

Etude de la phase sexuée du champignon Ascomycète
Microcyclus ulei,
Responsable de la maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa



Pauline Eveno

Stage de recherche de Master 1 Biologie Fonctionnelle des Plantes
encadré par Jean Guyot

Cirad Systèmes biologiques
UPR Bioagresseur : analyse et maîtrise du risque
BP 701
97387 Kourou cedex France

Mots clés: SALB (South American leaf blight), *Microcyclus ulei*, Ascospores, Inoculations, Libérations.
Nombre de mots du mémoire : 7 850
Nombre de caractères du résumé : 1 893

Résumé

Etude sur les ascospores de *Microcyclus ulei*

La maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa (SALB : South American Leaf Blight) causée par le champignon ascomycète *Microcyclus ulei* touche de nombreuses plantations d'hévéas en Amérique du sud, conduisant ainsi à un abandon progressif de leur exploitation. La majorité des clones d'hévéas cultivés dans le monde ont été sélectionnés en Asie et en Afrique en dehors de toute pression parasitaire liée au champignon les rendant très sensibles à *M. ulei*. Il est donc fondamental de comprendre la dynamique de la maladie et les caractéristiques du champignon afin d'appréhender au mieux une possible arrivée de la maladie en Asie et en Afrique. La forme sexuée du champignon joue un rôle essentiel dans les épidémies, attribué auparavant aux conidies. Cette étude a permis de mettre au point une méthode d'inoculation artificielle permettant d'obtenir des stromas. Il a été mis en évidence que plusieurs variables intervenaient dans ce processus. Le stade foliaire en est la première et les inoculations réalisées sur des folioles au stade C permettent d'obtenir les meilleurs résultats, c'est à dire une note d'attaque comprise entre 1,5 et 2,5 et une taille moyenne des lésions entre 1,5 et 2,5 mm, valeurs optimales pour obtenir des stromas en quantité maximale. Différentes expériences d'humectations en conditions contrôlées ont permis de définir les conditions nécessaires à une décharge d'ascospores. En conditions de rosée tout comme en conditions de pluies, la décharge d'ascospores est très rapide et se produit dans l'heure qui suit l'humectation du feuillage. Des humectations successives ont également permis de mettre en évidence un phénomène d'épuisement sur quelques heures ainsi qu'un renouvellement du stock d'ascospores au sein des stromas. Des plants porteurs de stromas dont le feuillage n'avait jamais été humecté peuvent libérer des ascospores dès la première pluie.

Mots clés :

- SALB (South American leaf blight)
- *Microcyclus ulei*
- Ascospores
- Inoculations
- Libérations

Remerciements

J'aimerais, en premier lieu, remercier l'entreprise Michelin, représentée en les personnes de Françoise Granet et Thierry Serres, qui ont assuré le financement de mon voyage et de mon accueil au Cirad de Guyane et sans qui ce stage n'aurait pas été possible. J'espère que ce rapport saura apporter les réponses adéquates aux questions pour lesquelles j'ai été missionnée.

En second lieu, mes remerciements s'adressent à Jean Guyot, chercheur au sein de l'Unité Bioagresseurs : analyse et maîtrise du risque et maître de stage, pour son accueil, son accompagnement tout au long de ce stage et le temps passé à ses côtés.

Du côté de l'université Montpellier II, je tiens à adresser mes remerciements à Messieurs Eric Lacombe, responsable du master I Biologie Fonctionnelle des Plantes ainsi qu'à Fabrice Varoquaux, responsable des stages pour m'avoir permis de réaliser cette expérience.

Christian Cilas, chef de l'Unité Bioagresseurs : analyse et maîtrise du risque, pour le temps accordé lors de sa visite en Guyane et ses précieux conseils en statistiques.

Virgile Condina, technicien de terrain, pour son aide précieuse et son appui technique au quotidien.

Fabien Doaré, technicien de laboratoire, pour son aide et sa bonne humeur.

J'aimerais ensuite remercier l'équipe du CIRAD de Kourou, mes collègues de bureau d'une part dont le dynamisme et la jovialité m'ont accompagné tout au long de ce stage, les services d'appui d'autre part qui ont fait en sorte que ce stage se passe dans les meilleures conditions possibles.

Et tous ceux qui ont pu, de près ou de loin, me faire partager leur connaissance et leur expérience au cours de ces quatre mois. Cette première expérience dans le domaine de l'épidémiologie et au contact des chercheurs m'a permis de réaliser une première expérience réussie dans le domaine de la recherche.

Merci à tous !

Sommaire

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | Introduction | 1 |
| 2. | Objectifs | 3 |
| 3. | Matériel et méthode | 3 |
| 3.1. | Inoculation artificielle..... | 3 |
| 3.2. | Expériences de piégeage | 4 |
| 3.2.1. | Les pièges à spores | 4 |
| 3.2.2. | Réalisation des expériences de piégeage | 4 |
| 3.2.2.1 | Feuilles prélevées au champ | 5 |
| 3.2.2.2 | Plants inoculés artificiellement..... | 5 |
| 3.3. | Les analyses statistiques | 7 |
| 4. | Résultats | 7 |
| 4.1. | Inoculation artificielle..... | 7 |
| 4.2. | Piégeage de spores | 9 |
| 5. | Discussion | 11 |
| 5.1. | Inoculations artificielles | 11 |
| 5.2. | Le piégeage de spores | 13 |
| 6. | Conclusion | 18 |
| 7. | Références | 19 |

1. Introduction

L'hévéaculture fournit actuellement 44% de la production mondiale d'élastomère sur 10 millions d'hectares entretenus par des millions de cultivateurs. Les 10 millions de tonnes de caoutchouc naturel qu'ils produisent sont utilisés par l'industrie automobile à 80% et sa consommation et sa production sont en constante progression (Source CIRAD).

Une grande partie du caoutchouc provenait auparavant des hévéas sauvages et en 1876, H.A. Wickham recueille des graines et rejoint Singapour et le Sri Lanka. C'est à partir de ces semences que sont issues les grandes plantations d'hévéa du sud-est asiatique. Les descendants des arbres de H.A. Wickham ont ensuite été plantés dans les Guyanes, en Amérique du Sud et Centrale ainsi que dans les Caraïbes (Chee et Holliday, 1986).

Cependant les plantations sud-américaines sont ravagées par le South American Leaf Blight (SALB) causé par le champignon ascomycète *Microcyclus ulei*. Le SALB est la maladie la plus dangereuse pour l'hévéa. Il s'agit d'une menace à prendre en considération en Asie et en Afrique où ne sont présents que des clones sensibles au parasite car sélectionnés en absence de pression parasitaire. L'introduction du SALB dans ces régions aurait des conséquences économiques dévastatrices pour les millions de petits exploitants dont le revenu principal est basé sur l'hévéaculture (Le Guen *et al*, 2008) et pour toute la filière du caoutchouc.

L'hévéa appartient à la famille des Euphorbiacées et comprend 10 espèces. Toutes les espèces produisent du latex mais seule *H. brasiliensis* est cultivée pour la quantité et la qualité de son latex. L'hévéa est endémique de la forêt Amazonienne et son habitat recouvre une superficie de 6 millions de kilomètres carrés. On le retrouve aussi bien sur des terrains élevés et bien drainés que sur des terrains plus bas et inondables. En milieu naturel l'arbre peut atteindre 30 mètres de hauteur et 3 mètres de circonférence.

Durant la phase juvénile, les arbres produisent des verticilles de feuilles tout au long de l'année. Le rythme de croissance se traduit par des successions de phases de dormance et de poussées foliaires. Il en résulte une croissance par étage déterminée génétiquement et modulée par les facteurs environnementaux. Lorsqu'il a atteint sa maturité phénologique, l'hévéa connaît naturellement des épisodes de défoliation-refoliation appelés «hivernage». Les feuilles les plus anciennes tombent et sont remplacées par de nouvelles feuilles à des périodes précises de l'année pour chaque clone (Holliday, 1970).

Seules les feuilles immatures sont réceptives au SALB et plus elles sont infectées jeunes, plus les nécroses sont larges. Les conséquences sont une chute de feuilles ou un développement anormal du limbe. C'est à maturité que l'hévéa est le plus touché par les maladies foliaires. En effet, les jeunes arbres produisent de nouvelles feuilles tout au long de l'année sans défoliation brutale. Une grande partie des feuilles échappent ainsi à l'attaque du parasite. Les arbres matures quant à eux ne présentent que des jeunes feuilles lors des périodes de refoliation offrant ainsi un substrat en grande quantité pour le champignon.

M. ulei n'est capable d'infecter que le genre *Hevea*. Son cycle biologique présente trois formes de sporulation :conidienne, pycnidiale et périthéciale. La première forme est asexuée et est appelée *Fusicladium macrosporum*. Elle se traduit par une forte production de conidies sur la face inférieure des folioles dix à douze jours après l'infection. Le processus de germination des conidies est rapide et elles peuvent germer par forte hygrométrie. La forme pycnidiale nommée *Aposphaeria ulei* entraîne l'apparition de petites ponctuations noires.

lorsque le limbe de la feuille commence à durcir. Les pycnidiospores peuvent germer mais la croissance du tube germinatif est rapidement stoppée du fait d'une mauvaise adhérence à la cuticule. Aucun rôle épidémique n'a été identifié pour les pycnidiospores. La forme périthéciale est à la forme parfaite du champignon : elle est issue d'une reproduction sexuée. Elle n'est visible que sur les feuilles matures. Des groupes de périthèces formant des stromas apparaissent sur la marge nécrotique de la face supérieure de la feuille (Cf. Annexe 1). Ces périthèces contiennent des asques renfermant les ascospores. Les ascospores produisent des tubes germinatifs et les appressoria se fixent très fortement à la cuticule. La pénétration du champignon est trans-cuticulaire et le mycelium a une croissance intercellulaire.

La lutte chimique contre *M. ulei* est difficile à appliquer dans des plantations adultes du fait de la taille des arbres et de son coût. Elle est donc limitée aux jardins à bois de greffe, aux pépinières et aux jeunes cultures. La lutte culturale utilisant la défoliation artificielle est efficace mais n'a pas connu de développement industriel. La lutte contre le SALB a donc été orientée vers la culture de l'hévéa en zones dites «escape», c'est-à-dire peu favorables au champignon et vers la sélection de clones résistants. Le but de cette sélection est d'associer la résistance des hévéas sauvages de la forêt amazonienne à la haute productivité des clones sélectionnés en Asie et en Afrique. Au Brésil et en Guyane, la diversité du champignon a été étudiée de manière approfondie dans les années 1980-1990 afin de mieux comprendre comment le parasite contournait les résistances ((Hashim and De Almeida, 1987; Junqueira *et al.*, 1986; Junqueira *et al.*, 1987; Le Guen *et al.*, 2008).

Des informations inédites obtenues grâce à l'étude menée par Guyot permettent une meilleure compréhension du pathosystème *M. ulei*-hévéa. Sur une parcelle saine, le SALB s'installe grâce à une arrivée d'ascospores. Cette hypothèse récemment confirmée n'avait encore jamais été démontrée. Le rôle épidémique des ascospores n'avait été que supposé par comparaison avec la biologie et l'épidémiologie de champignons ascosmycètes plus étudiés.

Les ascospores sont une forme de conservation du champignon pendant la saison défavorable (Cf. Annexe 2). Ils survivent plusieurs mois sur les feuilles matures (Guyot, comm. Pers). Chee a montré que les ascospores étaient présentes toute l'année contrairement aux conidies retrouvées seulement durant la saison des pluies. Leur présence se traduit par 2 pics de piégeage ; un durant la saison sèche puis un second coïncidant avec la période de libération maximale des conidies. Il a démontré que les jours sans pluies, la libération d'ascospores est relativement faible durant la journée pour augmenter dans la soirée et au cours de la nuit. Lors des jours pluvieux, les libérations sont au contraire plus fortes durant la journée avec un pic vers 14 heures. Généralement, une pluie est suivie d'une libération d'ascospores. Cependant, la quantité d'ascospores libérées n'est pas forcément proportionnelle à la quantité d'eau et des pluies intenses n'entraîneront pas forcément de libérations. Chee avait suggéré que la rosée et une très forte humidité seraient plus importantes qu'une pluie dans la libération des ascospores de *M. ulei* (Chee, 1976b).

Les premières infections et la reprise des épidémies au retour de la saison favorable sont dues aux ascospores à condition qu'elles soient en concentration suffisante dans l'air. Leur rôle diminue au cours des cycles épidémiques qui se succèdent au cours de la saison des pluies. La part des conidies dans l'inoculum total s'accroît alors que celle des ascospores diminue (Guyot, 2007).

Les ascospores jouent également un rôle de dissémination de la maladie supérieur à celui des conidies dû à une distance de dissémination supérieure (Rivano, 1992). Leur rôle est donc essentiel pour l'installation de la maladie. *M. ulei* entre donc dans le schéma classique des ascomycètes, dont la conservation et la dissémination à longue distance sont assurées par les ascospores, libérées sous l'action des pluies (Guyot, 2007).

Les études de terrain ont donc montré que la libération des ascospores est en grande partie liée aux fortes hygrométries. Cependant, il n'a pas encore été possible d'établir de manière précise l'influence de ces variables climatiques sur la libération des ascospores. Cela est dû à l'interaction entre les variables climatiques et au fait que ce processus physiologique se joue sur une très petite échelle de temps. Il s'agit d'une précision qu'il n'est pas possible d'avoir sur le terrain. Il est donc nécessaire de passer en conditions contrôlées afin de pouvoir déclencher de manière artificielle des précipitations et des humectations de feuilles (Guyot, 2007). Ces études sont essentielles pour mener une politique de sélection clonale et pour être en mesure de réagir efficacement en cas d'introduction du champignon sur un continent indemne de la maladie.

2. Objectifs

Le premier objectif de ce travail est de définir les conditions nécessaires à la libération des ascospores de *M. ulei*, essentiellement l'humectation des stromas, et de suivre la dynamique de cette libération. Se posent en particulier les questions suivantes :

- ✓ Une seule humectation est-elle nécessaire pour induire une libération d'ascospores ?
- ✓ Existe-t-il un seuil d'humectation minimal pour qu'il y ait une décharge ?
- ✓ Quel est le délai entre l'humectation et la libération ?
- ✓ Quelle est la durée de production d'ascospores par une feuille ?
- ✓ Quelle est la durée de libération des ascospores après une ou plusieurs humectations ?
- ✓ Comment le stock d'ascospores se constitue-t-il ?
- ✓ Le stock est-il libéré en une seule fois ?
- ✓ S'il y a un renouvellement du stock d'ascospores, en combien de temps ce processus a-t-il lieu ?

Le deuxième objectif de ce stage est de mettre au point une méthode d'inoculation artificielle des feuilles de l'hévéa permettant d'obtenir des stromas et des ascospores. Le but visé est d'obtenir des formes sexuées du champignon aussi abondantes semblables que possible que ce qu'on observe dans la nature. On cherchera donc à avoir des nécroses nombreuses mais de petite taille afin de maximiser le périmètre total des nécroses, siège de la reproduction sexuée du champignon. En effet l'idéal est de travailler sur des feuilles dont l'âge et l'histoire sont connus et qu'il est possible de conserver pendant plusieurs semaines à plusieurs mois. Pour y parvenir, il est nécessaire de disposer de plants inoculés artificiellement. L'inoculation artificielle est pratiquée en routine en conditions standardisées pour les tests de résistance clonale et l'étude de la diversité pathogénique du parasite, mais l'observation se fait 10 jours après l'inoculation (Hashim and Pereira, 1989; Junqueira *et al.*, 1986; Le Guen *et al.*, 2008; Mattos *et al.*, 2003). Le protocole ne prévoit pas d'observation sur les stromas et les conditions d'inoculation standard sont inadéquates pour y parvenir, notamment du fait que les feuilles sont inoculées à des stades très jeunes (B2a) et subissent en général de très fortes nécroses ou chutent.

3. Matériel et méthode

3.1. Inoculation artificielle

Des conidies sont prélevées sur la face inférieure de folioles d'hévéas du clone IRCA GY5 multiplicateurs à l'aide d'un petit pinceau. Elles sont mises en solution dans un mélange d'eau stérile et de tween 80 (Polyoxyéthylènesorbitan monooleate). Afin d'obtenir la concentration souhaitée, les spores sont comptées sous microscope (X 125) sur cellule de Malassez. Chaque plant est numéroté. La première feuille inoculée au plus bas du flush est annotée et les trois folioles sont mesurées. Les feuilles sont inoculées avec la solution conidienne sur leur face inférieure avec un atomiseur sous

pression. L'opération se déroule dans une chambre d'inoculation où la température et l'hygrométrie sont maintenues au voisinage de 24°C et 95 % respectivement.

Les inoculations sont pratiquées sur tous les stades foliaires (B2a, B2b et C). Après l'inoculation, les feuilles sont emballées dans des sacs en plastique humidifiés et fermés au niveau de la tige afin que les feuilles soient en humidité saturante pendant 24 heures durant lesquelles elles sont maintenues à l'obscurité totale. Les sacs sont ensuite retirés et une photopériode 12-12 heures est appliquée dans les boxes. Cette opération est réalisée dans une chambre d'inoculation où la température est voisine de 24°C. L'humidité relative y est d'environ 95%. Dix jours après les inoculations, une évaluation du diamètre moyen des lésions foliaires est réalisée et complétée par une évaluation de l'intensité des attaques grâce à une échelle de notation allant de 0 à 5 (Guyot, 2007). La note d'attaque permet d'établir un niveau des dégâts engendrés par l'infection fongique. 0= attaque nulle, 1= attaque faible, 2= attaque moyenne, 3= attaque forte, 4= attaque très forte, 5= la foliole tombe (Cf. Annexe 3). Les plants sont ensuite placés en tunnel ou à l'air libre dans un endroit ombragé.

3.2. Expériences de piégeage

3.2.1. Les pièges à spores

Différents modes de piégeages ont été testés sans succès, en particulier des lames gélosées disposées en prismes selon la méthode utilisée par Rivano (1992). Finalement, seuls les pièges de Burkard ont été utilisés (Cf. Annexe 4). Ils renferment un tambour sur lequel est placée une bande enduite d'une préparation collante (150g de vaseline solide, 18g d'huile de paraffine, 10g d'éthanol, 20 ml d'hexane) (Cf. Annexe 5). Un moteur aspire l'air par une fente de 14mm x 2mm. Les particules en suspension se déposent sur la bande. Pour placer la bande, le tambour est retiré du piège et placé sur un support (Cf. Annexe 6). Un ruban adhésif double face est collé au niveau du repère central du tambour. La bande y est fixée de manière à ce qu'elle soit bien appliquée. Cette opération est réalisée avec des gants afin de ne pas laisser de traces de doigts sur la bande. Le gel de piégeage est étalé en une couche très fine sur l'ensemble de la bande à l'aide d'un ustensile plat et souple. Le débit de référence des pièges est de 10 L/min et est contrôlé avec un débitmètre.

Une fois recouvert de sa bande, le tambour est replacé dans le piège (Cf. Annexe 7). Le repère vert du tambour est placé devant le repère vert de la chambre du piège (Cf. Annexe 8). Le tambour tourne dans le sens des aiguilles d'une montre et les spores sont piégées sur 336 mm de bande. Une fois que le tambour a effectué un tour complet, il est retiré du piège et placé sur son support. La bande est retirée dans le sens inverse des aiguilles d'une montre et placée sur une règle de découpe. La règle permet de découper la bande en 7 fragments de 48 mm à l'aide d'un scalpel. Pour la lecture au microscope, les fragments de bande sont placés, face collante vers le haut, sur lames préalablement couvertes d'une mince couche de Geltavol (35g de Geltavol, 100 ml d'eau distillée, 50g de Glycérol) qui assure l'adhésion de la bande à la lame. La lecture se fait par transect de 2 mm correspondant à la largeur de la fente d'aspiration. La durée de piégeage correspondant aux 2 mm dépend de la vitesse de rotation du tambour: 1,07 min pour un piégeage sur 3 heures, 2,14 min pour un piégeage sur 6 heures, 3,21 min pour un piégeage sur 9 heures, 8,57 min pour un piégeage sur 12 heures.

3.2.2. Réalisation des expériences de piégeage

Les expériences de piégeage portent sur du matériel végétal de deux types :

- ✓ des feuilles portant des stromas prélevées au champ sur la station de Pointe Combi, située à 50 km au nord de Kourou (Cf. Annexe 9),
- ✓ des plants inoculés artificiellement

Quatre protocoles ont été réalisés (figure 1 à 5) afin d'évaluer :

- ✓ la dynamique de la libération des spores après une humectation unique, une humectation continue, à sec
- ✓ le temps nécessaire entre deux humectations pour permettre une nouvelle décharge d'ascospores
- ✓ les conséquences de plusieurs humectations espacées sur la libération des ascospores.

Toutes les séries sont réalisées avec des lots de feuilles différents.

3.2.2.1 Feuilles prélevées au champ

La présence d'ascospores est vérifiée au laboratoire en grattant quelques stromas écrasés ensuite entre lame et lamelle dans une goutte d'eau et observés au microscope. Ces feuilles sont placées dans deux boîtes de pétri dont le fond est recouvert de papier absorbant imbibé d'eau. Afin de recréer une atmosphère où l'humidité relative est élevée, les boîtes sont placées dans un sac en plastique fixé d'un côté au niveau de l'orifice d'aspiration du piège à spore et de l'autre à un petit ventilateur. Le sac est percé afin d'y introduire la sonde d'un thermo-hygromètre électronique. Des expériences préliminaires de piégeage sur 18 h suivant une humectation ont montré que la libération des ascospores se produit dans les 3 premières heures. Cela a permis de réduire, par la suite, le temps de piégeage et d'observer de manière plus précise les événements de libération dans ces trois heures. Les humectations sont réalisées à l'aide d'un pulvérisateur ménager à raison de 15ml pour les deux boîtes de Pétri correspondant à une pluie de 0,48 mm. La température moyenne est de 24,2°C pour une hygrométrie moyenne de 71% (Cf. Annexe 10).

3.2.2.2 Plants inoculés artificiellement

Cette expérience est réalisée en tunnel avec 9 plants inoculés artificiellement et gardés à l'abri de la pluie depuis la date de l'inoculation. Un piège à spores est placé au milieu de ces 9 plants. Le feuillage est humecté à 2 reprises par aspersion pendant 2 minutes, soit l'équivalent d'une pluie de 2 mm. Une station météorologique était placée dans la serre pour suivre les conditions rencontrées par les plants au cours de l'expérience, mais, en raison d'une panne, ses données n'ont pu être que partiellement exploitées. En particulier, la durée d'humectation des feuilles n'a pas été enregistrée. Les ascospores ne sont visibles dans les stromas qu'à partir de 20 jours suivant la maturité des feuilles et leur abondance est maximale entre 60 et 70 jours (Guyot, comm. pers.). Je n'ai donc débuté les piégeages sur les plants inoculés en conditions contrôlées que 2 mois et demi après les premières inoculations. Cela explique le faible nombre d'observations, réalisées sur un seul lot d'arbres. Le piégeage dure 24 heures. Les humectations sont espacées de 10 heures le jour (8h et 18h pour les séries 1, 2, 3 et 5), de 13 heures la nuit (19h et 8h pour la série 4). Toutes les séries sont réalisées avec le même lot d'arbres avec une température moyenne de 28°C (Cf. Annexe 11).

Figure 1 : Protocole 1 : dynamique de la libération des ascospores sur 3 heures suite à une humectation à T0.

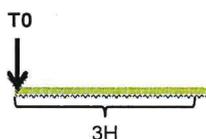


Figure 2 : Protocole 2 : effet de 2 humectations successives sur la libération des ascospores : T0 et T0+9heures.

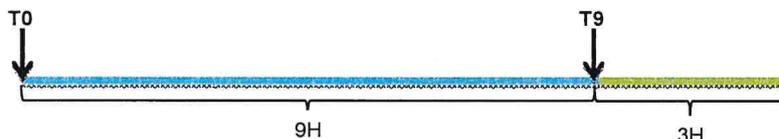


Figure 3 : Protocole 3 : effet d'une succession d'humectations (toutes les 15 mn) sur la libération d'ascospores de T0+7 heures à T0+9 heures suite à une humectation unique à T0.

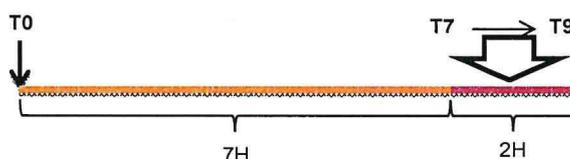


Figure 4 : Protocole 4 : effet d'une succession d'humectations à différents intervalles de temps : T0, T0+3 heures et T0+5 heures.

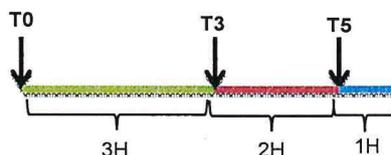


Figure 5 : Protocole 5 : effet de deux humectations successives sur des plants inoculés dont le feuillage n'a jamais été humecté : T0 et T0+10 heures.

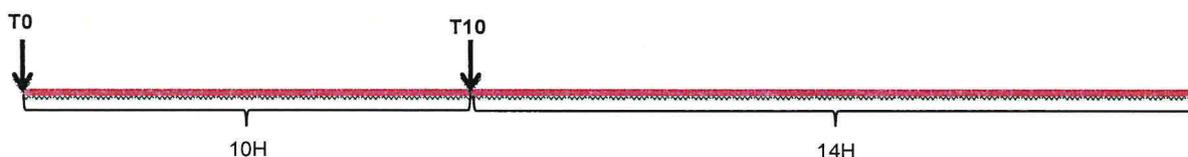


Tableau 1. Séries correspondant aux 5 protocoles et nombre total de spores piégées par protocole.

| Protocole | Durée de piégeage (heures) | Humectations | Séries observées | Nb de séries | Nombre d'ascospores |
|-----------|----------------------------|--|--|--------------|---------------------|
| 1 | 3 heures | T0 | 1, 2, 3, 4, 5, 6-1, 6-3, 7-1, 7-3, 8-1, 8-3, 9-1, 9-3, 10-1, 10-3, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, Serre 1, Serre 2, Serre 3, Serre 4, Serre 5, 29, 30 | 38 | 10188 |
| 2 | 12 heures | T0, T0+9h | 6, 7, 8, 9, 10 | 5 | 4678 |
| 3 | 9 heures | T0, toutes les 15 min de T0+7h à T0+8h45 | 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 27 | 8 | 1923 |
| 4 | 6 heures | T0, T0+3h, T0+5h | 13, 15, 17, 19, 21, 23, 26, 28, 29, 30 | 10 | 2515 |
| 5 | 24 heures | Variable | Serre 1, Serre 2, Serre 3, Serre 4, Serre 5 | 5 | 299 |

3.3. Les analyses statistiques

Le nombre de séries et d'ascospores piégées sur lesquels sont réalisées les analyses sont indiqués dans le tableau 1.

L'analyse des inoculations artificielles est réalisée avec la méthode par segmentation CART déjà utilisée par Guyot et al. (2009) pour analyser l'effet des variables climatiques sur la maladie. Cette méthode permet de déterminer quelle est la variable la plus discriminante. Il s'agit d'une technique de type « arbre de décision » et peut être utilisée pour la prédiction comme la régression linéaire ou pour la détection d'interaction entre variables dans un jeu de données. CART fonctionne par identification de groupes discrets et permet de trouver le lien entre les variables explicatives en cherchant quel serait l'impact sur la variable initiale. Les nœuds parents sont divisés en deux nœuds descendants. Chaque nœud est considéré comme un nœud parent et le nombre de divisions peut être aussi grand que possible. Les variables à expliquer sont la note d'attaque et la taille des lésions au stade D. La segmentation produit un arbre de régression car il s'agit de variables quantitatives. Les moyennes de la variable à expliquer doivent être les plus différentes d'un segment à l'autre. A l'intérieur d'un segment, la dispersion de cette variable autour de sa moyenne doit être la plus petite possible. Cette analyse a été faite avec le logiciel AnswerTree (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Certaines données ont été analysées selon des méthodes plus classiques (calculs de corrélations, régressions linéaires multiples pas à pas) avec le logiciel SAS 3.1 (SAS Institute Inc). La recherche du meilleur ajustement pour la dynamique de la libération des ascospores a été réalisée avec le logiciel CurveExpert 1.3.

4. Résultats

4.1. Inoculation artificielle

L'objectif est d'obtenir un nombre important de stromas de petites tailles sans déformation de la foliole. Les arbres de décisions sont élaborés sur la taille des lésions et la note d'attaque en fonction du stade foliaire, de la dimension des folioles lors de l'inoculation et de la concentration en inoculum. En général, les stromas sont présents en quantité intéressante lorsque la note d'attaque est comprise entre 1,5 et 2,5. Parfois, lors d'inoculations sur des feuilles âgées (fin B2b ou C) les stromas apparaissent très tardivement et une note d'attaque de 1 donne de bons résultats. La taille des lésions qui procure les meilleurs résultats va de 1,5 mm à 2,5 mm. Là encore, une taille de lésions de 1 mm sur des feuilles inoculées à des stades avancés peut procurer de bons résultats.

La note d'attaque moyenne pour l'échantillon de 537 individus inoculés est de 1,82 (Figure 6). Le stade est la première variable à intervenir dans l'explication de la note d'attaque. Le nœud 1 regroupe les 392 individus inoculés aux stades C et en fin B2b. La note d'attaque moyenne est de 1,3. La seconde variable à intervenir pour les individus du nœud 1 est la concentration en inoculum au cours de l'inoculation. Le nœud 3 montre qu'avec une concentration égale ou inférieure à 95 000 spores/mL, la note d'attaque moyenne est de 1,06 pour les 349 individus de ce groupe. La concentration intervient à nouveau pour ce groupe, avec une note d'attaque moyenne de 1,35 si la concentration est comprise entre 40 000 et 95 000 spores/mL. Si la concentration est supérieure à 95 000 spores/mL pour les individus inoculés en C et fin B2b, la note d'attaque moyenne est de 3,32.

La taille des lésions lorsque les feuilles arrivent au stade D a été analysée sur 368 individus dont la taille moyenne des lésions est de 1,57 (Figure 7). La première variable à intervenir est également le

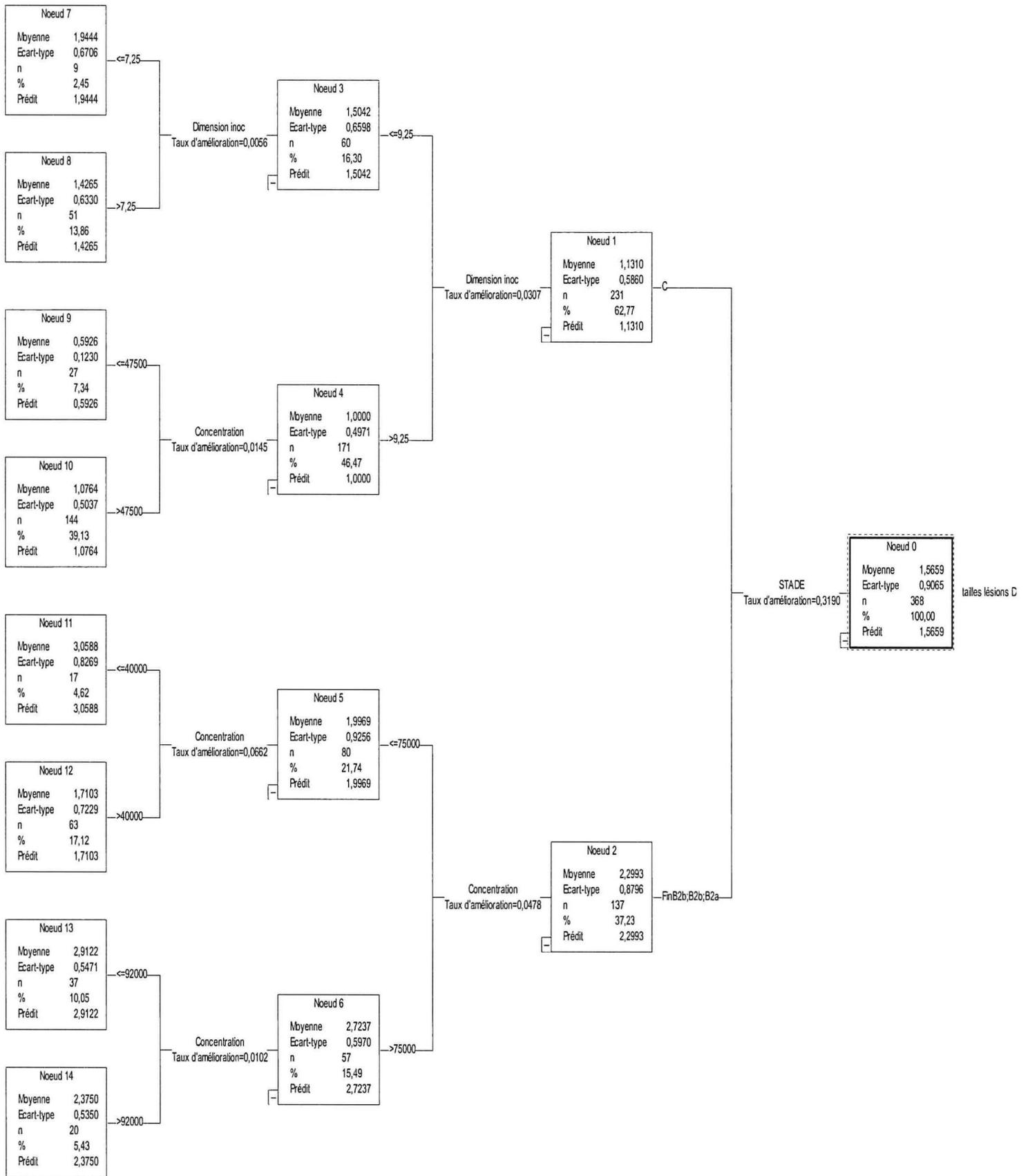


Figure 6. Arbre de décision pour la note d'attaque.

stade. Si les folioles sont inoculées au stade C, la taille moyenne des lésions pour les 231 individus de l'échantillon totale est de 1,13 mm (nœud 1). La dimension des folioles lors de l'inoculation intervient dans un second temps. Les folioles inoculées au stade C, dont la taille est égale ou inférieure à 9,25 cm ont une taille moyenne des lésions de 1,5 mm. Pour ce groupe, si la dimension des folioles à l'inoculation est égale ou supérieure à 7,25 cm, la taille des lésions est en moyenne de 1,9 mm contre 1,42 mm si la dimension foliaire à l'inoculation est supérieure à 7,25 cm. Si les folioles font plus de 9,25 cm, la taille moyenne des lésions est alors de 1 mm. La concentration en inoculum représente la troisième variable explicative à intervenir. Si elle est inférieure ou égale à 47 500 spores/mL, la taille moyenne des lésions est de 0,6 contre 1,07 si cette concentration est supérieure. Le nœud 2 comprend les 137 individus inoculés aux stades B2a, B2b et fin B2b. La concentration est la deuxième variable à intervenir. Si elle est égale ou supérieure à 75 000 spores/mL, la taille moyenne des lésions est de 1,99 mm. Si elle est comprise entre 40 000 et 75 000 spores/mL, la taille moyenne des lésions est alors de 1,7 mm. Des tests de corrélations entre variables initiales et explicatives ont également été réalisés. Elles ont mis en évidence une corrélation hautement significative entre la dimension de la foliole lors de l'inoculation et la taille des lésions.

La taille des lésions au stade D et la note d'attaque peuvent être modélisées ainsi :

$$TL = 2,36 + 1,14.10^{-5} * C - 0,14 * D \quad (1)$$

TL= Taille des lésions, C= Concentration en inoculum, D= Dimension de la foliole lors de l'inoculation

Ce modèle explique 27 % des variations dans la taille des lésions et est hautement significatif. La dimension des folioles lors de l'inoculation explique 20 % des variations et la concentration en inoculum 6 %.

$$NA = 2,32 + 2,22.10^{-5} * C - 0,14 * D \quad (2)$$

NA= Note d'attaque, C= Concentration en inoculum, D= Dimension de la foliole lors de l'inoculation

Ce modèle explique 39 % des variations dans la note d'attaque et est hautement significatif. Ces variations sont expliquées à 24 % par la concentration en inoculum et à 15 % par la dimension des folioles lors de l'inoculation.

4.2. Piégeage de spores

La libération d'ascospores est très rapide. Durant les 10 premières minutes, 12 % des ascospores sont libérées. La libération est maximale entre la 10^{ème} et la 20^{ème} minute. Les ascospores ne sont plus libérées après la 90^{ème} minute (Figure 8, protocole 1). Le cumul des pourcentages de toutes les séries montre qu'entre 10 et 20 minutes après l'humectation, plus de la moitié des ascospores sont libérées pour atteindre 100% à 90 minutes (Figure 9, protocole 1). Les piégeages sur 6 heures (Figure 10, protocole 4), sur 9 heures (Figure 11, protocole 3) et sur 12 heures (Figure 13, protocole 2) montrent que de nouvelles ascospores sont piégées uniquement s'il y a une nouvelle humectation. Les piégeages sous tunnel sur les plants inoculés artificiellement montrent une dynamique identique (Figure 14, protocole 5). Au fur et à mesure que les humectations sur feuilles prélevées au champ se succèdent, le nombre d'ascospores libérées diminue (tableau 2). Sur plants inoculés artificiellement, la tendance est identique : 215 spores en 1^{ère} série (56 %), 84 spores en 2^{ème} série (22 %), 53 spores en 3^{ème} série (14 %), 84 spores en 4^{ème} et 5^{ème} séries (4 % chacune).

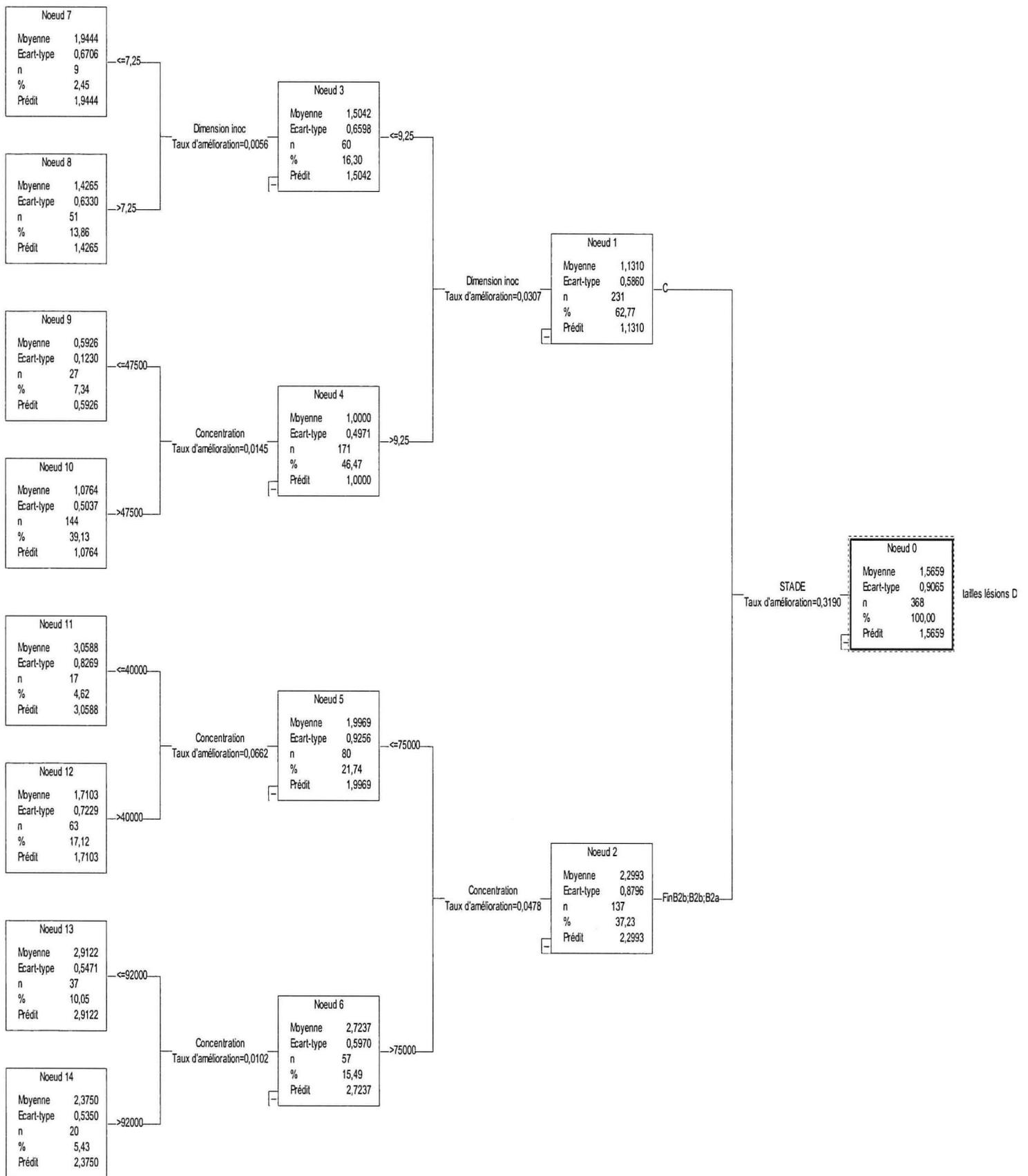


Figure 7. Arbre de décision pour la taille des lésions au stade D.

| Protocole | Humectation 1 | Humectation 2 | Humectation 3 |
|-----------|------------------|------------------|------------------|
| 2 | 2858 (62 %) | 1787 (38 %) | |
| 3 | 1386 (73 %) | 525 (27 %) | |
| 4 | 2164 (86 %) | 245 (10 %) | 100 (4 %) |

Tableau 2. Evolution du nombre d'ascospores piégées au fur et à mesure des humectations sur les feuilles prélevées au champ.

Le fait de maintenir une humectation continue par des aspersion toutes les 15 minutes (Figure 11, protocole 3) ne prolonge pas la durée d'éjection des ascospores. La dynamique de leur libération est identique à celle obtenue lors d'une seule humectation (Figure 12). Dans le protocole 1, ce n'est donc pas l'assèchement des feuilles qui permet la libération des ascospores mais bien l'humectation elle-même.

La libération d'ascospores en fonction du temps suit le modèle de Weibull (Figure 15) où $r = 0,99986$. La distribution de Weibull est un processus continu de distribution de probabilité :

$$ASC = a - b e^{(-cT)^d} \quad (3)$$

ASC= Pourcentages cumulés d'ascospores piégées, T= Temps (min.), a= 100,42892, b= 165,64211, c= 0,2052618, d= 0,67244926.

5. Discussion

5.1. Inoculations artificielles

Les premières inoculations ont été réalisées sur des folioles au stade B2a car il s'agit du stade le plus réceptif (Junqueira *et al.*, 1990; Lieberei, 2007). Cependant, pour toutes les concentrations testées, les feuilles se recroquevillent dès 5-6 jours après inoculations et on n'obtient pas de stromas. En inoculant à des stades plus avancés, j'ai constaté qu'au stade B2b, une partie des feuilles évoluait aussi vers un fort flétrissement allant même jusqu'à la chute. Au stade C les déformations du limbe sont beaucoup moins fortes : les notes d'attaque n'excèdent pas 2. Lorsque les concentrations en inoculum sont comprises entre 40 000 et 75 000 spores/mL, la taille moyenne des lésions est de 1,7 mm en moyenne sur les feuilles en B2a. On peut obtenir des résultats sensiblement identiques si l'on inocule à faible concentration sur une feuille jeune ou à forte concentration sur une feuille plus âgée. Bien que le stade foliaire et la concentration en inoculum jouent un rôle important dans le résultat final, j'ai constaté que la dimension foliaire lors de l'inoculation influe elle aussi fortement sur note d'attaque et sur la taille des nécroses. Les meilleurs résultats sont obtenus pour des folioles dont la longueur est comprise entre 8 cm et 9,25 cm. Plus les feuilles sont petites lors de l'inoculation, plus les lésions ont tendance à être larges lorsque la feuille arrive au stade D. La dimension de la feuille le jour de l'inoculation et la taille des lésions au stade D sont bien corrélées. Lorsque les feuilles dépassent 15 cm lors de l'inoculation (ce qui se rencontre uniquement dans le cas du stade C), les nécroses et les stromas apparaissent très tardivement, bien après le passage au stade D. La taille des lésions est alors très petite et le nombre de stromas est faible, donc peu intéressant pour une étude de la forme sexuée.

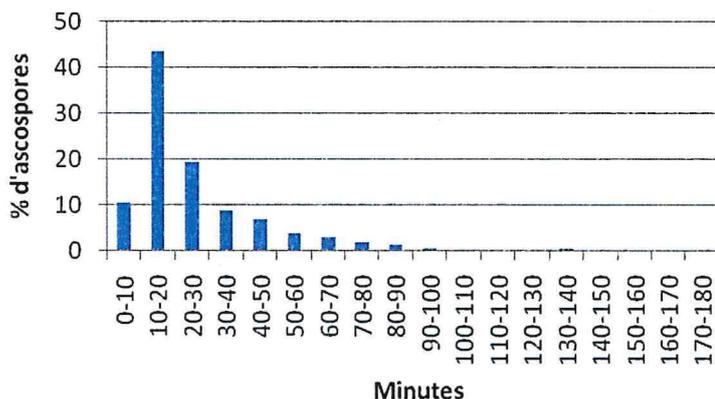


Figure 8: Pourcentages d'ascospores piégées sur 3 heures suite à une humidification à T0.

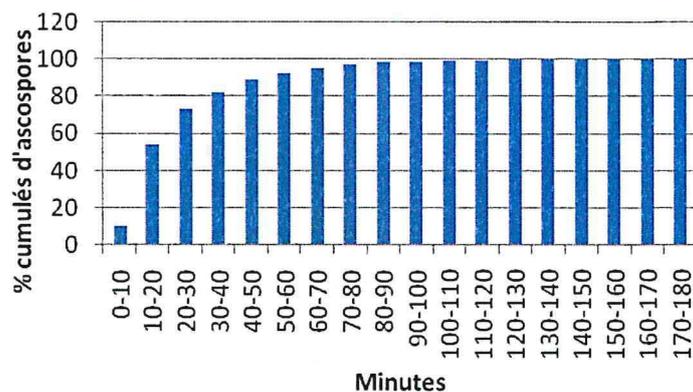


Figure 9: Pourcentages cumulés d'ascospores piégées sur 3 heures suite à une humidification à T0.

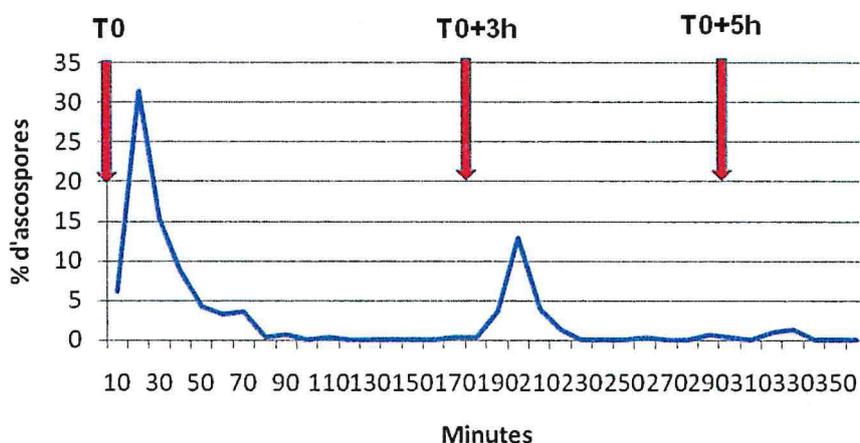


Figure 10: Pourcentages d'ascospores piégées sur 6 heures suite à une humidification à T0, T0+3 heures et T0+5 heures. Les flèches rouges représentent les humidifications.

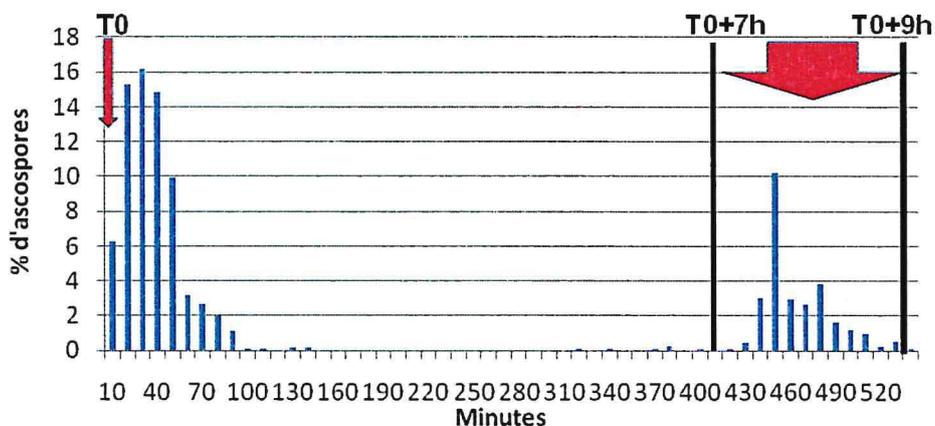


Figure 11: Pourcentages d'ascospores piégées sur 9 heures suite à une humidification à T0 puis suite à des humidifications successives de T0+7 heures à T0+9 heures. La grosse flèche représente les humidifications successives.

Selon mes observations, les meilleurs résultats pour l'inoculation sont ceux obtenus sur des feuilles inoculées au stade C à 95 000 spores/mL et mesurant de 8 à 10 cm de longueur. C'est dans ces conditions que l'on obtient le plus fréquemment des lésions nombreuses, de petites tailles avec des stromas qui apparaissent rapidement. L'inoculation de feuilles en C présente, en outre, deux avantages :

- ✓ la taille des folioles de stade C les rend plus faciles à manipuler
- ✓ au stade C, la surface du limbe n'est pas complètement lisse contrairement aux limbes des feuilles de stade B2a et B2b. L'inoculum a tendance à mieux adhérer et se répartit de façon plus homogène sans formes de grosses gouttes sur la feuille.

Cependant, il faut noter que des conditions d'inoculation identiques (concentration en inoculum, stade foliaire, dimension de la foliole) peuvent conduire à des résultats variables. Par exemple, des feuilles inoculées au stade C peuvent, dans certains cas, produire très rapidement des stromas et, dans d'autres cas, présenter des stromas seulement 2 à 3 semaines après le stade D sans avoir montré auparavant de nécroses ni de sporulation conidienne.

Des améliorations pourraient être apportées pour la conservation des plants après l'inoculation, notamment placer les plants à l'extérieur, dans un endroit ombragé, pendant les premières semaines suivant leur sortie de la chambre d'inoculation afin que les stromas puissent se développer sous un minimum d'humectation et à température mois élevée. Les plants seraient ensuite remis sous tunnel après 2 mois environ, début d'apparition des ascospores dans les stromas. En effet, j'ai noté que les stromas sur plants inoculés artificiellement ont un aspect différent de celui des stromas sur feuilles prélevées au champ : ils sont moins globuleux, aplatis, lisses, ils brunissent au lieu de rester noirs et ne sont presque plus visibles. Il est possible que leur capacité à produire et à libérer des ascospores ne soit pas la même qu'en milieu naturel.

5.1. Le piégeage de spores

Mes expériences mettent en évidence les points suivants ;

Le déclenchement de la libération des ascospores nécessite que les stromas soient mouillés, comme pour de nombreux ascomycètes.

La libération des ascospores se produit en présence d'une faible quantité d'eau sur les stromas. Certaines études réalisées sur *Venturia inaequalis*, ont montré qu'il est possible d'obtenir la libération d'ascospores en présence d'une humidité très élevée ou de rosée mais en très faible quantité par rapport à la libération sous une pluie (Stensvand et al., 1998). De fortes pluies n'entraînent nécessairement de piégeages plus importants : cela a été montré par Pinkerton et al. (1997) pour *Anisogramma anomala* ; sous forte pluies, c'est plus le mode de dissémination qui diffère (splashing et non plus anémophile). Guyot (2007) a constaté sur *M. ulmi* que les fortes pluies ne sont pas un facteur déterminant dans la libération des ascospores. De nombreux auteurs ont fait la même constatation pour *V. inaequalis* (Moore, 1958, Aylor et Anagnostakis, 1991, Ciecierski et al., 1995, ; Gadoury et al., 1998). D'autres études sur *V. inaequalis* ont montré que la rosée ne suffit pas à libérer les ascospores mais qu'une véritable pluie est nécessaire mais excès d'eau nuit à la libération des ascospores (Brook, 1968) :

Nombre d'ascospores

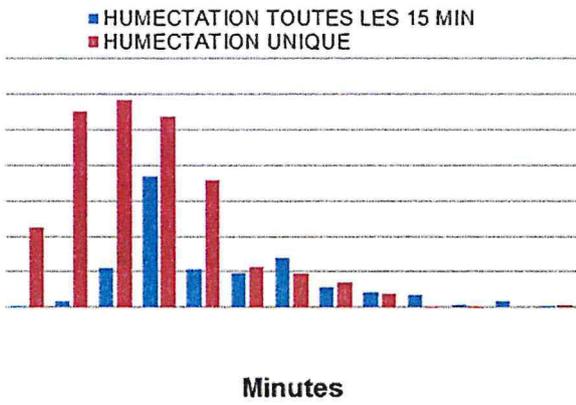


Figure 12: Comparaison entre le nombre d'ascospores libérées suite à une humectation unique ou répétée. L'humectation unique est réalisée à T0. Les humectations répétées sont effectuées sur 2 heures à partir de T0.

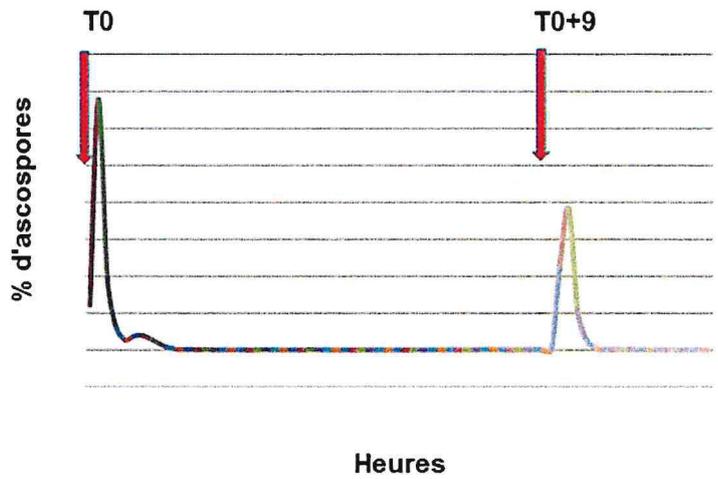


Figure 13: Pourcentages d'ascospores piégées sur 12 heures suite à une humectation à T0 et T0+9 heures. Les flèches rouges représentent les humectations.

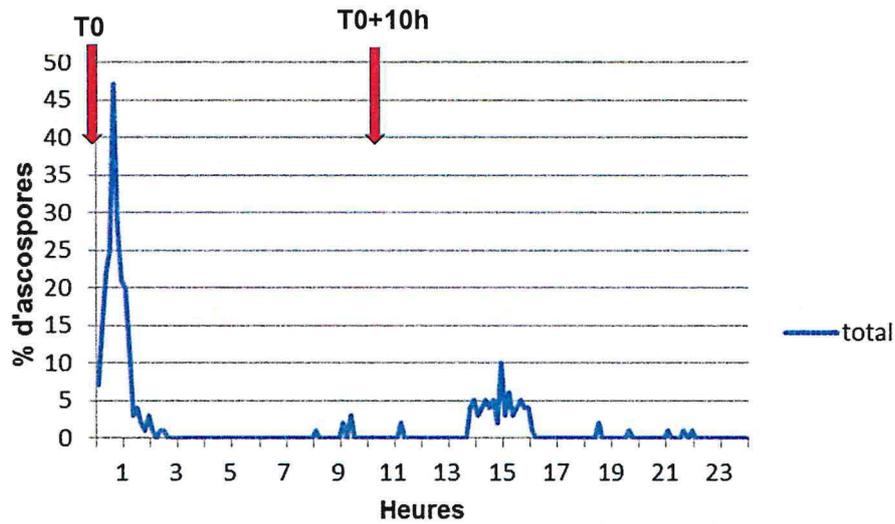


Figure 14: Pourcentages d'ascospores libérées suite à 2 humectations sur 24 heures: T0 et T0+10 heures. Les différentes séries sont réalisées sur le même lot d'arbre.

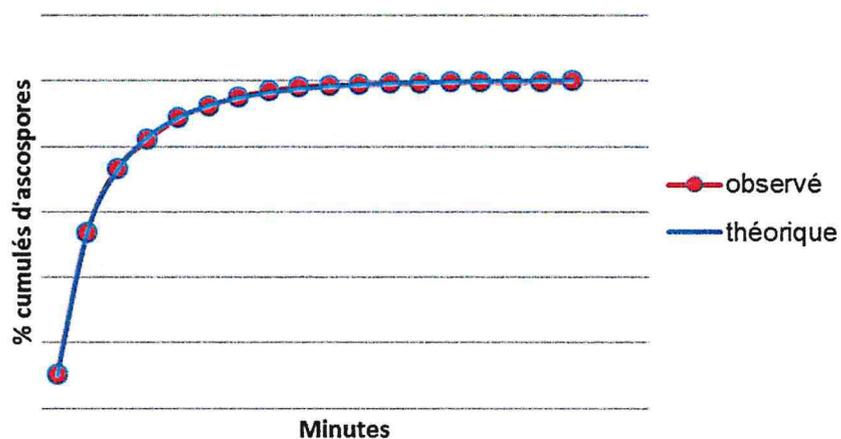


Figure 15: Comparaison des pourcentages cumulés d'ascospores observées avec les valeurs théoriques appartenant au modèle de Weibull

- ✓ En présence d'une mince couche d'eau, les asques entrent en turgescence, leurs pointes dépassent de la couche d'eau et déchargent les ascospores dans l'air. Lorsque la feuille est en train de sécher mais n'est pas complètement sèche, les asques continuent à émerger mais ne peuvent plus décharger d'ascospores. Les meilleures conditions pour qu'il puisse y avoir une décharge c'est lorsque les asques traversent une mince couche d'eau avant de libérer les ascospores.
- ✓ Si la couche d'eau est trop épaisse, les ascospores sont déchargées dans l'eau et restent bloquées dans les gouttes d'eau.
- ✓ Si la couche d'eau est trop fine, les asques mettent trop de temps à émerger et la quantité d'ascospores libérée est très faible. Plusieurs asques de chaque périthèce peuvent donc émerger sans décharger d'ascospores lorsque la feuille est dans sa dernière étape de séchage.
- ✓ Occasionnellement, les ascospores peuvent être libérées par beau temps si les parois des asques ont été brisées auparavant, ce qui permet l'entraînement des ascospores par le vent.

Le dépôt de rosée sur les feuilles se rencontre plutôt par temps calme alors que les pluies sont souvent associées au vent. Il est donc possible que ce ne soient pas les pluies en elles-mêmes mais le vent qui leur est associé qui favorise la libération et la dispersion des ascospores. Pour *V. inaequalis*, les piégeages d'ascospores sont plus faibles lors des nuits de rosée et sans pluies. La rosée peut permettre leur libération mais les conditions de rosée ne favorisent pas leur dispersion. S'il n'y a pas de vent, les ascospores libérées auront tendance à retomber dans le film d'eau créé par la rosée. Les ascospores peuvent donc être déchargées en cas de rosée mais il ne faut pas qu'il y ait trop d'eau sur la feuille afin que les périthèces et donc les asques ne soient submergés. Lorsque l'eau s'évapore il peut alors y avoir libération des ascospores dans l'air (Brook, 1968). Des libérations d'ascospores de *V. inaequalis* ont été observées lors de nuits sans pluies, juste avec de la rosée mais les piégeages sont largement inférieurs à ceux obtenus suite à une pluie. Les cas de piégeage d'ascospores en grande quantité n'ont été obtenus que lorsque la rosée était précédée d'une pluie 2 heures auparavant et que les feuilles n'avaient pas eu le temps de sécher (Stensvand et al., 1998).

La libération des ascospores est rapide et le pourcentage cumulé de spores piégées suit un modèle de Weibull. Elle débute quelques minutes après l'humectation et atteint son maximum dans les 10 à 20 minutes qui suivent. 80 % des ascospores sont libérées en moins de 40 minutes. La totalité des ascospores piégées l'est dans les 90 minutes qui suivent l'humectation.

Il s'agit donc d'un phénomène très rapide comparé aux expériences de libération réalisées sur les ascospores de *V. inaequalis*. Il a été mis en évidence que les libérations d'ascospores ne sont pas immédiates quelles que soient les heures de la journée auxquelles ont lieu les pluies. Les premiers piégeages se font 4 à 8 heures suite à l'humectation et atteignent un maximum autour de 12 heures (MacHardy et Gadoury, 1986). Cependant, plusieurs auteurs se contredisent sur le délai entre l'humectation et la libération des ascospores de *V. inaequalis*. Dans tous les cas, les libérations d'ascospores ne débutent jamais moins de 2 heures après l'humectation.

Une humectation continue des stromas ne prolonge pas la durée de libération des ascospores.

Il y a donc un stock d'ascospores qui se libère en une seule vague et se tarit dès la première humectation. Des humectations ont été réalisées toutes les 15 minutes durant 2 heures (protocole 3). Les libérations n'ont pas duré tout le temps de l'humectation. Pour *V. inaequalis*, plusieurs études ont montré que des libérations d'ascospores sont possibles tant qu'il pleut et qu'une succession d'humectations favorise la libération d'ascospores. Le fait que les feuilles puissent partiellement sécher entre chaque humectation permettrait une libération de spores en plus grande quantité et sur une plus longue période (Gilpatrick et Szkolnik, 1978). Il serait cependant intéressant d'observer la dynamique de libération des ascospores due à des humectations successives sans l'humectation préalable pratiquée quelques heures plus tôt.

Après une période d'assèchement de quelques heures, une nouvelle humectation entraîne une nouvelle libération d'ascospores qui suit la même dynamique que la première. Lors de mes expériences, j'ai constaté ce phénomène jusqu'à 2 heures d'écart entre deux humectations, mais il est possible que ce délai soit encore plus court. Réaliser des expériences complémentaires permettant de réduire davantage le délai entre les humectations permettrait d'avoir des informations supplémentaires sur le processus de décharge. Il pourrait être intéressant de réaliser des humectations toutes les 100 minutes : durée d'un cycle de libération d'ascospores.

Au fur et à mesure que les humectations se succèdent, la quantité de spores piégées diminue. Il y a constitution d'un nouveau stock d'ascospores libérables mais qui s'affaiblit progressivement. Il y a donc un phénomène d'épuisement des stromas, tout au moins dans le court terme. Le phénomène est moins évident dans le long terme car :

- ✓ les feuilles collectées au champ sont capables de libérer des ascospores alors qu'elles ont subi auparavant de nombreux événements pluvieux ; On peut donc penser à un renouvellement du stock mais sur un plus long terme.
- ✓ la constitution d'un stock d'ascospores disponible au retour de la saison des pluies pour initier les épidémies se fait sur des feuilles qui ont subi quasiment quotidiennement des périodes d'humectation nocturne prolongée (Guyot, 2007).

On constate ce phénomène d'épuisement aussi bien pour les feuilles prélevées au champ sur des observations de quelques heures et pour les feuilles inoculées artificiellement sur une échelle de temps de plusieurs jours. Le renouvellement des périthèces pourrait donc être très lent et se dérouler sur plusieurs jours ou plusieurs semaines. Renouveler les expériences d'humectations du feuillage sur plusieurs semaines et sur un même lot de plants permettrait d'observer s'il y a bien renouvellement du stock d'ascospores.

Ce double phénomène d'épuisement / renouvellement du stock d'ascospores m'amène à m'interroger sur les mécanismes physiologiques et histologiques qui y concourent :

- ✓ Sur une feuille donnée, y a-t-il apparition de nouveaux stromas ?
- ✓ Y-a-t-il, au sein d'un stroma, apparition de nouveaux périthèces ?
- ✓ Sont-ce les mêmes périthèces au sein desquels il y a maturation de nouveaux asques ?

Des études histologiques sur *V. inaequalis*. ont montré que les asques ne mûrissent pas tous simultanément. De nouveaux asques sont formés en permanence. Les jeunes asques poussent entre les plus anciens en les forçant à s'éloigner de l'hyménium et de la lumière du périthèce. Cette force est partiellement compensée par l'expansion continue de l'ascocarpe. Cette expansion cesse quand le périthèce est assez grand et que les périthèces commencent à se toucher les uns les autres. Le facteur induisant une pression immédiate est l'hydratation des asques. Si les asques sont retirés d'un périthèce sec et observé au microscope, la paroi des asques est très mince. Quand les asques sont humidifiés, ils entrent en état de turgescence et leur taille double en largeur. Le résultat de cette soudaine humectation du périthèce correspond à une ouverture de l'ostiole. Une légère humectation est suffisante pour permettre aux asques de sortir du canal et de l'ostiole. Les périthèces se poussent alors les uns contre les autres. Lors de l'éjection, les asques intacts ainsi que les spores libres remontent le canal. Mais seule une minorité de spores est libérée alors que les asques sont encore dans le canal. La grande majorité des asques éclatent et éjectent leurs ascospores une fois arrivés à la surface du périthèce (Gottwald et Cameron, 1979).

Seules des études histologiques sur *M. ulmi* pourront permettre de répondre concrètement à ces questions. La littérature reste pauvre sur ce sujet et aucune étude n'a été réalisée sur *M. ulmi*.

Il est possible d'obtenir des ascospores à partir d'inoculations en conditions contrôlées. Aucune méthode d'inoculation permettant d'obtenir des stromas n'avait été mise au point. Le risque,

était donc de ne pas obtenir de stromas ou d'en avoir mais vides d'ascospores, compromettant ainsi les expériences sur les feuilles inoculées. Cependant, les inoculations ont rapidement donné des résultats satisfaisants permettant de pouvoir lancer les premières expériences 2 mois et demi après les inoculations.

Après plus de 60 jours sans la moindre humectation, le champignon est capable de libérer des ascospores dès la première humectation. Cela montre que les ascospores sont bien des organes de conservation du champignon capables d'être libérés lors d'évènements climatiques favorables, en particulier les premières pluies qui suivent la saison sèche. La viabilité de ces ascospores devra cependant être vérifiée afin de s'assurer que le fait qu'ils aient été privés d'humectation durant leur développement n'ait pas eu d'impact sur leur pouvoir pathogène. Les stromas obtenus sous tunnel diffèrent de ceux prélevés au champ, il est possible que cela affecte la quantité de spores produites ou leur libération. En effet, en comparaison des expériences réalisées en laboratoire, je m'attendais à obtenir beaucoup d'ascospores étant donné la quantité de stromas présents sur les neuf plants d'hévéas utilisés pour cette expérience.

Je peux émettre diverses hypothèses pour expliquer cette observation :

- ✓ La forme aplatie des stromas pourrait gêner la libération des ascospores ;
- ✓ La forme anormale des ascospores pourrait gêner leur éjection ;
- ✓ L'absence totale d'humectation pourrait avoir ralenti la maturation des périthèces ou la formation d'asques et d'ascospores ;

Les stromas étant secs en début d'expérience, il est possible qu'une succession d'humectations soit nécessaire pour un fonctionnement optimal des périthèces. Cette hypothèse est cependant peu probable, car les piégeages obtenus à partir de ces neuf plants suivent la même dynamique que ceux obtenus avec les feuilles collectées au champ. Au cours des différentes séries d'humectation, je note une diminution progressive du nombre de spores piégées. Les piégeages sont mêmes nuls suite aux 11^{ème} et 12^{ème} humectations. Une malformation des périthèces seraient l'hypothèse la plus probable pour expliquer la faible quantité d'ascospores piégées. Un canal trop étroit ou une mauvaise ouverture des ostioles pourrait être une des causes empêchant une expulsion efficace suite à une humectation. L'absence presque totale de vent pourrait aussi expliquer ce nombre relativement faible d'ascospores piégées. En effet, il ne s'agit pas d'un facteur influant dans la libération des ascospores mais dans leur dissémination. Les premières expériences au laboratoire ont été réalisées sans ventilation et aucune ascospore n'a été piégée. Afin que les ascospores puissent se disséminer suite à l'éjection, ils doivent traverser la couche d'air présente à la surface de la feuille pour ensuite être emportées par le vent (Brook, 1968). Les ascospores étaient certainement libérables mais l'absence de vent n'a pas permis leur piégeage.

Les températures élevées (> 24 °C) n'empêchent pas la libération des ascospores, ce qui confirme les observations de Guyot (2007) et s'oppose donc aux avis précédents, non démontrés, selon lesquels la libération des ascospores nécessiterait des températures inférieures à 20°C, voire moins. Cependant, la température pourrait avoir un impact sur les quantités d'ascospores libérées. Beaucoup d'expériences ont montré que la concentration aérienne en ascospores variait au cours de la journée. Ces observations ne peuvent pas être directement expliquées par la distribution journalière des pluies. Il y aurait donc bien un parallèle entre les variations journalières des concentrations d'ascospores et les variations de températures et d'intensité lumineuse. Les humectations seraient un élément indispensable mais agissant différemment selon ses interactions avec d'autres facteurs climatiques (Hirst et Stedman, 1962).

Des feuilles peuvent présenter des ascospores à l'intérieur des stromas sans qu'il y ait forcément de décharge suite à une humectation. En effet, sur quelques séries, il n'y pas eu ou très peu d'ascospores piégées alors que l'écrasement sous microscope montrait la présence de nombreuses ascospores. Des études réalisées sur *V. inaequalis* ont montré que même en présence

d'ascospores et d'humectation, il n'y avait pas toujours de libération d'ascospores. L'absence de piégeage n'est donc pas due à un épuisement de l'offre en inoculum mais plutôt à un affaiblissement du mécanisme de décharge (Gadoury et MacHardy, 1982). Nous pourrions être dans cette situation pour certaines feuilles sauvages récoltées à Combi.

6. Conclusion

Très peu d'études ont été réalisées sur la forme sexuée du champignon *M. ulei*. Les rôles épidémiologiques étaient surtout attribués aux conidies par comparaison avec d'autres pathosystèmes incluant des champignons ascomycètes. L'importance des ascospores dans les épidémies n'a été démontrée que récemment par Guyot (2007). Cette étude, bien que brève, a permis d'initier un nouveau thème de recherche sur *Microcyclus ulei*, et déjà d'apporter des informations nouvelles sur le fonctionnement de la phase sexuée de ce champignon. La mise au point d'une méthode d'inoculation artificielle de plants d'hévéas permettant d'obtenir des stromas et des ascospores représente un outil précieux pour réaliser de telles études.

Certains aspects devront être abordés afin d'obtenir davantage d'informations :

- ✓ Pendant combien de temps les stromas peuvent-ils libérer des ascospores viables ?
- ✓ Comment se passe, histologiquement, le renouvellement des ascospores sur les feuilles d'hévéas et la constitution d'un stock d'ascospores disponible pour initier de nouvelles épidémies dans des conditions climatiques propices, toute l'année ?
- ✓ Quel est le délai nécessaire entre deux humectations pour reconstituer un stock optimal d'ascospores ?
- ✓ Les possibilités de renouvellement d'ascospores ont-elles une limite dans le temps ? Cela est probable car Guyot (comm. pers.) a observé une diminution de la quantité d'ascospores dans les stromas sur des feuilles âgées d'une centaine de jours après le début du stade D.
- ✓ Faut-il une libération du stock d'ascospores entre deux humectations pour initier à nouveau le processus de production ?
- ✓ Quelles sont les conséquences de l'alternance de périodes d'humectation et de séchage ? Favorise-t-elle la libération d'ascospores comme pour *V. inaequalis* (Moore, 1958) ?
- ✓ Comment intervient l'eau dans cette libération ? Sur cet aspect, la littérature est assez abondante, mais dans le cas de *M. ulei*, nous ne disposons uniquement que d'observations de terrain difficiles à relier au mécanisme de libération qui, nous l'avons montré est très rapide. Au champ, l'abondance des pluies n'est pas un facteur primordial dans la libération des ascospores, l'hygrométrie et l'humectation étant les facteurs principaux. Les pluies abondantes sont même considérées comme défavorables à la maladie. A l'inverse, l'humectation nocturne quotidienne qui recouvre les feuilles d'hévéas en saison sèche n'entraîne qu'une faible libération d'ascospores comparée à celle qui résulte des pluies de début de saison humide (Guyot, 2007). Mes résultats tendent à montrer qu'une très faible humectation suffit à libérer les ascospores. La question a été abordée sur d'autres pathosystèmes, avec des conclusions différentes et des avis partagés.

Des expériences complémentaires pourraient être réalisées ;

- ✓ Déterminer avec plus de précision quelles sont les quantités d'eau qui permettent ou non une décharge efficace d'ascospores.
- ✓ Une approche histologique du problème est à envisager, bien qu'une étude préliminaire ait montré l'existence de difficultés particulières pour une telle étude sur *M. ulei* (Trenel, 2008).
- ✓ Renouveler des expériences d'humectation de façon à connaître le délai minimal entre deux libérations.
- ✓ Observer le renouvellement des périthèces en ascospores suite à plusieurs humectations et voir en combien de temps le stock se renouvelle.

- ✓ A plus grande échelle, étudier la dissémination des ascospores au sein d'une parcelle afin d'observer comment évolue la maladie.

La méthode d'inoculation artificielle devra être améliorée afin d'obtenir des stromas identiques à ceux observés dans la nature. Il sera aussi indispensable de définir des conditions standard pour l'étude de la libération des ascospores sous tunnels. Cette méthode d'étude devra être privilégiée pour suivre le fonctionnement de la forme sexuée du champignon sur le long terme, car l'utilisation de feuilles prélevées au champ étant une technique destructrice, elle ne permet que des études sur le court terme et non renouvelables.

Il est important de comprendre comment fonctionne le champignon dans sa globalité en tenant compte de tous les facteurs climatiques mais aussi de la phénologie de l'hôte afin de lutter efficacement contre le SALB en Amérique du Sud, et d'appréhender au mieux une possible arrivée en Asie et en Afrique.

7. Références

Aylor D. E., Anagnostakis S. L., 1991. Active discharge distance of ascospores of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 81:548-551.

Brook P. J., 1968. Effects of light, temperature, and moisture on release of ascospores by *Venturia inaequalis*.

Chee, K.H., 1976a. Assessing susceptibility of Hevea clones to *Microcyclus ulei*. *Ann. Appl. Biol.*, 84, 135-145.

Chee, K.H., 1976b. South American Leaf blight of *Hevea brasiliensis*: spore dispersal of *Microcyclus ulei*. *Ann. Appl. Biol.*, 84, 147-152.

Chee, K.H., 1976c. Factors affecting discharge, germination and viability of spores of *Microcyclus ulei*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 66 (3), 499-504.

Chee K.H., Holliday P., 1986. South American Leaf Blight of hevea rubber. Malaysian Rubber Research and Development Board No. 13.

Ciecierski W., Cimanowski J., Bielenin A., 1995. Discharge of ascospores of *Venturia inaequalis*. *Journal of fruit and ornamental plant research*. Volume 3, No 2.

Gadoury M. D., Machardy W. E., 1982. Preparation and interpretation of squash mounts of pseudothecia of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 72:92-95.

Gadoury D. M., Stensvand A., R. C. Seem, 1998. Influence of light, relative humidity, and maturity of populations on discharge of ascospores of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*. Volume 88, No 9, 902-909.

Gilpatrick J. D., Szkolnik M., 1978. Maturation and discharge of ascospores of the apple scab fungus. New York State Agricultural experiment station, numéro 28.

Gottwald T. R., Cameron H. R., 1979. Studies in the morphology and the life history of *Anisogramma anomala*. *Mycologia*, volume 71.

Guyot J., Cilas C., Sache I., 2007. Influence of host resistance and phenology on South American Leaf Blight of the rubber tree with a special consideration for its temporal dynamics.

Guyot J., 2007. Analyse, à petite échelle, de l'influence de l'environnement, de l'inoculum, et de l'hôte sur la dynamique épidémique de la maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa (*Microcyclus ulei*) en milieu amazonien. Thèse de Doctorat, Université Montpellier, SupAgro Montpellier, 199 pp.

Guyot J., Condina V., Doaré F., Cilas C., Sache I., 2009. Segmentation applied to weather-disease relationships in South American leaf blight of the rubber tree. *European Journal of Plant Pathology*.126:349–362.

Hashim I., De Almeida L.C.C., 1987. Identification of races and *in vitro* sporulation of *Microcyclus ulei*. *Journal of Natural Rubber Research* 2: 111-117.

Hashim I., Pereira J.C.R., 1989. Influence of resistance of *Hevea* on development of *Microcyclus ulei*. *Journal of Natural Rubber Research* 4: 212-218.

Hirst J. M., Stedman O. J., 1962. The epidemiology of apple scab (*Venturia inaequalis*). *Ann. Appl. Biol.* 50 :525-550.

Holliday P., 1970. South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. Commonwealth Mycological Institute. *Phytopathological Papers*, No. 12.

Junqueira N.T.V., Chaves G.M., Zambolim L., Gasparotto L., Alfenas A.C., 1986. Variabilidade fisiologica de *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira* 11: 823-833.

Junqueira N.T.V., Alfenas A.C., Chaves G.M., Zambolim L., Gasparotto L., 1987. Variabilidade isoenzimática de isolados de *Microcyclus ulei* com diferentes níveis de virulência. *Fitopatologia Brasileira* 12: 208-214.

Junqueira N.T.V., Lieberei R., Kalil Filho A.N., Lima M.I.P.M., 1990. Components of partial resistance in *Hevea* clones to rubber tree leaf blight, caused by *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira* 15: 211-214.

Le Guen V., Guyot J., Mattos C. R.R., Seguin M., Garcia D., 2008. Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. *Crop protection* (27) 1498–1503.

Lieberei R., 2007. South American Leaf Blight of the Rubber Tree (*Hevea* spp.): New Steps in Plant Domestication using Physiological Features and Molecular Markers. *Annals of Botany* 100: 1125-1142.

MacHardy W. E., Gadoury D. M., 1986. Patterns of ascospores discharge by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 76:985-990.

Mattos C.R.R., Garcia D., Pinard F., Le Guen V., 2003. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no sudeste da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 28: 502-507.

Moore M. H., 1958. The release of ascospores of apple scab by dew. *Plant pathology*, volume 7, 4-5.

Pinkerton J. N., Johnson K. B., Stone J. K., Ivors K. L., 1997. Factors affecting the release of ascospores of *Anisogramma anomala*. *Phytopathology* 88:122-128.

Rivano F., 1992. La maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa. Etude, en conditions naturelles et contrôlées, des composants de la résistance partielle de l'hévéa à *Microcyclus ulei* (P. Henn.) V. Arx. Thèse de Doctorat, Université de Paris-sud, centre d'Orsay, Paris, 218 pp.

Rossi V., Ponti I., Marinelli M., Giosué S., Bugiani R., 2001. Environmental factors influencing the dispersal of *Venturia inaequalis* ascospores in the orchard air. Journal of phytopathology 149, 11-19.

Stensvand A., Amundsen T., Semb L., Gadoury D. M., Seem R. C., 1998. Discharge and dissemination of ascospores by *Venturia inaequalis* during dew. Plant Disease 82:761-764.

Trenel V., 2008. Elaboration de techniques d'études de la forme sexuée du champignon Ascomycète *Microcyclus ulei*, agent de la maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa, Mémoire de DUT, Paris XII, 51 p.

Table des illustrations

Schémas

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Protocole 1 : dynamique de la libération des ascospores sur 3 heures suite à une humectation à T0..... | 10 |
| Figure 2 : Protocole 2 : effet de 2 humectations successives sur la libération des ascospores : T0 et T0+9heures..... | 10 |
| Figure 3 : Protocole 3 : effet d'une succession d'humectations (toutes les 15 mn) sur la libération d'ascospores de T0+7 heures à T0+9 heures suite à une humectation unique à T0..... | 10 |
| Figure 4 : Protocole 4 : effet d'une succession d'humectations à différents intervalles de temps : T0, T0+3 heures et T0+5 heures..... | 10 |
| Figure 5 : Protocole 5 : effet de deux humectations successives sur des plants inoculés dont le feuillage n'a jamais été humecté : T0 et T0+10 heures..... | 10 |
| Figure 6 : Arbre de décision pour la note d'attaque..... | 12 |
| Figure 7 : Arbre de décision pour la taille des lésions..... | 14 |
| Figure 8 : Pourcentages d'ascospores piégées sur 3 heures suite à une humectation à T0..... | 16 |
| Figure 9 : Pourcentages cumulés d'ascospores piégées sur 3 heures suite à une humectation à T0..... | 16 |
| Figure 10 : Pourcentages d'ascospores piégées sur 6 heures suite à une humectation à T0, T0+3h et T0+5h..... | 16 |
| Figure 11 : Pourcentage d'ascospores piégées sur 9 heures suite à une humectation à T0 puis suite à des humectations successives de T7 à T9..... | 16 |
| Figure 12 : Comparaison entre le nombre d'ascospores libérées suite à une humectation unique ou répétée..... | 18 |
| Figure 13 : Pourcentage d'ascospores piégées sur 12h suite à une humectation à T0 et à T0+9h..... | 18 |
| Figure 14 : Pourcentage d'ascospores piégées suite à 2 humectations sur 24h : T0 et T0+10h..... | 18 |
| Figure 15 : Comparaison des pourcentages cumulés d'ascospores observées avec les valeurs théoriques appartenant au modèle de Weibull..... | 18 |
| Tableaux | |
| Tableau 1 : Séries correspondant aux 5 protocoles et nombre total de spores piégées par protocole..... | 10 |
| Tableau 2. Evolution du nombre d'ascospores piégées au fur et à mesure des humectations sur les feuilles prélevées au champ..... | 15 |

Table des annexes

| | |
|--|----|
| Annexe 1 : Stromas..... | 1 |
| Annexe 2 : Ascospores..... | 2 |
| Annexe 3 : Echelle de notation des symptômes..... | 3 |
| Annexe 4 : Piège à spores de Burkard..... | 4 |
| Annexe 5 : Tambour de piégeage et boîte de transport..... | 5 |
| Annexe 6 : Support pour le tambour utilisé pour le montage de la bande de piégeage..... | 6 |
| Annexe 7 : Montage du tambour sur le piège de Burkard..... | 7 |
| Annexe 8 : Positionnement du tambour dans la chambre..... | 8 |
| Annexe 9 : Station expérimentale de Pointe Combi..... | 9 |
| Annexe 10 : Dispositif de piégeage d'ascospores sur les feuilles sauvages..... | 10 |
| Annexe 11 : Dispositif de piégeage d'ascospores sur les feuilles inoculées..... | 11 |

Annexe 1 : Stromas

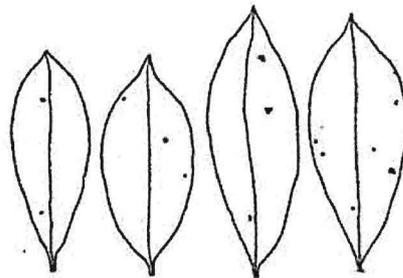


Annexe 2 : Ascospores (grossissement 312,5)

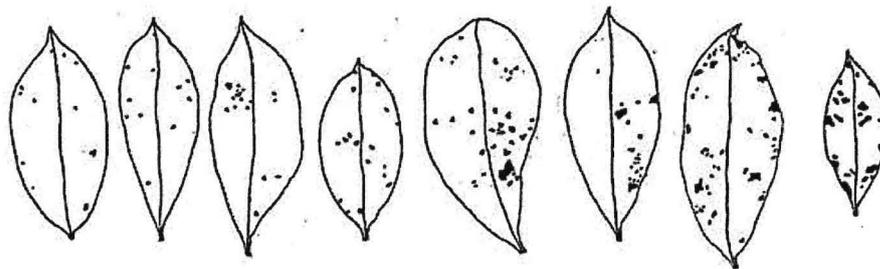


Annexe 3 : Echelle de notation des symptômes (d'après Chee, 1976c)

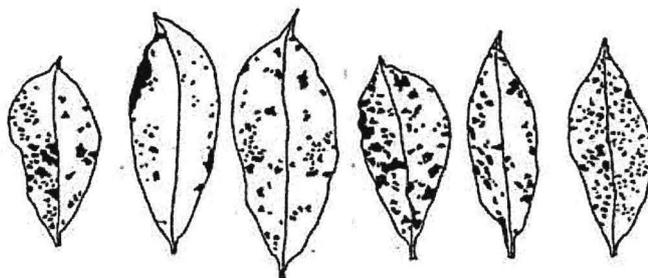
Note 1



Note 2



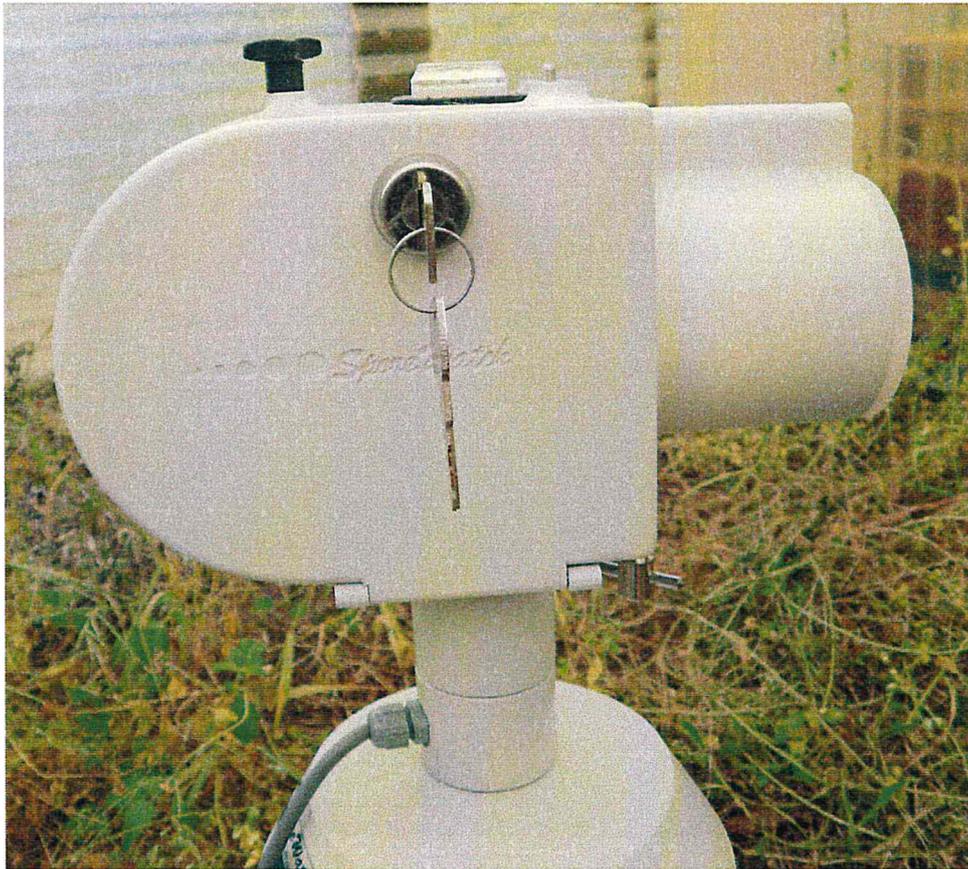
Note 3



Note 4



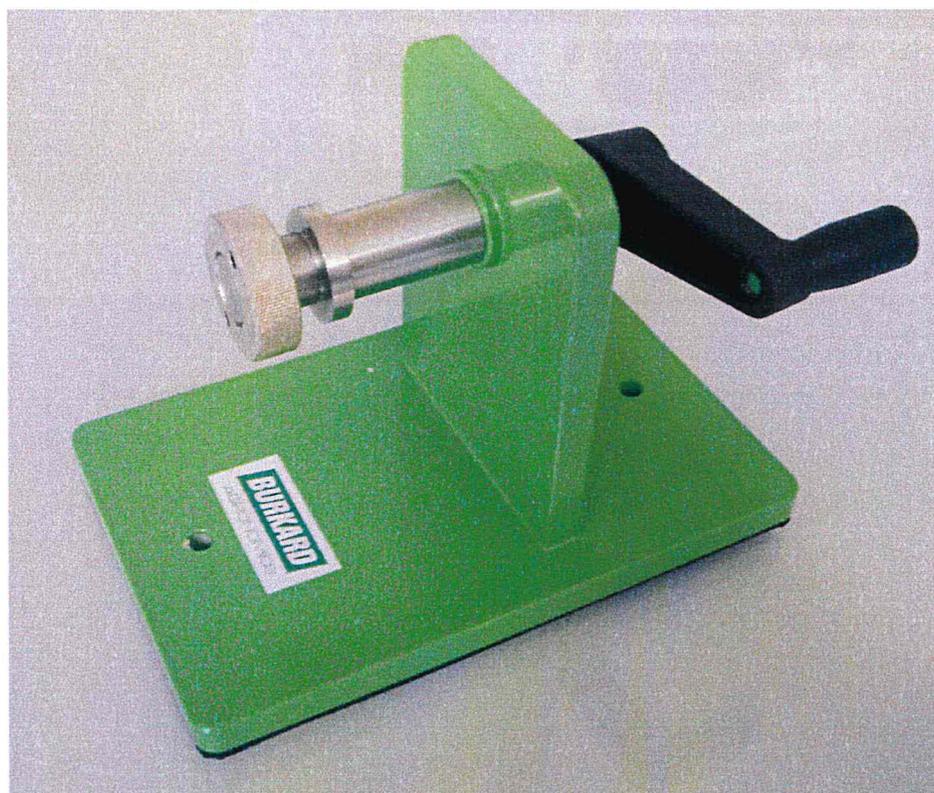
Annexe 4 : Piège à spores de Burkard



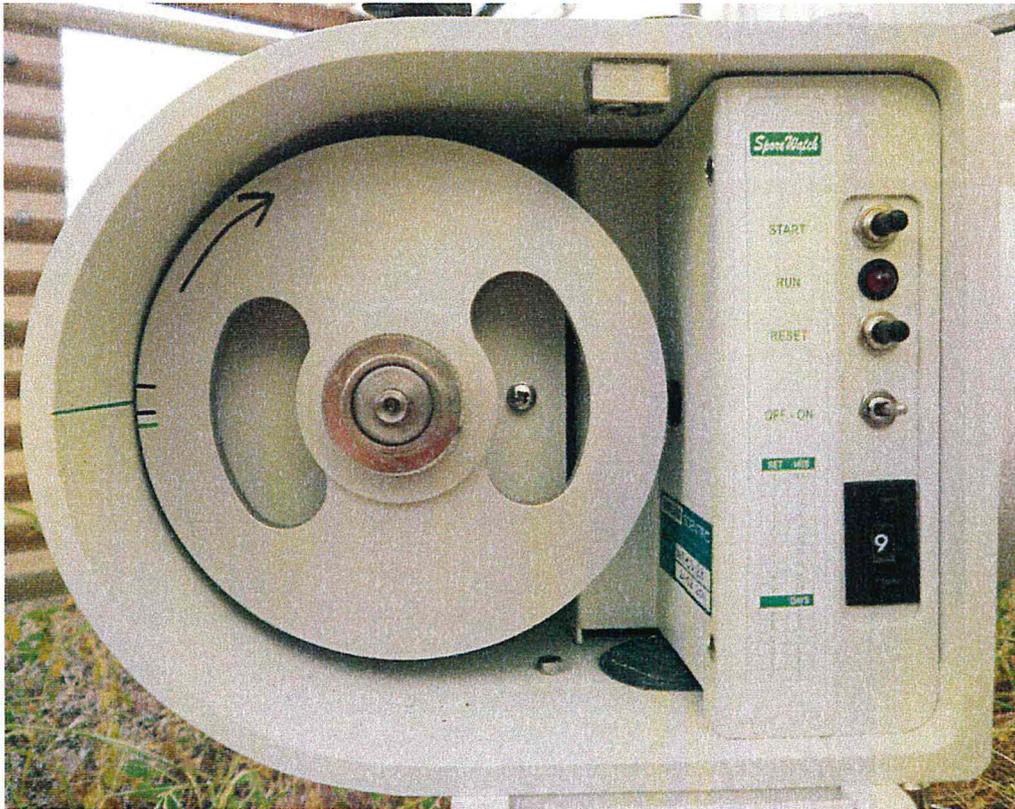
Annexe 5 : Tambour de piégeage et boîte de transport.



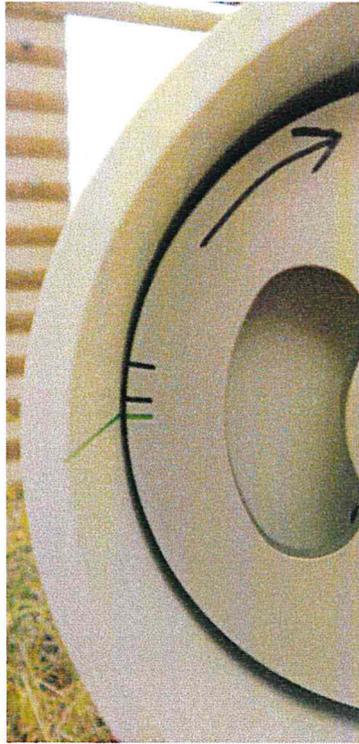
Annexe 6 : Support pour le tambour utilisé pour le montage de la bande de piégeage.



Annexe 7: Montage du tambour sur le piège de Burkard.



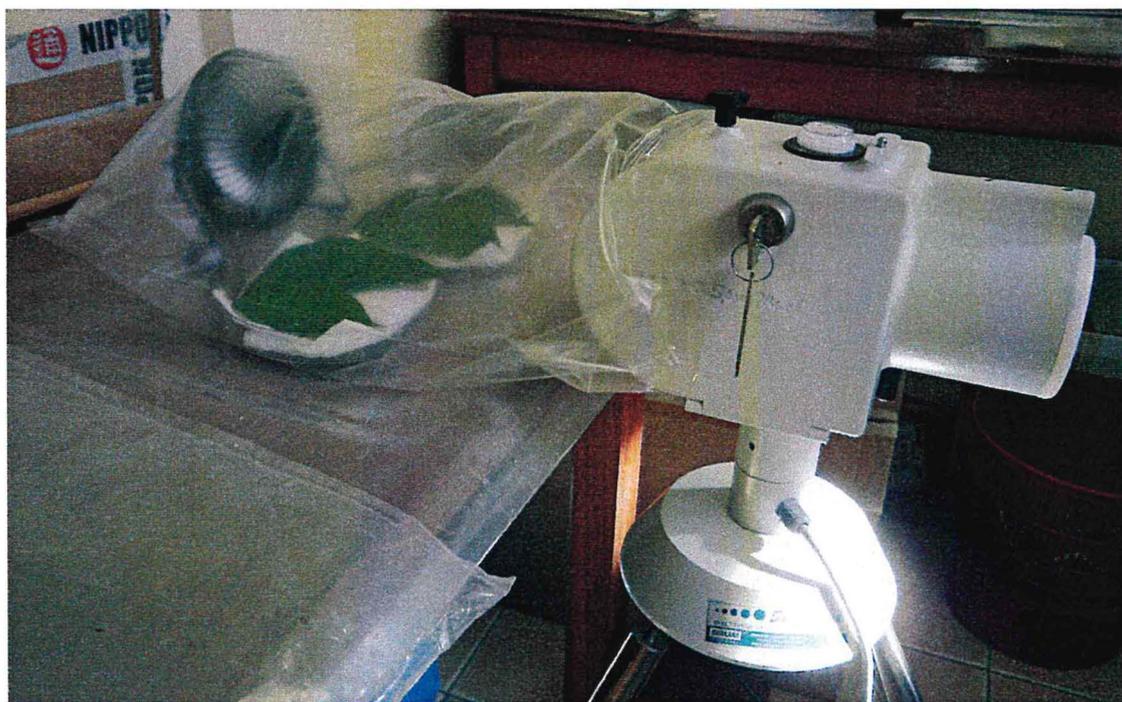
Annexe 8 : Positionnement du tambour dans la chambre.



Annexe 9 : Station expérimentale de Pointe Combi.



Annexe 10 : Dispositif de piégeage d'ascospores sur les feuilles prélevées au champ.



Annexe 11 : Dispositif de piégeage d'ascospores sur les feuilles inoculées.

