

THE 229
UNIVERSITE DE MONTPELLIER II SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE DE PARIS-GRIGNON
ECOLE SUPERIEURE D'AGRONOMIE DE MONTPELLIER
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Diplôme d'Etudes Appfondies (DEA)
EVOLUTION ET ECOLOGIE

1994

Thierry PAILLER

Contribution à l'étude des interactions hôte-pathogène du couple
Rubus fruticosus / *Phragmidium violaceum*.

Stage principal effectué au laboratoire AMATROP, UR Phyma, CIRAD - CA,
sous la direction de Thomas LE BOURGEOIS et Jean-Loup NOTTEGHEM.

Stage complémentaire :

Variabilité génétique des populations bulbeuses et non-bulbeuses de *Arrhenatherum elatius*
Effectué au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive - CNRS Montpellier,
sous la direction de John D. THOMPSON.

Soutenu les 7 - 8 septembre 1994 devant la commission d'examen:

M. L. THALER, Président, Mmes J. BRITTON-DAVIDIAN, I. OLIVIERI, MM.
A. CHARRIER, M. DEBUSSCHE, J. D. LEBRETON, J. C. REMY, F. WAREMBOURG.

DIK 32426

UNIVERSITE DE MONTPELLIER II SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE DE PARIS-GRIGNON
ECOLE SUPERIEURE D'AGRONOMIE DE MONTPELLIER
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

**Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA)
EVOLUTION ET ECOLOGIE**

1994

Thierry PAILLER

**Contribution à l'étude des interactions hôte-pathogène du couple
Rubus fruticosus / *Phragmidium violaceum*.**

Stage principal effectué au laboratoire AMATROP, UR Phyma, CIRAD - CA,
sous la direction de Thomas LE BOURGEOIS et Jean-Loup NOTTEGHEM.

Stage complémentaire :

Variabilité génétique des populations bulbeuses et non-bulbeuses de *Arrhenatherum elatius*
Effectué au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive - CNRS Montpellier,
sous la direction de John D. THOMPSON.

Soutenu les 7 - 8 septembre 1994 devant la commission d'examen:

M. L. THALER, Président, Mmes J. BRITTON-DAVIDIAN, I. OLIVIERI, MM.
A. CHARRIER, M. DEBUSSCHE, J. D. LEBRETON, J. C. REMY, F. WAREMBOURG.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p. 1
I - MATERIEL ET METHODES	
I - 1 Matériel biologique	p. 3
I - 2 Echantillonnage	p. 3
I - 3 Germination	p. 4
I - 4 Inoculation	p. 5
I - 5 Interaction hôte-pathogène en conditions contrôlées	p. 5
I - 6 Epidémiologie	p. 6
I - 7 Analyses statistiques	p. 7
II - RESULTATS	
II - 1 Germination	p. 8
II - 2 Inoculation	p. 9
II - 3 Interaction hôte-pathogène en conditions contrôlées	p. 10
II - 4 Epidémiologie	p. 11
III - DISCUSSION	
III - 1 Le cycle de vie	p. 13
III - 2 Le cycle épidémiologique de base	p. 15
CONCLUSION	p. 18
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p. 19

INTRODUCTION

Dans les écosystèmes naturels, l'abondance d'une espèce est régulée par des phénomènes de compétition et de prédation. L'introduction d'une espèce dans un milieu favorable à son développement, où les phénomènes de compétition et de prédation sont faibles ou nuls, peut entraîner un processus d'invasion de l'écosystème par cette espèce. Ce processus est exacerbé en milieu insulaire où la compétition interspécifique est moindre du fait de la paucispécificité des écosystèmes comme, par exemple, à l'île de La Réunion où sur 1054 plantes introduites et capables de se reproduire (THEBAUD, 1989), 8 espèces ont été classées comme étant particulièrement envahissantes dans les écosystèmes naturels de l'île (MAC DONALD *et al.*, 1991).

De manière générale, le phénomène d'invasion se traduit par une forte abondance de plantes. Une espèce végétale envahissante s'avère souvent indésirable dès lors que ses densités de population, très élevées, sont préjudiciables à l'agriculture, à la foresterie, aux pâturages, aux milieux aquatiques ou aux zones d'intérêt écologique. De même, quand les activités humaines altèrent l'environnement de telle façon que l'équilibre naturel est rompu, les plantes indigènes peuvent aussi devenir envahissantes.

Les plantes envahissantes sont donc des végétaux introduits (exotiques) ou indigènes dont l'abondance de leurs populations a un effet néfaste sur l'agriculture ou sur les écosystèmes naturels.

Parmi les 8 espèces envahissantes à l'île de La Réunion, le "raisin marron" (*Rubus alceifolius*) aurait été introduit vers 1850 à la suite d'un échange de matériel végétal entre botanistes de L'île Bourbon et de Calcutta. Le "raisin marron" est une espèce pérenne particulièrement envahissante, nuisible à la production forestière et aux écosystèmes naturels en général (DOUMENGE & RENARD, 1989).

Chronologiquement, les méthodes de lutte envisagées pour limiter l'exubérance des plantes envahissantes ont d'abord été l'arrachage manuel ou mécanique, puis l'utilisation de poison inorganique (nuisible à la vie en général) et ensuite, après la seconde guerre mondiale, l'emploi d'herbicides chimiques. Cette dernière méthode implique des coûts de production très élevés. La lutte biologique, qui offre une alternative à ces méthodes, a été définie comme étant **"l'étude et l'utilisation de parasites ou de prédateurs pour réguler la densité des populations hôtes"** (HARLEY & FORNO, 1992). A La Réunion, les coûts croissants qu'implique la lutte chimique et manuelle contre *Rubus alceifolius* ont mené les gestionnaires à envisager l'utilisation d'une méthode de lutte biologique afin de diminuer l'agressivité de cette espèce et à limiter ses densités des populations de façon plus rentable (SOULERE, 1989).

Les méthodes de lutte biologique peuvent être généralement divisées en deux classes (MARTINELLE & AESCHLIMANN, in press) :

(1) la lutte biologique classique est l'introduction d'un agent de contrôle dans une région afin d'établir un équilibre, entre le parasite et l'hôte, permettant d'abaisser de façon permanente la densité de la plante envahissante,

(2) la lutte biologique inondative est la libération dans l'environnement, à plusieurs reprises, d'un grand nombre d'individus d'un auxiliaire de lutte pour limiter la population de la plante envahissante ou pour augmenter une population préexistante d'agent de lutte. Ces derniers sont souvent des pathogènes (champignons parasites) et sont donc appelés "mycoherbicides".

Les deux premières étapes de la lutte biologique classiques sont l'identification de la plante cible et à l'inventaire de ses ennemis naturels dans la zone d'origine de la plante. Des prospections et des collectes effectuées en Thaïlande (TAYSUM *et al.*, 1991) ont permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs ennemis naturels d'espèces de *Rubus* tropicaux, morphologiquement proches de l'espèce présente à La Réunion. Ces agents de lutte potentiels sont des insectes (phasmes) et des champignons phytopathogènes (rouilles).

L'étape suivante réside dans le choix de l'auxiliaire de lutte. En effet pour qu'un auxiliaire soit efficace, il doit répondre à trois critères essentiels :

(1) la spécificité vis à vis de la plante cible est le premier critère de choix d'un auxiliaire de lutte. En effet, le parasite introduit ne doit pas causer d'épidémie sur d'autres espèces que la plante visée. Il doit avoir une innocuité totale vis à vis des plantes indigènes ou endémiques ainsi qu'à l'égard des plantes cultivées. Cette spécificité d'hôte limite les possibilités de choix à des parasites strictement spécifique de espèce cible. Le progrès des connaissances sur les mécanismes génétiques qui conduisent à la spécificité d'hôte sont encore limités. Il apparaît cependant que parmi les insectes, on trouve dans certains ordres (Lépidoptères, Coléoptères...) des parasites inféodés à une seule espèce végétale hôte. Chez les champignons, les rouilles sont souvent utilisées parce qu'elles sont en général inféodées à un nombre d'espèces végétales restreint et parfois à une seule espèce voir à une seule population de l'espèce comme par exemple certaines souches de *Puccinia chondrillina* vis à vis d'une population de *Chondrilla juncea*.. Dans ce dernier cas, les gènes d'avirulence des populations du parasite conduisent à une trop grande spécificité et ne permette pas de réduire l'ensemble des populations de la plante cible. Une analyse des gènes de résistance des populations de la plante envahissantes et des gènes d'avirulence de la population du parasite constitue donc une étape importante d'un programme de lutte biologique à l'aide d'un champignon parasite. Enfin notons que les problèmes de spécificité sont souvent à la base de conflits d'intérêt.

(2) le second critère est l'efficacité de l'auxiliaire de lutte vis à vis de la plante cible. Le parasite doit réduire suffisamment la compétitivité de la plante hôte pour que celle ci ne soit plus envahissante. Pour qu'un auxiliaire de lutte soit efficace, il est souhaitable qu'un équilibre s'établisse entre l'hôte et le parasite. De plus, la plante doit non seulement être sensible mais aussi réceptive à la maladie. Il est donc important de pouvoir quantifier l'influence de l'agressivité de la maladie à l'égard de son hôte ainsi que les périodes de réceptivité de celui-ci.

(3) enfin, dans le cas d'une méthode de lutte biologique classique, le troisième critère est la capacité de l'agent pathogène à se maintenir durant toute l'année et à produire un inoculum primaire capable de se propager de façon à initier une nouvelle épidémie en permanence ou chaque année selon les facteurs climatique de la zone. Dans les cas des organismes autoïques pour lesquels tout le cycle a lieu sur la même plante, le climat et la phénologie de l'espèce doivent être propices à la persistance du parasite sur l'hôte tout au long de l'année.

Notre étude a donc pour **premier objectif**, l'analyse des paramètres épidémiologiques influant les phases importantes du cycle de vie des rouilles telles que la germination des écidiospores et des urédospores, la contamination et l'infection de la plante hôte par les urédospores. En effet, de nombreux auteurs ont montré que l'eau, la température et la lumière sont les paramètres essentiels au déroulement du cycle de vie des champignons phytopathogènes. Ces différents facteurs ont d'abord été étudiés *in vitro* puis *in vivo*.

Le **second objectif** est la caractérisation du cycle épidémiologique de base des rouilles sur *Rubus fruticosus*. La compréhension de ce cycle permet de vérifier l'existence des qualités requises pour qu'un agent pathogène soit retenu comme auxiliaire de lutte. Par ailleurs, cette étude vise en premier lieu à révéler l'influence de l'inoculum primaire sur le développement de l'épidémie et, en second lieu, à montrer l'effet du régime des précipitations sur la contamination et l'épidémie en général. De plus, nous caractériserons le mode de dissémination des spores selon le modèle de KIYOSAWA.

Enfin nous avons choisi de travailler sur le couple *Rubus fruticosus-Phragmidium violaceum* pour les raisons suivantes: *Rubus fruticosus* est une plante envahissante dans de nombreux pays et les rouilles sont en général des parasites spécifiques déjà utilisés en lutte biologique. L'utilisation d'une rouille tropicale parasite de *Rubus alceifolius* est envisagée pour lutter contre cette plante devenue envahissante à La Réunion, et, si ce couple hôte-parasite n'est pas encore disponible pour des expérimentations, l'analyse des relations *Rubus fruticosus-Phragmidium violaceum* doit pouvoir faire avancer la réflexion sur les conditions de mise en place d'une méthode de lutte biologique contre d'autres espèces de *Rubus*.

I - MATERIEL ET METHODES

I - 1 MATERIEL BIOLOGIQUE

a) La plante hôte

La ronce européenne (*Rubus fruticosus* L. agg.) a le statut de peste végétale dans de nombreuses régions du globe telles que, l'Ouest des États-Unis, le Chili, la Nouvelle Zélande ou encore l'Australie (GILKEY, 1957; BRIDGE, 1963; AMOR & RICARSON, 1980; BRUZZESE & HASSAN, 1986 b). Les coûts impliqués dans la lutte chimique contre cette plante envahissante sont lourds à supporter dans les pays où elle sévit et la lutte biologique semble une alternative prometteuse.

Rubus fruticosus L. agg. appartient à l'ordre des Rosales et à la famille des Rosacées. C'est un buisson vivace dont les tiges, pentangulaires et munies de puissantes épines rétroscées, sont bisannuelles. Les feuilles sont alternes, composées de trois ou cinq folioles pubescentes à tomenteuses sur la face inférieure. Les inflorescences apparaissent sur les branches âgées de plus de un an. Les fleurs, hermaphrodites, donnent naissance à des fruits composés de drupéoles : les "mûres".

La ronce tempérée se rencontre en Europe et dans toutes les régions à climat méditerranéen de la planète (figure I-1). Des études conduites en Europe par le CIBC (Commonwealth Institut of Biological Control) ont recensé 161 ennemis naturels 144 arthropodes (dont 38 seraient spécifiques), 15 champignons pathogènes, 1 bactérie et 1 virus, (AMOR & RICARSON, 1980). Parmi les pathogènes de *Rubus fruticosus*, *Phragmidium violaceum* a la particularité d'être très spécifique, ce qui constitue une des conditions de son utilisation en lutte biologique (BRUZZESE & HASSAN, 1986 b).

b) L'agent pathogène

Les rouilles sont des champignons parasites de l'ordre des Urédinales dont l'évolution semble avoir commencée sur les fougères paléozoïques et s'est poursuivie sur les conifères, puis sur les angiospermes (CHADEFAUD & EMBERGER, 1960).

L'agent pathogène retenu lors de cette étude appartient à la famille des Pucciniacées et au genre *Phragmidium*. Cette famille comprend environ une cinquantaine d'espèces autoïques et macrocycliques, strictement inféodées aux plantes de la famille des Rosacées (VIENNOT-BOURGIN, 1949). La "rouille de la ronce", *Phragmidium violaceum* (C. F. Schultz) Winter (C.M.I., 1969), est spécifique de quelques espèces de *Rubus* dont celles du complexe *Rubus fruticosus* (BRUZZESE & HASSAN, 1986 c).

Brièvement, le cycle de développement de *P. violaceum* se décompose comme indiqué sur la figure I-2. Le cycle de vie est annuel et la phase de reproduction sexuée se déroule au printemps.

I - 2 ECHANTILLONAGE

L'échantillonnage est réalisé dans le département de l'Hérault, au mois de février 1994. Trois populations de ronces (P1, P2 et P3) sont mises à bouturer en serre dans des bacs à semis (30 x 45 cm) contenant un mélange terreau-pouzzolane (2/1 ; v/v) à raison de 200 boutures par population.

Au mois d'avril, les souches de rouille (S1 et S2), correspondant chacune à une écidie (individu sporifère produisant des spores dicaryotiques : les écidiospores) sont récoltées sur deux des trois populations de ronces, la troisième population n'étant pas attaquée par la maladie, une troisième souche (S3) est récoltée sur un plant de ronce d'une population de Saint Martin de Londres. Les souches sont conservées à l'obscurité à 0-2° C (BRUZZESE & HASSAN, 1986 a).

I - 3 ETUDE DE LA GERMINATION IN VITRO

La germination des spores fait suite à leur captation par la plante hôte. C'est le premier événement ayant lieu à l'interface entre le pathogène et l'hôte, avant la contamination. Afin de mieux comprendre le cycle de développement de *P. violaceum*, nous avons déterminé les conditions optimales de germination des spores ainsi que les facteurs limitant ce phénomène. Selon RAPILLY (1991), plusieurs paramètres influencent la germination des spores de rouilles; parmi lesquels, la température, la lumière et la concentration de l'inoculum sont les plus importants.

Les tests de germination des spores sont effectués pour les trois souches d'écidiospores (température et lumière) et d'urédospores (température, lumière, concentration et cinétique de germination). Ces dernières sont produites au laboratoire à partir de la contamination, par les écidiospores, de feuilles détachées des populations P1 et P2. Une suspension mère de spores dans l'eau est réalisée en présence de TWEEN 20 (1/10000), sa concentration est évaluée à l'aide d'une cellule de MALASSEZ. Cette suspension est alors diluée pour obtenir une suspension fille de concentration voulue. L'ensemencement a lieu sur boîte de Pétri contenant un milieu gélosé (agar 2%) préalablement stérilisé 20 minutes à 120°C. 0,1 ml de suspension fille est déposé sur le milieu puis étalé au "râteau" (pipette pasteur coudée). Les boîtes sont ensuite placées dans les conditions expérimentales (voir ci-dessous). La détermination du pourcentage de germination se fait par dénombrement (après 16 heures d'incubation) du nombre de spores germées sur 200 spores comptées. Une spore est considérée germée lorsque le tube germinatif mesure plus de deux fois le diamètre de la spore (BRUZZESE & HASAN, 1986 b). Trois répétitions sont réalisées pour chaque condition expérimentale.

a) Effet de la concentration de l'inoculum

Pour étudier l'influence de la concentration de l'inoculum, six suspensions d'urédospores de concentrations différentes sont réalisées (10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000 et 60 000 spores/ml). L'ensemencement est effectué de la façon décrite précédemment. Les boîtes sont placées à l'obscurité à 18 °C.

b) Effet de la température

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de la température sur la germination de deux types de spores de *Phragmidium violaceum* (urédospores et écidiospores). Pour cela, une suspension de spores (50 000 spores/ml) est ensemencée sur milieu gélosé et placée à l'obscurité et à différentes températures (4 ; 8 ; 14 ; 18 ; 22 ; 25 ; 30 ; 37°C). Le pourcentage de germination est déterminé 18 heures après ensemencement.

c) Effet de la lumière

Le même protocole que précédemment est utilisé pour révéler l'influence de la lumière. Les boîtes sont alors placées à 18 °C (BRUZZESE & HASAN, 1986 a, b, c), à la lumière ou à l'obscurité.

d) Cinétique de germination des spores

Enfin, la cinétique de germination des urédospores est étudiée en incubant des boîtes ensemencées à 18 °C et à l'obscurité. Le taux de germination des spores est évalué 2, 4, 6, 8, 10 et 16 heures après ensemencement en plaçant les boîtes dans une enceinte à 2°C afin de stopper le développement (germination) des spores aux temps indiqués précédemment.

I - 4 INOCULATION

a) Pulvérisation d'une suspension de spores

Cette méthode consiste à vaporiser, à l'aide d'un micropulvérisateur, une suspension de spores de concentration connue. La suspension de spores est agitée et vaporisée de façon à former une couche de gouttelettes uniformément réparties sur la face inférieure de la feuille. Parallèlement, la suspension est vaporisée sur une surface connue de gélose en boîte de Pétri (diamètre: 90 mm). Le comptage du nombre de spores par unité de surface permet de déterminer la densité des spores (spores / cm²). Cette densité donnera lieu plus tard à l'évaluation de l'efficacité de la contamination des feuilles par les spores germées (Nombre de pustules / cm²) / (Nombre de spores inoculées / cm²).

b) Dépôt et étalement à sec de spores au pinceau

Cette méthode consiste à étaler, sur la face inférieure des feuilles, des spores de rouilles à sec et à l'aide d'un pinceau. Les feuilles sont alors brumisées à l'aide d'un micropulvérisateur manuel. Cette méthode est utilisée lorsque la quantité d'inoculum est faible (HASSAN *et al.*, 1992), elle nous a permis de produire une quantité importante d'urédospores sur feuilles détachées à partir d'écidiospores.

I - 5 INTERACTION HÔTE PATHOGÈNE EN CONDITIONS CONTRÔLÉES

Lors de l'étude des interactions entre *Rubus fruticosus* et *Phragmidium violaceum*, nous avons utilisé le protocole suivant (figure I-3) :

- les feuilles sont prélevées sur les individus en pots et sont placées (face adaxiale contre le support) en boîtes de Pétri (diamètre : 90 mm) dont le fond est tapissé de trois feuilles de papier filtre humidifié par 10 ml d'eau distillée stérile.

- les feuilles détachées sont inoculées à l'aide d'une suspension de spores de composition constante (eau distillée stérile, TWEEN 20 à 1/10000, urédospores de la souche S1 à 50000 spores/ml) selon la méthode de pulvérisation décrite précédemment.

- la préincubation des feuilles inoculées permet la germination des urédospores en suspension dans les gouttelettes d'eau issues de la pulvérisation (HASSAN, com. pers.). Les conditions expérimentales retenues sont : 16 h à l'obscurité et à 18°C (BRUZZESE & HASSAN, 1986 a, b, c).

- les boîtes de Pétri sont alors ouvertes jusqu'à évaporation des gouttelettes d'eau (1 à 2 heures) de façon à mettre en contact la spore germée et l'épiderme de la face inférieure de la feuille.

- les feuilles sont alors incubées à 25±1°C avec une alternance Jour / Nuit de 12 h / 12h.

- l'évaluation de la maladie se fait par comptage du nombre de pustules produites (urédosores) entre 40 et 45 jours après inoculation. La surface de la feuille infectée est alors déterminée à l'aide d'un scanner piloté par un logiciel (Surface Foliaire) conçu par le laboratoire AMATROP du CIRAD-CA. Le niveau de la maladie peut être exprimé en terme de densité de pustules (nombre d'urédosores par centimètre carré). Il est alors possible de déterminer l'efficacité de contamination.

a) Effet de la concentration de l'inoculum

Pour déterminer les effets de la concentration de l'inoculum sur la contamination, 6 suspensions de spores de concentrations différentes (10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000 et 60 000 spore/ml) sont testées par pulvérisation sur 5 feuilles de rang 2 ou 3 des individus des trois populations. Parallèlement, des boîtes de Pétri contenant de la gélose sont ensemencées de façon à déterminer par comparaison l'efficacité de la contamination.

b) Réceptivité des organes

Nous avons déterminé à quels stades de développement les feuilles sont réceptives à la maladie. Pour chaque plant de *R. fruticosus*, les cinq plus jeunes feuilles (rang 1 à 5) d'une branche sont inoculées. Le rang 1 correspond à la plus jeune feuille, en cours de formation. Le rang 2 correspond à la première feuille entièrement formée et les rangs 3, 4 et 5, aux feuilles suivantes.

c) Temps minimum de persistance de l'eau libre sur les feuilles

Le temps minimum de persistance de l'eau libre sur les feuilles est le temps nécessaire à la contamination des tissus par la spore. Nous l'avons déterminé en préincubant durant 4, 6, 8, 10, 14 et 18 heures, des feuilles inoculées. Chaque condition expérimentale est établie sur des feuilles issues de 5 plantes de chaque population.

d) Durée d'incubation et cinétique d'apparition des urédosores

La durée d'incubation ou LPU (Latent Period before Uredo) correspond au temps nécessaire à la spores pour germer, pénétrer dans les tissus de son hôte et produire des urédosores. Nous avons déterminé la LPU par inoculation de cinq feuilles de rang trois de chaque population pour chacune des trois populations étudiées. Après 15 jours d'incubation, nous avons relevé le nombre d'urédosores par feuille à raison d'une observation à 1 ou 2 jours d'intervalle jusqu'au 45^{ème} jour après inoculation (temps au delà duquel les urédosores n'apparaissent plus). La LPU correspond dans nos expériences au nombre de jours avant l'apparition du premier urédosore sur une des cinq feuilles testées de la population considérée.

I - 6 EPIDEMIOLOGIE

a) Evolution de la maladie en milieu naturel

L'étude qualitative de l'évolution de la maladie en milieu naturel est mise en place à partir d'observations bimensuelles de populations naturelles de ronces. Au cours des observations, nous avons noté les organes végétatifs et reproducteurs de *Rubus fruticosus* présents ainsi que les différents appareils sporifères de *Phragmidium violaceum* en place et leur localisation spatiale sur la plante hôte. Ceci nous permet de décrire de façon spatio-temporelle une partie du cycle de développement de *Phragmidium violaceum* sur *Rubus fruticosus* dans la région de Montpellier, entre le mois de mars et le mois d'août.

b) Mode de dispersion des spores dans le cas d'une épidémie en milieu contrôlé

120 individus de la population P2 sont mis dans des pots de cinq litres contenant un mélange terreau-tourbe-pouzzolane (1/3; 1/3; 1/3 v / v). Les pots sont disposés au CIRAD sur une parcelle formée de 2 blocs (A et B) de 1,5 m sur 10 m. Chacun des blocs contient 60 plants distants entre eux de 50 cm (figure I-4). Deux rangées de maïs en pots sont disposés de part et d'autre des parcelles dans le sens de la longueur en guise de coupe vent et pour diminuer les contaminations interblocs. Un système d'irrigation au goutte à goutte est mis en place avec des goutteurs d'un débit de 1 litre / heure. Les plantes sont arrosées à raison de 250 ml / jour sans solution nutritive.

Le mode de dispersion des spores est étudié sur les parcelles précédentes en plaçant en tête de parcelle une bande contaminatrice constituée de quatre plants de ronce fortement contaminés par inoculation au pinceau, le 3 Juin 1994. L'infection de la bande contaminatrice correspond à la phase monocyclique de l'épidémie. La phase polycyclique débute avec l'apparition de pustules issues des spores de la phase monocyclique. Dès lors, les symptômes des 60 plantes de chaque bloc sont relevés par comptage du nombre de sores produits sur 30 feuilles prises au hasard sur chacun des plants. L'évolution de la maladie est suivie dans le temps à raison d'une observation tous les 7 jours.

b) Influence de l'hygrométrie et des précipitations dans le cas d'une épidémie en milieu contrôlé

Pour tester si l'hygrométrie et les précipitations de la région de Montpellier limitent de développement de l'épidémie, nous avons comparé un lot de plantes en pots placées en conditions climatiques naturelles à un lot de plantes pour lequel la présence d'eau n'était pas un facteur limitant. Pour cela nous avons utilisé un système de brumisation (15 litres/heures) fonctionnant 15 minutes par heure toutes les nuits entre 22 heures et 7 heures. L'évaluation de la maladie se fait de la même manière que précédemment.

I - 7 ANALYSES STATISTIQUES

L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel d'analyse de variance de STAT-ITCF (GOUET & PHILIPPEAU, 1989) selon un plan d'expérience à un facteur en randomisation totale pour étudier d'une part, l'influence de chaque paramètre abiotique sur la germination de chacune des trois souches (température, lumière, temps d'incubation) et d'autre part, l'influence de chacun des traitements testés pour la contamination de chacune des trois populations. L'analyse de variance selon un plan d'expérience à 2 facteurs est réalisée en randomisation totale pour l'effet de l'interaction entre les souches et les différents facteurs abiotiques. De plus nous avons effectué le test de NEWMAN-KEULS, au risque d'erreur de première espèce de 5% de façon à constituer différents groupes homogènes de traitements, lorsqu'il y a des différences significatives entre les traitements.

Pour analyser l'effet du traitement sur le taux de germination, les valeurs mesurées T ont été transformées en $2 \arcsin (T^{1/2})$, comme le préconise DAGNELIE (1975) pour la réalisation de ce test sur des valeurs exprimées en fréquences ou en pourcentages. Pour cette raison, les résultats nuls ont été transformés en $1 / 4 n$ ($n =$ nombre de répétitions).

Lors de l'analyse de l'effet du traitement sur la contamination des feuilles, lorsque les résultats présentaient certaines données manquantes (dus à la mort de certaines feuille avant la fin de l'expérience) nous avons estimé leur valeur par la méthode de Yates (PHILIPPEAU, 1992).

II - RESULTATS

II - 1 GERMINATION

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'effet de la concentration en inoculum sur la germination des urédospores. Les pourcentages de germination sont déterminés pour les écidiospores et urédospores de façon à définir la gamme de température optimale et l'influence de la lumière sur la germination de ces deux types de spores. Enfin, nous avons établi la cinétique de germination des urédospores.

a) Effet de la concentration de l'inoculum

Les urédospores des souches S1, S2 et S3 présentent des gammes de concentrations optimales pour la germination significativement différentes (Tableau II-1). Le facteur souche a une gamme optimale de germination appartenant à l'intervalle 40-50000 spore/ml. Le taux de germination n'est pas proportionnel à la concentration en spores entre 10 000 et 60 000 spores / ml. A partir d'une certaine teneur en inoculum, il semble y avoir un effet inhibiteur de la concentration en spores sur la germination (Figure II-1).

Par ailleurs, il faut noter que les trois souches sont significativement différentes pour les taux optimum de germination (Tableau II-1). Quelle que soit la concentration en inoculum, S1 a le meilleur pourcentage de germination (86,6%), suivie de S2 (81,8%) et enfin S3 (56,4%). Le faible taux de germination de la souche S3 montre est donc une caractéristique de cet isolat.

b) Effet de la température

Les pourcentages de germination des écidiospores (figure II-2) et des urédospores (figure II-3) en fonction de huit températures d'incubation, montrent que la température potentielle de germination des trois souches (S1, S2 et S3) appartient à l'intervalle [8 - 30 °C].

Pour les écidiospores, l'intervalle de température optimale de germination est [18 ; 22°C] (Tableau II-2). Pour les urédospores cet intervalle semble plus large : [18 ; 25°C] (Tableau II-3). De plus, à l'intérieur de ces intervalles, les taux de germination des trois souches d'écidiospores ne sont pas différents, alors que pour les urédospores, la germination des souches S1 et S2 est significativement plus élevée que celle de S3. Pour ces dernières, la souche S1 germe mieux que S2 et S2 mieux que S3 aussi bien à la température optimale que pour l'ensemble des températures testées.

Enfin, seule la souche S3 montre une différence significative entre les pourcentages de germination de ces deux types de spores à la température de 22°C (température appartenant à la gamme de germination optimale des deux types de spores) (tableau II-4).

	S1	S2	S3
Ecidiospores	92,2 %	88,3 %	90,9 %
	ns	ns	F=159,06 ; p<0,001
Uredospores	94,2 %	88,4 %	69,6 %

Tableau II - 4 : comparaison des pourcentages de germination des deux types de spores pour les trois souches de *Phragmidium violaceum* étudiées à la température de 22°C. Test de Newman-Keuls.

c) Effet de la lumière

Le tableau II-5 révèle que la germination des écidiospores et des urédosores est significativement plus élevée à l'obscurité qu'à la lumière après 18 heures d'incubation, quelle que soit la souche considérée. Pour les trois souches d'écidiospores, les pourcentages de germination à l'obscurité ne sont pas significativement différents. Par contre à la lumière, la souche S3 a un taux de germination significativement supérieur (59,5%) à S1 et S2 (47,7% et 51,7%).

Pour les urédosores, les trois souches ont des taux de germination différents quelle que soit l'intensité lumineuse, alors que cette différence n'apparaît chez les écidiospores qu'au niveau du traitement lumière. On retrouve encore une homogénéité dans les pourcentages de germination optimale (à l'obscurité) des trois souches d'écidiospores, comparées aux urédosores où S1 est encore supérieure et S3 inférieure.

De plus, les sores et donc les spores sont situés à la face inférieure de la feuille et sont donc relativement protégés de la lumière solaire. Ce caractère semble favoriser la viabilité des spores.

d) Cinétique de germination des spores

La figure II-5 montre que les profils des courbes sont les mêmes pour les trois souches : une phase de latence d'environ 2 heures, suivie d'une phase exponentielle de germination qui se poursuit par une phase stationnaire. Dans tous les cas, les premières spores commencent à germer entre 2 et 4 heures et le taux maximum de germination est obtenu après 8 heures d'incubation à l'obscurité et à 18 °C (tableau II-6).

Par contre les trois souches diffèrent par leur taux moyen de germination lors des expériences effectuées entre 0 et 16 heures. S3 présente toujours le plus faible pourcentage de germination, ce qui est en accord avec les résultats précédents et suggère donc des différences entre les souches d'urédosores. Ces différences semblent moins importantes chez les écidiospores.

II - 2 - INOCULATION

a) Pulvérisation d'une suspension de spores

La pulvérisation de suspension de spores est couramment utilisée pour l'inoculation de matériel végétal et notamment de parties aériennes (HASSAN *et al.*, 1992). Le principal avantage de cette méthode d'inoculation est de connaître la quantité de spores déposées sur les feuilles détachées de *Rubus fruticosus* et donc de déterminer l'efficacité d'infection de la souche étudiée. De plus elle accorde une bonne reproductibilité des expériences. Enfin cette méthode permet l'obtention d'une répartition relativement homogène des symptômes comparable à celle observée en milieu naturel.

b) Dépôt et étalement à sec de spores au pinceau

L'inoculation au pinceau s'est avérée efficace pour la production d'urédosores, et pour l'infection des plantes de la bande contaminatrice de l'expérience sur le gradient de dispersion et l'influence du régime hydrique. Toutefois cette méthode d'inoculation ne permet pas de connaître la quantité exacte de spores déposée. De plus, les urédosores apparus suite à une telle méthode de contamination, sont très nombreux et de taille visiblement inférieure à ceux produits sur des feuilles inoculées à partir de basses concentrations en inoculum. Ceci résulterait de phénomènes de compétition entre les mycéliums intra-tissulaires des urédosores. Enfin, on note que les feuilles inoculées au pinceau ont une durée de vie réduite (3 semaines pour des plantes en pot dans des conditions naturelles) comparées à des plantes en pot contaminées par pulvérisation (plusieurs mois pour les feuilles contaminées au printemps).

II - 3 INTERACTION HOTE-PATHOGENE EN CONDITIONS CONTROLEES

a) Effet de la concentration de l'inoculum

La figure II-6 relative à l'influence de la concentration en inoculum de la souche S1 sur le degré d'infection des feuilles de rang 2 et 3 de trois populations étudiées (P1, P2 et P3) montre que, pour les trois populations, l'infection des feuilles est d'autant plus élevée que la concentration de l'inoculum est forte. Quelle que soit la concentration, l'agressivité de la souche S1 est plus élevée envers les populations P1 et P2 que vis à vis de la population P3 (Tableau II-7). Par ailleurs, il existe une baisse de l'efficacité de l'infection des feuilles aux fortes concentrations en inoculum (figure II-7).

b) Réceptivité des feuilles

La figure II-8 indique le degré d'infection des organes (nombre de sores / cm²) en fonction de l'âge de la feuille (rang 1 à 5), pour les trois populations de *Rubus fruticosus* (P1, P2 et P3) inoculées par la souche S1. Quelle que soit la population, les feuilles des rangs 2 et 3 sont toujours les plus réceptives, alors que les feuilles non encore développées (rang 1) sont peu (P1 et P2) ou pas (P3) réceptives. Au delà des rangs 2 et 3, la réceptivité des feuilles décroît rapidement pour être quasiment nulle à partir du rang 5.

Alors que P1 et P2 montrent une réceptivité semblable, quel que soit le rang, la population P3, avec une faible réceptivité, semble plus résistante à la souche S1 (tableau II-8).

c) Influence du temps de persistance de l'eau libre sur les feuilles

Les résultats relatifs à la contamination des feuilles de rang 3 selon le temps de persistance d'eau libre sont représentés sur la figure II-9. Pour les trois populations, environ 6 heures sont nécessaires pour que la contamination puisse avoir lieu. De plus, pour la population P3, la quantité d'urédozoaires apparues n'augmente plus après 10 heures de préincubation alors que ce phénomène est stoppé seulement après 14 heures chez P1 et P2 (Tableau II-9). Ceci montre la variabilité qui existe entre différentes populations, concernant la durée optimale d'eau libre pour une contamination efficace. Ces résultats sont en accord avec ceux de HUBER & GILLESPIE (1992), établis pour plusieurs couples hôte-pathogène.

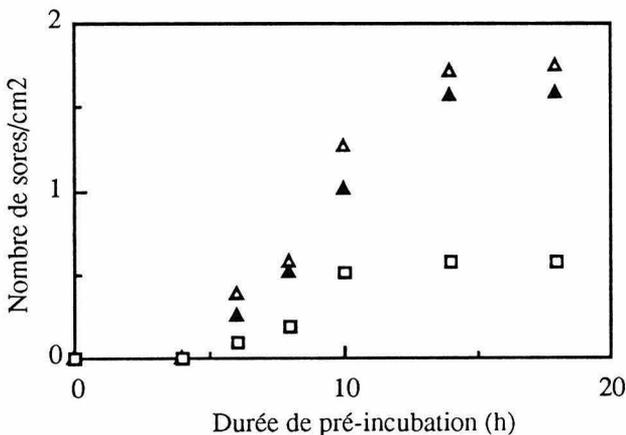


Figure II - 9 : influence du temps de pré-incubation (durée de persistance d'eau libre à la surface des feuilles) nécessaire à la contamination des feuilles de trois populations de *Rubus fruticosus* (Δ : P1, ▲ : P2 et □ : P3) par les urédospores de la souche S1.

	P1	P2	P3
0	0,00 B	0,00 D	0,00 B
4	0,00 B	0,00 D	0,00 B
6	0,38 B	0,25 DC	0,10 B
8	0,57 B	0,51 C	0,20 B
10	1,44 A	1,07 B	0,51 A
14	1,73 A	1,56 A	0,58 A
18	1,79 A	1,59 A	0,57 A

Tableau II - 9 : résultats des analyses de variance à un facteur (durées de pré-incubation) pour chacune des trois populations (P1, P2 et P3). Les valeurs différentes sont suivies de lettres différentes.

d) Durée d'incubation et cinétique d'apparition des urédosores

La figure II-10 relative à la durée d'incubation et à la cinétique d'apparition des urédosores de la souche S1, sur feuilles détachées de rang 3 des trois populations de *R. fruticosus* montre que la durée d'incubation est de 18 jours pour les populations P1 et P2 et de 23 jours pour la population P3. Par ailleurs, SUBBA RAO *et al.* (1992) ont montré que la courbe d'apparition des pustules provoquées par *Cercospora arachidicola* sur feuilles détachées d'arachide est une sigmoïde proche de celle que nous avons obtenue.

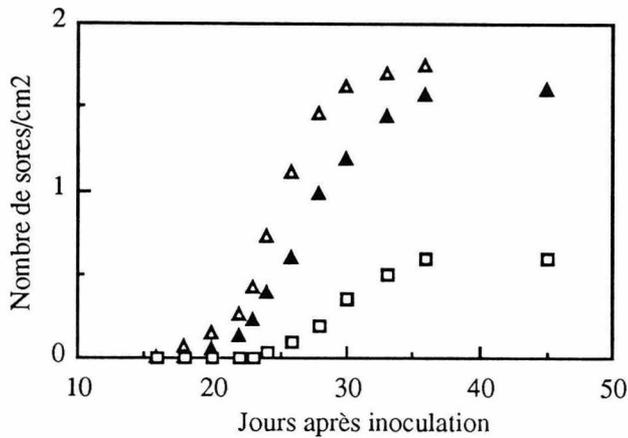


Figure II - 10 : cinétique de la densité d'urédosores de la souche 1 (représenté en fréquence cumulée), produits selon la population hôte (▲ : P1, ▲ : P2 et □ : P3) en fonction du nombre de jours après inoculation.

II - 4 EPIDEMIOLOGIE

a) Evolution de la maladie en milieu naturel

Les résultats relatifs à l'évolution de la maladie provoquée par l'agent pathogène sur son hôte en milieu naturel (figure II-11) obtenus par observations bimensuelles des populations de *Rubus fruticosus* de la zone Nord de Montpellier (Montferrier), entre le mois de mars et le mois d'août 1994, permettent de caractériser la relation entre la phénologie de la plante hôte et l'évolution de la maladie sur cette dernière.

Dans un premier temps, nous avons noté les stades phénologiques du développement de *R. fruticosus* : Au mois de mars, les ronciers sont caractérisés d'une part, par la présence de tiges desséchées et mortes, ces tiges étant âgées de plus de deux ans, et d'autre part, par des tiges non ramifiées portant des feuilles de l'année précédente et présentant les traces des infections urédiennes de l'année passée. Ces traces correspondent aux téliospores apparues sur les urédosores à l'automne. Le mois d'avril est marqué par le début de reprise de végétation de la plante. Les ramifications d'ordre secondaire apparaissent et produisent rapidement des feuilles alors que sortent de terre de nouvelles tiges issues de drageons ou de la souche déjà en place. A partir du mois de mai et jusqu'au mois d'août, ces dernières produisent de nouvelles feuilles. Au mois de juin, la croissance végétative des axes d'ordre II est stoppée par l'apparition des boutons floraux, les fleurs s'épanouissent et les premiers fruits verts apparaissent dès le début du mois de juillet. La maturation des fruits se poursuit jusqu'à la fin du mois d'août.

Dans un second temps, nous avons noté l'évolution de la maladie sur la plante hôte. Au mois de mars, l'agent pathogène est présent sur la base des tiges de *Rubus fruticosus* sous forme d'écidies. Ces écidies sont des pustules sporifères déchirant l'écorce du rameau pour libérer des écidiospores. Elles sont de forme ovoïde et leur taille varie entre 3-20 mm de long sur 1-10 mm de large. Ces appareils sporifères produisent une quantité importante de spores dès le mois de mars. La localisation des écidies progresse de la base de la tige vers les parties saines du sommet, atteintes au mois de mai. La production d'une écidie dure environ 1 mois dans les conditions naturelles.

C'est au début du mois de mai que les premières urédosores apparaissent à la face abaxiale des jeunes feuilles des nouvelles ramifications. Au mois de juin, les feuilles des tiges primaires de l'année en cours présentent elles aussi des urédosores. De juin à août, on ne note aucune évolution dans la localisation de la maladie. Par contre, la quantité d'urédosores augmente sensiblement durant ces trois mois.

b) Evolution de l'épidémie en milieu contrôlé

Le mode de dispersion

La figure II-12 montre que lorsque l'on considère la dissémination des spores au sein du bloc A, sept jours après le début de l'épidémie, le nombre moyen d'urédosores décroît régulièrement sur les 8 premiers mètres et devient nul au delà. Après 35 jours, le niveau d'infection est plus élevé et la répartition des urédosores sur la parcelle ne suit plus de gradient de dispersion.

Le gradient de dispersion correspond à la décroissance de la quantité de spores qui tombent sur un peuplement hôte en fonction de la distance d'éloignement avec la source d'émission. Cette décroissance s'explique par la dilution dans le volume d'air qui croit avec la distance et par la chute progressive des spores par sédimentation au sol ou sur la surface hôte.

Deux modèles empiriques sont principalement utilisés pour représenter les gradients de dispersion (GREGORY, 1968 ; RAPILLY, 1991). Le modèle de GREGORY est une fonction puissance alors que le modèle de KIYOSAWA est une fonction exponentielle. Ces modèles expriment la quantité de spores retrouvées en fonction de la distance à la source.

Pour l'ajustement des modèles, nous avons linéarisé les moyennes obtenues pour chaque distance à cinq valeurs. Le nombre d'urédosores de la courbe correspond donc à la valeur moyenne :

$$\hat{X} = \frac{\sum_{i=-2}^2 (X+i)}{5}$$

où X est le nombre moyen d'urédosores des trois plants situés à la distance x de la bande contaminatrice.

L'équation du gradient de dispersion obtenu selon le modèle de GREGORY est donc: $y=5,43x^{-2,37}$ (avec un coefficient de corrélation égal à 0,68) et selon le modèle de KIYOSAWA: $y=4,69e^{-0,635x}$ (coefficient de corrélation égal à 0,78). Le coefficient caractérisant le gradient ($b=-0,635$) de l'équation de ce dernier modèle révèle une capacité de dispersion comparable à celles d'autres rouilles telles que *Uromyces phaseoli* (RAPILLY, 1991).

Pour le bloc B (brumisé), le gradient de dispersion n'a pas été révélé par l'expérimentation. En effet, le nombre d'urédosores moyen est plus élevé à 4 mètres de la bande contaminatrice qu'à 1 mètre. Il semble que cette absence de gradient résulte d'une contamination par un allo-inoculum (extérieur à la parcelle). Toutefois l'hypothèse d'un effet agrégatif de la brumisation sur la dispersion des spores peut aussi être la cause de l'absence du gradient attendu.

Evolution de la maladie selon l'hygrométrie et les précipitations

La figure II-13 représente l'évolution de la maladie sur l'ensemble des plantes de chacune des parcelles entre le 21 Juin et le 8 Août 1994, soit cinq semaines après le début de la phase polycyclique de la maladie. Quelque soit le traitement hydrique, l'intensité (nombre moyen de pustules sur 30 feuilles) de l'épidémie augmente linéairement au cours du temps. Ce type de courbe est caractéristique d'une épidémie de faible intensité (WERKER *et al.*, 1991). En effet après cinq semaines de phase polycyclique de l'épidémie il y a en moyenne 4,4 et 5,3 pustules par feuilles respectivement pour le bloc non brumisé et pour le bloc brumisé. Ce niveau d'infection est bien inférieur à celui observé dans la nature à cette même période. Il est toutefois à noter que l'épidémie naturelle bénéficie en cette saison d'un inoculum beaucoup plus élevé que celui de notre parcelle expérimentale. La comparaison de notre épidémie avec celle du milieu naturel n'est pas non plus possible puisque les stades de développement de la maladie et de croissance des plantes sont différents. Notons enfin qu'il n'y a pas de différence significative, du niveau de la maladie après 5 semaines d'épidémie, entre le bloc brumisé et le bloc non brumisé (Tableau II - 10).

III - DISCUSSION

III - 1 LE CYCLE DE VIE

Les phases du cycle de vie de *P. violaceum* que nous avons étudié sont les stades écidien et urédien. Rappelons tout d'abord que les souches récoltées sont issues chacune d'une écidie. Une écidie produit des écidiospores ayant le même génotype, aux mutations somatiques près. De plus, le passage de la phase écidienne à la phase urédienne a lieu lors de la reproduction asexuée (CHADEFAUD & EMBERGER, 1960), sans remaniement génétique. Les souches étudiées présentent donc une faible variabilité génétique intra-population.

Ces deux phases sont caractérisées par des individus dicaryotiques (MOREAU, 1953) morphologiquement peu distinguables. Les écidies sont typiquement produites sur tiges alors que les urédosores sont produites sur feuilles (MALCOM & HENDERSON, 1966).

Germination

L'influence de la concentration de l'inoculum sur la germination de *Phragmidium violaceum* montre que les souches diffèrent entre elles par la concentration pour laquelle le pourcentage de germination est maximum. La germination est favorisée par des valeurs croissantes de concentration jusqu'à un optimum à partir duquel elle diminue. RAPPILY (1991) montre que la germination de *Puccinia striiformis* est stimulée par une augmentation de la concentration de l'inoculum en urédospires. Cette augmentation de germination serait due à l'action de substances solubles stimulantes excrétées au cours de la germination des spores (MACKO *et al.*, 1977). La diminution du taux de germination au delà de la concentration optimale, observée chez *Phragmidium violaceum*, peut être due à un phénomène d'auto-inhibition. Celui-ci a été mis en évidence chez de nombreuses spores de rouilles de la famille des Pucciniacées (SUSSMAN & MALVORSON, 1966). Les substances inhibitrices sont le plus souvent des composés organiques hydrosolubles (coumarines, acide vanillique...). On peut donc émettre l'hypothèse de l'existence d'une balance entre stimulateurs et inhibiteurs qui favoriserait ou non la germination selon la concentration des spores en solution.

Les expériences ont montré que la présence d'eau libre à la surface des feuilles est nécessaire à la germination des spores. Certains auteurs pensent que l'eau libre joue un rôle important pour favoriser l'accès aux nutriments nécessaires au développement de la spore et pour la diffusion de toxines dans l'environnement du micro-organisme producteur (COOK & BAKER, 1983). Dans le cas de *Phragmidium violaceum* comme pour d'autres rouilles, il semble que l'eau libre n'ait pas de rôle sur la nutrition des spores, puisque ces dernières sont capables de germer en absence d'une source quelconque de nutriments. Par contre, l'eau libre semble avoir un effet sur la diffusion de substances excrétées par les spores si les différences observées dans la germination pour des concentrations variables sont liées à des exsudats stimulateurs ou inhibiteurs (MACKO *et al.*, 1977; COOK & BAKER, 1983; ONOE *et al.*, 1987).

Les résultats relatifs à l'effet de la température sur la germination des spores ne montrent pas de différence entre les stades écidien et urédien mis à part pour la souche S3, ceci peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas de remaniement génétique entre les deux stades et que leurs caractéristiques physiologiques sont semblables vis à vis de ce facteur. La baisse du taux de germination de la souche S3 entre le stade écidien et urédien pourrait être due au fait que la production des urédospires de cette souche a été effectuée sur une plante hôte différente de celle sur laquelle ont été produites les écidiospores. De plus, il est à noter que la gamme de températures permettant la germination des spores est plus large que celle permettant la production des feuilles réceptives de *Rubus fruticosus* dans les conditions naturelles. Le parasite tolère donc une gamme de températures de germination plus large que celle de son hôte. Ce caractère montre le pouvoir adaptatif du parasite à son environnement vis à vis des températures de germination.

Les résultats relatifs au rôle de la lumière sur la germination confirment ceux d'autres auteurs (BRUZZESE & HASSAN, 1986 a ; SUSSMAN & MALVORSON, 1966) et montrent que la germination des spores est favorisée par l'obscurité. Ce phénomène semble donc avoir lieu la nuit ou à l'aube dans la nature, ce qui coïncide avec les résultats relatifs à l'importance de l'eau libre et de la rosée sur la germination.

En fin signalons que les urédosores de la souche S3 possèdent des capacités germinative moins bonnes que celles des deux autre souches. Le succès de la germination étant une composante de l'agressivité de la souche, il est préférable d'utiliser une souche ayant de bonne capacités germinatives en vue de son utilisation en lutte biologique.

Contamination

La comparaison des résultats obtenus sur la cinétique de germination des urédospores en présence d'eau et sur l'influence du temps de persistance de l'eau libre sur feuille permet de proposer une cinétique du mécanisme de contamination des feuilles par les urédospores de la souche S1 étudiée. En effet, les résultats montrent d'une part, que la germination des spores commence entre 2 et 4 heures après leur mise en contact avec un film d'eau et atteint son maximum après un séjour de 8 heures dans la pellicule d'eau et que d'autre part, la pénétration de la feuille par les urédospores débute après 6 heures de persistance d'eau libre. La cinétique de contamination du couple hôte-pathogène étudié est donc la suivante:

Lors de la mise en contact des spores avec l'eau, un phénomène d'hydratation permet à la spore de reprendre son activité métabolique et d'émettre ainsi un tube germinatif à partir de ses réserves. La spore se vide pour perdre son aspect globuleux et prendre un aspect flétrit. La croissance du tube germinatif commence après environ 3 heures d'incubation (obs. pers.). L'élongation du tube se poursuit durant les heures suivantes. C'est lorsque l'eau s'évapore que le contact entre l'agent infectieux et l'épiderme de la face inférieure de la feuille a lieu. Ensuite, la direction que prend le tube germinatif pour atteindre le stomate pourrait être due à l'un des deux phénomènes suivants : soit un phénomène d'hygrotropisme dirigeant le tube germinatif vers le stomate (LITTLEFIELD & HEATH, 1979), soit un phénomène de thigmotropisme résultant de la reconnaissance du microrelief des cellules épidermiques par le tube germinatif et permettant son orientation vers le stomate (ONOE *et al.*, 1987). La pénétration du stomate suivie de la contamination de la feuille par le tube germinatif nécessite plus de six heures après inoculation des urédospores. Il semble que la lumière et l'humidité puissent jouer un rôle dans la contamination par induction de l'ouverture des stomates.

L'infection

L'effet de la concentration de l'inoculum sur l'infection des feuilles de *Rubus fruticosus* peut être considéré, d'une part, par l'évaluation du degré d'infection des feuilles et d'autre part, par la capacité relative des spores à contaminer les feuilles selon les différentes concentrations de l'inoculum (efficience de contamination).

Il existe une forte relation entre la concentration des spores et l'infection des feuilles de sorte que la contamination augmente avec la concentration d'inoculum déposé jusqu'à 50-60 000 spores/ml. D'autre part, bien que le niveau d'infection augmente avec la concentration de l'inoculum, l'efficience contaminatrice (le nombre de spores ayant donné un sore par rapport au nombre de spores déposées) décroît entre les faibles concentrations (10 000 spores/ml) et les concentrations élevées. Il est à noter que dans la gamme de concentrations étudiées, l'efficience de contamination est la meilleure aux concentrations les moins favorables à la germination des spores. Deux hypothèses peuvent être émises :

- le succès de contamination est indépendant des conditions de la germination,
- les taux de germination sur milieu gélosé et sur feuille sont différents. Ceci semble probable du fait du rôle des stimulateurs ou inhibiteurs chimiques et de leur diffusion dans la gélose ou dans les gouttelettes d'eau en suspension.

Les résultats, relatifs à la réceptivité des feuilles, que nous avons obtenus sont en accord avec ceux de BRUZZESE & HASSAN (1986 c). En effet, ces auteurs montrent le même phénomène de baisse de réceptivité avec le rang des feuilles de *Rubus procerus*, à partir du rang 2. Aussi, les feuilles de rang 1 sont, comme chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) moins réceptives que celles des rangs suivants lorsqu'elles sont infectées par *Uromyces phaseoli* (STEADMAN & SHAIK, 1988). Pour les feuilles de rang 2 à 5, il semble qu'un changement de l'ultrastructure de l'épiderme de la feuille avec l'âge soit responsable de la baisse de réceptivité des feuilles les plus vieilles. En effet, la direction du tube germinatif des urédospores de rouilles est en général orientée par le microrelief des cellules épidermiques des feuilles de l'hôte (ONOE *et al.*, 1987). Le changement du microrelief de l'épiderme foliaire avec l'âge ne permettrait plus une orientation efficace du tube germinatif qui ne reconnaîtrait plus son hôte, ce qui se traduit par une perte de la réceptivité de la feuille âgée. La durée de réceptivité des feuilles est donc limitée dans le temps.

Les résultats relatifs à l'apparition des urédosores sur feuilles détachées nous amènent à formuler deux hypothèses quant au développement de l'agent pathogène dans les tissus de la plante. Tout d'abord, en considérant que la pénétration du champignon à travers les stomates a lieu lors de la préincubation, il existe une grande variabilité dans le temps de latence avant production d'urédosores, au sein des individus d'une même souche. Cette variabilité peut être provoquée par un phénomène de compétition entre les individus. En effet, il est probable que les premiers organismes urédiens qui pénètrent, bénéficient de meilleures conditions nutritives que ceux s'introduisant tardivement. Auquel cas, la difficulté d'accès à la source nutritive augmenterait le temps de latence. D'autre part, il semble que les nutriments offerts par la feuille diminuent à partir du moment où celle-ci est détachée de la plante mère.

III - 2 LE CYCLE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE BASE

Le cycle de base est l'ensemble des changements d'états du parasite et de la maladie qui sont rencontrés lors de l'épidémie (ZADOKS, 1972). La connaissance de tous les éléments constitutifs du cycle de base est nécessaire avant d'entreprendre toute étude épidémiologique polycyclique (RAPPLY, 1991).

L'épidémie susceptible de réduire la densité de population de *R. fruticosus* est provoquée par le stade urédien de la rouille. Nous présentons ici les différentes étapes du cycle de base des urédospores de *P. violaceum*.

Inoculation

La première étape du cycle de base correspond à la pollution des organes de la plante hôte à partir de l'inoculum primaire. L'inoculation est donc la mise en contact de l'hôte avec son pathogène. La quantité d'inoculum primaire est un paramètre conditionnant l'ampleur de l'épidémie de l'année. Nos résultats montrent que pour des faibles concentrations, l'infection des feuilles de *Rubus fruticosus* est proportionnelle à la quantité de spores déposées. De telles concentrations permettent d'obtenir une charge parasitaire relativement importante lorsque la souche est virulente et la plante sensible. De plus, la contribution à l'inoculum secondaire des pustules obtenues à ces concentrations est favorisée par une longue durée de production de spores et une forte quantité de spores produite. Par contre, des inoculations de spores à de fortes concentrations telles que celles obtenues par la méthode au pinceau, semblent défavorables au développement de l'épidémie. En effet, la compétition entre sores diminue leur production de spores. Par ailleurs, la courte durée de production de sores et donc la quantité de spores produites à long terme, est réduite du fait de la nécrose précoce des tissus végétaux (trois semaines environ contre deux mois avec de plus faibles concentrations d'inoculum). De trop grandes quantités d'inoculum sont donc défavorables à la valeur sélective des individus inoculés. L'ampleur avec laquelle un parasite affaiblit ou tue son hôte est souvent corrélée au taux de multiplication du parasite. Pour les parasites nécrotrophes, il n'y a pas de limite à l'évolution de l'agressivité. Capables de se développer en saprophytes, une agressivité élevée entraînant la mort précoce de l'hôte ne constitue pas un caractère contre adaptatif pour de tels

parasites, leur cycle de vie est donc très court. Par contre, pour des parasites biotrophes, il semble que les faibles niveaux d'agressivité aient une meilleure valeur adaptative puisqu'ils favorisent la durée de vie de leur hôte et donc leur durée de production des spores dans le cas des rouilles. Des souches de rouille trop agressives entraîneraient une nécrose rapide du tissu végétal et ne permettraient pas une longue phase contagieuse. Pour l'application d'une méthode de lutte biologique, la concentration de l'inoculum primaire employée est donc un facteur essentiel au succès de l'initiation de l'épidémie et l'agressivité moyenne d'une souche semble favoriser celle-ci à long terme.

De plus, l'efficacité de contamination de l'inoculum est réduite aux fortes concentrations. Dans le cas où le coût de production des spores est élevé et que le cycle de base est assez rapide, il semble plus avantageux d'initier une épidémie par de petites quantités d'inoculum réparties en plusieurs sites plutôt que par une forte dose d'inoculum primaire en un seul lieu. La distance entre les petits foyers devra être alors considérée selon les capacités de dissémination des spores.

Contamination

Suite à la mise en contact de l'hôte avec son pathogène, la contamination est la seconde étape du cycle de base d'une épidémie. Cette phase épidémiologique correspond à la phase de contamination du stade urédien du cycle de vie de *P. violaceum*.

Parmi les paramètres physiques influant le succès de la contamination, nous avons vu que l'eau est un facteur essentiel à la contamination. Par ailleurs le type de régime hydrique favorisant le développement de la maladie est déterminé de façon précise par le climat de la région où se déroule le cycle épidémiologique (HUBER & GILLESPIE, 1992). En effet, nos résultats montrent que l'eau libre sous forme d'une série de petites pluies nocturnes ne favorise pas l'épidémie provoquée par *Phragmidium violaceum* sur *Rubus fruticosus* dans la région de Montpellier. Le déficit hydrique de la région méditerranéenne n'est donc pas un facteur limitant le développement de l'épidémie. En climat méditerranéen, la rosée suffit à la germination et à la pénétration des urédospores de *Phragmidium violaceum*. Il reste néanmoins probable que d'autres formes d'eau libre puissent être sans effet ou avoir un effet négatif sur la propagation de l'épidémie. De fortes pluies, par exemple provoquent un lessivage des spores de la surface des feuilles de l'hôte (HUBER & GILLESPIE, 1992).

En milieu tropical, l'épidémie provoquée par un pathogène sur *Rubus alceifolius*, lors d'années pluvieuses et d'années sèches, devrait être comparée dans la zone d'origine de façon à connaître l'effet de l'eau sur l'importance de la maladie et ses implications dans une méthode de lutte biologique contre cette espèce à La Réunion. En effet, *Rubus alceifolius* est envahissante à La Réunion dans des localités où les précipitations annuelles sont comprises entre 3000 mm et 8000 mm (DOUMENGE & RENARD, 1989). Il paraît donc primordial de savoir si l'épidémie peut être efficace à l'intérieur de cette gamme de précipitations annuelles. Dans le cas contraire, l'existence de refuges écologiques permettra à l'espèce de conserver des foyers d'invasion.

D'autre part, l'état de l'hôte et du peuplement végétal est une caractéristique importante pour que la contamination ait lieu (RAPPILY, 1991). Les deux facteurs caractérisant l'état de l'hôte et du peuplement sont la réceptivité des organes de l'hôte ainsi que la compatibilité des interactions hôte-pathogène. En effet, dans le cas de *R. fruticosus*, les feuilles de la plante hôte ne sont réceptives aux urédospores que durant les deux ou trois premières semaines suivant leur apparition. Ce temps est variable d'une population à l'autre selon les caractéristiques morphologiques de l'hôte (présence ou non de poils, changement de la structure de l'épiderme...).

Pour envisager une méthode de lutte biologique efficace contre une espèce de *Rubus* à l'aide d'une rouille, il est donc nécessaire, d'un point de vue épidémiologique, que l'inoculum primaire soit disponible dès le début de la période de réceptivité des organes de son hôte, et ensuite sans interruption durant toute la période végétative de la plante afin que la contamination des nouvelles feuilles puisse avoir lieu, dans la mesure où les autres conditions environnementales (biotiques et abiotiques) sont favorables. En effet, l'épidémie de *P. violaceum* sur *R. fruticosus* dans la région de Montpellier a montré que l'inoculum primaire, représenté dans la nature par des écidiospores, est présent avant la reprise de végétation de la

plante, ce qui a permis une contamination précoce des jeunes feuilles apparues. Le moment de l'induction de la contamination est donc un paramètre à considérer lors de la libération d'un auxiliaire de lutte biologique.

Le second facteur impliqué dans le mécanisme de contamination est l'existence d'une réaction de compatibilité entre l'hôte et son pathogène. Le phénomène de compatibilité est étroitement lié à la spécificité des interactions hôte-pathogène. Une réaction compatible a lieu lorsque le pathogène possède le gène de virulence nécessaire à surmonter la résistance de la plante cible. Afin de réduire l'abondance d'une plante par la lutte biologique, il est donc nécessaire d'utiliser une population de pathogène possédant la totalité des gènes de virulence nécessaires à la contamination de l'ensemble des populations de la plante hôte. Par ailleurs, si un large polymorphisme de la virulence génétique permet de couvrir l'ensemble de la variabilité des gènes de résistance, il est à prévoir que ce dernier portera des combinaisons capables de réactions de compatibilité avec des espèces ou des genres proches de la plante cible. Dans un contexte de lutte biologique visant à la conservation des écosystèmes naturels, l'innocuité du pathogène vis à vis des espèces indigènes voire endémiques du système constitue une condition *sine qua non* à l'utilisation de la lutte biologique dans de tels milieux. Les conflits d'intérêts résultent souvent de problèmes de spécificité qui constituent la principale limite de l'utilisation de la lutte biologique.

Sporulation et dissémination

La troisième étape du cycle de base est représentée par la sporulation. Cette dernière correspond à la phase contagieuse du cycle. Le délai entre l'inoculation et l'apparition des spores est la période de latence, notée LPU (VAN DER PLANCK, 1963, BRUZZESE & HASSAN, 1986 a). Nous avons vu précédemment que la durée de sporulation était pour une même population, fonction de la concentration en inoculum. Les différences entre les LPU observées sur les trois populations semblent donc être le reflet de la diversité génétique de ces dernières.

Lorsque la contamination est réalisée, la vitesse de déroulement du cycle de base est principalement fonction de la durée de latence qui marque le début de l'apparition de tissus contagieux et donc de production d'un inoculum secondaire. Cette durée est variable selon les modalités de résistance de l'hôte, elle est souvent modulée par les conditions climatiques (RAPILLY, 1991).

Le nombre de répétition du cycle de base caractérisant une épidémie polycyclique, est d'autant plus élevé que le temps de réceptivité des organes, lors d'une saison végétative, est long, que la vitesse de déroulement d'un cycle est rapide et que la quantité d'inoculum secondaire produit est importante. C'est donc le nombre de répétition du cycle de base de la phase polycyclique qui conditionne, en partie, l'ampleur de l'épidémie.

L'utilisation de souches ayant la même vitesse de déroulement du cycle de base et donc de LPU est à envisager au risque de ne pas réduire la densité de toutes les populations à la même vitesse et de voir les populations plus faiblement parasitées occuper les niches écologiques libérées par les populations dont l'abondance aura été réduite. Aussi, bien que BRUZZESE & HASSAN (1986 a) ont montré que des faibles LPU étaient souvent associées, ceci ne constitue pas une règle générale.

La quatrième phase du cycle épidémiologique de base correspond à la phase de dissémination des spores. Classiquement, deux modes de dissémination sont à considérer en épidémiologique : l'hydrochorie et l'anémochorie.

D'un point de vue micro climatique, la dissémination des spores par l'intermédiaire de gouttelettes d'éclaboussure se produit à faible distance, inférieure à un mètre (FITT *et al.*, 1989). Ce phénomène favorise donc la dispersion des unités infectieuses au sein d'un individu contagieux et donc augmente localement sa charge parasitaire.

D'un point de vue local et régional, la dissémination des unités infectieuses par le vent est le mode de propagation des spores le plus efficace à faible et grande distance (GREGORY, 1968). Nos résultats montrent que la propagation des spores de *Phragmidium violaceum* est caractéristique d'un mode de dispersion anémochore graduelle suivant le modèle de KIYOSAWA ($r^2 = 0,78$).

CONCLUSION

L'étude effectuée a mis en évidence d'une part le rôle de différents paramètres climatiques sur le développement des écidiospores et des urédospores de *Phragmidium violaceum*, d'autre part le rôle du facteur hydrique sur le développement de la maladie dans la région de Montpellier entre le mois de mars et le mois d'août 1994. Enfin nous avons montré que le type de dispersion des spores de *Phragmidium violaceum* est anémochore et s'apparente à celui d'autres espèces de rouilles selon le modèle de KIYOSAWA.

Dans la perspective de l'utilisation d'une méthode de lutte biologique à l'aide d'une rouille, contre *Rubus alceifolius* à La Réunion, nous avons analysé les implications de l'étude des interactions hôtes-pathogènes dans l'utilisation d'une méthode de lutte biologique contre les *Rubus*. Ce type d'étude pourrait être envisagé à différents autres niveaux:

En effet, nous avons montré des différences de succès de germination de spores de plusieurs souches, donc une certaine variabilité d'agressivité de ces dernières. Bien que les connaissances des phénomènes déterminant l'agressivité des pathogènes vis à vis de leur hôte soient encore mal connues, l'étude d'autres composantes de l'agressivité de la population du parasite utilisé, telles que par exemple la survie des spores ou leur quantité produite par les urédosores, apporterait des informations précieuses sur les possibilités d'équilibre, entre le pathogène et la plante hôte, permettant de réduire les populations de cette dernière en dessous de son seuil de nuisibilité économique.

De plus, malgré la quasi absence de phénomènes de résistance spécifique au sein des trois populations de *Rubus fruticosus* étudiées, la recherche d'une méthode de lutte biologique contre *Rubus alceifolius* nécessite l'étude préalable de la diversité génétique des population cette espèce présentent à la Réunion afin de sélectionner chez le parasite les souches possédant la totalité des gènes de virulence capable de provoquer l'infection de l'ensemble des populations de la plante cible.

Enfin, une étude de spécificité des interactions Rouille / *Rubus alceifolius* et leur évolution au cours du temps constitue l'étape clé de ce programme de lutte biologique. Toutes les précautions visant à tester l'innocuité du parasite à l'égard, des rosacées cultivées à La Réunion, et de la flore indigène et endémique de l'île devront être prises afin de préserver les productions agricoles et l'intégrité du patrimoine génétique des écosystèmes forestiers réunionnais.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMOR, R. L. & RICARSON, R. G. (1980). The biology of Australian Weeds : *Rubus fruticosus* L. agg. *The journal of the Australian Institut of Agricultural Science*. **46**, 87-97.
- BRIDGE, K. (1963). Weed control in Chile. *World Farming*. **5**, 6-7; 28. In : Amor & Ricarson, 1980.
- BRUZZESE, E. & HASAN, S. (1986 a). The collection and selection in Europe of isolates of *Phragmidium violaceum* (Uredinales) pathogenic to species of European blackberry naturalised in Australia. *Annals of Applied Biology*. **108**, 527-533.
- BRUZZESE, E. & HASAN, S. (1986 b). Host specificity of the rust *Phragmidium violaceum*, a potential biological control agent of European blackberry. *Annals of Applied Biology*. **108**, 586-596.
- BRUZZESE, E. & HASAN, S. (1986 c). Infection of Australian and New Zealand *Rubus* subgenera *Dalibarda* and *Lampobatus* by the European blackberry rust fungus, *Phragmidium violaceum*. *Plant pathology*. **35**, 413-416.
- BRUZZESE, E. & TENNI, A. M. (1992). Biological control of european blackberry by the rust fungus *Phragmidium violaceum*. *KTRI*, Australia: note n°6.
- CHADEFAUD, M. & EMBERGER, L. (1960). *Traité de botanique systématique*, tome I. Masson, Paris. 1017 p.
- COOK, R. J. & BAKER, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. *The American Phytopathological Society, Minnesota*. 539 p.
- C.M.I. (1969). Description of pathogenic fungi and bacteria, *Commonwealth Agricultural Bureaux, Kiew*. N°209.
- DAGNELIE, P. (1975). *Théorie et méthodes statistiques*. Les Presses Agronomiques de Gembloux, Vol. 2, 463 p.
- DOUMENGE, C. & RENARD, Y. (1989). La conservation des écosystèmes forestiers de l'île de la Réunion. *UICN*, Cambridge, pp 95.
- FITT, B. D. L., McCARTNEY, H. A. & WALKLATE, P. J. (1989). The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annual revue of phytopathology*. **27**, 241-270.
- GILKEY, H. M. (1957). Weeds of the Pacific North West. *Oregon State College*. In : Amor et Ricarson, 1980.
- GOUET, J. P. & PHILIPPEAU, G. (1989). Stat-itcf: comment interpréter les résultats d'une analyse de variance? *Institut Technique des Céréales et Fourrages*. 47 p.
- GREGORY, P. H. (1968). Interpreting plant disease dispersal gradient. *Annual revue of phytopathology*. **6**, 189-212.

- HARLEY, K. L. S. & FORNO, I. W. (1992). Biological control of weeds. *Inkata Press*, Melbourne & Sydney. 73 p.
- HASAN, S., DELFOSSE, E. S., ARACIL, E. & LEWIS, R. C. (1992). Host-specificity of *Uromyces heliotropii*, a fungal agent for the biological control of common heliotrope (*Heliotropium europaeum*) in Australia. *Annals of Applied Biology*. **121**, 697-705.
- HUBER, L. & GILLESPIE, T. J. (1992). Modeling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. *Ann. rev. Phytopathol.* **30**, 553-577.
- LITTLEFIELD, L. J. & HEATH, M. C. (1979). Ultrastructure of Rust fungi. *Academic Press*. 277 p.
- MACDONALD, I. A. W., THÉBAUD, C., STHRAM, W. A. & STRASBERG, D. (1991). Effects of alien plant invasions on native vegetation remnants on La Réunion (Mascarene Island, Indian Ocean), *Environmental conservation*. **18**, 51-61.
- MACKO, V., TRIONE, E. J. & YOUNG, S. A. (1977). Identification of the inhibitor of the germination self inhibitor of *Puccinia striiformis*. *Phytopathology*. **67**, 1473-1474. *In* : Rappily, 1991.
- MALCOM, W. & HENDERSON, D. H. (1966). British rust fungi. *Cambridge university press*. pp. 98-100.
- MARTINELLE, G. & AESCHLIMANN, J. P. (in press). La lutte biologique contre les mauvaises herbes.
- MOREAU, F. (1953). Encyclopédie mycologique, tome I et II. Ed. Paul Lechevalier. 2119 p.
- ONOE, T., TANI, T., MINAGAWA, S. & SAGAWA, H. (1987). Ultrastructural changes of stomata in relation to specificity of rust fungi. *In* : Nishimura S. (1987) Molecular determinants of plant diseases. *Japan Sci. Press, Tokyo/Springer - Verlag*, pp 29-45.
- PHILIPPEAU, G. (1992). Théorie des plans d'expériences. *ITCF*. 205 p.
- RAPILLY, F. (1991). L'épidémiologie en pathologie végétale. *INRA*. 317 p.
- SOULERE, O. (1990). Nécessité d'une lutte biologique contre les espèces envahissantes à la Réunion. Document dactylographié. ONF Réunion.
- STEADMAN, J. R. & SHAIK, M. (1988). Leaf pubescent confers apparent race non specific rust resistance in bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology*, **78**, 1566.
- SUBBA RAO, P.V., RENARD, J. L. & Mc DONALD, D. (1993). Variability in isolates of *Cercospora arachidicola* Hori. *Report of ICRISAT / CIRAD collaborative research*, 81 p.
- SUSSMAN, A. S. & MALVORSON, H. A. (1966). Spores : Their dormancy and germination. *Harper & Row ed., New York*. pp. 274-277.
- TAYSUM, D.H , DONSKOFF, M. & DY PHON, P. (1991). Report of *Rubus* exploratory mission of Thailand. *Unpub.* 66 p.
- THEBAUD, C. (1989). Contribution à l'étude des plantes étrangères envahissantes à la Réunion. Rapport VAT, Conseil Régional de la Réunion. 49 p.

- VAN DER PLANK, J. E. (1963). Plant diseases : epidemics and control. *Academic Press*. 349 p.
- VIENNOT-BOURGIN, G. (1949). Les champignons parasites des plantes cultivées. *Masson, Paris*. pp. 1128-1133.
- WERKER, A. R., GILLICAN, C. A. & HORNBY, D. (1991). Analysis of disease-progress curves for take-all in consecutive crops of winter wheat. *Plant Pathology*. **40**, 8-24.
- ZADOKS, J. C. (1972). Methodology of epidemiological research. *Ann. rev. Phytopathology*. **10**, 253-271.

Stage complémentaire

**Variabilité génétique des populations
bulbeuses et non-bulbeuses de
*Arrhenatherum elatius***

Effectué au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive
CNRS Montpellier.

Sous la direction de **John D. THOMPSON**

Stage complémentaire

**Variabilité génétique des populations
bulbeuses et non-bulbeuses de
*Arrhenatherum elatius***

Effectué au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive
CNRS Montpellier.

Sous la direction de **John D. THOMPSON**

VARIABILITE GENETIQUE AU SEIN DES POPULATIONS BULBEUSES ET NON BULBEUSES DE *ARRHENATHERUM ELATIUS*

PROBLEMATIQUE

De nombreuses plantes supérieures pérennes combinent la reproduction sexuée et une ou plusieurs formes de propagations clonales. ELLSTRAND & ROOSE (1987) ont émis l'hypothèse que, chez les espèces à propagation strictement clonale, les populations multiclonaux de diversité intermédiaire sont la règle, la plupart des clones sont restreint à une ou quelques populations, et les clones à larges répartitions constituent des exceptions.

Chez les plantes à multiplication clonale se reproduisant par la voie végétative (propagules asexuées, bulbilles, agamosperme...), les descendants sont identiques entre eux et à leur parents. Ces plantes devrait donc montrer une faible diversité génotypique. Certains modèles envisagent que les populations à reproduction asexuée sont composées de peu de génotypes bien localisés alors que d'autres modèles considèrent que les populations ayant une stratégie de reproduction clonale peuvent posséder autant de polymorphisme génétique que celles à reproduction sexuée.

L'existence de deux modes de reproduction distincts (sexué et clonal) à l'intérieur de la sous-espèce *Arrhenatherum elatius* ssp *bulbosum* nous interroge sur les patrons du maintien de la diversité génotypique chez ces plantes à reproduction mixte.

La stratégie mixte de reproduction entraîne-t-elle une baisse de la diversité génotypique des populations de *Arrhenatherum elatius* ssp *bulbosum* ?

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Le complexe polyploïde *Arrhenatherum elatius* (graminée pérenne) est constitué de quatre sous-espèces européennes à distribution plus ou moins restreinte, présentant deux cytotypes représentés par des plantes diploïdes et tétraploïdes (tableau I). Deux d'entre elles ne se reproduisent presque exclusivement par reproduction sexuée, alors que les deux autres ont une stratégie mixte, la voie végétative étant assurée par l'apparition de bulbes à la base des tiges au niveau du sol (Fig. 1).

Les sous-espèces retenues lors de cette étude sont les deux taxons tétraploïdes les plus répandus en Europe: les trois populations de la sous-espèce *bulbosum* proviennent de Bretagne (B-B; B-F; B-SA), deux populations de la sous-espèces *elatius* sont originaires de Corse (C-VA; C-CA) et quatre de la région de Montpellier (C-NP; MM; LAV; SML). Seule la sous-espèce *bulbosum* possède une stratégie de reproduction mixte.

Méthode électrophorétique

L'électrophorèse enzymatique a pour but de visualiser différents allèles d'un même locus. Son principe repose sur les variations de vitesse de migration des protéines de charges électriques différentes, lorsqu'elles sont placées sur un support traversé par un champ électrique. Nous avons ainsi testé deux systèmes enzymatiques (voir encadré 1):

GOT : Glutamase Oxalo-acétate Transaminase (EC 2.6.1.1)

PGI : Phospho Gluco Isomérase (EC 5.3.1.9)

Analyse des données

Pour les espèces à propagation clonales, plusieurs mesures de diversités génotypiques ont été proposées pour comparer différentes populations (ELLSTRAND & ROOSE, 1987 ; ECKERT & BARRET, 1993). Afin de quantifier la diversité génotypique des populations bulbeuses et non-bulbeuses étudiées, nous avons calculé plusieurs paramètres en prenant en compte deux marqueurs électrophorétiques:

Nr : Nombre de ramets échantillonnés

G : Estimation du nombre de génotypes multilocus distincts:

G / Nr : Proportion de génotypes multilocus distincts : Cette proportion décrit la diversité clonale de la population étudiée. Lorsque G/Nr est proche de 1, la plupart des ramets échantillonnés sont différents et inversement, lorsque G/Nr est proche de 0 la population se caractérise par une faible proportion de génotypes multilocus distincts.

D : Indice de Pielou:

$$D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^G n_i (n_i - 1)}{N_r (N_r - 1)}$$

avec n_i : nombre d'individus portant le $i^{\text{ème}}$ génotype observé

Nr: nombre d'individus de l'échantillon

D est compris entre 0 dans les populations monoclonales, et 1, dans les populations où tous les génotypes sont différents. Cette mesure est influencée par le nombre de loci polymorphes et le nombre d'allèles par locus. Ce paramètre reflète le niveau de polymorphisme de la population et permet le calcul d'une troisième mesure de la diversité clonale: l'Indice de similarité génotypique des populations.

E : Indice de similarité génotypique des populations:

$$E = \frac{D_{\text{observé}} - D_{\text{minimum}}}{D_{\text{maximum}} - D_{\text{minimum}}}$$

avec:

$$D_{\text{maximum}} = \frac{N_r (G - 1)}{G (N_r - 1)}$$

et

$$D_{\text{minimum}} = \frac{(G - 1) (2N_r - G)}{N_r (N_r - 1)}$$

La similarité génotypique varie de 0, dans une population où tous les individus ont le même génotype, à 1 dans une population uniforme pour ses fréquences génotypiques.

RESULTATS

Le tableau II récapitule l'ensemble des résultats issus des analyses des gels d'électrophorèse enzymatique obtenus. De façon globale, l'ensemble des populations bulbeuses à stratégie de reproduction mixte (ssp *bulbosum*) présentent une diversité génotypique et une proportion de génotypes multilocus distincts supérieures aux populations non bulbeuses à régime de reproduction strictement sexuée. Les populations ayant la plus forte diversité génotypique sont B-B (0,97), B-F (0,96) LAV (0,96) et C-VA (0,96) alors que celles possédant les plus faibles valeurs de D sont C-CA (0,35) et MM (0,35). Ceci montre que le niveau de polymorphisme est en moyenne plus élevé chez les populations bulbeuses que chez les non bulbeuses. Enfin les populations insulaires de Corse, montrent une gamme de diversité génotypique plus large que les populations continentales de la région de Montpellier ou de Bretagne.

DISCUSSION

Les populations d'*Arrhenatherum elatius* présentent une gamme de diversité génotypique relativement large, reflétant des variations dans la stratégie de reproduction à l'intérieur et entre les sous-espèces étudiées. Chez *A. elatius* le brassage génétique est donc plus élevé dans certaines populations que dans d'autres sans que ceci soit corrélé à la localisation géographique de la sous-espèce ou à son mode de reproduction.

Chez la sous-espèce *bulbosum*, la multiplication clonale n'entraîne pas comme chez certaines espèces telles que *Decodon verticillatus* (ECKERT & BARRET, 1993), de baisse du niveau de polymorphisme génotypique de ses populations mais au contraire, ces dernières possèdent une diversité génotypique en moyenne plus élevée. Ces résultats nous interrogent sur les facteurs permettant le maintien de la diversité génotypique de cette sous-espèce. Le niveau élevé de polymorphisme génétique montré par les populations bulbeuses (B-B et B-F) suggère que la fondation d'une population se fait par de nombreux individus issus de graines génétiquement polymorphes. La valeur de diversité génotypique plus faible de la population B-SA peut résulter, soit de l'établissement de cette population à partir d'individus moins diversifiés génétiquement (effet fondateur), soit de l'évolution d'une population à l'origine plus diversifié mais dont le recrutement d'individus issus de la multiplication végétative est supérieur à celui d'individus issus de graine.

D'autres mécanismes permettent toutefois d'expliquer la forte diversité génotypique des plantes à reproduction clonale. D'un point de vue génétique, la mutation somatique est une source d'introduction d'allèles nouveaux dans la population et leur propagation au sein de cette dernière se réalise aussi bien par la voie sexuée que par la voie asexuée chez les espèces à stratégie de reproduction mixte. La voie sexuée permettant le brassage génétique engendre des graines portant les allèles recombinés, issus de mutations somatiques ou non, et présentant donc une diversité génotypique élevée.

La migration demeure une autre source d'introduction d'allèles et de génotypes nouveaux au sein d'une population. Ce phénomène dépend essentiellement du mode de dissémination des semences et du degré d'isolement des populations entre elles. En effet le flux génique est fonction du type de pollinisation de l'espèce. Chez *Arrhenatherum elatius*

l'anémophilie permet d'effectuer des échanges géniques entre individus compatibles plus ou moins distants et constitue donc une source de diversité génotypique chez les plantes à reproduction mixte. Ajouté à ce phénomène, la dissémination anémochore de l'espèce est une autre forme de migration permettant l'augmentation de la diversité génotypique de cette plante à stratégie de reproduction mixte.

Enfin, d'un point de vue écologique, la prédation préférentielle d'un type de diaspores (graines ou bulbilles) peut influencer de façon significative le polymorphisme génétique d'une population. Ce phénomène peut être variable selon les conditions d'habitats des plantes. A la prédation viennent s'ajouter les phénomènes de compétition entre graines et bulbes ainsi que la plasticité phénotypique des individus issus de ces deux types de semences. Il semble donc que des phénomènes locaux peuvent influencer fortement la composition génotypique d'une population.

Donc malgré la présence d'une forme de multiplication clonale par bulbes, *Arrhenatherum elatius* ssp *bulbosum* conserve une diversité génotypique élevée comparée à la sous-espèce *elatius* chez laquelle seule la reproduction sexuée existe. Nous avons donc montré lors de cette étude que les populations de *Arrhenatherum elatius* ssp *bulbosum* **ne présentent pas de baisse de diversité génotypique malgré leur stratégie mixte de reproduction**. Enfin, les données relatives à la diversité des plantes tétraploïdes à système de reproduction mixte faisant sévèrement défaut, l'étude actuellement en cours sur plusieurs autres populations permettra d'éclairer nos connaissances dans ce domaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ECKERT, C. G. & BARRET, S. C. H. (1993). Clonal reproduction and pattern of genotypic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *American Journal of Botany*, 80 (10): 1175-1182.
- ELLSTRAND, N. C. & ROOSE M. (1987). Pattern of genotypic diversity in plant species. *American Journal of Botany*, 74 (1): 123-131.
- PETIT, C. (1993). Le maintien d'une stratégie de reproduction mixte en milieu hétérogène chez *Arrhenatherum elatius*. Mémoire de DEA "Evolution et Ecologie", Montpellier. p 16 + annexes.
- ROMERO-ZARCO, C. (1985). Revision del genero *Arrhenatherum* Beauv. (*Gramineaceae*) en la Peninsula Iberica. *Acta Botanica Malacitana*. 10: 123-154.



· 34980 St-Gély-du-Fesc - Tél 67 84 27 66

RESUME

Le couple *Rubus fruticosus-Phragmidium violaceum* que nous avons étudié s'est révélé être un modèle intéressant pour l'étude des interactions entre une espèce végétale pérenne à régime de reproduction mixte et un champignon pathogène autoïque qui développe un cycle complexe sur son hôte. Cette étude a mis en évidence le rôle de différents paramètres climatiques (température, lumière) et biotique (concentration de spores) sur certaines phases du cycle de vie de *Phragmidium violaceum*, et notamment au niveau de la germination des écidiospores et des urédospores. D'un point de vue épidémiologique, bien que l'eau soit nécessaire à la germination des spores et donc à la contamination de l'hôte, ce facteur n'est pas un paramètre climatique limitant le développement de la maladie dans la région de Montpellier entre le mois de mars et le mois d'août 1994. De plus, nous avons montré que le type de dissémination des spores de *Phragmidium violaceum* est anémochore et suit un gradient de dispersion comparable à celui d'autres rouilles selon le modèle de KIYOSAWA. Enfin, l'analyse des interactions hôte-pathogène en milieu contrôlé a montré une variabilité des réponses des populations de *Rubus fruticosus* infecté par une même souche de *Phragmidium violaceum*. Ce dernier point suggère que, dans l'optique de la mise au point d'une méthode de lutte biologique dans les régions où les *Rubus* sont des plantes envahissantes, une étude de la variabilité génétique de l'hôte est indispensable afin de sélectionner un agent pathogène capable de réguler l'ensemble des populations de la plante hôte.

Mots clés: Lutte Biologique ; *Rubus fruticosus* ; *Phragmidium violaceum* ; Interactions hôte-pathogène ; Epidémiologie.
