

# RAPPORT FINAL

ATP N° 30/95

Le genre *Colletotrichum* en zones tropicales :  
interactions hôte pathogène et épidémiologie

Contributions des participants

N° 2

Septembre 1998



**PRESENTATION**

***C. Musae / bananier***

**L. DE LAPEYRE, X. MOURICHON, F. LAPEYRE**  
**Cirad-flhor**

# ATP *Colletotrichum* - Anthracnose du bananier

L.de Lapeyre de Bellaire<sup>1</sup>, X.Mourichon<sup>2</sup>, & F.Lapeyre<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CIRAD-FLHOR - Station de Neufchâteau - Guadeloupe

<sup>2</sup>CIRAD-FLHOR - Montpellier

## INTRODUCTION

Dans un contexte de concurrence économique internationale, la production de bananes de qualité devient capitale pour les producteurs antillais si ils veulent préserver leur position privilégiée sur le marché européen. La qualité de ces bananes d'exportation est sévèrement affectée par des défauts de présentation et plus particulièrement par des pourritures brunes liées au développement d'anthracnose. *Colletotrichum musae* (Berk. et Curt.) Arx, le champignon responsable de cette maladie, est capable de former des lésions sur les fruits en absence de blessures, mais il forme des nécroses beaucoup plus rapidement et de taille bien plus large lorsque les fruits sont blessés.

Comme pour d'autres anthracnoses de fruits tropicaux tels que la papaye, la mangue ou l'avocat, les spores de *C. musae* provoquent des infections quiescentes. Dans le cas de la banane, les spores contaminent les fruits au champ, germent rapidement et forment un appressorium qui restera inactif jusqu'à la maturation du fruit. Une hyphes de pénétration se développe alors, et le mycélium envahit la peau, puis la pulpe du fruit pour aboutir à la formation de nécroses brunes.

Aux Antilles, les dégâts d'anthracnose sont particulièrement importants au second semestre de l'année, dans les zones de basse altitude. Après la récolte, le traitement des fruits avec un fongicide, le mode de récolte et de conditionnement, la conservation des bananes ainsi que l'hygiène des locaux d'emballage sont autant de facteurs qui vont influencer l'apparition de dégâts d'anthracnose sur les fruits mûrs. Ces actions sont toutefois réalisées de façon invariable par les différents opérateurs, et les variations saisonnières observées résultent principalement d'une variabilité du potentiel de qualité des fruits au champ. Ce potentiel se définit par sa composante parasitaire (niveau de contamination du fruit, nature des souches) et par sa composante physiologique. La méthode de lutte chimique classiquement employée contre l'anthracnose est aujourd'hui dans une impasse. En effet, les traitements fongicides effectués après récolte avec du thiabendazole ne sont pas partout efficaces, et des souches résistantes à ce fongicide se sont aussi développées. Il faut, de plus, garder à l'esprit que les exigences des consommateurs tendent vers une réduction de l'emploi de pesticides. Ainsi, les solutions de demain reposent-elles sur la recherche de nouvelles techniques de lutte qui devraient s'appuyer sur une meilleure connaissance de la bio-écologie de ce champignon, particulièrement en termes d'épidémiologie et de relations hôte-pathogène.

Aussi, les différentes phases du cycle épidémiologique de *C. musae* sont abordées dans le cadre de cette ATP:

- les variations et les sources d'inoculum
- la dissémination des spores
- la contamination des fruits
- la phase de quiescence et l'évolution des symptômes
- les différentes espèces de *Colletotrichum* associées au bananier

# I. Les variations et sources d'inoculum

## 1. Etude des variations naturelles d'inoculum incident sur les fruits

### a. Piégeages de spores.

Afin de mieux connaître les variations d'inoculum incident sur les fruits tout au long de leur croissance, nous avons utilisé un piège à spores permettant de collecter les eaux de ruissellement sur le régime de bananes. Ces pièges étaient posés 7 jours après la sortie de l'inflorescence, au stade où les doigts commencent à se recourber vers le haut, et étaient retirés à la récolte. Les eaux de ruissellement étaient analysées une fois par semaine après filtration sur membrane et comptage au microscope des conidies préalablement colorées avec du bleu trypan. Les études de piégeages de spores ont permis de montrer que la production de conidies de *Colletotrichum* passait par un pic un mois à un mois et demi après la floraison pour chuter fortement jusqu'à un niveau nul à la récolte. Ce faciès est très répétable d'une série de piégeage à l'autre, comme en témoigne la figure 1 obtenue à partir de neuf séries de piégeage (17 bananiers étudiés). Par contre, les quantités de spores recueillies sont très variables, et dépendent fortement des conditions climatiques durant la "période critique" de 7-30 jours après la floraison. La plus grande période de "sécheresse" (plus grand nombre de jours successifs où la pluviométrie est inférieure à 5 mm), semble être assez bien expliquer (figure 2) la variation des quantités de conidies piégées durant toute la croissance des fruits ( $r^2 = 0.67$ ).

### b. Isolements sur les pièces florales

Avec la technique précédente, l'identification des conidies par un examen microscopique ne permettait pas de différencier le *C.musae*, agent de l'antracnose des bananes, d'autres espèces de *Colletotrichum* qui auraient pu être présentes dans les piégeages. Ainsi, un milieu sélectif a été mis au point, afin d'isoler et de caractériser les différentes espèces de *Colletotrichum* présentes sur les pièces florales, et plus particulièrement de connaître leur dynamique respective au cours de la croissance du régime de bananes.

Chaque semaine, de la floraison à la récolte, nous avons réalisé des isolements sur des pièces florales prélevées sur la deuxième main de 100 fruits situés sur 100 bananiers d'une même parcelle. Ce travail a été effectué en saison sèche et en saison humide sur la même parcelle. Au cours de cette étude on a aussi suivi le développement de l'inoculum sous des gaines plastiques. En effet, l'engainage des régimes est une pratique courante qui a pour conséquence de créer un microclimat sous la gaine, lequel pourrait modifier la dynamique de l'inoculum. Sur la même parcelle 100 autres bananiers ont été choisis le même jour, au même stade de floraison et engainés. Les résultats montrent que:

- *C.musae* s'isole très facilement à partir des pièces florales, en quantités importantes, ce qui confirme le rôle important de ces organes dans la dissémination des conidies. Il représente 70 à 90% des colonies appartenant au genre *Colletotrichum* isolées et identifiées durant la "période critique".

- la dynamique de l'inoculum observée par isolements sur les pièces florales, est très comparable à celle obtenue par piégeage de spores (figure 3). Cela confirme donc ce résultat et plus particulièrement l'existence d'une période critique précoce au cours de laquelle la pollution des fruits serait plus forte.

- la quantité d'inoculum de *Colletotrichum musae* récupérée sur les pièces florales des bananiers gainés est équivalente à celle récoltée sur les bananiers non gainés (figure 3). Ce résultat est contraire à l'hypothèse de départ selon laquelle le microclimat sous la gaine serait plus favorable à la sporulation, notamment en ce qui concerne l'hygrométrie.

## 2. Les sources d'inoculum

Nous avons utilisé la méthodologie du piège à spores pour étudier l'importance de certaines sources d'inoculum. L'élimination de la bractée de l'inflorescence et des pièces florales à la floraison permet de diminuer très sensiblement la quantité de spores récupérée au cours de la période de piégeage (figure 4). Cela semble indiquer que ces organes sont les principales sources d'inoculum. Nous avons élaboré l'hypothèse suivante: un inoculum primaire serait véhiculé vers les pièces florales et la bractée soit par éclaboussures d'un bananier à l'autre, soit par des insectes visitant les fleurs, soit par transport aérien des ascospores de *Glomerella musarum*, forme parfaite du *C.musae*. Un inoculum secondaire, beaucoup plus important, se développerait ensuite sur ces organes. La proximité de ces organes par rapport aux fruits permettrait une dissémination efficace des spores par le ruissellement de l'eau de pluie sur les fruits.

# II. Dissémination des spores

## 1. Étude de la répartition des nécroses sur le fruit

La répartition des nécroses sur les fruits a été étudiée sur 100 bananiers non gainés et 100 bananiers engainés à la floraison. Au stade récolte, sur chacun de ces 200 bananiers on a récolté un fruit à différents étages du régime de bananes: sur les mains 1, 4 et 7. Après maturation artificielle des fruits par de l'éthylène (1000 ppm) les nécroses ont été comptées sur les fruits 10 jours après le traitement. Les nécroses ont été réparties en 12 secteurs: chacune des 4 faces du fruit (haut, bas, droit et gauche) a été divisée en trois parties égales: pédoncule, centre et apex floral. La répartition des nécroses sur ces 100 fruits gainés et non gainés permet les constats suivants:

\* la quantité de nécroses est très largement supérieure sur les fruits non-gainés que sur les fruits engainés (figure 5), quelque soit le rang de la main. La gaine plastique constitue une bonne protection contre le ruissellement de l'eau, ce qui pourrait expliquer les différences importantes observées entre les fruits gainés et non gainés, sachant que, comme nous l'avons vu précédemment, l'engainage ne modifie pas la production d'inoculum sur les pièces florales. Cela signifierait bien que l'eau est l'élément majeur de dispersion des spores.

\* les nécroses sont préférentiellement réparties sur le tiers de l'apex floral (figure 5), et plus particulièrement sur la face du bas. Cette répartition tendrait aussi à démontrer que les spores sont disséminées par le ruissellement de l'eau sur les pièces florales.

## 2. Etude du rôle de l'eau

Pour étudier la répartition de l'inoculum sur les pièces florales et la dispersion des spores en absence de pluie, un dispositif de 12 bananiers a été mis en place sous serre. Toutes les fleurs de 6 de ces bananiers ont été inoculées avec du *C.musae* à la floraison, et pas celles des 6 autres bananiers. De la floraison jusqu'à la récolte, des isolements de *C.musae* ont été réalisés sur les pièces florales d'un fruit de chaque bananier. L'objectif est de démontrer qu'en absence de ruissellement d'eau, qu'il y ait ou pas de l'inoculum sur les pièces florales, les spores ne sont pas dispersées sur les fruits, et il n'y a donc pas de symptômes à la récolte.

Cette étude n'est pas terminée, et le seul constat qui puisse être effectué pour le moment est que la quantité d'inoculum de *C.musae* réisolée sur les pièces florales inoculées est très importante, alors qu'il n'y a pas ou peu d'inoculum sur les pièces florales non inoculées. Les conditions semblent donc réunies pour répondre à la question posée.

## III. La contamination des fruits

L'évaluation du niveau de contamination des fruits est particulièrement importante pour étudier l'impact du climat ou d'une technique de lutte visant à limiter la pollution des fruits par réduction de l'inoculum au champ.

### 1. Mesures sérologiques

Ces travaux ont été menés en collaboration avec D.Martinez du CIRAD-EMVT. Un mélange de conidies et d'appressoria de *C.musae* a été injecté à 10 lapins afin de stimuler la production d'anticorps. Les sérums produits par ces lapins, constitués d'un mélange d'anticorps (anticorps polyclonaux), étaient peu spécifiques du *C.musae*. Une mycothèque la plus représentative de la mycoflore aérienne du bananier a été constituée. L'objectif était d'obtenir des anticorps spécifiques du *C.musae* en éliminant les anticorps non-spécifiques par adsorption sur les différents champignons de cette mycothèque. Les sérums adsorbés ne croisent plus avec la majorité des champignons isolés. Toutefois, un dosage sérologique du niveau de contamination des fruits suppose au préalable de pouvoir décrocher tous les appressoria présents sur le fruit. Cette étape est difficile à réaliser, et cette voie a été abandonnée d'autant plus que le seuil de détection serait sûrement trop faible. Une deuxième approche a alors été envisagée.

### 2. Révélation des infections quiescentes

L'objectif recherché était de provoquer artificiellement la levée de la quiescence des appressoria de façon à observer les symptômes provoqués par l'intégralité de l'inoculum présent sur les fruits. Si l'on veut révéler un maximum d'infections, cette levée de quiescence ne doit pas être accompagnée d'une évolution physiologique du fruit vers un processus de sénescence qui interférerait avec la symptomatologie de l'antracnose. Par ailleurs, il est particulièrement intéressant de pouvoir révéler l'inoculum à différents stades de développement du fruit, et plus particulièrement à un stade précoce 5-6 semaines après le stade doigts horizontaux (date à laquelle un maximum de contaminations ont eu lieu), ce qui permettrait d'établir une prévision

de risques.

Différents facteurs ont été étudiés afin de déterminer une technique permettant de révéler les infections quiescentes sur les fruits. Tout d'abord l'éthylène, car chez les espèces climactériques, cette hormone stimule la germination, la formation d'appressoria et peut déclencher la levée de la quiescence et induire la formation de nécroses. Par ailleurs, nous avons testé différentes températures de conservation des fruits après mûrissage, car l'utilisation de températures élevées (>30°C) permet d'inhiber la dégradation des chlorophylles et inhibe la formation de spots de sénescence (tigrage) qui perturbent les observations. D'autre part, une température élevée pourrait être favorable au développement des nécroses. L'action d'une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> a aussi été étudiée.

Ces différents facteurs ont été étudiés sur des fruits prélevés à deux stades de développement (6 semaines après la floraison et au stade récolte), sur lesquels des inoculations artificielles ont été pratiquées: dépôt de 20 gouttelettes, ou trempage dans une solution de spores. Les fruits sont alors conservés pendant 5 jours à 25°C dans une chambre humide, puis la maturation est déclenchée par un traitement de 24 heures avec 1000 ppm d'éthylène. Ce sont alors les conditions de conservation des fruits après ce traitement qui ont différé:

#### **a. Action de la température**

Cinq températures de conservation ont été comparées: 25°, 29°, 32° et 35°C. A la température de 35°C, le nombre de nécroses observé est fortement diminué: cette température est inhibitrice. A 25°C, le nombre de nécroses est moins important, et les spots de sénescence sont nombreux. Aux températures de 29 et 32°C, les nécroses sont les plus importantes, mais à 32°C, il n'y a plus de spots de sénescence et les observations sont donc plus commodes. Cette température a été retenue.

#### **b. Comparaison de divers traitements.**

Différents traitements ont été comparés durant la conservation des fruits (6 jours):

A - température de conservation 32°C, dans l'air.

B - température de conservation 25°C, fruits conservés en polybag (4-8%CO<sub>2</sub> et 2-3%O<sub>2</sub>, environ).

C - température de conservation 32°C, fruits conservés en polybag (4-8%CO<sub>2</sub> et 2-3%O<sub>2</sub>, environ).

D - température de conservation 32°C, fruits conservés dans une atmosphère à 15%CO<sub>2</sub> et 2%O<sub>2</sub>.

E - température de conservation 32°C, la concentration en éthylène de 1000 ppm est maintenue pendant 6 jours.

Le traitement E, pour lequel les fruits sont soumis à l'action de l'éthylène pendant 6 jours, est celui qui a permis d'obtenir les meilleurs résultats (figure 6), et plus particulièrement pour les fruits immatures. Le CO<sub>2</sub> a plutôt une action inhibitrice sur le développement des nécroses comme en témoigne le faible nombre de nécroses observé sur les fruits du traitement D. Il semble bien que l'action de l'éthylène soit la plus déterminante pour lever la quiescence des appressoria, et une dose élevée appliquée pendant 6 jours permet de révéler les infections présentes sur des fruits immatures. D'autre part, le fait que de fortes concentrations en CO<sub>2</sub> inhibent le développement des nécroses est à rapprocher du fait que ce gaz est un inhibiteur de



l'action de l'éthylène. Une température de conservation élevée (32°C) permet de réaliser les observations rapidement en absence de tigrage qui altère la symptomatologie.

Cette technique de maturation pourrait permettre de réaliser une prévision de risque à un stade précoce. Une expérimentation a été menée sur 40 bananiers: 20 étaient engainés et on avait retiré les pièces florales et la bractée du régime à la floraison (EG), les 20 autres n'ont été ni engainés ni épistillés (NENG). A 6 semaines, l'on pouvait dénombrer 79.5 nécroses par fruits sur les fruits NENG et 3.5 nécroses sur les fruits EG. A la récolte, on a compté respectivement 94 lésions par fruit pour les NENG et 5.8 pour les EG. Au stade de 6 semaines il semble donc possible de prévoir le niveau de contamination des fruits à la récolte.

### 3. Etude de l'impact de l'élimination des sources d'inoculum sur la contamination des fruits

Cette étude a pour objectif de montrer, en vraie grandeur, que l'élimination des sources d'inoculum primaire (élimination des feuilles sénescentes, gainage précoce) et secondaire (élimination précoce des pièces florales et de la bractée du régime) de *C.musae*, peut être une **technique de lutte efficace et durable pouvant se substituer à la lutte chimique après la récolte**. En effet, le surcoût de main d'oeuvre nécessaire pour l'élimination des sources d'inoculum ne pourra se justifier que si un label supplémentaire de qualité des fruits peut être obtenu. Cela serait le cas si l'on pouvait supprimer l'emploi de pesticides à la récolte.

Cette étude a été menée sur une parcelle de 3 ha et comporte 3200 bananiers expérimentaux. Cette parcelle a été divisée en 2 parties égales "E" et "NE". Sur la partie "E", les pièces florales ont été éliminées à la floraison par deux passages successifs espacés de 3-4 jours. La bractée du régime a aussi été coupée à la floraison, lors du premier passage pour l'épistillage. Les régimes ont aussi été dégagés en coupant les feuilles qui les recouvraient. Les gaines des feuilles éliminées ont été découpées le plus près possible du pseudo-tronc pour éviter le développement de pourritures à proximité du régime. Les régimes ont été engainés le lendemain du deuxième passage de l'épistillage. Le bourgeon mâle a été éliminé après la pose de la gaine. Sur la partie "NE", les pièces florales et les bractées ont été laissées en place.

Sur les deux parties, chaque semaine, 50 à 60 régimes n'ont pas été engainés, ce qui a permis de caractériser l'effet de l'engainage (régimes gainés "G" ou non gainés "NG") sur la contamination des fruits. On a ainsi étudié l'effet de trois facteurs: engainage (G ou NG), élimination des sources d'inoculum (E ou NE), effet du traitement fongicide après la récolte (T ou NT). Il y a donc 8 traitements:

- NE.NG.NT
- NE.NG.T
- E.NG.NT
- E.NG.T
- NE.G.NT
- NE.G.T
- E.G.NT
- E.G.T

Pour chaque régime récolté, 2 fruits ont été prélevés sur le rang externe de la main n°2. Les 2 fruits étaient ensuite répartis en 2 lots T et NT. Après la découpe, les fruits du lot T étaient trempés pendant une minute dans un bain de thiabendazole à la concentration de 500 ppm. Les fruits du lot NT n'étaient pas traités. Les fruits ont été ensuite stockés 4 ou 5 jours à 25°C, puis

leur maturation induite par un traitement à l'éthylène ( $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$ ) pendant 24 h. La conservation s'est faite à  $32^\circ\text{C}$  en présence de la même concentration d'éthylène, pendant 6 jours. Au terme de cette conservation, on a dénombré le nombre de nécroses d'anthracnose par fruit.

La quantité d'inoculum (primaire et secondaire) incident sur les fruits est très importante: plus de 90 nécroses par fruit issu du traitement NE.NG-NT! L'"épistillage" seul (E.NG-NT) permet une réduction très significative du niveau de contamination des fruits (figure 7), de l'ordre de 72 %. Cette réduction est cependant plus importante avec l'engainage (NE.G-NT) : 84%, et encore plus en combinant l'engainage et l'épistillage au champ (E.G-NT) : 92% de réduction. Le niveau de contrôle obtenu avec la combinaison de l'engainage et de l'épistillage est comparable, voire meilleur, à celui obtenu classiquement par le traitement au thiabendazole de fruits engainés (NE.G-T). Il faut d'ailleurs remarquer que le traitement au thiabendazole a été particulièrement inefficace au cours de cette expérimentation (figure 7).

Ponctuellement, (3 ou 4 envois en tout), des fruits ont été emballés et expédiés par bateau à Rungis, selon le processus habituel d'exportation. Seuls les fruits appartenant aux traitements E.G-NT et NE.G-T ont été comparés. Les fruits ont été observés en sortie de mûrisserie, et les résultats obtenus confirment le bon niveau de contrôle obtenu par les techniques de réduction de l'inoculum au champ (EG-NT) comparativement à la lutte chimique traditionnelle (NE.G-T).

## **IV. Etude de la phase de quiescence**

Un travail d'enquête mené dans différentes situations pédo-climatiques et agro-techniques de Guadeloupe a permis de mettre en évidence une variabilité de l'efficacité du traitement au thiabendazole. Ce travail portait sur 20 bananiers inoculés à la floraison avec une souche sensible au fongicide. A la récolte, 2 fruits étaient alors blessés par écrasement standardisé du site d'inoculation, et un des fruits était traité au thiabendazole. La comparaison des nécroses se développant sur les fruits traités et non traités permet alors de mesurer l'efficacité du traitement fongicide. Les variations observées suggèrent que le caractère saisonnier des dégâts provoqués par ce champignon pourrait être lié à un développement plus avancé de l'infection (colonisation de l'épiderme par le mycélium) selon l'état physiologique du fruit, ce qui pourrait expliquer une moins bonne efficacité des traitements après-récolte.

Dans le cas de la banane, le travail qui fait référence à ce jour, a établi que les spores contaminent les fruits au champ, germent rapidement et forment un appressorium qui resterait inactif jusqu'à la maturation du fruit. Il faut remarquer que les études qui ont été réalisées antérieurement sur les processus infectieux de ce champignon ont été réalisées en laboratoire par inoculation artificielle de fruits ayant atteint le stade de récolte. Or, nos propres travaux sur les variations de l'inoculum ont permis de montrer que la contamination des fruits se produisait relativement tôt au champ (jusqu'à 2 mois avant la récolte), et que par conséquent ces études avaient occulté toute la phase de contact hôte-pathogène plus ou moins longue, ainsi que la variabilité de la physiologie du fruit.

Dans un premier temps la mise au point d'une technique de coloration par le schiff et le naphthol blue black a permis de repérer les différentes étapes du processus infectieux. Dans un deuxième temps, nous avons tenté de relier le développement du processus infectieux à l'efficacité du traitement fongicide, dans deux situations pédo-climatiques distinctes. Il semblait ressortir, de l'enquête précédente, que pour les parcelles situées sur vertisols l'efficacité des traitements au thiabendazole était mauvaise. Inversement les parcelles situées sur des andosols d'altitude de la région de Matouba présentaient toujours des efficacités élevées. Nous avons donc retenu ces deux situations extrêmes (Saint François sur Vertisol et Matouba sur andosol) pour tenter de valider l'hypothèse selon laquelle une mauvaise efficacité du traitement fongicide serait liée à un développement du mycélium dans la peau avant le stade récolte.

Sur chaque situation, à deux périodes de l'année, pour avoir des récoltes situées en période de bonne qualité mai-juin et de mauvaise qualité novembre-décembre, nous avons effectué des inoculations à la floraison sur 20 bananiers. A la récolte on a mesuré l'efficacité du traitement fongicide et effectué des prélèvements pour une observation histologique du processus infectieux. Malheureusement, il n'a pas été possible d'observer de mauvaises efficacités du traitement au thiabendazole sur la parcelle située sur vertisol à aucune des deux périodes, et parallèlement il n'a pas été observé de mycélium dans la peau des fruits. L'hypothèse de départ n'a pas pu être démontrée car les conditions (facteurs climatiques ?) n'ont pas été réunies cette année pour provoquer une sensibilité physiologique des fruits...à l'inverse de ce qui s'était produit en 1996.

Néanmoins, au cours d'une première expérimentation préparatoire, l'observation d'échantillons obtenus au stade récolte, en provenance d'une zone où il y a fréquemment des problèmes de qualité (Changy), a permis de repérer du mycélium, parfois dans des assises cellulaires profondes. Dans la zone témoin de référence (Neufchâteau), il n'y en avait pas. Il n'y a cependant pas eu d'évaluation de l'efficacité du traitement (la méthodologie n'était pas encore disponible), et une tempête tropicale avait détruit un certain nombre de bananiers. Il faudra ainsi reprendre cette expérimentation et une meilleure connaissance de l'élaboration de la qualité des fruits permettra de se placer sans ambiguïté dans des conditions où les fruits sont particulièrement sensibles, voire de les provoquer.

## **V. Etude des différentes espèces de *Colletotrichum* associées au bananier**

Les résultats d'isolements hebdomadaires menés de la floraison à la récolte sur les pièces florales montrent que d'autres espèces de *Colletotrichum* sont présentes. Parmi les autres *Colletotrichum* observés et n'appartenant pas à l'espèce *C.musae*, différents types morphologiques ont été identifiés. Ces champignons isolés appartiennent ils au groupe *C.gloeosporioides*?

## ***1. Caractérisation morphologique***

La caractérisation morphologique des différents *Colletotrichum* isolés permet de distinguer le *C.musae* des autres espèces. Sur milieu de Mathur modifié, le mycélium est relativement ras à légèrement cotonneux et rarement très cotonneux, et peu dense. La sporulation est abondante en absence de lumière, ce qui confère une couleur orangée aux colonies, et de nombreuses acervules sont visibles. Les acervules ne sont jamais réparties en cercles concentriques. Un grand nombre d'isolats ont été isolés et congelés à -80°C, ce qui permettra une étude complète ultérieure.

## ***2. Etude du pouvoir pathogène***

Un échantillon de 1000 souches a été inoculé à des bananes avec blessure et sans blessure. Toutes les espèces présentant des critères morphologiques distincts du *C.musae*, se sont avérées non pathogènes après inoculation de fruits blessés et non blessés. La réponse a été presque toujours constante entre les fruits blessés et les fruits non blessés, pour toutes les souches.

Une méthodologie d'échantillonnage pour étudier la variabilité du pouvoir pathogène au sein de l'espèce *C.musae* est en cours. L'objectif est de déterminer une unité de fruits pour laquelle on peut considérer que le développement des nécroses est uniforme, et aussi de déterminer le nombre de répétitions minimum nécessaire pour mettre différencier des souches entre elles.

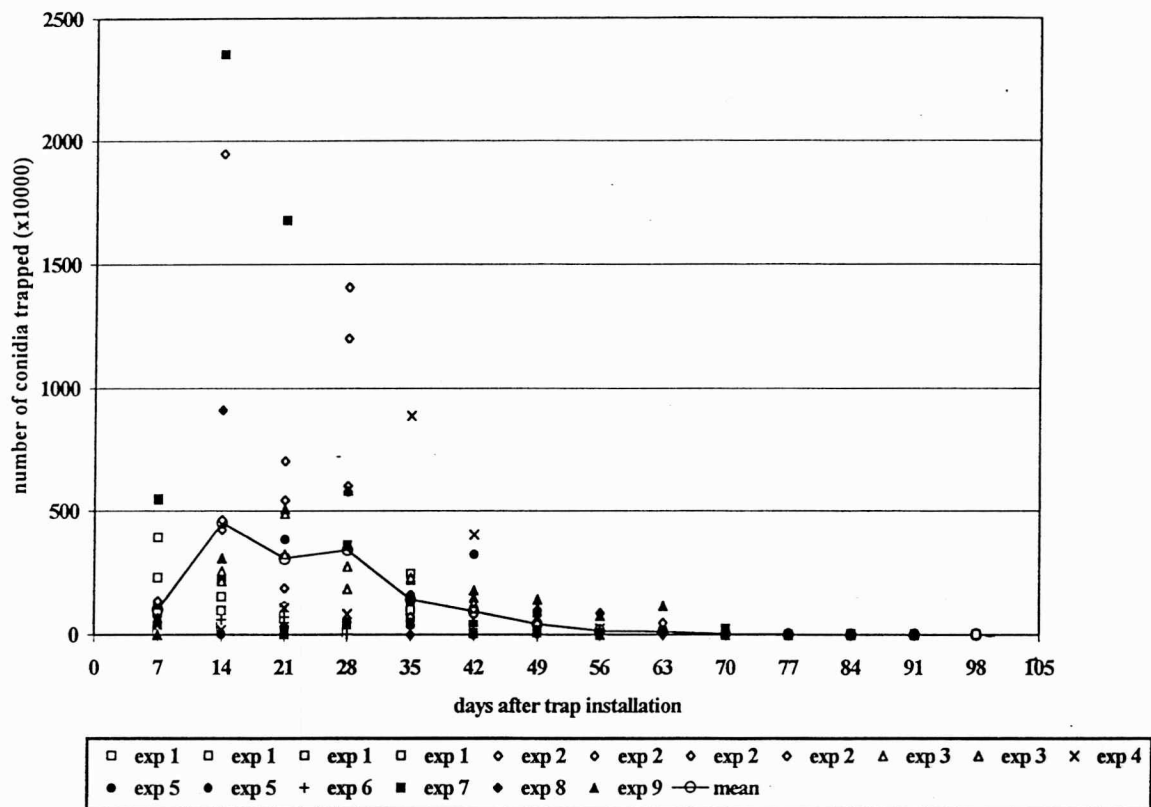


Figure 1 - Nombre de conidies de *Colletotrichum* piégées chaque semaine, depuis la floraison jusqu'à la récolte, au cours de 9 expériences.

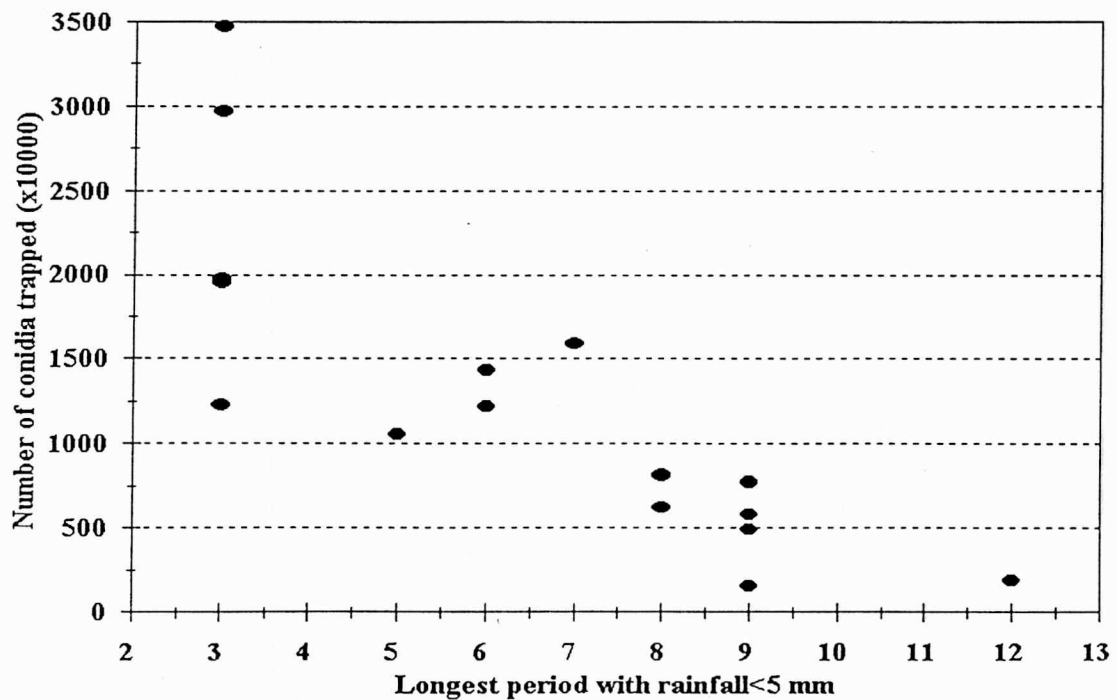


Figure 2 - Relation entre la quantité de conidies piégées depuis la floraison jusqu'à la récolte et la plus longue période où la pluviométrie est inférieure à 5 mm (LPD). La LPD a été calculée pour 8 expériences, et deux périodes sèches ont été fusionnées si elles étaient séparées par un jour de pluie < 15 mm

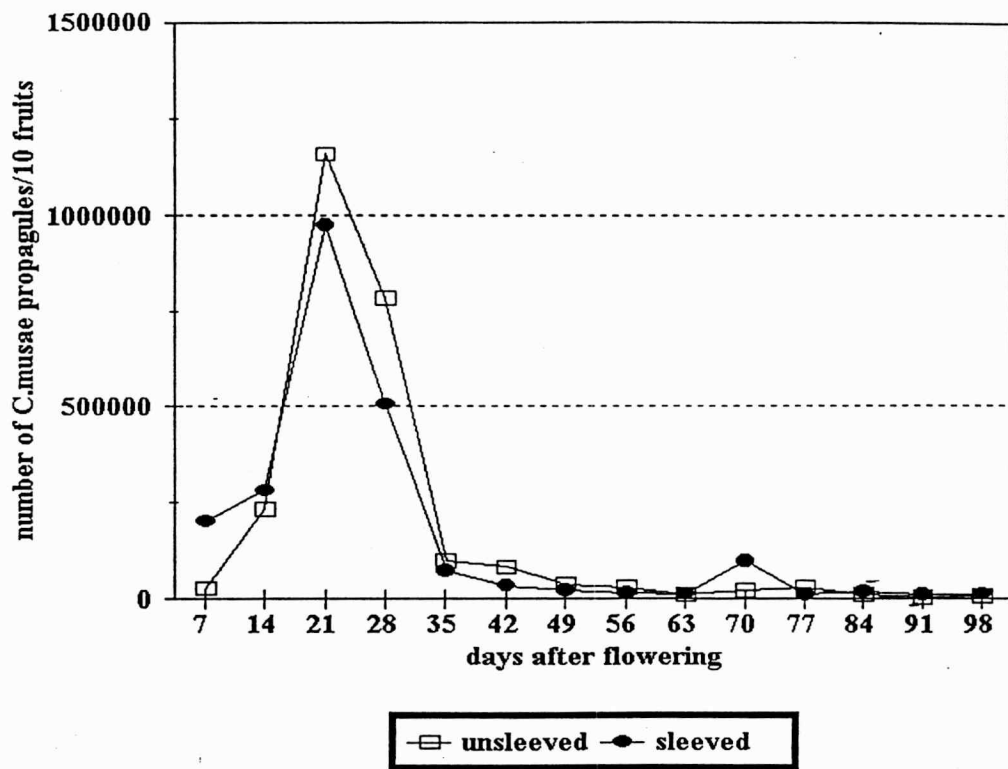


Figure 3 - Nombre de propagules de *Colletotrichum musae* isolés à partir des pièces florales, de la floraison à la récolte. Pour chaque traitement (régimes engainés et non gainés), les données représentent la moyenne de 10 échantillons des pièces florales collectées sur 10 fruits situés sur les deuxième mains de 10 bananiers différents.

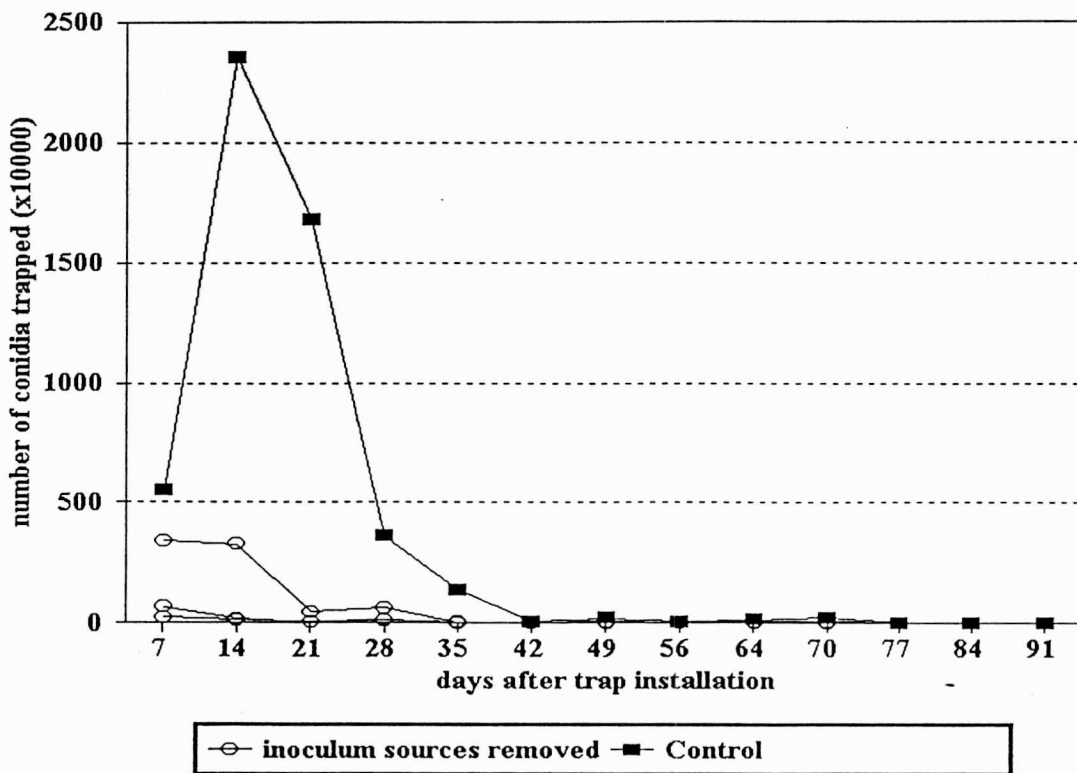


Figure 4 - Effet de l'élimination au champ des sources d'inoculum sur les quantités de conidies de *Colletotrichum spp* piégées chaque semaine, de la floraison jusqu'à la récolte.

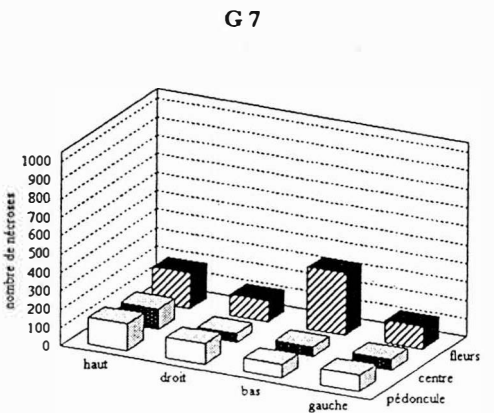
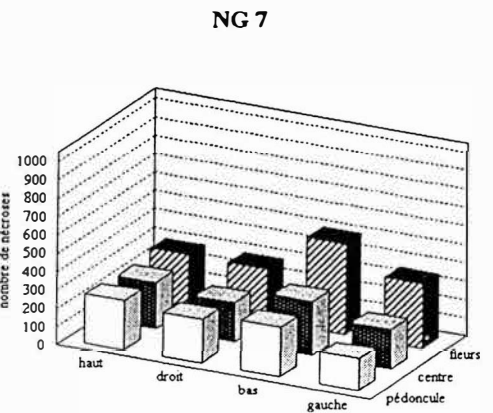
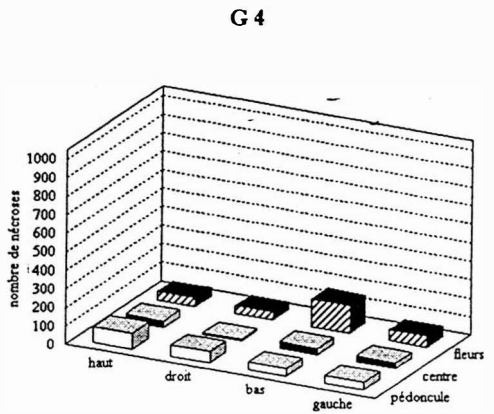
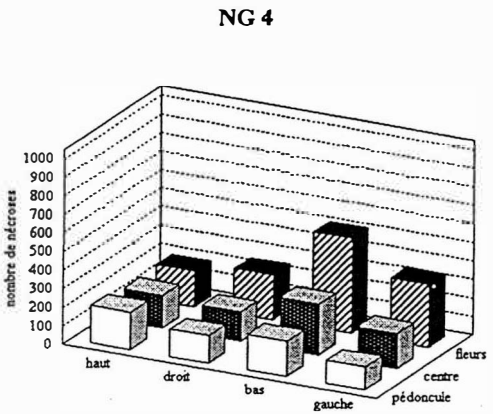
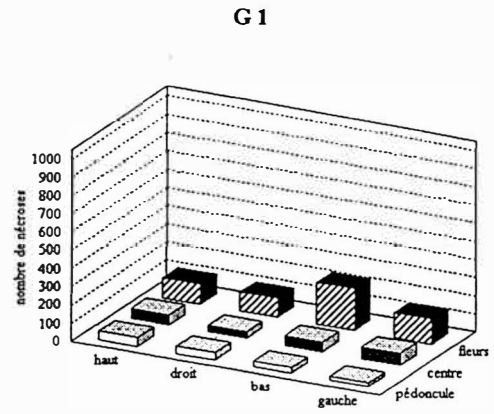
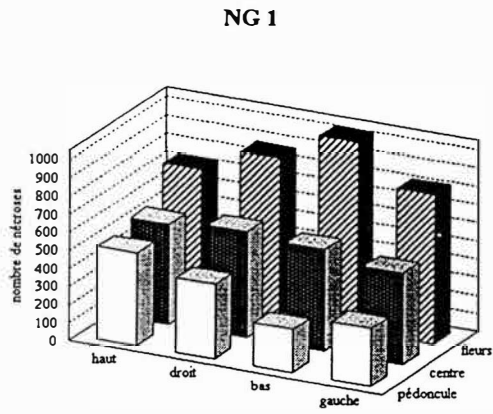


Figure 5 - Répartition des nécroses sur différents secteurs du fruit. 12 secteurs ont été déterminés, les 4 faces (gauche, droite, bas et haut) ayant été découpées en 3 secteurs égaux (près du pédoncule, centre, et près de l'apex floral). Les valeurs indiquées correspondent au nombre de nécroses mesurées sur 100 fruits prélevés sur des régimes non gainés (NG) ou gainés (G) et à différentes positions : mains 1, 4 et 7.

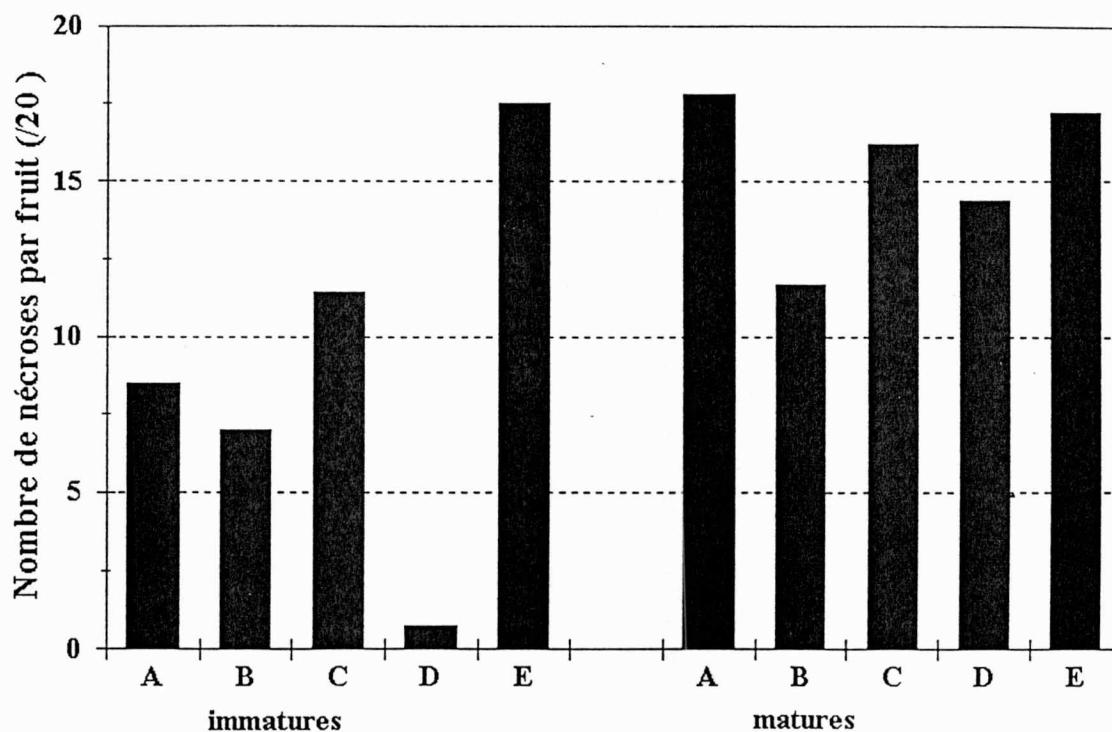


Figure 6 - Effet de différents modes de conservation sur l'apparition de nécroses sur des fruits immatures ou matures inoculés avec une solution calibrée à  $510^2$  conidies de *C.musae.mL^{-1}*. Il y a 20 sites d'inoculation par fruit, et les fruits sont conservés 5 jours à 25°C en hygrométrie saturée avant un traitement avec  $1000 \mu L.L^{-1}$  d'éthylène pendant 24 heures. Les différents modes de conservation sont: A (température de 32°C, dans l'air); B (température de 25°C, en polybag, 4-8%CO<sub>2</sub> et 2-3 % O<sub>2</sub>); C (température de 32°C, en polybag, 4-8%CO<sub>2</sub> et 2-3 % O<sub>2</sub>); D (température de 32°C, dans une atmosphère à 15%CO<sub>2</sub> et 2% O<sub>2</sub>); E (température de 32°C, avec une concentration d'éthylène maintenue pendant 6 jours). Le nombre de sites d'inoculation pour lequel il y a eu développement d'une nécrose est compté après 6 jours de conservation.



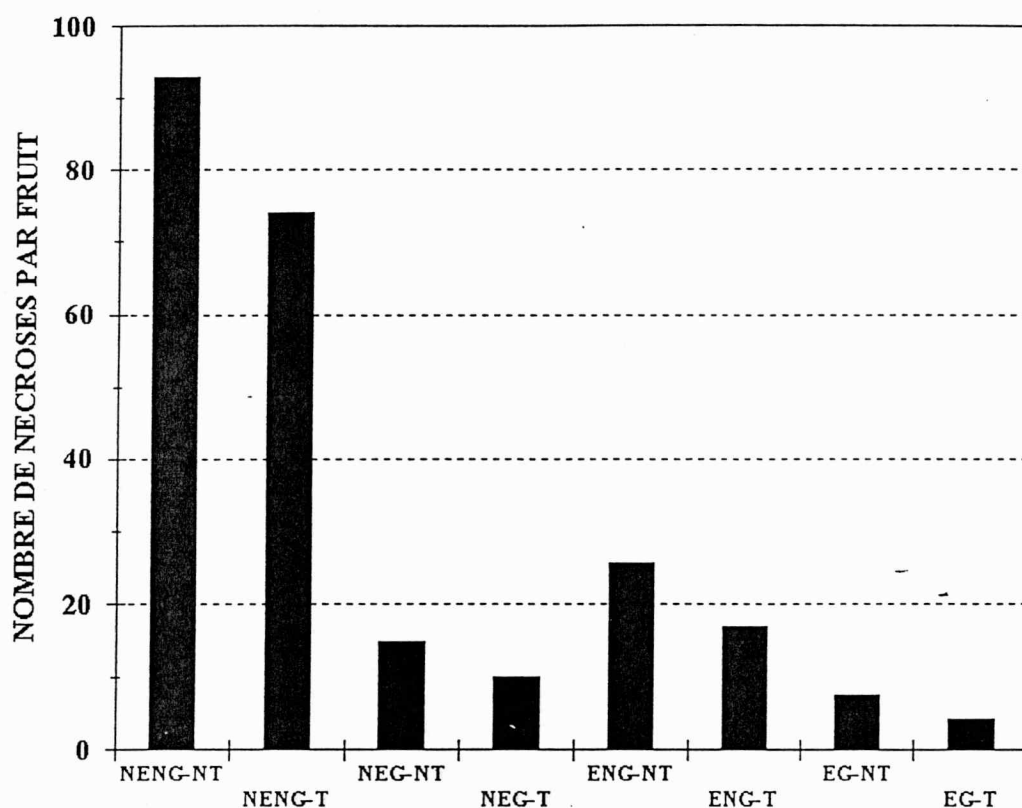


Figure 7 - Effet de différents traitements sur la contamination des fruits au champ. Le nombre de nécroses par fruit a été déterminé après traitement des fruits avec de l'éthylène (1000  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) pendant 24 heures à 25°C, puis les fruits sont conservés 4 jours à 32°C, en maintenant l'éthylène au contact des fruits. Les différentes combinaisons de facteurs sont étudiées : élimination des sources d'inoculum (pièces florales, feuilles et bractées) à la floraison (E) ou pas (NE). Pose d'une gaine plastique à la floraison (G) ou pas (NG). Enfin, traitement des fruits à la récolte avec du thiabendazole (-T) ou pas (-NT). Les fruits traités et non traités sont deux doigts externes médians et voisins collectés sur la deuxième main du même régime.



**PRESENTATION**

***C. Kahawae / Café***

**Cirad-cp**

CIRAD-CP

Laboratoire de phytopathologie B.P. 5035

34035 MONTPELLIER CEDEX FRANCE

## **Rapport ATP *Colletotrichum***

(janvier 1997 à juin 1998)

***Colletotrichum kahawae* / *Coffea arabica***

## SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1 - ANALYSE DE LA DIVERSITE GENETIQUE	1
1 - 1 matériel et méthodes	1
1 - 1 - 1 collection d'isolats et culture	1
1 - 1 - 2 extraction et dosage de l'ADN	2
1 - 1 - 3 amplification de l'ADN	3
1 - 1 - 4 traitement des données	3
1 - 2 résultats	4
1 - 2 - 1 amplification RAPD et analyse de la diversité génétique	4
1 - 2 - 2 structure des populations pathogènes en Afrique de l'est	5
1 - 3 discussion	5
1 - 3 - 1 diversité des populations pathogènes	5
1 - 3 - 2 structure ces populations pathogènes en Afrique de l'est	7
1 - 3 - 3 centre de diversité de <i>C. kahawae</i>	7
2 - IDENTIFICATION DE SOURCES DE RESISTANCE	9
2 - 1 matériels et méthodes	9
2 - 1 - 1 matériel phytopathogène	9
2 - 1 - 2 matériel végétal	9
2 - 1 - 3 technique d'inoculation	9
2 - 1 - 4 lecture des sytômes et interprétation des résultats	10
2 - 2 résultats du Ring Test	10
2 - 3 inoculations complémentaires au Ring Test	12
2 - 4 criblage de divers matériel végétal	13
2 - 4 - 1 premier criblage de matériel végétal provenant du Cameroun, du Costa Rica et d'Ouganda	13
2 - 4 - 2 deuxième criblage de matériel végétal provenant du Costa Rica et d'Ouganda	15
2 - 4 - 3 troisième criblage de matériel végétal provenant du Costa Rica et du Cameroun	16
2 - 4 - 4 quatrième criblage de matériel végétal provenant du Cameroun et de Tanzanie	18
2 - 4 - 5 cinquième criblage avec du matériel provenant de Tanzanie	18
2 - 5 discussion	20

3 - PREMIERES ETAPES DANS L'ELABORATION D'UN TEST SUR FEUILLES	20
3 - 1 matériel et méthodes	20
3 - 1 - 1 matériel fongique	20
3 - 1 - 2 matériel végétal	21
3 - 1 - 3 méthodes d'inoculation	21
3 - 1 - 4 lecture des symtômes	21
3 - 1 - 5 analyse des résultats	21
3 - 2 résultats	22
3 - 3 discussion	23

REFERENCES

ANNEXES

**Tab.1** : Liste des isolats de *Colletotrichum kahawae* d'Afrique de l'est analysés par RAPD

Isolats		Pays	District	Altitude (m)	Année de collecte	Variété de <i>C. arabica</i>	Organe
code CP	code origine						
KN 001	KHW 1B	Kenya					Drupe verte
KN 002	KHW 2	Kenya					Drupe verte
KN 003	KHW 3	Kenya					Drupe verte
KN 004	Q 2	Kenya					
KN 006	IMI 319418	Kenya	Ruiru		1987		Drupe
KN 007	KC 2	Kenya	Kiambu	1580	1995	French mission	Drupe verte
KN 008	KC 4	Kenya	Ruiru	1600	1995	SL 28	Drupe verte
KN 009	KW 39	Kenya	Bungoma	2000	1995	K 7	Drupe verte
KN 010	KP 1	Kenya	Taita Taveta	1500	1995	Ruiru 11	Drupe verte
KN 011	KP 2	Kenya	Taita Taveta	1500	1995	Ruiru 11	Drupe verte
KN 012	KP 3	Kenya	Taita Taveta	1500	1995	SL 28	Drupe verte
KN 014	KE 14	Kenya	Embu	1500	1994	SL 34	Drupe verte
KN 016	KW 19	Kenya	Bungoma	1600	1995	SL 28	Drupe verte
KN 017	KW 20	Kenya	West Pokot	1900	1995	SL 28	Drupe verte
KN 021	KC 8	Kenya	Kirinyaga	1700	1995	SL 34	Drupe verte
KN 022	KE 10	Kenya	Meru	1500	1995	K 7	Drupe verte
KN 026	KM 3	Kenya	Ruiru	1600	1995	Laurina	Drupe verte
KN 027	KM 4	Kenya	Ruiru	1600	1995	Caturra Amarillo	Drupe verte
BU 001	011.1	Burundi	Gitega	2050	1989		Drupe verte
BU 002	021.2	Burundi	Ngozi	1850	1989		Drupe verte
BU 003	023.2	Burundi	Ngozi	1850	1989		Drupe mûre
BU 005	042.1	Burundi	Kayanza	1770	1989		Drupe verte
BU 006	051.1	Burundi	Muyinga	1830	1989		Drupe verte
BU 007	052.1	Burundi	Muyinga	1830	1989		Drupe momifiée
BU 008	062.1	Burundi	Gitega	2030	1989		Drupe verte
BU 009	071.2	Burundi	Gitega	1570	1989		Drupe verte
BU 010	072.2	Burundi	Gitega	1570	1989		Drupe momifiée
BU 011	081.1	Burundi	Kirundo	1820	1989		Drupe mûre
BU 012	082.2	Burundi	Kirundo	1820	1989		Drupe verte
BU 013	101.2	Burundi	Muyinga	1830	1989		Drupe verte
BU 015	111.1	Burundi	Ngozi	1650	1989		Drupe verte
BU 016	121.2	Burundi	Ngozi	1850	1989		Drupe momifiée
BU 017	132.1	Burundi	Kayanza	1950	1989		Drupe mûre
BU 018	133.1	Burundi	Kayanza	1950	1989		Drupe momifiée
BU 019	CC102	Burundi					
MW 001	CC 60	Malawi					
MW 002	M 2	Malawi					
MW 003	CC 66	Malawi					
MW 004	IMI 301220	Malawi	Mzuzu		1986	<i>Coffea spp</i>	Drupe
MW 005	IMI 325944	Malawi	Kawalazi		1986		Drupe
MW 007	CC 72	Malawi					
TZ 001	IMI 359451	Tanzanie					
TZ 002	IMI 359452	Tanzanie					
TZ 004	IMI 359454	Tanzanie					
TZ 005	IMI 359455	Tanzanie					
TZ 006	IMI 311655	Tanzanie			1986	<i>Coffea spp</i>	
RW 002	RW 002	Rwanda	Rubona		1993	Ar 575	Drupe verte

## INTRODUCTION

Au cours de l'année 1997, l'équipe du CIRAD-CP de Montpellier a approfondi ses recherches selon les axes dégagés lors des précédentes études

i) **La caractérisation des populations pathogènes** a été poursuivie grâce notamment à l'utilisation de marqueurs moléculaires. Les objectifs de cette étude ont consistés dans la mise au point de la technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) sur *Colletotrichum kahawae* et à l'identification de marqueurs potentiellement utilisables pour caractériser la structure des populations pathogènes (étendue de la diversité génétique et différenciation des populations). Cette analyse a été réalisée pour les populations pathogènes d'Afrique de l'est et est actuellement étendue à l'Afrique de l'ouest (Cameroun).

ii) **La recherche de sources de résistance** a été poursuivie selon les plans d'inoculation artificielle définis au cours des exercices précédents. Une collection de génotypes de *Coffea arabica* a donc été testée pour la résistance vis-à-vis de différentes souches de *C. kahawae*. Ces tests ont permis de classer les génotypes selon leur niveau de sensibilité. Enfin, une étude comparative des résultats du Ring Test obtenus par nos partenaires au Cameroun et au Portugal a été réalisée afin de tester la robustesse des résultats obtenus.

iii) Les tests d'inoculations sont actuellement réalisés sur semenceaux déracinés. Ce type de test, lourd dans sa mise en œuvre, présente en plus certains inconvénients majeurs tels que sa nature destructrice et des problèmes de reproductibilité (effet "date d'inoculation" important). Un nouveau type de test moins contraignant et plus robuste apparaît donc nécessaire. Nous présenterons les premières étapes dans **l'élaboration d'un test d'inoculation sur feuilles de caféier**.

## 1 - ANALYSE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

### 1 - 1 Matériel et méthodes

#### 1 - 1 - 1 collection d'isolats et culture

Quarante six isolats monospores ont été sélectionnés parmi la collection actuellement



conservée au CIRAD. Ces souches proviennent du Kenya (17 isolats), de Tanzanie (5 isolats), du Malawi (6 isolats), du Burundi (17 isolats) et du Rwanda (1 isolat) (Tab.1). Elles sont maintenues

en culture à 23°C sur milieu PDA (Difco) ou en collection sous forme d'implants mycéliens immergés soit dans l'eau, soit dans le glycérol et conservés à température ambiante.

Les cultures fongiques pour l'extraction d'ADN sont réalisées en milieu liquide (Sreenivasaprasad *et al.*, 1993). Douze implants mycéliens sont introduits dans un erlenmeyer contenant 100 ml de Potato Dextrose Broth pH 5,6 (PDB, Difco) et mis à incuber à 25°C sous agitation (90 tr/min) pendant 72h. Le mycélium est alors récupéré par filtration sur membrane nylon (Monyl, 66µm), rincé à l'eau distillée et séché sur papier filtre. Après lyophilisation, le matériel fongique est conservé à -20°C.

### 1 - 1 - 2 extraction et dosage de l'ADN

L'ADN est extrait selon le protocole établi par Rogers et Bendich (1988) et modifié pour *C. kahawae*. Le mycélium lyophilisé (100 mg) est broyé dans un tube eppendorf de 2 ml, réhydraté par adjonction de 1 ml de tampon d'extraction CTAB 1x chaud (65°C)(CTAB 1%, 50 mM Tris HCl pH8, 10 mM EDTA pH8, 0,7 M NaCl, 0,5% PVP40) et mis à incuber 5 min à 65°C. Les débris fongiques sont éliminés après 5 min de centrifugation (13.000 g) en présence de 500µl de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Le surnageant est alors extrait avec un cinquième de volume de tampon CTAB 5x (CTAB 5%, 0,7 M NaCl) et 500 µl de chloroforme/alcool isoamylique. Après 5 min de centrifugation, la phase aqueuse (surnageant) est récupérée et un volume de tampon de précipitation est ajouté (CTAB 1%, 50mM Tris HCl pH8, 10mM EDTA pH8). Un précipité d'acides nucléiques se forme et est récupéré après 5 min de centrifugation. Le culot est repris dans 500 µl de TE NaCl (10 mM tris HCl pH8, 1 mM EDTA pH8, 1M NaCl), reprécipité à l'isopropanol 100% et rincé à l'éthanol 70%. Les tubes sont alors renversés jusqu'à évaporation complète de l'éthanol, puis le culot est repris dans 200 µl de TE 0,1x et 10 µl de RNase A (10 mg ml<sup>-1</sup>) sont ajoutés.

Après 1 h d'incubation à 37°C, 200 µl de phénol/chloroforme/ alcool isoamylique (25/24/1) sont incorporés. L'émulsion est centrifugée à 13.000 g pendant 5 min et la phase aqueuse (surnageant) est récupérée. L'opération est renouvelée une seconde fois puis la phase aqueuse est extraite de la même façon par un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Le surnageant est alors récupéré, additionné d'un demi volume d'acétate d'ammonium 7,5 M et de deux volumes d'éthanol 100% glacé. Le mélange est homogénéisé par renversement puis incubé 15 min à -20°C. L'ADN est récupéré après 15 min de centrifugation à 13.000 g, rincé à

l'éthanol 70%, séché et repris dans 100 µl de TE 0,1x. La concentration de l'ADN est estimée visuellement après migration sur gel d'agarose par comparaison avec une gamme étalon. Les solutions d'ADN sont alors ajustées à la concentration de 10 ng µl<sup>-1</sup> et conservées à -20°C.

### 1 - 1 - 3 amplification de l'ADN

Le protocole d'amplification RAPD décrit par Williams *et al.* (1990) a été modifié pour *C. kahawae*. Les amplifications ont été réalisées sur plaque de microtitration dans un volume final de 25 µl. Le mélange réactionnel comprend 2,5 µl de tampon d'amplification 10x (Eurobio, Les Ulis, France), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Eurobio), 200 mM de chaque dNTP (Pharmacia, St Quentin-en-Yvelines), 0,2 mM d'amorce (Operon Technologies Inc, Alameda, California, USA), 50 ng d'ADN et 1 unité de *Taq* DNA polymérase (Eurobiotaq II, Eurobio). Le mélange réactionnel est ensuite recouvert d'une goutte d'huile minérale.

Quarante amorces RAPD correspondant aux kits E et X (Operon) ont été testées pour révéler du polymorphisme au sein de la collection d'isolats.

Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur PTC 100 (MJ Research Inc, Watertown, Mass., USA) programmé pour 1 cycle de 5 min à 94°C suivi de 45 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 39°C et 60 sec à 72°C. et terminé par une phase d'élongation de 10 min à 72°C. Les produits d'amplifications sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,4% dans un tampon TBE 0,5x pendant 3h à 6,7 Vcm<sup>-1</sup> (Sambrook *et al.*, 1989). Les gels d'électrophorèse sont ensuite colorés au bromure d'éthidium et les produits d'amplification visualisés sous UV λ=360 nm.

### 1 - 1 - 4 traitement des données

Pour chaque amorce, trois répétitions indépendantes ont été réalisées afin de vérifier la reproductibilité des profils d'amplification obtenus. Seuls les fragments polymorphes reproductibles ont été retenus pour l'analyse. Chaque produit d'amplification est considéré comme un locus à deux allèles : **présent ou absent** et répertorié sous forme d'une matrice 1/0 respectivement.

La structure génétique des populations a été analysée à l'aide du logiciel GENEPOP v. 3.1 (Raymond et Rousset, 1995). Parmi les loci RAPD polymorphes, nous avons sélectionné ceux dont la fréquence est supérieure ou égale à 10% pour les analyses statistiques. Ce seuil de 10%

a été retenu pour les analyses statistiques afin de minimiser le biais lié aux faibles effectifs des populations pathogènes. De plus, n'ont été considérés pour cette étude que les populations représentées par au moins cinq individus soient le Kenya, le Burundi, la Tanzanie et le Malawi. Pour chaque locus, un test exact de Fisher est réalisé et l'hypothèse nulle: "les populations ne sont pas différenciées pour ce locus" est rejetée lorsque  $p < 0,05$ .

Le logiciel GENEPOP nous a également permis de tester l'indépendance statistique des loci (déséquilibre de liaison) pour chacune des populations étudiées. Pour une paire de loci donnée, 1000 tableaux de contingence sont réalisés en permutant de façon aléatoire les allèles dans les populations tout en conservant les fréquences alléliques initiales. Pour chaque tableau de contingence, un test exact de Fisher est réalisé et comparé au test effectué avec les données originales. Le logiciel donne alors la probabilité d'obtenir des valeurs simulées inférieures ou égales au test original. L'hypothèse d'indépendance des loci est rejetée lorsque cette probabilité est inférieure à 0,05.

Les loci RAPD indépendants ainsi identifiés sont alors retenus pour l'estimation de l'indice  $F_{st}$  de Weir et Cockerham (1984). Cet estimateur permet d'apprécier les parts intra et inter populations de la variabilité génétique.

Enfin, l'indice de diversité génétique de Nei (1978), non biaisé et corrigé pour de petits effectifs a été estimé pour chaque population à partir des loci RAPD retenus précédemment.

## 1 - 2 Résultats

### 1 - 2 - 1 amplifications RAPD et analyse de la diversité génétique

Sur les 40 amorces RAPD utilisées pour rechercher du polymorphisme, 27 ont généré des profils d'amplification exploitables. Pour illustration, les profils d'amplification obtenus à l'aide de l'amorce OP X01 sont présentés dans la planche 1. Au total, 284 produits d'amplification reproductibles ont été répertoriés soit 7,1 fragments par amorce.

Parmi les 284 fragments amplifiés, 58 se révèlent polymorphes, soit 20,4% des amplifiats. Toutefois, sur les 58 marqueurs RAPD obtenus, 40 ne sont polymorphes que chez un seul individu. Ainsi, 29 de ces marqueurs caractérisent uniquement la souche BU 019.

Au final, nous disposons donc 18 marqueurs polymorphes dont les fréquences alléliques sont comprises entre 0,04 et 0,24. Parmi ces marqueurs, dix seulement présentent des fréquences alléliques supérieures à 0,10 et sont donc exploitables pour l'analyse de la structure des populations pathogènes en Afrique de l'est.

De cette recherche de marqueurs RAPD, il ressort que les populations de *C. kahawae* sont très peu polymorphes avec seulement 3,5% de marqueurs non rares observés. L'indice de diversité

généétique de Nei (1978) a cependant été établi pour chacune des populations considérées, soit à partir de la totalité des marqueurs RAPD obtenus (284 loci), soit en ne considérant que les 58 loci polymorphes (Tab. 2). Cet indice, voisin de zéro, confirme la très faible diversité génétique des populations pathogènes en Afrique de l'est. La population du Burundi présentant un indice de diversité de 0,12 (estimé à partir des 58 loci polymorphes) semble la plus diversifiée. Cependant, cette diversité est le seul fait de la souche BU 019 qui cumule à elle seule 50% des marqueurs RAPD polymorphes. Lorsque cette souche est exclue de l'analyse, l'indice de diversité de la population Burundi est du même ordre de grandeur que ceux observés dans les autres populations (Tab. 2).

**Tab.2 :** Indices de diversité de Nei ( $H$ ) et sa variance ( $Var(H)$ ) estimés à partir de la totalité des marqueurs RAPD amplifiés et des 58 loci RAPD polymorphes

Population	284 loci RAPD		58 loci RAPD polymorphes	
	$H$	$Var(H)$	$H$	$Var(H)$
Kenya	0,0151	0,0053	0,0740	0,0227
Burundi	0,0251	0,0043	0,1232	0,0112
Burundi (sans BU019)	0,0126	0,0035	0,0615	0,0148
Malawi	0,0061	0,0027	0,0299	0,0128
Tanzanie	0,0077	0,0034	0,0379	0,0158

**Tab. 3 :** Caractéristiques des marqueurs RAPD polymorphes retenus pour les analyses statistiques.

Marqueur	Taille (pb)	Fréquences de l'allèle "présent"					Probabilité du test exact de Fisher
		Global	Kenya	Burundi	Malawi	Tanzani	
E1-10	380	0,13	0,18	0,00	0,00	0,60	0,0047
E7-4	1100	0,87	1,00	0,65	1,00	1,00	0,0093

E7-6	750	0,83	0,82	0,71	1,00	1,00	0,3970
E12-7	750	0,80	0,82	0,65	1,00	1,00	0,2584
X1-5	1800	0,85	0,82	0,76	1,00	1,00	0,6752
X7-9	850	0,20	0,53	0,00	0,00	0,00	0,0006
X9-3	1200	0,11	0,00	0,12	0,33	0,20	0,0980
X13-10	460	0,24	0,65	0,00	0,00	0,00	0,0001
X13-11	440	0,24	0,65	0,00	0,00	0,00	0,0001
X13-12	420	0,24	0,65	0,00	0,00	0,00	0,0001

### 1 - 2 - 2 structure des populations pathogènes en Afrique de l'est

Malgré la très faible diversité des populations pathogènes, dix marqueurs RAPD ont été retenus pour l'analyse de la structure génétique de ces populations. Les caractéristiques de ces marqueurs à savoir la taille des fragments d'ADN amplifiés ainsi que les fréquences au global ou dans chacune des populations étudiées (Kenya, Burundi, Malawi et Tanzanie) sont présentées dans le Tableau 3. Un test exact de Fisher a été réalisé pour chacun de ces loci et la valeur de la probabilité est présentée dans la dernière colonne. Ce test indique que parmi les dix loci étudiés, six différencient significativement les populations d'Afrique de l'est. Il s'agit des marqueurs E1-10, E7-4, X7-9, X13-10, X13-11 et X13-12. Pour ces marqueurs, le même type de test a été réalisé en considérant les populations deux à deux (Tab. 4). Il apparaît que dans cinq cas sur six, la population du Kenya se différencie des autres populations pathogènes. Un seul marqueur (E1-10) permet de différencier deux autres populations : le Burundi et la Tanzanie. Par contre, aucun marqueur ne permet de différencier la population du Malawi des populations du Burundi ou de Tanzanie.

Le logiciel GENEPOP nous a également permis de tester l'indépendance statistique des dix loci RAPD retenus. Lorsque les trois populations sont analysées conjointement, il apparaît que 50% des combinaisons de loci sont en déséquilibre de liaison. Deux marqueurs RAPD (E1-10 et X9-3) sont totalement indépendants. Suite à cette analyse, cinq loci RAPD polymorphes indépendants peuvent être retenus pour l'estimation du paramètre  $F_{st}$  de Weir et Cockerham (Tableau 5). Cet indice nous permet de déterminer la part relative de chacun des marqueurs dans la variabilité inter ou intra population. Ainsi, l'indice estimé à partir des cinq marqueurs RAPD indépendants ( $F_{st}=0,2525$ ) indique que près de 25% de la variabilité est due à des différences

entre les différentes populations. Toutefois, cette variabilité n'est le fait que de trois loci RAPD: E1-10, E7-4 et X7-9 pour lesquels des valeurs de  $F_{st}$  comprises entre 0.26 et 0.45 sont observées.

### 1 - 3 Discussion

#### 1 - 3 - 1 diversité des populations pathogènes

A travers cette étude, nous avons mis en évidence que les populations pathogènes en Afrique de l'est présentent un **très faible niveau de diversité génétique**. A l'exception de la souche BU 019, tous les individus étudiés peuvent être considérés comme appartenant à un groupe génétiquement homogène. Un seul isolat (BU 019) semble plus polymorphe. En effet, cette souche présente 50% des marqueurs polymorphes (marqueurs rares compris) soit 29 des 58 marqueurs RAPD.

**Tab.4** : Populations pour lesquelles les fréquences des marqueurs RAPD sont significativement différentes (test exact de Fisher)

Marqueur	Populations différenciées	Probabilité du test exact de Fisher
E1-10	Burundi / Tanzanie	0,0072
E7-4	Kenya / Burundi	0,0192
X7-9	Kenya / Burundi	0,0009
	Kenya / Malawi	0,0017
X13-10	Kenya / Burundi	0,0002
	Kenya / Malawi	0,0123
	Kenya / Tanzanie	0,0354
X13-11	Kenya / Burundi	0,0001
	Kenya / Malawi	0,0124
	Kenya / Tanzanie	0,0377
X13-12	Kenya / Burundi	0,0002
	Kenya / Malawi	0,0133
	Kenya / Tanzanie	0,0332

**Tab.5** : Valeur de l'indice  $F_{st}$  de Weir et Cockerham (1984) estimé pour cinq loci RAPD indépendants

Marqueur RAPD	Valeur de $F_{st}$	Probabilité
E1-10	0,3138	0,0064
E7-4	0,2617	0,0110
E12-7	0,0741	0,2529
X7-9	0,4549	0,0002
X9-3	0,0819	0,0908
Totalité	0,2525	0,0000 -

En fait, l'importante proportion de marqueurs polymorphes associés à cet isolat ainsi que son appartenance au groupe de compatibilité végétative (VCG) caractéristique des souches camerounaises (Bella Manga, 1997) indiquent que l'origine de la souche BU 019.1 pourrait être éronnée. Pour vérifier cette hypothèse, trois isolats du Cameroun ont été analysés conjointement (données non présentées). Il ressort de cette analyse que les 29 marqueurs RAPD associés à la souche BU 019 sont présents chez les isolats camerounais ce qui confirmerait l'hypothèse d'une erreur d'étiquetage survenue au cours d'échanges entre laboratoires. Ainsi, les haplotypes de la souche BU 019 et des trois isolats camerounais d'une part et l'analyse des VCG d'autre part (Bella Manga, 1997), suggèrent l'existence d'une différenciation entre les populations pathogènes d'Afrique de l'est et du Cameroun. Cette hypothèse est actuellement à l'étude avec l'analyse d'une collection d'isolats prélevés dans diverses zones caféicoles de Cameroun. Toutefois, la réelle appartenance de la souche BU 019 à la population pathogène du Burundi ne peut pas être écartée. La vérification de cette hypothèse implique la caractérisation moléculaire d'un échantillon plus conséquent d'isolats du Burundi dans le but de détecter d'autres souches apparentées. Enfin, la souche originale étant déposée auprès de l'IMI, il conviendra de se la procurer à nouveau aux fins de comparaisons.

Malgré la faible diversité génétique observée en Afrique de l'est, **une différenciation des populations pathogènes** est observée : six des dix marqueurs RAPD étudiés présentent des fréquences alléliques significativement différentes entre les populations. La différenciation des populations pathogènes pourrait résulter de différences de pressions de sélection qui s'exercent au sein des populations (différences d'ordre écologique ou différences de variétés de caféier cultivées). Si tel était le cas, une plus grande diversité génétique des populations pathogènes serait observée. Or, les populations pathogènes sont très peu diversifiées en Afrique de l'est. Ceci reflète la relative homogénéité génétique de l'arabicaculture dans cette région. Il semble donc que la différenciation observée résulte de phénomènes de **dérive génétique** au sein des populations pathogènes.

### 1 - 3 - 3 centre de diversité de *C. kahawae*

Cette structure des populations de *C. kahawae* en Afrique de l'est pose plus particulièrement le problème du centre d'origine de la maladie. En effet, l'antracnose des baies du caféier a été observée pour la première fois sur les hauts plateaux kenyans en 1922 (Mac Donald, 1926). Ainsi, le centre d'origine de la maladie pourrait se situer au Kenya.

La relative homogénéité génétique des populations pathogènes en Afrique de l'est confirme le **caractère récent** de la maladie. Par contre, la faible diversité de la population kenyane indique que cette région **n'est pas un centre de diversité** pour *C. kahawae*. Celui-ci est donc à rechercher sur d'autres aires géographiques telles que l'Éthiopie (centre de diversification de *Coffea arabica*) ou l'Ouganda (zone de convergence des parents présumés de *C. arabica*, i.e.: *C. eugenioides*, *C. canephora*, *C. liberica* et *C. congensis*) (Muller, 1980). Dans cette optique, une collection d'isolats pathogènes provenant de ces aires géographiques doit être constituée. Enfin, l'agent pathogène est à rechercher sur d'autres espèces de *Coffea*, notamment *C. eugenioides*. En effet, Van der Graaf (1992) émet l'hypothèse d'une interaction parasitaire faible entre *C. kahawae* et *C. eugenioides*. Actuellement, nous disposons au laboratoire de trois isolats prélevés sur *C. eugenioides* et semblant appartenir au genre *Colletotrichum*. L'analyse moléculaire de ces isolats ainsi que leur aptitude à infecter des semences de *C. arabica* doit être entreprise afin de vérifier cette possibilité.

L'étape suivante de cette étude consiste dans la comparaison des populations pathogènes d'Afrique de l'est et celles du Cameroun. Les premiers éléments réunis (VCG, haplotypes RAPD



de trois isolats) indiquent une probable différenciation de ces populations. L'analyse de la répartition des marqueurs moléculaires permettra certainement de vérifier l'hypothèse selon laquelle la présence de la maladie dans d'autres régions que l'Afrique de l'est résulterait d'échanges de matériel végétal infecté à partir du Kenya (Muller, 1964; Muller, 1970).

D'autre part, une variabilité pour l'agressivité chez certains isolats a pu être mise en évidence lors de tests sur semenceaux (Roma, 1997). Cette diversité n'est pas observée à l'aide des marqueurs RAPD. Après s'être assuré que cette variabilité ne résulte pas d'une perte d'agressivité liée aux repiquages successifs, il sera nécessaire de caractériser l'ensemble des isolats de la collection pour l'agressivité sur une gamme de cultivars définie et de comparer ces résultats aux données moléculaires.

Enfin, la faible proportion de marqueurs RAPD polymorphes observés dans les populations pathogènes d'Afrique de l'est implique la mise au point de nouveaux outils moléculaires plus puissants tels que les microsatellites ou les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Vos *et al*, 1995). En effet, cette méthodologie s'est avérée générer un grand nombre de marqueurs polymorphes utilisables en génétique des populations notamment chez *Colletotrichum lindemuthianum* (Herrera-Estrella *et al.*, 1997).

## 2 - IDENTIFICATION DE SOURCES DE RESISTANCE

### 2 - 1 Matériels et méthodes

#### 2 - 1 - 1 matériel phytopathogène

Les isolats utilisés pour les inoculations artificielles proviennent du Cameroun et de l'Afrique de l'est (tab.6) ; l'isolat CM732 a été utilisé comme isolat de référence pour son fort pouvoir pathogène régulièrement observé en laboratoire, lors des expérimentations antérieures.

**Tab. 6** : Liste des isolats de *Colletotrichum kahawae* utilisés dans l'évaluation du matériel végétal.

Isolats	Origine (provenance)	Code Origine	Pathogénicité sur baies	Hôte	Organe
CM712	Cameroun (IRA)	712B	+	<i>C.arabica</i>	baie verte
CM732A	"	732A	+	"	"

Isolats	Origine (provenance)	Code Origine	Pathogénicité sur baies	Hôte	Organe
KN001	Kenya (CRF) (IMI)	KHW1	+	<i>C.arabica</i>	baie verte
KN006		319418	+	"	"
KN009	Kenya (CRF)	KW39	+	"	"
KN010		KP1	+	"	baie développée
KW42		KW42	+	"	baie développée
KM1		KM1	+	"	baie en développement
TZ005	Tanzanie	92.11			
ZW001	Zimbabwe	ZW1	+	<i>C.arabica</i>	baie verte

### 2 - 1 - 2 matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans les différents tests d'inoculations sur hypocotyles provient pour la majorité d'arbres précisément identifiés (Annexe). Pour toutes les inoculations, les variétés Caturra amarillo ou Catuaï ont été utilisées comme témoin sensible.

### 2 - 1 - 3 technique d'inoculation

Le test sur hypocotyle a été mis au point par Cook (1973) et Van der Vossen (1976). On prélève des semenceaux de caféier âgés de 5 à 6 semaines avec leur système racinaire lavé avant inoculation. Les semenceaux sont cultivés sur un substrat composé de 2/9 de vermiculite et 7/9 de terreau.

Les hypocotyles sont inoculés par trempage jusqu'au collet dans une suspension conidienne. La suspension est préparée à partir de culture de *C.kahawae* se développant sur milieu PDA à 20°C avec une photopériode de 12H/12H. Elle est réalisée par la mise en suspension de conidies dans de l'eau distillée. La concentration de la suspension est ensuite ajustée à  $2.10^6$  conidies/ml. Les semenceaux sont ensuite mis en cellule à 20°C à l'obscurité pendant 48H. On réalise une seconde inoculation selon le même protocole au bout des 48H, puis ils sont mis à la lumière dans les mêmes conditions de température, avec une photopériode de 12H/12H, sous une humidité relative de 100%.

**Tab. 7 :** Analyse de variance des résultats du Ring Test obtenus dans les trois pays.

Variable	DDL	CM	F	P
Pays	2	1815,03	20,99	0,0001
Génotype	5	794,70	9,19	0,0003
Isolat	4	612,03	7,08	0,0018
Pays/Génotype	9	94,37	1,09	0,4201
Pays/Isolat	2	1117,68	12,93	0,0005
Génotype/Isolat	20	90,80	1,05	0,4666

**Tab. 8** : Analyse de variance des résultats du Ring Test obtenus au Portugal.

<b>Variable</b>	<b>DDL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Génotype	5	202,62	2,15	0,1502
Isolat	2	426,83	4,53	0,0435

**Tab. 9** : Analyse de variance des résultats du Ring Test obtenus en France.

<b>Variable</b>	<b>DDL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Génotype	5	929,29	73,61	0,0005
Isolat	4	1327,62	105,16	0,0003
Génotype/isolat	20	86,55	6,86	0,0373

## 2 - 1 - 4 lecture des symptômes et interprétation des résultats

Les lectures sont faites au bout de 7, 14 et 21 jours après la première inoculation d'après l'échelle de VAN DER GRAAF modifiée par BELLA MANGA qui comporte 5 stades

- 0 : absence de symptômes,
- 1 : petites lésions verdâtres évoluant vers le brun, largeur des lésions inférieure à 05 mm,
- 2 : une ou plusieurs lésions brunes ayant tendance à fusionner, largeur des lésions supérieure à 0,5 mm,
- 3 : larges lésions brunes avec de nombreuses tâches noires, ces dernières peuvent entourer l'hypocotyle mais l'extrémité reste verte,
- 4 : lésion noire encerclant l'hypocotyle ; l'extrémité est brune.

Les analyses sont effectuées à partir des  $\Pi M$  obtenus avec les résultats de la troisième lecture. Les données obtenues pour les différents tests d'inoculation ont fait l'objet d'une analyse de variance par le programme SAS. Le test de BONFERRONI à 5% a été utilisé pour comparer les moyennes.

Dans le cas où une interaction est détectée par l'analyse de variance, nous avons conclu lors de travaux précédents que pour vérifier la validité de cette interaction, il était préférable de tracer des graphiques d'interaction. Si les graphiques d'interaction et l'analyse de variance mettent en évidence des interaction, on peut alors envisager une analyse de corrélation pour préciser la nature de ces interactions.

Dans le cas où l'analyse de variance n'a pas détecté d'interaction ou que les graphiques d'interaction ne confirment pas la présence d'interaction, un indice moyen de sensibilité est calculé pour chaque hôte (IS) ainsi qu'un indice moyen de pathogénicité pour chaque isolat (IP). Ces indices varient de 0 à 100.

## 2 - 2 Résultats du Ring Test

L'analyse a porté sur les résultats du Cameroun, du Portugal et de la France. Les résultats obtenus avec CM712 étant aberrants, nous ne les avons pas pris en compte dans l'analyse de variance (Tab.7)

L'analyse de variance a mis en évidence un effet isolat, un effet pays, un effet génotype et une interaction pays/isolat, ce qui signifie que le classement des isolats dans chaque pays est différent.

Comme tous les génotypes n'ont pas été inoculés dans tous les pays, et que nous avons seulement décelé une interaction pays/isolat (pas d'interaction génotype/isolat), une analyse de variance par pays a été réalisée

- l'analyse de variance effectuée sur les résultats obtenus au CIFC/Portugal (Tab.8) met en évidence un effet isolat, mais pas d'effet génotype. Les interactions n'ont pu être testées car il n'y avait pas de répétition des inoculations.

- l'analyse de variance effectuée sur les résultats obtenus au CIRAD/France (Tab.9) a mis

en évidence un effet génotype, un effet isolat et une interaction génotype/isolat significatifs à 5%. Pour vérifier la validité de l'interaction, nous avons tracé les graphiques d'interaction (Fig.1).

L'analyse de ces graphiques ne fait pas ressortir d'interaction, on peut considérer que les courbes présentent globalement la même évolution (courbes sensiblement parallèles), on peut donc conclure que tous les génotypes et tous les isolats sont corrélés entre eux.

Du fait de l'absence d'interaction, le classement des isolats est identique quelque soit le génotype, et le classement des génotypes est identique quelque soit l'isolat. Ainsi, nous avons pu classer les isolats en fonction de leur indice moyen de pathogénicité (IP) vis à vis des génotypes testés dans chaque pays (Tab.10), et les génotypes en fonction de leur indice moyen de sensibilité (IS) vis à vis des isolats testés (Tab.11).

**Tab. 10 :** Classement des isolats de *C.kahawae* dans les différents pays en fonction des indices de pathogénicité.

FRANCE			PORTUGAL			CAMEROUN	
CM732	96,66	A	KN009	97,42	A	CM732	88,25
KN006	73,27	B	CM732	88,90	A B		
ZW001	72,37	B	ZW001	81,08	B		
KN001	65,16	C					
KN009	65,16	C					

**Tab. 11 :** Classement des génotypes de *C.arabica* dans les différents pays en fonction des indices de sensibilité.

FRANCE			PORTUGAL			CAMEROUN	
Cat. Ao	99,07	A	Cat.Ao	100	A	Cat.Ao	97,00
Java	77,17	B	Java	97,50	A	R. S. T02724 /08	62,00
R. S. T02724 /08	76,47	B	R. S. T02724 /08	93,00	A	R. S. T02724 /01	56,00
R. S. T02724 /01	70,31	B	Catimor T17938	78,00	B	Catimor T17938	50,00
Catimor T17937	69,50	B	R. S. T02724 /01	76,00	B		
Catimor T17938	69,00	B					

Les indices suivis d'une même lettre ne sont pas différents significativement

L'isolat CM732 utilisé par les trois partenaires montre un niveau d'agressivité élevé dans chacun des cas ; toutefois, il est à remarquer que l'isolat KN009 s'est montré plus agressif que

l'isolat CM732 lors des inoculations réalisées au Portugal, contrairement aux résultats obtenus au Cirad. Ces variations imposent la réalisation d'au moins une répétition de chaque couple génotype/isolat, lors de chaque inoculation, pour chacun des partenaires.

Pour les génotypes testés, les classements sont sensiblement équivalents dans les trois pays, avec toutefois des différences de valeurs relatives ; le génotype exprimant la plus faible sensibilité (Catimor T17938) présente des valeurs comprises entre 50 et 78 selon les partenaires.

## 2 - 3 Inoculations complémentaires au Ring Test

Cette analyse complète le Ring Test précédemment étudié, notamment pour le génotype Rume Sudan. Le même génotype T 02724 a été remis en essai en France et au Portugal, mais avec des semences prélevées sur des arbres différents :

- Rume Sudan 02 (testé en France)
- Rume Sudan 04 ( " )
- Rume Sudan 05 (testé en France et Portugal)
- Rume Sudan 06 ( " )
- Rume Sudan 07 ( " )

Dans cet essai, trois autres génotypes prélevés au Kenya ont été testés (mélange de 5 à 8 arbres):- Catimor (testé en France et Portugal)

- K7 ( " )
- Rume Sudan ( " )

Les six isolats utilisés dans le Ring Test ont été repris pour les inoculations en France. Au Portugal, seuls les isolats CM732, KN009 et ZW001 ont été utilisés.

Les résultats obtenus avec l'isolat CM712 étant aberrants, nous ne les avons pas pris en compte dans l'analyse de variance, ainsi que les trois génotypes kenyan qui n'ont pu être inoculés qu'avec un seul isolat.

**Tab. 12 :** Analyse de variance des résultats de l'analyse complémentaire au Ring Test obtenus en France et au Portugal.

Variable	DDL	CM	F	P
Pays	1	895,49	16,90	0,0034
Génotype	7	894,86	16,89	0,0003
Isolat	4	384,71	7,26	0,009
Pays/Génotype	4	118,67	2,24	0,1541
Pays/Isolat	2	515,81	9,74	0,0072

Variable	DDL	CM	F	P
Génotype/Isolat	25	181,58	3,43	0,0378

L'analyse de variance (tab. 12) met en évidence un effet pays, génotype, isolat, une interaction pays/isolat et une interaction génotype/isolat significatifs. L'interaction pays/isolat signifie que le classement des isolats est différent selon le pays. Du fait que tous les génotypes ne sont pas communs, une analyse de variance complémentaire pour chaque pays a été réalisée.

**Tab. 13 :** Analyse de variance des résultats de l'analyse complémentaire au Ring Test obtenus au Portugal.

Variable	DDL	CM	F	P
Isolat	2	302,76	3,90	0,0678
Génotype	4	121,58	1,57	0,2835

**Tab. 14 :** Analyse de variance des résultats de l'analyse complémentaire au Ring Test obtenus en France.

Variable	DDL	CM	F	P
Isolat	4	1024,53	256,13	0,0039
Génotype	7	1177,67	294,13	0,0039
Génotype/ Isolat	25	179,58	44,89	0,022

**Tab. 15 :** Classement des génotypes de *C.arabica* en fonction de leur indice de sensibilité.

FRANCE			PORTUGAL		
Cat.Ao	99,07	A	Catuaï	100	A
Java	77,17	B	Java	97,5	A
Rume Sudan 05	67,08	C	Rume Sudan 07	89,00	A
Rume Sudan 06	61,26	C	Rume Sudan 05	79,50	A
Rume Sudan 04	60,39	C			
Rume Sudan 02	56,38	C			
Rume Sudan 07	54,79	C			

**Tab. 16 :** Classement des isolats de *C.kahawae* en fonction de leur indice de pathogénicité.

FRANCE			PORTUGAL		
CM732	87,11	A	KN009	92,40	A
KN009	72,23	B	CM732	89,75	A
ZW001	65,88	B	ZW001	82,25	A
KN006	61,02	B			
KN001	60,63	B			

**Tab. 19** : Classement des géotypes de *C.arabica* utilisés dans le criblage en fonction de leur indice de sensibilité.

Origines	Géotypes	Indices
Cameroun	ET19c1 c4 L322	100 A
Cameroun	ET9c1 c4	100 A
Cameroun	ET19 c3 L219	90,91 A B
Cameroun	Et30*Ja1 c10 L22	90,00 A B C
Cameroun	ET33 c4L234	89,06 A B C D
Cameroun	ET1*ET33 c1 L15	86,11 A B C D E
Cameroun	ET39c1 c1	80,41 A B C D E F
Cameroun	ET32bc8 c2 L145	75,94 A B C D E F G
Cameroun	KF10 c3 L99	75,30 A B C D E F G
Cameroun	Ja1*ET41	75,00 A B C D E F G
Costa Rica	Catuai	72,45 A B C D E F G
Cameroun	ET3*ET7	71,58 A B C D E F G
Cameroun	ET16 c4 L216	68,34 B C D E F G
Cameroun	ET11c c3 L210	64,40 B C D E F G
Cameroun	KF7 c3 L31	64,02 B C D E F G
Ouganda	T8655	63,06 B C D E F G
Cameroun	Java	63,05 B C D E F G
Cameroun	ET33 c5	61,40 B C D E F G
Cameroun	CA5*ET3 c2 L8	60,60 B C D E F G
Cameroun	ET16 c5 L8	60,44 B C D E F G
Cameroun	IL3 c3 L88	59,71 C D E F G
Cameroun	ET19 c2 L61	58,71 - D E F G
Cameroun	STA2	57,58 E F G
Costa Rica	ET27 06 F 4B	56,87 E F G



Origines	Génotypes	Indices
Costa Rica	T.17937 b2-a2	56,40 E F G
Cameroun	ET3 c2	55,10 E F G
Cameroun	ET3 c2 L208	53,05 F G
Cameroun	Ja1 c1 L193	51,5 F G
Cameroun	ET4 c22 L210	50,30 F G
Cameroun	Il3 c5 L2	50,00 F G
Cameroun	ET34bc3 c1 L147	49,67 F G
Costa Rica	ET51 04 F 4B	45,39 G

L'analyse de variance des résultats du Portugal (Tab.13) ne met en évidence ni effet isolat ni effet génotype. Les interactions n'ont pas pu être testées dans le cas du Portugal, car il n'y avait pas de répétitions des inoculations.

L'analyse de variance des résultats obtenus au Cirad (Tab.14) montre la présence d'un effet isolat, génotype et une interaction génotype/isolat. Nous avons tracé les graphiques d'interaction pour vérifier la validité de cette interaction (Fig.2). On peut émettre l'hypothèse, au vu des graphiques, que tous les génotypes et tous les isolats sont corrélés entre eux. On peut toutefois remarquer que le génotype témoin sensible Caturra amarillo se distingue des autres génotypes. L'interaction décelée avec l'analyse de variance proviendrait peut être de cette différence.

L'absence d'interaction étant démontrée, nous avons pu classer les génotypes en fonction de leur indice de sensibilité (Tab. 15), et les isolats en fonction de leur indice de pathogénicité (Tab.16) pour chaque pays. On remarque que les indices de pathogénicité des isolats sont plus élevés au Portugal. L'analyse de variance des résultats obtenus au Cirad classe l'isolat CM732 comme le plus agressif, et met en évidence que les autres isolats sont corrélés entre eux (isolats de l'Afrique de l'Est), alors que l'analyse de variance des résultats obtenus au Portugal met en évidence que les trois isolats CM732, ZW001 et KN009 sont corrélés entre eux et que l'isolat KN009 ressort comme le plus agressif.

**Au vu de ces résultats et ceux du Ring Test, il semble qu'il y ait une variation du niveau d'agressivité des isolats au sein d'un même lieu d'expérimentation, ainsi qu'entre les différents lieux de test, ce qui entraîne des difficultés dans l'interprétation des résultats.**

**Il est donc nécessaire pour chaque expérimentation et pour chacune des équipes de faire au moins une répétition de chaque inoculation pour pouvoir tester les interactions ainsi que pour valider les résultats.**

## **2 - 4 Criblage de divers matériel végétal**

### **2 - 4 - 1 premier criblage de matériel végétal provenant du Cameroun, du Costa Rica et d'Ouganda**

En tenant compte de cette nécessité de réaliser des répétitions, un plan d'inoculation a été élaboré avec au minimum une répétition pour chaque génotype avec chacun des cinq isolats en essai. Les inoculations se sont déroulées à raison de trois génotypes par isolat et par semaine.

Toutes les inoculations prévues chaque semaine n'ont toutefois pas pu être réalisées à cause de l'état des graines, entraînant des difficultés de germination. Parfois, des génotypes ayant germés tardivement et qui n'avaient pas pu être inoculés dans la semaine programmée ont du être inclus dans les programmes d'inoculation des semaines suivantes ou dans des inoculations réalisées lors de semaines complémentaires au programme initial.

Une première analyse de variance a été effectuée ; elle n'a pas mis en évidence d'interaction génotype/isolat. Une deuxième analyse a été effectuée sans tester les interactions (Tab.17). Cette analyse de variance met en évidence un effet isolat, un effet génotype et un effet semaine significatifs à 5%.

**Tab. 17 :** Analyse de variance des résultats du criblage du matériel végétal.

Variable	DDL	CM	F	P
Génotypes	31	352,90	3,43	0,0001
Isolat	5	6139,86	59,68	0,0001
Semaine	21	431,13	6,36	0,0001

Nous avons pu établir un classement des isolats en fonction de leur indice de pathogénicité (Tab.18) et un classement des génotypes en fonction de leur indice de sensibilité (Tab.19).

**Tab. 18 :** Classement des isolats de *C.kahawae* utilisés dans le criblage en fonction de leur indice de pathogénicité.

Isolats	Indices	
CM732	75,66	A
ZW001	75,02	A
KN001	70,86	A
KN009	65,02	B
KN006	60,92	B

Lors des semaines 7,8 et 9, l'isolat CM732 ne ressort plus comme l'isolat le plus agressif; les Indices d'Intensité de la Maladie (IIM) obtenus pour le couple Catuai/CM732, normalement voisin de 90, sont inférieurs à 50. Un problème de culture de l'isolat CM732 a été rencontré lors de ces semaines au laboratoire, ce qui peut expliquer les résultats aberrants obtenus.

Compte tenu des résultats très faibles obtenus à la 7<sup>ème</sup>, 8<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> semaine avec l'isolat CM732, on remarque que certains génotypes de *C.arabica* présentent un indice de sensibilité plus faible qu'attendu (Tab.19) ; c'est notamment le cas pour le témoin sensible Catuai. De ce fait, d'autres génotypes apparaissent plus sensibles que ce dernier : ET19, ET33... .

Malgré un Indice de Sensibilité inférieur, le génotype Ja1 n'est pas significativement différent du génotype Java, ce qui ne semble pas confirmer les résultats précédemment obtenus

au laboratoire (AKALAY, 1995). Il est toutefois intéressant de remarquer que ce classement met en évidence des génotypes dont les indices de sensibilité sont proches de 50 et parfois même inférieurs : ET3, Ja1, ET4, IL3, ET34, ET51.

Tab. 20 : Classement des différents génotypes de *C. arabica* en fonction de trois isolats de *C. kahawae* utilisés dans le criblage.

	ISOLATS					
	CM732		KN009		ZW001	
	ET19c1 c4 L322	100	ET16 c5 L216	86,84	ET39c1 c4	100
	KF10 c3 L99	100	ET16 c4 L216	83,33	ET32 bc8 c2 L145	95,24
	ET19c1 c4	100	IL3 c3 L88	78,75	ET39c1 c1	94,23
	ET16 c4 L216	98,44	ET3*ET7	75	KF10 c3 L99	92,51
	ET3 c2	97,5	ET11c c3 L210	70,65	T8655	89,77
	ET19c1 c1	96,00	Catuaï	70,14	Ja1 c1 L193	88,89
	ET19 c3 L219	90,91	CA5*ET3 c2 L8	9,89	ET19 c2 L61	85,53
	ET33 c5	90,79	Ja1 c1 L193	68,33	ET16 c4 L216	84
	ET30*Ja1 c10 L22	90,00	Java	66,89	Catuaï	81,65
	ET33 c4 L234	89,06	T 8655	66,18	ET11c c3 L210	75
	KF7 c2 L31	87,50	ET3 c2	61,25	IL3 c3 L8	73
G	Ja1*ET41 c7 L5	84,38	ET4 c4 L216	57,14	CA5*ET3 c2 L8	69,61
E	ET32bc8 c2 L145	84,21	KF7 c2 L31	55,00	ET3 c2 L208	69,32
N	Catuaï	83,62	ET34 bc3 c1 L147	54,00	ET4 c2 L216	68,48
O	ET19 c2 L61	76,67	ET3 c2 L208	52,63	ET16 c5 L216	68,33
T	T.17937 b2-a2	74,00	ET33 c5	50,00	ET3*ET7	66,67
Y	ET11c c3 L210	73,03	STA2	50,00	Ja1*ET41 c7 L5	65,63
P	Java	71,91	ET19 c2 L61	48,33	Java	62,8
E	STA2	71,74	ET27 06 F 4B	47,50	ET34 bc3 c1 L147	56,67
S	T8655	66,62	T.17937 b2-a2	45,00	KF7 c2 L31	56,25
	ET27 06 F 4B	66,25	ET51 04 F 4B	44,00	ET3 c2	52,27
	ET3 c2 L208	65,84			ET51 04 F 4B	38,00
	ET3*ET7	63,03			ET27 06 F 4B	36,90
	IL3 c3 L88	61,67				
	ET16 c5 L216	58,33				
	ET34 bc3 c1 L147	54,69				
	ET51 04 F 4B	54,17				
	IL3 c5 L2	50,00				
	ET4 c2 L210	34,38				
	Ja1 c1 L193	10,00				

sensible

non classé en sensible

non classé en non sensible

Compte tenu de l'absence d'interaction génotype/isolat, le classement (Tab.19) issu de l'analyse de variance est obtenu par une moyenne des IIM pour l'ensemble des isolats. Il nous a été possible d'établir un classement des génotypes en fonction d'un isolat représentatif de chacun des pays desquels sont issus les isolats (CM732 pour le Cameroun, KN009 pour le Kenya - isolat kenyan le plus inoculé - et ZW001 pour le Zimbabwe) (Tab.20). Compte tenu des remarques précédentes concernant les semaines 7,8 et 9 pour l'isolat CM732, nous n'avons pas pris en compte ces données pour établir le classement.

Au vu des résultats du tableau 20, l'isolat CM732 ressort comme l'isolat le plus agressif. Les inoculations réalisées avec cet isolat permettent de confirmer :

- la forte sensibilité des génotypes ET19, ET33...
- les faibles indices de sensibilité des génotypes ET51, I13, Ja1...

Avec les trois isolats, le génotype ET51, qui était le moins sensible dans le classement de l'analyse de variance, ressort également comme un des génotypes présentant le plus faible indice de sensibilité (indice proche de 50).

#### 2 - 4 - 2 deuxième criblage de matériel végétal provenant du Costa Rica et d'Ouganda

Différents génotypes provenant du Costa Rica et d'Ouganda ont été inoculés avec trois isolats provenant de trois pays différents : CM732, KN009 et ZW001. Très peu d'inoculation ont pu être répétées ; de ce fait, il nous a été impossible de tester les interactions lors de l'analyse de variance (Tab.21).

**Tab. 21** : Analyse de variance des résultats obtenus pour le criblage des semences du Costa Rica et d'Ouganda.

Variable	DDL	CM	F	P
Génotype	16	467,51	15,25	0,0001
Isolat	2	474,27	15,47	0,0009
Date	7	284,79	9,29	0,0001

L'analyse de variance met en évidence un effet génotype, un effet isolat et un effet date significatifs à 5%. Nous avons pu établir un classement des isolats en fonction de leur indice de pathogénicité (Tab.22) et un classement des génotypes en fonction de leur indice de sensibilité (Tab.23).

**Tab.22 :** Classement des différents isolats de *Colletotrichum kahawae* utilisés dans le criblage des semences du Costa Rica et d'Ouganda.

Isolats	Indices
CM732	81,35 A
ZW001	69,35 B
KN009	63,78 C

**Tab. 23 :** Classement des différents géotypes de *Coffea arabica* utilisés dans le criblage des semences du Costa Rica et d'Ouganda.

Origines	Géotypes	N°arbre	Section	Colonne	Indices
CAMEROUN	Catuaï				96,00 A
COSTA RICA	T.03721	09	A	6B	93,18 A B
OUGANDA	NG 9258				88,89 A B C
COSTA RICA	T.17027	03	F	5A	87,85 A B C
OUGANDA	NG 9257				83,33 A B C D
OUGANDA	KP 162				82,14 A B C D
CAMEROUN	JAVA				79,46 A B C D
COSTA RICA	T.17205	04	F	5A	79,16 A B C D
COSTA RICA	T.16724	05	F	4B	75,96 A B C D
COSTA RICA	T.16690	01	F	4A	75,47 A B C D
COSTA RICA	T.03721	05	A	6B	75,00 A B C D
COSTA RICA	T.02758	05	D	2A	70,98 A B C D
COSTA RICA	T.16712	04	F	4B	69,41 B C D
COSTA RICA	T.16704	07	F	4B	64,58 C D
COSTA RICA	T.02754	03	D	2A	60,00 D
COSTA RICA	T.16692	01	F	4A	45,04 E
COSTA RICA	T.16691	03	F	4B	36,84 E

Les indices suivis d'une même lettre ne sont pas significativement différent.

On peut remarquer que l'analyse de variance (Tab.21) a distingué trois classes pour les isolats (Tab.22) ; les indices des isolats ZW001 et KN009 restent tout de même assez proches. Malgré l'existence d'un effet date, qui signifie qu'il existe une variation de l'agressivité des isolats en fonction des semaines d'inoculation, le classement des isolats les uns par rapport aux autres reste identique au classement mis en évidence dans le test précédent (Tab.18).

Les génotypes semblent être tous corrélés entre eux (Tab.23) ; deux génotypes provenant du Costa Rica se distinguent des autres avec un indice de sensibilité inférieur à 50 :

- T. 16692 01 F 4A (ET4)
- T. 16691 03 F 4B (ET3)

Il sera nécessaire de faire des répétitions des inoculations avec ces génotypes pour confirmer ces résultats.

### 2 - 4 - 3 troisième criblage de matériel végétal provenant du Costa Rica et du Cameroun

Différents génotypes provenant du Cameroun et du Costa Rica ont été inoculés avec les mêmes isolats que dans le criblage précédent : CM732, KN009 et ZW001. Très peu d'inoculations ont pu être répétées ; de ce fait, il nous a été impossible de tester les interactions lors de l'analyse de variance.

**Tab. 24 :** Analyse de variance des résultats obtenus avec les semences du Cameroun et du Costa Rica.

Variable	DDL	CM	F	P
Génotype	50	617,61	6,50	0,0011
Isolat	2	102,32	1,08	0,0949
Date	7	551,17	5,80	0,0199

L'analyse de variance (Tab.24) met en évidence un effet génotype et un effet date significatifs à 5%. Contrairement au précédent criblage, il n'y a pas d'effet isolat. Nous avons pu établir un classement des isolats en fonction de leur indice de pathogénicité (Tab.25) et un classement des génotypes en fonction de leur indice de sensibilité (Tab.26).

**Tab. 25 :** Classement des isolats de *C.kahawae* utilisés pour le criblage des semences du Costa Rica et du Cameroun en fonction de leur indice de pathogénicité.

Isolats	Indices
CM732	68,92 A
ZW001	63,58 B
KN009	61,18 B

On peut remarquer que même si l'analyse de variance distingue deux classes d'isolats, les indices de pathogénicité sont proches, c'est pourquoi il n'y a pas d'effet isolat. Le classement des

isolats reste toujours identiques aux précédents.

**Tab. 26** : Classement des géotypes de *C.arabica* utilisés pour le criblage des semences du Costa Rica et du Cameroun en fonction de leur indice de sensibilité.

Origines	Géotypes	N°arbre	Ligne	Indices	
CAMEROUN	CA5	c6	L37	91,67	A
COTA RICA	T.8667			90,56	A
COSTA RICA	CATUAI			90,53	A
COSTA RICA	T.17940	b2-a5		89,58	A
COSTA RICA	T.17940	b2-a4		87,50	A
COSTA RICA	T.17929	b2-a3		82,45	A B
COSTA RICA	T.17931	b2-a2		81,82	A B
COSTA RICA	T.17929	b2-a2		81,41	A B -C
CAMEROUN	ET28	c2	L62	81,04	A B C
COSTA RICA	T.17925	b2-a1		77,50	A B C D
COSTA RICA	T.17935	b2-a4		77,50	A B C D
COSTA RICA	CR.95			75,85	A B C D
COSTA RICA	T.17928	b2-a1		75,00	A B C D
CAMEROUN	KF2497	c5	L30	74,81	A B C D
COSTA RICA	T.17937	b2-a3		74,00	A B C D E
COSTA RICA	T.18138	9		73,50	A B C D E
COSTA RICA	T.17928	5		72,31	A B C D E
COSTA RICA	IAPAR 59			71,33	A B C D E
COSTA RICA	T.17931	8		71,15	A B C D E
CAMEROUN	ET19	c5	L61	70,00	A B C D E
COSTA RICA	T.17129	6		67,00	A B C D E
COSTA RICA	T.17933	b2-a2		65,91	A B C D E
COSTA RICA	T.18121	1		65,50	A B C D E
COSTA RICA	T.17934	b2-a4		65,33	A B C D E
CAMEROUN	Hybride 86	c2	L21	64,19	A B C D E
CAMEROUN	ET19	c1	L61	63,89	A B C D E
CAMEROUN	ET14	c3	L259	63,46	A B C D E
CAMEROUN	ET19	c4	L61	62,90	A B C D E
COSTA RICA	T.17931	b2-a1		62,50	A B C D E



Origines	Génotypes	N°arbre	Ligne	Indices					
COSTA RICA	T.18130	6		62,03	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.5296			61,80	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.17928	b2-a5		60,53	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.17935	b2-a2		60,00	A	B	C	D	E
CAMEROUN	ET33	c2	L64	59,09	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.17935	12		58,75	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.18141	12		58,06	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.17933	b2-a1		57,69	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.17934	11		57,50	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.17934	b2-a2		56,67	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.17935	b2-a3		56,33	A	B	C	D	E
CAMEROUN	JAVA			51,48	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.17126	3		50,36	A	B	C	D	E
CAMEROUN	KF1	c1	L29	49,50	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.17932	9		48,18	A	B	C	D	E
CAMEROUN	ET19	c5	L61	45,93	A	B	C	D	E
COSTA RICA	T.17929	6		40,38		B	C	D	E
COSTA RICA	T.18123	3		39,75		B	C	D	E
CAMEROUN	Ja1*ET41	c7	L5	36,00			C	D	E
CAMEROUN	ET19	c3	L61	34,09				D	E
CAMEROUN	Hybride 86	c2	L26	33,33				D	E
COSTA RICA	T.18126	4		29,50					E

Les indices suivis d'une même lettre ne sont pas significativement différents.

Certains génotypes ressortent avec un faible indice de sensibilité :

- T. 18126 arbre 4 (Catimor)
- Hybride 86 c2 L26
- ET19 c3 L61
- Ja1\*ET41 c7 L5
- T. 18123 arbre3 (Catimor)
- T. 17929 arbre 6 (Catimor)
- ET19 c5 L61
- T. 17932 arbre 9 (Catimor)
- KF1

Des répétitions des inoculations avec ces géotypes restent nécessaires pour confirmer ces résultats.

**Tab. 28** : Classement des isolats de *C.kahawae* utilisés pour le criblage des semences du Cameroun et de Tanzanie en fonction de leur indice de pathogénicité.

Isolats	Indices	
CM732	80,89	A
KW42	79,64	A
KM1	67,29	B
KN010	65,45	B

Les indices suivis d'une même lettre ne sont pas significativement différents.

**Tab. 29** : Classement des géotypes de *C.arabica* utilisés pour le criblage des semences du Cameroun et de Tanzanie en fonction de leur indice de sensibilité.

Origines	Géotypes	N°arbre	Ligne	Indices
CAMEROUN	ET28	c2	L62	91,09 A
CAMEROUN	ET28	c3	L62	90,47 A
CAMEROUN	Cat.Ao			87,18 A
CAMEROUN	ET2	c3	L275	86,59 A B
CAMEROUN	ET50	c4	L66	84,59 A B C
CAMEROUN	ET2	c2	L27	79,24 A B C
CAMEROUN	ET4	c5	L210	78,85 A B C
CAMEROUN	Ab1	c5	L1	77,07 A B C
TANZANIE	A 107			72,53 A B C
CAMEROUN	Java			70,68 A B C
TANZANIE	A 113			70,43 A B C
CAMEROUN	Sc3	c4	L206	70,37 A B C
TANZANIE	A 106			69,95 B C
CAMEROUN	Bb1	c2	L175	65,43 C
CAMEROUN	Dg10	c1	L85	63,22 C
CAMEROUN	ET26	c2	L220	62,00 C
TANZANIE	A 103			60,67 C

Origines	Génotypes	N°arbre	Ligne	Indices	
TANZANIE	A 111			57,22	C
TANZANIE	A 110			55,43	C

Les indices suivis d'une même lettre ne sont pas significativement différents.

#### 2 - 4 - 4 quatrième criblage de matériel végétal provenant du Cameroun et de Tanzanie

Un plan d'inoculation a été réalisé afin de pouvoir réaliser au minimum une répétition pour chaque génotype avec chacun des quatre isolats en essai : CM732, KW42, KN010 et KM1.

Aucune interaction n'ayant été mise en évidence lors d'une première analyse de variance, nous en avons effectué une seconde sans tester les interactions (Tab.27).

**Tab. 27** : Analyse de variance des résultats du criblage des semences du Cameroun et de Tanzanie.

Variable	DDL	CM	F	P
Génotype	18	445,59	4,70	0,0001
Isolat	3	1175,23	12,41	0,0001
Date	10	635,86	3,86	0,0003

Cette analyse de variance (Tab.27) met en évidence un effet génotype, un effet isolat et un effet date significatifs à 5%. Nous avons établi un classement des isolats en fonction de leur indice de pathogénicité (Tab.28), et un classement des génotypes en fonction de leur indice de sensibilité (Tab.29).

Les génotypes sont corrélés entre eux et ont des indices de sensibilité élevés, toutefois deux génotypes tanzanien ont des indices proches de 55 (A 111 et A 110) ; il serait donc intéressant d'utiliser ces génotypes dans un autre criblage pour confirmer ces résultats.

#### 2 - 4 - 5 cinquième criblage avec du matériel végétal provenant de Tanzanie

Ce criblage avec des semences provenant de Tanzanie a été effectué avec trois isolats : l'isolat de référence CM732, l'isolat KN010 utilisé dans le criblage précédent et l'isolat TZ005 provenant de Tanzanie.

L'analyse statistique des résultats n'ayant pas été encore réalisée, nous ne pouvons que présenter les résultats obtenus au bout de la troisième semaine de lecture de chaque géotype avec chaque isolat (Tab.30) et un classement des géotypes en fonction des moyennes des IIM obtenus avec tous les isolats (Tab.31).

**Tab. 30** : Indices d'Intensité de la Maladie obtenus après inoculation des différents géotypes tanzaniens avec les trois isolats de *C. kahawae*.

Isolats Géotypes	CM732	KN010	TZ005
A 103	87,38	51,19	61,46
A 106	70,56	66,50	91,62
A 107	80,44	64,35	90,27
A 109	75,00		66,30
A 110	80,68	68,33	73,86
A 111	69,79	63,00	63,00
A 112	72,00	53,00	71,5
A 113	79,52	54,00	63,69
B 121	78,57		
B 125	57,50		78,00
B 126	53,00	53,13	60,00
B 127	54,00	57,00	69,74
B 128	63,16		64,00
B 129	53,00	55,00	94,12
B 131	70,96	48,86	52,27
B 133	88,64	65,00	71,88
C 138	68,42	54,17	52,88
C 139	96,43	76,14	65,48
D 144	100		92,65
D 145	75,00		71,15
D 146	80,00	63,75	71,25

<b>Isolats Géotypes</b>	<b>CM732</b>	<b>KN010</b>	<b>TZ005</b>
D 149	96,25		73,68
F 180	98,44		100
Cat.Ao	90,14	87,02	89,31
Java	74,50	68,25	84,46

**Tab. 31** : Classement des géotypes en fonction des moyennes des IIM.

<b>Origines</b>	<b>Géotypes</b>	<b>Indices</b>
TANZANIE	F 180	99,22
TANZANIE	D 144	96,32
CAMEROUN	Cat.Ao	92,16
TANZANIE	D 149	86,46
TANZANIE	C 139	79,35
TANZANIE	B 121	78,57
TANZANIE	A 107	78,35
TANZANIE	A 106	76,23
CAMEROUN	Java	75,74
TANZANIE	A 110	74,29
TANZANIE	B 133	75,17
TANZANIE	D 145	73,07
TANZANIE	D 146	71,66
TANZANIE	A 109	70,65
TANZANIE	B 125	67,75
TANZANIE	B 129	67,67
TANZANIE	A 103	66,68
TANZANIE	A 113	65,74
TANZANIE	A 112	65,50
TANZANIE	A 111	65,26
TANZANIE	B 128	63,58
TANZANIE	B 127	60,24
TANZANIE	C 138	58,49
TANZANIE	B 131	57,36
TANZANIE	B 126	55,37

Ces premiers classements obtenus avec les géotypes tanzanien reste encore à confirmer par des répétitions de ces inoculations, ce qui nous permettra de faire une analyse statistique pour tester les interactions et établir un classement du matériel végétal.

## 2 - 5 Discussion

Lors des différentes expérimentations, nous avons souvent été confronté à un effet date; l'hypothèse d' une variation du pouvoir pathogène des isolats au cours du temps, plus particulièrement de la composante agressivité compte tenu de l'absence d'interactions génotypes / isolats, apparaît comme très probable. Il apparaît donc primordial de trouver un moyen de régénérer et de maintenir l'agressivité des isolats ; il s'agit plus particulièrement d'inoculer régulièrement, sur baies ou sur semenceaux, les isolats utilisés lors des criblages et d'effectuer de nouveaux isolements. Le rythme de passage du matériel fongique sur tissus reste toutefois à déterminer.

Cette variation de l'agressivité provoque un problème de reproductibilité du test et rend très délicate la comparaison des résultats obtenus au sein d'un même laboratoire à différentes dates et surtout entre différents laboratoires. D'une part, l'introduction dans les tests de génotypes témoins (sensible et "résistant") et d'autre part, la réalisation de répétitions, sont une nécessité. La réalisation de ces répétitions se heurte toutefois à la disponibilité en matériel végétal qui de plus doit présenter un taux de germination élevé.

Néanmoins, les différents criblages ont permis de mettre en évidence des génotypes présentant des comportements de moyenne sensibilité, comme par exemple les lignées éthiopiennes ET3, ET4 et ET51, et diverses lignées de Catimor du Costa Rica. Seules des répétitions des inoculations permettront de confirmer l'intérêt de ce matériel pour son utilisation dans des schémas d'amélioration.

## 3 - PREMIERES ETAPES DANS L'ELABORATION D'UN TEST SUR FEUILLES

De part les problèmes de reproductibilité rencontrés lors du test sur semenceaux déracinés, et ses caractères limitants tels que le nombre d'individus testés et sa nature destructive, la mise au point d'un nouveau type de test de pouvoir pathogène ne présentant pas ces inconvénients apparaît nécessaire.

Un protocole d'inoculation sur baies détachées est d'ors et déjà disponible, et est utilisé au Cameroun (BELLA MANGA, 1997). Cependant, l'obtention de baies à un stade réceptif limite l'utilisation de ce type de test dans le temps et le rend presque impossible à mettre en oeuvre hors zone productrice.

Ainsi, le développement d'un test d'inoculation de *C.kahawae* sur feuilles de *C.arabica* a été envisagé.

### 3 - 1 Matériel et méthodes

#### 3 - 1- 1 matériel fongique

Les isolats utilisés pour ce test sont présentés dans le tableau 32. Dix isolats de *C.kahawae*

provenant d'origines géographiques variées et quatre isolats de *Colletotrichum* spp. non pathogènes sur baies ont été sélectionnés.

Tab.32 : Listes des isolats de *Colletotrichum* utilisés au cours du test sur feuille

Isolat	Code Origine des isolats	Origine	Hôte	Organes	Pathogénie sur baie de <i>C.arabica</i> var. Caturra amarillo*
<i>C.kahawae</i>					
CM732	732A	Cameroun	<i>C.arabica</i>	Baie verte	+
ET001	190857	Ethiopie	<i>C.arabica</i>	Baie verte	+
ZW001	ZW1	Zimbabwe	<i>C.arabica</i>	Baie verte	+
KN001	KHW1	Kenya	<i>C.arabica</i>	Baie verte	+
BU005	042.1A	Burundi	<i>C.arabica</i>	Baie verte	+
MW002	M2	Malawi	<i>C.arabica</i>	Baie verte	+
MW003	CC66	Malawi	<i>C.arabica</i>	Baie verte	+
MW005	325944	Malawi	<i>C.arabica</i>	Baie verte	+
TZ001	5.1	Tanzanie	<i>C.arabica</i>	Baie verte	+
TZ003	90.9	Tanzanie	<i>C.arabica</i>	Baie verte	+
<i>Colletotrichum</i> spp.					
CM636	636D	Cameroun	<i>C.arabica</i>	Rameau	-
CM638	638A	Cameroun	<i>C.arabica</i>	Pédoncule floral	-
CM790	790D	Cameroun	<i>C.arabica</i>	Baie verte	-
-	EQ6	Equateur	<i>C.arabica</i>	Feuille	-

\* tests réalisés au laboratoire sur baies détachées.



### 3 - 1 - 2 matériel végétal

Deux variétés de *C.arabica* ont été sélectionnées pour ce test : Caturra amarillo et Java, respectivement considérées comme très sensible et “résistant” au CBD, d’après les observations aux champs. Les feuilles ont été prélevées à deux stades différents :

- taille de feuille comprise entre 3 et 6 cm
- taille de feuille comprise entre 6 et 8,5 cm.

### 3 - 1 - 3 méthodes d’inoculation

Les méthodes de préparation de l’inoculum sont identiques à celles décrites précédemment. La concentration de l’inoculum est ajustée à  $1.10^6$  conidies/ml. Les feuilles entières sont déposées face supérieure contre une éponge humide. La face inférieure est inoculée en déposant des gouttes de 20 $\mu$ l d’inoculum. Chaque feuille entière est inoculée de part et d’autre de la nervure centrale, par cinq gouttes d’un isolat (la feuille contient dix gouttes d’inoculum de deux isolats différents). Puis les bacs (fermés hermétiquement) contenant les feuilles sont placés à l’obscurité pendant 24h afin de favoriser la germination des conidies. Ils sont ensuite placés à 20°C en lumière alternée 12h/12h.

### 3 - 1 - 4 lecture des symptômes

Trois lectures de symptômes sont réalisées sur un maximum de trois semaines à partir de la date d’inoculation. Les symptômes ont été notés selon l’échelle développée par BOMPARD (1994) :

- 0 : absence de symptômes
- 1 : petites lésions jaunâtres présentant une légère dépression, formant des points dispersés
- 2 : lésion brune à bords irréguliers
- 3 : lésion brune à noire, bords réguliers.

### 3 - 1 - 5 analyse des résultats

Les quatre stades d’évolution de la maladie (0,1,2,3) permettent le calcul d’un indice pour chaque demi-feuille : à chaque stade d’évolution correspond un effectif ; cet effectif est affecté d’un coefficient (coefficient 0 pour le stade 0, coefficient 1 pour le stade 1...). Une note globale de 0 à 15, correspondant à l’**indice d’infection moyen (IIM)** est obtenue pour chacune des combinaisons variété/isolat.

L’ensemble des résultats a été analysé avec le programme statistique STATITCF. Une analyse de variance et une comparaison de moyenne avec le test de Newman-Keuls ont été réalisées.

Il est important de noter qu’aucune correspondance ne peut être établie entre l’indice

d'infection moyen (IIM) défini pour ce test et l'indice d'intensité de la maladie (IIM) utilisé lors du test sur semenceaux.

**Tab. 33 :** Indices d'infection moyen obtenus après l'inoculation de deux variétés de *C.arabica* (Caturra et Java) par dix isolats de *C.kahawae* (notation à 5 et 15 jours après inoculation).

Variétés Isolats	IIM		IIM	
	Cat.Ao > 6 cm	5 jours Java > 6 cm	Cat.Ao > 6 cm	15 jours Java > 6 cm
CM732	2,20 C	6,67 A	10,9 B	11,83 A
BU005	0,00 C	1,50 B	0,00 D	10,50 A
ZW001	1,80 C	0,50 B	5,90 C	2,50 B
KN001	1,10 C	0,00 B	2,00 D	0,33 B
MW002	0,00 C	0,00 B	0,00 D	0,00 B
MW003	0,10 C	0,00 B	2,00 D	1,33 B
MW005	0,20 C	0,17 B	1,00 D	1,17 B
ET001	0,00 C	0,17 B	0,00 D	1,83 B
TZ001	7,10 B	0,00 B	14,3 A	0,00 B
TZ003	13,7 A	0,00 B	15,0 A	2,83 B

**Tab.34 :** Indices d'Infection Moyen obtenu par l'inoculation d'une variété de *C.arabica* (Caturra amarillo) sur des feuilles de longueur supérieure et inférieure à six centimètres par dix isolats de *C.kahawae*.

Variétés Isolats	IIM		IIM	
	Cat.Ao > 6 cm	5 jours Cat.Ao < 6 cm	Cat.Ao > 6 cm	15 jours Cat.Ao < 6 cm
CM732	8,00 A	7,38 A	15,0 A	15,00 A
BU005	0,75 B	0,50 B	11,25 B	11,75 B
ZW001	0,00 B	0,38 B	2,38 CD	4,38 C
KN001	0,13 B	0,13 B	2,25 D	2,63 CD
MW002	0,00 B	0,50 B	0,88 D	1,75 CD
MW003	0,00 B	0,13 B	0,13 CD	1,63 CD
MW005	0,13 B	0,00 B	0,63 D	1,88 CD
ET001	0,75 B	0,00 B	4,38 C	3,38 CD
TZ001	0,00 B	0,00 B	0,00 D	0,00 D

	IIM	5 jours	IIM	15 jours
TZ003	0,38 B	0,38 B	1,13 CD	0,88 CD

### 3 - 2 Résultats

Dans un premier temps, un essai d'inoculation a été effectué sur des feuilles de Caturra amarillo et de Java dont la taille était supérieure à six centimètres. Les indices d'infection moyen obtenus à partir des résultats sont répertoriés dans le tableau 33.

Au bout de cinq jours nous pouvons observer que

- deux isolats sont particulièrement agressifs sur Caturra : TZ001 et TZ003. Ces isolats n'attaquent pas la variété Java ;
- l'isolat, CM732 est agressif sur la variété Java et pas sur la variété Caturra. Cependant, quinze jours après inoculation, plus aucune différence n'est observée entre les deux variétés ;
- l'isolat BU005 ne développe pas de symptômes cinq jours après inoculation (sur les deux variétés), par contre à quinze jours, il attaque très nettement la variété Java ;
- un seul isolat (MW002) ne provoque aucun symptôme quelque soit la variété, même 15 jours après inoculation ;
- les autres isolats présentent des IIM très faibles. Aucune différence n'est notée entre les variétés ou la date de lecture.

**Un second test** a été effectué pour observer l'influence de la taille des feuilles sur l'apparition des symptômes. Les indices d'infection moyens obtenus à partir des résultats sont répertoriés dans le tableau 34.

On peut remarquer que

- il n'y a pas de différences notables entre les deux stades foliaires choisis. Ce test peut donc être réalisé indépendamment du stade de développement de la feuille juvénile ;
- un isolat se révèle le plus agressif : CM732. Les symptômes provoqués par cet isolat continuent à se développer quinze jours après inoculation. De même, pour l'isolat CM732, les IIM relevés cinq jours après inoculation lors du test précédent étaient plus faibles (IIM de 2,20 dans le premier test, et IIM de 8,00 dans le second) ;
- tous les autres isolats attaquent faiblement quelque soit le stade de la feuille.

Il est à noter qu'il existe des différences entre les deux tests : les isolats TZ001 et TZ003 qui attaquaient fortement Caturra cinq jours après inoculation lors du premier test, ne l'attaquent plus dans le second. Aucune évolution des symptômes n'est observée quinze jours après inoculation.

Le troisième test réalisé a consisté à inoculer des isolats non pathogènes sur baies afin de vérifier qu'ils n'induisent pas de symptômes sur feuilles. Les résultats sont consignés dans le tableau 35.

Il résulte que les isolats non pathogènes sur baies se révèlent également non pathogènes sur feuilles.

Nous notons également que l'isolat TZ003, qui provoquait des symptômes sur feuilles lors du premier test, n'en provoque plus. Ceci pourrait résulter d'une perte du pouvoir pathogène de cet isolat dû aux repiquages successifs.

**Tab. 35** : Indices d'infection moyens obtenus par l'inoculation de deux variétés de *C.arabica* (Caturra et Java) sur des feuilles de longueur supérieure et inférieure à six centimètres par deux isolats de *C.kahawae* et quatre isolats de *C. spp.*

Variétés Isolats	IIM 5 jours				IIM 15 jours			
	Cat.Ao > à 6 cm	Cat.Ao < à 6 cm	Java > à 6 cm	Java < à 6 cm	Cat.Ao > 6 cm	Cat.Ao < à 6 cm	Java > à 6 cm	Java < à 6 cm
CM732	3,50 A	4,50 A	4,90 A	4,50 A	10,40 A	12,10 A	9,60 A	9,80 A
TZ003	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B
EQ6	0,10 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,30 B	0,30 B	0,20 B	0,00 B
CM636	0,10 B	0,00 B	0,00 B	0,10 B	0,20 B	0,60 B	0,60 B	0,40 B
CM638	0,00 B	0,00 B	0,10 B	0,00 B	0,20 B	0,10 B	0,50 B	0,10 B
CM790	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B

### 3 - 3 Discussion

Ces expériences montrent qu'en conditions contrôlées, **il est possible d'infecter des feuilles de caféier avec des isolats de *C.kahawae*** jusqu'alors considéré comme **pathogène exclusif des baies**. Bien que jamais observées auparavant, il est probable que de telles infections puissent avoir lieu en conditions naturelles. Si tel était le cas, les feuilles infectées pourraient constituer un "réservoir" d'inoculum pouvant être à l'origine de nouvelles épidémies. Une telle hypothèse doit être confirmée par des observations aux champs.

Les feuilles de caféier choisies pour cette étude ont été prélevées à deux stades de développement. Aucune différence significative n'ayant été observée, ce test peut être réalisé quelque soit le stade de développement de la jeune feuille.

Lorsque nous comparons les deux premières séries d'inoculations, des différences de comportement des isolats testés apparaissent. Cette situation a déjà été rencontrée lors du test sur semenceaux déracinés.

Dès lors, quelque soit le type de test réalisé, il est primordial de déterminer si ces différences sont dues à des **variations dans les conditions expérimentales** (température, hygrométrie), à une **hétérogénéité du matériel végétal** ou bien à une **variabilité de l'agressivité** dans le temps des souches causée par les repiquages successifs.

Le test sur feuilles présentant l'avantage d'être **non destructif**, des répétitions sur un même individu pourront donc être réalisées. Ces répétitions devraient permettre de **déterminer le ou les paramètres responsables d'une telle variation** entre les expérimentations.

De plus, **une restauration de l'agressivité** peut être tentée en inoculant des isolats, soit sur baies détachées, soit sur semenceaux d'une variété sensible et de les réisoler à partir des lésions observées. Cette technique s'est avérée efficace pour restaurer le pouvoir pathogène chez *Colletotrichum lindemuthianum* (J.V. Fabre, communication personnelle).

Ces résultats illustrent la difficulté à élaborer un test d'évaluation de la sensibilité pour toute interaction plante/agent pathogène. Les étapes suivantes dans l'élaboration d'un test sur feuille consistent donc en un contrôle plus précis des conditions expérimentales notamment l'agressivité des isolats, la concentration de l'inoculum et l'homogénéité du matériel végétal. **Une fois seulement ces paramètres contrôlés, il sera possible de comparer les deux tests (sur feuille et sur semenceaux) et de les valider (ou invalider) par des expérimentations aux champs, en présence d'une pression parasitaire caractérisée.**

## Références

- Bella Manga, 1997. 2eme rapport scientifique annuel du contrat STD III n° TS3-CT 94-0307.
- Herrera-Estrella, L., Simpson, J., Martinez, O., Hernandez, F., Zavala, M.E., Acosta, J., Rodriguez, R., and Gonzales, M. 1997. Report presented to the EEC for the joint research proposal N° 938022MX. 18p.
- Mac Donnal, J. 1926. Report of the mycologist, Kenya Dep. Agric. Annu. Rep. 1925. 141-148.
- Muller, R.A. 1980. Bull. IFCC. 15. 170p.
- Muller, R.A. 1970. Café Cacao Thé, 14: 114-129.
- Muller, R.A. 1964. Bull. IFCC 6: 1-38.
- Nei, M. 1978. Genetics 89:583-590.
- Raymond, M. and Rousset, F. 1995. J. Hered. 86:248-249.
- Rogers, S.O., and Bendich, A.J. 1988. Plant Molecular Biological Manual. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Roma, E. 1997. Rapport de licence, Université Montpellier II. 43p
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E., and Mills, P.R. 1993. Mycol. Res. 97:995-1000.
- Van der Graaf, N.A. 1992. Coffee Berry Disease. In: Plant diseases of international importance, disease of sugar, forestand plantation crops. Ed. A.N. Mukhopadhyay, J.-Kumar, U.S. Sing, and H.S. Chaube. 4: 202-230.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.
- Weir, B.S., and Cockerham, C.C. 1984. *Evolution* 38:1358-1370.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.





**3<sup>ème</sup> RAPPORT SCIENTIFIQUE ANNUEL**

Déc. 1996 - Déc. 1997

**Recherche et création de variétés de caféiers  
résistants à l'antracnose des baies**

Contrat STD III n° : TS3 - CT 94-0307

Activités réalisées à l'IRA  
Programme "plantes Stimulantes"

SOMMAIRE

1- INTRODUCTION -----	1
2 - MATERIEL ET METHODE -----	1
2 - 1 Matériel phytopathogène	1
2 - 2 Matériel végétal	3
2 - 3 Techniques d'inoculations	3
2 - 3 - 1 Technique d'inoculation de jeunes semenceaux par trempage	
2 - 3 - 2 Technique d'inoculation de baies détachées	
3 - CARACTERISATION DE <i>Colletotrichum kahawae</i> -----	3
3 - 1 Identification des isolats appartenant à l'espèce <i>C. kahawae</i>	3
3 - 2 Evaluation du pouvoir pathogène sur baies	4
3 - 2 - 1 Mode opératoire	
3 - 2 - 2 Résultats	
3 - 2 - 3 Conclusions	
3 - 3 Evaluation du pouvoir pathogène sur semenceaux -----	5
3 - 3 - 1 Mode opératoire	
3 - 3 - 2 Analyse statistique	
3 - 3 - 3 Résultats	
3 - 3 - 4 Conclusions	
3 - 4 Comparaison de l'agressivité des isolats sur semenceaux et sur baies détachées	7
3 - 4 - 1 Mode opératoire	
3 - 4 - 2 Résultats	
3 - 4 - 3 Conclusions	
4 - EVALUATION DE LA SENSIBILITE DU MATERIEL VEGETAL -----	8
4 - 1 Evaluation de la sensibilité sur semenceaux	8
4 - 1 - 1 Mode opératoire	
4 - 1 - 2 Résultats	
4 - 1 - 3 Conclusions	
4 - 2 Evaluation de la sensibilité sur baies détachées	9
4 - 2 - 1 Mode opératoire	
4 - 2 - 2 Résultats	
4 - 2 - 3 Conclusions	
4 - 3 Comparaison des tests sur semenceaux et sur baies détachées	10
4 - 4 Incidence du stade de développement de la baie sur la sensibilité	11
4 - 4 - 1 Mode opératoire	
4 - 4 - 2 Résultats	
4 - 4 - 2 - 1 Effet isolat	
4 - 4 - 2 - 2 Effet génotype	
4 - 4 - 2 - 3 Effet stade de développement de la baie	
4 - 4 - 3 Conclusions	

5 - RECHERCHE DES FORMES DE SURVIE DU PATHOGENE EN INTERCAMPAGNE -----	13
6 - EPIDEMIOLOGIE -----	13
7 - EVALUATION DE LA MALADIE EN COLLECTION -----	14
8 - ETUDE DE L'HERITABILITE DES CARACTERES DE RESISTANCE -----	14
9 - CONCLUSIONS GENERALES -----	14
10 - DIVERS -----	15
10 - 1 Diffusion de matériel végétal	15
10 - 2 Participation à des colloques	16
10 - 3 Formation	16

ANNEXES

## 1 - INTRODUCTION

Le début de l'année 3 a été marquée par l'organisation et la tenue de l'atelier de Travail organisé à DSCHANG au mois d'avril, réunissant la totalité des participants. Il a permis de faire un point précis des résultats acquis et des interrogations soulevées par les différents partenaires. Cette confrontation a contribué à confirmer certains choix et à réorienter certains travaux en cours. Aussi, les orientations données aux recherches durant cette année 3 ont eu en perspective un approfondissement des connaissances acquises en année 2 en vue de la préparation des essais de l'année 4 dernière année du projet.

Les principaux objectifs des essais engagés sont les suivants:

- 1 - Caractérisation de la structure de la population de *Colletotrichum kahawae* vis à vis du marqueur de pathogénicité,
- 2- Criblage du matériel végétal afin d'identifier des sources de résistance,
- 3 - Recherche des formes de survie du champignon en inter-campagne,
- 4 - Impact des conditions microclimatiques sur le développement de la maladie et analyse des pertes de récolte,
- 5 - Mise en place d'un schéma de croisements.

La campagne qui vient de s'écouler a débuté après une saison sèche particulièrement longue et une reprise des pluies très irrégulière qui a eu des conséquences notables sur la phénologie des caféiers et sur le déroulement de la floraison : le taux de nouaison a été particulièrement faible. En conséquence, la production est très faible parfois nulle, ce qui a perturbé à plusieurs reprises le plan de travail initialement prévu.

Par ailleurs, la collecte des données vient de se terminer et les analyses statistiques sont en cours. Les résultats sont présentés sous forme de tendance et les conclusions seront confirmées ultérieurement.

## 2 - MATERIEL ET METHODES

### 2-1- Matériel phytopathogène

Les souches utilisées ont été choisies en raison de leur diversité observée en année 2 et de nouvelles souches prospectées durant la campagne de 1996 ont été introduites. Toutes les souches sont monoconidies. Leurs caractéristiques sont fournies dans le tableau 1.

Tab. 1 : Liste et caractéristiques des isolats utilisés

CODE	ORGANE	VARIETE	ORIGINE	DATE	Croissanc 30°C	PATHOGENICITE Smcx*	Baies*
675	B.V.I.	var. local	Baham	04/92	+		
708		"	Santa	06/92	+	96	72
732	"	Java	Babadjou	92	+	98	59
740	"	var. local	Santa	12/92	+	83	
818	"		Meling		+	92	
821	"		Bali-Nyonza		+	82	20
822	"		Tatum		+	98	11
826	"		Nkambe		+	36	0
834	"		Kumfutu		+	5	
835	"		Wum		+	56	
854	"		Pinyun		+	77	34
901	"		Awing ville	08/96	+	80	0
902	"		Awing (Banding)	08/96		100	58
903	scab		Santa village	08/96	+	95	10
904	B.V.I.		Sabga	08/96	+	98	19
905	"		Kumbo (Melim)	08/96	+	94	62
906	"		Ndu town	08/96	+	93	1
907	"		Nkambé	08/96	+	100	51
908	"		Kumfutu	08/96	+	89	9
909	"		Belo (Ashing)	08/96	+	95	18
910	"		Achon	08/96	+	80	27
911	"		Belo (Ashing)	08/96	+	100	50
912	"		Bafou (Saint-Laure	08/96	+		71
913	"		Bafou (Saint-Laure	08/96	+		94
914	"		Bamendou I cheffe	08/96	+		72
915	"		Fokwe (Fotomena)	08/96	+		28
916	"	Et1 c1 3	Foumbot	08/96	+		75
917					+		58
918	scab	Mu13 c3	Santa	08/96	+		0
919	B.V.I.	Mu13 c11- 1		08/96	+		39
920	"	Mu13 c5 1		08/96	+		64
921	"	Mu18 c3	Santa	08/96	+		52
922	"	Mu19 c2	Santa	08/96	+		72
923	"	Mu19 c2		08/96	+		
924	"	CTR L1 c7	Santa		+		51
925	"	CTR L1 c7	Santa		+		
926	"	Ca3 c1 1	Foumbot		+		2
927	"	Ca3 c1 2	Foumbot		+		
932	?	Var. local	Santa	11/96	+		
933	?	"	Santa	"	+		
937	?	"	Santa	12/96	+		
939	Baie mûr	"	Santa	01/97			
940	Baie mûr	"	Santa	"			
941	Baie mûr	"	Santa	"			
942	Branche	"	Santa	"			
943	Branche	"	Santa	"			
944	Branche	"	Santa	02/97			
945	Branche	"	Santa	"			
946	Branche	"	Santa	"			
947	"	"	Oku	05/97			
948	"	"	Kumbo (Melim)	08/96	-		1
949	"	"	Fokwe centre	08/96	-		
950	"	"	Bamendjin	08/96	-	-	0

951	"	"	Santa Ndzong	08/96	-		
953	"	"	Bandjoun	08/96	-		
954	"	"	Bafoussam	08/96	-		0
955	"	"	Banegang-Bensoa	08/97			
956	"	"	"	08/97			
957	"	"	Banegang-Toutset	08/97			
958	"	"	"	08/97			
959	"	"	"	08/97			
960	"	"	"	08/97			
961	"	"	Bamendou-Ngou	08/97			
962	"	"	"	08/97			
963	"	"	"	08/97			
964	"	"	"	08/97			
965	"	"	Bangang	08/97			
966	"	"	"	08/97			
967	"	"	Bafou-Femmock	08/97			
968	"	"	"	08/97			
969	"	"	Bafou-Mezet	08/97			
970	"	"	"	08/97			
971	"	"	Fongo-Tongo	08/97			
972	"	"	"	08/97			
973	"	"	"	08/97			
974	"	"	"	08/97			
975	"	"	Fongo-Tongo Ndje	08/97			
976	"	"	"	08/97			
977	"	"	Santa coffee	08/97			
978	"	"	"	08/97			
979	"	"	Bachua	08/97			
980	"	"	"	08/97			
981	"	"	"	08/97			
982	"	"	"	08/97			
983	"	"	Santa village	08/97			
984	"	"	Santa village	08/97			

\* IIM et %IR sur Caturra

+ : croissance inhibée à 30°C

- : croissance non inhibée à 30°C

## 2-2- Matériel végétal

Les semences utilisées dans les tests précoces sur jeunes semenceaux ou sur baies détachées ont été collectées arbre par arbre dans les collections de Foubot et de Santa. Le témoin sensible, la variété Caturra, a été récoltée en mélange sur les différentes lignes de la collection à Foubot, ainsi que le témoin de moindre sensibilité Java sur les arbres du champ semencier.

## 2-3- Techniques d'inoculations

### 2-3-1 Technique d'inoculation de jeunes semenceaux par trempage

Cette technique étant bien maîtrisée dans les conditions locales elle a été appliquée en routine. Le mode opératoire a été décrit dans le rapport précédent. L'Index d'Intensité de la Maladie permet de caractériser l'Intensité des symptômes observés.

### 2-3-2 Technique d'inoculation sur baies détachées

Les inoculations artificielles sur baies détachées sont réalisées par dépôt d'une goutte de suspension calibrée de  $10^6$  conidies / ml. Les baies sont placées dans des boîtes de pétri à 20°C à l'obscurité durant 24 heures, puis sous une photo-période 12 h / 12 h. La lecture des symptômes est effectuée au 10<sup>ème</sup> jour. L'échelle de symptômes suivante a été adoptée :

- stade 0 : absence de symptômes
- " 1 : petites taches brun clair
- " 2 : taches de tailles moyennes devenant coalescentes
- " 3 : taches brunes uniformes, légèrement déprimées.

Une évaluation de la sensibilité prenant en compte l'intensité des symptômes a été réalisée. Le calcul de l'Index d'Intensité de la Maladie est obtenu en considérant le pourcentage de baies de chaque classe de symptômes. Ce pourcentage est affecté du coefficient de sensibilité ( de 0 à 3 ) de l'échelle de notation. L'ensemble des résultats est cumulé pour chaque combinaison lignée/isolat. Les IIM sont compris entre 0 et 100.

Lors de chaque inoculation 25 baies sont utilisées et pour chaque série d'inoculation le témoin sensible et le témoin de moindre sensibilité sont introduits. Dans la limite des disponibilités en baies, 3 répétitions de la confrontation sont réalisées.

## 3 - CARACTERISATION DE *Colletotrichum kahawae*

### 3 - 1 Identification des isolats appartenant à l'espèce *C. kahawae*

Cet essai vise à identifier l'appartenance des isolats prospectés en 1996 à l'espèce *C. kahawae* et à vérifier leur pouvoir pathogène en vue d'évaluer leur agressivité sur une série de variétés et d'origines.

Le choix des souches nouvellement introduites a été fait selon 2 critères, la ressemblance morphologique du champignon en culture avec des cultures types et l'inhibition de la croissance du mycélium à 30°C qui est un indicateur fiable de la pathogénicité des isolats sur baies.

### 3 - 1 - 1 Résultats

Les résultats de l'inhibition de la croissance à 30° C de 40 isolats nouvellement introduits sont reportés dans le tableau 1. Les isolats 826, 901, 906, 918, 926 sont inhibés à 30°C mais n'ont pas induit de symptômes sur baies.

### 3 - 1 - 2 Conclusions

Après sélection de souches selon le critère d'inhibition de la croissance, 34 isolats ont été retenus qui seront utilisées pour l'étude du pouvoir pathogène et l'évaluation de la sensibilité du matériel végétal par inoculations artificielles sur semenceaux et sur baies.

## 3 - 2 Evaluation du pouvoir pathogène sur baies

L'évaluation du pouvoir pathogène des isolats sur baies répond à 2 objectifs:

- déterminer dans les souches nouvellement prospectées, celles qui sont effectivement pathogènes,
- évaluer et caractériser le pouvoir pathogène.

### 3 - 2 - 1 Mode opératoire

Les inoculations artificielles de 34 isolats, sur baies des variétés Java et Caturra, ont été réalisées à 5 reprises, correspondant au 14ème, 16ème, 18ème, 20ème et 22ème semaines après la floraison. Les confrontations ont été étalées dans le temps en raison de l'impossibilité de les réaliser en totalité lors d'une séance. Lors de chaque inoculation les isolats 708, 732, 854 et 905 sont introduits comme témoin. Chaque inoculation est réalisée avec 2 répétitions de 25 baies.

### 3 - 2 - 2 Résultats

L'absence de répétitions en nombre suffisant ne permet pas une analyse statistique. Toutefois, la comparaison des Index d'Intensité de la Maladie des 2 variétés montre une similitude de classement des isolats. (Tableau 2) à l'exception de la confrontation isolat 920 / caturra qui a fait l'objet d'une seule inoculation. La moyenne générale des 34 isolats est de IIM = 30,85 avec Java et IIM = 26,97 avec Caturra.

Le classement des isolats sur les deux variétés est globalement identique. Aucune inversion notable n'est décelée en l'absence d'une analyse plus approfondie.

Les isolats 948, 950, 954, dont la croissance n'est pas inhibée à 30°C, n'ont pas donné de symptômes sur baies. De même, les isolats 826, 901, et 918, dont la croissance est par contre inhibée à 30°C, n'ont également pas entraîné de symptômes sur baies. L'hypothèse d'une absence de pathogénicité sur baies pour ces isolats devra être confirmée, notamment pour ceux qui se montrent pathogènes sur semenceaux (Tab.1 : isolats 826 et 901).



**Tab.2** : Index d'Intensité de la Maladie de 34 isolats sur baies des variétés Caturra et Java

<b>Isolat</b>	<b>Caturra</b>	<b>Java</b>
913	82	82
916	68	79
914	62	65
922	60	65
912	58	67
708	56	71
920	49	84
902	48	44
921	47	52
917	45	71
732	41	51
905	39	60
907	36	28
911	34	34
919	33	48
924	27	23
854	27	30
910	19	19
915	19	19
904	17	8
821	11	15
906	9	3
909	8	8
822	7	12
903	7	4
908	6	7
CaC11	1	0
948	1	0
124-1	0	0
901	0	0
950	0	0
918	0	0
826	0	0
954	0	0

### 3 -2 -3 Conclusions

Le classement des isolats est globalement identique sur les 2 variétés considérées comme sensible (caturra) et moins sensible (Java). Il ne permet pas de déceler d'inversion ou de décalage de classement. Cette observation devra être vérifiée sur un plus grand nombre de répétitions, mais si cette observation préliminaire se confirme cela laisse supposer une absence d'interaction différentielle avec ces 2 variétés.

Les souches pathogènes induisent des symptômes allant de IIM =0 à IIM = 84 avec un continuum entre ces 2 bornes. Ceci traduit une certaine diversité dans l'expression de l'agressivité des isolats sur baies. Les souches dont l'IIM est supérieur à 15 sont considérées comme pathogènes sur baies.

Dans cet essai, la variété Java se révèle plus sensible et attaquée par un plus grand nombre d'isolats que la variété caturra.

Quelques isolats échappent à la corrélation généralement observée entre inhibition de la croissance à 30°C et pathogénie sur baies. Cette expérimentation ayant été réalisée une seule fois elle sera répétée pour confirmation.

### **3 - 3 Evaluation du pouvoir pathogène sur semenceaux.**

#### 3 - 3 - 1 Mode opératoire

L'évaluation du pouvoir pathogène de 20 isolats a été réalisée avec la technique d'inoculation artificielle par trempage, sur semenceaux de 11 origines, représentées par 1 à 6 arbres. Les inoculations ont été réalisées à différentes dates, les variétés Java, Caturra constituent les témoins.

#### 3 - 3 - 2 Analyse statistique.

Malgré certaines données manquantes il est apparu important de réaliser une analyse de variance préliminaire. Pour les 11 lignées (Et6, Et19, Et21, ET37c, Ab1, Ce, Jm1, Kf1, Mi6, Caturra, Java) les données obtenues sur plusieurs arbres ont été regroupées (tableau 3). Les données ont été analysées à l'aide du programme d'analyse de variance du logiciel SAS qui permet une comparaison des niveaux d'agressivité des isolats et de la sensibilité du matériel végétal. Les tests de comparaison multiple des moyennes de Newman et Keuls ont été appliqués pour le classement des variables en groupes homogènes.

#### 3 - 3 - 3 Résultats

L'agressivité des isolats a été estimée avec l'Index d'Intensité de la Maladie (IIM) dans le tableau 4. L'ANAVA met en évidence un effet de la date d'inoculation sur l'expression des symptômes, un effet de la souche et de la variété. Par ailleurs des interactions date/souche et date/variété sont enregistrées. L'interaction variété/souche n'est pas significative. Malgré les effets observés, un classement des isolats en groupes homogènes a été effectué en première analyse.



**Tab.4** : Analyse de variance des indices de pathogénie de 20 isolats inoculés sur semenceaux déracinés et classement des isolats en groupes homogènes en fonction des Indices de Pathogénie.

**Analyse de variance**

Variabes	DDL	F	Pr > F
Date	23	4.76	0.0001
Variété	10	12.87	0.0001
Souche	19	38.97	0.0001
Date * Variété	90	2.24	0.0001
Date * Souche	107	2.13	0.0001
Variété * Souche	175	1.19	0.0883

**Classement**

Isolats	IIM moyen	Groupes homogènes
902	97.27	A
911	95.89	AB
907	95.75	AB
822	90.17	BC
904	88.10	CD
903	87.10	CDE
732	87.07	CDE
909	84.54	CDEF
905	81.03	DEFG
906	80.36	EFG
818	78.63	FGH
708	75.39	GH
910	72.45	H
908	66.92	I
901	61.00	J
821	51.42	K
854	51.34	K
835	50.29	K
834	35.82	L
826	25.92	M

### 3 - 3 - 4 Conclusions

Cette ANAVA a été conduite en l'absence de certaines données. Ensuite le classement des isolats en groupe homogène a été effectué. Les isolats ont pu être séparés en fonction de leur niveau d'agressivité. Cela traduit une assez grande diversité dans l'expression du pouvoir pathogène. Il est à noter que vis à vis des isolats 902, 911 et 907, aucune tolérance du matériel végétal n'a été observé.

Ces inoculations constituent seulement une étape et seront complétées par de nouvelles confrontations ; une étude statistique plus détaillée va être développée afin d'analyser plus en détail ces premiers résultats.

### 3 - 4 Comparaison de l'agressivité des isolats sur semenceaux et sur baies.

#### 3 - 4 - 1 Mode opératoire

Les IIM obtenus par inoculation de 17 isolats sur baies de Caturra et de Java ont été comparés aux IIM obtenus par inoculation des semenceaux de ces 2 variétés avec cette même série d'isolats.

#### 3 - 4 - 2 Résultats.

**Tab. 5 :** Comparaison de la moyenne des IIM des isolats, obtenus sur semenceaux (smcx) et sur baies des variétés Java et Caturra.

ISOLAT	91 1	90 7	90 3	90 5	73 2	90 6	82 2	90 9	90 2	90 4	91 0	90 8	70 8	90 1	82 1	85 4	82 6
I.I.M. Smcx	10 0	10 0	96	94	94	93	93	92	91	90	88	87	80	71	67	60	35
I.I.M. Baies	34	32	5	50	46	6	10	8	46	12	19	7	63	0	13	29	0

La comparaison porte sur 17 isolats (Tab.5). Les analyses statistiques sont en cours. Toutefois, un certain nombre d'observations peuvent être dégagées. Les isolats 903 et 906 considérés comme très agressifs sur semenceaux (IIM 96 et 93) induisent seulement des IIM de 5 et 6. Par contre, l'isolat 708 dont l'agressivité est moyenne sur semenceaux avec un IIM de 80 se révèle l'isolat le plus pathogène de la série étudiée avec un IIM de 63 sur baies infectées. L'isolat 901, qui montre un niveau moyen d'agressivité sur semenceaux (IIM de 71), est non pathogène sur baies.

#### 3 - 4 - 3 Conclusions.

Des différences marquées dans le classement des isolats selon l'expression de leur agressivité sont notées. Dans la nouvelle série d'isolats introduite (prospection 1996), certains ont induit des IIM supérieurs à la souche 732 considérée comme très pathogène. Par ailleurs, des isolats très pathogènes sur semenceaux (903,906) sont peu pathogènes sur baies, et l'inverse est aussi noté (708).

Ceci conduit à émettre l'hypothèse que le pouvoir pathogène pourrait s'exprimer différemment sur semenceaux et sur baies. Cela doit amener notamment à reconsidérer le choix des souches utilisées pour l'évaluation sur baies et sur semenceaux des génotypes et

Tab. 6 : classement par ordre décroissant de sensibilité sur semenceaux de 87 origines vis à vis de 3 isolats

génotype	caf.	code	708	732	854	moy
ET 28	2	152	100	100	100	100
KF 11	3	101		100		100
ET 34	3	113	100	99	100	100
ET 28	3	153	100	100	96	99
ET 32bc8	3	158	100	97	98	98
ET 50	2	114		98		98
KF 10	3	140		97		97
ET 21	2	61		99	92	96
ET 37c6	1	115	100	93	93	95
ET 14	2	110		95		95
AM	3	80	99	98	84	94
ET 2	3	147	94	100	85	93
JK 2	6	131	79	100	97	92
AM	5	81		100	84	92
JM 1	5	135	92	100	79	90
Caturra		72	96	98	77	90
ET 37c6	4	117	95	94	81	90
JK 2	1	129	88	97	83	89
AB 1	3	77	97	98	69	88
ET 6	3	49		92	81	87
ET 12	1	149	87	96	74	86
HA	1	92	91	95	66	84
ET 41	6	66		84		84
JK 2	4	94	96	95	58	83
LB 1	6	105	76	90		83
JK 2	2	93	93	95	59	82
KF 6	1	139	86	91	70	82
AB1	5	78	69	98	80	82
ET 30	4	65		82		82

génotype	caf.	code	708	732	854	moy
JK 2	3	130	83	98	62	81
JA		70	84	96	62	81
SC 3	4	107		80		80
MI 6	6	145	94	96	49	80
AB 1	2	74	88	100	51	80
MI 6	3	142	82	94	60	79
AB1	6	79	79	96	60	78
KF 9	3	100		78		78
ET 53	1	156	88	73	71	77
LB 1	1	102		77		77
MI 6	4	143	93	97	40	77
LB 1	4	103		76		76
ET 19	2	59		88	63	76
BO	2	82	86	95	41	74
JK 3	4	132	54	94		74
ET 11c	2	52		87	60	74
LB 1	5	104		73		73
ET 19	1	58		89	55	72
MI 6	5	144	81	81	51	71
JK 3	5	96	84	84	44	71
MI 6	1	106	78	100	33	70
ET 2	2	146	75	99	37	70
BB 1	3	123	57	85	65	69
KF 1	2	98	57	78		68
ET 21	1	62		76	58	67
ET 14	4	150	73	74	54	67
KF 2	5	138		82	51	67
ET 6	4	50	81	76	41	66
CO	5	89	79	74	44	66

génotype	caf.	code	708	732	854	moy
CE	3	84	82	81	33	65
AB 1	1	120	59	96	40	65
CO	3	86	84	71	40	65
ET 21	6	111	71	70	54	65
DG 10	1	127	56	87	50	64
ET 6	2	48		82	46	64
DG 10	2	128	75	78	39	64
ET 26	1	151	57	70		64
Java		73	64	84	42	63
ET 54	2	68	74	66	50	63
BB 1	1	121	51	94	36	60
BB 1	2	122	30	87	64	60
ET 17	6	57	67	69	44	60
DG 5	2	91	88	62	24	58
KF 1	1	97	56	84	34	58
ET 19	6	60	58	67	44	56
CE	1	83	54	83	31	56
JM 1	6	136	59	71	38	56
KF 9	1	99	47	84	33	55
ET 21	6	63	56	72	28	52
JK 3	3	95	67	57	31	52
ET 4	4	108		61	39	50
BB 1	6	124	55	52	37	48
ET 26	2	112	30	69	39	46
ET 12	3	109	35	72	31	46
ET 4	5	148	54	55	27	45
JM 1	2	133	43	67	23	44
ET 55	5	69		41	9	25

Code : Code d'introduction de l'origine ou variété  
Caf. : numéro de l'arbre

moyennes générales			
	732	708	854
IIM	85	75	56

à renforcer les études de validation du test sur semenceaux.

## 4 - EVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DU MATÉRIEL VÉGÉTAL

### 4 - 1 Evaluation de la sensibilité sur semenceaux

#### 4 - 1 - 1 Mode opératoire

La sensibilité des variétés a été évaluée par inoculations artificielles par trempage sur jeunes semenceaux. En raison du nombre réduit de semenceaux de certaines origines, un ordre de priorité a été établi dans le choix des souches, la 732 étant systématiquement la souche de référence, puis la 708 et la 854.

#### 4 - 1 - 2 Résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau 6 et en annexe. Ils indiquent une sensibilité très élevée de la plupart des origines étudiées. Avec l'isolat 732, la quasi totalité du matériel végétal a été évalué soit 86 origines. La distribution du matériel végétal dans les classes de l'IIM vis à vis de l'isolat 732 est la suivante:

iim [81-100]	67.5% des génotypes	T.S.
iim [61-80]	27.9%	S
iim [41-60]	4.6%	MR
iim inf à 40	0%	R

Les origines ET55 c5 (iim=41), ET4 c1 (iim=55) et BB1 c6 (iim=52) sont moyennement résistantes à l'isolat 732.

Afin de réaliser un classement des génotypes selon leur niveau de sensibilité une moyenne des IIM a été effectuée vis à vis des 3 isolats représentatifs 708, 732, 854, malgré l'absence de certaines données. Ce classement provisoire n'a pas de valeur statistique. Il permet d'identifier de façon précoce des origines présentant une moindre sensibilité qui devra être confirmée ultérieurement.

Ainsi les origines ayant un IIM inférieur à 60 pourront être retenues en sélection précoce.

#### 4 - 1 - 3 Conclusions

Les origines ET55 c5, ET4 c5 et c1, BB1 c6 et JK3 c3 présentent une moindre sensibilité avec les isolats 708, 732 et 854 ; cette observation confirme les résultats obtenus lors de précédents essais. Toutefois, ces origines devront être testées vis à vis d'autres isolats qui se montrent plus agressifs (ex : isolats 902, 907, 911, ...) que ceux utilisés.

Tab. 7 : Evaluation de la sensibilité sur baies détachées de 14 origines

	708	732	835	854	901	904	905	906	908	910	IIM moyen
<i>Ab1c1</i>		28									
<i>Ab1c2</i>	39			12			23	3	0		
<i>Ab1c6</i>	4	24			0	5				0	
<i>Bb1c1</i>	35	47	31	7		21	17		0	5	20
<i>Bb1c2</i>	24	23	4	15	0		13	0	0		10
<i>Bb1c3</i>	19	56		12	0	15	25	8		3	17
<i>Bb1c6</i>			16		0	15		8	3	0	
<i>Cec1</i>	79	70	14	50	0	44	26	12	4	33	33
<i>Cec4</i>	69	17	15	4	0	9	12	0	1	9	14
<i>Dg5c3</i>	11	13	0	1			0		0		4
<i>Jk3c5</i>	45	16		5			9		0		15
<i>Jm1c1</i>	96	74	41	56	5	39	39	17	2	20	39
<i>Jovac1</i>	67	70	15	19	4	17	19	7	4	4	38
<i>Jovac2</i>	65	75	17	23	0	20	16	4	0	5	16
<i>Kf1c4</i>	15	10	1	4	0	1	0	0	0	0	3
<i>Kf9c1</i>	40	43	12	11		5	9	0	0	21	16
<i>Kf9c3</i>	37	45	3	14	0	13	23	2	0	9	15
<i>Kf11c4</i>	81	56		19							
<i>Mu16c1</i>	39	25	9	5	0	4	3	0	0	0	9
<i>Mu16c2</i>	44	43	9	5	0	4	3	1	0	16	13
<i>Mu16c4</i>	8	28		7	0	11	0	3	0	0	6
<i>Et26c1</i>	55	33	1	12	1	5	7	1	0	2	12
<i>Et33c1</i>	32	4		0							
<i>Et33c2</i>			0		0	0	5		0	0	
<i>Et34c1</i>	47	40		21			24		4		27
<i>Et34c2</i>	40	15	0		0	0		3			
	47	40		18			15				



## 4 - 2 Evaluation de la sensibilité sur baies détachées

### 4 - 2 - 1 Mode opératoire

Le choix des 26 origines représentées par 1 à 3 arbres a été dicté par la présence de baies sur les arbres en collection car la production a été excessivement faible. Dans la mesure du possible le matériel végétal retenu a été évalué avec les 10 isolats et 3 répétitions de 25 baies.

La totalité des inoculations a été réalisée à la 15<sup>ème</sup> semaine après la floraison.

Dans cet essai, le témoin Java a été prélevé sur 2 pieds identifiés de la collection de Santa dont la sensibilité sur semenceaux est connue. Le témoin sensible a été remplacé par Mu 16 noté très sensible au champ (Bouharmont).

### 4 - 2 - 2 Résultats

L'évaluation de la tolérance des origines montre une étendue de réactions relativement importante, allant de 0 à 96.

L'analyse des résultats complets (en grisé dans le tableau 7) portant sur 18 origines et 4 isolats confirme les différents niveaux d'agressivité précédemment observés. Les isolats 732 et 708 induisent un IIM moyen de 47 et 50 sur les 18 caféiers et les isolats 854 et 905 induisent respectivement un IIM moyen de 18 et 15 sur ces mêmes caféiers.

Quelques origines apparaissent très sensibles vis à vis de 732 et 854: Jm1c1, Ce c1, Java1.

Cependant, plusieurs origines comme Dg5 c3, Kf1 c4, Mu16 c4, présentent de bons niveaux de tolérance.

### 4 - 2 - 3 Conclusions

L'IIM obtenu sur Java est pratiquement le plus élevé. Les faibles pourcentages d'infections réussies observés avec quelques origines devront être confirmés et corrélés avec les résultats sur semenceaux.

L'origine Mu 16 considérée comme tolérante au champ se révèle très sensible pour au moins 2 arbres évalués.

Les isolats 732 et 708 sont les plus agressifs.

#### 4 - 3 Comparaison des tests sur semenceaux et sur baies détachées

Une comparaison des résultats obtenus sur jeunes semenceaux et sur baies détachées provenant des mêmes arbres a pu être en partie effectuée (Tableau 8).

Tab. 8 : Comparaison des Index d'Intensité de la Maladie de 3 isolats sur baies et sur semenceaux.

Génotype		Origine	708		732		854	
arbre	code		Baies (iim)	Sceaux (iim)	Baies (iim)	Sceaux (iim)	Baies (iim)	Sceaux (iim)
AB1C1	120	Santa		59	28	96		40
AB1C2	74	Santa	39	88		100	12	51
AB1C6	79	Santa	4	79	24	96		60
BB1C1	121	Santa	35	51	47	94	7	36
BB1C2	122	Santa	24	30	23	87	15	64
BB1C3	123	Santa	19	57	56	85	12	65
Caturra	72	Foumbot	56	96	41	98	27	77
CEC1	83	Santa	79	54	70	83	50	31
ET19C1	58	Foumbot	39		23	89	16	55
ET26C1	151	Santa	55	57	30	70	12	
Java	73	Foumbot	71	64	51	84	30	42
JK3C5	96	Santa	45	84	16	84	5	44
KF9C1	99	Santa	40	47	43	84	11	33
KF9C3	100	Santa	37		45	78	14	

Les analyses statistiques sont en cours, toutefois quelques points particuliers seront relevés.

Dans la confrontation avec la variété Java et l'origine Ce c1, les 3 isolats inoculés sur baies induisent des pourcentages d'infection très élevés alors que l'IIM traduit pour ces mêmes variétés et origine une certaine tolérance.

Dans le cas de Jk3 c5 avec la souche 732, l'IIM sur baies est assez faible (IIM=16), à l'inverse l'IIM sur semenceaux est assez élevé (IIM=84).

Avec l'origine Ab1 c6 vis à vis de la souche 708 un décalage important est noté entre la sensibilité sur semenceaux (IIM=79) et l'IIM sur baies qui est quasiment nul (IIM=4).

Ces observations préliminaires ont tendance à montrer que la sensibilité sur baies et sur semenceaux ne s'exprime pas dans le même sens. Cette observation préliminaire fera l'objet d'une analyse plus approfondie lors de la prochaine campagne.

## 4 - 4 Incidence du stade de développement de la baie sur la sensibilité

### 4 - 4 - 1 Mode opératoire

La maladie au champ apparaît vers la 8 - 9ème semaine après la floraison jusqu'à la 23 -24 ème semaine qui correspond à la période d'apparition des derniers symptômes. Afin de suivre l'évolution de la sensibilité au cours du temps et de définir le stade de sensibilité maximum de la baie, des prélèvements échelonnés ont été effectués de la 14ème semaine après la floraison avec une périodicité de 2 semaines jusqu'à la 22ème semaine, ainsi 5 séries d'inoculations ont été réalisées. La floraison principale est apparue au 1er avril.

Les variétés Caturra, Java et les origines Et 19 c1 et Et 21 c5 prélevées dans la collection de Foubot ont été confrontées aux isolats 708, 732, 854, 905. Lors de chaque inoculation pour chaque confrontation, 3 répétitions avec 25 baies soit 75 baies au total sont inoculées. Une analyse de variance a été réalisée. Les données détaillées sont fournies en annexe .

### 4 - 4 - 2 Résultats

#### 4 - 4 - 2 - 1 Effet isolat

Le test de Newman et Keuls permet de mettre en évidence des différences significatives entre les 4 isolats. Le classement des isolats par ordre d'agressivité décroissant est le suivant: 708, 905, 732, 854 (Tableau 9).

**Tab.9** : Classement des isolats en fonction des pourcentages d'infections réussies.

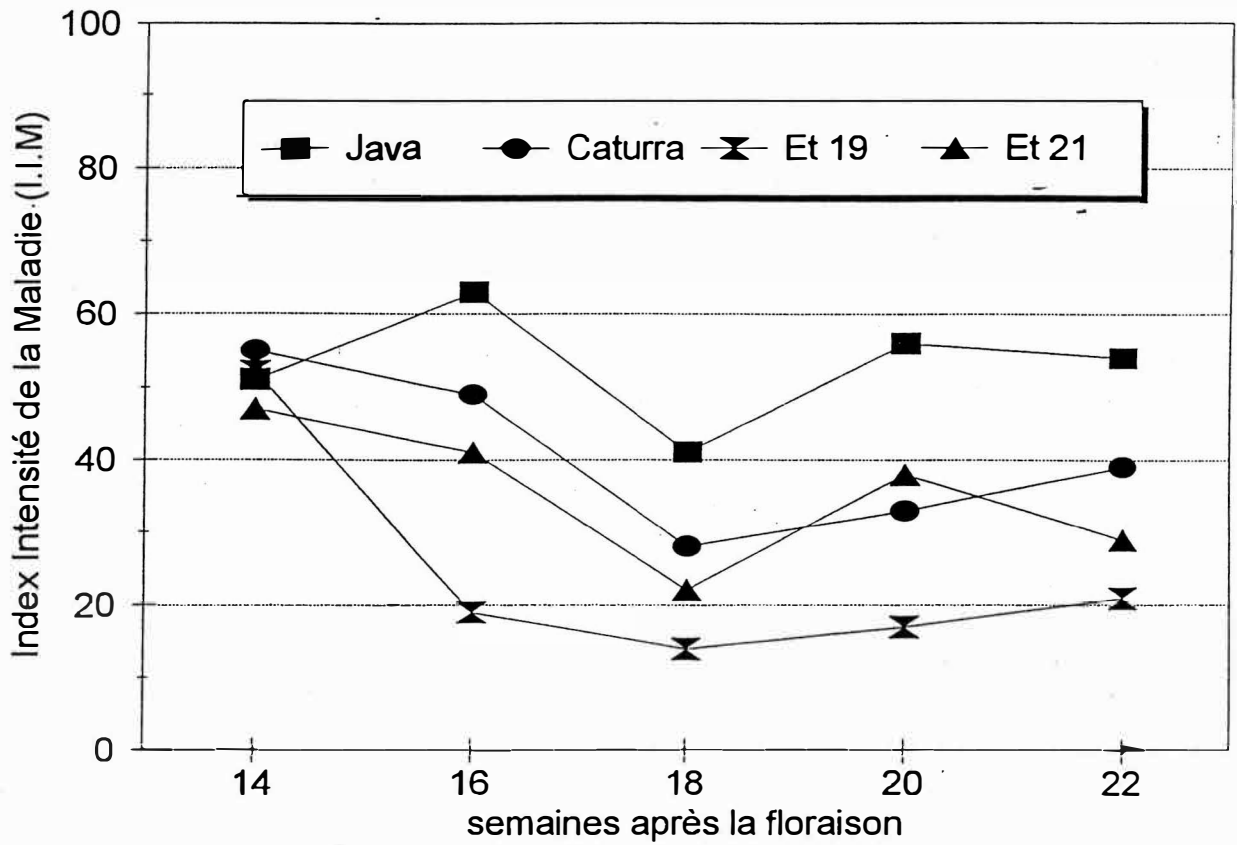
Isolat	IIM	Groupes homogènes
708	53.2	a
905	40.7	b
732	38.3	b
854	21.6	c

#### 4 - 4 - 2 - 2 Effet génotype

Les 4 génotypes présentent des niveaux de tolérance significativement différents allant de Java(IIM = 53) le plus sensible, Caturra (IIM =40.8), Et 21 (IIM = 35.4) à ET 19 (IIM = 24.5) le plus tolérant (Tableau 10).

**Tab.10** : Classement des génotypes en fonction des IIM

Isolat	% d'infect° réussies	Groupes homogènes
Java	53	a
Caturra	40.8	b
ET 21 c5	35.4	c
ET 19 c1	24.5	d



**Figure 1 - Evolution de l'Index d'Intensité de la Maladie en fonction du stade de développement de la baie**

#### 4 - 4 - 2 - 3 Effet stade de développement de la baie

La mise en évidence de l'effet du stade de développement de la baie a été évalué en cumulant la totalité des résultats obtenus avec les 4 variétés et les 4 isolats pour une date donnée.

La sensibilité des baies est plus élevée lors de la première et de la deuxième inoculation (IIM=51 et 43), une baisse est enregistrée lors de la 3<sup>ème</sup> date d'inoculation (IIM=36.1 et 35.6) et un niveau intermédiaire est observé lors des 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup>. (Tableau 11).

Tab. 11 : Sensibilité des baies exprimée en IIM obtenu sur les baies à différentes semaines après la floraison

Semaines	IIM	Groupes homogènes
14	51	a
16	43	b
20	36.1	c
22	35.6	c
18	26.5	d

La baisse de sensibilité lors de la 3<sup>ème</sup> inoculation a été observée sur l'ensemble des couples (Figure 1).

#### 4 - 4 - 3 Conclusions

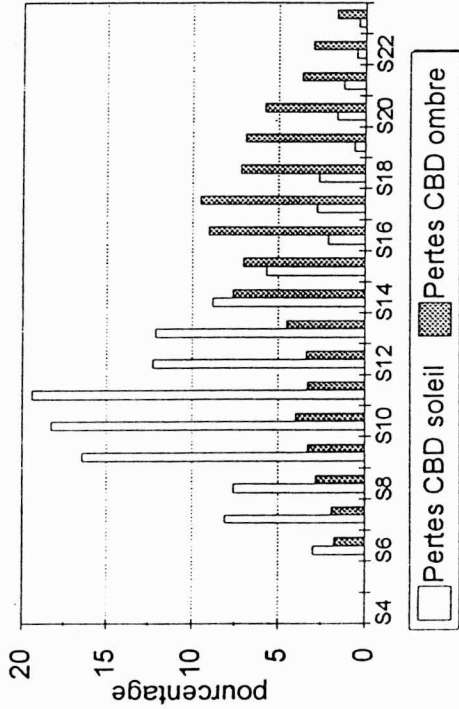
Une variation de la sensibilité au cours du temps a été enregistrée pour l'ensemble des couples testés. L'Index d'Intensité de la Maladie étant le plus élevé lors des deux premières inoculations, correspondant à la 14<sup>ème</sup> et à la 16<sup>ème</sup> semaine après la floraison. Ensuite, une baisse à la 18<sup>ème</sup> semaine, puis une légère remontée de l'Index d'Intensité de la Maladie à la 20<sup>ème</sup> et à la 22<sup>ème</sup> semaine est observée.

Cette variation de la sensibilité pourrait être due à une variation de la réceptivité des tissus de la baie au cours du temps. L'augmentation de la sensibilité des baies à la 20<sup>ème</sup> semaine correspond au stade d'endurcissement de l'endosperme. La perte de sensibilité des tissus vers la 18<sup>ème</sup> semaine doit être considérée avec attention car lors de l'analyse de la sensibilité du matériel végétal par inoculation artificielle sur baies les inoculations réalisées durant cette période auront tendance à sous estimer la sensibilité. Toutefois l'hypothèse d'un effet date de manipulation ne peut être écarté.

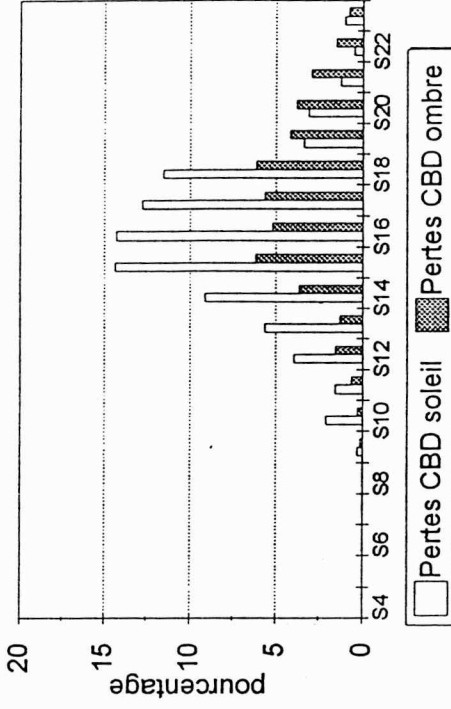
Il est important de noter que les 4 isolats étudiés présentent des niveaux d'agressivité différents des niveaux obtenus lors des tests sur semenceaux à l'exception de l'isolat 854, qui dans les 2 cas est le moins pathogène. Cela conduit à supposer que l'agressivité des isolats s'exprime de manière différente selon la nature des tissus.

De même le classement des génotypes, diffère du classement obtenu avec le test sur semenceaux. Notamment la variété Java considérée tolérante se montre plus sensible que la variété Caturra.

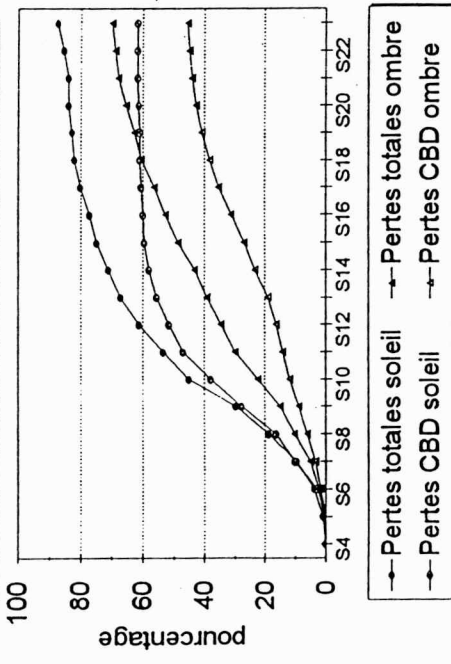
Taux de pertes instantanées dues au CBD - Santa 96



Taux de pertes instantanées dues au CBD - Babadjou 96



Pertes cumulées totales et dues au CBD - Santa 96



Pertes cumulées totales et dues au CBD - Babadjou 96

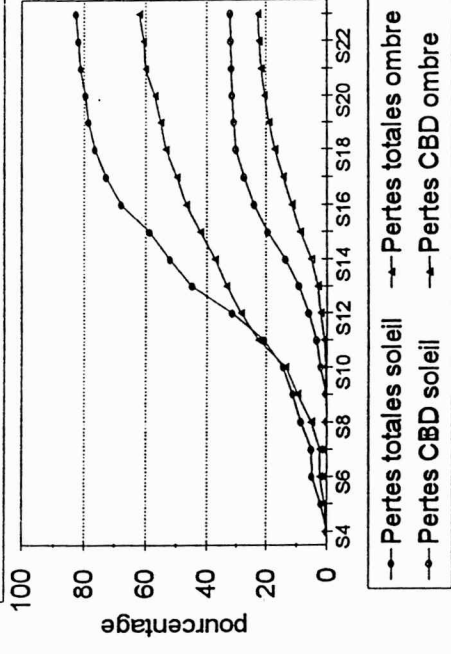


Figure 2 : Evolution des taux de pertes totales et pertes dues au CBD à l'ombre et au soleil sur les sites de Babadjou et Santa

## 5 - RECHERCHE DES FORMES DE SURVIE DU PATHOGENE EN INTER-CAMPAGNE

La région de production du Caféier arabica est sous un régime des pluies unimodal avec une saison sèche très marquée qui s'étend de novembre à février-mars. Durant cette période, la maladie n'est pas visible. Une recherche des formes de survie a été entreprise.

Des fragments de branchettes semi-aoûtées ou encore herbacées, des pédoncules floraux et des baies momifiées ont été prélevés durant les mois de novembre à février. L'isolement du champignon a été obtenu par agitation des fragments de tissus dans de l'eau distillée. La suspension a ensuite été étalée sur milieu antibiotique et incubée à 20°C ce qui diminue la croissance des champignons dont la croissance se situe à 25°C et favorise les champignons dont l'optimum de croissance est situé à 22°C comme *C. kahawae*.

Cette méthodologie a permis d'isoler plusieurs souches présentant des similitudes de profil en culture avec *C. kahawae* et inhibées à 30°C. Leur pathogénicité sur baies doit être vérifiée. Ces isolats ont été clonés et sont en cours d'étude. Il s'agit des isolats 932 à 946.

## 6 - EPIDEMIOLOGIE

Durant l'année 1996, l'incidence de la maladie a été étudiée sur 2 sites en plantations paysannes, conduites sous couvert d'arbres fruitiers, représentatives de la culture dans cette zone. La première est située en zone de moyenne altitude à 1550 mètres et la deuxième à 1760 m.

L'incidence de l'exposition à la lumière a été mesurée en prenant en compte les arbres préférentiellement exposés à la lumière et les arbres exposés préférentiellement à l'ombre. Le dispositif expérimental est constitué pour chaque objet de 50 arbres choisis en randomisation totale. Chaque arbre est considéré comme une parcelle élémentaire. Sur chaque arbre, les chutes de baies sont observées de façon hebdomadaire, sur 5 branches exposées dans toutes les directions.

Sur les deux sites les pourcentages de pertes totales enregistrés au soleil sont quasiment identiques. Les pertes observées à l'ombre sont sensiblement inférieures.

A Santa les pertes cumulées totales sont de 83%. Les pertes dues à la maladie sont de 62%. Environ 20% des pertes sont d'origine inconnue (figure 2).

A Babadjou les pertes cumulées totales au soleil sont aussi de l'ordre de 82%, mais seulement 32% des chutes sont expliquées par la maladie. La différence, soit environ 50% des chutes observées au soleil ne sont pas dues à la maladie. A l'ombre le taux de chutes inexplicables est de 40%.

Ces pertes d'origine inconnue peuvent être attribuées à des chutes physiologiques ou à des attaques d'insectes, mais dans l'état actuel des connaissances il est

L'observation du rythme des pertes hebdomadaires de baies fait apparaître un pic de chute décalé entre les baies exposées à la lumière et les baies à l'ombre. La chute des baies au soleil est plus précoce et d'intensité plus grande. Ce décalage est bien marqué à Santa, il est de l'ordre de 4 semaines. Le rythme de développement des baies à l'ombre et au soleil n'étant vraisemblablement pas synchrone et la sensibilité des baies étant fonction de leur stade de développement, ceci pourrait expliquer les différentes cinétiques de chutes de baies observées à l'ombre et au soleil.

La maladie apparaît dès la 6ème semaine après la floraison à Santa, et seulement à partir de la 9ème à Babadjou. Cette dynamique d'évolution de la maladie permettra de moduler l'application de traitements fongicides en fonction des conditions écologiques et climatiques.

## **7 - EVALUATION DE LA MALADIE EN COLLECTION**

Au cours de cette campagne aucun relevé de la maladie sur les arbres de la collection n'a pu être effectué en raison de l'absence de baies.

## **8 - ETUDE DE L'HERITABILITE DES CARACTERES DE RESISTANCE**

Un essai diallèle incomplet a été installé en 1989 sur la station de Foubot. Il a été récolté pied par pied pour effectuer une analyse de l'héritabilité des caractères de résistance en F2.

L'analyse sera effectuée au CIRAD à Montpellier avec des isolats du Cameroun et d'autres zones de production.

## **9 - CONCLUSIONS GENERALES**

### **Pouvoir pathogène**

L'analyse du pouvoir pathogène d'une gamme de 40 isolats géographiques du Cameroun sur plusieurs variétés de *C. arabica* choisies en fonction de leur diversité, confirme l'existence d'un continuum d'agressivité dans l'expression du pouvoir pathogène des isolats à la fois sur semenceaux et sur baies détachées. Sur la gamme d'isolats géographiques évaluée vis à vis de la série de variétés, les observations effectuées en l'attente d'une analyse statistique, ne permettent pas de déceler d'interaction spécifique clairement établie.

En revanche, il semblerait que l'expression du pouvoir pathogène pour certains isolats soit différente sur semenceaux et sur baies détachées. C'est le cas de l'isolat 708 moyennement pathogène sur semenceaux du géotype Ab1 c6 qui se révèle très peu pathogène sur baies. Inversement, les isolats 708, 732 et 854, moyennement pathogènes sur semenceaux du géotype Ce c1, provoquent des pourcentages d'infections réussies très élevés sur baies. En conséquence, il semblerait que pour un couple donné l'expression du pouvoir pathogène sur baies et sur semenceaux ne s'exprime pas avec la même intensité.



Cela amène à émettre l'hypothèse d'une expression du pouvoir pathogène spécifique, fonction du tissu attaqué. Si cette observation se confirme, cela posera le problème du choix des souches à utiliser lors du criblage du matériel végétal.

Enfin, dans l'état actuel des connaissances si l'absence d'interactions différentielles se confirme, et, si comme le montre l'étude des Groupes de Compatibilité Végétative, les isolats du Cameroun constituent un seul groupe, alors la population de *Colletotrichum kahawae* du Cameroun présenterait une faible diversité.

Ces observations doivent amener à reconsidérer le choix des isolats utilisés dans le criblage du matériel végétal et à restreindre leur nombre lors des évaluations.

### **Sensibilité - Développement**

Le stade de développement de la baie semble avoir une incidence sur la sensibilité. Ainsi entre la 14ème et la 22ème semaine après la floraison, la sensibilité des baies a significativement évolué. Afin de préciser le stade de développement de la baie correspondant à l'apparition des premiers symptômes et le stade de disparition de la sensibilité, cette étude sera reprise et débutera dès la 7ème ou 8ème semaine après la floraison et sera poursuivie au-delà de la 22ème semaine. Ceci est important pour définir la fenêtre durant laquelle les inoculations sur baies peuvent être réalisées pour se trouver en phase avec la période de sensibilité maximum.

Par ailleurs, la détermination des stades précoces de sensibilité des baies peut avoir une importance dans le choix des dates des premiers traitements phytosanitaires.

### **Recherche des sources de résistance**

L'évaluation de la tolérance de certains génotypes identifiés lors des précédents essais a été confirmée. L'élargissement du nombre de génotypes testés a permis de repérer quelques individus supplémentaires. Le criblage sur baies de ces individus sera effectué lors de la prochaine campagne. Il s'agit d'arbres repérés au sein des origines ET4c5 et c4, ET12c3, ET19c6, ET21c6, ET26c2, ET54c2, ET55c5, BB1c6, DG5c2, JK3c3.

Toutefois, les sources de résistance identifiées sont relatives car certains isolats (902, 911, 907) surmontent toute résistance au moins dans le test sur semenceaux.

## **10 - DIVERS**

### **10 - 1 Diffusion de matériel végétal**

La récolte de semences fin 1996 a permis la diffusion de la variété Java auprès des partenaires du CIFC et du CIRAD ainsi que d'autres origines éthiopiennes pour l'évaluation de leur tolérance vis à vis d'isolats en provenance de l'Afrique de l'Est.

Les semences collectées en novembre 1997 ont été diffusées en partie.

## 10 - 2 Participation à des colloques

### - Atelier de travail de Dschang

Durant la période du 31 mars au 4 avril les chercheurs des différents pays partenaires se sont rencontrés dans la zone caféière. Le point sur les travaux en cours a été effectué. Le compte-rendu de l'atelier a fait l'objet du 3ème rapport semestriel d'activité du projet.

### - Colloque ASIC

Le 17ème colloque de l'ASIC s'est déroulé à Nairobi du 21 au 25 juillet. Cela a été l'occasion pour 2 ingénieurs, M. BELLA MANGA et M. MOUEN BEDIMO, et le responsable scientifique M. BIEYSSE de participer au colloque. Une communication "Observation sur la diversité de la population de *Colletotrichum kahawae* agent de l'anthracnose des baies du caféier Arabica ; Implications pour l'amélioration génétique", a été présentée (Texte en annexe).

## 10 - 3 Formation

L'ingénieur M.BELLA MANGA, actuellement en thèse (réalisation en alternance Cameroun / France) dont le sujet porte sur l' "Etude de la diversité de *Colletotrichum kahawae*, agent de l'anthracnose des baies, et caractérisation de la résistance du caféier Arabica (*Coffea arabica* L.) à cet agent pathogène" bénéficie d'un appui logistique déterminant lui permettant de réaliser dans de bonnes conditions les expérimentations nécessaires à l'avancement de ses travaux.

## PRESENTATION

*C. Gloeosporioides / café*

Orstom

# Rapport final d'ATP

Le genre *COLLETOTRICHUM* en zones tropicales :  
interactions hôte-pathogène et épidémiologie.

Contributions des Laboratoires de Phytopathologie de l'ORSTOM  
à Nouméa (Nouvelle-Calédonie) et à Montpellier.

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>MATÉRIELS &amp; MÉTHODES</b>	<b>1</b>
1) Méthodologie des enquêtes	1
2) Gestion des données	3
<b>RÉSULTATS ÉPIDEMIOLOGIQUES</b>	<b>5</b>
1) Rappels bibliographiques	5
2) Inventaire des contraintes pathologiques du caféier en NC	5
3) Typologie des sites de caféiculture	7
4) Co-structure Pathologie/Environnement : interrelations.	9
5) Prédiction du risque épidémique	13
6) Modélisation de la cinétique de maladie	13
<b>COMPLÉMENTS BIOLOGIQUES</b>	<b>16</b>
1) Structure génétique des populations de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	16
2) Recherche d'une méthode d'infection artificielle	19
3) Évaluation in situ du pouvoir pathogène	22
4) Prise en compte de la diversité de l'hôte	23
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>24</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>25</b>

## Rapport final d'ATP

### "Le genre *COLLETOTRICHUM* en zones tropicales : interactions hôte-pathogène et épidémiologie."

Contributions des Laboratoires de Phytopathologie de l'ORSTOM<sup>1</sup>  
à Nouméa (Nouvelle-Calédonie) et à Montpellier.

## INTRODUCTION

Du fait de l'importance économique du café à travers le monde et des contraintes phytosanitaires qui affectent sa culture, de nombreux travaux de recherche ont abordé la pathologie fongique du caféier sous différents aspects : biologie de l'agent pathogène, épidémiologie, génétique du parasitisme, méthodes de lutte, etc. Bien que de nombreux pathogènes affectent *Coffea arabica*, la majorité des recherches a été consacrée à l'étude de la rouille due à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., car ce pathogène s'est révélé particulièrement dommageable dans de nombreux pays producteurs (Shieber 1972 ; Eskes et al. 1991 ; Sierra Sanz et al. 1994).

Les recherches épidémiologiques menées depuis 1991 en Nouvelle-Calédonie (NC) sur le caféier *arabica* consistent à étudier le fonctionnement d'un pathosystème multiple intégrant les trois principaux pathogènes fongiques (*Hemileia vastatrix*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cercospora coffeicola*) dans des contextes écologiques contrastés.

En pratique, la démarche retenue pour ces études repose sur l'intégration des caractéristiques pathologiques et environnementales des sites d'enquête. La modélisation de leurs inter-relations doit permettre d'identifier et de hiérarchiser les paramètres mésologiques qui régissent l'émergence et le développement des maladies du caféier. Cette caractérisation du déterminisme des évolutions pathologiques puis la prévision du risque épidémique tendent à l'optimisation des techniques de lutte.

Les différentes facettes de cette approche holistique sont représentées sur la Figure 1. L'axe vertical de ce schéma représente de bas en haut la chronologie des opérations épidémiologiques mises en oeuvre : inventaire initial, acquisition des données de terrain, analyse synthétique, etc. De part et d'autre de cet axe, ont été articulées des actions de recherche complémentaires indispensables à la cohésion du programme et à la rigueur des préconisations résultant de la modélisation.

Au terme des investigations menées dans ce cadre, une masse d'informations a été obtenue sur la pathologie du caféier et les mécanismes qui la contrôlent. Mais dans le cadre du présent rapport d'ATP-anthracoïse, l'accent est essentiellement mis sur les résultats concernant *Colletotrichum gloeosporioides*, tout en s'attachant cependant à établir des comparaisons avec les deux autres pathogènes du caféier.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1) Méthodologies des enquêtes

Le dispositif d'enquête pluri-local est constitué par des sites traditionnels de caféiculture, choisis selon des critères de diversité aussi larges que possible (Figure 2).

La démarche épidémiologique est subordonnée à deux étapes dont la rigueur conditionne la capacité ultérieure à interpréter les données :

\* La première consiste à réaliser un "état des lieux" initial le plus détaillé possible.

Les caractéristiques écologiques de chaque site sont tout d'abord définies par la localisation géographique, la situation topographique, l'exposition aux vents dominants, la densité de plantation, l'état général de la culture. Les caractéristiques édaphiques globales ont été obtenues par analyses physico-chimiques d'échantillons de terre (pH, texture du sol, CEC, bases échangeables, fertilité, etc.) alors qu'une éventuelle micro-hétérogénéité édaphique a également été recherchée le long du transect formé par les 10 arbres choisis pour l'enquête (prélèvements systématiques de terre de 20 à 120 cm, profils de pH, analyse par pédocomparateurs,...).

<sup>1</sup> Ces résultats ont été obtenus à Nouméa : par Nandris D., Kohler F. et Pellegrin F. (épidémiologie), Morelle S. (infections artificielles) ; à Montpellier, par Fernandez D., Faugeron S. et Lourd M. (analyses des populations du pathogène), Lashermes P. et Trouslot P. (diversité génétique du caféier).

# PATHOSYSTÈME "CAFÉIER"

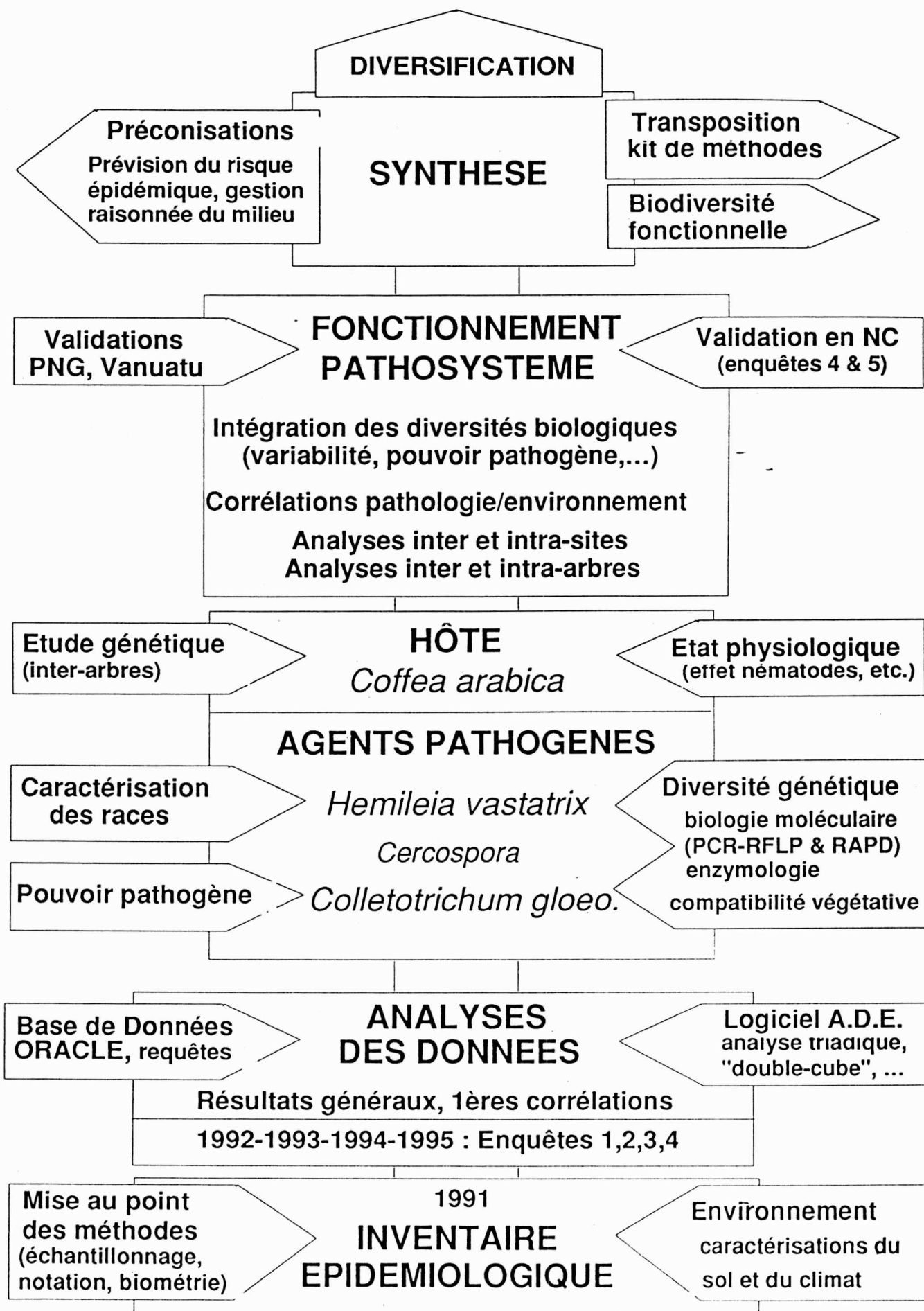


Figure 1 : structuration et évolution du programme de recherche sur le pathosystème caféier.

## LOCALISATION ET CARACTÉRISTIQUES DES SITES

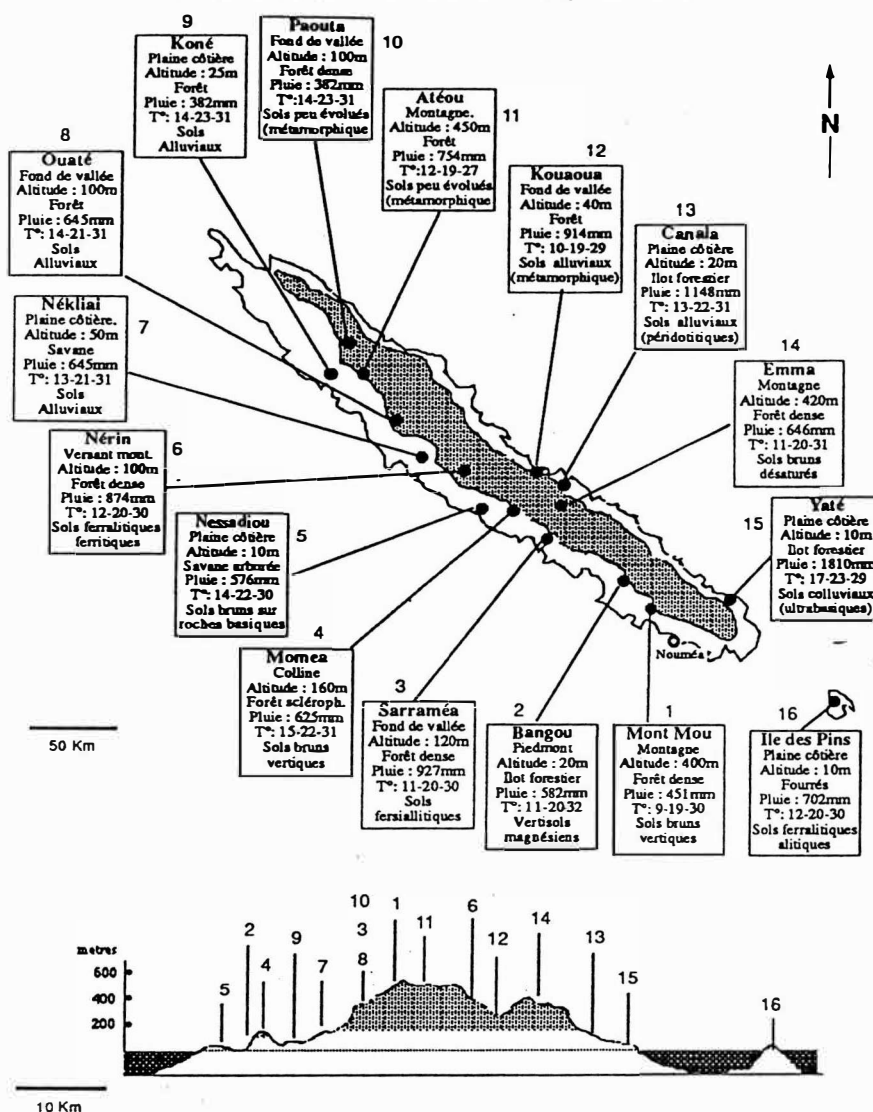


Figure 2 : localisation et caractéristiques des sites d'enquête en Nouvelle-Calédonie.

\* La seconde étape réside dans un suivi mensuel réalisé durant tout le cycle cultural du caféier afin de décrire d'une part, l'apparition et l'évolution des attaques causées par les pathogènes, et d'autre part, de relever les principales données climatiques (température, humidité relative, insolation, durée d'humectation foliaire, pluie, humidité du sol à 20 et 50 cm de profondeur, ...) enregistrées en permanence par une station météorologique. Ce suivi a été répété pendant plusieurs années consécutives afin de dégager les tendances majeures tout en minimisant l'effet d'éventuels épiphénomènes.

L'enquête épidémiologique proprement dite est effectuée sur 10 arbres par site, selon le principe d'un suivi "feuille à feuille". Le "patrimoine" végétal initial ainsi pris en compte varie selon les années entre 6000 et 10.000 feuilles. L'état sanitaire des rameaux et des baies ainsi que la production sont également notés. Pour ces différents relevés, il faut souligner l'importance du facteur humain dans la fiabilité des observations épidémiologiques pour, qu'au cours du temps, la variance "inter-observateurs" ne masque pas la variance biologique recherchée.

## 2) Gestion des données

\* Ces données écologiques, climatiques et épidémiologiques génèrent des fichiers informatiques de taille importante (plus de 40.000 données par mois). Le stockage et la gestion de ces données ont été réalisés avec la base de données ORACLE. Grâce à un ensemble de "requêtes" SQL (Structured Query Language), on extrait sélectivement les informations recueillies *in situ*. Selon les besoins, le niveau de résolution de ces requêtes peut être modulé afin d'appréhender, soit dans leur globalité, soit en détail, les phénomènes observés :

- analyse inter-sites : comparaison des signatures parasitaires ; mise en évidence de relations originales avec l'environnement.
- analyse intra-site : évaluation de la diversité de comportement de chacun des 10 arbres ; appréciation du degré de variation édaphique.
- analyse intra-arbre : étude fine de la dynamique de l'épidémie au sein de l'arbre ; incidence de l'âge et de la position des feuilles sur leur état sanitaire.

\* Les résultats bruts extraits par les requêtes SQL sont repris sur Excel dans le but de disposer de paramètres synthétiques permettant la quantification de l'état sanitaire des arbres.

- Note Sanitaire : selon le site, la situation parasitaire peut prendre trois aspects : mono-infection (un seul pathogène infeste les caféiers), infections multiples (2 ou 3 pathogènes sont présents sur des feuilles différentes), co-infection (présence simultanée de 2 ou 3 pathogènes sur des mêmes feuilles).

Pour rendre compte de ces différentes situations, une note sanitaire récurrente a été calculée : à une date d'observation donnée, elle intègre d'une part, le niveau moyen de gravité des attaques foliaires dans une parcelle et d'autre part, l'historique pathologique des feuilles disparues. Selon le cas, la Note Sanitaire (NS) définit soit, le niveau d'infestation de la parcelle (tous pathogènes confondus) soit, celui imputable à chacune des trois maladies.

- Le pourcentage cumulé de feuilles nouvellement infectées (%fmal) qui reflète la progression des maladies. Le pourcentage cumulé de mortalité des feuilles malades (%fTmal) caractérise le niveau de défoliation pathologique alors que le pourcentage cumulé de mortalité des feuilles saines (%fTsain) met en évidence d'éventuels stress physiologiques entraînant une défoliation avant la sénescence de fin de cycle.

- La durée moyenne du cycle infectieux exprime le nombre moyen de jours s'écoulant entre le début de l'infection et la chute des feuilles. Par comparaison avec la durée de vie moyenne d'une feuille saine, il rend compte de l'impact des attaques fongiques durant un cycle culturel donné.

- L'indice d'aggravation, qui est établi en rapportant l'évolution de la gravité de la maladie (depuis les premiers symptômes jusqu'à la chute de la feuille) à la durée moyenne du cycle infectieux.

- Le pourcentage de rameaux morts.

\* L'interprétation statistique de ces données est réalisée avec le logiciel ADE-4 (Analyses multivariées et expression graphique des Données Environnementales) développé à l'Université de Lyon par Thioulouse, Chessel, Dolédec & Olivier (1997). Outre les analyses multi-dimensionnelles classiques (ACP, AFC, ACM, CAH, Discriminante, etc.), ce logiciel très original tant dans sa conception que dans son maniement, autorise la réalisation de statistiques plus complexes (comparaisons AFC/ACP, analyses inter-intra classes, co-structures de deux ACP, analyse triadique, etc.).

Parmi toutes ces possibilités, l'analyse triadique s'est révélée précieuse puisque la répétition dans le temps des observations de terrain génère des fichiers de données de type cubique (variables x sites x dates d'observation) dont l'analyse simultanée (et non, date par date) est assez particulière (Figure 3). Pour de tels fichiers constitués de tableaux successifs, le module Statico établit, entre autre, un "compromis" révélant les structures communes aux différentes dates pour aboutir à une typologie spatio-temporelle des sites d'enquêtes en fonction, soit de leurs caractéristiques édaphiques, soit des dommages pathologiques.

L'analyse de co-structures, s'est également avérée bien adaptée à la comparaison des deux cubes de données formés par les tableaux Pathologie et Environnement. Cette analyse recherche les combinaisons de variables (ou axes de co-inertie) qui expriment la co-variation temporelle (succession des observations) et la co-structures spatiale existant entre les nuages de points représentant les données. La projection de ces variables sur des axes définit des plans précisant les liens entre les deux cubes de données (Figure 3).

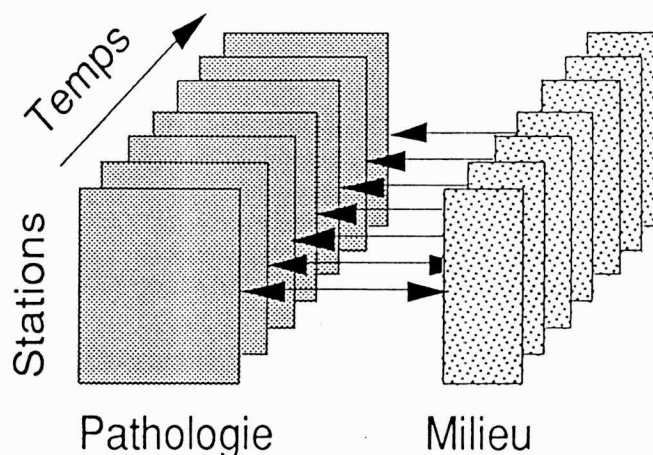


Figure 3: format des données à traiter (échantillonnage complet de tous les sites à toutes les dates d'observation) ; couplage de cubes de données.



## 1) Rappels bibliographiques

*Colletotrichum glæosporioides* apparaît comme un taxon aux contours mal définis, constitué selon VON ARX (1957), de plus de 600 espèces synonymes. Les nombreuses études entreprises par l'analyse des caractères morphologiques, physiologiques et pathologiques d'isolats de différentes populations de *C. glæosporioides*, ne sont pas parvenues à cerner convenablement les limites de l'espèce. Plus particulièrement, chez le caféier où il existe plusieurs types d'antracnoses, la confusion taxonomique a pendant longtemps rendu difficile l'établissement de diagnostics pertinents. Ainsi à titre d'exemple, les travaux de HINDORF (1975) puis plus récemment ceux de SREENIVASAPRASAD et al. (1993) et WALLER et al. (1993) ont permis progressivement de séparer et d'identifier *Colletotrichum kahawae*, l'espèce responsable de l'antracnose des baies vertes de *Coffea arabica*, maladie limitée à l'Afrique centrale et orientale (PINARD, 1995).

Par ailleurs, il a été établi que de nombreuses souches de *Colletotrichum* font preuve d'une agressivité réduite, se développent en saprophytes puis deviennent parasites à la faveur de circonstances favorables (environnement, traumatismes subis par l'hôte, ...) à leur pénétration dans les tissus de l'hôte (LOURD, 1982). Le parasitisme n'est donc pas une caractéristique constante chez ce champignon. Pendant la saison sèche, peu propice à son développement, le parasite se maintient à l'état saprophytique sur des débris végétaux nécrosés. Lors du retour des conditions favorables (humidité et pluie), il reprend son activité parasitaire et devient infectieux (HINDORF, 1975). Ces constatations ont été confirmées dans une synthèse réalisée par WALLER (1992) qui dresse un bilan des règles auxquelles obéissent les épidémies de *Colletotrichum*. Compte tenu de l'existence d'une phase saprophytique dans son cycle de vie et de sa pathogénicité occasionnelle voire opportuniste, *C. glæosporioides* peut être considéré comme un parasite faible. La nature polyphage de *C. glæosporioides* ne fait que confirmer son caractère opportuniste. Du fait de sa non spécificité, il est probable qu'il soit peu agressif et rarement virulent.

La corrélation entre le comportement pathologique et la présence ou non de reproduction sexuée est un domaine peu exploré, en raison de la difficulté pratique à obtenir des périthèces. Ce point a cependant été abordé par plusieurs auteurs : ainsi, les résultats obtenus par AHOUSSOU (1989) sur l'igname, suggèrent une tendance à plus d'agressivité chez les isolats en phase de reproduction sexuée ; ces résultats sont en accord avec ceux recueillis par LE GRAND (1974, in AHOUSSOU 1989) chez *C. musae* du bananier. Par contre, LOURD (1979) signalait l'absence de lien entre le comportement pathogène des différents isolats de *C. glæosporioides* à l'égard de plusieurs variétés de jute, et la présence ou non de reproduction sexuée.

Paradoxalement, malgré ces caractéristiques particulières, *C. glæosporioides* peut être très dommageable dans certains cas. Ainsi, les pertes occasionnées par l'antracnose de l'igname, peuvent atteindre 80% de la récolte, dans les cas d'épidémies sévères (TORIBIO et JACQUA, 1978 ; WINCH et al. 1984). Il est également signalé, qu'en cas de co-infection ou d'association avec un autre pathogène, les antracnoses de rameaux et de feuilles de caféiers, dues à *C. glæosporioides*, provoquent de sérieux dégâts (MULLER, 1980 ; MUTHAPPA, 1974).

## 2) Inventaire des contraintes pathologiques du caféier en NC

En Nouvelle-Calédonie, *Colletotrichum gloeosporioides* est responsable de l'antracnose des feuilles, des rameaux et des baies mûres. Il est assez souvent associé à *Hemileia vastatrix* et plus rarement à *Cercospora coffeicola*. Sur feuilles, les premiers symptômes se manifestent sous forme de petites taches brunes qui progressivement s'étendent, confluent et couvrent plus de la moitié de la surface foliaire. Sur rameaux, une coloration noire s'étend en quelques semaines depuis l'apex vers l'insertion, avant que n'intervienne le dessèchement puis la mort de l'organe. De façon concomitante, les cerises de ces branches infestées mûrissent prématurément et sont fréquemment envahies par le pathogène.

Les premiers résultats épidémiologiques révèlent, selon les parcelles, une mosaïque de situations avec présence ou absence de l'un et/ou l'autre des trois protagonistes (Figure 4). Bien que la rouille demeure la maladie la plus représentée au sein du Territoire, près de 65 % des parcelles présentent des attaques de *C. gloeosporioides* et, pour moins de la moitié d'entre elles, ces infections concernent 70% des feuilles. Les cinétiques de maladies basées sur la Note Sanitaire confirment que dans 3 sites (ILP6, NESS3, YATÉ), l'antracnose constitue la contrainte pathologique la plus forte. Dans les autres sites, il s'agit plus fréquemment d'infections multiples impliquant *Colletotrichum* et *Hemileia*.

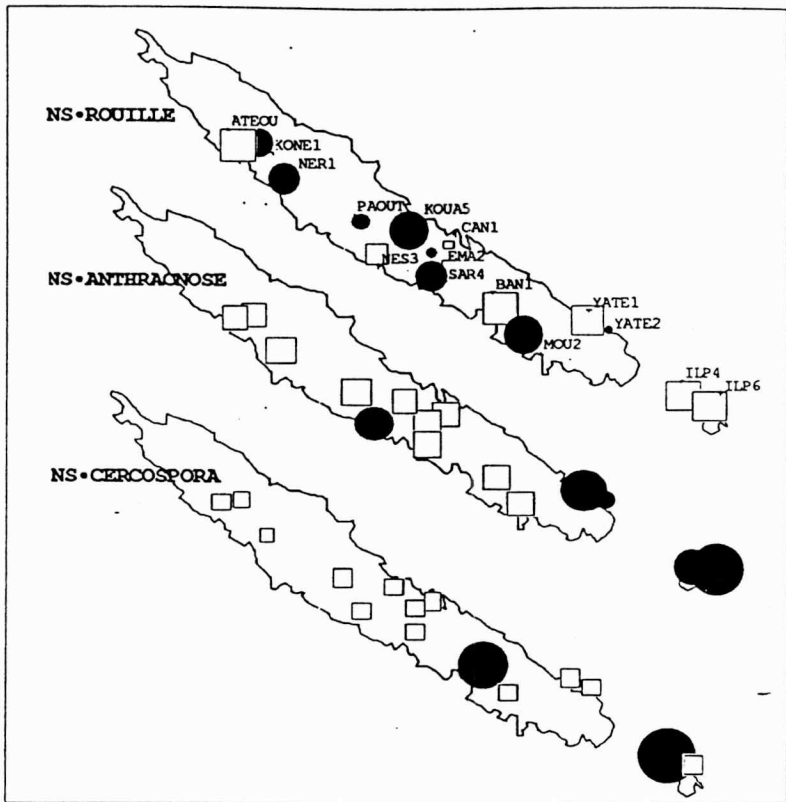


Figure 4: distribution des foyers de maladies en Nouvelle-Calédonie.

Cette distribution est globalement confirmée par les enquêtes menées durant les années suivantes. Dans la majorité des sites, l'amplitude de variation des cinétiques annuelles du *Colletotrichum* demeure faible d'une année à l'autre (Figure 5), alors que la climatologie a fluctué significativement. Ce constat suggère que les conditions climatiques ont peu d'effet sur le développement de l'antracnose.

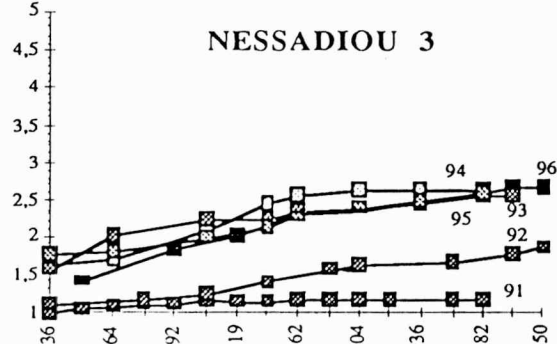
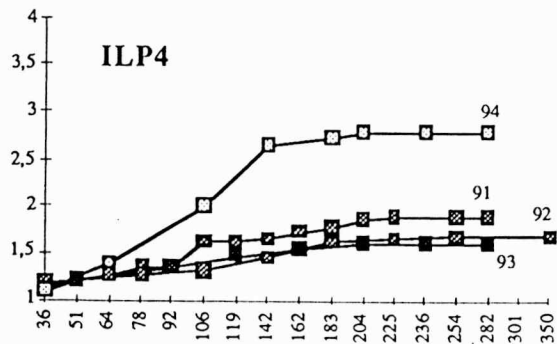
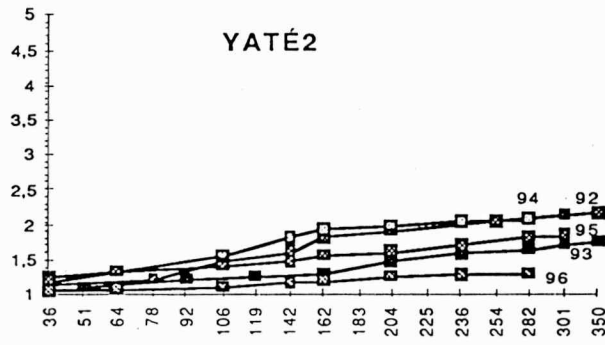
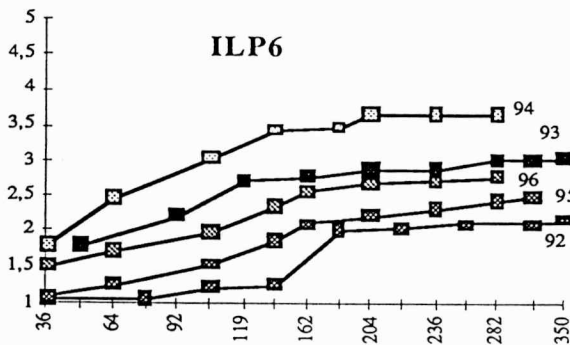


Figure 5 : cinétiques pluri-annuelles (Notes Sanitaires de Colletotrichum) dans 4 sites.

Il faut enfin noter qu'un phénomène de mortalité de rameaux est fréquemment observé durant la seconde moitié du cycle cultural. Dans certaines parcelles, les taux de rameaux morts peuvent alors dépasser 50%. Après isolement dans les parties malades, il est fréquent d'associer *Colletotrichum* à ces lésions apicales.

### 3) Typologie des sites de caféiculture

\* L'analyse triadique des données pathologiques correspondant à une année donnée repose sur trois niveaux d'interprétation.

- La définition d'une "interstructure" considérant le jeu de données comme une suite chronologique de tableaux (sites x paramètres), permet tout d'abord d'étudier l'évolution de la situation pathologique dans ces sites (Figure 6). A partir de la date 5, des regroupements de sites "homologues" sont perceptibles, leur signification est précisée par le compromis de date.

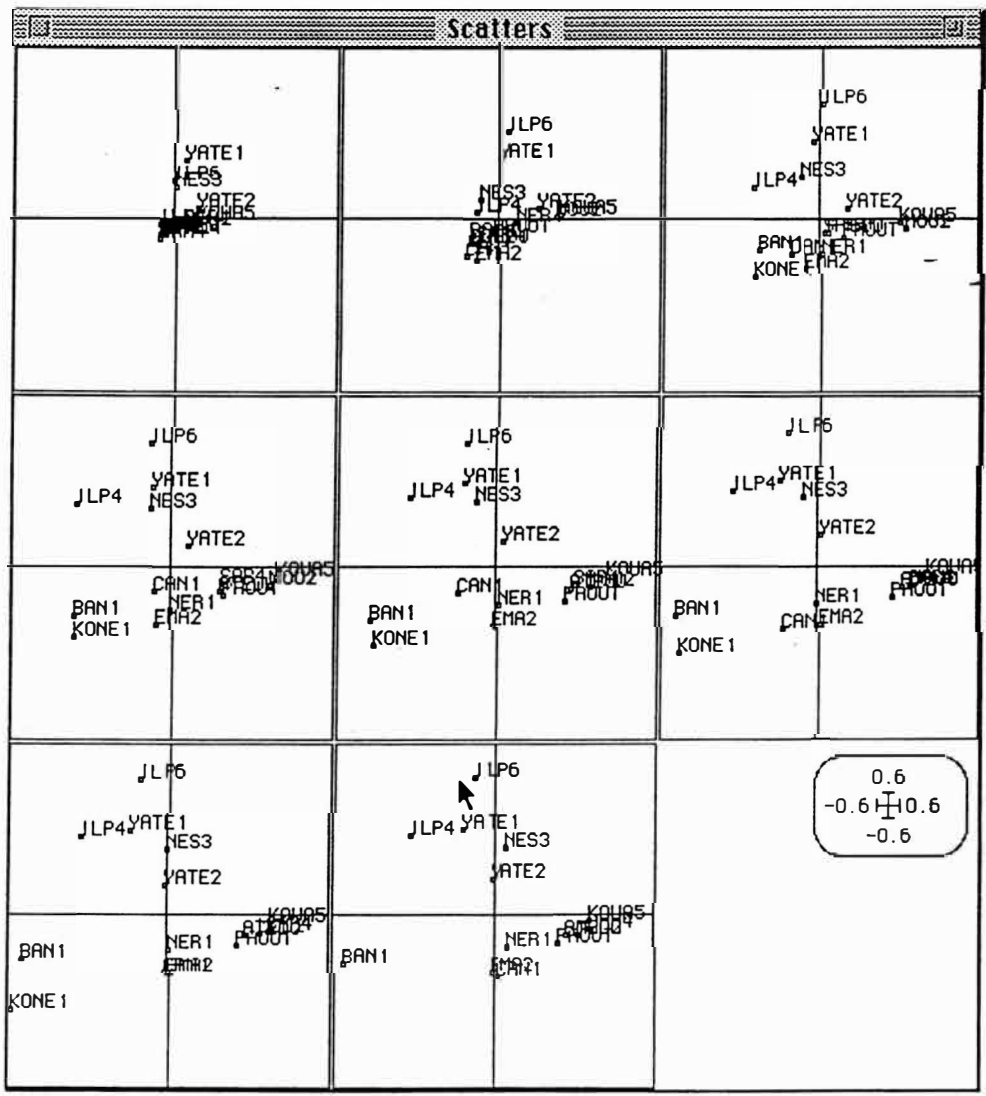


Figure 6: interstructure ; représentation par multifenestration de l'évolution des points (sites d'enquête) en fonction du temps (8 dates d'observation).

- On établit en second lieu un "compromis de date" résumant, sur un unique plan, l'effet des variables considérées dans le positionnement statistique des sites (Figure 7). Le nuage de points peut alors être partagé en sous-ensembles cohérents ayant en commun par exemple, soit de fortes infestations par l'antracnose, soit un niveau élevé de rouille, soit une forte défoliation pathologique. La divergence des trois vecteurs représentant respectivement l'antracnose, la rouille et la cercosporiose indique clairement l'indépendance de ces trois maladies et confirme la diversité des situations pathologiques au sein du dispositif d'enquête.

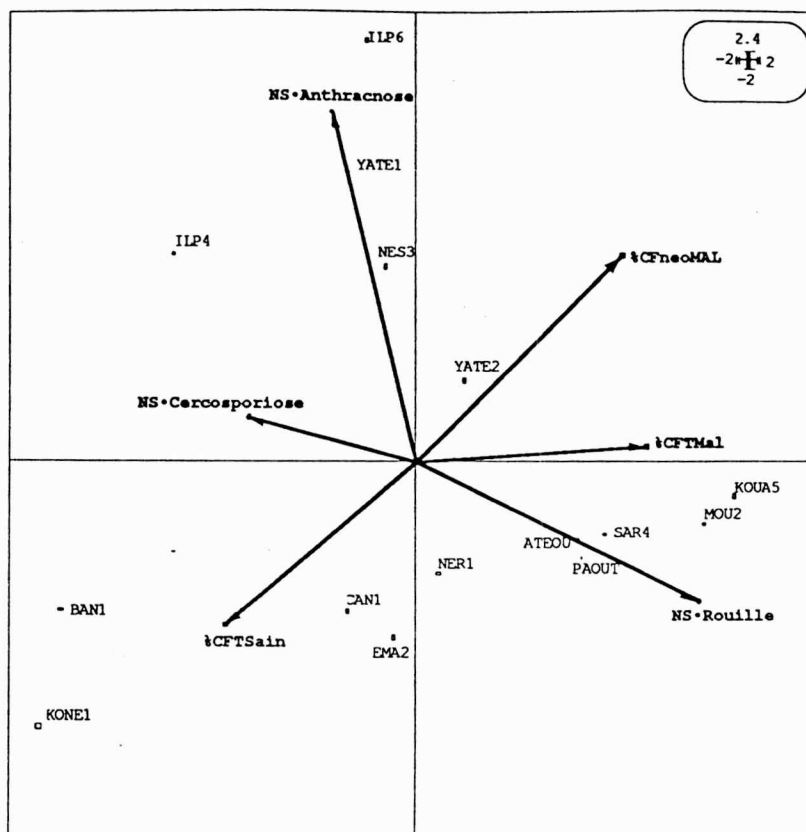


Figure 7 : superposition des 2 plans "compromis" (sites & variables pathologiques).

- En troisième lieu, la transformation des tableaux par projection de l'information initiale sur le plan compromis de date, reflète les itinéraires de déplacement des points en fonction de chacune des variables. Cette "intrastructure" donne pour chaque parcelle la chronique des dates permettant de rechercher des événements temporels marquants (Figure 8). La variable %CFneoMAL (% de feuilles devenues malades) y apparaît comme une somme (anthracnose et rouille), tandis que la variable %CFTMal (défoliation pathologique) est plus étroitement liée à la rouille. Dans les deux espaces, les trajectoires divergentes indiquent l'augmentation de la variabilité inter-stationnelle avec le développement des maladies. La variance vectorielle augmente mais la corrélation inter-variables reste modeste.

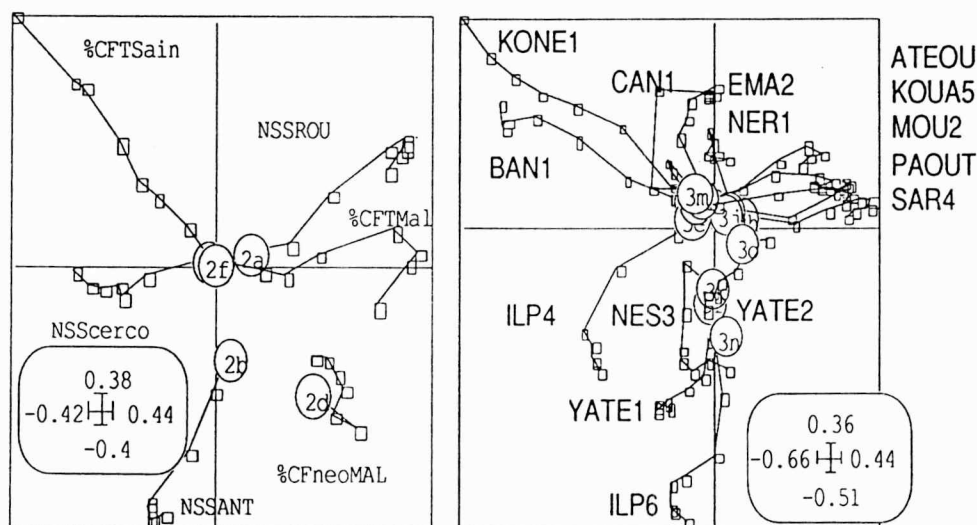


Figure 8 : analyse triadique du cube "pathologie", interstructure. Trajectoires d'évolution temporelle (8 dates) des variables pathologiques (à gauche) et des sites (à droite).

Au bilan, ces différentes étapes de l'analyse triadique aboutissent à une typologie inter-sites et inter-dates discriminant les différentes épidémies sur un cycle annuel.

#### 4) Co-structure Pathologie/Environnement : inter-relations

De façon complémentaire, il est possible d'établir la co-structures des deux "cubes" de données Pathologie et Environnement, en maximisant à chaque relevé leur covariance, puis en estimant la stabilité de la relation entre ces deux groupes de variables.

- En premier lieu, il est intéressant de suivre la mise en place de la co-structures au travers d'une double représentation des nuages de co-inertie (Figure 9). A chacune des 8 dates, la co-inertie pathologie-environnement s'exprime par une double typologie des sites, issue d'une part des descripteurs pathologiques et d'autre part des descripteurs environnementaux. Ces deux typologies peuvent être mises en relation graphiquement sur le référentiel commun que constituent les axes du compromis de co-inertie. Ceci donne une image particulièrement explicite de la mise en place progressive de la co-structure entre la variabilité "pathologique" qui augmente au cours du temps et la variabilité "mésologique" qui reste stable. Aux dates 1 et 2, la variabilité "pathologique" est très faible et il n'y a aucune correspondance. La co-structure s'installe en 3 et 4, elle est bien en place de 5 à 7 et se dégrade légèrement en 8.

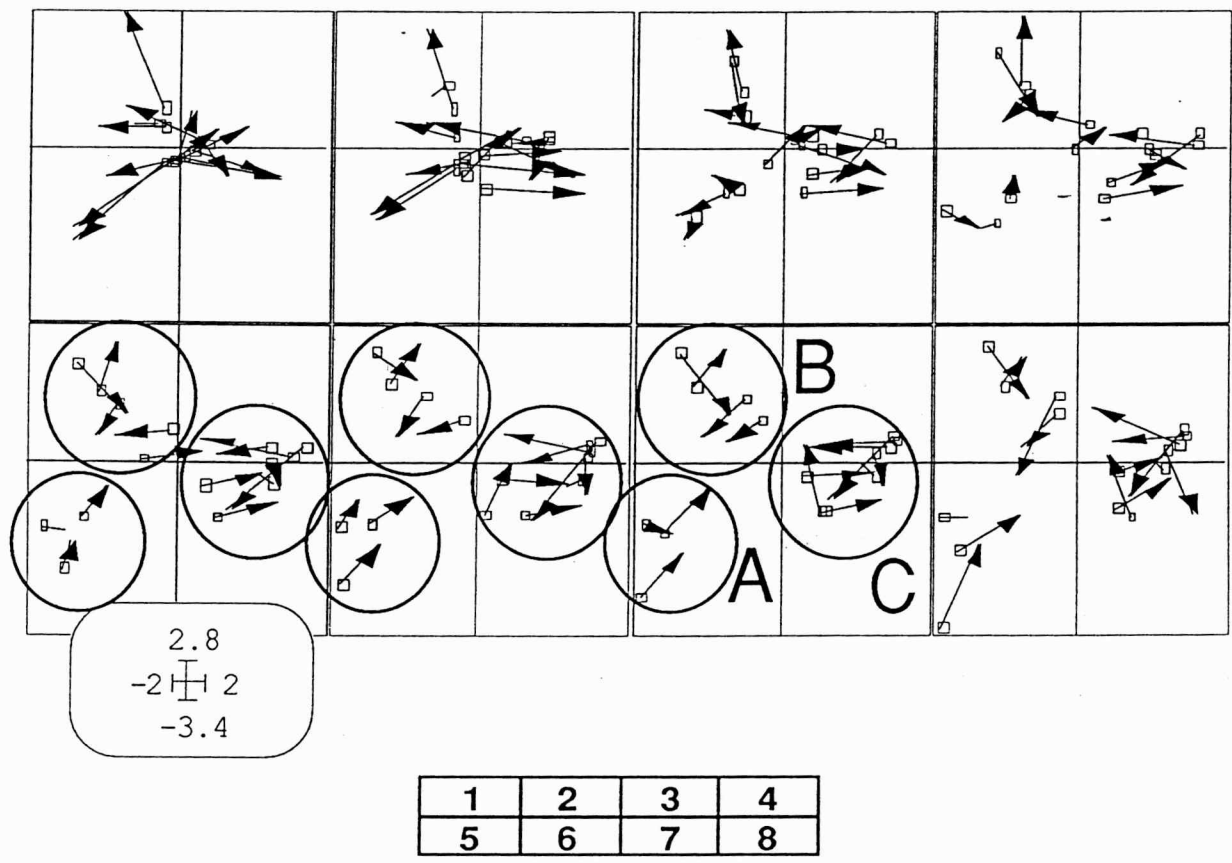


Figure 9: typologie inter-dates des sites : mise en place de la co-structure

Pour ces dates, la représentation suggère une partition des sites en trois groupes (A, B, C) définis conjointement par la nature et la gravité des pathogènes ainsi que par les caractéristiques environnementales.

Cette partition est détaillée dans la Figure 10. On perçoit dans cette disposition des stations une ordination sur l'intensité de l'attaque de la rouille croissante avec la valeur de l'axe 1. La séparation sur l'axe 2 ne porte que sur les 6 stations peu concernées par la rouille dans lesquelles on rencontre 4 situations : anthracnose sans cercosporiose, cercosporiose sans anthracnose, les deux à la fois et ni l'une ni l'autre.

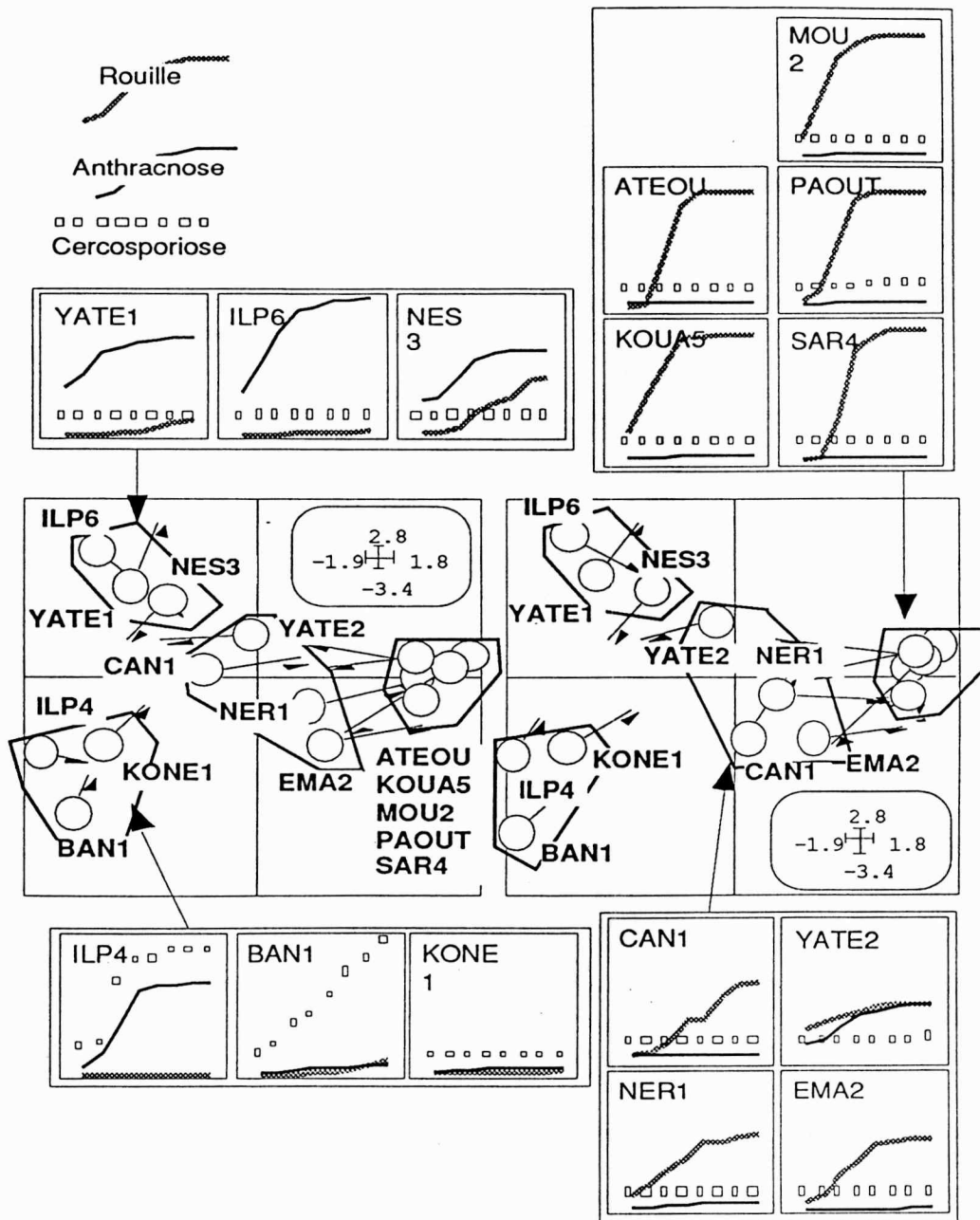


Figure 10 : compromis de co-inertie, partition des sites à l'aide des Notes Sanitaires.

- En second lieu, l'analyse de co-inertie entre les cubes de données épidémiologiques et environnementales a révélé, pour une année d'enquête donnée, des combinaisons de variables de chacun de ces tableaux qui expriment d'une part, la covariation temporelle et d'autre part, la co-structures spatiale des données (Figure 11). Les vecteurs caractérisant chaque maladie (NSanth, NSrou, NScerco) sont nettement divergents (11B) et démontrent leur indépendance respective au regard des conditions environnementales (11C).

Sur le premier axe, l'intensité croissante de l'attaque de la rouille s'exprime en valeurs positives, à l'opposé des vecteurs représentant les deux autres maladies. L'indice de défoliation pathologique (%CFTMal) apparaît fortement lié au niveau d'importance de la rouille. Le second axe sépare anthracnose et cercosporiose, mais il est avant tout lié à l'indice de défoliation physiologique (%CFTSain) qui reflète un stress des arbres. En terme de concordance pathologie-milieu, l'essentiel de l'information se retrouve sur le premier axe (11A). Les variables environnementales s'expriment dans cette analyse comme facteurs favorisant ou limitant les maladies : à titre d'exemple, l'anthracnose s'exprime préférentiellement dans des sites caractérisés par des sols mal structurés (contraintes structurales) mais fertiles, un pH élevé, une faible capacité en eau et une altitude faible.

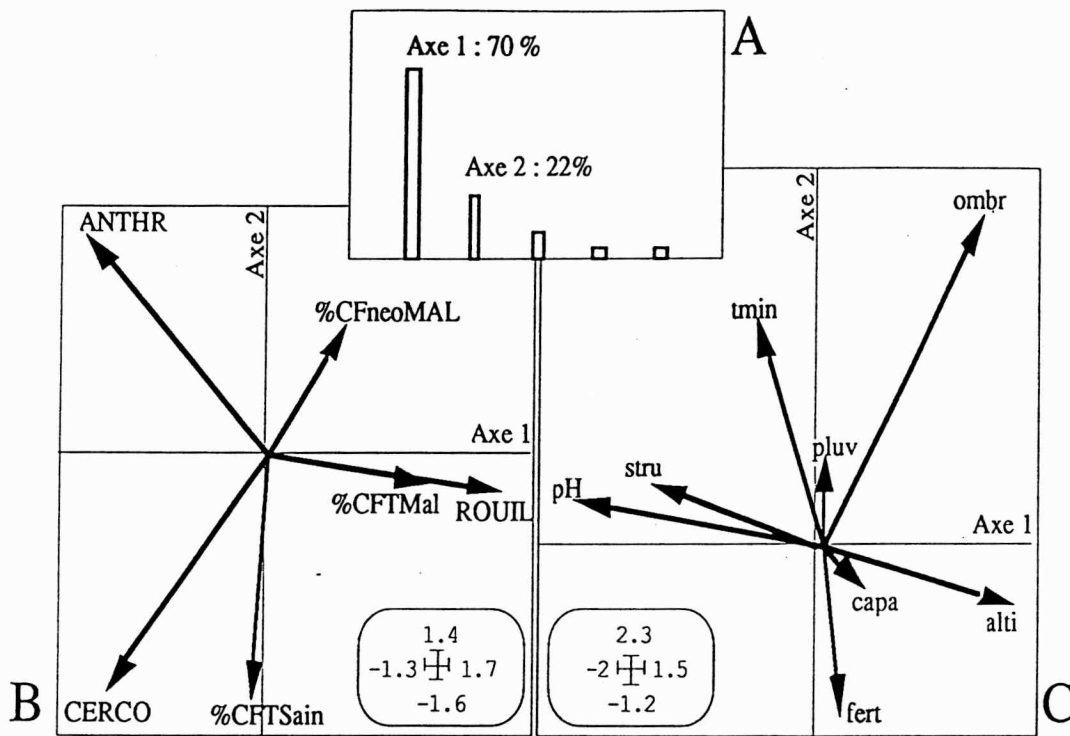


Figure 11 : co-inertie pathologie-milieu ; phase du compromis. A : histogramme des valeurs propres ; B : projection des colonnes du tableau croisé compromis (variables de pathologie) sur les axes 1 et 2 ; C : projection des lignes du tableau croisé compromis (variables de milieu) sur les axes 1 et 2.

Les lignes et colonnes de chacune des analyses de co-inertie séparées (respectivement variables environnementales et variables pathologiques mesurées à chaque visite) peuvent se projeter sur le référentiel commun formé par les axes du compromis (Figure 12) et permettent de préciser la typologie moyenne.

Du point de vue des variables pathologiques (Figure 12A), cette représentation met en évidence les dynamiques largement indépendantes des trois maladies (rouille, anthracnose et cercosporiose). Du point de vue des variables environnementales (Figure 12B), dont six sur huit sont stables dans le temps, on pourrait s'attendre à ce que leurs coordonnées dans le compromis le soient également. Ce serait effectivement le cas si l'on se limitait à la seule analyse du tableau des relevés de milieu. Mais les covariances entre variables de milieu et variables pathologiques, qui s'expriment dans les tableaux croisés de co-inertie, augmentent avec le développement des maladies et induisent une nouvelle image de la croissance, au cours du temps, de la liaison entre ces deux groupes de variables.

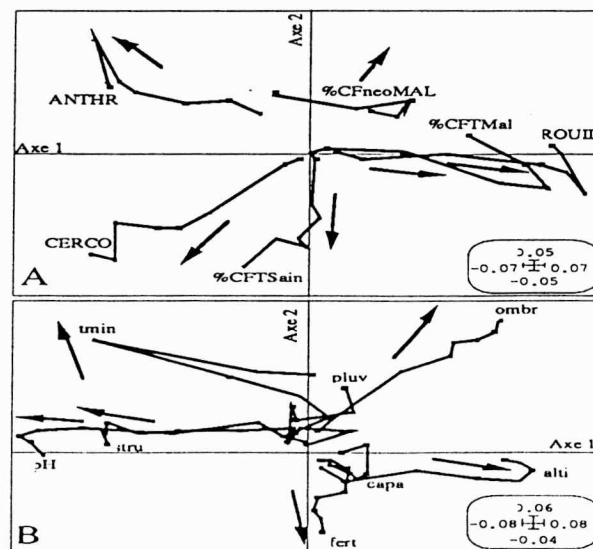


Figure 12 : co-inertie pathologie-milieu : reproductibilité de la moyenne. A : trajectoires des variables de pathologie sur le plan 1-2 du compromis B : trajectoires des variables de milieu sur le plan 1-2 du compromis.

La combinaison des facteurs environnementaux influant sur la dynamique des maladies est résumée graphiquement dans la Figure 13 qui permet d'identifier les conditions favorables à chacune des trois maladies. Ceci confirme la prépondérance des facteurs stationnels dans la régulation des maladies.

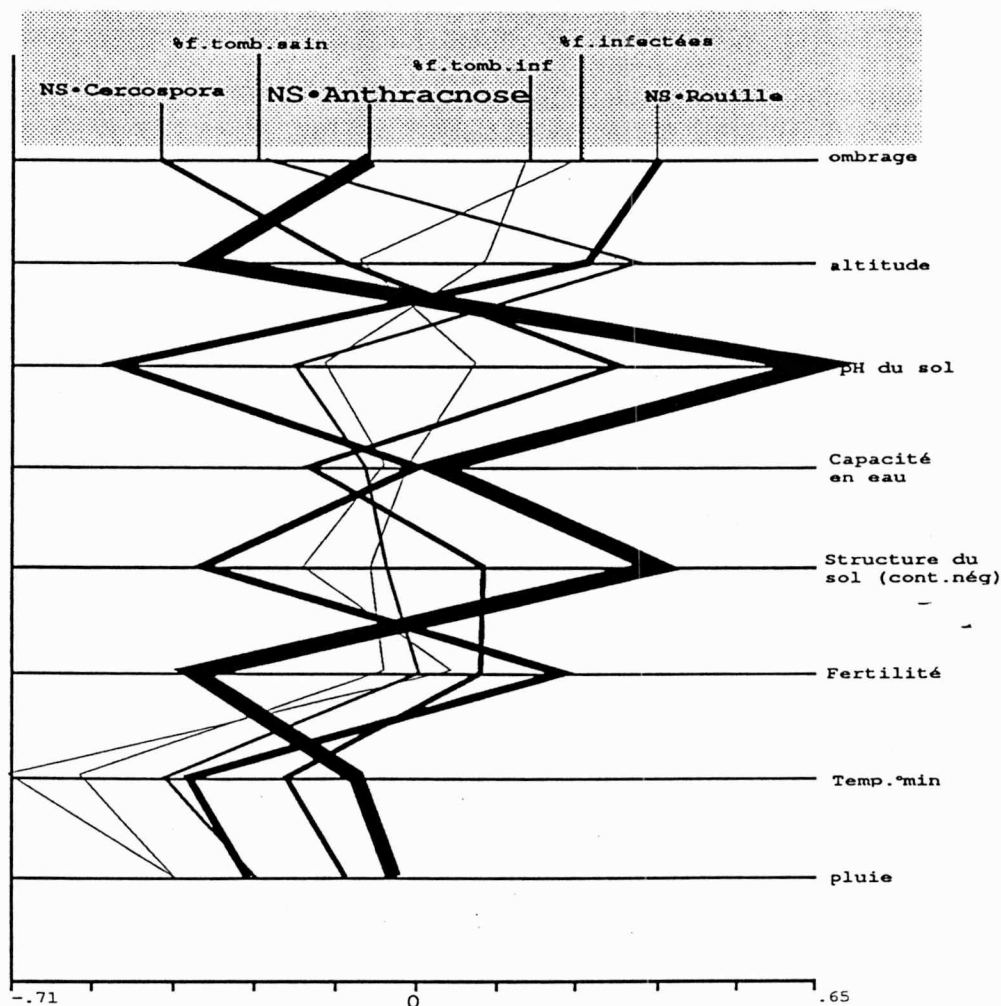


Figure 13: tableau croisé issu de la co-inertie entre Pathologie et Environnement

Dans un second temps, la comparaison des plans de co-inertie (non produits dans ce document) correspondant aux cycles culturaux successifs confirme la stabilité de ces corrélations originales :

- l'antracnose apparaît toujours fortement liée à des facteurs édaphiques tels que de fortes valeurs de pH, une mauvaise structure du sol et un faible taux d'ombrage.

- les pourcentages cumulés de mortalité des feuilles infectées et de feuilles saines ainsi que le pourcentage de feuilles devenues malades sont toujours fortement liés à des variables météorologiques (faibles précipitations, températures élevées). Par ailleurs, le taux de mortalité des feuilles saines se signale du fait de sa corrélation négative avec le taux d'ombrage.

Dans le cadre des investigations épidémiologiques ayant servi de support à cette étude, l'usage de la méthode STATICO<sup>2</sup> a permis de révéler l'existence de régulations originales exercées par l'environnement sur la dynamique des maladies du caféier. Les tendances identifiées, après co-inertie, comme étant impliquées préférentiellement dans le fonctionnement du pathosystème ont été mises à profit pour tenter de modéliser ces maladies et d'élaborer un outil de prédiction de leur développement.

<sup>2</sup> Au plan méthodologique, la flexibilité de STATICO permet de s'adapter à une grande variété de problématiques. Face à toute situation expérimentale pouvant se décrire sous la forme d'une série de  $K$  couples de tableaux, STATICO propose une vision synthétique de la co-structure moyenne sous la forme d'un compromis de co-inertie et étudie la reproductibilité de cette co-structure dans chacun des  $K$  couples de tableaux. Enfin, les nombreuses aides graphiques à l'interprétation, tirant parti entre autre du multifenêtrage par tableau, sont autant d'outils d'exploration puis d'expression synthétique des résultats.



## 5) Prédiction du risque épidémique.

\* Une première modélisation reposant sur l'analyse discriminante et le bootstrap a été effectuée sur les moyennes annuelles. Bien que des valeurs significatives aient été obtenues, cette première approche statistique n'a pas été retenue car elle ne tenait pas compte de la dynamique des maladies.

\* Les efforts se sont alors portés sur la recherche d'un outil statistique permettant de réaliser une prédiction, à la fois, du niveau de sévérité attendu pour une maladie dans un contexte donné et du type de cinétique correspondant.

Plusieurs pistes théoriques ont été explorées en collaboration avec l'Université de Lyon 1 (D. Chessel) et plus particulièrement, une adaptation de la méthode de régression PLS1 (Partial Least Squares) proposée en chimométrie et dont elle est devenue un standard méthodologique. Intitulée PLS de deuxième génération (ou PLSgen2) elle permet d'expliquer simultanément plusieurs variables à partir d'un ensemble de variables explicatives. Cette nouvelle analyse, plus stable que la régression multiple (bien qu'elle autorise des analyses sur un petit nombre d'individus) constitue une méthode itérative optimisant la cohérence des coefficients de régression avec les corrélations. Sa définition théorique et son mode d'utilisation ont fait l'objet de notices détaillées qui, depuis leur incorporation à la programmathèque d'ADE-4 en juillet 1997, sont accessibles sur Internet.

Après une phase de conception théorique et informatique, l'application pratique de la PLSgen2 aux données épidémiologiques du caféier devait répondre aux questions suivantes :

- Y a-t-il effectivement possibilité de prédictibilité simultanée des trois pathologies ?
- Est-on dans une situation de PLS1 (si les pathologies distinctes sont des processus indépendants, chacune doit être modélisée pour son propre compte) ou de PLS2 (si les pathologies distinctes sont des composantes associées d'un état sanitaire globalement sous la dépendance des paramètres externes).
- Y a-t-il un modèle commun ou plusieurs modèles spécifiques ?
- Si ce modèle commun existe, utilise-t-il une ou plusieurs composantes explicatives ?

Au terme des analyses, des éléments de réponse ont été apportés à ce questionnement scientifique :

- la PLSgen2 prédit la contrainte pathologique globale (3 maladies confondues) au travers des seuls facteurs mésologiques. A titre d'exemple, pour l'année 1992, la variance expliquée par la PLSgen2 est de 87%.
- l'adjonction des variables "dégâts" (% de mortalité) réduit la qualité de la prédiction.
- la comparaison des résultats de PLSgen2 (tous pathogènes confondus) et PLS1 (pour chaque pathogène, successivement) est édifiante. On ne gagne rien à globaliser les maladies, car chacune est un processus devant être modélisé séparément. Il s'agit de modèles additifs et, comme cela est suggéré par les calculs de durée moyenne du cycle infectieux (cf page 20), il n'existe pas de réelle synergie entre les pathogènes.

Au bilan, les PLS (1 ou 2) permettent d'établir des équations définissant le niveau des maladies en fonction du poids relatif des variables environnementales identifiées par la Costructure, mais à ce jour, ces équations demeurent spécifiques de chaque ronde. Donc, en l'état, elles ne semblent pas convenir pour une véritable prédiction car le poids relatif de chaque variable environnementale fluctue ronde après ronde. Il faudrait mettre au point une PLS "synthétique" représentant un compromis des PLS mensuelles, voire annuelles.

En tout état de cause, si la PLSgen2 n'apporte pas directement de résultats concluants en matière de pathologie du caféier, en revanche, il se pourrait que dans le cas d'une autre culture, il y ait synergie entre les pathogènes et qu'alors ce nouvel outil soit utilisable pour aborder globalement la contrainte pathologique.

## 6) Modélisation de la cinétique de maladie

L'usage de la PLS se révélant être une impasse, une autre voie a été explorée en tenant compte des spécificités des maladies du caféier en NC :

- indépendance de comportement entre les maladies, effet stationnel majeur, diversité des signatures épidémiques, etc.
- caractère annuel (au plan pathologique) de cette culture pérenne. En effet, les feuilles, qui sont le support de l'infection de ces pathogènes, sont soumises à un cycle annuel qui se termine par la défoliation physiologique. De ce fait, le patrimoine de feuilles est renouvelé chaque année et par voie de conséquence, l'inoculum résiduel est minimal voire nul en début de cycle (Figure 14).

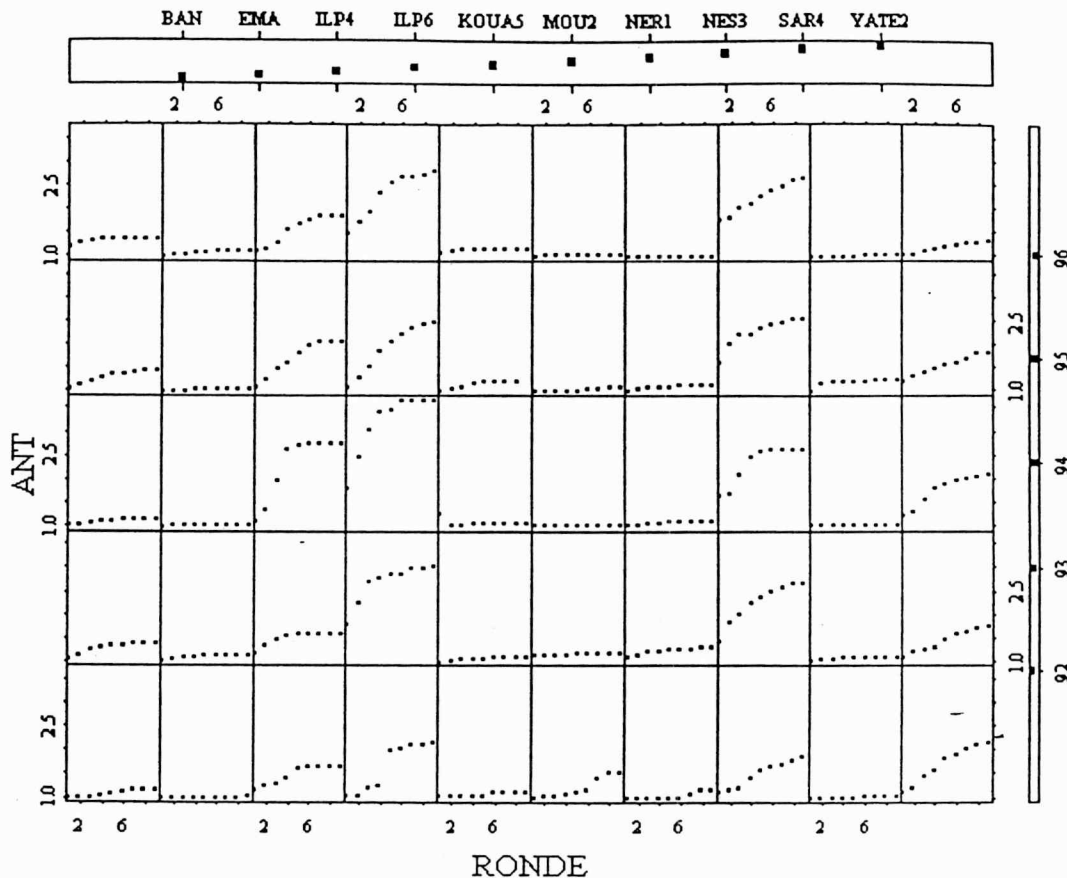


Figure 14: représentation des cinétiques d'anthraxose pour 10 sites, observés 9 fois par an, durant 5 années.

Comme la logique de développement de la maladie est annuelle et stationnelle, tout site suivi pendant une année peut faire l'objet d'une modélisation du triplet constitué par les 3 paramètres définissant une courbe de notes sanitaire : K (niveau de sévérité maximale atteint par la maladie), r (taux d'accroissement de maladie ou pente de la courbe) et de tm (précocité de développement de l'épidémie).

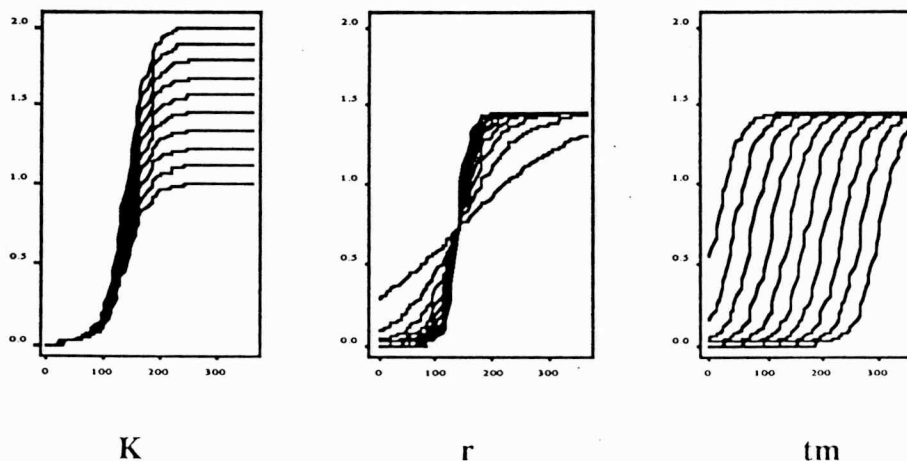


Figure 15 : paramètres définissant une courbe de Note Sanitaire.

Après essais de différents modèles, l'ajustement du modèle logistique sur ces données s'est révélé très satisfaisant dans la presque totalité des cas (Figure 16).

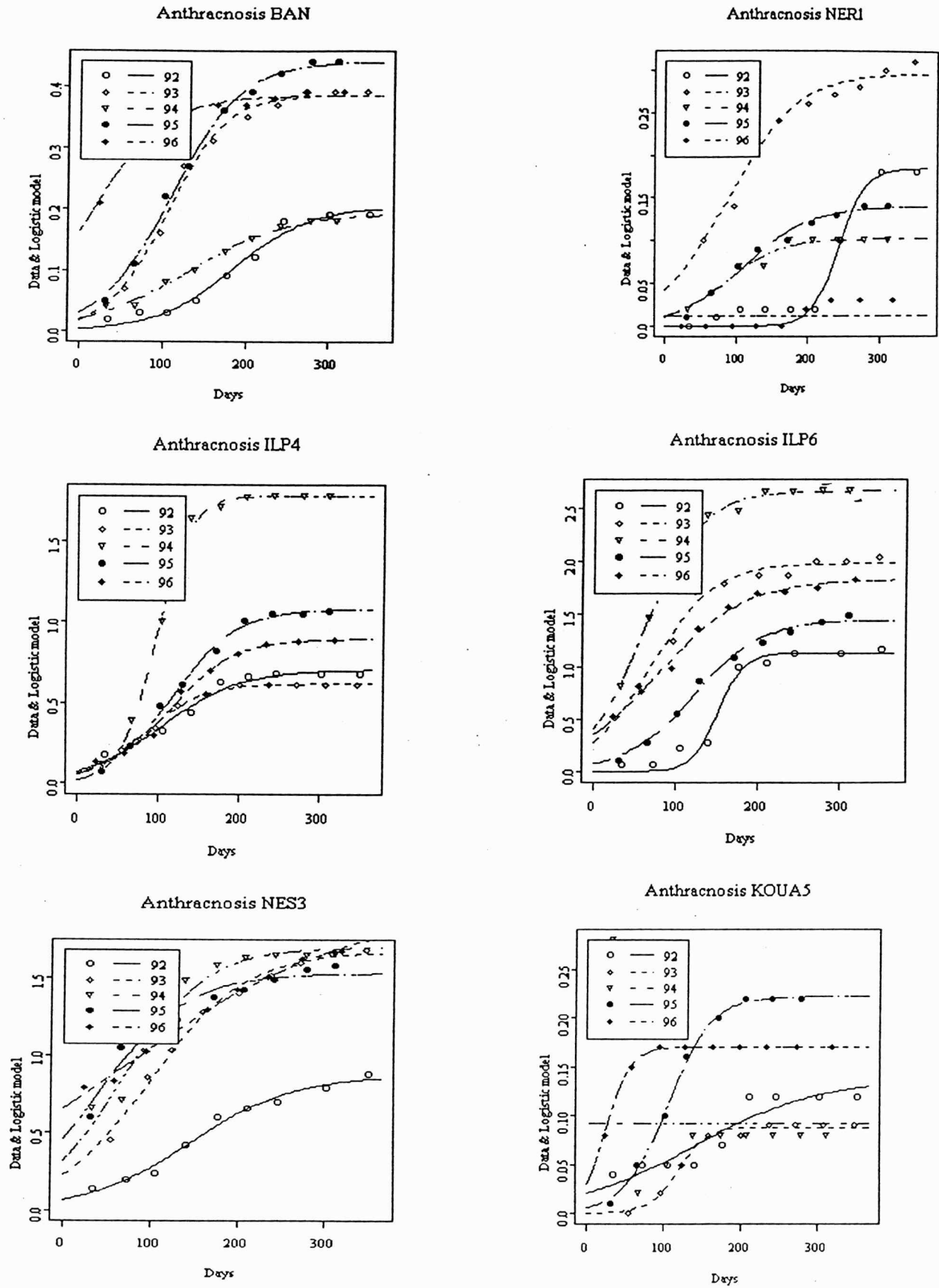


Figure 16: modélisation -par ajustement du modèle logistique- des cinétiques annuelles de *illetotrichum* (en abscisse, la date d'observation en jours ; en ordonnée, la valeur de la note sanitaire).

Pour préciser le déterminisme des évolutions pathologiques, on considère que le nom des sites d'enquête ainsi que l'année considérée constituent deux variables qualitatives ayant respectivement 10 et 5 modalités. Dès lors, une analyse de variance standard des trois variables "maladies" sur les deux types d'effet (stationnel ou annuel) rend compte d'importantes différences entre les trois maladies :

	Effet	K	tm	r
ANTHRACNOSE	stationnel	0,01	41,75	36,79
	temporel	41,64	0,05	51,45
ROUILLE	stationnel	0,01	1,38	0,01
	temporel	41,64	0,05	21,44
CERCOSPORIOSE	stationnel	0,001		0,001
	temporel	12,6		13,53

En ce qui concerne l'antracnose, la probabilité de F correspondant au paramètre K est très significative (0.01%), ce qui indique que ce paramètre est d'ordre stationnel ; en revanche, le paramètre tm est annuel (0.05) et le paramètre r n'a pas de signification spatio-temporelle. A titre indicatif, on notera que les trois paramètres décrivant la cinétique de la rouille ne varient qu'en fonction du site (les valeurs pour K, tm & r, sont inférieures à 5%). Pour la cercosporiose, les paramètres déterminés (K et r) ne sont que d'ordre stationnel.

En tout état de cause, ces résultats reflètent une situation très particulière quant aux liens entre pathologie et contexte écologique. Au plan théorique, des travaux sont en cours pour faire la synthèse de ces divers modèles annuels et obtenir un outil de prédiction des maladies.

## COMPLÉMENTS BIOLOGIQUES

Les précédents résultats épidémiologiques définissent un schéma fonctionnel du pathosystème "caféier" avec en particulier, la hiérarchisation des facteurs environnementaux influant sur le comportement parasitaire. Au terme de cette première phase des recherches, on pouvait considérer que les grandes tendances régissant le fonctionnement du pathosystème caféier étaient identifiées.

Cependant, devant l'hétérogénéité du comportement de certains arbres dans un même site et au vu des fluctuations annuelles des cinétiques épidémiques de certains sites, il est apparu indispensable de détailler ces mécanismes épidémiques en quantifiant la part de variabilité imputable à :

- la diversité génétique des populations d'agents pathogènes, afin de savoir si les différences d'infestations constatées *in situ* reflètent des différences de pouvoir pathogène de l'agent causal,
- la diversité génétique des arbres, ceci ayant pour conséquence une plus ou moins forte sensibilité aux maladies,
- une hétérogénéité édaphique intrasite pouvant entraîner des variations de comportements des arbres.
- une possible infestation des sols en nématodes phytoparasites, susceptible d'affecter gravement la physiologie du caféier.

Ces études biologiques complémentaires contribuent à la cohérence des approches épidémiologiques, avant d'aborder la phase de synthèse (cf. Figure 1). Mais dans le cadre de ce rapport d'ATP, il ne sera fait état que de ce qui concerne l'antracnose.

### 1) Structure génétique des populations de *Colletotrichum gloeosporioides*

L'étude de la diversité génétique de *C. gloeosporioides* a été initiée afin de quantifier la variabilité génétique des souches présentes dans les différentes plantations de caféiers de la région Pacifique Sud et d'apprécier la structuration de leurs populations. Les études préliminaires ayant porté sur un petit nombre de souches de Nouvelle Calédonie, en utilisant trois techniques différentes (analyse d'isoenzymes, groupes de compatibilité végétative et RAPD), ont permis de mettre en évidence l'existence d'un polymorphisme important que nous avons cherché à quantifier plus précisément en augmentant l'échantillonnage initial.

L'échantillonnage a donc été conduit dans six sites différents, mais tous ayant subi des attaques importantes de *C. gloeosporioides*. Le choix de ces sites a permis de se placer à trois échelles géographiques différentes : une échelle locale avec quatre sites en Nouvelle-Calédonie (Yaté, Bangou, Nessadiou et l'île des Pins), deux échelles régionales en incluant un site aux Vanuatu (île de Tanna) et un site en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Jolamuna). Entre vingt et trente souches ont été isolées dans chaque site, généralement dans une seule et même parcelle (sauf pour l'île des Pins où les souches proviennent de deux parcelles distinctes).

Des problèmes lors de la purification des cultures et de l'extraction de l'ADN ont réduit l'échantillonnage de quelques populations (Bangou : 13 souches ; Jolamuna : 15 souches), sans pour autant interdire une analyse populationnelle. Celle-ci a été réalisée sur la base de l'analyse du polymorphisme des fragments d'ADN amplifiés par la technique RAPD. Plusieurs amorces avaient déjà été sélectionnées lors de l'étude préliminaire, nous en avons testé d'autres. Finalement, trois d'entre elles ont été retenues pour la facilité de lecture qu'elles permettaient : OPF 3, OPF 9 et OPF 10 (Planche 1). Au total, 38 fragments ainsi amplifiés, tous polymorphes, ont été sélectionnés.

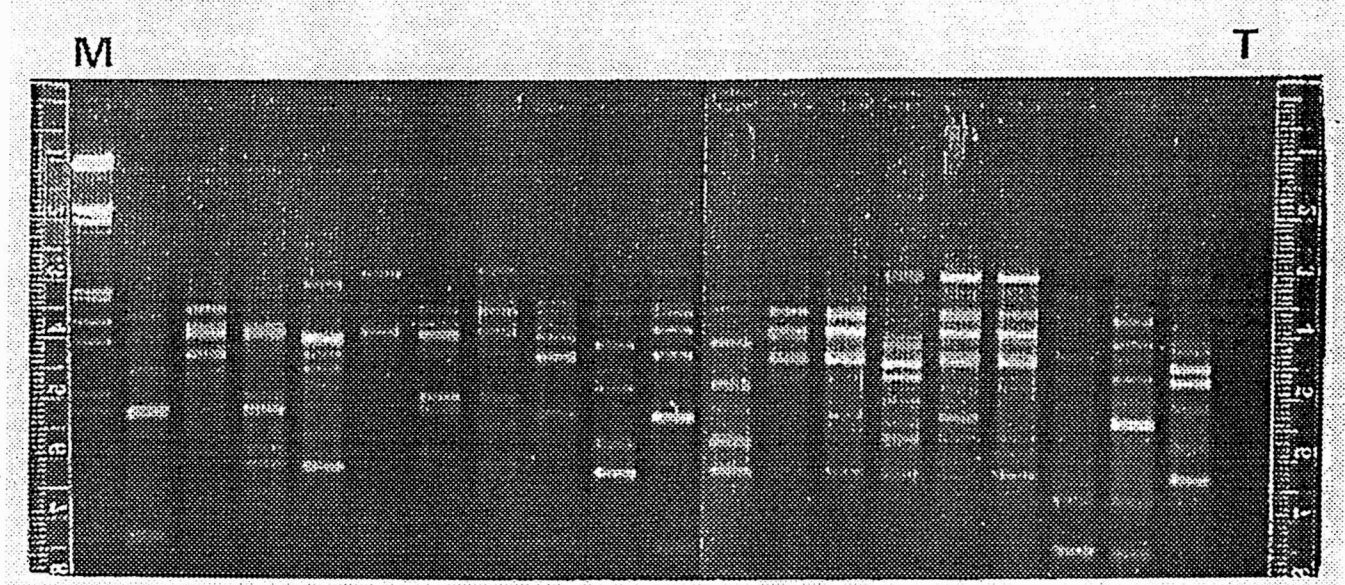


Planche 1 : Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce OPF 10 sur PHC-3 (Techne).  
M = marqueur de poids moléculaire ; T = témoin négatif.

Ils ont permis de construire un dendrogramme UPGMA qui a révélé une diversité haplotypique considérable (Fig. 17). Pratiquement chacune des 123 souches étudiées représentait un haplotype singulier. Seuls trois haplotypes étaient représentés par plus d'une souche (l'un représenté par six souches, les deux autres par deux paires de souches, toutes provenant de la même population : Yaté).

Ce dendrogramme ne montre pas une structuration géographique forte. Néanmoins, trois populations (Yaté, Jolamuna et Bangou) ont l'essentiel de leurs souches regroupées sur des branches voisines, indiquant un certain niveau de structuration de cette diversité haplotypique. La diversité allélique est élevée dans l'ensemble de l'échantillonnage (indice de Nei :  $H=0,32$ ) ainsi que dans chacune des six populations ( $0,15 < H < 0,31$ ).

L'analyse de la structuration de cette diversité entre les différentes populations a été abordée avec des outils plus fins de génétique des populations. L'index de Wright ( $F_{st}$ ) global a été estimé à 0,27, indiquant une très forte structuration, contrairement à ce que pouvait laisser penser l'analyse du dendrogramme. Dans le détail, trois populations se révèlent être particulièrement et très significativement (du point de vue statistique) différenciées de toutes les autres : Yaté, Bangou et Jolamuna. En revanche, les trois autres populations (Nessadiou, île des Pins et Tanna) ne semblent pas différenciées entre elles, comme si elles formaient une seule et même population.

Enfin, aucun déséquilibre de liaison n'a été détecté. Ceci nous a conduit à envisager un taux élevé de recombinaison génétique, qui pourrait être obtenu par reproduction sexuée comme hypothèse explicative de cette importante diversité génétique.

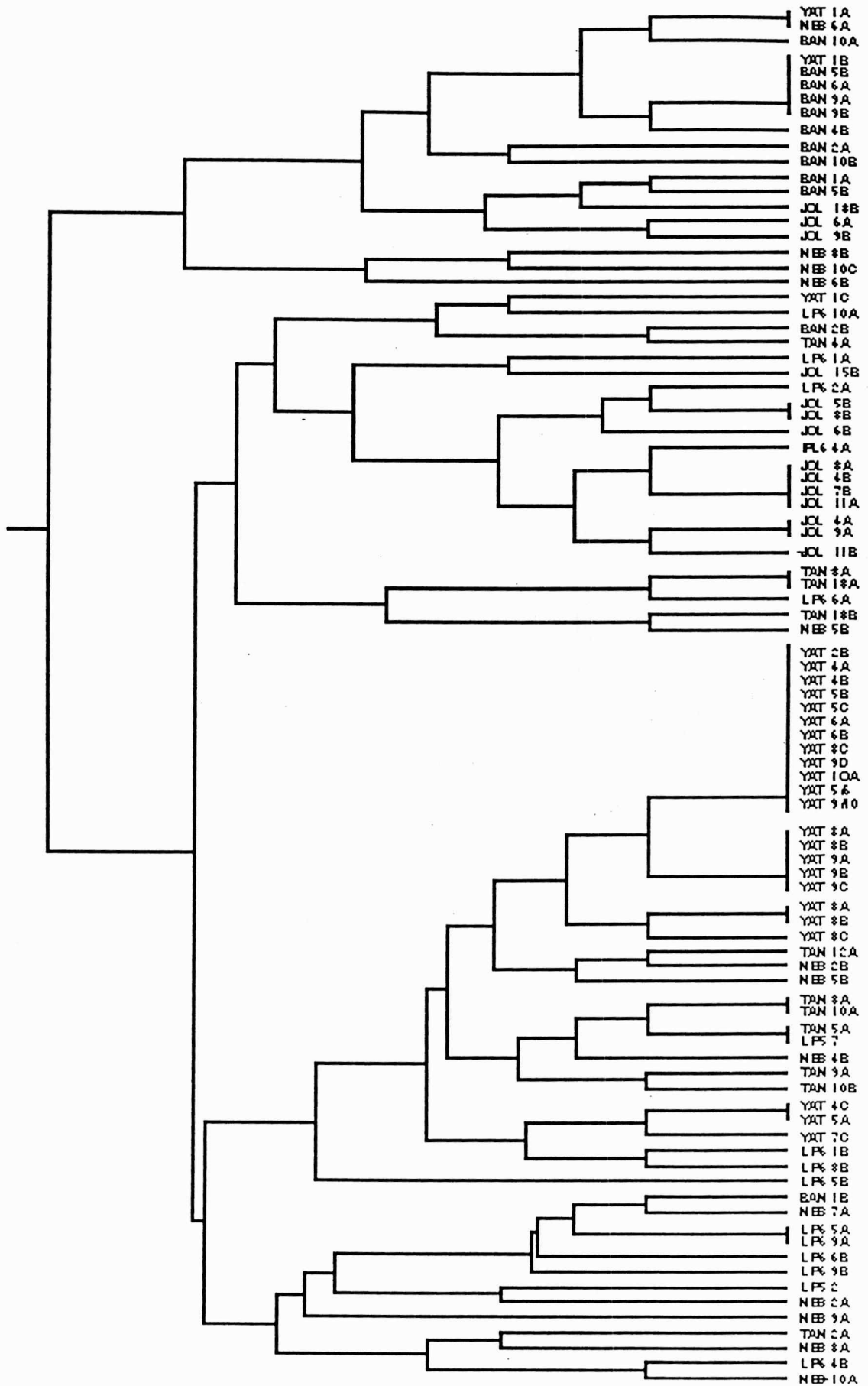


Figure 17 : dendrogramme UPGMA des souches de *C. gloeosporioides*

Cette conclusion est remarquable dans le sens où la forme sexuée n'est que rarement sur le terrain. Etant donné que *C. gloeosporioides* possède près de 600 espèces d'hôtes différentes, on peut supposer que la reproduction sexuée a lieu sur un autre hôte que le caféier. On peut éventuellement rechercher la forme sexuée dans des endroits plus atypiques, à savoir la litière de feuilles de caféiers.

## 2) Recherche d'une méthode d'infection artificielle

Le développement du champignon est classiquement caractérisé par deux phases essentielles : une phase de croissance végétative où d'abondantes fructifications asexuées (spores) sont regroupées dans les acervules et une phase de fructification sexuée caractérisée par des périthèces (forme parfaite *Glomerella cingulata*). Ces derniers constituent également une forme de conservation du champignon. *In situ*, l'inoculum est constitué soit de mycélium, soit de spores. Cet inoculum est soit déjà présent dans les débris de plante ou dans le sol, soit transporté passivement par des agents tels que le vent, les gouttes de pluie, les insectes etc... La pénétration du pathogène dans les tissus de l'hôte peut s'opérer de façon mécanique (appressorium & pique de pénétration), par les blessures (cassure ou érosion éolienne, chaleur, insectes, nématodes, pratiques culturales, ou encore blessures occasionnées par d'autres pathogènes) ou par les stomates.

Les conditions de l'installation et de la progression du pathogène demeurent inconnues. En terme de relations entre les développements épidémiques et les conditions environnementales (Bailey et Jeger 1992), on peut noter que

- sur avocatier, un lien a été mis en évidence avec la pluie
- sur citrus, les périodes de fortes pluies correspondent aux périodes à fortes incidences pathologiques. Il a été démontré que les intensités de maladie étaient maximum quand les fortes pluies étaient suivies de périodes prolongées de fortes humidités (rosée).
- sur manguier, l'optimum d'infection est obtenu quand la température se maintient dans une fourchette de 10 à 30°C et que l'humidité relative reste supérieure à 95%.
- sur stylosanthes, 12 à 24h d'eau libre et une température comprise entre 20 et 30°C sont considérées comme des conditions idéales pour le déclenchement des infections. En Colombie, il a été démontré que des fluctuations thermiques quotidiennes de 18°C sont susceptibles de favoriser la progression de la maladie.

Ces quelques indications ont été mises à profit pour tenter d'élaborer une méthode d'infection artificielle permettant l'analyse et la comparaison du pouvoir pathogène des souches de *Colletotrichum*. Une synthèse bibliographique des différentes procédures (Tableau 1) a été réalisée puis, différents types d'essais ont été conduits au laboratoire, avec en général peu de succès :

- Conditions optimales de germination et de croissance.

Il s'est avéré que, paradoxalement, le maintien en immersion des conidies inhibait leur germination. De ce fait, l'optimum de germinations des spores et de croissance des tubes germinatifs a été obtenu par immersion des conidies pendant 18h suivi d'un séchage progressif. Par ailleurs, la concentration optimale d'une suspension de conidies semble se situer à  $10^8$ /ml, alors qu'à  $10^9$ /ml, l'inhibition de la germination est complète. Enfin, la température (20 ou 24°C), n'induit pas de différence significative.

- Tests d'inoculation.

Ceux-ci ont été réalisés à la fois sur plante entière avec diverses modalités (jeunes et vieilles feuilles, face inférieure ou face supérieure, spores et mycélium) et sur feuilles en survie (face inférieure, conidies ou mycélium, chocs thermiques jour-nuit, traumatismes par piqûres, scarifications, comparaisons de provenances différentes et de caféiers de sites différents).

Tous ces essais ont été soit négatifs soit non reproductibles. Ceci indique qu'un ou plusieurs éléments majeurs conditionnant le déterminisme de la germination et de la pénétration de l'hyphe mycélienne n'ont pu être cernés. Des essais complémentaires sur gamme d'hôtes (melon, pois, tomate et concombre) ont également aboutis à des échecs. En revanche, des essais de phytotoxicité ont révélé, après trempage du système racinaire de plantules de tomates dans du filtrat de culture de *Colletotrichum*, un flétrissement visible jusqu'à une dilution au 1/100.

AUTEURS	LOURD (1982) <i>C. gloeosporioides</i>			MINUCCI et al. (1985) <i>C. coffeanum</i>		VAN VOSSEN et al. (1976-1979) <i>C. coffeanum</i>			
	essai 1	essai 2	essai 3	essai 1	essai 2	essai 1	essai 2	essai 3	essai 4
<b>MATERIEL VEGETAL</b> nature - plants in vivo - plants in vitro - feuilles isolées - baies - bourgeons âge - stade immature - stade mûr blessure	+	+	+		+	+			
<b>INOCULUM</b> suspension de conidies : 10 <sup>6</sup> /ml suspension de conidies : 10 <sup>7</sup> /ml broyât de culture	+	+	+			+			
<b>TECHNIQUE D'INOCULATION</b> pulvérisation piqûre de la gaine foliaire piqûre de la tige dépôt de goutte badigeonnage	+	+	+			+		+	+
<b>INCUBATION</b> environnement - serre - chambre climatisée - sac de cellulose - éponge humide - enceinte close durée température humidité luminosité	+		+	+	+				+
<b>APPARITION DES SYMPTOMES</b>	1 à 2 sem.	1 sem.	10 jours				15 jours	6 jours	2 sem.

Tableau 1 : Synthèse bibliographique des méthodes d'inoculation artificielles employées avec *Colletotrichum* sp.



AUTEURS	HINDORF (1975) "indéterminé"	BOMPARD (1994) <i>C. coffeanum</i>	GEIGER et al. (1980) <i>C. graminicola</i>	FABRE (1992) <i>C. lindemuthianum</i>
<b>MATERIEL VEGETAL</b> nature - plants in vivo - plants in vitro - feuilles isolées - baies - bourgeons âge - stade immature - stade mûr blessure		+	+	+
<b>INOCULUM</b> suspension de conidies : $10^6$ /ml suspension de conidies : $10^7$ /ml broyât de culture	+	+	+	+
<b>TECHNIQUE D'INOCULATION</b> pulvérisation piqûre de la gaine foliaire piqûre de la tige dépôt de goutte badigeonnage		+	+	+
<b>INCUBATION</b> environnement - serre - chambre climatisée - sac de cellulose - éponge humide - enceinte close durée température humidité luminosité	16° à 27°C	24h 20°C obs.24h puis ph.12h/12h	3 jours 25°C	19°C ph. 12h/12h
<b>APPARITION DES SYMPTOMES</b>	5 jrs à 3 sem.	7 à 15 jours	8 à 15 jours	6 jours

Tableau 1 : Synthèse bibliographique des méthodes d'inoculation artificielles employées avec *Colletotrichum* sp.

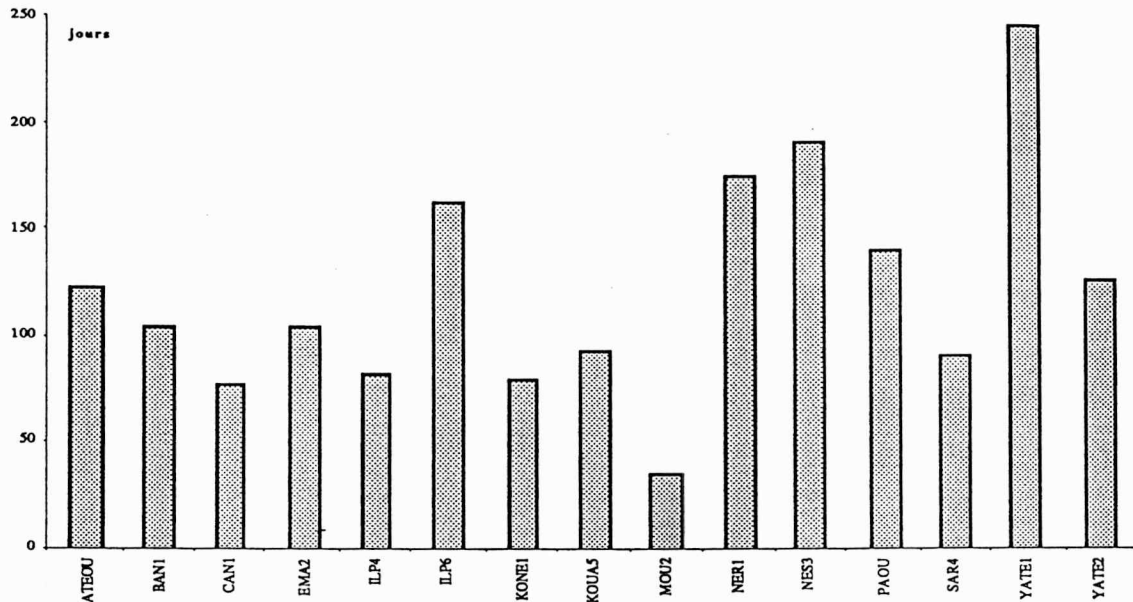


Figure 19 : durées de cycles infectieux dans les sites attaqués par *Colletotrichum* (1993)

Sur cette base, un indice d'aggravation a été calculé (Figure 20). Il représente l'expression du pouvoir pathogène dans chaque site. Les valeurs élevées de cet indice (BAN1, ILP6, ...) caractérisent les sites où *C. gloeosporioides* est particulièrement agressif.

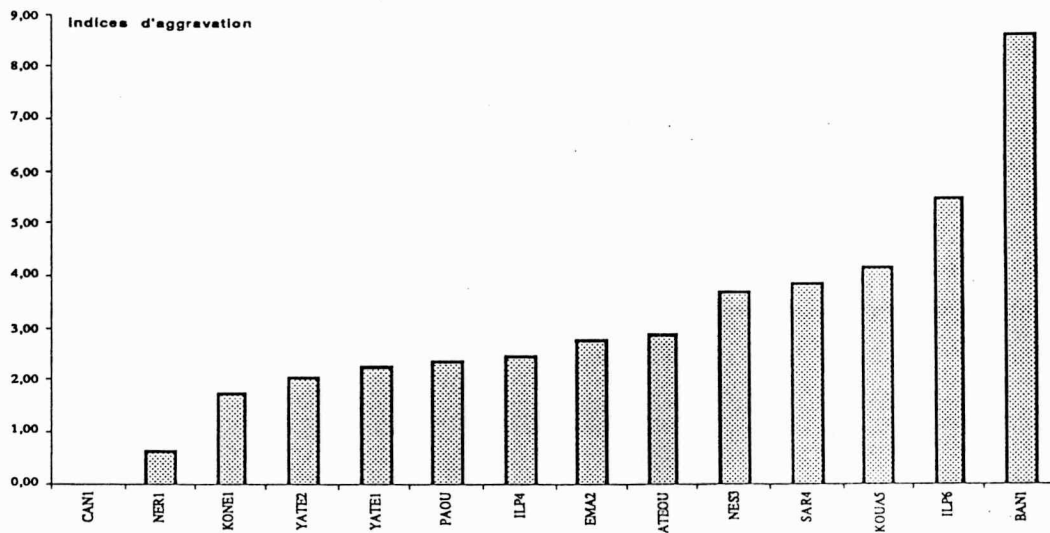


Figure 20 : comparaison des aggravations de maladie dans les sites infestés par *Colletotrichum*.

#### 4) Prise en compte de la diversité de l'hôte

L'examen intra-parcelle du comportement des arbres révèle des différences de sensibilités (Figure 21). Ces variations peuvent être imputables soit à une diversité génétique des arbres<sup>3</sup> soit à une éventuelle hétérogénéité édaphique (reflétée par les pédocomparateurs). Pour préciser cette situation, des sous-fichiers catégoriels sont actuellement en cours d'analyse.

D'une année à l'autre, les notes sanitaires varient peu, révélant de fait que la sensibilité de l'hôte et l'agressivité du pathogène sont relativement constantes, et ce malgré les aléas climatiques.

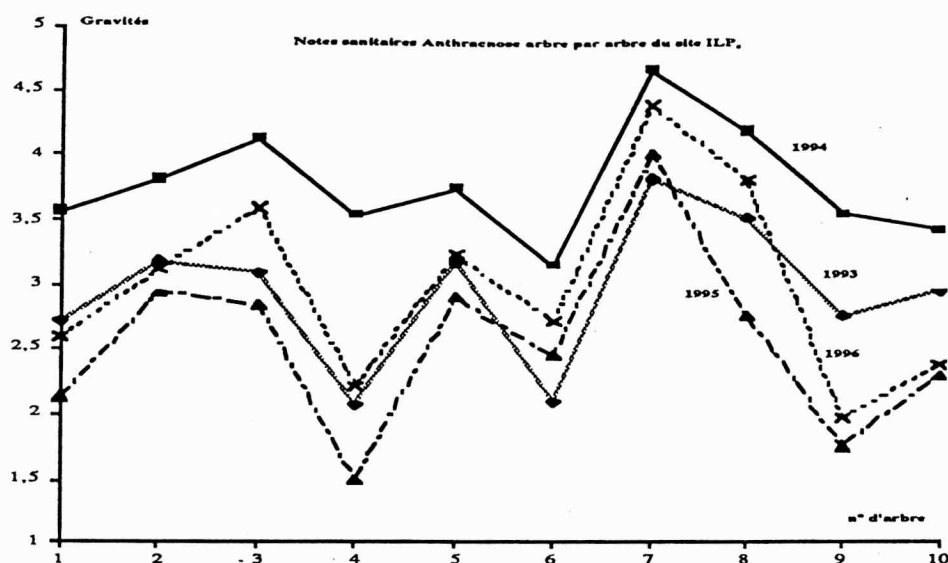


Figure 21 : comparaison pluriannuelle des valeurs de Note Sanitaire (moyenne des infections sur 4 rameaux) correspondant aux 10 arbres suivis dans un site donné.

Cette homogénéisation par sous-fichiers catégoriels est un facteur de clarification qui, après agrégation à l'ossature du modèle, permettra d'augmenter aussi bien les coefficients de corrélation entre les caractéristiques pathologiques et environnementales, que le taux de résolution des prévisions du niveau de sévérité des attaques fongiques sur caféier.

## CONCLUSIONS

Dans le cadre des investigations menées en Nouvelle-Calédonie sur le pathosystème multiple inféodé au caféier, de nombreuses informations ont été obtenues sur la biologie et l'épidémiologie des pathogènes étudiés. Dans le cadre de l'ATP consacrée au genre *Colletotrichum* en zones tropicales, il a été possible de répondre à certains des objectifs fixés aux équipes de recherche.

La majeure partie des travaux réalisés à Nouméa concerne l'étude de la dynamique spatio-temporelle des épidémies. En matière d'antracnose, la distribution, la pérennité et la sévérité des attaques de ce pathogène ont été précisées pour la zone caféicole. Les infections foliaires sont les plus fréquentes et constituent, dans certains cas, une contrainte significative pour la croissance des caféiers. Le phénomène de die-back concerne certains sites dans lesquels, au terme d'un cycle culturel donné, la proportion de rameaux morts est considérable. Bien que *Colletotrichum gloeosporioides* ait pu être fréquemment isolé de ces lésions apicales, les observations épidémiologiques permettent de relier la mortalité de ces rameaux aux perturbations (d'ordre nutritionnel ?) consécutives aux sévères défoliations pathologiques provoquées par les attaques de rouille. De même, dans les conditions néo-calédoniennes, les attaques sur baies ne précèdent que de peu le dépérissement des rameaux porteurs : dans ce cas, il y a donc lieu de penser que la contrainte pathologique sur les baies est peu fréquente.

Il est paradoxal de constater que les inter-relations entre pathogènes, au sein du pathosystème multiple, sont réduites. Les données obtenues sur les cas (fréquents au demeurant) de co-infections infirment une action synergique sur la progression de la maladie : quels que soient les pathogènes considérés, et quel que soit l'ordre d'apparition sur un organe foliaire, la durée de cycle infectieux n'est pas significativement modifiée pour autant.

A ce propos, on retiendra que l'agressivité du *Colletotrichum* à l'égard des feuilles de caféier est apparue relativement faible. A titre d'exemple, dans certains sites, des feuilles fortement infestées par ce pathogène (note sanitaire 4 ou 5, soit plus de 50% de surface foliaire nécrosée) parviennent chaque année à survivre pendant plusieurs mois.

Ce type de comportement *in situ* peut être rapproché des nombreuses tentatives infructueuses de réalisation d'infections artificielles. Ces observations et ces différents échecs contribuent à étayer l'idée selon laquelle les souches de *C. gloeosporioides* existant dans les sites de caféiculture calédonienne ne sont

opportuniste qui profite d'un état physiologique défaillant d'un caféier pour en infecter les organes aériens. Compte tenu de la diversité des opinions au sujet d'une éventuelle corrélation entre le comportement pathologique et la présence ou non de reproduction sexuée, il semble qu'une vérification mériterait d'être effectuée.

Le déterminisme de l'infection a cependant été élucidé. Certains facteurs édaphiques, climatiques ou stationnels ont pu être corrélés à l'émergence et au développement de ce pathogène dans les plantations de caféier. A cet égard, il est important de noter l'indépendance qui existe entre les trois maladies, et par voie de conséquence, celle des facteurs qui les favorisent. La modélisation des cinétiques de maladie a permis de préciser ce déterminisme : l'optimal de sévérité atteint au terme du cycle cultural est sous la dépendance des caractéristiques stationnelles alors que la précocité d'émergence de la maladie semble liée aux conditions climatiques. Ces enseignements sont actuellement pris en compte pour élaborer un système de prédiction du risque de maladie.

Les analyses de la diversité génétique des populations de souches isolées dans différents sites d'enquête démontrent une structuration des souches de *C. gloeosporioides* en entités homogènes inféodées principalement aux sites. La dispersion et donc le brassage génétique, d'un site à un autre, semblent être peu fréquents ce qui a conduit à une grande disparité dans les populations étudiées.

Il faut souhaiter que ces résultats, après avoir été comparés à ceux obtenus par les autres équipes partenaires, puissent contribuer, au plan des connaissances théoriques et méthodologiques, à mieux appréhender les interactions hôte-pathogène et l'épidémiologie de *Colletotrichum*.

Nouméa, le 01-09-1998

## BIBLIOGRAPHIE

- AHOUSSOU N., 1989. Etude de l'antracnose de l'igname (*Dioscorea alata*) provoquée par *Colletotrichum gloeosporioides*. Thèse de biologie végétale. Université de Provence, Aix Marseille I, 96 pp.
- BAILEY J.A., JEGER M.J., 1992 : *Colletotrichum* : Biology, Pathology and control. C.A.B International. 388 pp.
- ESKES, A.B., MENDES, M.D.L., ROBBS, C.F., 1991 : Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. Café Cacao Thé, vol. XXXV, n°4, 275-282.
- HINDORF H. , 1975. *Colletotrichum* occurring on *coffea arabica* : a review. Journal of coffee research, 5, p. 43-56.
- LOURD M, GEIGER JP, GOUJON M., 1979 : Les *Colletotrichum*, agents d'antracnose en Côte d'Ivoire : 1. Caractéristiques morphologiques et culturelles d'isolats de *Colletotrichum gloeosporioides*. Ann. Phytopathol. 11(4), 483-495.
- LOURD M., 1982 : Les *Colletotrichum*, agents d'antracnose en Côte d'Ivoire; Recherches sur la structure de l'espèce *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. comparée à *Colletotrichum graminicola*. Thèse de Pathologie végétale Université P. & M. Curie. Paris VI, 115 pp.
- MULLER R.A. , 1980. Contribution à la connaissance de la phytomycocénose constituée par *Coffea arabica* L., *Colletotrichum coffeanum* Noack (sensu Hindorf), *Hemileia vastatrix* B. et Br. , *Hemileia coffeicola* Maubl. et Rog. Café Cacao Thé, Bulletin n° 15, 173 pp.
- MUTHAPPA B.N. , 1974. Comparative morphology and characterization of *Colletotrichum* occurring on *Coffea arabica* in South India. J. Coffee Res. , 4 : p. 105-118.

- PINARD F. , 1995. Le genre *Colletotrichum* en zones tropicales : interactions hôte pathogène et épidémiologie. Proposition d'ATP, 25 pp.
- SCHIEBER, E., 1972 : Economic impact of coffee rust in Latin America. Ann. Rev. Phytopath., 10, 491-510.
- SIERRA SANZ, C.A., MONTOYA RESTREPO, E.C., 1994 : Control of coffee rust based on natural infection levels and its effects on production. Fitopatologia Colombiana, 18 (1-2), 14-22.
- SREENIVASAPRASAD S. , BROWN A.E. MILLS P.R. , 1993. Coffee berry disease pathogen in Africa : genetic structure and relation ship to the group species *Colletotrichum glæosporioides*. Mycol. Res. 97 (8) : p. 995-1000.
- THIOULOUSE, J., CHESSEL, D., DOLEDEC, S., OLIVIER, J.M., 1997 : ADE-4 : a multivariate analysis and graphical display software. Statistics and Computing, 7 (1), 75-83.
- TORIBIO J.A., JACQUA G., 1978 : Traitements fongicides contre l'antracnose de l'igname. Nouv. Agronomiques, Antilles-Guyane, 4(3/4), 147-152.
- WALLER J.M. , BRIDGE P.D. , BLACK R. , HAKIZA G. , 1993. Characterization of the Coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. Mycol. Res. 97 (8) : p. 989-994.
- WINCH JE., NEWHOOK FJ., JACKSON GVH., COLE JS., 1984 : Studies of *Colletotrichum glæosporioides* disease on yam, *Dioscorea alata* in Solomon Islands. Plant Pathology, 33, 467-477.

Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA)  
BIOLOGIE DE L'EVOLUTION ET ECOLOGIE

1996

**Sylvain FAUGERON**

**Structure génétique des populations de *Colletotrichum gloeosporioides*, responsable de l'antracnose du Caféier**

**Stage principal** effectué dans le laboratoire de phytopathologie tropicale de l'ORSTOM-Montpellier

Sous la direction de Diana FERNANDEZ

**Stages complémentaires :**

1- Simulation de successions végétales sur la base du modèle des Attributs Vitaux  
Stage effectué au CEFÉ-CNRS, sous la direction de Sandra LAVOREL

2- Les réglementations des pêches et des réserves marines en Nouvelle Calédonie  
Stage effectué à l'Aquarium de Nouméa, sous la direction de Pascale JOANNOT

Soutenu les 10 et 11 septembre 1996 devant la commission d'examens :

M. B. DELAY, Président, Mme I. OLIVIERI, MM J. BLONDEL, F. BONHOMME, A. CHARRIER, J. ESCARRE, J. D. LEBRETON, J. LEPART, J. MAILLET, D. MC. KEY, S. RAMBAL, M. RAYMOND, J. ROY, L. THALER et F. WAREMBOURG.

## RESUME

A des fins d'étude de génétique des populations, des marqueurs RAPD ont été développés à partir de 125 isolats de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz & Saccet. isolé sur caféier (*Coffea arabica* L.). L'échantillonnage a été réalisé dans six populations de la région du Pacifique Sud, afin de pouvoir estimer la diversité locale et régionale ; l'essentiel provenant de Nouvelle Calédonie. Trois amorces ont été choisies pour les amplifications, et 38 fragments d'ADN amplifiés ont été sélectionnés. Le dendrogramme UPGMA, construit à partir de la matrice de distance génétique calculées sur la base de la similarité des profils d'amplification RAPD, ne montre pas une structuration géographique forte de la diversité génotypique. Néanmoins, trois populations sont différenciées (Yaté et Bangou en N<sup>lle</sup> Calédonie, et Jolamuna en Papouasie-N<sup>lle</sup> Guinée). La diversité allélique est élevée dans la population totale ( $H = 0,45$ ) ainsi que dans les différentes populations ( $0,2 < H < 0,4$ ). Une structuration élevée de la population totale a été observée sur la base du  $F_{st}$  (estimé à 0,27), et 3 populations (Yaté, Bangou et Jolamuna) sont nettement différenciées des autres (Ile des Pins et Nessadiou en N<sup>lle</sup> Calédonie, et Tanna aux Vanuatu). Aucun déséquilibre gamétique n'a été détecté sur les 9 loci retenus pour l'analyse (de fréquences alléliques comprises entre 0,25 et 0,75). Parmi les hypothèses discutées, un taux de recombinaison génétique élevé, obtenu par reproduction sexuée, est proposé pour expliquer le taux de variabilité génétique observé dans les population de *C. gloeosporioides*.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1/ Objectifs de l'étude	1
2/ Etat des connaissances	2
• <i>Le caféier</i>	2
• <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3
• <i>La diversité chez C. gloeosporioides</i>	3
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>4</b>
1/ Echantillonnage	4
• <i>Localisation des prélèvements</i>	4
• <i>Echantillonnage in situ</i>	4
2/ Isolements de <i>C. gloeosporioides</i>	4
• <i>Mise en culture</i>	5
• <i>Constitution de la mycothèque</i>	5
• <i>Obtention de cultures clonales</i>	5
• <i>Ultimes purification des cultures</i>	5
• <i>Préparation du mycelium pour l'extraction de l'ADN</i>	6
3/ Extraction de l'ADN	
• <i>Protocole de Lee et al. (1988), modifié</i>	6
• <i>« Quick CTAB »</i>	6
• <i>Estimations de la quantité d'ADN extraite</i>	7
4/ Amplifications de l'ADN	7
• <i>Préparation du mélange de réaction (mix)</i>	7
• <i>Réaction d'amplification</i>	7
• <i>Visualisation des résultats</i>	7



• <i>Recherche de la quantité d'ADN qui permet la meilleure amplification possible</i>	8
5/ Tests de l'indentité des fragments RAPD	8
• <i>Préparation de sondes RAPD</i>	8
• <i>Transfert de fragments RAPD sur membrane</i>	8
• <i>Hybridations</i>	8
• <i>Interprétation</i>	8
6/ Analyse statistique des résultats RAPD	9
• <i>Codage des résultats d'amplification</i>	9
• <i>Construction d'un dendrogramme</i>	9
• <i>Analyse de la diversité des échantillons</i>	9
<b>RESULTATS</b>	<b>11</b>
1/ Etablissement des profils d'amplification RAPD	11
• <i>Isolements et cultures</i>	11
• <i>Extraction de l'ADN</i>	11
• <i>Choix des amorces</i>	11
• <i>Choix des bandes RAPD</i>	11
• <i>Vérification du concept « chaque bande d'un profil correspond à un locus différent »</i>	12
2/ La structuration génétique des populations de <i>C. gloeosporioides</i>	13
• <i>Le dendrogramme</i>	13
• <i>Indice de diversité</i>	13
• <i>La structuration de la diversité</i>	13
<b>DISCUSSION</b>	<b>15</b>
• <i>La recombinaison</i>	15
• <i>Les migrations</i>	16
• <i>Un ancêtre commun récent ?</i>	16
• <i>Un effet fondateur ?</i>	16
• <i>Relations avec les données de génétique des caféiers</i>	17
• <i>Relations avec les données écologiques et épidémiologiques</i>	17

**CONCLUSION - PERSPECTIVES** 18

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 19

**ANNEXES**

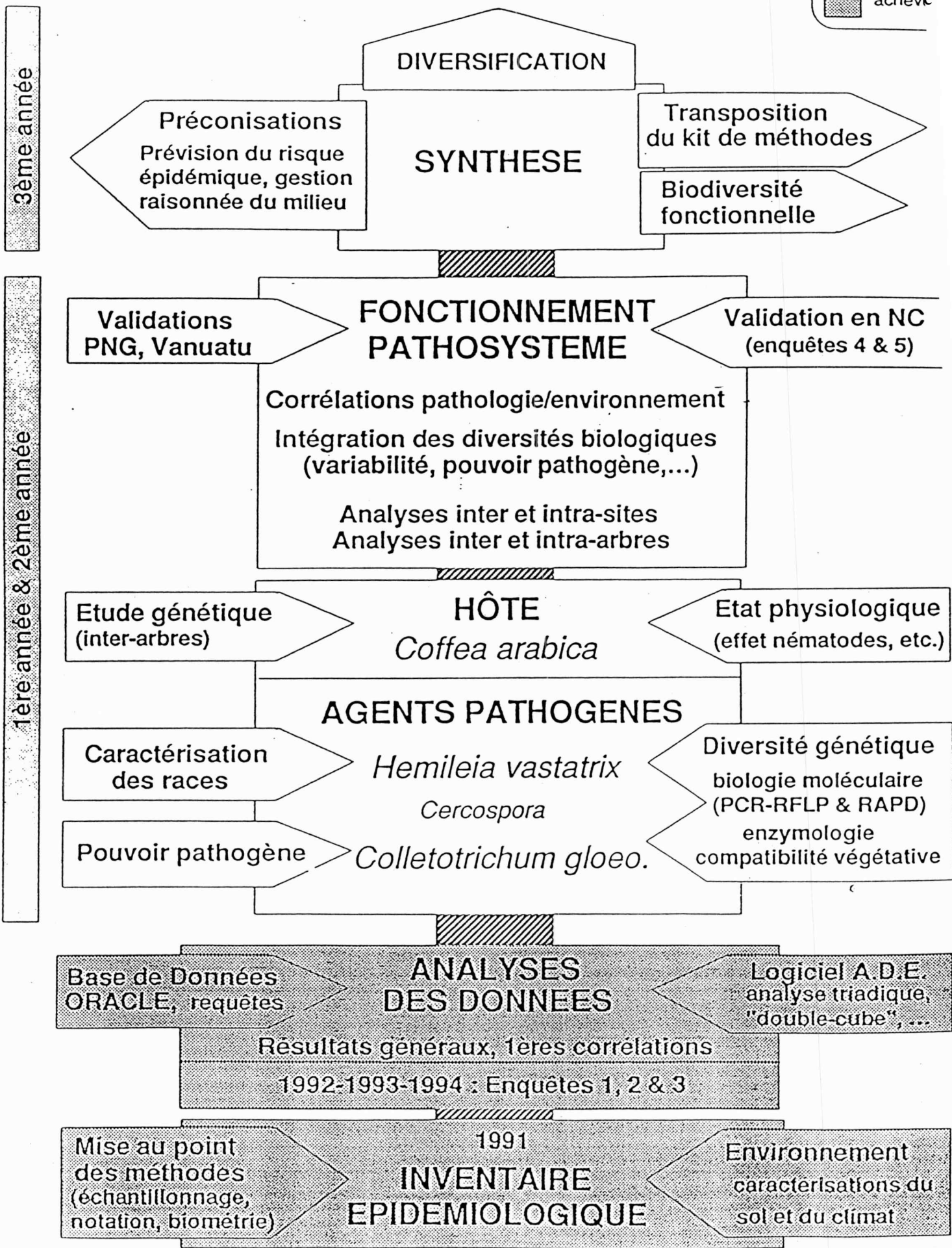
**STAGE COMPLEMENTAIRE N° 1 :**

Simulations de successions végétales sur la base du modèle des attributs vitaux

**STAGE COMPLEMENTAIRE N° 2 :**

Les réglementations des pêches et des réserves marines en Nouvelle Calédonie

Figure 1 : Le pathosystème « caféier ».



# INTRODUCTION

Les études de phytopathologie ont jusqu'à présent, dans leur immense majorité, associé une maladie à un agent pathogène. Le principe étant d'étudier un symptôme sur une espèce de plante, voire une variété, d'en découvrir l'origine et de trouver le moyen de lutter contre le responsable (supposé unique) de ce symptôme. Ces études ont pu être conduites de manière approfondie dans des domaines variés : biologie, écologie, cytologie, biochimie, biologie moléculaire, augmentant notre connaissance des mécanismes épidémiologiques, et permettant de développer des moyens de protection des cultures. Des modèles épidémiologiques prédictifs ont également pu être développés (Kushalappa & Lagesse, 1981, et Kushalappa *et al.*, 1984). Néanmoins, cette approche peut être qualifiée de réductionniste, puisqu'une plante subit rarement l'assaut d'une seule espèce de parasite ou herbivore, et qu'un parasite peut avoir différentes espèces hôtes.

Ainsi, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Saccet est un champignon pathogène responsable de l'antracnose pour un très large spectre d'hôtes (Lourd *et al.*, 1979, Manners *et al.*, 1992 b). Von Arx (1957, cité par Lourd *et al.*, 1979, Bonde *et al.*, 1991, et Mills *et al.*, 1992) avait regroupé sous le synonyme *gloeosporioides* 594 espèces de *Colletotrichum* différenciées par leur spécificité d'hôte.

Le caféier *Coffea arabica* L. est un des hôtes de *C. gloeosporioides*. Le pathogène provoque des attaques sur feuilles et rameaux. Mais cet arbuste subit également les attaques d'autres champignons pathogènes : *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. provoquant la rouille sur feuilles, et *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke responsable de la cercosporiose des feuilles.

Une démarche originale a été développée par les phytopathologistes de l'ORSTOM, qui synthétise les études du caféier et de l'ensemble de son cortège parasitaire, et les données de l'écologie des sites de culture (Lamouroux *et al.*, 1995). La fig. 1 résume le contenu du programme d'études. La finalité de ces recherches consiste à élaborer un outil épidémiologique moderne permettant, après modélisation, d'effectuer une prévision du risque épidémique pour une gestion raisonnée de l'environnement agricole (Pellegrin *et al.*, 1995).

Dans ce programme « Pathosystème Caféier », l'étude de la diversité génétique de l'hôte et des parasites doit contribuer à améliorer notre compréhension des mécanismes épidémiologiques et des relations entre les différents acteurs. La rouille est la maladie la plus développée sur caféier *arabica* en Nouvelle Calédonie. Mais *H. vastatrix* est un parasite strict (on n'a pas encore réussi à le cultiver sur milieu artificiel). La cercosporiose est au contraire peu importante dans cette île. En revanche *C. gloeosporioides* provoque dans certains sites de sérieuses attaques (fig. 2), et il peut facilement être isolé, autorisant des études de biologie moléculaire sur un échantillonnage statistiquement acceptable.

## 1/ OBJECTIFS DE L'ETUDE

Il s'agit d'analyser la structure génétique des populations de *C. gloeosporioides* à différentes échelles dans la zone du Pacifique Sud, dont la Nouvelle-Calédonie constitue le

Maladies fongiques



rouille



anthracnose



cercosporiose

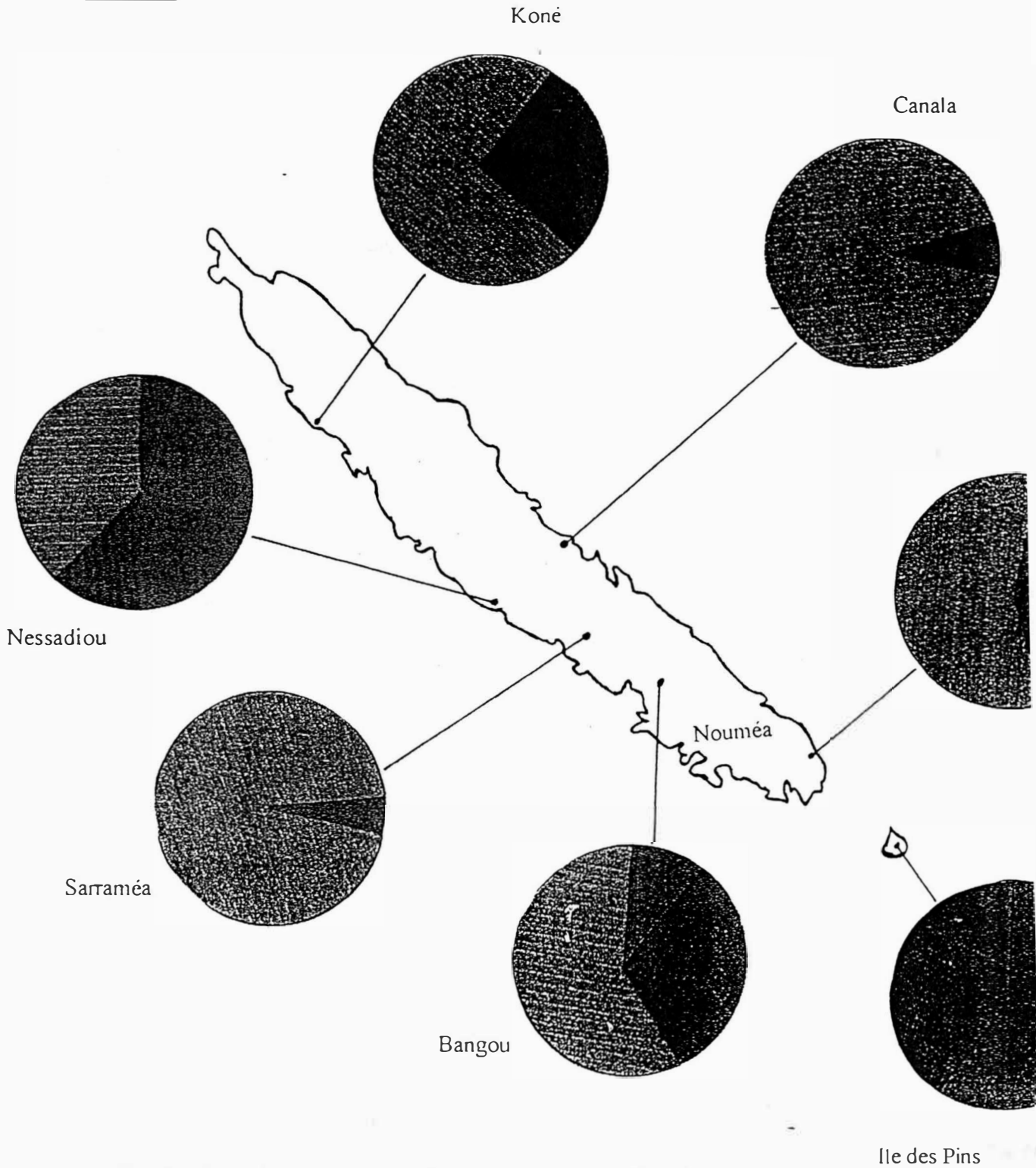


Fig. 2 : Diversité pathologique des sites de Nouvelle Calédonie

point central. Cette étude permettra d'estimer la diversité génétique intra- et inter-populationnelle, et de rechercher des relations entre diversités écologique, épidémiologique et génétique de l'hôte et du parasite. Cette approche permettra également, par le biais des estimations de la structuration de cette diversité et du déséquilibre gamétique, d'émettre des hypothèses quant à l'importance de la reproduction sexuée (ou parasexuée) vis-à-vis de la reproduction végétative, ainsi qu'à l'importance des échanges génétiques entre populations (migrations).

L'application de la technique d'amplification de l'ADN à l'aide d'amorces aléatoires (amorces de 10 paires de bases, dont la séquence est choisie *a priori*), ou RAPD (Williams *et al.*, 1990, Welsh & Mc Clelland, 1990), permettra d'obtenir des marqueurs moléculaires pour caractériser les populations de *C. gloeosporioides* dans plusieurs sites régionaux du Pacifique Sud.

Ces marqueurs sont supposés neutres, et sont obtenus rapidement sans avoir besoin d'informations préalables sur des séquences particulières ou des régions codantes (Hadrys *et al.*, 1992). Ils sont obtenus avec une quantité réduite d'ADN et les résultats sont lisibles rapidement sur gel d'agarose. Et Jacobson *et al.* (1993) ont comparé leur niveau de résolution avec celui d'autres marqueurs. Ainsi, plusieurs études de génétique de populations de champignons phytopathogènes ont utilisé avec grand intérêt ces marqueurs RAPD (Arnau *et al.*, 1994, Hamelin *et al.*, 1995, Gosselin *et al.*, 1995). Dans le cas de *C. gloeosporioides*, l'haploïdie permet d'éviter un certain nombre d'hypothèses préalables telle que la dominance de l'allèle « présence » chez les diploïdes.

## 2/ ETAT DES CONNAISSANCES

### • Le caféier

Le caféier appartient à la grande famille des Rubiacées, dont il constitue le genre *Coffea*, créé par Linné (R. Coste, 1989). Parmi les nombreuses espèces que ce genre contient, deux surtout sont cultivées : *C. canephora* Pierre et *C. arabica* L. ; cette dernière étant la plus répandue dans le monde actuellement. Le *C. robusta*, également très cultivé, est généralement considéré comme une variété de *C. canephora*.

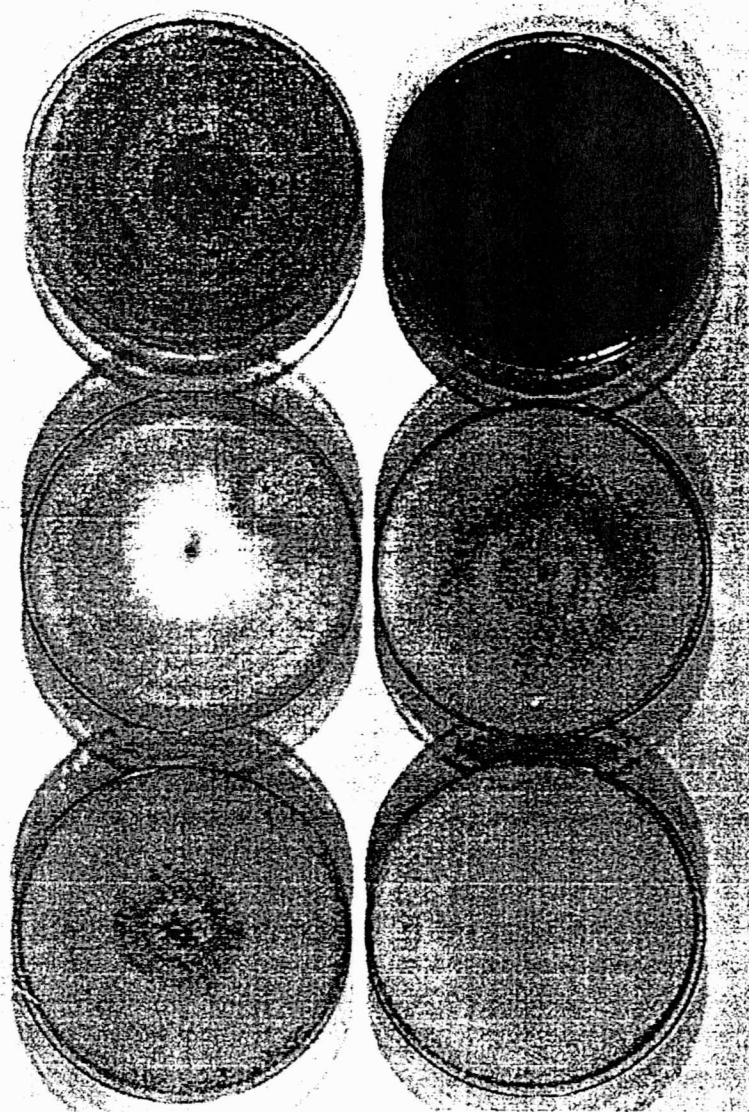
*C. arabica* est la plus ancienne espèce de caféier connue, et trouverait son origine en Ethiopie (Abyssinie), contrairement à ce qu'indique son nom. Il s'agit d'un arbuste à feuillage persistant, de 8 à 10 m de hauteur à l'état naturel, souvent multicaule. Les feuilles sont opposées, ovales, brièvement pétiolées, de 10 à 15 cm de long et 4 à 6 cm de large. Le fruit est une drupe communément appelée cerise. C'est la graine, en double généralement (il y a deux ovaires par fleur), qui est commercialisée.

Il existe de nombreuses variétés de *C. arabica*. Je citerai les plus communément cultivées en Nouvelle Calédonie :

*C. arabica* var. *typica* L.

*C. arabica* var. Bourbon (Rodr) Choussy. Originnaire de la Réunion, elle est de taille légèrement plus petite que *typica* mais a un feuillage plus dense. Ses fruits sont aussi plus petits, mais appréciés pour leur qualité.

Des hybrides entre les deux variétés précédentes constituent une gamme entre le phénotype *typica* et le phénotype Bourbon.



**Planche 1** : Cultures clonales de *C. gloeosporioides* sur PDA âgées d'une semaine. On note la diversité morphologique des thalles.

Les cultures se font sous ombrage et demandent une quantité d'eau importante mais pas excessive (1000 à 1800 mm par an). Les branches et les feuilles du caféier sont souples mais n'apprécient pas les vents trop forts qui les font chuter. La nature du sol importe peu, pourvu que l'arbuste puisse développer son système racinaire. Néanmoins, un pH acide (4,5 à 6,0) semble préférable.

- *Colletotrichum gloeosporioides*

*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Saccet est la forme imparfaite de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Splaud. & Schrenk, un champignon de la famille des Ascomycètes. La multiplication végétative semble être le principal mode de dispersion pendant une épidémie. Des spores ovales, les conidies, uninuclées et haploïdes, dont la paroi contient de la chitine, sont produites en très grande quantité. Leur mode de dissémination n'est pas précisément connu. La phase infectieuse est fortement corrélée à la présence d'eau libre (de l'eau de rosée) (Dodd *et al.*, 1992, Lamouroux *et al.*, 1995). Les stomates de la feuille ou de la tige sont alors ouverts. La spore germe et produit une structure d'infection particulière à l'intérieur du stomate, l'appressorium, constitué de grosses cellules dans lesquelles règne une forte pression osmotique qui fait éclater les cellules de l'épiderme foliaire et permet à l'hyphe de pénétrer dans le mésophylle. La colonisation de la feuille-hôte se traduit par un brunissement suite à la mort des cellules infectées : c'est le syndrome de l'antracnose.

La forme parfaite, *G. cingulata*, imprévisible et rarement observée au champ, est considérée comme fondamentalement homothallique (Bryson *et al.*, 1992) : elle a une préférence pour l'autogamie.

- *La diversité chez C. gloeosporioides*

*C. gloeosporioides* est connu pour être extrêmement variable morphologiquement (Lourd *et al.*, 1979, Geiger *et al.*, 1980, et Planche 1), en termes de pathogénicité (Manners *et al.*, 1992), et en termes de diversité génétique. Freeman *et al.* (1996) et Katan & Shabi (1996) ont montré que des souches de *C. gloeosporioides* isolées sur amandes se différencient nettement des souches isolées sur avocat et anémones, en plus d'une différenciation géographique intraspécifique. Liyanage *et al.* (1992) différencient des populations de *C. gloeosporioides* sur deux espèces de *Citrus* à l'aide de divers marqueurs morphologiques, culturaux et génétiques (RFLP d'ADN ribosomique, sondes uniques et karyotypes électrophorétiques). Hodson *et al.* ont utilisé l'ADN ribosomique et l'ADN mitochondrial pour étudier la diversité entre *C. gloeosporioides* attaquant plusieurs espèces de fruits tropicaux. Enfin, Mills *et al.* (1992 a et 1992 b) ont montré que l'emploi de marqueurs RAPD permettait de différencier des isolats de *C. gloeosporioides* provenant de différents hôtes et de différentes origines géographiques.

Sur le caféier, des études préliminaires ont été conduites en 1995 à Montpellier, à l'aide de différents marqueurs (Kohler *et al.*, 1995) : polymorphisme enzymatique, groupes de compatibilité végétative et RAPD. La technique RAPD a déjà pu mettre en évidence sur quelques souches une forte diversité inter-sites, avec néanmoins des regroupements entre différentes souches. Par contre, la diversité intrasite semble plus réduite mais n'a été étudiée que sur quelques souches issues de 3 sites.



# MATERIEL ET METHODES

## 1/ ECHANTILLONNAGE

### • Localisation des prélèvements

Les souches de *C. gloeosporioides* ont été récoltées dans 6 sites au total (voir Fig. 2) choisis pour l'intensité d'anthracnose qui a été rapportée (Lamouroux *et al.*, 1995) :

- d'une part en Nouvelle Calédonie, dans 4 sites :

Bangou (noté BAN)

Ile des Pins (noté ILP5 et ILP6 = 2 parcelles)

Nessadiou (noté NESS)

Yaté (noté Y)

- d'autre part dans 2 sites « régionaux » :

Ile de Tanna, aux Vanuatu (noté TAN)

Jolamuna, en Papouasie-Nouvelle-Guinée (noté JOL)

Les arbres utilisés pour ces prélèvements sont choisis le long d'un transect et servent depuis plusieurs années aux enquêtes épidémiologiques du programme « Pathosystème Caféier ». De ce fait, on dispose pour chacun d'entre eux, chaque année, d'une « signature pathologique », *i.e.* des indications précises sur le comportement à l'égard des champignons pathogènes tout au long du cycle cultural.

Sont également disponibles pour ces sites des caractéristiques pédologiques (pH, texture, fertilité, pédocomparateurs, ...), climatiques (température, pluie, rosée, insolation, humidité du sol, ...) et génétiques (comparaisons des ADN des caféiers par l'emploi de marqueurs RAPD ; données fournies par P. Lashermes, ORSTOM Montpellier).

### • Echantillonnage in situ

Sur chaque arbre, ont été prélevées deux feuilles présentant des symptômes d'infection par *C. gloeosporioides* (lésions brun sombre généralement en position apicale ou sur les marges foliaires) et si possible sur des rameaux diamétralement opposés. Après numérotation sur la face inférieure, la feuille est aussitôt placée dans un sac en plastique, à raison d'en général 20 souches par site.

## 2/ ISOLEMENT DE *C. GLOEOSPORIOIDES*

• Après la collecte sur le terrain, l'isolement des souches de *C. gloeosporioides* est réalisé au laboratoire selon les techniques classiques de mycologie (voir annexe I). A partir de cette étape, le champignon est cultivé sur milieu artificiel, généralement sur milieu solide (PDA, voir annexe III) en boîte de Pétri.



**Planche 2** : Conidies et bourgeonnements d'un fragment de mycélium prélevé dans un acervule. Coloration au bleu coton (x 1000).

- **Mise en culture**

Après 5 à 6 jours, si les acervules typiques (structures contenant les conidies) du *C. gloeosporioides* (en général de couleur rose-orangée, voir Planche 1) sont visibles autour de l'implant, un premier repiquage (prélèvement dans les arcervules) est réalisé sur PDA/antibiotique afin de purifier la culture. On procède ainsi à 2 ou 3 repiquages successifs en alternant deux types d'antibiotiques (Pénicilline G - Colimycine à  $10^6$  unités, et Gentiline à 160 mg.l<sup>-1</sup>) jusqu'à l'obtention d'une culture pure en boîte de Pétri (*i.e.* exempte de contamination par des bactéries ou d'autres espèces de champignons).

- **Constitution de la mycothèque**

Après vérification de la présence d'acervules dans la dernière boîte de repiquage, on procède à l'ensemencement d'un tube contenant du milieu PDA sans antibiotiques. On constitue de cette manière une mycothèque « intra-site » comportant, en principe, 20 souches (numérotées 1A, 1B, 2A, ..., 10A, 10B ; voir annexe II). Dans certains cas, il a été produit des isolats surnuméraires pour être sûr de pouvoir fournir le minimum de 20 souches par site. Ils ont été conservés pour cette étude. Selon le site, le type et l'âge des symptômes, et selon la période d'échantillonnage, le pourcentage de réussite d'isolement de *C. gloeosporioides* peut en effet varier de 50 à 100%. Ce sont des boutures de cette mycothèque qui nous sont parvenues de l'ORSTOM Noumea à Montpellier.

- **Obtention de cultures clonales**

Afin d'analyser un seul génome par échantillon, nous avons réalisé des cultures clonales, à partir d'une seule conidiospore. A l'aide d'une aiguille stérilisée à la flamme, on prélève des spores végétatives en piquant dans un acervule. Ces spores sont déposées dans un tube Ependorff contenant 1 ml d'eau distillée et stérile. Le tube est alors agité vigoureusement (à l'aide d'un Vortex) afin de produire une suspension homogène de spores. Cette suspension est ensuite diluée 10 fois. On dépose enfin 5 à 6 gouttes sur milieu PDA qu'on étale aussitôt de la façon la plus homogène possible à l'aide d'une pipette Pasteur courbée.

Après 24 h, de nombreuses spores ont germé. On prélève alors un fragment de mycélium issu de la germination d'une seule spore qu'on dépose dans une nouvelle boîte de Pétri.

Cette étape permet d'avoir une culture dite "mono-spore", contenant un seul génotype dont on peut vérifier facilement qu'il s'agit bien de *C. gloeosporioides* : observation des acervules caractéristiques et, si nécessaire, des spores ovales typiques au microscope (coloration au Bleu Coton qui se fixe sur la chitine, voir Planche 2). On vérifie également que la culture est exempte de toute contamination bactérienne (par observation de l'aspect général du mycélium, cultures de boutures sur milieu LPGA (annexe III), et/ou observations au microscope).

- **Ultimes purifications des cultures**

De nombreux isolats étaient contaminés par des bactéries. Pour certains, l'emploi d'antibiotiques fut suffisant pour éliminer les contaminants. Pour d'autres, ce sont diverses

techniques de mycologie classique qui ont été testées (voir annexe I). Néanmoins, toutes les souches n'ont pas pu être correctement purifiées.

- *Préparation du mycélium pour l'extraction de l'ADN*

On réalise une culture sur milieu PDB (Potato Dextrose Broth), liquide, afin d'avoir une quantité suffisante de mycélium. On ensemence à cet effet une fiole de Roux contenant 200 ml de PDB avec 6 à 7 boutures de 1 cm<sup>2</sup>. Après une semaine d'incubation à 22°C, le mycélium est extrait de la fiole, filtré et rincé à l'eau stérile sur une toile à blutter en Nylon. Il est enfin lyophilisé, puis conservé à -20 °C.

### 3/ EXTRACTION DE L'ADN

2 protocoles ont été testés :

- *Protocole de Lee et al. (1988), modifié*

Des tubes Ependorff de 1,5 ml sont remplis au tiers avec du mycélium lyophilisé broyé (environ 0,1 g) dans du sable de Fontainebleau. 500 µl de tampon de lyse (voire annexe III) sont ajoutés au broyât. Après homogénéisation du mélange, le mycélium est mis en incubation pendant 30 min à 1 h à 65 °C.

Les protéines sont éliminées par extraction au Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique (25/24/1) en quantité égale à celle du tampon de lyse. Après centrifugation (15 min à 12000 g), la phase supérieure aqueuse est récupérée (soit environ 400 µl) et l'ADN est précipité sélectivement avec 0,54 volume d'Isopropanol (pour ne pas précipiter les polysaccharides) en présence de 10 % d'Acétate de Sodium (3 M, pH 8,0). Lorsque la phase aqueuse n'est pas parfaitement limpide, une deuxième extraction au Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique est effectuée avant la précipitation.

Après centrifugation (2 min à 12000 g), le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est rincé avec 300 µl d'Ethanol 70 %. Il est ensuite repris dans 200 µl de T.E. (annexe III). Si la redissolution n'est pas immédiate, le tube est placé en incubation à 65 °C jusqu'à ce que le culot d'ADN ne soit plus visible.

La solution d'ADN est alors traitée avec 1 µl de Rnase A (10 mg.ml<sup>-1</sup>) (Boehringer Mannheim) pendant 1 h à 37 °C et précipitée une seconde fois avec 1 volume d'Ethanol absolu (à -20 °C) en présence de 10 µl d'Acétate de Sodium (3 M, pH 8,0). Après centrifugation (2 min à 12000 g), le culot d'ADN est rincé avec de l'Ethanol 70 % puis séché sous vide (dans un appareil « speed vacuum »).

L'ADN est enfin repris dans 200 µl de T.E., maintenu une nuit à 4°C, puis conservé à -20 °C.

- « *Quick CTAB* » (tiré de *Current Protocols in Molecular Biology, 1994*)

Ce protocole n'ayant pas été retenu pour l'extraction en série de l'ADN, il est détaillé en annexe I.

- **Estimation de la quantité d'ADN extraite**

Deux méthodes ont été employées pour estimer la quantité d'ADN :

- dosage au spectrophotomètre. L'absorbance est mesurée à 260 nm, et la quantité de nucléotides est déduite sachant qu'une unité d'absorbance A<sub>260</sub> correspond à une concentration de 50 µg.ml<sup>-1</sup>. D'autre part, la solution d'ADN est considérée comme pure lorsque la relation suivante est vérifiée :  $1,8 < A_{260} / A_{280} < 2$ .

- estimation sur gel d'électrophorèse. On dépose sur un gel d'agarose (0,8 %) 10 et 5 µl de marqueur de poids moléculaire (Phage λ coupé par Hind III et EcoRI), dont la concentration est connue, ainsi que 10 µl de la solution d'ADN à plusieurs dilutions différentes (1/50<sup>e</sup> et 1/100<sup>e</sup>). Après migration (1 h sous 100 V), on compare l'intensité des bandes de l'ADN total extrait avec les intensités respectives des bandes du marqueur. En sachant quelle quantité de ce dernier a été déposée, on sait quelle quantité d'ADN représente chaque bande, et on estime ainsi la quantité d'ADN de champignon qui a été déposée. Par cette méthode, on peut également observer la qualité de l'ADN extrait (dégradé ou intacte), et éventuellement détecter la présence d'ARN (migrant plus vite que l'ADN génomique, ils forment une tache diffuse en bas du gel).

#### **4/ AMPLIFICATION DE L'ADN**

- **Préparation du mélange de réaction (mix)**

Pour 25 µl, le mix contient 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dXTP, 20 pmoles d'amorces, 2 unités de Taq polymérase et 2,5 µl de tampon de réaction (Goldstar Polymerase licensed, Eurogentec), 5 µl d'ADN (environ 25 ng), et de l'eau pure filtrée à 0,25 µm pour compléter à 25 µl. Un mix pour plusieurs tubes (en général 45) est préparé sans ADN, et réparti ensuite dans des tubes Ependorff de 0,5 ml. L'ADN est alors ajouté dans chaque tube, et le mix complet est finalement recouvert d'huile minérale.

On précise que tous les pipetages sont effectués avec des cônes à filtre pour éviter toute contamination par des aérosols.

- **Réaction d'amplification**

Elle débute par un premier cycle de dénaturation de l'ADN (5 min à 95 °C). Suivent ensuite 30 cycles comprenant 1 min à 92 °C (dénaturation), 1 min à 36 °C (fixation de l'amorce), 1 min 30 à 72 °C (polymérisation de l'ADN). Pour finir, 1 cycle de 15 min à 72 °C permet d'achever toutes les polymérisations initiées. Différents thermocycleurs ont été utilisés (PHC-3 Techne, PTC 100 et PTC 200 MJ Research). Néanmoins, pour chaque amorce testée, le même appareil a été utilisé pour toutes les souches.

- **Visualisation des amplifiats**

Les fragments d'ADN amplifiés sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose (1,4 % dans du tampon T.A.E.) contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg.ml<sup>-1</sup>). Chaque gel est placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du T.A.E., et le voltage et la durée de migration dépend de la taille du gel. Classiquement, pour un gel de 150 ml, on

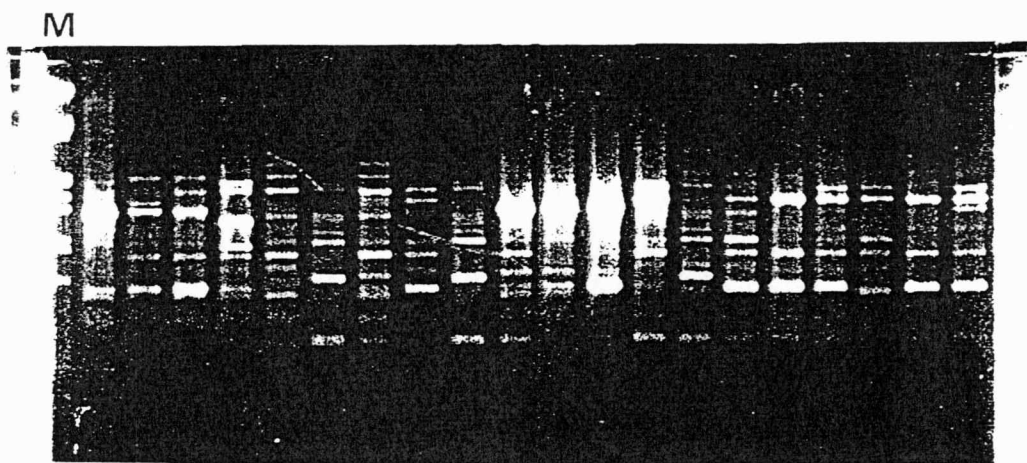
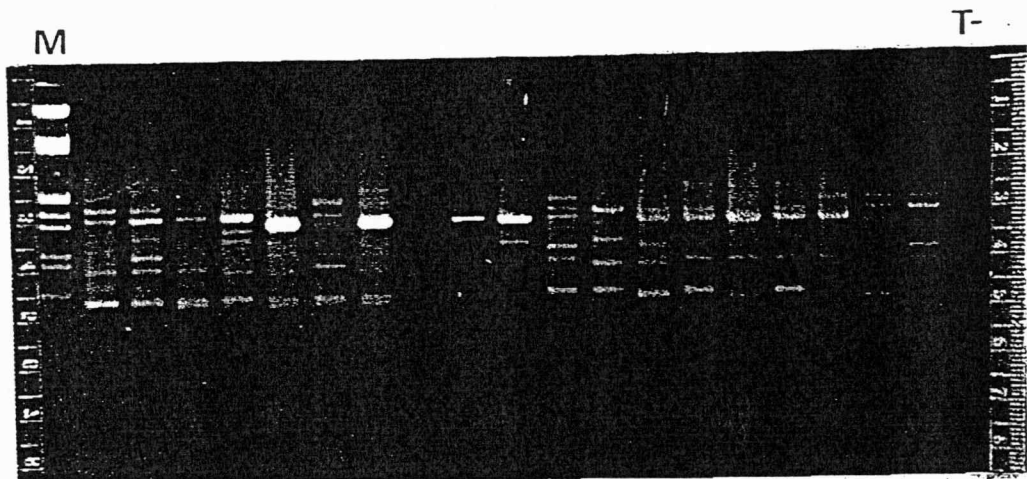
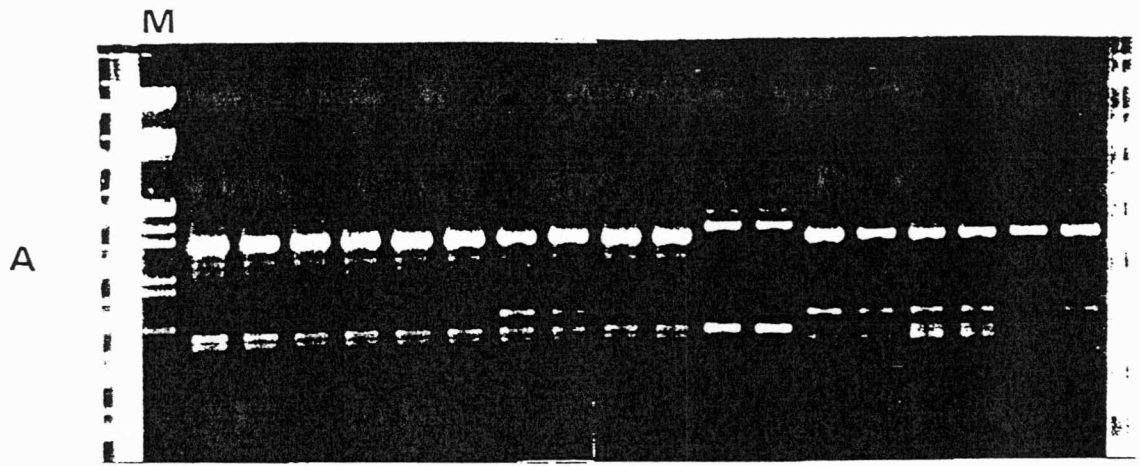
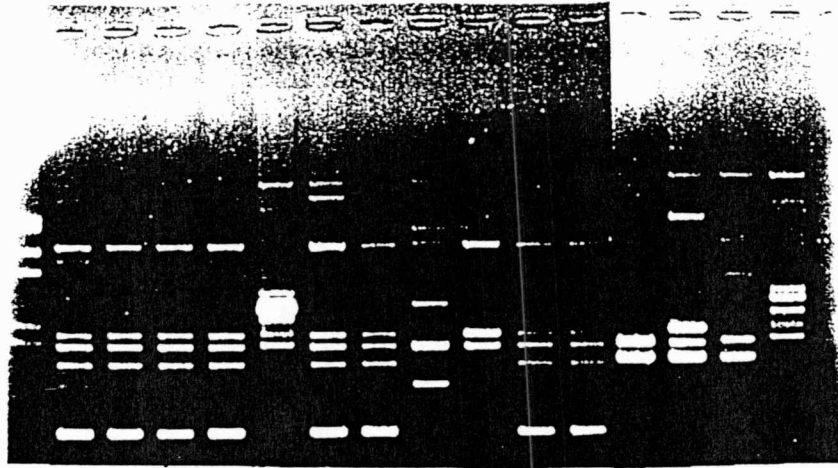


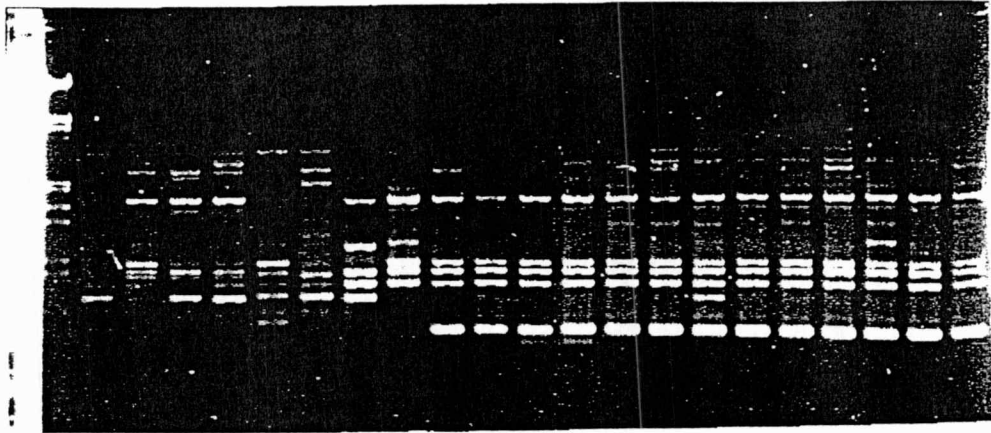
Planche 3 : Profils RAPD obtenus par amplifications avec l'amorce OPF3 sur PTC 200 (MJ Research) Les fragments d'ADN amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'Agarose (1,4 % dans du tampon T A E.)  
 M = Marqueur de poids moléculaire (phage  $\lambda$  dirigé par EcoR I et Hind III)  
 T- = Témoin négatif (sans ADN)

Photo A Test de la concentration d'ADN. Chaque souche est en double, à deux dilutions différentes. 1/50 à gauche, 1/100 à droite

M



M



M

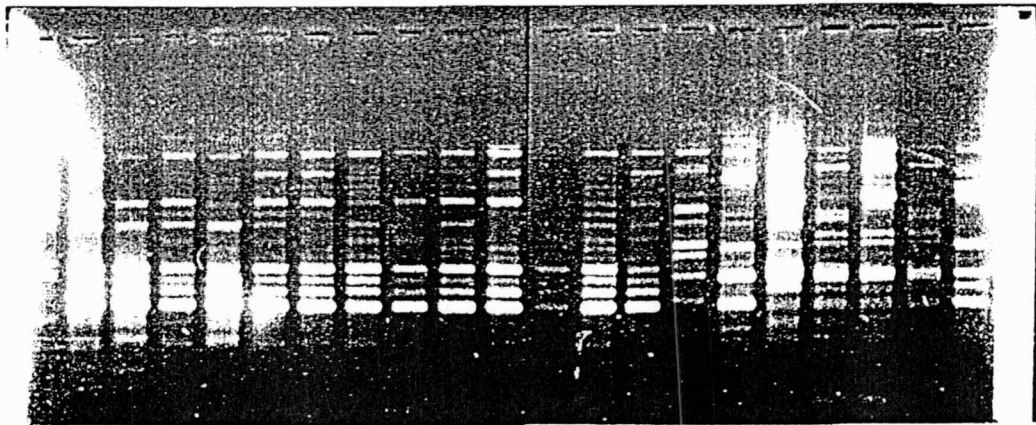
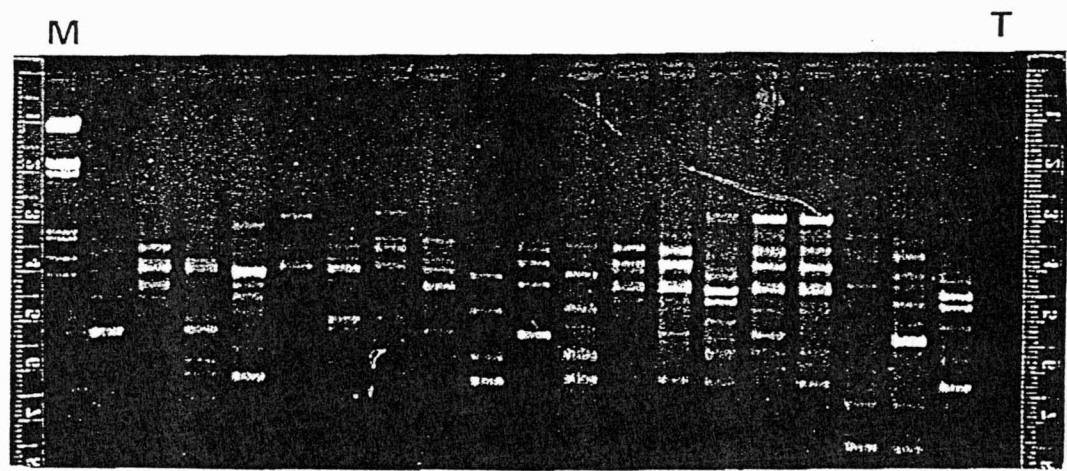
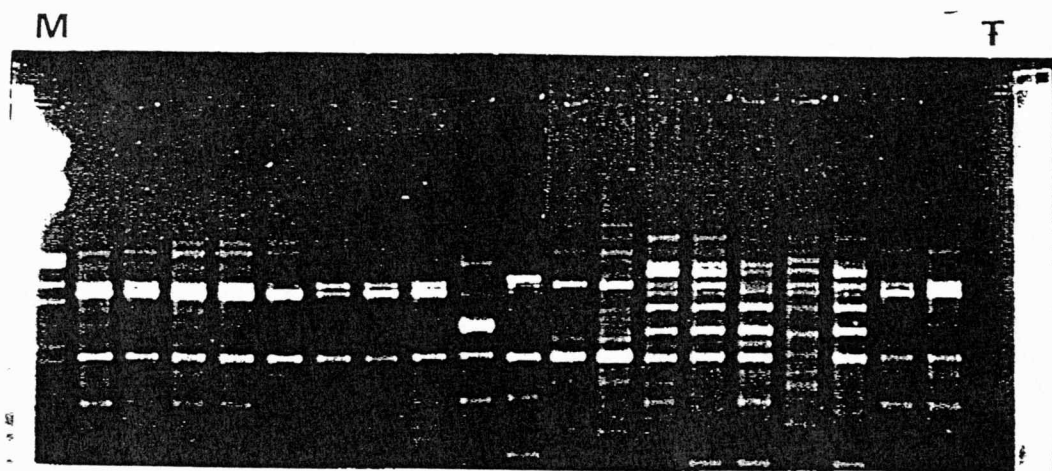
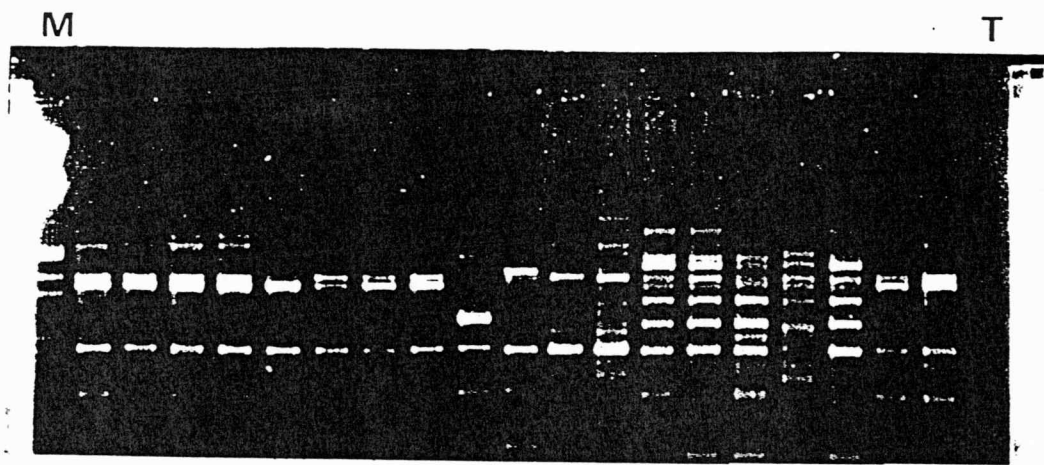


Planche 4 Profils RAPD obtenus par amplifications avec l'amorce OPF9 sur PTC 100 (MJ Research) Les fragments d'ADN amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'Agarose (1,1% dans du tampon TAE)  
M - Marqueur de poids moléculaire (phage  $\lambda$  digé par EcoR I et Hind III)



**Planche 5 :** Profils RAPD obtenus par amplifications avec l'amorce OPF10 sur PHC-3 (Techne) Les fragments d'ADN amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'Agarose (1,4 % dans du tampon T A E.)  
 M = Marqueur de poids moléculaire (Phage  $\lambda$  digéré par EcoR I et Hind III).  
 T = Témoin négatif (sans ADN)



applique une tension de 100 V pendant 2 h 30. Les fragments d'ADN amplifiés sont alors visualisés sous U.V. et photographiés avec un appareil Polaroid (exemples sur les Planches 3, 4 et 5).

- ***Recherche de la quantité d'ADN qui permet la meilleure amplification possible***

Plusieurs dilutions d'ADN (de 1/20° à 1/1000°, 1/50° et 1/100° étant les plus fréquemment utilisées ; Planche 3 - photo. A) ont été testées pour chaque souche en RAPD avec l'amorce OPF 9 (voir paragraphe suivant). La dilution qui donne la plus forte intensité de bandes après amplification est celle qui est retenue. Lorsqu'aucune des deux dilutions ne donne de résultat satisfaisant, des dilutions moins importantes sont testées (1/20°). L'important est d'avoir une quantité et une qualité d'ADN qui permette une bonne réaction d'amplification.

## **5/ TESTS DE L'IDENTITE DES FRAGMENTS RAPD**

- ***Préparation de sondes RAPD***

Des fragments d'ADN amplifié que l'on veut utiliser comme sonde sont récupérés après migration lente (sous 40 ou 50 V) dans un gel d'agarose à bas point de fusion (Promega). La bande de gel contenant le fragment RAPD est découpée à l'aide d'un scalpel stérile, et l'ADN est purifié à l'aide du kit Wizard PCR Preps (DNA Purification System, Promega), puis dosé par électrophorèse.

5 ng de chacune des sondes sont ensuite marqués radioactivement par 20 µCie d' $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP selon le procédé de « random priming » (à l'aide du kit Megaprime™ DNA Labelling Systems, Amersham).

- ***Transfert des fragments RAPD sur membrane***

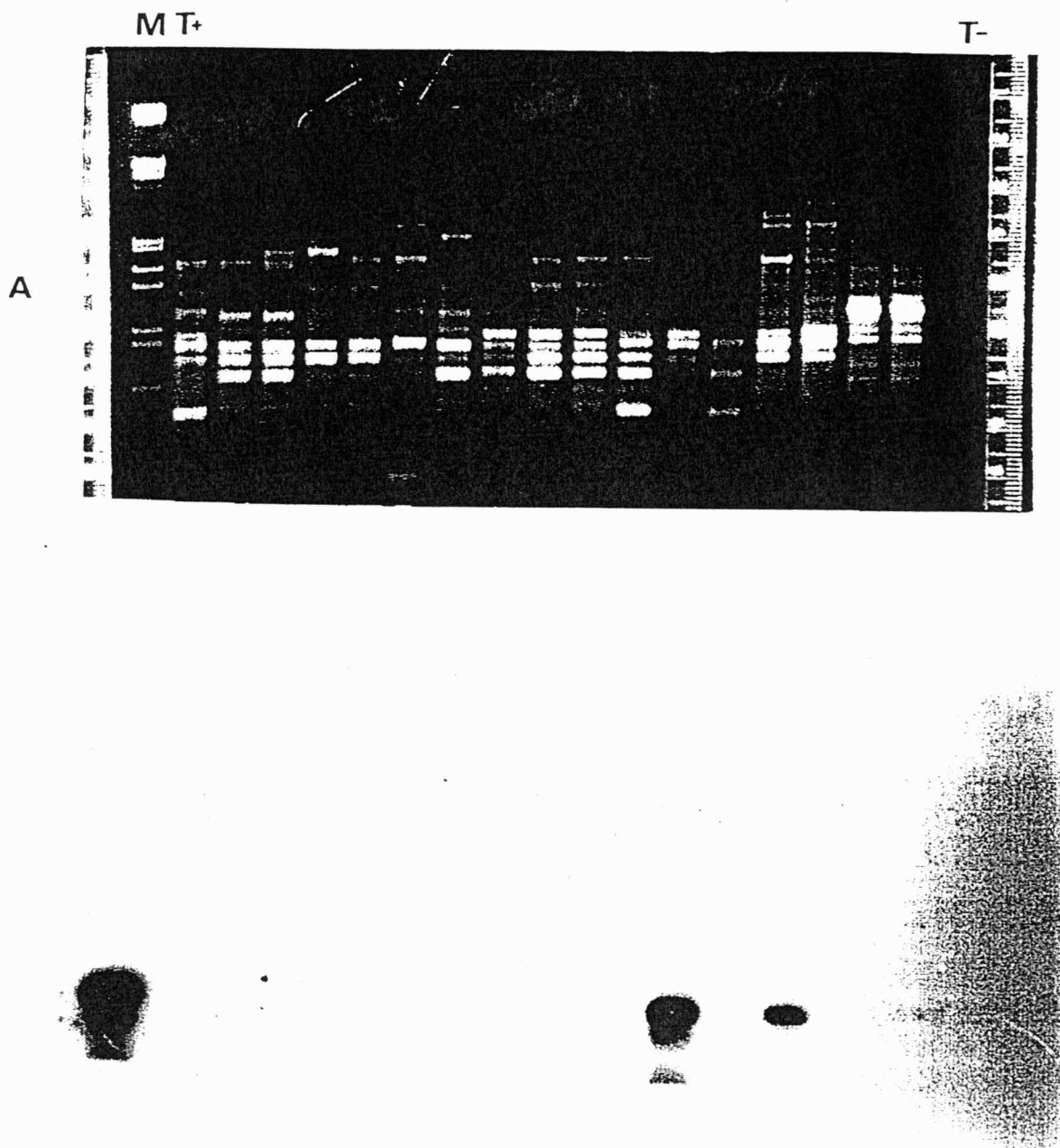
Après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose (1,4 %, migration sous 80 V pendant 3 h), les fragments d'ADN amplifiés sont transférés sous forme dénaturée (ADN simple brin) sur une membrane de Nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) par la méthode du transfert alcalin sous vide (Alkaline Vacuum Transfert, TE 80 TransVac, Hoefer Scientific Instrument).

- ***Hybridation***

Les membranes sont préhybridées dans 20 ml de tampon d'hybridation (composition en annexe), à 65 °C pendant 1 h, puis hybridées dans ce même tampon avec les sondes radioactives (une sonde par membrane) pendant toute une nuit à 65 °C.

Les membranes sont ensuite rincées successivement avec des tampons de rinçage à concentration décroissante en sels (annexe III) puis séchées rapidement.

Des autoradiographies sont alors réalisées en plaçant les membranes radioactives directement en contact avec une plaque photosensible, à -80 °C, pendant 1 h (Planches 7, 8, 9 et 10).



**Planche 7 :** Profils d'hybridation obtenus avec la sonde OPF9-445 sur une membrane de transfert contenant de l'ADN amplifié avec l'amorce OPF9.

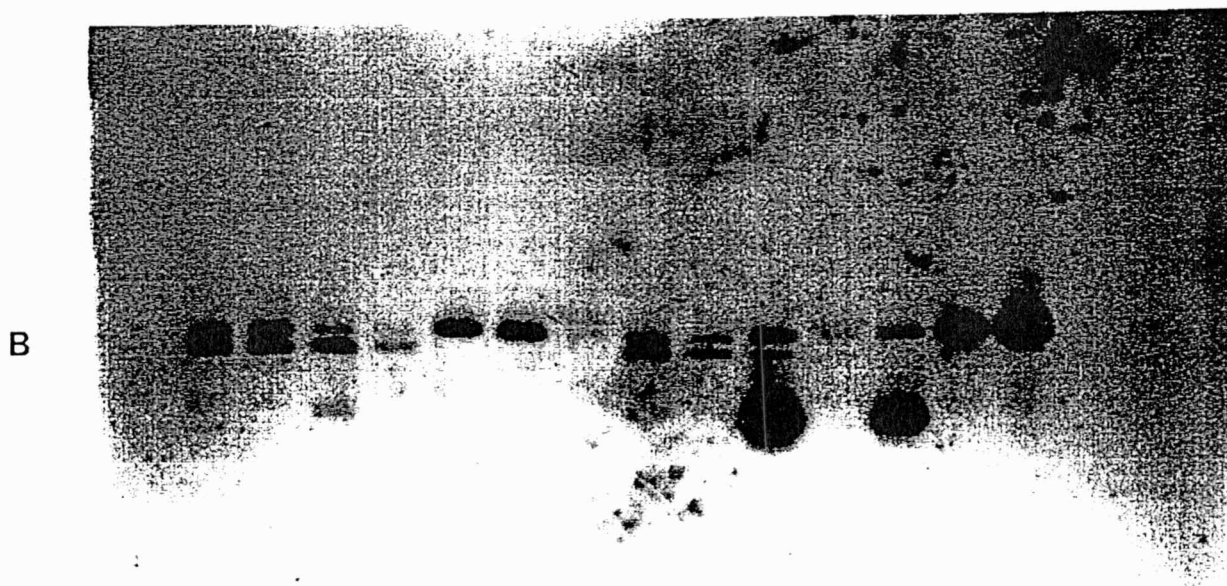
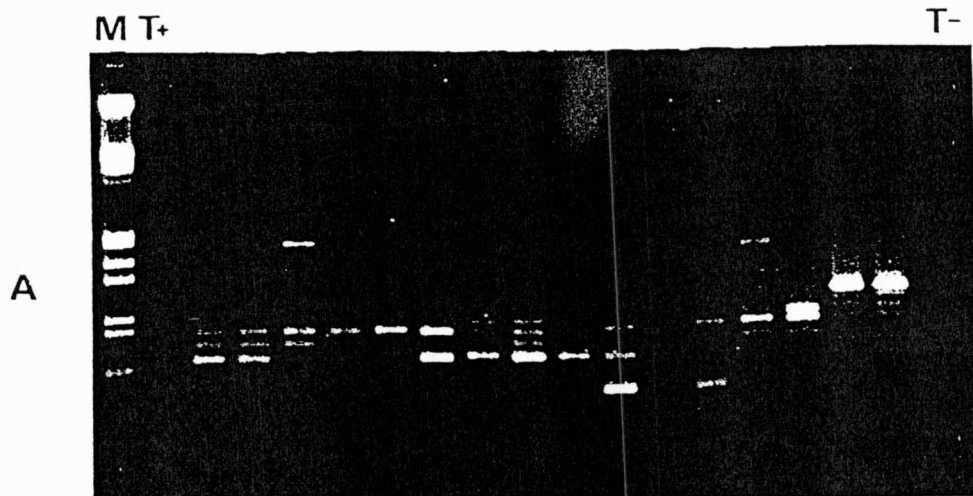
**Photo A :** gel d'électrophorèse contenant de l'ADN amplifié par RAPD avant son transfert sur membrane (1,4 % d'Agarose dans du tampon T.A.E.).

M = Marqueur de poids moléculaire (phage  $\lambda$  dirigé par EcoR I et Hind III).

T + = Témoin positif (Y8A = souche ayant servi à produire la sonde).

T- = Témoin négatif (sans ADN)

**Photo B :** autoradiographie de la membrane après hybridation avec la sonde OPF9-445 (exposition 1 heure)



**Planche 8** : Profils d'hybridation obtenus avec la sonde OPF9-800 sur une membrane de transfert contenant de l'ADN amplifié avec l'amorce OPF9.

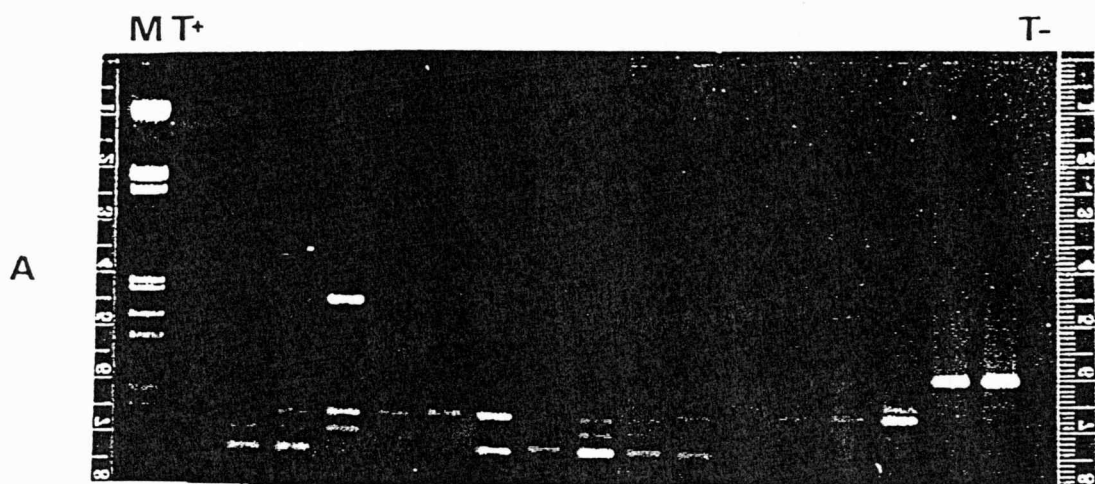
**Photo A** : gel d'électrophorèse. Il manque le témoin positif Y8A.

M = Marqueur de poids moléculaire (phage  $\lambda$  dirigé par EcoR I et Hind III).

T + = Témoin positif (Y8A = souche ayant servi à produire la sonde).

T- = Témoin négatif (sans ADN).

**Photo B** : autoradiographie de la membrane après hybridation avec la sonde OPF9-800 (exposition 1 heure).



B

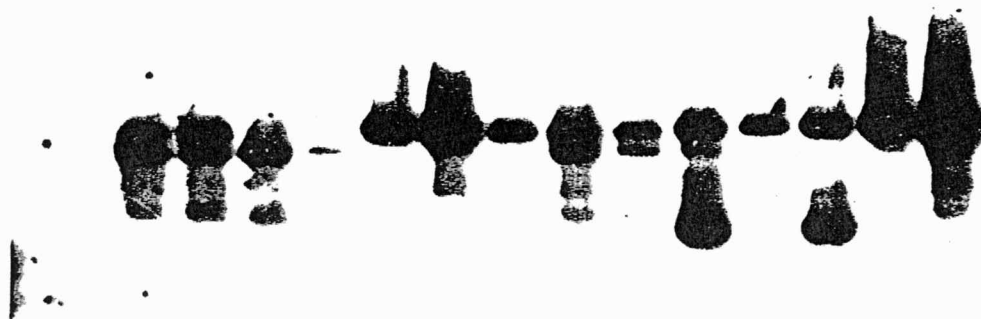


Planche 9 : Profils d'hybridation obtenus avec la sonde OPF9-1070 sur une membrane de transfert contenant de l'ADN amplifié avec l'amorce OPF9.

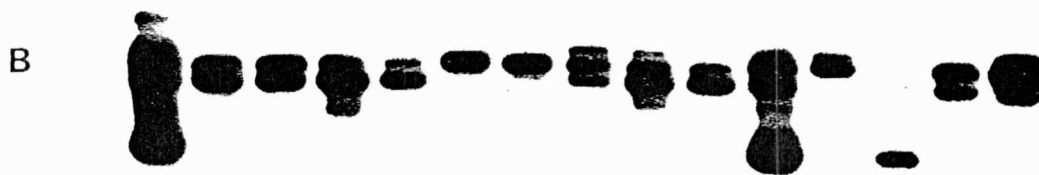
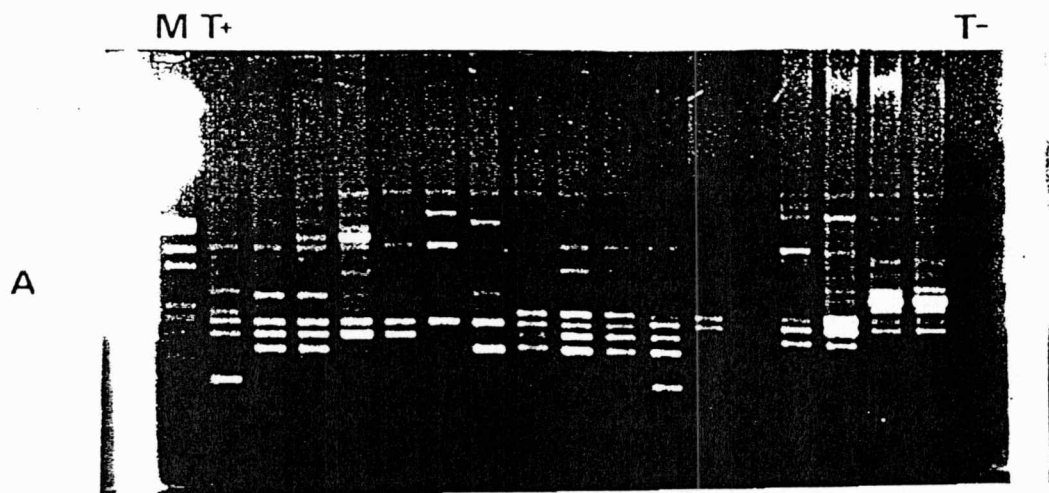
Photo A : gel d'électrophorèse. Il manque le témoin positif Y8A.

M = Marqueur de poids moléculaire (phage  $\lambda$  dirigé par EcoR I et Hind III).

T + = Témoin positif (Y8A = souche ayant servi à produire la sonde).

T- = Témoin négatif (sans ADN).

Photo B : autoradiographie de la membrane après hybridation avec la sonde OPF9-1070 (exposition 1 heure).



**Planche 10** : Profils d'hybridation obtenus avec la sonde OPF9-1610 sur un membrane de transfert contenant de l'ADN amplifié avec l'amorce OPF9.

**Photo A** : gel d'électrophorèse.

M = Marqueur de poids moléculaire (phage  $\lambda$  dirigé par EcoR I et Hind III).

T + = Témoin positif (Y8A = souche ayant servi à produire la sonde).

T- = Témoin négatif (sans ADN).

**Photo B** : autoradiographie de la membrane après hybridation avec la sonde OPF9-1610 (exposition 1 heure).

- **Interprétation**

Lorsqu'une sonde s'hybride avec plusieurs fragments de tailles différentes, on considère que ceux-ci contiennent la même séquence et représentent donc plusieurs allèles d'un même locus. On ne sélectionne alors qu'une seule de ces bandes pour ne considérer que deux allèles (présent/absent). Par contre, lorsqu'une sonde ne s'hybride pas avec tous les fragments de même taille, on considère que des loci différents mais indistiguables par électrophorèse puisqu'ils ont migrés au même endroit, et ces loci sont éliminés de l'analyse.

## 6/ ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS RAPD

- **Codage des résultats d'amplification**

Lorsque les loci amplifiés ont été sélectionnés pour une amorce, on estime la taille de chaque fragment d'ADN en comparant la distance de migration après électrophorèse avec celle des fragments du marqueur de poids moléculaire. Pour chacune des souches, on recherche toute bande qui corresponde à une taille de fragment sélectionné. Un profil d'amplification est alors établi en codant 1 chaque présence d'une bande, et 0 chaque absence. En regroupant les données de chaque amorce, on construit ainsi une matrice constituée de 0 et de 1 qui forment un code (haplotype) pour chaque souche.

- **Construction d'un dendrogramme**

A l'aide du programme MATRIX, une matrice de distances génétiques des souches à été produite en calculant l'indice Simple Matching (Apostol *et al.*, 1993) :

$$(n_{11} + n_{00}) / n ,$$

$n$  étant le nombre total de loci,  $n_{11}$  le nombre de bandes présentes chez les deux individus,  $n_{00}$  le nombre de bandes absentes chez les deux individus.

Cette matrice a servi à construire un arbre par la méthode d'agrégation (Cluster Analysis) par les moyennes non-pondérées, ou « UPGMA ».

Il est important de noter ici qu'une telle démarche est normalement prévue pour étudier les relations phylogénétiques entre espèces différentes. Deux hypothèses fortes sont en défaveur de l'application de cette méthode à l'étude d'individus d'une même espèce : les individus/espèces sont supposées évoluer indépendamment les uns des autres, ce qui ne peut être le cas pour des individus d'une même population que s'ils sont issus d'un unique clone ; les loci divergent uniformément (hypothèse de l'horloge moléculaire, imposée par le fait qu'on ne connaît pas la nature des loci). Une autre méthode de construction phénétique permet d'éviter la seconde hypothèse : le classement « hiérarchique » des individus en un arbre « Neighbour Joining Tree ». Les regroupements étant similaires à ceux produits par la méthode UPGMA, c'est cette dernière qui est finalement utilisée pour sa plus grande commodité de lecture.

• *Analyse de la diversité des échantillons*

- indice de diversité H, d'après Nei (1978) :

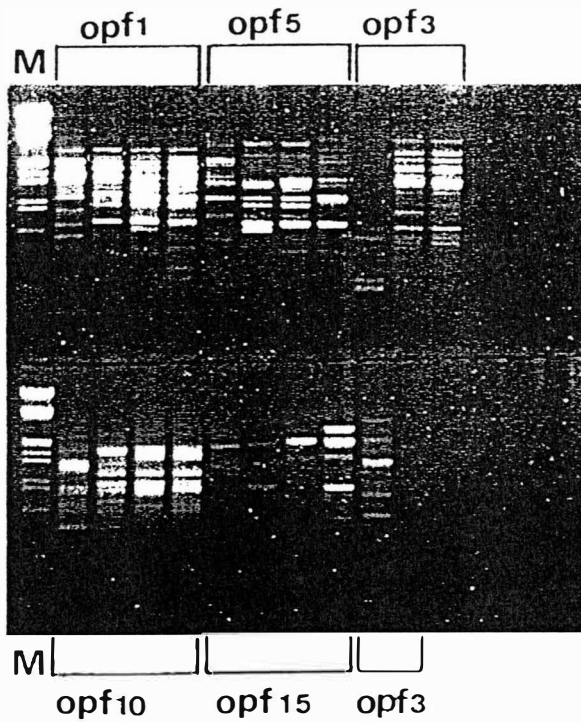
$$H = 1/r \sum_j (2n / 2n - 1) (1 - \sum_i x_{ij}^2)$$

avec  $x_{ij}$  la fréquence de l'allèle  $i$  au locus  $j$ ,  $n$  l'effectif de l'échantillon étudié, et  $r$  le nombre de loci étudiés.

- le déséquilibre gamétique : nous avons employé pour son estimation le logiciel GENEPOP (Raymond et Rousset, 1995 a) qui teste pour chaque paire de loci l'hypothèse nulle : « le génotype d'un locus est indépendant du génotype de l'autre locus ». Les valeurs des probabilités  $P$  du test exact de cette hypothèse (Raymond & Rousset, 1995 b) sont comparées au seuil de 5 % corrigé par la procédure de Bonferroni (Rice, 1989). Au préalable, les loci qui ont des fréquences alléliques supérieures à 0,75 ou inférieure à 0,25 sont éliminées de l'échantillonnage pour éviter tout biais dans l'estimation du déséquilibre gamétique.

- la structuration de la diversité génétique des souches : le logiciel GENEPOP calcule le  $F_{st}$  de Wright (Weir & Cockerham, 1984), après avoir « diploïdisé » les allèles à chaque locus.

- la différenciation des populations les unes par rapport aux autres : le logiciel donne la valeur  $P$  de la probabilité du test exact de l'hypothèse « les allèles sont distribués indépendamment de leur répartition en sous-populations distinctes » pour chaque locus. L'information de chaque loci ( $j$ ) est combinée en une valeur  $(-2 \sum_j \log(P_j))$  qui suit une loi du  $\chi^2$  à  $2r$  degrés de liberté ( $r$  = nombre de loci testés, d'après Fisher, 1970).



**Planche 6** Tests d'amorces. 5 amorces (Opéron Technology, Kit F) sont ici testées sur l'ADN de 4 souches. Les amplifications ont été réalisées sur Thermojet (EquiBio).  
M = Marqueur de poids moléculaire (Phage  $\lambda$  digéré par EcoR I et Hind III).



# RESULTATS

## 1/ ETABLISSEMENT DES PROFILS D'AMPLIFICATION RAPD

### • *Isolements et cultures*

147 souches de *C. gloeosporioides* ont pu être isolées à partir des prélèvements foliaires effectués dans chacun des sites échantillonnés. Mais toutes n'étaient pas pures. Certains des contaminants n'ont pu être éliminés malgré l'utilisation de différentes techniques de purification, réduisant l'échantillonnage à 125 souches. En outre, nous avons observé une variabilité importante de la morphologie des thalles en culture sur PDA (voir Planche 2).

### • *Extraction de l'ADN*

Comme précisé dans Matériels et Méthodes, deux protocoles d'extraction d'ADN ont été testés. En effet, dans le protocole de Lee *et al.* (1988), la précipitation de l'ADN était fréquemment accompagnée d'une précipitation de polysaccharides. Pour pallier à cet inconvénient, nous avons testé le protocole au CTAB qui produisit un faible rendement d'ADN extrait, qui plus est, difficilement soluble une fois précipité. Ce dernier a donc été abandonné, tout en sachant que les polysaccharides risquaient de gêner les réactions d'amplifications. Néanmoins, les ADN d'une vingtaine de souches traitées par ce protocole ont été utilisés pour les amplifications, après avoir vérifié que la technique d'extraction ne modifiait pas les résultats d'amplification.

### • *Choix des amorces*

Plusieurs amorces OPF (Opéron Technology, kit F) ont été présélectionnées (Kohler *et al.*, 1995), et nous en avons testé d'autres (Planche 6). Celles qui ont été retenues (OPF 3, 9 et 10) mettent en évidence un polymorphisme d'amplification notable mais pas excessif (c'est à dire qu'on doit pouvoir identifier suffisamment de bandes polymorphes, mais pour pouvoir les distinguer correctement, celles-ci ne doivent pas être trop nombreuses).

### • *Choix des bandes RAPD*

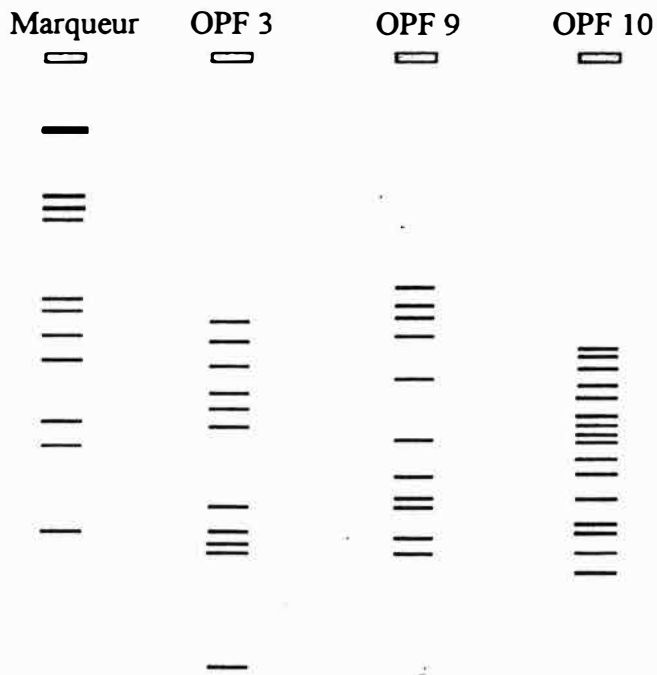
Pour chacune des amorces utilisées, un polymorphisme important a été observé entre les profils d'amplification des souches, avec un grand nombre de fragments amplifiés par amorce (autour de 15 en général) de taille différente (de 3500 à 200 pb environ).

Les bandes ont été sélectionnées de façon à ce que chacune d'entre elles puisse être distinguées facilement. Chaque bande choisie pour l'analyse est donc suffisamment intense pour que sa présence (ou son absence) soit indiscutable, et doit être suffisamment différente des autres (il s'agit surtout de ne pas considérer deux fragments de tailles trop peu différentes comme appartenant à un même locus). La fig. 3 représente les bandes choisies (elles sont toutes situées entre 2400 et 200 pb). La taille de chaque fragment amplifié peut être estimée en

**Fig. 3 :** Représentation schématique des bandes sélectionnées pour chaque amorce.

Marqueur : Phage  $\lambda$  digéré par EcoR I et Hind III.

Les rectangles gris représentent les puits du gel (*i.e.* le point de départ de la migration de l'ADN lors de l'électrophorèse).



comparant sa position sur le gel à celles des fragments connus du marqueur de poids moléculaire.

Au total 42 bandes ont été sélectionnées, dont 11 pour OPF 3, 15 pour OPF 9 et 16 pour OPF 10. 48 profils ont ainsi pu être déterminés, 76 pour OPF 9, et 81 pour OPF 10. Tous ces fragments, pour chaque amorce, sont codés de la façon suivante : OPF (numéro de l'amorce)-(numéro du locus) (exemple : opf 9-3 = 3<sup>e</sup> fragment le plus long amplifié par OPF 9). Aucun de ces fragments n'est monomorphe à l'échelle de l'ensemble de l'échantillonnage.

• *Vérification du concept « chaque bande d'un profil correspond à un locus différent »*

Afin de vérifier que tous les fragments d'ADN de même longueur amplifiés chez différentes souches correspondent bien à un même allèle d'un même locus, nous avons réalisé une expérience d'hybridation de l'ADN amplifié avec des sondes radioactives produites à partir de fragments d'ADN amplifiés de la même façon. Cette expérience, préconisée par Pillay & Kenny (1995) et Rieseberg (1996), n'a pu être conduite que pour l'amorce OPF 9, dont 4 fragments ont été marqués à partir de l'amplification de l'ADN de la souche Y 8A : OPF 9-5 (1610 pb), -7 (1070 pb), -10 (800 pb) et -15 (445 pb) (Planches 7, 8, 9 et 10, dans lesquelles les fragments sont cités par leur taille, au lieu de leur numéro). Nous les avons choisis en partie parce qu'ils sont très bien représentés dans toutes les populations (cas de OPF 9-5 et -10), ou parce qu'ils se rencontrent surtout dans certaines populations (cas de opf 9-7 et -15).

Note : les fragments sont cités à présent par leur taille (en paire de bases) au lieu de leur numéro, pour faciliter le repérage des bandes sur les différents gels.

La bande OPF9-445 n'est marquée que pour les souches Y 8A, ILP6 6B et ILP5 2 (Planche 7). Ce qui signifie que la sonde s'hybride bien avec tous les fragments de même longueur, et uniquement ceux-ci. Il s'agit donc bien d'un même locus à deux allèles (présence/absence).

Par contre, la sonde préparée à partir de l'ADN de la bande OPF9-800 ne s'hybride pas avec tous les fragments de même longueur : il n'y a pas eu de marquage des fragments OPF 9-800 des souches TAN 5A, 9A et (pour laquelle une bande est bien visible, malgré la faiblesse de l'amplification ; voir Planche 8). Il s'agit donc de fragments de même taille, mais contenant une information génétique différente. De plus, cette sonde s'hybride avec les fragments -800 et -680. Ceci suggère, d'une part, qu'une bande contient en plus des fragments d'ADN de longueur plus courte, d'autre part, que les fragments OPF 9-800 et -680 possèdent une séquence très similaire qui nous autorise à les considérer comme deux allèles d'un même locus.

Pour la bande OPF9-1070, on n'observe aucun marquage des fragments de longueur correspondante, excepté le témoin positif (Y 8A) qui n'a pas été amplifié et qui n'est pas du tout marqué (Planche 9). C'est à dire que la sonde ne reconnaît aucun des fragments de même taille qu'elle-même. Or, en regardant avec plus d'attention une photographie du gel, on s'aperçoit que pour Y 8A, cette bande a légèrement moins migré que pour les autres souches. Il s'agit donc d'un locus différent, qui n'existerait que chez Y 8A. Enfin, de même que pour la sonde précédente, celle-ci s'est hybridée avec toutes les bandes inférieures, confirmant qu'une bande amplifiée séparée par électrophorèse contient les fragments de taille correspondante, plus tous ceux de taille inférieure.

Il en est de même pour la bande OPF 9-1610 qui, de plus, avait été purifiée avec un très faible rendement (Planche 10). Peut être aussi que la quantité de fragments d'ADN de haut

Fig. 4 : Dendrogramme « UPGMA » construit sur la base de la similarité des profils d'amplification (indice de similarité « Simple Matching »), estimée à partir de la matrice (0/1) complète. La règle indique les pourcentages de similarités représentés par les longueurs de branches.

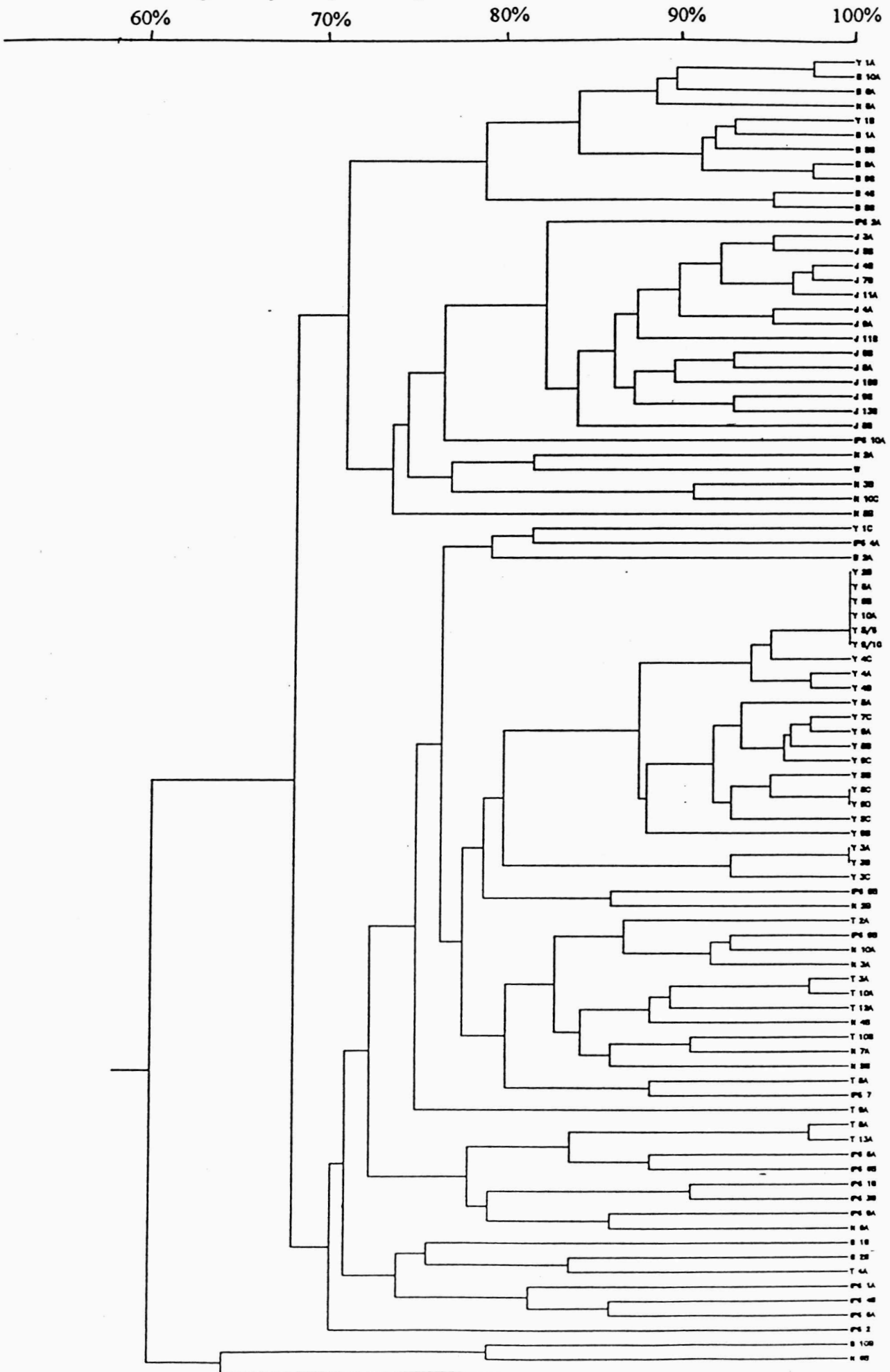
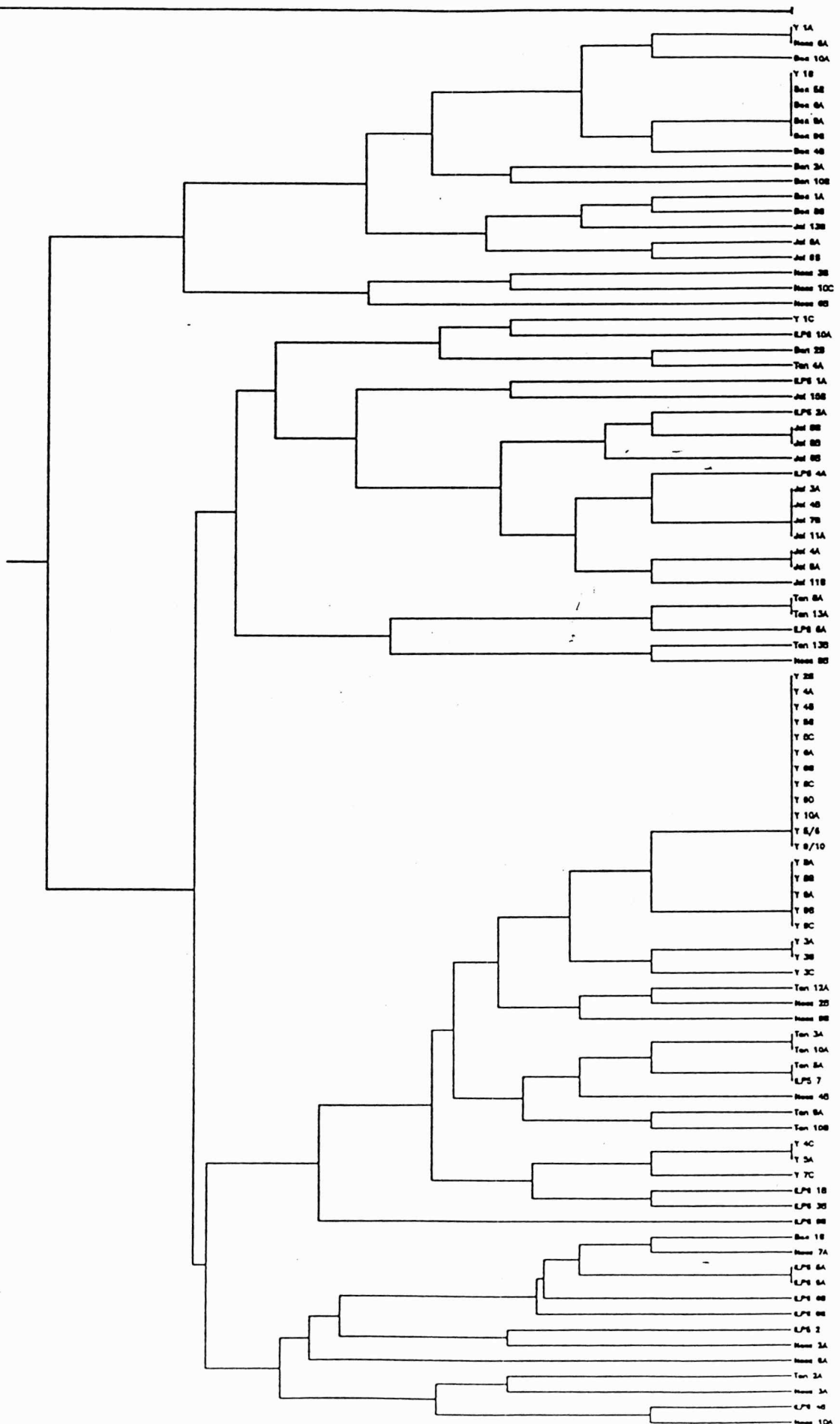


Fig. 5 : Dendrogramme « UPGMA » construit sur la base de la similarité des profils d'amplification (indice de similarité « Simple Matching »), estimée à partir de la matrice (0/1) ne contenant que les loci ayant des fréquences alléliques comprises entre 0,25 et 0,75.



**Tableau 1 :** Indices de diversité de Nei (1978), H, pour chaque population

Population	Y	BAN	NESS	ILP6	ILP5	TAN	JOL
H	0,24	0,28	0,46	0,41	0,4	0,36	0,28

**Tableau 2 :** Structuration des populations sur la base du Fst (comparaisons par paires de populations). Les étoiles indiquent la significativité du test exact de la distribution des allèles dans les deux populations comparées

\*\*\* hautement significatif  
 \*\* assez significatif  
 ns non significatif

	Y	BAN	NESS	ILP6	ILP5	TAN
BAN	Fst = 0,54 ***					
NESS	Fst = 0,29 ***	Fst = 0,32 ***				
ILP6	Fst = 0,22 ***	Fst = 0,34 ***	Fst = 0,03 n.s.			
ILP5	Fst = 0,03 n.s.	Fst = 0,39 **	Fst = 0,41 n.s.	Fst = 0,02 n.s.		
TAN	Fst = 0,19 ***	Fst = 0,42 ***	Fst = 0,04 n.s.	Fst = 0,06 n.s.	Fst = 0,04 n.s.	
JOL	Fst = 0,29 ***	Fst = 0,34 ***	Fst = 0,27 ***	Fst = 0,22 ***	Fst = 0,35 **	Fst = 0,36 ***

poids moléculaire transférée sur la membrane était insuffisante pour l'hybridation (mauvaise qualité du transfert). Quoi qu'il en soit, il subsiste un doute quant à ce locus qui nous impose son élimination de notre analyse.

Les résultats de cette expérience nous ont conduit à éliminer de notre analyse les bandes OPF 9-1610, -1070, -800 et -680. Il ne reste donc que 38 bandes (celles qui sont représentées en Fig. 3), soit 38 loci.

### 3/ LA STRUCTURATION GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS

#### • *Le dendrogramme*

Le dendrogramme produit à partir des distances génétiques calculées à partir de la matrice 0/1 sur les 38 loci (Fig. 4) montre une diversité importante (peu de souches ont le même profil : 6 souches de Yaté sont identiques, plus 2 couples de souches de Yaté et Jolamuna, toutes les autres souches ont un profil original). L'indice de similarité entre les souches les plus différenciées est faible (61 %). Cependant, la majorité des souches présente un minimum de 66 % de similarité. On n'observe pas de structuration géographique forte de la diversité génotypique.

On distingue trois groupes principaux : un groupe externe contenant une majorité des souches de Bangou avec un minimum de 77 % de similarité entre elles, et deux groupes plus proches contenant chacun une des populations Yaté ou Jolamuna, indiquant une forte homogénéité des profils d'amplification. Les souches sont bien regroupées sur des branches voisines et courtes, avec plus de 83 % de similarité indiquant une proximité génotypique importante des souches au sein de leur population respective. En revanche, les souches de l'Ile des Pins, de Tanna et de Nessadiou sont plus éparpillées dans l'arbre, montrant une plus importante hétérogénéité de ces populations qui n'apparaissent pas nettement structurées.

Un second dendrogramme a été construit selon le même principe, mais uniquement à partir des loci dont les fréquences alléliques sont comprises entre 0,25 et 0,75 (voir Matériel et Méthodes, § 6, pour la justification). Il n'indique pas une plus grande structuration (Fig. 5). Au contraire, les populations dont les individus étaient bien regroupés sur des branches voisines du dendrogramme construit avec tous les loci sont ici éparpillés sur des branches plus lointaines. Ici, ces populations (Yaté, Jolamuna et Bangou) sont plus écartées, bien qu'on trouve d'avantage d'individus portant le même haplotype.

#### • *Indice de diversité*

L'indice de diversité  $H$  (Nei, 1978) calculé sur les 9 loci pour lesquels les fréquences alléliques sont comprises entre 0,25 et 0,75, vaut 0,45 pour l'ensemble de l'échantillonnage. Lorsqu'on le calcule par population (voir tableau 1), on peut alors distinguer deux groupes : les populations peu diversifiées, pour lesquelles  $H$  est voisin de 0,25 (Yaté, Jolamuna et Bangou), et les populations diversifiées, pour lesquelles  $H$  est voisin de 0,4 (Ile des Pins 5 et 6, Nessadiou et Tanna). Ces résultats viennent confirmer les variations de diversité des populations montrée par le dendrogramme.

- *La structuration de la diversité*

Le programme GENEPOP n'indique pas de déséquilibre de liaison entre les 9 loci retenus sur tout l'échantillonnage (de fréquences alléliques comprises entre 0,25 et 0,75).

Le calcul du  $F_{st}$  (toujours sur ces 9 loci uniquement) donne une valeur globale de 0,27 (avec un maximum de 0,48 pour le locus OPF 3-9, et un minimum de 0,11 pour OPF 9-4). Ceci indique une structuration élevée de la diversité génétique de notre échantillon. Le tableau 2 indique les comparaisons par paires de populations. Les étoiles indiquent le niveau de significativité du test de Fisher sur les probabilités du test de l'hypothèse nulle « les allèles sont distribués indépendamment de leur répartition en deux sous-populations ». Ceci correspond en fait à la significativité d'une différenciation éventuelle des populations comparées. On vérifie ainsi que les paires de populations qui ont un  $F_{st}$  important sont en général significativement différenciées, *et vice versa*. La significativité du test de Fisher sur la distribution des allèles apporte un poids statistique à la valeur de  $F_{st}$ .

Les populations différenciées sont Bangou, Jolamuna et Yaté (sauf avec Ile des Pins 5). L'île des Pins 5 et 6, Nessadiou et Tanna ne sont pratiquement pas différenciées entre elles ( $F_{st}$  de l'ordre de 0,03, et distribution des allèles indépendante de l'existence de populations géographiquement distinctes).

Lorsqu'on recentre l'échantillonnage sur la Nouvelle Calédonie uniquement, on ne trouve toujours pas de déséquilibre de liaison, et la valeur du  $F_{st}$  est sensiblement la même (0,28). Par contre, lorsqu'on inclut la population de Tanna, le  $F_{st}$  est légèrement réduit à 0,25. Cette différence n'est sans doute pas significative, et est vraisemblablement due au fait que Tanna est une population très diversifiée, qu'on retrouvait très dispersée sur le dendrogramme.



## DISCUSSION

L'objectif de ce stage de DEA était d'estimer la diversité des populations du champignon *C. gloeosporioides*, pathogène du caféier, et leur structuration dans la zone du Pacifique Sud (N<sup>lle</sup> Calédonie, Vanuatu et Papouasie-N<sup>lle</sup> Guinée). Ce champignon haploïde est connu pour sa variabilité morphologique et pathogénique, et les données de terrain révèlent de fortes variations en termes d'épidémiologie.

La présente étude confirme ces données en révélant par les marqueurs RAPD une diversité haplotypique et allélique importante ( $H = 0,45$ ) sur l'ensemble des 125 souches analysées, et dans chaque population étudiée ( $0,2 < H < 0,4$ ). La structuration de la diversité est donc forte sur l'ensemble des populations ( $F_{st} = 0,27$ ). Certaines populations sont différenciées (Jolamuna, en Papouasie-N<sup>lle</sup> Guinée, Yaté et Bangou en N<sup>lle</sup> Calédonie). Mais on observe aussi des populations non-différenciées : Ile des Pins 5 et 6 et Nessadiou en N<sup>lle</sup> Calédonie et Tanna aux Vanuatu (qui est à quelques 500 km de la Grande Terre, l'île principale de N<sup>lle</sup> Calédonie) ont des  $F_{st}$  négligeables lorsqu'on les compare entre elles.

Nous n'avons pas détecté de déséquilibre gamétique significatif (pour 9 loci), ni de locus monomorphe sur l'ensemble de l'échantillonnage. Plusieurs questions se posent alors pour expliquer à la fois une importante diversité, une forte structuration globale, mais avec quelques populations non-différenciées, et une absence apparente de déséquilibre de liaison : existe-t-il de la recombinaison génétique ? Y a-t-il des migrations importantes entre populations ? S'agit-il de populations récentes ayant un ancêtre commun ?

### • La recombinaison

Pour expliquer cette importante diversité, une des hypothèses possibles est l'existence d'un taux de recombinaison élevé, donc de la reproduction sexuée ou de la parasexualité (c'est à dire, la capacité des souches à former des hétérokaryons, par anastomose des hyphes, qui subissent ensuite rapidement l'équivalent d'une méiose, avec donc échange de matériel génétique). Des études préliminaires (Kohler *et al.*, 1995) ont montré que pour 10 souches étudiées en N<sup>lle</sup> Calédonie, il existait 9 groupes de compatibilité végétative (VCG). A titre de comparaison, Katan et Shabi (1996) ont trouvé que les 70 souches de *C. gloeosporioides* isolées sur amandes dans 11 sites en Israël ne forment qu'un seul VCG. Cette diversité des VCG pourrait limiter sensiblement les possibilités de recombinaison par la parasexualité. Nous devons donc considérer la reproduction sexuée comme hypothèse majeure pour expliquer une telle diversité.

Or, une des idées présupposées était que *C. gloeosporioides*, champignon haploïde produisant beaucoup de spores végétatives, se propage principalement à l'aide de ces dernières, par reproduction asexuée. On n'a d'ailleurs jamais observé la forme sexuée, *Glomerella cingulata*, au champ. Elle apparaît sur milieu artificiel sans qu'on puisse la prévoir.

50 Km

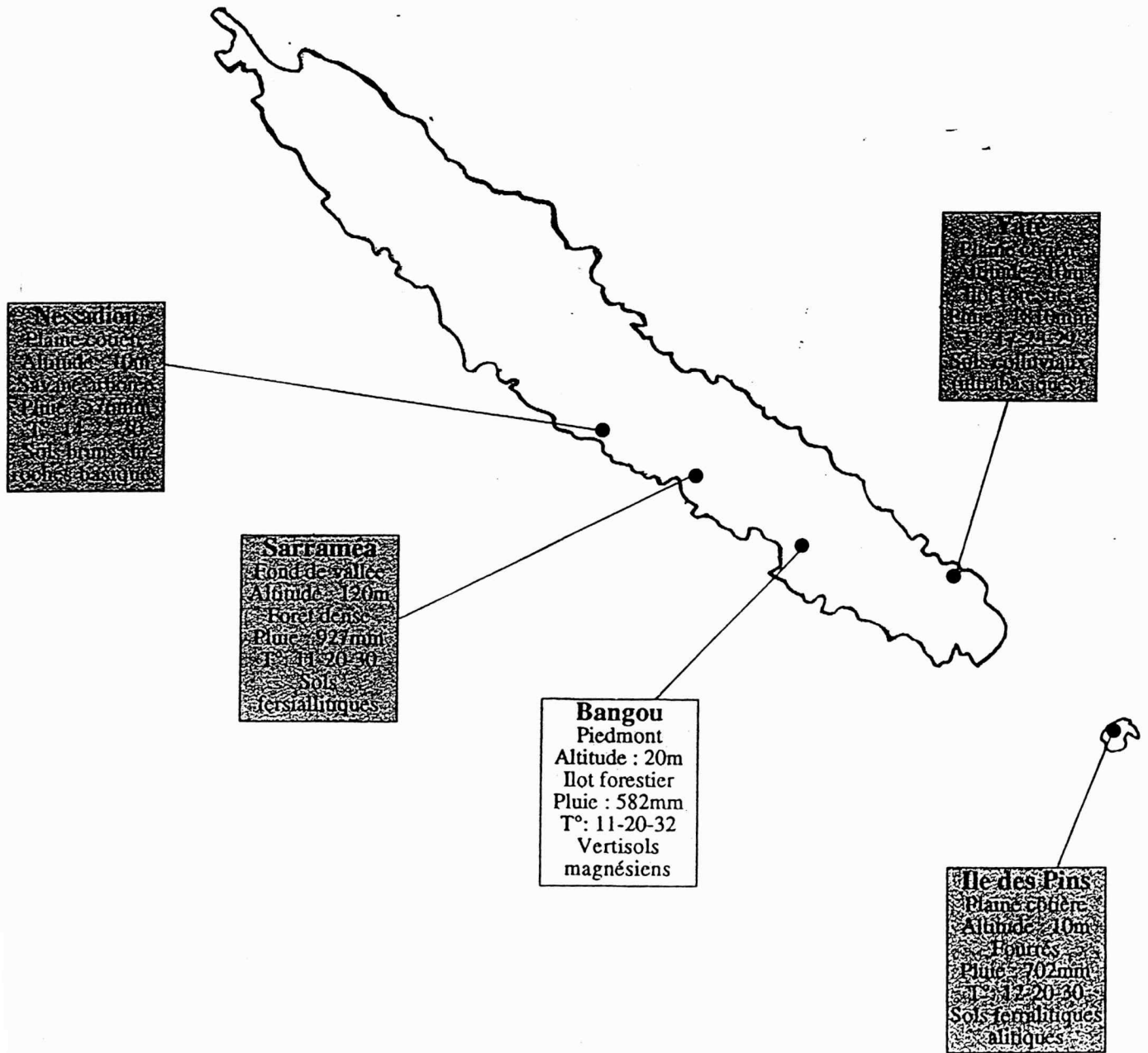


Fig.6 : Localisation et caractéristiques écologiques des sites de Nouvelle Calédonie.

La population de Yaté, qui est très homogène, avec un haplotype qui se retrouve chez plusieurs souches, peut faire penser à une structure dans laquelle la reproduction végétative est importante. Il en est de même pour Jolamuna (de Papouasie). Par contre, la population de Bangou est très différenciée, mais très diversifiée (voir dendrogramme fig.4), et on peut douter qu'une part de reproduction végétative y soit prépondérante.

- *Les migrations*

Les migrations pourraient permettre d'expliquer l'absence de structuration de certaines populations, mais la présence de deux populations différenciées (Bangou et Yaté) au milieu d'autres non-différenciées est un argument fort contre cette explication. L'Ile des Pins, l'île de Tanna et la Grande Terre sont séparées par l'océan. Donc, s'il y a des migrations entre ces sites au point d'empêcher une structuration des populations, c'est que celles-ci se font par les airs. Or comment, dans ce cas expliquer la différenciation de Bangou et de Yaté qui sont plus rapprochées de Nessadiou et de l'Ile des Pins que de Tanna ?

Cette ambiguïté sera difficilement levée car on ne sait rien de la dispersion des spores de *C. gloeosporioides*. A très courte distance, on invoque les éclaboussures des gouttes de pluies qui, en tombant sur un acervule, se chargent de spores qui peuvent infecter les arbres de proche en proche. Mais on ne sait pas si ces spores réussissent à s'implanter facilement (aucun test d'innoculation n'a encore pu conduire de façon reproductible à une apparition de symptômes), et on ne connaît pas de mécanisme décrivant la dispersion à plus grande échelle.

Une possibilité pourrait être étudiée : la dispersion des ascospores. En effet, chez certains Ascomycètes, les spores végétatives peuvent être très peu dispersées, contrairement aux ascospores qui seraient dispersées sur des plus longues distances (Ruey-Shyang & McDonald, 1996). On ne connaît pas assez la biologie de *C. gloeosporioides* pour garantir que ce pourrait être un mécanisme expliquant la forte diversité générale, et les ressemblances entre souches pourtant isolées dans des sites géographiquement éloignés.

- *Un ancêtre commun récent ?*

Pour les populations de l'Ile des Pins, de Tanna et de Nessadiou au moins, on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit de populations ayant peu divergé, ou été fondées récemment par un ancêtre commun. Cette hypothèse est séduisante pour expliquer les ressemblances entre souches provenant de sites géographiques distincts. Mais elle n'explique pas le niveau de diversité.

- *Un effet fondateur ?*

Il est possible qu'une parcelle faiblement diversifiée comme Yaté ait été colonisée par un petit nombre de spores. Si on reconnaît qu'une part importante de la reproduction se réalise en mode asexué, la population de champignon aurait pu rapidement traverser un goulot d'étranglement localisé à la parcelle, avec en conséquence un effet majeur de la dérive. McCain *et al.* (1992) et Hamelin *et al.* (1995) ont évoqué ce mécanisme pour expliquer qu'une population soit différenciée parmi un ensemble de populations non-différenciées. Il faudrait néanmoins que les migrations entre populations soient différentes selon les sites. De plus, une part de reproduction sexuée paraît nécessaire pour expliquer la forte variabilité des populations de Yaté et Jolamuna, et surtout de Bangou.

Tableau 3 : Types variétaux des caféiers.

B = phénotype bourbon

T = phénotype *typica*

Bt = hybride à dominante bourbon

bT = hybride à dominante *typica*

\* indique que le génotype est légèrement différent de l'ensemble lorsque celui-ci est homogène

Arbres	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Yaté	B*	-	B	-	B	-	B	-	B	-
Bangou	-	B	-	-	T	T	-	T	-	B
Nessadiou	T	T	B	bT	B	Bt	B	Bt	B	B

- *Relations avec les données de génétique des caféiers*

Sur le tableau 3 figurent les types variétaux des caféiers hôtes, détectés à l'aide de marqueurs RAPD (Lashermes, données non-publiées). Ce qu'on remarque d'emblée, c'est que les deux populations homogènes de *C. gloeosporioides* (Yaté et Jolamuna) sont issues de deux parcelles homogènes quant à la variété du caféier. Il est même étonnant de noter que le seul arbre (Y 1) qui diverge un peu des autres dans la parcelle de Yaté abrite des souches très différentes de toutes les autres. On peut donc imaginer qu'un parasite (plus agressif ou meilleur compétiteur tout simplement) ait envahi la parcelle.

En revanche, la parcelle de Bangou possède les deux variétés Bourbon et Typica. Ceci pourrait expliquer que si cette population est différenciée, elle n'en n'est pas pour autant homogène (longueur de branches importantes sur le dendrogramme, indiquant des similarités pouvant être inférieures à 80 %). La population la plus intéressante étant Nessadiou, très diversifiée pour *C. gloeosporioides*, dans laquelle on trouve les deux variétés de caféier, plus des hybrides entre les deux constituant une gamme de phénotypes hôtes.

Il semble donc que le génotype de l'hôte puisse avoir un effet majeur sur l'importance de la diversité intrapopulationnelle. Cependant, nous ne disposons pas de données suffisantes pour conclure quantitativement.

- *Relations avec les données écologiques et épidémiologiques*

La carte représentée en fig. 6 résume une partie des données écologiques des sites. On peut remarquer une certaine hétérogénéité dans la répartition des pluies, des écarts de températures et de la qualité des sols. L'environnement des parcelles est aussi variable (savanne, fourrés, forêt).

Comme rappelé en introduction, *C. gloeosporioides* nécessite de l'humidité pour se développer (de l'eau libre). Lamouroux *et al.* (1995) et Pellegrin *et al.* (1995) ont montré que l'importance de l'anthracnose n'était pas spécialement liée à une pluie abondante. En revanche, des caractéristiques comme les écarts de températures, la densité du feuillage et un ombrage insuffisant sont d'avantage corrélés à une prédominance de l'anthracnose sur les autres maladies. L'intensité de la maladie observée dans un site ne semble corrélée en aucune façon à la diversité du *C. gloeosporioides* (voir annexe V pour les notes épidémiologiques de chaque arbre hôte). En fait, il y a sans doute trop de facteurs qui définissent la pathogénicité (génotype de l'hôte, conditions environnementales, présence d'autres pathogènes...) pour qu'on puisse trouver des relations précises sans une analyse statistique fine (voir Lamouroux *et al.*, 1995 et Pellegrin *et al.*, 1995).

L'importance des facteurs écologiques sera étudiée en détail prochainement, en particulier à l'aide de modèles de comparaisons de tableaux croisés (méthodes développées actuellement à l'ORSTOM Noumea par Nandris et Pellegrin, et à l'université de Lyon par Chessel).

## CONCLUSION - PERSPECTIVES

L'étude de la diversité génétique de *C. gloeosporioides*, champignon au large spectre d'hôtes, extrêmement variable dans sa morphologie et sa pathogénicité, a permis de montrer que les populations naturelles de souches infestant le caféier dans le Pacifique Sud sont très diversifiées. Les résultats de notre étude, associés aux données épidémiologiques et biologiques du pathogène, tendraient à expliquer le taux de variabilité génétique observé par l'existence d'un taux élevé de recombinaison, lié à la reproduction sexuée. Les populations différenciées, moins diversifiées, présenteraient une part de reproduction végétative notable. En revanche, il n'est pas possible de conclure quant à l'importance des flux migratoires entre populations ; nos connaissances des modes de dispersion sont encore insuffisantes.

L'emploi des marqueurs RAPD permettent à présent d'analyser de nombreuses souches en peu de temps. Il devrait donc être possible d'augmenter l'échantillonnage, en particulier pour réaliser un suivi dans le temps, et étudier *C. gloeosporioides* sur les hôtes autres que le caféier et qui entourent généralement une plantation (papayer, manguiers, agrumes...). L'intérêt serait alors d'avoir des renseignements sur la structure temporelle de la diversité, et si des hôtes intermédiaires assurent un relais au cours du cycle cultural du café.

Il sera également fort intéressant d'augmenter les connaissances sur la diversité génétique des caféiers, en particulier pour l'inclure dans les modèles prédictifs en cours d'élaboration, et aussi pour déterminer plus clairement les relations qui existent entre *C. gloeosporioides* et son hôte. Des études du pouvoir pathogène viendraient affiner l'analyse.

Enfin, il serait également intéressant d'améliorer nos connaissances de la biologie et de l'écologie de *C. gloeosporioides*. La connaissance du mode de dissémination permettrait de mieux comprendre les mécanismes du maintien de la diversité et de sa structuration, et serait d'un intérêt fondamental dans l'étude épidémiologique de ce champignon pathogène. Il serait utile enfin d'avoir une preuve de la recombinaison au champ, en observant la reproduction sexuée (ou la parasexualité) dans les conditions naturelles.

## BIBLIOGRAPHIE

- Apostol B. et al., 1993** : Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers : applications to the mosquito *Aedes aegypti*. Theo. and Appl. Genet., 86 : 991-1000.
- Arnau J., Housego A. & Oliver R., 1994** : The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. Curr. Genet, 25 : 438-44.
- Arx J. von, 1957** : Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopathol. Z., 29 : 413-468.
- Bonde M., Peterson G. & Maas J., 1991** : Isozyme Comparisons of *Colletotrichum* Species Pathogenic to Strawberry. Phytopath., 81 : 1523-1528.
- Bryson R., Caten C., Hollomon D. & Bailey J., 1992** : Sexuality and Genetics of *Colletotrichum*. In *Colletotrichum* : Biology, Pathology and Controle. Ed. par Bailey J. & Jeger M.. British Society of Plant Pathology. Chap. 2 : 27-46.
- Coste R., 1989** : Caféiers et cafés, Techniques Agricoles et Productions Tropicales. Ed. Maisonneuve t Larose, 373 pp.
- Dodd J., Estrada A. & Jeger M., 1992** : Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics. In *Colletotrichum* : Biology, Pathology and Controle. Ed. par Bailey J. & Jeger M.. British Society of Plant Pathology. Chap. 16 : 308-325.
- Fisher R., 1970** : Statistical Methods for Research Workers. 14<sup>th</sup> Edit. Oliver & Boyd, Edinburgh
- Freeman S., Katan T. & Shadi E., 1996** : Characterisation of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates from Avocado and Almond Fruits with Molecular and Pathogenicity Tests. Appl. and Env. Microbiol., 62 (3) : 1014-1020.
- Geiger J.P., Lourd M. & Huguenin B., 1980** : Les colletotrichum agents d'Anthracnose en Côte d'Ivoire. II- Polymorphisme enzymatique dans une collection d'isolâts de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.. Ann. Phytopath., 12 (3) : 177-191.
- Gosselin L., Jobidon R. & Bernier L., 1995** : Assessment of genetic variation within *Chondrostereum purpureum* from Quebec by random amplified polymorphic DNA analysis. Mycol. Res., 100 (2) : 151-158.
- Hadrys H., Balick M. & Schierwater B., 1992** : Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Molecular Ecology, 1 : 55-63.

- Hamelin R., Beaulieu J. & Plourde A., 1995 :** Genetic diversity in populations of *Cronartium ribicola* in plantations and natural stands of *Pinus strobus*. Theor. Appl. Genet., 91 : 1214-1221.
- Hodson A., Mills P. & Brown A., 1993 :** Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphism in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. Mycol. Res., 97 (3) : 329-335.
- Jacobson K., Miller O. & Turner B., 1993 :** Randomly amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. Proc. Natl. Acad. Sci., 90 : 9159-9163.
- Katan T. & Shadi E., 1996 :** Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from almond in Isarel. Europ. J. of Plant Pathol., 102 : 597-600.
- Kohler F., Lourd M., Bresson E., Fernandez D. Nandris D. & Pellegrin F., 1995 :** Etude de la diversité des champignons pathogènes du caféier à l'aide de marqueurs moléculaires, enzymatiques et morphologiques. ASIC, 16<sup>e</sup> Colloque, Kyoto.
- Kushalappa A., Akutsu M., Oseguera S., Chaves G., Melles C., Mirande J. & Bartolo J.F., 1984 :** Equation for predicting the the rates of coffee rust development based on net survival ratio for monocycliques process of *Hemileia vastatrix*. Fitopatol. Bras., 9 : 255-271.
- Kushalappa A. & Lagesse R., 1981 :** LEAFAL : A Computer Program for Quantitative Analysis of Leaf Fall in Coffee Principaly from Rust. Phytopathol. Z., 101 : 97-105.
- Lamouroux N., Pellegrin F., Nandris D. & Kohler F., 1995 :** The *Coffea arabica* Fungal Pathosystem in New Caledonia : Interactions at Two Different Scales. J. Phytopath., 143 : 403-413.
- Lee S., Milgroom M., & Taylor J., 1988 :** A rapid, high yield miniprep method for isolation of total genomic DNA from fungi. Fungal Genetics Newsletter, 35 : 23-24.
- Liyanage H., McMillan R. & Corby Kistler Jr. and H., 1992 :** Two Genetically Distinct Populations of *Colletotrichum gloeosporioides* From *Citrus*. Phytopath., 82 : 1371-1376.
- Lourd M., Geiger J.P. & Goujon M., 1979 :** Les *Colletotrichum* agents d'Anthracnoses en Côte-d'Ivoire. I- Caractéristiques morpholgiques et culturales de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.. Ann. Phytopath., 11 (4) : 483-495.
- McCain J., Groth J. & Roelfs A., 1992 :** Inter- and intrapopulation isozyme variation in collections of bean rust fungus, *Uromyces appendiculatus*. Mycology, 84 : 329-340.
- Manners J., Masel A., Braithwaite K. & Irwin J., 1992 :** Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides*, Pathogenic on the Tropical Pasture Legume *Stylosanthes*. In *Colletotrichum : Biology, Pathology and Controle*. Ed. par Bailey J. & Jeger M. British Society of Plant Pathology. Chap. 13 : 250-268.



- Mills P., Hodson A. & Brown A., 1992 a** : Molecular Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates Infecting Tropical Fruits. In *Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control. Ed. par Bailey J. & Jeger M.. British Society of Plant Pathology. Chap. 14 : 269-288.
- Mills P., Sreenivasaprasad S. & Brown A., 1992 b** : Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *Microbiology Letters*, 98 : 137-144.
- Nei M., 1978** : Estimation of average heterozygosity and genetic distances from small number of individuals. *Genetics*, 89 : 583-590.
- Pellegrin F., Nandris D., Waestrelin S. & Kohler F., 1995** : Situation pathologique des *arabica* en Nouvelle Calédonie, corrélations entre pathogénèse et environnement. ASIC, 16<sup>e</sup> Colloque, Kyoto. 690-697.
- Pillay M. & Kenny S., 1995** : Anomalies in Direct Pairwise Comparisons of RAPD Fragments for Genetic Analysis. *BioTechniques*, 19 : 694-698.
- Raymond M. & Rousset F., 1995 a** : GENEPOP (version 1.2) : A population software for exact tests and eucumenism. *Journal of Heredity*, 86 : 248-249.
- Raymond M. & Rousset F., 1995 b** : An exact test for population differentiation. *Evolution*,
- Rice W., 1989** : Analysing tables of statistical tests. *Evolution*, 43 : 223-225.
- Rieseberg L., 1996** : Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology*, 5 : 99-105.
- Ruey-Shyang C. & McDonald B., 1996** : Sexual Reproduction Plays a Major Role in the Genetic Structure of Populations of the Fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetics*, 142 : 1119-1127.
- Weir B. & Cockerham C., 1984** : Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 : 1358-1370.
- Welsh J. & McClelland M., 1990** : Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, 18 (24) : 7213-7218.
- Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski A. & Tingey S., 1990** : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18 (22) : 6531-6535.

# ANNEXE I : PROTOCOLES COMPLEMENTAIRES

## • Isolement des souches

- Dans un premier temps, chaque feuille de caféier est lavée sur ses deux faces avec un coton imbibé d'alcool, afin d'éliminer d'éventuelles spores ou mycélium de champignons saprophytes pouvant contaminer les cultures ultérieures.

- A l'aide d'une paire de ciseaux stérilisés à l'alcool, on découpe ensuite un fragment de tissu végétal situé sur le front de croissance de la lésion : ce fragment (3x3mm) comporte donc une partie brune (imputée a priori à *C. gloeosporioides*) et une partie verte correspondant aux tissus sains jouxtant la lésion.

- Ce fragment est déposé en conditions stériles dans une boîte de Pétri contenant du milieu PDA et une dose d'antibiotique (soit Gentaline à 160 mg/l, soit Péniciline G & Colimicyne à  $10^6$  unités de chaque par litre).

## • Purification des cultures

Lorsqu'on observe des bactéries dans les cultures de champignons, on dispose alors de deux possibilités pour faire disparaître ces contaminants :

- inhiber leur croissance en employant des antibiotiques. Des cultures sur PDA contenant Péniciline G et/ou Streptomycine à différentes concentrations ont été réalisées :

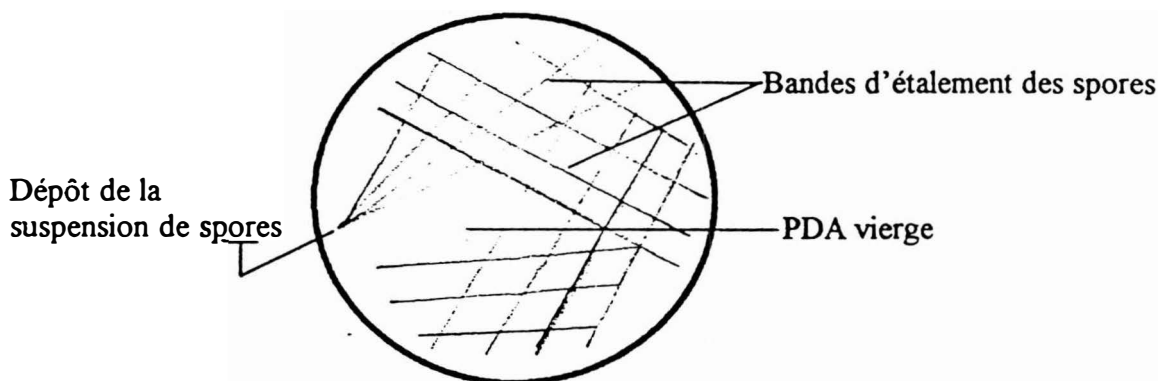
Péniciline G	100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Streptomycine	100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Péniciline G + Streptomycine	10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de chaque
Péniciline G + Streptomycine	25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de chaque
Péniciline G + Streptomycine	50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de chaque
Péniciline G + Streptomycine	100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de chaque

Puis pour les plus résistantes, des essais ont été effectués avec Ampiciline et/ou Kanamycine, à différentes concentrations également :

Ampiciline	3, 6 ou 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Kanamycine	3, 6 ou 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Ampiciline + Kanamycine	3 + 3, 3 + 6, 3 + 10, 6 + 3, 10 + 3, 6 + 6 et 10 + 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (respectivement)

- éviter les colonies bactériennes en produisant des suspensions de spores plus diluées encore, ou en réalisant des bandes étroites d'étalement plutôt qu'un étalement homogène sur toute la surface de la boîte de Pétri (le fragment de mycelium est prélevé lorsqu'en croissant, il

sort de la bande d'étalement pour se développer dans de PDA « vierge »). On espère ainsi prélever un hyphes non contaminé.



#### • *Extraction de l'ADN au CTAB*

- 500  $\mu$ l de tampon CTAB d'extraction (compositions des divers tampons en annexe) sont ajoutés à environ 0,1 g de mycélium lyophilisé et broyé, et mis à incuber 30 min à 1 h, à 65 °C.

- Une première extraction est réalisée en ajoutant un volume égal de Chloroforme-Alcool minisoamylique (24/1). Après centrifugation pendant 5 min à 12000g, la phase aqueuse, supérieure, est récupérée.

- On ajoute 1/10 vol. de solution CTAB « salée », avant de réaliser une deuxième extraction au Chloroforme-Alcool isoalyique.

- La phase aqueuse récupérée, une première précipitation est effectuée avec 1 vol. de solution CTAB de précipitation. Une centrifugation d'une minute à 12000 g suffit à faire tomber la pelote d'ADN au fond du tube.

- Le surnageant est éliminé, et l'ADN est repris dans 200  $\mu$ l de T.E. « salé ». Une deuxième précipitation est alors réalisée avec 0,6 vol. d'Isopropanol.

- Le culot d'ADN obtenu après centrifugation 1 min à 12000 g est rincé avec de l'Ethanol 70 %, séché, puis repris dans 200  $\mu$ l de T.E..

## ANNEXE II : CODIFICATION DES SOUCHES

### ILE DES PINS 6

1 A 1 B  
2 A 2 B  
3 A 3 B  
4 A 4 B  
5 A 5 B  
6 A 6 B  
7 A 7 B  
8 A 8 B  
9 A 9 B  
10 A 10 B

### ILE DES PINS 5

NUMÉROTÉS DE 1 À 10

### JOLAMUNA

1 A  
3 A 3 B  
4 A 4 B  
5 A 5 B  
6 B  
7 A 7 B  
8 A 8 B  
9 A 9 B  
10 A 10 B  
11 A 11 B  
12 B  
13 A 13 B  
14 B  
15 B

### NESSADIQU

1 A 1 B 1 C  
2 A 2 B  
3 A 3 B  
4 A 4 B  
5 A 5 B  
6 A 6 B  
7 A 7 B  
8 A 8 B  
9 A 9 B  
10 A 10 B 10 C

### YATE

1 A 1 B 1 C  
2 A 2 B  
3 A 3 B 3 C  
4 A 4 B 4 C  
5 A 5 B 5 C  
6 A 6 B 6 C  
7 A 7 B 7 C  
8 A 8 B 8 C  
9 A 9 B 9 C 9 D  
10 A 10 B 10 C  
5/6  
9/10

### BANGOU

1 A 1 B  
2 A 2 B  
3 A 3 B  
4 A 4 B  
5 A 5 B  
6 A 6 B  
7 A 7 B  
8 B  
9 A 9 B  
10 A 10 B

### SAR BR

Baie = 110  
Ram = 54

### TANNA

1 B  
2 A  
3 A  
4 A  
5 A  
6 A  
7 A  
8 A 8 B  
9 A 9 B  
10 A 10 B  
11 A 11 B  
12 A 12 B  
13 A 13 B

## ANNEXE III : MILIEUX DE CULTURE ET TAMPONS

### • Milieux de culture

Potato-Dextrose-Agarose (PDA) : décoction de 125 g de purée de pommes de terre, 15 g de agarose et 10 g de Dextrose pour 1 l d'eau.

Potato Dextrose Broth (PDB) : décoction de 125 g de purée de pommes de terre et 10 g de Dextrose pour 1 l d'eau.

Levure Peptone Glucose Agarose (LPGA) : extrait de levure, Peptone et Glucose à 7 g.l<sup>-1</sup> chacun, et 15 g.l<sup>-1</sup> d'Agarose.

### • Tampons d'extraction

#### Tampon de lyse :

Tris-HCl	50 mM, pH 8,0
EDTA	50 mM, pH 8,0
SDS	3 %
β-mercaptoéthanol	1 %

#### Tampon T.E. :

Tris-HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	1 mM, pH 8,0

#### Solution CTAB d'extraction :

CTAB	2 % (masse/volume)
Tris-HCl	100 mM, pH 8,0
EDTA	20 mM, pH 8,0
NaCl	1,4 M
β-mercaptoéthanol	2 %

#### Solution CTAB de précipitation :

CTAB	1 % (masse/volume)
Tris-HCl	50 mM, pH 8,0
EDTA	10 mM, pH 8,0

#### T.E. « salé » :

Tris-HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	0,1 mM, pH 8,0
NaCl	1 M

### • Tampon de dilution

Les dilutions d'ADN sont faites dans du T.E. 1/10<sup>e</sup> : tampon T.E. dilué 10 fois.

- **Tampon de réaction d'amplification**

Tris-HCl	750 mM, pH 9,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200 mM

- **Tampon d'électrophorèse**

T.A.E. :

Tris-Acétate	40 mM, pH 8,0
EDTA	1 mM, pH 8,0

Tampon de charge :

Saccharose dans H <sub>2</sub> O	40 %
Colorant Orange G	

- **Tampon d'hybridation**

6x SSC	
5x Réactif de Denhart	
SDS	0,5 %

Salt Sodium Citrate (SSC) : (solution mère 20x)

NaCl	0,15 M
Citrate de Na	0,015 M (pH 7,0)

Réactif de Denhart : (solution stock : 50 x)

Fico II	5 g
Polyvinyl Pyrrolidone	5 g
BSA (fraction V)	5 g
H <sub>2</sub> O	qsp 500 ml

- **Tampons de rinçage**

SSC 2x, 1x, 0,5x (respectivement pour des concentrations en sels décroissantes)	
SDS	0,1 %

# ANNEXE IV : MATRICE (0 / 1)

Souches	OPF 3	OPF 10	OPF 9
Y 1A	01000101001	0001000000100001	00110010100
Y 1B	00010101001	0100000001000001	00010010100
Y 1C	00011000010	0110000000000010	00010110000
Y 2B	00100000110	0110000011010000	00010110001
Y 3A	00100000100	0011000000100111	00010110001
Y 3B	00100000100	0011000000100111	00010110001
Y 3C	00100010110	0011000000100111	00011110001
Y 4A	00100010110	0110000001010000	00011110001
Y 4B	00100010110	0110000011010000	00011110001
Y 4C	00100000110	0110000011010000	00011110101
Y 5A	00100000110	0110000001000101	00011110101
Y 5B	00100000110	0010000001000101	00010110001
Y 5C	00111000110	0110000001000101	00010110001
Y 6A	00100000110	0110000011010000	00010110001
Y 6B	00100000110	0110000011010000	00010110001
Y 7C	00100010100	0110000001000101	00011110001
Y 8B	00100000100	0110000001000101	00010110001
Y 8C	00100000110	0110000001000100	00010110001
Y 9A	00100000100	0110000001000101	00011110001
Y 9B	00100010100	0010000001010100	00011110001
Y 9C	00100000100	0110000001000001	00011110001
Y 9D	00100000110	0110000001000100	00010110001
Y 10A	00100000110	0110000011010000	00010110001
Y 10B		0110001000000010	00011000100
Y 10C		0100001000010000	00011100000
Y 5/6	00100000110	0110000011010000	00010110001
Y 9/10	00100000110	0110000011010000	00010110001
B 1A	00010101000	0100000001000001	00110110100
B 1B	01110010010	0010100110001100	00010110100
B 2A	00000100000	1110100001000100	00010010000
B 2B	00000010010	0000010010011100	00000110000
B 4B	00001010001	0001010001100001	00100010100
B 5B	00001010001	0001010001100001	10110010100
B 6A	00000101001	0001010001100001	10110010100
B 7A	11000010001	0000110000010100	
B 8B	00000101001	0100000001000001	00100110100
B 9A	00000101001	0100000001000000	00110010100
B 9B	00000101001	0100000001000000	10110010100
B 10A	01000101001	0001000000100001	00110110100
B 10B	10011010000	0000010001000110	00011001010

# ANNEXE IV : MATRICE (0 / 1)

Souches	OPF 3	OPF 10	OPF 9
T 1B		0110101001000100	00011010000
T 2A	00100000010	0110101000000000	00000010000
T 3A	00100000110	0110101001000100	00011010000
T 4A	01000010111	0100000010001100	01000110000
T 5A	00100000110	0110101011000000	01101010000
T 7A	00001000110	0110100000100000	
T 8A	00100000110	0000000010111100	00110100100
T 8B	01011000111	0010010100010100	
T 9A	01100100110	0000010001000000	00011010000
T 9B			10010010000
T 10A	00100000110	0110101001000100	10011010000
T 10B	00100000110	0100100000100000	10110010000
T 12A	00100000110	0110101001000100	10110100000
T 13A	00100000110	0000010010111100	00110100100
T 13B	01011000111	0001000100010100	00010101010
IP6 1A	00100000110	0100110000001000	00000110101
IP6 1B	00100001110	1000000011101010	00010110101
IP6 2A	10000000111	0000101010100000	00010110100
IP6 2B		0000000001100000	10010100100
IP6 3A	00100001111	0000000011100010	
IP6 3B	00100010110	1000000011101010	00011010101
IP6 4A	01000000100	0110010000000100	00010110000
IP6 4B	00100010010	0111010000001000	10000100100
IP6 5A	00100000110	0000000110001000	00010010100
IP6 5B	00100000100	0110000001100000	10000100000
IP6 6A	00100010011	0100100000001000	10010100100
IP6 6B	00100000110	0010000010101000	00010000101
IP6 7A		0000000010001000	00010100100
IP6 7B		0010110000001000	00010110110
IP6 8A		0010000000100010	10000010001
IP6 8B		0010000000100010	00010110001
IP6 9A	00100010110	0000000000100010	00010010100
IP6 9B	00100010110	0111100000000000	10000010100
IP6	10000000001	0000010010010000	10010110000
IP5 2	00100000100	1011000000000110	10000000101
IP5 3	00100000110	1001000001100100	
IP5 4	00100000010	1001110001100000	
IP5 5		0010000011000011	00010110000
IP5 6		0100000000000100	00010110000
IP5 7	00100000110	0110000011000100	00100010000
IP5 9		0110000011001000	00010110000

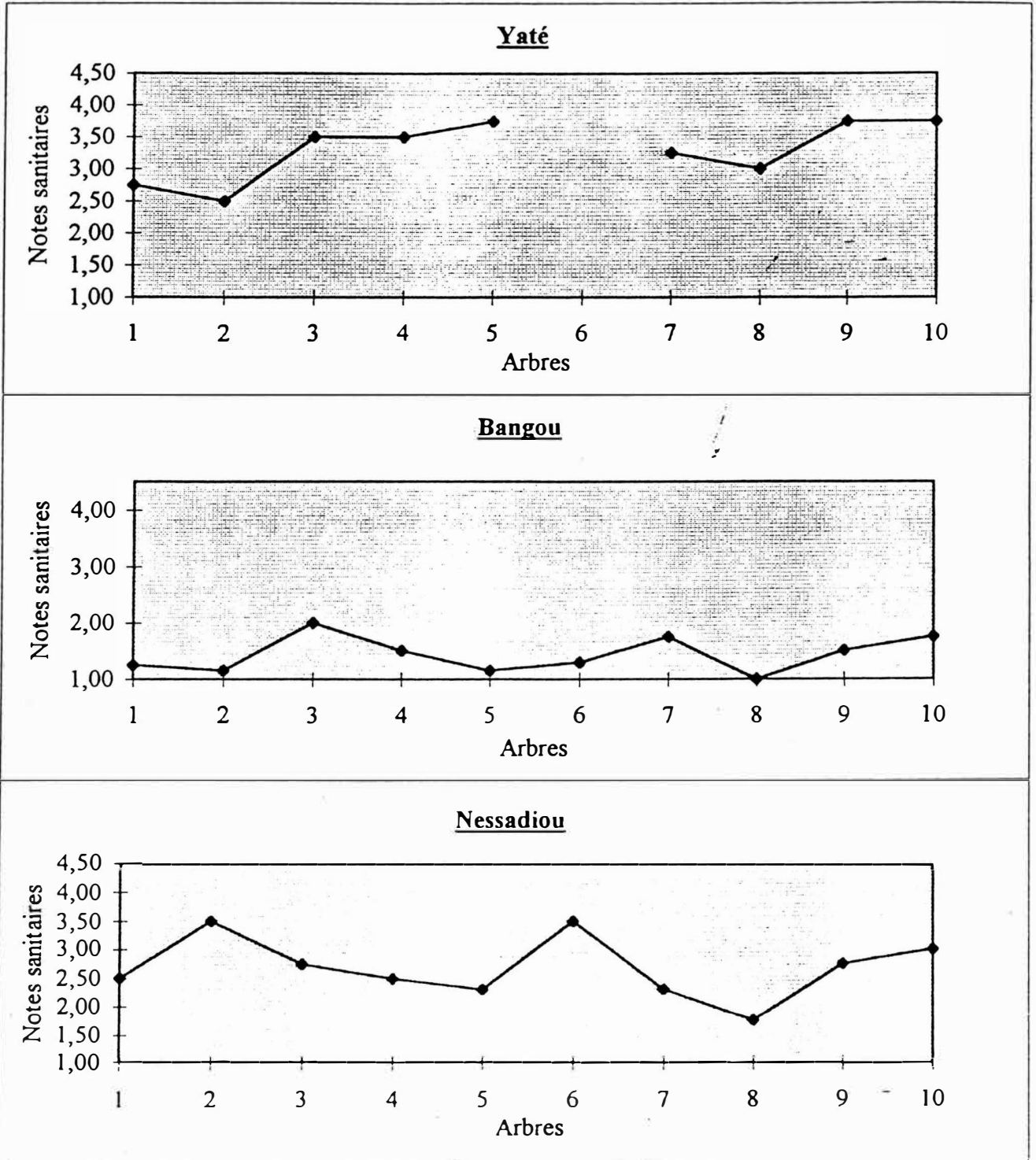


# ANNEXE IV : MATRICE (0 / 1)

Souches	OPF 3	OPF 10	OPF 9
J 1A		1010010000100000	10000000100
J 3A	01000000101	0010000010100000	10010110100
J 3B		0010001011100000	00010110100
J 4A	01000000101	0010000001100000	00011110100
J 4B	11000000101	0010000000100000	00010110100
J 5A			00000010100
J 5B	00000000111	0010000010100000	10010110100
J 6B	11000000111	0010000010100000	00000110100
J 7B	11000000101	0010000000100000	10010110100
J 8A	11000000010	0010000011100000	00000110100
J 8B	01000000111	1010010000100000	00010110101
J 9A	01000100101	0010000011100000	00011110100
J 9B	11000100011	0010000001100000	00010110100
J 10A	01100100101	0000000010100000	
J 11A	01000000101	0010000000100000	00010110100
J 11B	01010100101	0000000001100000	10010110100
J 13A		1000000001100000	00010110110
J 13B	11000100000	0010000001100000	00000110100
J 15B	01000000100	0000000010100000	00000110100
N 1A		0001000100100000	00011110100
N 2A	00010000110	0010000100100000	01000000100
N 2B	00100000110	0000000011100000	10011100000
N 3A	00100000110	0111100000010000	10000110000
N 3B	01000100111	0000000001101010	10000000000
N 4A		0010000001101000	10010000000
N 4B	00100000110	0110100000000100	10010010001
N 5A		0010100000001000	10000000000
N 5B	00100010110	0110100000100100	10010100000
N 6A	00001101001	000000000100001	01110010100
N 6B	10010010000	0000110000010100	00101000000
N 7A	00100000110	0110100000110000	10010010100
N 7B		0100000010110000	00000010111
N 8A	00100000111	0110100000010100	
N 8B	11010100110	0010100000001000	10010100000
N 9A	00100010010	0010000001100011	10010000100
N 9B		0010000001100000	10010000100
N 10A	00100000010	0111100000000000	10000110100
N 10B		0001000000111000	00000100100
N 10C	01000000010	0000000001101010	10000000100

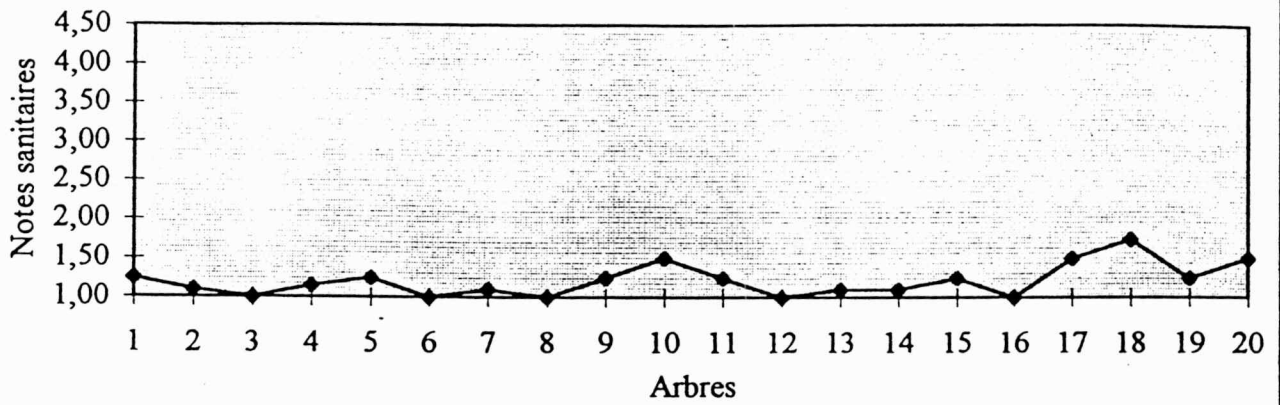
## ANNEXE V : NOTES SANITAIRES DES CAFEIERS

La note sanitaire intègre le niveau moyen de gravité des attaques foliaires dans une parcelle et l'historique pathologique relatif aux feuilles disparues. Elle définit le niveau d'infestation de l'ensemble des feuilles imputable à l'antracnose (1 étant la note minimale. et 4 la note maximale correspondant à un état général où peu de feuilles sont encore sur l'arbre mais infectées).

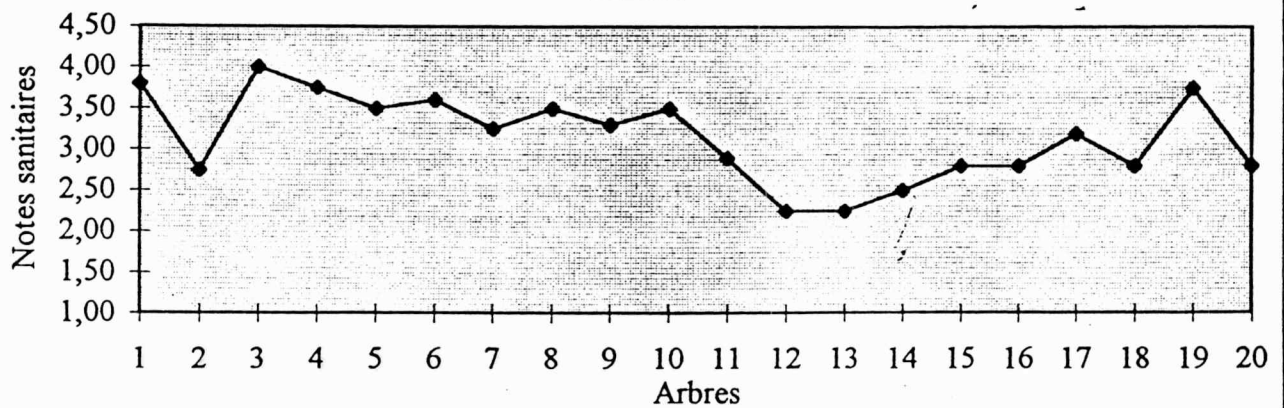


# ANNEXE V : NOTES SANITAIRES DES CAFEIERS

## Jolamuna



## Tanna



**STAGE ANNEXE**

**SIMULATIONS DE SUCCESSIONS VEGETALES SUR LA  
BASE DU MODELE DES ATTRIBUTS VITAUX**

Stage réalisé au CEFE - CNRS, sous la direction de Sandra LAVOREL

# SIMULATIONS DE SUCCESSIONS VEGETALES SUR LA BASE DU MODELE DES ATTRIBUTS VITAUX

## INTRODUCTION

Le terme de succession végétale secondaire désigne les phénomènes de recolonisation du milieu par les plantes après toute perturbation qui aurait modifié la composition floristique initiale. Il s'agit bien là d'un processus dynamique montrant le remplacement d'espèces végétales dominantes par d'autres au cours du temps, jusqu'au retour hypothétique à ce qu'on appelle un climax (Cléments 1916) (pour lequel l'évolution de la composition en espèces n'est modifiée qu'à une échelle de temps "archéologique").

Il existe différents modèles descriptifs faisant appel à différentes hypothèses explicatives qui se complètent plus ou moins, qui s'opposent parfois. D'après Connell & Slatyer (1977), "il n'y a pas un modèle pour la succession, mais chacun des modèles peut s'appliquer à certains remplacements d'espèces". En général, la succession est perçue comme un processus ordonné, raisonnablement directionnel et prévisible (Lepart & Escarre, 1983), pour lequel différents mécanismes doivent être considérés pour la modélisation.

La théorie de la composition floristique initiale considère que toutes les espèces sont initialement présentes (c'est à dire, juste après la perturbation) (Egler, 1954), et que chaque assemblage d'espèces est progressivement remplacé par son successeur. La succession correspond donc à des changements de dominance des espèces. Le modèle des « attributs vitaux » (Noble & Slatyer, 1980) reconstitue cette dynamique en se basant sur les traits d'histoire de vie des espèces.

Au cours de ce stage, nous avons travaillé sur VANEW (Noble & Gitay, 1996), un programme de simulation des successions végétales dérivé du modèle des attributs vitaux.

**Tableau 1 : Description des Attributs vitaux (d'après Noble & Gitay, 1996)**

<i>Attributs vitaux</i>	<i>Exemple</i>
D	Graines très dispersées
S	Stock de graines à longue durée de vie (dans le sol)
C	Stock de graines à courte durée de vie (dans la canopée)
G	Cas spécial de S : toutes les graines germent ou meurent après une perturbation
V	Espèce à reproduction végétative
U	Espèce virtuellement non-affectée par la perturbation (reproduction sexuée ou végétative immédiatement la perturbation)
W	Espèce dont seuls les adultes sont virtuellement non-affecté par la perturbation ; les juvéniles ne résistent pas
T	Espèce pouvant s'établir et se développer n'importe quand après la perturbation
I	Espèce ne pouvant s'établir qu'immédiatement après la perturbation (lorsqu'il n'y a pas de compétition pour les ressources)
R	Espèce ne pouvant s'implanter que dans des stades successionnels évolués

**Tableau 2 : Groupe d'espèces types caractérisées par leur attributs vitaux**

<i>Types d'espèces</i>	<i>Attributs</i>	<i>m</i>	<i>l</i>	<i>e</i>
Annuelle (An)	S I	0	1	10
Pérenne (Pe)	C I	1	30	30
Graminée clonale (Gr)	V I	2	60	60
Ligneux bas (Lb)	C I	5	30	30
Chêne blanc (Cb)	C I	20	300	300
Chêne vert (Cv)	G I	20	300	1000

Un exemple de communauté schématisant les types biologiques rencontrés au cours des successions secondaires dans les friches méditerranéennes (Escarré *et al.*, 1983) figure dans le tableau 2.

## EXEMPLES DE SIMULATIONS

Notre travail a consisté en une analyse de sensibilité du modèle à différents régimes de perturbations pour diverses communautés. Nous ne présentons ici, à titre d'exemple, que les résultats pour le groupe d'espèces figurant au tableau 2.

Les simulations sont effectuées à différentes fréquences de perturbations : 0.001 (= une perturbation tous les 1000 ans), 0.01 (= une perturbation tous les 100 ans), 0.5 et 0.3. Les résultats complets figurent en annexe. En ligne figurent les différentes combinaisons d'états possibles de chaque groupe d'espèces, à droite du tableau, la probabilité d'être dans telle combinaison, telle année.

Ainsi la 15<sup>e</sup> année, avec une perturbation tous les 1000 ans, il y a une probabilité de 0.99 d'avoir la communauté dans l'état suivant : Annuelles sous forme de propagules, Pérennes, Gramminées et Ligneux bas matures, et les Chênes juvéniles, ce qui constitue un état normal dans la succession sans nouvelle perturbation. Les Annuelles ont dépassé leur durée de vie qui était d'un an. Les Chênes n'ont pas encore atteint leur maturité qui arrivera à 20 ans... La simulation donne aussi à 15 ans après la perturbation une proba de 0.01 que toutes les populations soient éteintes sauf les Graminées clonales qui sont matures. Ce cas peut correspondre à l'éventualité où une nouvelle perturbation serait intervenue aussitôt après la première, pendant la période où les ligneux juvéniles sont incapables de produire des propagules ou des rejets de souche. Seules les graminées à reproduction végétative n'ont pas besoin d'être matures pour se reproduire après la perturbation.

Avec une perturbation tous les 1000 ans, on a une forte probabilité qu'une succession complète se poursuive jusqu'à une communauté composée de Chênes uniquement 500 ans après la perturbation.

Avec une perturbation tous les 100 ans, la probabilité qu'une deuxième perturbation survienne dans un stade successional jeune est plus grande que précédemment, ce qui produit une bonne diversité d'états dans la tranche 15 - 50 ans. Chaque état a une faible probabilité, mais on peut raisonner à l'échelle du paysage, et pas uniquement sur le site ponctuel fictif où est fait la simulation. Ainsi, on

## QU'EST-CE QU'UN ATTRIBUT VITAL ?

Il s'agit pour une espèce d'un attribut qui détermine son rôle dans les séquences de remplacements d'espèces (Noble & Slatyer, 1980). Ainsi, la dynamique de la végétation peut être comprise sur la base d'un nombre limité de traits biologiques des espèces pouvant être regroupées en types selon leurs caractéristiques pour chaque trait. Le tableau 1 résume les différents attributs vitaux. On peut combiner certains attributs entre eux : CT représente une espèce qui ne peut se reproduire qu'à l'état mature, mais qui peut s'établir n'importe quand. C'est donc une espèce susceptible à des perturbations trop rapprochées qui l'empêcheraient de s'établir. DI représente une espèce facilement dispersée mais qui doit s'implanter immédiatement après une perturbation. Il s'agit typiquement d'une pionnière.

## LE PROGRAMME « VANEW » (NOBLE ET SLATYER, 1980)

Ce programme propose, à partir d'une communauté initiale composée de plusieurs types biologiques décrits par leurs attributs vitaux, des séquences de remplacements possibles des espèces entre elles sous l'effet de perturbations récurrentes. Les séquences sont calculées explicitement à partir d'un modèle démographique simple. Les populations de chaque espèce sont divisées en 4 stades (juvénile, mature, propagule et éteint). La dynamique est basée sur 3 paramètres : la durée de vie moyenne  $l$ , l'âge de maturité  $m$ , et la longévité des propagules  $e$ , pour chaque espèce, ainsi que leur état initial (juvénile...) et le régime des perturbations. La dynamique est modélisée par des relations logiques conditionnelles du type : S'il y a une perturbation et que l'espèce est du type S, alors apparaît un ensemble de plantules. A partir de ces séquences, le programme calcule à l'aide d'une chaîne de Markov les probabilités de rencontrer les différents états possibles de la communauté (*i.e.* toutes les espèces éteintes, ou une partie mature et une partie sous forme de propagules...).

Dans le cas de VANEW, les perturbations sont de type feu : toutes les parties aériennes des végétaux sont détruites. Il subsiste donc la banque de graines, plus les parties souterraines capables de régénération végétative, plus les graines de type G (qui ne peuvent germer qu'après la perturbation).



obtient une mosaïque de communautés avec des structures démographiques différentes pour chaque espèce.

VANEW propose d'ailleurs une option de « spatialisation ». C'est à dire qu'il figure sur deux dimensions un ensemble de points auxquels la simulation attribue un état pour chaque espèce. En simulant une propagation d'un feu, il montre que dans le paysage, des états rares (qui ont une faible probabilité dans la simulation normale) sont possibles. Cet aspect est important pour montrer qu'une espèce peut avoir une forte probabilité d'être éteinte à telle date, mais être présente dans le paysage, donc potentiellement recolonisatrice de sites où elle avait disparue. Les représentations graphiques de cette option n'ont malheureusement pas pu être imprimées.

On peut enfin, pour une définition plus réaliste de la simulation, attribuer à chaque état d'une communauté des probabilités de perturbation différentes. Ainsi, lorsque la communauté est composée uniquement de juvéniles, la probabilité qu'un feu démarre à ce stade est très faible. Par contre, lorsque la communauté est composée de ligneux bas et de graminées, la probabilité que ces plantes, sèches dans notre région en été, s'enflamment ou propagent un feu est très importante. On peut ainsi tenter de reproduire des événements naturels afin de mieux en comprendre les étapes, les rôles respectifs de chaque acteur...

L'avantage de pouvoir attribuer à chaque communauté un régime de feu particulier permet d'amplifier certains phénomènes, et de voir ce que les perturbations d'origine anthropique notamment ont comme impact sur la végétation. Ainsi, une communauté composée de ligneux bas, d'herbacées pérennes, et de graminées clonales, comme pourrait l'être une friche pâturée, contient des ligneux bas capables de rejeter après chaque perturbation (espèce V I, par exemple : des ronces, des genévriers). La probabilité d'un départ de feu naturellement n'est pas négligeable, mais on peut simuler l'action du berger qui, voulant éliminer ces ligneux bas nuisibles à son troupeau, débroussaille par le feu. La succession évolue normalement vers un stade à graminées clonales et ligneux bas puis ligneux bas seuls, incomestibles. Escarré *et al.* (1983) ont expliqué qu'un tel stade successional était en dehors d'une succession normale, naturelle.

**Tableau 3 : Probabilité de perturbation pour chaque type de communauté.**

An	Pe	Gr	Cb	Lb	Cv	Prob. d'une perturbation
j	j	j	j	j	j	0,001
m	j	j	j	j	j	0,001
p	m	j	j	j	j	0,002
p	m	m	j	j	j	0,03
p	m	m	j	m	j	0,2
j	j	j	e	m	e	0,1
e	m	m	m	m	m	0,03
e	e	m	m	p	m	0,02
e	j	j	j	m	m	0,025
e	e	e	m	p	m	0,01
e	e	j	j	j	m	0,015
e	e	e	m	p	p	0,008
p	e	m	e	j	e	0,03
p	e	m	e	m	e	0,2
m	j	j	e	m	e	0,1
p	m	j	e	m	e	0,1
e	m	j	j	m	m	0,025
e	m	m	j	m	m	0,035
e	e	m	j	j	m	0,02
e	e	m	j	m	m	0,035
e	e	m	m	m	m	0,03
e	e	e	m	m	m	0,03
e	e	e	m	m	e	0,02

## DISCUSSION - CONCLUSION

On dispose donc de plusieurs niveaux d'interprétation des simulations sur un jeu d'espèces : rechercher la probabilité d'un état à différentes dates après la perturbation, rechercher les différents états possibles d'une espèce à différentes dates, caractériser des stades successionnels en fonction du régime de perturbations, ou imaginer la dynamique à l'échelle du paysage en interprétant les différentes possibilités d'un stade successional comme une mosaïque.

En revanche, dans ce modèle, les perturbations ne sont pas externes, mais considérées comme faisant partie de la dynamique successionale, indispensables au maintien des groupes d'espèces. S'il n'y a pas de perturbation, le système s'effondre (chaque type d'espèce s'éteint). D'une manière plus générale, on peut dire que ce sont finalement les ligneux hauts qui dominent parce que les autres ne se reproduisent pas tant qu'il n'y a pas de perturbation. La succession est bien une élimination progressive de groupes d'espèces après qu'elles aient été dominantes pendant une période plus ou moins longue.

Le cheminement qui a été suivi dans l'exemple précédent partait d'une communauté établie *a priori*, ou d'après les connaissances qu'on peut avoir des dynamiques successionales réelles. On observait alors la sensibilité de cette communauté à différents régimes de perturbation. On peut suivre un cheminement inverse qui consiste à rechercher la composition d'une communauté viable dans ce modèle de simulations, ou qui permet la plus riche mosaïque d'états possibles (*i.e.* la plus grande diversité paysagère).

Néanmoins, ce modèle ne prend en compte que les présences/absences des types d'espèces. Rien n'est fait concernant les abondances relatives de chaque type, si ce n'est à travers la probabilité d'être éteint, juvénile, mature... Comparer les probabilités de chaque type de communauté à l'échelle du paysage peut donner une idée des abondances relatives de chaque type, et pourrait aussi permettre d'estimer un indice de diversité.





# ANNEXE

1 perturbation / 50 ans

	An	Pe	Gr	Cb	Lb	Cv	0	1	5	15	25	50	100	500
	j	j	j	j	j	j	1.00	0,02						
m	j	j	j	j	j	j		0,94						
p	m	m	j	j	j	j			0,85					
p	m	m	j	j	j	j				0,72				
e	m	m	j	j	m	j					0,61			
e	m	m	m	m	m	m						0,45	0,04	
e	e	e	m	m	e	m							0,31	
e	e	e	e	m	e	m								0,04
e	e	e	e	m	e	p								
j	e	e	j	e	e	e		0,04						
m	e	e	j	e	e	e								
p	e	e	j	e	e	e			0,01	0,01				
p	e	e	m	e	e	e			0,08	0,02	0,01			
e	e	e	m	e	e	e				0,07	0,09	0,17	0,35	
j	e	e	c	e	e	e							0,06	0,44
m	j	j	j	e	e	e								
p	j	j	j	e	e	e		0,01						
p	m	m	m	e	e	e		0,04						
e	m	m	m	e	e	e		0,01	0,08	0,01				
j	j	j	j	e	e	e			0,01	0,09	0,06	0,01		
m	j	j	j	e	j	e								
p	m	m	j	e	j	e		0,03						
p	m	m	m	e	j	e		0,05						
e	m	m	m	e	m	e				0,01				
e	j	j	j	e	j	e				0,06				
e	m	m	j	e	j	e					0,17	0,01		
e	m	m	j	e	j	e					0,02			
e	j	j	j	e	j	m					0,02	0,01		
e	m	m	j	e	j	m					0,06	0,01		
e	m	m	j	e	j	m						0,02		
e	m	m	j	e	m	m						0,05		
e	e	j	j	e	m	m						0,04	0,01	
e	e	m	j	e	e	m							0,01	
e	e	e	e	j	e	m							0,01	
e	e	e	e	j	e	m							0,09	
e	e	e	e	j	e	j								0,01
e	e	e	e	j	e	e				0,01	0,01	0,01		
e	m	j	j	e	e	e				0,01				
e	e	j	j	e	e	m						0,01		
e	e	m	m	e	e	m						0,09		
e	e	e	e	e	e	p								0,51
e	j	j	j	e	e	m								
e	m	m	m	e	e	m					0,01	0,01		
e	j	j	j	e	j	m								
e	m	m	m	e	j	m								
e	e	e	e	e	m	m						0,01		



**STAGE ANNEXE**

**LES REGLEMENTATIONS DES PECHEES ET DES  
RESERVES MARINES EN NOUVELLE CALEDONIE**

Stage réalisé à l'Aquarium de Noumea, sous la direction de Pascale JOANNOT



# REGLEMENTATIONS DES PECHEES ET DES RESERVES MARINES EN NOUVELLE CALEDONIE

## INTRODUCTION

Les textes en vigueur ont été produits par le territoire de Nouvelle Calédonie. Mais depuis mars 1995, ce sont les provinces qui sont compétentes en matière de réglementation marine, tant pour la pêche que pour la navigation ou la création de réserves (la Nlle Calédonie est divisée en trois provinces administratives : Provinces Sud, Nord et Iles). Cette décision a été prise dans le but de faciliter le développement économique de chaque province.

Les trois provinces sont sensiblement différentes : la Province Sud concentre près des deux tiers de la population. La majorité est constituée de métropolitains récemment implantés. Un nombre considérable d'entre eux possèdent un bateau de plaisance et pêchent régulièrement dans le lagon. La province Nord abrite une population en partie mélanésienne, vivant sur le mode tribal et pêchant pour leur propre compte, en partie blanche, des français implantés depuis de nombreuses générations et qui sont nombreux à posséder un bateau. Enfin, dans les îles, la population est essentiellement mélanésienne, tribale et ne pêche que ce qu'elle consomme.

Depuis l'année dernière, les provinces n'ont pas encore eût le temps de modifier de façon notable ces textes, qui restent donc communs aux trois provinces. Seule la province Sud diffère des deux autres par la présence de nombreuses réserves marines.

## LES PECHEES

Les réglementations des pêches en Nouvelle Calédonie sont dictées par des lois qui proviennent, pour une part, du Droit International de la Mer, et pour une autre part du Territoire de N.C.. La partie concernée par le droit public international est soustraite à toute souveraineté territoriale. Il s'agit en fait de la haute mer qui a été consacrée patrimoine commun de l'humanité par la convention de Montego Bay en 1982. Celle-ci assure la liberté de navigation, de pêche, le survol, et la pose de câbles sous-marins. La convention de Washington, en 1973, régit le commerce international de faune et de flore menacée d'extinction. Deux niveaux de protection ont été créés, et un inventaire des espèces en voie de disparition a été dressé. Il existerait enfin une Police de la Navigation, créée par une convention pour la sauvegarde de la vie humaine en mer (1946, suite au naufrage du Titanic), et une Police de la Pêche en Haute Mer, en particulier pour faire respecter les quotas des espèces protégées et les moyens réglementés par diverses conventions (ex. : la pêche à la Baleine). Il ne s'agit que de conventions entre différents états qui sont les seuls tenus de les respecter.

50 Km

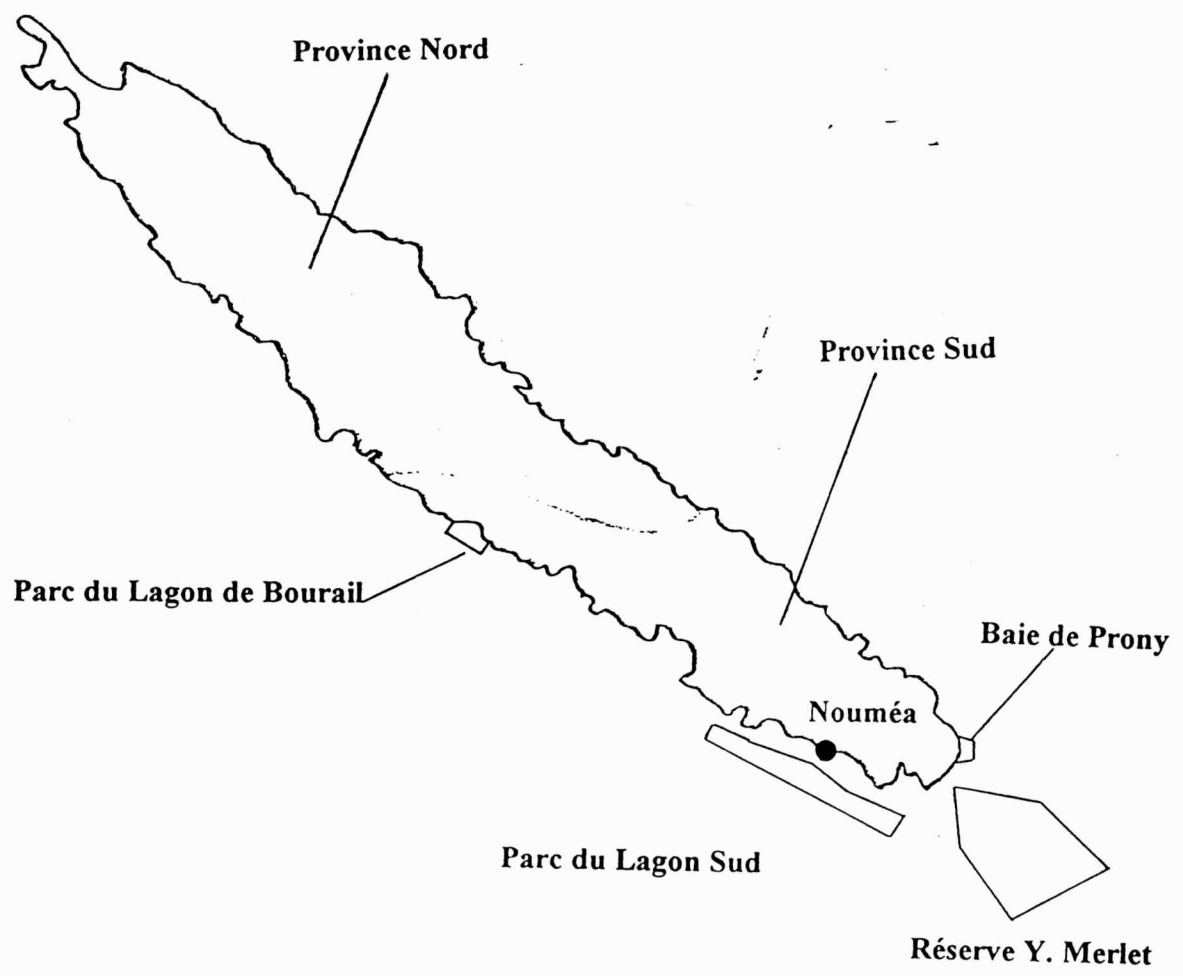
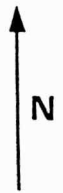


Fig. 1 : Localisation des réserves marines en Nouvelle Calédonie.

Mais il semble que le plus gros des pêches en Nouvelle Calédonie soient réalisées à l'intérieur des eaux territoriales, et destinés à un commerce local. Elles sont donc principalement soumises à une réglementation propre au territoire.

Il existe un Memento contenant les références des textes officiels, et quelques notes en résumé pour chaque délibération ou arrêté. Il a été édité par le Service Territorial de la Marine Marchande et des Pêches Maritimes en janvier 1996.

Je me contenterai d'émettre quelques remarques sur les activités de pêches en illustration des réglementations officielle.

- On distingue la pêche artisanale, lagonaire et côtière, de la pêche au large, industrielle. Il y a environ 300 bateaux armés à la pêche professionnelle. Mais seuls ceux qui pratiquent la pêche côtière ou la pêche au large exercent une activité à plein temps (dans la province Nord, ils ne représentent que 6 ou 8 bateaux). Les quantités déclarées sont pour 1994 : 1750 t pour la pêche artisanale, dont 75 t pour la pêche côtière. Le plus gros de la pêche est constituées d'Holoturies, ce qui ramène la quantité de poissons à 500-600 t seulement. La pêche au large concerne le Thon principalement, soit 1600 t, destinées en grande partie à l'exportation. En dehors de ces chiffres officiels, il y a tout ce que ne déclarent pas les pêcheurs professionnels, plus tout ce que vendent les plaisanciers dans la plus stricte illégalité, plus tout ce qui est pêché au filet à partir du bord de mer, ou ramassé à marée basse par des particuliers. Des estimations sont tentées. Comme le contrôle est très faible, aucun chiffre fiable n'est disponible.

- Pour avoir une autorisation de pêche Professionnelle, c'est à dire avoir le droit de commercialiser les produits pêchés, il faut avoir un bateau armé à la pêche professionnelle. La pêche à pied est largement autorisées dans les limites des réglementations de pêche dans la zone des 1000m, et en dehors de zones en réserve spéciale ou intégrale. Mais les produits de cette pêche ne peuvent donc en aucun cas être commercialisés, si l'on respecte la loi. Néanmoins, cette ambiguïté n'empêche pas les ramasseurs de crabes des palétuviers de vendre les produits de leurs pêches, puisque c'est la seule façon de les capturer, et que leur commerce n'est pas interdit. Ils ne bénéficient d'aucune autorisation exceptionnelle.

- Dans le même ordre d'idée que précédemment, le ramassage du corail est réglementé : on ne peut ramasser que certaines espèces, et dans des zones géographiques bien définies. Par exemple, le corail à usage médical est ramassé par une personne qui possède toutes les autorisations officielles, et à qui il a été indiqué une zone de ramassage précise. Or, celle-ci n'abrite pas, ou plus le corail en question. Notre pêcheur est donc contraint d'aller le récolter ailleurs pour pouvoir en vendre.

- La loi coutumière est largement développée en Nlle Calédonie. Il peut s'agir d'autorisation officielles de pêches dans des zones protégées (autorisation de pêche coutumière dans la réserve intégrale Y. Merlet, mais exclusivement sur certains récifs), ou sur des animaux protégés (il y aurait notamment quelques autorisations de pêcher des Dugongs (Vaches marines, animal en voie de disparition et protégé par des conventions internationales) accordées à des tribus du Nord de la Grande Terre (l'île principale). Mais on peut distinguer aussi les habitudes qu'ont les pêcheurs, voire certaines coutumes telle l'appropriation de la zone maritime en face du village par la tribu qui y habite. Les réglementations officielles n'en prennent pas du tout compte, et placent dans l'illégalité ces pêcheurs.

Il est possible que les autorités laissent faire en grande partie parce que les produits de pêches sont avant tout destinés à la consommation locale, et non au commerce, et qu'ils représentent quantitativement un faible impact sur les stocks. Pour ce qui est des espèces en voie de disparition par contre, le laisser faire ne trouve plus de justification, si ce n'est que certaines tribus ont toujours pêché ces espèces là, et que le leur interdire nécessiterait un trop gros effort de surveillance des pêcheurs.

- **Problème de la gestion provinciale** : l'apparente faiblesse de la pression anthropique dans les provinces Nord et Iles sur les stocks de pêche et sur les espèces protégées par ailleurs justifie à première vue la nécessité de gérer différemment la pêche dans le Sud et dans les deux autres provinces. Le contre-coup pourrait survenir quand une trop grande disparité des réglementations sera instaurée par cette gestion. Un premier exemple est donné par le crabe des Palétuviers : la taille minimale réglementaire de cet animal est de 15 cm dans la province Sud et de 14 cm dans la province Nord. La principale source de crabe est le Nord de l'île, les mangroves du Sud étant progressivement détruites. Les consommateurs sont surtout concentré à Nouméa et ses environs. Comment envisager un développement serein de chaque province si la demande de l'une ne peut être satisfaite par l'offre de l'autre à cause d'une contrainte (sans doute peu significative biologiquement) émise par la première ?

### • *Conclusion*

Il existe un certain nombre d'abérations, d'ambiguïtés et de lacunes dans les réglementations des pêches en Nouvelle Calédonie. La situation ne me semble pas désespérée pour autant. Le problème majeur vient du cumules des coutumes et habitudes, pas toutes justifiables historiquement, et du manque de contrôle. L'élaboration des lois elle-même participe sans doute au manque. Un arrêté ou une délibération n'étant visiblement pas synonyme de concertation préalable ni de réflexion sur des bases objectives. Il n'en reste pas moins que si une réglementation doit être issue d'une réflexion sur des bases objectives et d'une concertation, il doit être compliqué de vouloir satisfaire tout le monde : les poissons, les pêcheurs, et les "écotouristes" qui visitent le lagon et mangent du poisson.

## LES RESERVES MARINES

### • *Quelques définitions*

Il existe quatre types de réserves marines en Nouvelle Calédonie (Fig. 1) : réserve intégrale, réserve spéciale, réserve spéciale de faune, et réserves tournantes. Chacune a été créée dans un but précis, et est régie par une réglementation qui lui est propre. Il existe en outre une zone de protection des 1000 m littoraux. Ces réserves n'existent que dans la province Sud. Ce n'est pas parce que les dirigeants y sont plus soucieux de la qualité des eaux qu'ailleurs. Mais la nécessité de créer des réserves y est plus forte à cause d'une pression anthropique plus forte : d'avantage de pêche professionnelle et plaisancière, d'avantage de chasse sous-marine, de prélèvements de coraux et autres dégradations du lagon autour de Nouméa. C'est autant par soucis de protection de la nature que de préservation des stocks de pêche et du maintien de l'attrait touristique qu'ont été créées des réserves dans des zones bien précises.

La réserve naturelle intégrale est une aire sur toute l'étendue de laquelle toute espèce de chasse ou de pêche, toute exploitation forestière agricole ou minière, toutes fouilles ou prospections, sondages, terrassement ou constructions, tous travaux tendant à modifier l'aspect du terrain ou de la végétation,



Fig. 2: La réserve intégrale Yves MERLET.

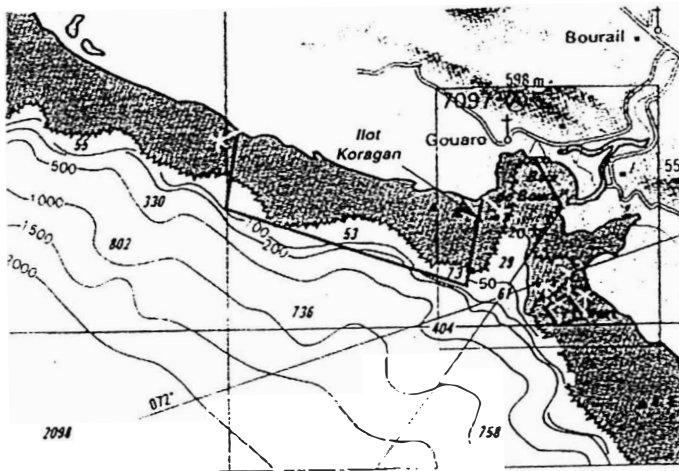


Fig. 4 : Les réserves spéciales de Bourail.



Fig. 5 Les réserves spéciales de la Baie de Prony

tout acte de nature à nuire ou à apporter des perturbations à la faune ou à la flore, tout introduction d'espèces zoologiques ou botaniques, indigènes ou importées, sauvages ou domestiques, toutes collectes d'échantillons botaniques ou géologiques sont strictement interdits.

Il est donc défendu de pénétrer, de circuler ou de camper sans une autorisation spéciale écrite de l'autorité compétente. Le survol est réglementé et les recherches scientifiques ne peuvent être effectuées qu'avec une autorisation écrite. Cependant, des autorisations de pêche coutumière peuvent être accordées à l'occasion des fêtes coutumières par le Président de la Province Sud.

Il existe une seule réserve marine de ce type : la réserve Yves Merlet, créée en 1970 (Fig. 2).

Les réserves spéciales marines sont des aires mises à part pour la propagation, la protection et la conservation de la vie animale sauvage et de la végétation, instituées en vue de l'éducation et de la récréation du public dans lesquelles la chasse, l'abattage ou la capture de la faune, la destruction, la mutilation et le ramassage de la flore, la collecte d'échantillons botaniques ou géologiques sont interdites sauf avec autorisation écrite des autorités compétentes et dans un but scientifique.

L'autorité compétente peut dans un but d'éducation et de récréation permettre la construction de routes, sentiers, restaurants, hôtels, ou toutes installations nécessaires à son fonctionnement. C'est ainsi qu'un petit hôtel a été construit sur l'îlot Maître. De même, sur un certain nombre d'îlots, des constructions ont été réalisées (en générale, des pontons) afin de faciliter l'accès des personnes sur la terre ferme.

Les réserves spéciales peuvent être regroupées en une structure plus vaste intitulée Parc Provincial Marin. Il n'en existe qu'un : le Parc du Lagon Sud. Mais on trouve aussi le parc du lagon de Bourail, qui n'est pas à proprement parler un parc provincial (au sens défini par les textes officiels), mais regroupe tout de même trois réserves spéciales.

Les réserves tournantes, quant à elles, ont été conçues et instaurées dans le but de limiter l'impact de la prédation humaine en mettant en place des sortes de jachères supposées permettre un rétablissement des équilibres écologiques, et en particulier des stocks de pêches. Tous les trois ans, une portion de ces réserves est fermée à la pêche. La fermeture dure trois ans, ce qui signifie que les deux autres portions sont ouvertes pendant six années consécutives. Ces réserves sont abandonnées depuis août 1996. Le secteur B a été mis en réserve permanente et rattaché à l'îlot Amédée (Fig. 3). Les deux autres secteurs sont définitivement ouverts à la pêche.

#### • *Inventaire des réserves marines de Nlle Calédonie*

Réserve intégrale Y. Merlet (Fig. 2).

Parc du Lagon Sud comprend les îlots Amédée, Maître, Larégnère, Signal, Canard, Bailly (Fig. 3). Deux réserves vont être ajoutées prochainement : le plateau corallien au Sud de l'anse Vata qui sera rattaché à l'îlot Canard, et près de récif Mbere ou une épave sera coulée (voir Fig. 3, les réserves entourées de bleu).

Réserve spéciale de la fausse passe de Uïtoe (non balisée).

Parc du Lagon de Bourail comprend les baies de la Roche Percée et des Tortues, l'île Verte, la plage de Poe (Fig. 4).

Baie de Prony comprend l'îlot Casy, l'Aiguille de Prony (Fig. 5)



- *Commentaires*

La création de réserves, leur nombre et leurs dimensions ont été et sont encore largement discutées. Parmi les scientifiques, tout d'abord, pour lesquels la question "faut-il mieux une grande réserve ou plusieurs petites ?" est toujours sans réponse, et permet un débat animé. Les plaisanciers trouvent eux "qu'il y a tellement de réserves qu'ils ne peuvent plus pêcher dans le lagon de Noumea". En fait, ils pestent contre le fait qu'ils soient obligés d'aller de plus en plus loin pour réaliser leur "coup de pêche". Néanmoins, le grand nombre de réserves apporte une certaine satisfaction intellectuelle aux calédoniens qui ont une fibre sensible à la qualité et la protection de la nature.

Des études montrent que les réserves permettent le maintien d'une diversité importante, et un nombre accru de poissons de taille significativement plus grande que dans les zones ouvertes à la pêche. Mais il s'agit des poissons récifaux, peu pêchés semble-t-il, et très casaniers. L'effet des réserves sur les stocks de pêche serait donc nettement insuffisant, alors qu'un des buts recherchés précisément lors de leur création était de permettre un accroissement, sinon un maintien des stocks. Je ne reviendrai pas sur la question des réserves tournantes qui voient les effets de fermeture temporaire à la pêche se volatiliser en quelques jours au moment de la réouverture. On peut même supposer qu'à ce moment là, la prédation est tellement forte, le nombre de bateaux jetant l'ancre autour ou sur le récif, et les filets tellement nombreux, que l'effet dévastateur est plus considérable encore sur l'ensemble du milieu que si cette zone avait été ouverte depuis toujours. Il en est de même pour la protection des coraux : les gens bien intentionnés qui viennent visiter les réserves marines, sans prélever ni détruire volontairement les coraux, ne prêtent pas suffisamment attention à l'endroit où ils jettent l'ancre, un facteur considérable de la destruction des récifs.

Ces dernières remarques font dire à certains que les réserves sont inutiles, à d'autres qu'elles sont insuffisantes. On peut tout de même saluer les initiatives des pouvoirs publics de créer des réserves avant que les dégradations n'aient été trop importantes.