par les techniques histocytochimiques afin d'aider dans la lutte contre l'anthracnose du pois chiche.

## 5. CONCLUSION

L'utilisation du pathosystème cal de *Cicer arietinum* confrontés au mycélium d'*Ascochyta rabiei* a permis d'étudier quelques éléments de cette interaction. Cet outil montre l'intérêt d'utiliser la culture de tissus *in vitro* en phytopathologie. L'interaction entre les deux éléments du pathosystème déclenche des mécanismes de défense mis en évidence *in situ* par des méthodes histochimiques. Les cals des deux génotypes de pois chiche étudiés INRA 199 et Twist considérés respectivement comme résistant et tolérant à *Ascochyta rabiei* montrent deux réactions totalement distinctes vis-à-vis du pathogène. Celles-ci se caractérisent pour le génotype INRA199 par une prolifération mycélienne limitée aux assises cellulaires externes du cal avec la présence d'une zone de cellules riches en composés phénoliques alors que pour le génotype Twist, par une colonisation rapide du cal par les hyphes avec la présence de quelques cellules accumulant les mêmes composés.

Les variations des composés mis en évidence par le bleu de toluidine et par la réaction cytochimique nitroso semblent être liées directement aux degrés de résistance des deux génotypes étudiés. En effet, même si leur présence est détectée chez le témoin, une intensité de coloration plus importante est remarquée chez les cals confrontés au pathogène.

La mise en évidence des flavonoïdes molécules clés de la défense chez *Cicer arietinum* pourrait être un élément de réponse qui pourrait expliquer le type d'interaction dans le cas du pathosystème cal - mycélium. L'élaboration par l'hôte de phytoalexines toxiques pour le pathogène est considérée comme fondamentale dans la pathogenèse. Il est donc nécessaire d'accorder une attention particulière à cet aspect. Ainsi ces molécules pourraient être utilisées comme marqueurs biochimiques facilement détectables par des méthodes histocytochimiques, ceci faciliterait éventuellement la sélection et l'obtention de plantes résistantes de pois chiche.

## RÉFÉRENCES

- [1] Jang J.C. & Tainter F.H., 1990. Cellular response of Pine callus to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 80 Vol. 12, 1347-1352.
- [2] Yang D. & Bernier L., 1996. Production and use of calli from yellow brich buds for *in vitro* assessment of virulence of *Necteria Galligena* isolates. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 45, 175-177.
- [3] Daayf F, El Bellaj M., El Hassni M., J'Aiti F. & El Hadrami L., 2003. Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* culture medium. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 49, 41-47.
- [4] Dai G.H, Andary C., Mandolot Cosson L. & Boubals D., 1995. Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 101, 541-547.
- [5] Goyal B.K., Kant U. & Verma P. R., 1995. Growth of *Albugo candida* (race unidentified) on *Brassica juncea* callus cultures. *Plant and Soil*, Vol. 172, 331-337.
- [6] Murashige T. & Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, Vol. 15, 473-497.
- [7] O'Brien T. P., Feder N. & Mc Cully M.E., 1964. Polychromatic staining of Plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, Vol. 59, 367-373.
- [8] Bashir N., 1989. Biochemical basis of resistance in chickpea against *Ascochyta* blight with special reference to phenolics. Thèse de Doctorat, Université de Bahauddin Zakarya, Pakistan. 177p.
- [9] Patten A. M., Jourdes M., Brown E. E., Laborie M.P., Davin B.L. & Lewis N.G., 2007. Reaction tissue formation and stem tensile modulus properties in wild-type and *p*-coumarate-3-hydroxylase downregulated lines of alfalfa, *Medicago sativa*



(Fabaceae). *American Journal of Botany*, Vol. 94, 912-925.

[10] Andary C., Modolot Cossen L. & Dai G.H., 1996. Histology, ultrastructure and molecule cytology of plant microorganism interaction: *In situ* detection of polyphénols, Eds. Kluwer. 259 p.

[11] Ingram D.S., 1967. The expression of R-gene Resistance to *Phytophthora infestans* in Tissue Cultures of *Solanum tuberosum*. *Journal of general Microbiology*, Vol. 49, 99-108.

[12]. Pijut P.M, Domir S. C., Lineberger R.D. & Shreiber L.R., 1990. Use of culture filtrates of *Ceratocystis ulmi* as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus americana*. *Plant Science*, Vol. 70, 191-196.

[13] Gallão M.L., Cortelazzo A.L., Fevereiro M.P.S. & Brito E. S., 2007. Response to chitin in suspension-cultured *Citrus aurantium* cells. *Brazilian journal of plant physiology*, Vol. 19(1), 69-76.

[14] Kavousi H.R., Marashi H., Mazafari J. & Bagheri A.R., 2009. Expression of phenylpropanoid pathway genes in chickpea defense against Race 3 of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology Journal*, Vol. 8(3), 127-132.

[15] Ingram D.S. & Joachim L., 1971. The growth of *Peronospora farinosa* f. sp. *betae* and sugar beet callus tissues in dual culture. *Journal of General Microbiology*, Vol. 69, 211-220.

[16] Zoeten G.A., Gaad G., Haberlach G.T. & Helgeson J.P., 1982. Infection of Tobacco callus by *Phytophthora parasitica* var. *nicotinae*. *Phytophology*, Vol. 72(7), 743-746.

[17] McComb J.A., Hinch J.M. & Clarke A.E., 1987. Expression of field resistance in callus tissue inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, Vol.77(2), 346-351.

[18] Casares A., Gonzalez A. & Sanchez Tains R., 1994. Ultrastructure of calli from resistant and susceptible chestnut inoculated with *Phytophthora cambivora*. *Journal of Physiopathology*, Vol. 142, 19-26.

[19] Krause C.R., Ichida J.M., Shreider L.R. & Domir S., 1996. Host parasite relationships to susceptible and resistant Elm callus cultures challenged with *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. *Journal of Environmental Horticulture*, Vol. 14(1), 33-38.

[20] Lepoivre P., 2003. Phytopathologie. Edition De Boek. 427p.

[21] Doke N. & Tomiyama N., 1980. Effect of hyphal wall components from *Phytophthora infestans* on protoplasts of potato tuber tissues. *Physiological Plant Pathology*, Vol. 16, 169-176.

[22] Uchiyama T., Sato J. & Ogasawara N., 1983. Lignification and qualitative changes of phenolic

compounds in rice callus tissues. *Agric. Bio L. Chem.*, Vol. 47(1), 1-10.

[23] Upadhyaya G., Shivanna M.B., Prakash H.S. & Shetty H.S., 1992. A novel approach to the establishment of dual cultures of pearl *Panicum miliacum* and *Sclerospora graminicola*. Biomedical and Life Sciences. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol.31(3), 203-206.

[24] Bruno G. & Sparapano L., 2007. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol. 69, 209-223.

[25] Ameziane El Hassani A., 1981. Modalités d'expression de la résistance d'un cultivar de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) à *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Thèse de Docteur Ingénieur, ENA de Rennes. 48p.

[26] Weidemann C., Tenhaken R., Höhl U. & Barz W., 1991. Medicarpin and Maackiain-3-O glucoside -6'-O-malonate conjugates are constitutive compounds in chickpea *Cicer arietinum* L. cell culture. *Plant Cell Reports*, Vol. 10, 371-374.

[27] Kessmann H., Edwards R., Geno P.W. & Dixon R.A., 1990. Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology*, Vol. 94, 227-232.

[28] Kessmann H. & Barz W., 1987. Accumulation of isoflavone and pterocarpans phytoalexin in cell suspension culture of different cultivars of chickpea. *Plant Cell Report*, Vol. 6(1), 55-59.

[29] Höhl B., Pfautsch M. & Barz W., 1990. Histology of disease development in resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology*, Vol. 129, 31-45.

[30] Singh M. & Singh A., 1990. Growth and sporulation of *Neovossia indica* in weath callus culture. *Indian Phytopathology*, Vol. 29, 113-115.

[31] Hosel W., Surholt E. & Borgmann E., 1978. Characterization of P-Glucosidase isoenzymes possibly involved in lignification from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 84, 487-492.

[32] Chalupowicz L., Barash I., Schwartz M., Aloni R. & Manulis S., 2006. Comparative anatomy of gall development on *Gypsophila paniculata* induced by bacteria with different mechanisms of pathogenicity. *Planta*, Vol. 224, 429-437.

[33] Rea G., Metou O., Infantino A., Federico R. & Angelini R., 2002. Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiology*, Vol. 128, 865-875.