

Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat
à Gembloux
(BELGIQUE)

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA RELATION PARASITAIRE
ENTRE

Typhula incarnata LASCH ex FR.
ET L'ORGE D'HIVER
(*Hordeum vulgare* L. var. *hybernum* VIB.)

par

Marc CAVELIER
Ingénieur agronome

Dissertation originale
présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences agronomiques

ANNEE ACADEMIQUE 1986 - 1987

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit (photocopie notamment) ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat, à Gembloux.

AVANT-PROPOS

M. le Professeur J. Semal a aimablement accepté de diriger ce travail et nous a tout spécialement conseillé et guidé dans la rédaction finale. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de toute notre gratitude.

Ce mémoire a été exécuté au Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat à Gembloux, dans le cadre des études menées à la Station de Phytopathologie sur les dépérissements printaniers de l'orge d'hiver. Nous remercions MM. R. Lecomte, Directeur du Centre, et G. Parmentier, Directeur de la Station, de nous avoir donné les moyens de réaliser ces recherches.

Nous tenons à remercier chaleureusement M.C. Maroquin, chef de travaux à la Station de Phytopathologie, pour ses encouragements répétés et l'esprit de recherches qui nous animait lorsque nous avons entrepris ensemble l'étude des jaunissements dispersés de l'orge tant sous l'aspect virologique que mycologique.

Nous sommes particulièrement redevables à Mme D. Martin qui fut notre technicienne pendant près de deux ans, et dont l'efficacité a toujours été à la mesure de son grand dynamisme.

Nos remerciements s'adressent aussi à M. R. Biston, chef de section à la Station de Haute Belgique et à Mme A. Baquet, technicienne, dont nous avons pu apprécier la compétence en matière d'analyse des sucres en HPLC.

La plupart des données ont été traitées par le Bureau de Biométrie et de Statistiques Appliquées du Centre. Nous remercions vivement le Dr. R. Oger pour ses conseils en cette matière.

Nous remercions également MM. JP. Wathelet et M. Marlier, attachés à la Chaire de Chimie Générale et Organique de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, d'avoir réalisé pour nous des analyses en chromatographie gazeuse et en spectrographie de masse.

Nous sommes reconnaissants à tous les collègues de la communauté scientifique et technique de Gembloux qui nous ont apporté leur aide à l'un ou l'autre titre.

Les champs d'essai ont été réalisés chez M. F. Spirlet, agriculteur à Jandrain, que je remercie pour son accueil et sa parfaite collaboration.

Les "moisissures de neige" sont des champignons ascomycètes ou basidiomycètes qui ont en commun la faculté de se développer à basse température. Ces espèces psychrophiles s'attaquent à un grand nombre de graminées et sont répandues dans l'hémisphère nord aux faibles et moyennes latitudes.

L'impact des "moisissures de neige" sur la production de biomasse ou de grains chez les céréales et autres graminées est difficilement estimable, eu égard à la diversité des facteurs qui influencent l'élaboration du rendement, mais la grande étendue des surfaces concernées, laisse cependant supposer que les dégâts dus à ces champignons ont une incidence considérable sur la production. Jusqu'en 1970, Fusarium nivale (FR.) CES. était l'unique représentant de ce groupe reconnu en Belgique comme étant dommageable aux céréales. Les dégâts de Typhula incarnata LASCH ex FR. qui y furent observés en grand nombre depuis 1975, résultent sans doute d'une large distribution de ce pathogène, liée vraisemblablement à l'extension de la culture de l'escourgeon depuis le début des années 70. L'activité parasitaire de T. incarnata représente un défi supplémentaire pour la culture de l'orge au moment où, face à une production céréalière excédentaire, il devient nécessaire de réduire les prix de revient.

Certes, la maladie à Typhula ne revêt pas actuellement une importance majeure dans nos régions, mais son brusque développement doit être interprété comme un signal d'alarme auquel il convient d'être attentif, les modifications éventuelles de l'agro-système pouvant changer rapidement les rapports entre les pathogènes et leurs hôtes.

Dans le chapitre 1, nous évoquons la découverte de T. incarnata en Belgique, son origine et sa dispersion géographique. Suit une description de la maladie qu'il provoque et sa situation par rapport aux autres causes de dépérissement printanier de l'orge d'hiver. Les moyens de lutte chimique envisagés contre ce parasite sont enfin passés en revue.

Le chapitre 2 est consacré à la description de la méthodologie générale suivie dans notre étude de T. incarnata.

Etant devenu familier de cette minuscule clavaire depuis plusieurs années, nous en avons illustré différentes facettes peu connues encore, en précisant notamment le comportement nucléaire des thalles et la croissance des hyphes (chapitre 3).

Nos recherches se sont orientées dans plusieurs domaines inexplorés de la biologie de T. incarnata, notamment en tentant de mettre en évidence le rôle des basidiospores dans la dissémination et le développement de la maladie (chapitre 4).

La susceptibilité de l'orge vis-à-vis de T. incarnata est fonction de son stade phénologique et de son état d'endurcissement au froid, illustrant ainsi

un phénomène de prédisposition de l'hôte (chapitre 5), dont la maîtrise est indispensable à la reproductibilité des conditions d'inoculation en chambre froide et à l'interprétation des résultats d'infection obtenus sous diverses conditions, notamment au champ.

L'étude du comportement de T. incarnata vis-à-vis de l'orge nous a conduit à analyser les relations entre l'hôte et le pathogène, en fonction des caractéristiques des souches (chapitre 7), dans une perspective de lutte biologique. L'interaction entre souches de T. incarnata est liée à la transmission des facteurs d'agressivité, non seulement par voie sexuée (chapitre 6), mais également par anastomose d'hyphes ou par le biais des recombinaisons somatiques (chapitre 8).

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. Découverte de <u>Typhula incarnata</u> Lasch ex Fr. en Belgique	10
1.2. Origine et dispersion géographique de l'espèce.	11
1.3. Cycle parasitaire et symptômes sur orge d'hiver.	12
1.4. Importance des dégâts occasionnés par <u>Typhula incarnata</u> selon les hôtes..	16
<u>Céréales</u>	16
<u>Graminées prairiales</u>	18
<u>Gazons</u>	18
1.5. Lutte contre les moisissures de neige par traitement fongicide	19
1.6. Principales causes de dépérissement de l'orge d'hiver de la levée au	
stade redressement.	21
a. Phytotoxicité des herbicides en automne	21
b. Attaque d'oscinies (insectes diptères) en automne.	21
c. Attaque importante d'oïdium en automne.	21
d. Dégâts de gel.	21
e. Asphyxie radiculaire.	22
f. Faim d'azote au printemps.	22
g. Attaque hivernale de <u>Fusarium sp.</u>	22
h. Attaque automnale et hivernale du virus de la mosaïque jaune de l'orge	
i. Attaque automnale du virus de la jaunisse nanisante de l'orge.	23
j. Attaque automnale et hivernale de <u>Typhula incarnata</u>	26

CHAPITRE 2

METHODOLOGIE GENERALE

2.1. Milieux de culture de <u>Typhula incarnata</u>	28
2.2. Souches de <u>Typhula incarnata</u> utilisées.	28
2.2.1. Les souches monospermes <u>fc</u>	31
2.2.2. Les souches auxotrophes.	31
2.3. Coloration des noyaux.	34
2.3.1. Dans le mycélium.	34
2.3.1.1. Coloration au Giemsa (thalles à croissance normale)	35
2.3.1.2. Coloration à l'hématoxyline ferrique de Regaud (Langeron, 1942) des	
thalles à croissance réduite de type <u>fc</u>	35
2.3.2. Dans les spores (fig. 3.1) : méthode au Giemsa	36
2.4. Essais d'inoculation de l'orge par <u>Typhula incarnata</u>	36
2.4.1. Inoculation en chambre froide.	37
2.4.1.1. Inoculation par mycélium de <u>T. incarnata</u>	37

2.4.1.2. Inoculation par sclérotés de <u>T. incarnata</u>	37
2.4.2. Essais au champ.	38
2.5. Analyse des sucres solubles dans les plantes d'orge.	39
2.5.1. Préparation des échantillons de plantes.	39
2.5.2. Analyse HPLC. (High Pressure Liquid chromatography).	39
2.5.3. Essai d'identification de l'acide citrique et confirmation de la présence de fructose et de glucose.	41

CHAPITRE 3

ANALYSE DESCRIPTIVE DE TYPHULA INCARNATA

3.1. Systématique et morphologie.	45
3.2. Examen microscopique des thalles, comportement nucléaire et morphogénèse. .	50
3.3. Croissance de <u>Typhula incarnata in vitro</u>	57

CHAPITRE 4

CONTRIBUTION DES BASIDIOSPORES AU POTENTIEL D'INFECTION DE TYPHULA INCARNATA

4.1. Etat des connaissances en la matière	62
4.2. Description de l'essai de dicaryotisation	64
4.3. Résultats	64
4.4. Discussion et conclusions	67

CHAPITRE 5

SUSCEPTIBILITE DE L'ORGE D'HIVER VIS-A-VIS DE TYPHULA INCARNATA EN FONCTION DU PRETRAITEMENT DES PLANTES AU FROID

5.1. Introduction	69
5.2. Relation entre l'âge de la plante-hôte et sa susceptibilité à <u>Typhula</u> . . .	70
5.2.1. Orge d'hiver	70
5.2.2. Froment d'hiver	70
5.2.3. Graminées	71
5.3. La notion d'endurcissement des plantes au froid en relation avec leur résistance à <u>Typhula</u>	71
5.3.1. Contrôle métabolique du processus d'endurcissement au froid (d'après Levitt, 1972)	71
5.3.2. Teneur en sucres solubles et tolérance au froid	72
5.3.3. Endurcissement au froid et résistance à <u>Typhula</u>	73
5.4. Description des essais	74
5.5. Résultats	75

5.5.1. Evolution du contenu en sucres solubles des plantes d'orge en automne	75
5.5.2. Effet de la durée d'incubation de la maladie à <u>Typhula</u> sur le niveau des pertes en talles-épi de l'orge au champ	79
5.5.3. Relation entre l'évolution des teneurs en sucres solubles des plantes d'orge en automne et leur degré d'infection par <u>Typhula incarnata</u> au champ	81
5.5.4. Influence du prétraitement des plantes d'orge en chambre froide sur leur contenu en sucres solubles	81
5.5.5. Effet de l'âge sur la prédisposition de la plante d'orge vis-à-vis de <u>Typhula incarnata</u>	84
5.6. Discussion et conclusions	87

CHAPITRE 6

HEREDITE ET STABILITE DU POUVOIR PATHOGENE DE TYPHULA INCARNATA CARACTERISATION D'UN FACTEUR D'HYPOAGRESSIVITE

6.1. Introduction	90
6.2. Caractérisation d'une souche hypoagressive.	92
6.3. Quelle est l'agressivité des monocaryons issus de la souche (4CH4+746n)?	93
6.4. Analyse des générations F1 issues des dicaryons hypoagressifs résultant des croisements entre les monocaryons agressifs (746n et 596) et le monocaryon non agressif (4CH4).	95
6.4.1. Hypothèse de travail.	95
6.4.2. Réalisation du test d'agressivité portant sur les générations F1	96
6.4.3. Résultats	96
6.4.4. A propos de la reproductibilité des résultats d'infection par les souches témoins de référence.	99
6.5. Stabilité de l'agressivité des souches de <u>Typhula incarnata</u>	105
6.6. Agressivité des dicaryons obtenus par croisement du monocaryon 596 avec les monocaryons <u>fc^b</u> produits par le dicaryon (4CH4 + 746n).	107
6.7. Conclusions relatives à la souche 4CH4.	108
6.8. Survie du gène <u>fc^b</u> B17 au champ	108
6.9. Application du modèle moléculaire d'Ullrich à l'expression du caractère <u>fc^b</u> dans certaines souches de <u>Typhula incarnata</u>	111
6.10. Conclusions	112

CHAPITRE 7

INFLUENCE DE L'INTERACTION ENTRE SOUCHES DE TYPHULA INCARNATA SUR LA REPONSE DE L'ORGE D'HIVER A L'INFECTION

7.1. Importance des interactions entre souches dans la microflore parasite.	113
7.2. Effet sur l'infection, de la compatibilité et de la nature des souches de <u>Typhula incarnata</u> inoculées en mélange sur l'orge d'hiver var. "Gerbel".	116

7.2.1. Essai n°1	117
7.2.2. Essai n°2	119
7.3. Les mélanges de souches compatibles de <u>Typhula incarnata</u> au champ.	121
7.4. Interprétation générale des phénomènes de compétition entre souches de <u>Typhula incarnata</u>	123
7.5. Localisation sur l'hôte du site de l'interaction entre souches de <u>Typhula incarnata</u>	127
7.6. Interactions entre souches de <u>Typhula incarnata</u> confrontées <u>in vitro</u>	131
7.7. Interaction entre <u>T. incarnata</u> et d'autres champignons.	140
7.8. Influence de la compatibilité entre souches de <u>Typhula incarnata</u> sur l'interaction hôte-pathogène : une hypothèse explicative.	141
7.9. Conclusions.	142

CHAPITRE 8

LES RECOMBINAISONS SOMATIQUES CHEZ TYPHULA INCARNATA

8.1. Introduction	146
8.2. Obtention de dicaryons dérivés à partir de croisements illégitimes.	147
8.3. Etude de l'hérédité d'une mutation nutritionnelle par analyse de la descendance de deux dicaryons recombinants.	150
8.4. Utilisation du facteur de déficience nutritionnelle comme marqueur de la recombinaison somatique.	151
8.5. Agressivité de la descendance d'un dicaryon recombinant.	154
8.6. Conclusions	156

CHAPITRE 9

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

9.1 Prédiposition de l'orge d'hiver à l'attaque par <u>Typhula incarnata</u>	158
9.2. Dispersion de <u>Typhula incarnata</u> par les basidiospores.	161
9.3. Agressivité de <u>Typhula incarnata</u> et interaction hôte-pathogène.	161
9.3.1. La règle du premier occupant.	163
9.3.2. Présence du gène mutant <u>fc</u>	164
9.3.3. La compatibilité entre souches de <u>Typhula incarnata</u>	164
BIBLIOGRAPHIE.	166

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA RELATION PARASITAIRE ENTRE TYPHULA INCARNATA
ET L'ORGE D'HIVER

MARC CAVELIER

ERRATA

- LIRE page 28 § 2.1 - milieux minima : 120 µg thiamine-HCl
- MM6 : 3 g NaNO₃
- page 33 Tableau 2.3 (titre) : d'après Holliday, 1956
- page 34 § 2.3.1 : un explantat.....est déposé
- page 35 § 2.3.1.2 6ème ligne : HgCl₂
- page 39 § 2.5.2 : 2ème ligne : 8 mg/ ml
9ème ligne : 22 s
- page 41 § c) 1er tiret : des dérivés silylés
- page 50 § 3.2 27ème ligne : Kühner, 1977
- page 56 4ème ligne : méiose
14ème ligne : tandis que l'appariement des noyaux
- page 74 § 5.4 10ème ligne : (figure 5.1A)
18ème ligne : (tableau 5.1 et figure 5.1B)
- page 75 § 5.5.1 8ème ligne : pour décroître ensuite
- page 84 § 5.5.5 3ème ligne : et une même durée d'incubation
- page 108 § 6.7 13ème ligne : le génome 4CH4
- page 118 légende du tableau 7.1 : 2. 69G = monocaryon non agressif,
d'après un essai antérieur (Cavelier, 1986b)
- page 119 15ème ligne : ou presque complète (1ère série) de la plante
- page 139 photo a : A4B2, au lieu de A4B4
- page 158 3ème ligne : réceptives au pathogène au lieu de sensibles
- page 159 16ème ligne : réceptives à T.incarnata au lieu de sensibles

SUPPRIMER, en bas de la page 111, la phrase entre parenthèses.

REPLACER les références bibliographiques suivantes;

- PUNJA, Z.K. & GROGAN, R.G., 1983. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single - basidiospores strains of Athelia (Sclerotium) rolfsii. *Phytopathology*, 73, 9 : 1279-1284.
- RAYNER, A.D.M. & TODD, N.K., 1979. Population and community structure and dynamics of fungi in decaying wood. *Advances in Botanical Research*, 7 : 333-420.
- SMITH, J.D., 1975b. Resistance of turfgrasses to low - temperature - basidiomycete snow mold and recovery from damage. *Can. Plant. Dis. Surv.*, 55 : 147-154.
- SMITH, J.D. & ARSVOLL, K., 1975. Competition between basidiomycetes attacking turf grasses. *The Journal of the Sports Turf Research Institute*, 51 : 46-51.
- SMITH, J.D., 1976. Snow molds on winter cereals in northern Saskatchewan in 1974. *Can. Plant Dis. Surv.*, 55 : 91-96.
- SMITH, J.D. & DAVIDSON, J.G.N., 1979. Acremonium boreale n.sp., a sclerotial low - temperature - tolerant, snow mold antagonist. *Can. Journal of Botany*, 57 : 2122-2139.
- VANDERPLANK, J.E., 1968. Résistance des plantes aux maladies. Academic Press, New-York and London, 223 pp.
- VOLK, V.A., 1937. Untersuchungen über Typhula graminum Karst. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten*, 47 : 338-365.
- WELLER, D.M., 1983. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology*, 73 : 1548-1553.
- WESSELS, J.G.H., 1978. Incompatibility factors and the control of biochemical processes. In : *Genetics and morphogenesis in the basidiomycetes* (Marvin N. Schwab and Philip G. Miles, ed.). New York-London, Academic Press, 81-104.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. Découverte de Typhula incarnata Lasch ex Fr. en Belgique

Au printemps 1976, des jaunissements apparaissaient de façon dispersée dans les cultures d'orge d'hiver du sillon Sambre-Meuse. De nombreuses plantes présentaient au collet des sclérotés de Typhula incarnata, un parasite des graminées, jusqu'alors peu observé dans ces régions, mais néanmoins connu sous de plus hautes latitudes ou en altitude en Suisse, comme faisant partie du complexe des "moisissures de neige" au même titre que Fusarium nivale (Schmidt, 1976). A la montaison, la taille des orges dans les champs atteints était très irrégulière, symptôme qui aurait pu être dû également à la jaunisse nanisante de l'orge, maladie virale transmise en automne par les pucerons de céréales, en extension à cette époque.

L'étude des causes de jaunissement de l'orge d'hiver a été réalisée en reproduisant les symptômes de l'une et de l'autre maladie par des inoculations artificielles au champ (Cavelier et Maroquin, 1978). Depuis lors, des épidémies de rhynchosporiose, d'helminthosporiose et de mosaïque jaune ont aggravé la situation sanitaire de l'orge d'hiver en Belgique (Cavelier et Maroquin, 1984) reléguant au second plan les attaques de T. incarnata dont l'orge ne semble pas trop souffrir jusqu'à présent dans la majorité des cas.

Entre-temps, T. incarnata s'est répandu de façon assez spectaculaire en Belgique, investissant en moins d'une décennie les principales régions de grandes cultures, excepté celles de la côte. Aujourd'hui, elle met en péril l'hivernage de l'orge d'hiver en Allemagne, spécialement en Rhénanie du Nord et en Westphalie (Hindorf, 1980a), en France, particulièrement en Lorraine (Denis, communication personnelle) et en Ecosse (Perry et Al-Hashimi, 1984). En Belgique, la situation sanitaire est à ce point de vue beaucoup plus favorable, malgré les risques d'augmentation de l'inoculum dans les terres à forte charge céréalière. La lutte chimique dirigée en automne contre les maladies du pied pourrait dans certains cas favoriser la production de sclérotés chez les plantes malades (Mielke, 1984).

1.2. Origine et dispersion géographique de l'espèce.

D'après les travaux publiés au début du siècle, les moisissures de neige du genre Typhula sont signalées principalement dans 3 régions; en Europe du Nord (Allemagne, Suède), aux Etats-Unis et au Japon. Les graminées atteintes sont d'une part les céréales (orge et seigle en Allemagne, froment et avoine aux Etats-Unis) et d'autre part les graminées prairiales (en Scandinavie et au Japon). A l'époque, la désignation de l'agent responsable différait selon les auteurs : Typhula graminum Karst (Volk, 1937; Tasugi, 1929), Sclerotium rhizodes (Hungerford, 1923), T. itoana Imai (Imai, 1929), S. fulvum Fries (Young, 1929). En 1940, l'américaine Remsberg compare pour la première fois les sporophores des champignons à sclérotos impliqués dans ces dépérissements et distingue deux espèces de Typhula: T. itoana Imai à sporophores roses et sclérotos brun-rouge et T. idahoensis Remsberg à sporophores blanc-crème et sclérotos brun-noir. La désignation T. incarnata Lasch ex Fr. prévaut sur T. itoana Imai depuis que Corner (1950) a publié sa monographie sur les clavaires et genres alliés.

T. incarnata est considéré comme le moins pathogène des Typhula sur graminées (Bruehl et Machtmes, 1978). Il se rencontre en Europe, en Amérique du Nord et en Asie. T. idahoensis et son cousin T. ishikariensis dont le degré de "spéciation" est sujet à controverse (Arsvoll et Smith, 1978; Bruehl et Machtmes, 1980; Matsumoto et al., 1982) requièrent le plus souvent des conditions de fort enneigement pour se développer. T. incarnata, moins exigeante de ce point de vue, représente la principale espèce de Typhula parasite dans les contrées marginales quant au développement des "moisissures de neige" (Holton, 1953).

L'espèce T. idahoensis est limitée aux Etats-Unis (Bruehl et Machtmes, 1980). T. ishikariensis se rencontre en Scandinavie, aux Etats-Unis, au Canada et au Japon (Bruehl et Machtmes, 1979). En Europe de l'Ouest, T. incarnata est le seul représentant pathogène du genre Typhula sur graminées.

Hormis en Allemagne où plusieurs générations de chercheurs se sont intéressés aux propriétés parasitaires de Typhula incarnata (Volk, 1937; Lehmann, 1965b; Hindorf et Kiewnick, 1978; Mielke, 1978) et dans les pays scandinaves - Suède (Akerberg, 1957; Ekstrand, 1955), Finlande (Jamalainen, 1951; Makela, 1981), Norvège (Arsvoll, 1973) - on ne signale que sporadiquement la présence de cet agent dans les autres contrées d'Europe avant les années 1970: Pays-Bas (anonyme, 1964), Ecosse (Jackson, 1962; Gray, 1963). En Belgique, Maraite et al. (1981) signalent avoir déjà observé des attaques de Typhula très largement distribuées depuis 1973 : les premières mentions de T. incarnata datent de 1976 (Parmentier et Cavelier, 1976). L'épidémie de 1975-1976 en France (de Merleire

et Verbeke, 1976; Lancrenon, 1976; Glemas et al., 1977) et en Belgique (Cavelier et Maroquin, 1978; 1979) a définitivement inclus ce champignon dans la flore parasitaire de l'orge d'hiver cultivé sous notre climat. Le regain d'intérêt que l'on porte depuis à ce parasite dans d'autres régions du monde, permet de supposer que l'épidémie nouvellement observée en Europe de l'Ouest s'est également étendue aux régions traditionnellement touchées par la maladie.

1.3. Cycle parasitaire et symptômes sur orge d'hiver.

Les sclérotés de T. incarnata représentent les organes de survie du champignon qui lui permettent de passer la saison estivale, même en l'absence d'hôte, dans des conditions de température qui ne permettent pas sa croissance. Quelle que soit la plante sur laquelle ils se développent (graminée cultivée ou adventice, fig.1.1), les sclérotés naturels résultent toujours d'une infection par un thalle dicaryotique (fig.1.2A). Dès qu'ils sont formés, les sclérotés entrent en dormance. Celle-ci n'est levée qu'après que les sclérotés aient subi une dessiccation, condition qui empêche pratiquement une germination précoce au printemps (Lehmann, 1965b).

En automne, généralement à partir de début novembre (Detiffe et Maraite, 1985), l'hygrométrie élevée et les baisses sensibles de température (<15°C) induisent la germination des sclérotés non dormants qui donnent naissance soit à des carpophores, soit à des cordons mycéliens (fig 1.2A). Les clavules (organes fertiles des carpophores) sont produites par les sclérotés situés près de la surface du sol ; elles donnent naissance aux basidiospores considérées comme peu infectantes par la plupart des auteurs (voir chapitre 4). Les cordons mycéliens se développent fréquemment à partir de sclérotés enfouis plus profondément dans le sol où ils se dirigent sans orientation précise (Detiffe et al., 1985).

Les organes de contamination sont représentés par les cordons mycéliens issus des sclérotés et par les hyphes qui se développent à partir des clavules sénescents (fig.1.2B), qui tous deux donnent naissance à des dicaryons.

T. incarnata peut infecter directement de jeunes plantules avant que les premières feuilles ne deviennent sénescents, comme de nombreux essais d'inoculation en chambre froide l'ont montré (Cavelier et Auquier, 1980; Cavelier, 1980, 1982 a et b, 1986b) et comme Detiffe et al. (1983b) l'ont observé au champ.

L'attaque de l'orge par T. incarnata débute principalement au niveau des déchirures du cylindre foliaire faisant suite au développement des talles et secondairement par les ouvertures stomatiques (Detiffe et al., 1983b).

A.



B.



Figure 1.1 : A. Talles d'orge présentant des sclérotés de Typhula incarnata.
B. Attaque de Typhula incarnata sur le mouron (Stellaria media):
les sclérotés allongés épousent la forme des tiges de la
plante.

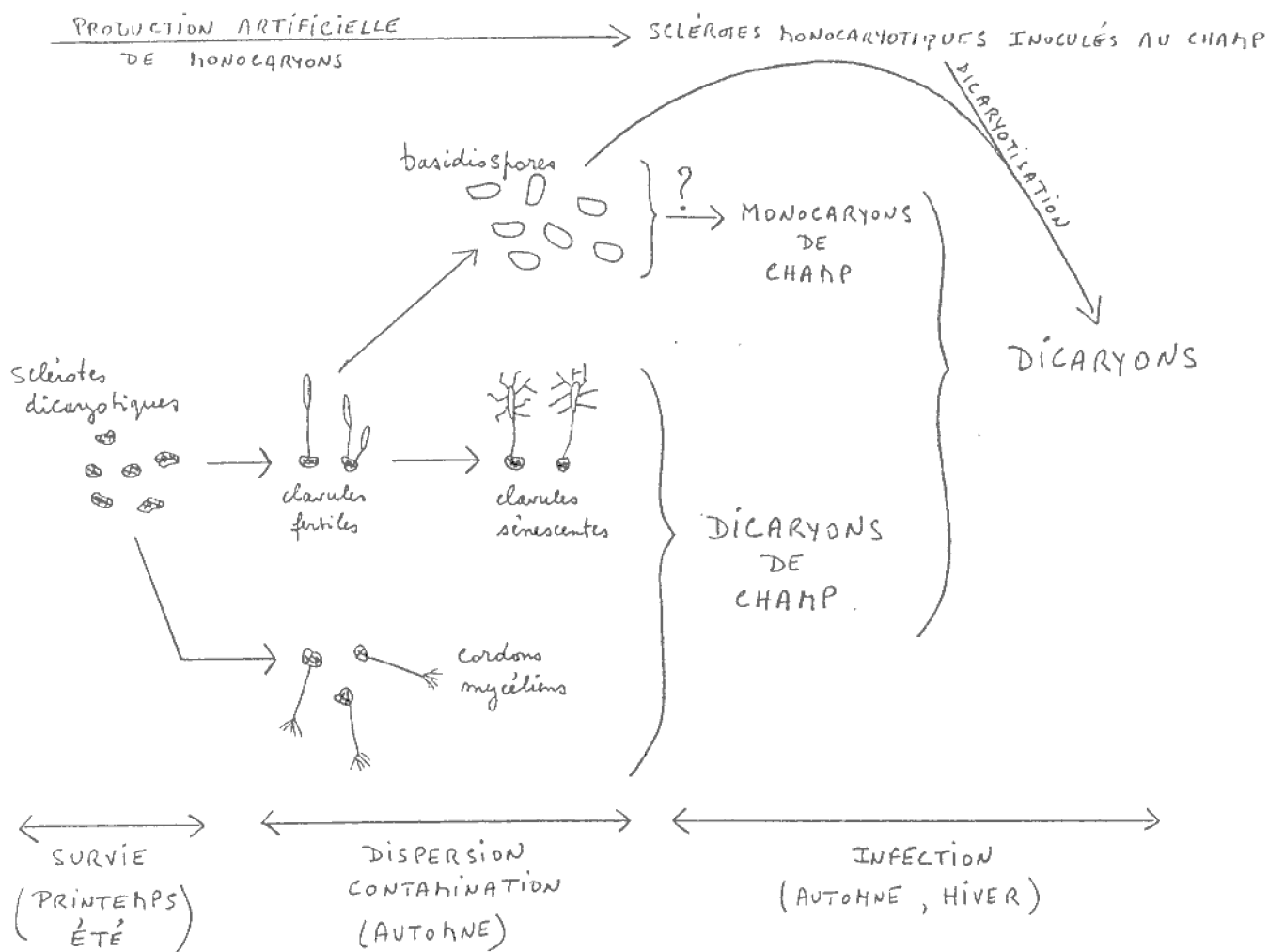


Figure 1.2A : Représentation schématique des organes de survie et de dispersion de *Typhula incarnata* conduisant à la formation des dicaryons responsables des infections au champ : la dicaryotisation de sclérotés monocaryotiques obtenus au laboratoire et inoculés au champ est traitée au chapitre 4.

Le plateau de tallage et les racines sont colonisées à leur tour d'autant plus rapidement que les infections sont précoces et concernent des plantes peu développées infectées sous une épaisse couche de neige (Bruehl et Cunfer, 1971).



Figure 1.2B : Contamination de l'orge par les clavules sénescents de Typhula incarnata.

Au printemps, la maladie s'exprime brutalement au moment de la reprise de la végétation par des jaunissements et par le dépérissement de talles entières sur des segments de ligne de 1 à 10 plantes malades (Cavelier et Maroquin, 1978). Bien que les méristèmes ne soient pas colonisés (Detiffe et al., 1985), le flétrissement est irréversible si la plupart des racines ont été tuées et si la plante est incapable de les remplacer suffisamment vite (asphyxie racinaire).

Les plantes attaquées par Typhula deviennent extrêmement sensibles au gel ce qui accentue encore les dégâts dus à l'hiver.

Les sclérotés sont produits dès le mois de janvier (Cavelier et Maroquin, 1978; Detiffe et al., 1981) entre les gaines foliaires et au collet des plantes atteintes ainsi que sur les racines et sur les feuilles flétries jonchant le sol.

Les talles survivantes à l'attaque parasitaire et les talles secondaires de remplacement accusent un léger retard de croissance par rapport aux plantes saines (fig. 1.3) ce qui crée en phase de montaison (avril) une strate de végétation hétérogène. L'épiaison des plantes malades est également retardée de quelques jours. Certaines variétés infectées par Typhula présentent un allongement manifeste de leurs épis (Mielke, 1978) ce qui peut être interprété comme un facteur de tolérance à l'égard de l'attaque parasitaire (Cavelier et Maroquin, 1980).



Figure 1.3 : Plantes d'orge ayant survécu à l'attaque de Typhula incarnata (plante de gauche et du centre) comparées à une plante saine (plante de droite).

1.4. Importance des dégâts occasionnés par Typhula incarnata selon les hôtes.

Céréales

Les dommages provoqués aux cultures d'orge d'hiver par T. incarnata sont difficiles à évaluer parce que ce champignon n'est pas le seul responsable des dépérissements printaniers observés avec une fréquence variable selon les années (voir point 1.6). D'autre part, nous avons montré que, malgré la sensibilité manifeste de certaines variétés d'orge d'hiver vis-à-vis de Typhula, leur rendement n'était pas inférieur à celui de variétés plus résistantes, quoique l'infection ait atteint plus de 50 % de la surface des parcelles concernées (Cavelier et Maroquin, 1980).

Par ailleurs, il faut également prendre en considération la méthode d'évaluation de l'intensité des dégâts. Les cotations couramment utilisées au printemps pour juger du degré d'attaque des cultures, à savoir le % de jaunissement (Ebenebe et Fehrmann, 1974) ou le % de plantes infectées (Mielke, 1977)

ne donnent pas toujours une bonne estimation du rendement final des parcelles concernées (Cavelier et Maroquin, 1980). Ceci est dû à la tolérance de certaines variétés à l'égard de T. incarnata et aux conditions climatiques qui président au rétablissement des plantes au printemps. En effet, certains paramètres du rendement tels que le poids de 1000 grains peuvent compenser la perte des talles-épi provoquée par la maladie (Mielke, 1978; Cavelier et Maroquin, 1980). Holton (1953) constate également que les dégâts dus à T. idahoensis sur froment paraissent souvent bien plus sévères au printemps qu'au moment de la récolte en été.

Lehmann (1965b) cite des chutes de rendement en grains pour l'orge d'hiver de l'ordre de 8 % avec parfois 30 % de talles-épi en moins, mais signale également que dans un essai comprenant 36 répétitions, le rendement des parcelles infectées avait dépassé celui des parcelles témoins. A plusieurs reprises, nous avons pu faire les mêmes observations (Cavelier et Maroquin, 1980 et observations personnelles). L'état de certains emblavements à la sortie de l'hiver peut donc paraître désastreux et amener l'agriculteur à retourner les champs en cause. Seule l'estimation du nombre de plantes survivantes par unité de surface doit être considérée en la matière, sans prendre en compte leur piètre apparence. Des reperçements de talles peuvent avoir lieu jusqu'au mois de mai et donner des épis normaux. Quand le printemps est humide et pas trop froid, les plantes attaquées peuvent parfois se rétablir grâce à l'émission de nouvelles racines (Lehmann, 1965b; Detiffe et al., 1983b).

Depuis quelques années, de fortes infections de T. incarnata contribuent, en Belgique, au dépérissement de certaines orges déjà gravement atteintes par la mosaïque jaune de l'orge, entraînant leur perte totale.

Outre l'orge d'hiver qui est la céréale la plus sensible à T. incarnata (Volk, 1937), le seigle, l'avoine et le froment peuvent être fréquemment atteints par ce parasite.

Marshall et Schein (1960) signalent, en Pennsylvanie, une attaque exceptionnelle de T. incarnata sur avoine d'hiver recouverte par une couche de neige de 60 pouces. Selon les variétés, 10 à 53 % des plantes n'auraient pas survécu!

Dans la province du Saskatchewan (Canada), la présence de T. incarnata est signalée seulement depuis 1974 (Smith, 1975a) mais ce sont surtout Sclerotinia borealis et un LTB (Low temperature basidiomycete) dont le stade parfait serait Coprinus psychromorbides (Traquair et Smith, 1982) qui causent des dégâts importants au seigle et au froment.

Aux Etats-Unis (Washington, Idaho), la virulence de T. incarnata sur froment d'hiver est loin d'atteindre celle des autres principaux agents de moisissures de neige: Fusarium nivale et T. idahoensis. Aucune donnée nord-

américaine ne permet d'affirmer que T. incarnata provoque une mortalité élevée chez les plantes.

L'étude de T. incarnata aux Etats-Unis a été envisagée au champ à cause de sa large distribution géographique et parce qu'il existe chez certaines variétés de froment d'hiver une corrélation entre la résistance à T. incarnata, celle à T. idahoensis et celle à F. nivale (Bruehl, 1967b).

Nous avons testé en chambre froide la sensibilité de 5 froments d'hiver d'origine allemande, belge, française et suisse à l'égard de T. incarnata. Tous étaient nettement moins sensibles que l'orge d'hiver et ne produisaient pratiquement pas de sclérotés (Cavelier, 1980).

Graminées prairiales

En Norvège, le développement des moisissures de neige constitue, avec la formation d'une couche de glace, le facteur limitant le plus important de l'exploitation des herbages qui couvrent 620.000 hectares (en Phleum pratense, Lolium perenne, Festuca pratensis, Poa trivialis, Dactylis glomerata). De 1968 à 1971, les moisissures de neige ont été tenues pour responsables de la moitié des dégâts dus à l'hiver dans les prairies, avec une perte estimée en moyenne à 21 %. Sur 2.401 prairies, 1.780 étaient endommagées par les moisissures de neige et plus du quart étaient atteintes par T. incarnata. Cependant, la part des pertes dues à T. incarnata a été estimée à seulement 0,8 % (Arsvoll, 1973).

Dans le Nord de la Finlande, la neige tombe en novembre et persiste jusqu'en mai, de sorte que les prairies sont protégées du gel. Les dommages hivernaux sont essentiellement dus à l'activité des moisissures de neige. Avec une fréquence de T. incarnata de 10% dans les isoléments, l'incidence de ce champignon sur le rendement est considéré comme faible par rapport à celle de T. ishkariensis (Mäkelä, 1981).

Gazons

Au Canada et en Colombie britannique, les pelouses de prairies de sport sont sujettes aux attaques des champignons psychrophiles, parmi lesquels T. incarnata (Smith, 1975b), surtout quand la neige tombe sur le sol non gelé. Dans le Michigan, les gazons sont également attaqués par T. incarnata (Vargas et Kelly, 1981). D'après ces auteurs, tous les cultivars d'Agrostis rampants sont susceptibles d'être attaqués et requièrent un traitement fongicide.

Cet aperçu de la littérature sur les dégâts provoqués par T. incarnata, montre qu'il est difficile d'évaluer le niveau des pertes pour les différents

types de culture. Il apparaît cependant que si de nombreuses espèces de graminées sont susceptibles d'être atteintes par la maladie, les dépérissements ne revêtent une importance économique que dans deux cas précis :

- attaque sévère de l'orge d'hiver avec des conséquences néfastes sur le rendement, par diminution du nombre de talles-épi (Europe de l'Ouest);
- attaque de gazon conduisant à une dépréciation des plaines de jeux et de sport (Canada, Etats-Unis et Japon).

Dans tous les autres cas, T. incarnata fait partie du cortège des moisissures de neige, mais ne représente pas une cause majeure de dépérissements économiquement préjudiciables.

1.5. Lutte contre les "moisissures de neige" par traitement fongicide

La maladie causée par Typhula incarnata a été partiellement contrôlée par des pulvérisations de cyanamide (0.1 %), de composés mercuriels (0.1%) ou de maneb (0,2 %), diminuant le nombre de plantes jaunies et le nombre de sclérototes par plante (Kiewnick, 1968) ; cependant l'incidence de ces traitements sur le rendement de l'orge d'hiver n'a pas été mesuré. Le chloroneb (1,4 - dichloro - 2,5 - diméthoxybenzène) a été utilisé avec succès pour empêcher le dépérissement des pelouses d'Agrostis sp. et de Poa annua (Vargas et Beard, 1970). Cette substance ne provoque pas de phytotoxicité apparente alors que les produits mercuriels sont responsables d'une décoloration des tiges. La période idéale de traitement se situerait 1 mois avant la tombée de la neige.

Au Japon, on a renoncé à utiliser les produits mercuriels en pulvérisation pour lutter contre les "moisissures de neige" dans les cultures de froment d'hiver à cause de leur trop grande phytotoxicité.

Les mesures de lutte recommandées pour lutter contre T. incarnata sont les suivantes (Matsumoto, 1983):

- 1) semer aussitôt que possible afin de promouvoir l'endurcissement des plantes (voir chapitre 5);
- 2) appliquer un traitement fongicide approprié juste avant le recouvrement des cultures par la neige. Une pulvérisation supplémentaire est recommandée s'il vient à pleuvoir après la première pulvérisation;
- 3) répandre de la poudre de carbone à la fin de l'hiver pour accélérer la fonte des neiges.

Le thiophanate méthyl (poudre mouillable à 70 %) serait actif contre Sclerotinia borealis et Fusarium nivale bien que certaines souches de ce dernier soient devenues résistantes à ce produit depuis 1980 dans l'île d'Hokkaido. Le PCP (pentachlorophénol) autorisé comme herbicide, le Mépronil

(3'-iso-propoxy-2-méthylbenzanilide) et l'oxyquinoléate de cuivre seraient actifs contre T. incarnata et T. ishikariensis. L'emploi d'agents adhésifs est conseillé pour diminuer la fréquence des pulvérisations sur les plaines de golf. Le tolclofos méthyl, fongicide systémique, appliqué comme désinfectant des semences ou en pulvérisation sur la végétation début novembre, serait efficace contre les moisissures de neige du genre Typhula (Shimanuki et al., 1981; Ohtsuki et Fujinami, 1982).

Le traitement des semences au triadiménol ainsi que les pulvérisations à la carboxine et à l'oxycarboxine à la mi-octobre et à la mi-novembre ont fortement réduit le nombre de plantes d'orge infectées par T. incarnata (Ebenebe et Fehrmann, 1974). La croissance mycélienne et la production de sclérotés étaient fortement inhibées in vitro par 7 fongicides systémiques (Ebenebe et Fehrmann, 1976).

Le contrôle de Sclerotinia borealis et de Typhula FW sur gazon d'Agrostis a pu être réalisé avec du quintozone et du bénomyl. Le quintozone semble avoir stimulé le développement de F. nivale (Smith et Reiter, 1976). Les fongicides à base de BCM se sont révélés inefficaces sur orge d'hiver (Mielke, 1981) et sur froment d'hiver (Bruehl, 1982).

Une solution diluée d'acide peracétique (0,5 - 1,5 %) a diminué considérablement le nombre de sclérotés de T. incarnata dans les 5 premiers centimètres du sol. La même action fongicide a été obtenue sur plusieurs piétins des céréales (Mielke et Hopp, 1982).

Bien qu'au laboratoire, le triadiméfon ne soit pas très efficace à l'égard de T. incarnata, lorsqu'il est appliqué au champ à la dose normale, ce fongicide empêche le jaunissement de l'orge en favorisant la croissance des plantes sans freiner pour autant la production de sclérotés sur les organes infectés (Mielke, 1981). Un surplus de rendement a été obtenu à la suite de tels traitements mais il est peu probable que ce soit en raison de leur effet fongicide sur T. incarnata. Une réduction de la maladie a également été observée en Belgique sur orge d'hiver à la suite d'un traitement automnal à base de triadiméfon (Detiffe et al., 1981).

L'application de bitertanol, à la fin de l'automne à la dose de 1.5 l/ha, permet non seulement de réduire le degré de jaunissement de l'orge d'hiver mais aussi la proportion de plantes atteintes et le taux de sclérotés (Mielke, 1984).

Il existe donc des préparations fongicides permettant de freiner et même d'arrêter le développement des "moisissures de neige", notamment de T. incarnata. Toutefois, de façon générale, leur emploi est peu recommandable dans

l'optique d'une réduction du prix de revient des cultures et d'une diminution de la pression sélective que ces produits exercent sur la flore parasitaire combattue dans le cadre de traitements classiques au printemps. De plus, l'emploi de certains fongicides systémiques non éradicants est susceptible d'augmenter le nombre de sclérotés produits aux dépens des plantes survivant à l'infection, contribuant à accroître l'inoculum du pathogène dans le sol (Mielke, 1984).

Par ailleurs, l'impossibilité de prévoir la gravité d'une attaque de T. incarnata fait que la rentabilité d'un traitement automnal est plus que douteuse. En Belgique, le traitement des semences d'orge d'hiver au triadiménol tend à se généraliser pour diverses raisons ; malgré cette évolution, il ne semble pas que la fréquence des attaques de T. incarnata ait diminué.

1.6. Principales causes de dépérissement de l'orge d'hiver de la levée au stade redressement.

a. Phytotoxicité des herbicides en automne

Exemple: phytotoxicité du chlortoluron appliqué en préémergence, en rapport avec la profondeur du semis ; dans le champ, dégâts répartis sur de longues bandes ; sur les plantes, présence alternée de bandes jaunes et vertes perpendiculairement aux nervures foliaires ; rétablissement rapide des plantes atteintes grâce au tallage.

b. Attaque d'osciniés (insectes diptères) en automne.

Attaque dispersée ou localisée à l'emplacement d'anciens andains ; la feuille centrale se flétrit et la talle meurt. Les conséquences sont variables et dépendent du stade phénologique des plantules atteintes ; incidence généralement faible sur le rendement.

c. Attaque importante d'oïdium en automne.

Attaque généralisée produisant un flétrissement des feuilles couvertes de pustules blanches. Jaunissement doré visible de loin ; incidence nulle ; repousse printanière indemne d'oïdium.

d. Dégâts de gel.

Dégâts localisés en fonction de la topographie, de la couverture de neige et des effets micropédoclimatiques. Le coeur végétatif est nécrosé suite à des températures trop basses ou les racines sont sectionnées à la suite

d'un déchaussement; perte d'un certain nombre de plantes; reprise plus difficile. Risque d'infection par Pythium sp. par temps pluvieux et froid à la fin de l'hiver.

e. Asphyxie racinaire.

Dégâts localisés dans les fonds humides ou en présence d'une semelle de labour. Les plantes végètent ou disparaissent suite à des nécroses racinaires (même incidence qu'en d.).

f. Faim d'azote au printemps.

La faim d'azote résulte d'un semis précoce ou/et trop dense (concurrence entre les plantes) ou d'un manque de nitrification hivernale. Cette faim d'azote se manifeste selon les cas sur toute la sole ou uniquement en fourrière (redoublement de semis) en provoquant le jaunissement précoce des feuilles. L'incidence de ce phénomène est faible ou nulle si la culture est réalimentée correctement en azote.

g. Attaque hivernale de Fusarium sp.

Fréquente mais généralement peu spectaculaire en raison de sa dispersion dans la culture. Ce type de dégâts est parfois responsable de la disparition totale de fractions de ligne de culture, surtout après une longue période d'enneigement, lorsque la neige a persisté sur un sol non gelé (hiver 1979 par ex.). Des rosettes de plantes flétries, il ne reste plus que des feuilles grises jonchant le sol, ponctuées des stromas mycéliens roses du parasite. En raison de son caractère dispersé, la maladie n'a qu'une faible incidence sur la culture, parce qu'il y a soit compensation de la part des plantes saines, soit reperçement de feuilles nouvelles chez les plantes malades dont le coeur végétatif n'aurait pas été tué.

h. Attaque automnale et hivernale du virus de la mosaïque jaune de l'orge.

Cette virose est transmise par Polymyxa graminis, champignon du sol parasite des graminées. Depuis 1977, on observe une augmentation constante du nombre de terres infectées par cette maladie qui affecte de larges aires de culture, souvent sur des pentes (fig. 1.4A) ou qui se généralise dans une partie voire dans l'entièreté d'une sole. La végétation atteinte est plus claire, ne profite pas de façon satisfaisante des engrais azotés et est dominée de façon caractéristique par les repousses bien vertes de froment de l'assolement précédent (fig. 1.4B).

Les feuilles des plantes virosées présentent par transparence une multitude

de points chlorotiques évoluant en stries nécrotiques parallèles aux nervures. Ce symptôme qui est très caractéristique sur les plus jeunes feuilles, peut persister parfois jusque sur la feuille-pavillon.

On note une réduction importante de la taille des plantes les plus atteintes, une augmentation de la longueur moyenne de l'épi mais un échaudage sévère du fait d'un enracinement médiocre.

Les conséquences de la mosaïque jaune de l'orge sur le rendement sont variables et essentiellement fonction de la grandeur des surfaces atteintes, des conditions atmosphériques de l'hiver (exposition au gel) et de la sensibilité relative des variétés. Les pertes de rendement sont comprises entre 15 et 50 % pour une variété très sensible (Cavelier et Maroquin, 1984). Le seul moyen de lutte consiste à planter des variétés résistantes.

i. Attaque automnale du virus de la jaunisse nanisante de l'orge.

Cette virose endémique dans l'ensemble de la Belgique, s'est développée de façon épidémique en 1976 et 1983 à la suite des contaminations automnales de 1975 et 1982 par les pucerons de céréales vecteurs de la maladie, principalement dans les semis antérieurs au 25 septembre (Cavelier et Maroquin, 1978, 1984).

La maladie se présente de façon dispersée dans la culture (fig. 1.5A), le damier qui en résulte étant plus contrasté que dans le cas de Typhula (fig. 1.7A) en raison de la teinte ocre des plantes malades (fig. 1.5B). Les symptômes de la jaunisse nanisante de l'orge sont les suivants: plantes mortes ou plantes jaunes faiblement développées ; les plantes survivant à l'hiver présentent un liseré caractéristique en bordure des limbes des feuilles les plus jeunes tandis que des stries jaunes internerviennes se développent sur les feuilles les plus âgées; ultérieurement, nanisme des talles les plus atteintes, épiaison difficile, dépressions dans la végétation formées par des orges malades de différentes tailles.

Les conséquences prévisibles de la jaunisse nanisante de l'orge sur le rendement sont nulles s'il y a peu de foyers d'infection. Lorsque ceux-ci sont nombreux et tendent à se rejoindre, leur incidence sur la production est faible si la souche de virus est peu agressive, mais elle peut être élevée si la souche de virus est très agressive (Cavelier et Maroquin, 1980).

La lutte préventive contre la jaunisse nanisante s'effectue par destruction des sources de virus (telles que les repousses d'escourgeon) et par le traitement des nouveaux emblavements avec un aphicide au début novembre si les populations aphidiennes au champ sont importantes et les conditions climatiques favorables à leur développement.

A.



B.



Figure 1.4 : Différents aspects de la mosaïque jaune de l'orge

- A. Au printemps, jaunissement des plantes (ici, à l'avant-plan)
- B. A l'épiaison, aspect d'un champ mosaïqué dominé par des repousses de froment (à l'avant-plan), en bordure d'un champ non atteint par la virose quoique cultivé en une variété d'orge sensible (à l'arrière-plan)

A.



B.



Figure 1.5 : Aspect d'un jaunissement dispersé dû au virus de la jaunisse nanisante de l'orge dans une culture d'orge du mois de mars 1983

A. Aspect général de la culture

B. Foyers de jaunisse nanisante dus à la multiplication des pucerons vecteurs en automne

j. Attaque automnale et hivernale de Typhula incarnata.

Ce type de dégâts détermine le plus souvent un aspect moucheté de la culture au moment de la reprise de croissance au printemps (fig.1.7A). Typhula incarnata est avec le VJNO (voir point suivant) responsable du jaunissement dispersé de l'orge d'hiver (Parmentier et al., 1979).

Selon la gravité de l'attaque, on distingue sur la plante trois types de symptômes:

- soit la mort des rosettes: feuilles blanches jonchant le sol et portant des sclérotés brun-rouge (fig. 1.7B),
- soit une végétation jaunissante en voie de flétrissement: collets entourés d'un manchon mycélien blanc; sclérotés roses enchassés dans les gaines foliaires (fig.1.6),
- soit une végétation apparemment saine mais présentant de nombreux sclérotés au niveau du plateau racinaire.

Dans les cas graves, on a observé une réduction du nombre de talles-épi de 3 à 31 %, sans qu'il y ait une incidence sur le rendement final en grains (Cavelier et Maroquin, 1980). T.incarnata contribue néanmoins à affaiblir les emblavements déjà handicapés par des façons culturales non appropriées ou par un état sanitaire déficient (ex. mosaïque jaune, voir point h).



Figure 1.6 : Plantes d'orge dont les talles sont emprisonnées par un manchon mycélien de Typhula incarnata.

A.



B.



Figure 1.7 : Aspect d'un jaunissement dispersé dû à Typhula incarnata dans une culture d'orge au mois de mars 1979.

- A. aspect moucheté de la végétation
- B. plantes mortes alternant avec des plantes ayant survécu à Typhula incarnata

CHAPITRE 2

METHODOLOGIE GENERALE

2.1. Milieux de culture de Typhula incarnata.

Les différentes souches de T. incarnata sont maintenues en culture sur milieu "potato dextrose agar" (PDA de MERCK) à 12°C. C'est sur ce même milieu qu'ont été effectuées les mesures de croissance du mycélium en fonction de la température (chapitre 3). Les confrontations de souches (chapitre 7) ont été réalisées sur différents milieux: malt agar (MA), jus de tomates-agar (VB), lima bean agar (LBA) et milieu synthétique complet (MC). La composition du milieu complet et des milieux minima utilisés pour la mise en évidence de souches auxotrophes (chapitre 8) figure ci-dessous (pour 1 litre de solution à pH6);

- milieu complet (MC) : 20g saccharose, 2g peptone, 2g extraits de levure, 0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.46g KH_2PO_4 , 1g K_2HPO_4 , 18g agar.
- milieux minima (MM) : produits communs : 0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.46g KH_2PO_4 , 1g K_2HPO_4 , 120µg thiamine-HCl, 18g agar.
produits spécifiques :
 - MM1 : 20g saccharose, 2g L-asparagine
 - MM2 : 20g saccharose, 1.5g $(NH_4)_2SO_4$
 - MM3 : 20g D-glucose, 1.5g $(NH_4)_2HPO_4$
 - MM4 : 20g D-glucose, 2g L-asparagine
 - MM5 : 20g saccharose, 1.5g $(NH_4)_2HPO_4$
 - MM6 : 20g saccharose, 3g $NaNO_3$
- milieu minimum selon Holliday (1956) (HO)
 - 30g saccharose, 1.9g KNO_3 , 370mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 170mg KH_2PO_4 , 8.5mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 27.5mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 20g agar.

2.2. Souches de Typhula incarnata utilisées.

Certaines souches provenant des isolats de T. incarnata (Cavelier et Auquier, 1980), ont été utilisées dans des essais d'inoculation, tandis que d'autres ont servi à réaliser des croisements (tableau 2.1a). Des isolats de champ génétiquement indéterminés (tableau 2.1a) ont également été utilisés. Les produits de générations-filles obtenus au laboratoire figurent au tableau 2.1b.

Tableau 2.1a : Origine du matériel fongique prélevé au champ et utilisé pour la création de souches nouvelles de Typhula incarnata.

(A) Isolats dicaryotiques de <u>T. incarnata</u> prélevés au champ			(B) Monocaryons issus des isolats (A) (Cavelier et Auquier, 1980)
Sigle	Localité d'origine	Date de l'isolement	
G	Gembloux-Liroux	1976	59G (A1B1) 78G (A1B1) 69G (A2B2) 74Gn (A2B2) 56Gn (A1B2) 56Gb (A1B2) ¹ 48G (A2B1)
P	Gembloux (N.4)	1978	8P (A2B4) 13P (A2B4) 9P (A4B4)
M	Milmort (Liège)	1978	15M (A2B6)
CH4 ^(*)	Nyon (Suisse)	1974	4CH4 (A5B17) ¹
GD	Gembloux-Ernage	1981	
HO	Hoeselt (Tongres)	1980	
Li	Liefrange (vallée de la Sûre) Grand-Duché de Luxembourg	1984	= Isolats non caractérisés génétiquement.
S3	Schaffen (Diest)	1980	
SL	Slins (Liège)	1981	
ST	Steevoort (Hasselt)	1980	

(*) Souche aimablement fournie par D. Schmidt (Station fédérale de Changins)

1. Souche fcB (voir point 2.2.1)

Tableau 2.1b : Généalogie des souches utilisées dans les essais. (*)

Souches dicaryotiques parentales	Souches monospERMES ^a de 1ère génération	Dicaryons F1	Souches monospERMES ^a de 2ème génération	Dicaryons F2
596 x 9P	16-3C10 (A4B2) ¹ 1-3E41 (A2B4) ² 11-3E41 (A2B1) ²	16-3C10 x 4CH4	1 à 30 J104	566n x (1 à 40)Dr3
9P + 596	1 à 72 Na1	16-3C10 + 596	dont 1-J104 (A5B2)	
696 + 596	dont 4Na1 (A5B1)	596 + 16-3C10	5-J104 (A2B2)	
746n + 596	1 à 174Na2	12Na2 x 14Na2 dénommé J104	11-J104 (A5B17) ¹ 14-J104 (A2B17) ¹	
9P x 746n	dont 1Na2 (A5B2)	3Na2 + (4CH4 x 11-3E41) dénommé Dr (1 à 12)	40 souches Dr3	
566n x 9P	3Na2 (A2B17) ¹		dont 6Dr3 (A2B17) ^{1,2}	
566n + [746n + (596 x 9P)] dénommé 3C10	12Na2 (A2B17) ¹	596 x 78 souches Na2 de type B2	44Dr3 (A2B17) ^{1,2}	
13P + [696 + (786 x 9P)] dénommé 3E41	14Na2 (A5B2)	152 souches (Na2 x Na2)	13Dr3 (A2B1) ²	
4CH4 + 596 dénommé Na1	129Na2 (A5B17) ¹	74 souches (Na1 x Na1)	36Dr3 (A2B1) ²	
4CH4 + 746n dénommé Na2	1 à 20Na3	(Dr = Dicaryon recombinant)	16Dr3 (A5B1) ² 56Dr3 (A5B1) ²	
4CH4 + 566b dénommé Na3			33 souches Dr6	

1. Souche fcb (Cavelier; 1982a, 1985)

2. Souche auxotrophe (voir texte)

3. Souches obtenues à partir de monobasidiospores

* Signification des signes x et + dans les croisements entre souches ; x pour croisement réciproque + pour croisement unilatéral.

Les croisements a + [b + (c x d)] s'effectuent obligatoirement dans l'ordre suivant :

1. (c x d) : croisement des souches c et d ; le signe x signifie que le produit (cd) du croisement résulte de la dicaryotisation réciproque des souches.
2. [b + (c x d)] : croisement de la souche (cd) avec la souche b ; le signe + signifie que seul le produit du croisement (bcd), résultant de la dicaryotisation de b par (cd), est retenu.
3. a + [b + (c x d)] : croisement de la souche (bcd) avec la souche a ; croisement unilatéral comme en 2, le produit de croisement (abcd) résultant de la dicaryotisation de a par (bcd).

2.2.1. Les souches monospermes fc

Le caractère fc est responsable d'une croissance réduite du mycélium (par rapport à la croissance radiaire normale continue et indéfinie), sous l'effet d'une toxine brunâtre fongistatique émise par le champignon (Cavelier, 1982a). Apparu spontanément chez certaines souches d'origine G et CH4 et pouvant être transmis quelques fois à leur descendance, le caractère fc est lié tantôt à l'allèle B2, tantôt à l'allèle B17 d'incompatibilité.

La souche 16-3C10 (très pigmentée) et la souche 4CH4 (beaucoup moins pigmentée) constituent les principales souches fc utilisées dans ce travail, dont les propriétés ont été résumées dans une note récente (Cavelier, 1985) et seront discutées à plusieurs endroits de ce mémoire.

2.2.2. Les souches auxotrophes.

L'absence de croissance d'une souche sur milieu minimum reflète une déficience nutritionnelle; une telle auxotrophie est apparue spontanément dans quelques souches monospermes de la souche 3E41 testées sur milieu MM1.

Sur PDA, les souches prototrophes (croissant sur MM1) et les souches auxotrophes issues de la même souche parentale 3E41, ont des vitesses de croissance variables sans rapport apparent avec une exigence nutritionnelle particulière.

Pour les souches prototrophes, l'asparagine et l'ion NH_4^+ (MM1 et MMS respectivement) constituent une source d'azote permettant une croissance atteignant 60 à 75 % de celle mesurée sur PDA. Avec ces mêmes souches, le nitrate de sodium (MM6) induit des colonies aussi étendues que sur PDA mais cependant très ténues. L'adjonction de 100mg d'asparagine/litre de milieu rétablit une croissance mycélienne normale comparable à celle sur PDA.

L'identification du facteur de croissance responsable de l'auxotrophie a été entreprise en utilisant la grille de milieux de culture (tableau 2.2) proposée par Holliday (1956). Le tableau 2.3 montre que par rapport au milieu MA, certains milieux de culture conviennent mieux à la croissance de la souche prototrophe 74Gn (PDA, MM1, H1, H6, H7, H8 et H9) que d'autres (H0, H2, H3, H4, H5, H10, H11 et H12). Par ailleurs, la croissance de la souche auxotrophe 11-3E41 est rapide sur MA et PDA mais est faible ou nulle sur MM1, H0, H1, H4, H7, H9, H11 et H12. Des résultats analogues sont obtenus avec la souche auxotrophe fc 44Dr3.

L'adjonction de pyridoxine (vitamine B6) dans les milieux minima MM1 et MM4 a rétabli la croissance normale des souches auxotrophes (tableau 2.4). Par

Tableau 2.2 : Tableau à double entrée des 36 substances ajoutées au milieu minimum (H0) selon Holliday (1956)

	H1	H2	H3	H4	H5	H6
H7	adénine	biotine	phénylalanine	alanine	arginine	leucine
H8	hypoxanthine	acide folique	sérine	cystéine	ornithine	glycine
H9	cytosine	acide pantothénique	tryptophane	thréonine	acide aspartique	isoleucine
H10	guanine	pyridoxine	tyrosine	thiosulphate	proline	histidine
H11	thymine	thiamine	acide p-aminobenzoïque	méthionine	acide glutamique	lysine
H12	uracil	riboflavine	acide nicotinique	choline	inositol	valine

Tableau 2.3 : Croissance radiale de 3 souches monospermes de *Typhula incarnata* sur différents milieux de culture (d'après Hollyday, 1956).

Milieux de culture d'origine	Première subculture			Deuxième subculture		
	PDA			Les différents milieux testés		
	20 jours après le repiquage			9 jours après le repiquage		
Souches testées	74Gn Sauvage	11-3E41 <u>aux</u>	44Dr3 <u>aux/fcb</u>	74Gn Sauvage	11-3E41 <u>aux</u>	44Dr3 <u>aux/fcb</u>
Milieux testés						
MA	100 ¹	97	65	C ²	C	C
PDA	95	73	27	C	C	C
MM1	73	27	27	C	O	O
H0	59	14	19	C	O	O
H1	62	14	22	C	O	O
H2	43	19	19	C	C	C
H3	54	19	16	C	R	C
H4	41	3	11	C	O	O
H5	49	27	11	C	R	C
H6	70	35	14	C	C	C
H7	73	5	8	C	O	O
H8	73	35	27	C	R	C
H9	62	27	14	C	O	R
H10	46	38	22	C	C	C
H11	43	8	3	C	O	O
H12	38	5	24	C	O	O

1. Dimension du rayon de la colonie en % de celle observée sur MA avec la souche 74Gn.
2. C, croissance continue ; R, croissance réduite ; O, pas de croissance.

contre, l'addition d'acide folique, présumé également actif d'après le tableau 2.3, n'a que faiblement stimulé la croissance des souches auxotrophes, les thalles demeurant ténus (tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Influence de l'addition de la vitamine B6 ou de l'acide folique sur la croissance radiale de 5 souches monospermes de T. incarnata.

Milieu de culture	MM1	MM4	MM1	MM4	MM1	MM4	PDA
acide folique	-	-	+	+	-	-	-
pyridoxine (vit. B6)	-	-	-	-	+	+	-
<u>Souches de T. incarnata</u>							
74Gn sauvage	1.18 ¹	1.35	1.23	1.43	1.52	1.36	1.93
9P sauvage	1.52	1.53	1.51	1.39	1.53	1.38	1.59
1-3E41 <u>aux</u>	0.00	0.11	0.35	0.33	1.48	1.39	2.18
56Dr3 <u>aux</u>	0.02	0.10	0.34	0.38	0.91	0.60	0.46
6Dr3 <u>fc</u> <u>aux</u>	0.00	0.03	0.41	0.20	1.13	1.11	0.56

1. croissance radiale à 12°C en mm/jour (moyenne de 4 répétitions).

2.3. Coloration des noyaux.

2.3.1. Dans le mycélium.

Un explantat de la souche de T. incarnata à observer est déposée stérilement sur une lame porte-objet sèche ou recouverte d'un film d'eau gélosée. La lame est elle-même placée sur eau gélosée dans une boîte de Petri et incubée à 12°C.

Après que le champignon ait envahi la lame, les techniques de coloration ont été adaptées en fonction du matériel fongique.

Les problèmes majeurs rencontrés au cours des manipulations ont été :

- le décollement variable de la préparation pendant l'hydrolyse et la coloration elle-même (problème non résolu).
- l'altération de la préparation par l'opération de décollodionage (procédé qui a été abandonné).

- la difficulté de mettre en évidence les parois intercellulaires (septa) en même temps que les noyaux: ce problème aurait pu être résolu par une technique de double coloration. En fait, cela s'est avéré inutile pour dénombrer les noyaux par cellule étant donné la répartition homogène de ceux-ci dans les hyphes monocaryotiques d'une part et la présence d'anses d'anastomose dans les hyphes dicaryotiques d'autre part.

2.3.1.1. Coloration au Giemsa (thalles à croissance normale) (fig. 3.7 et 3.12).

- Fixation dans le liquide de Carnoy (3 parts d'éthanol 95% pour une part d'acide acétique glacial) (12 minutes),
- trempage dans l'éthanol 95% (15 minutes),
 - " " " 70% (15 minutes),
 - " " " 50% (15 minutes),
 - rinçage dans l'eau distillée,
 - hydrolyse HCl 1N à 60°C (12 minutes),
 - rinçage dans 5 bains successifs de tampon phosphate (pH 6.9) (mélange à parts égales de 2.8g Na₂HPO₄/litre et de 2.4g KH₂PO₄/litre),
 - coloration dans une solution de Giemsa pendant une nuit (1 ml Giemsa du commerce/15 ml tampon),
 - élimination de l'excès de colorant à l'eau distillée et trempage dans le tampon phosphate,
 - séchage à l'air,
 - montage au baume du Canada et observation.

2.3.1.2. Coloration à l'hématoxyline ferrique de Regaud (Langeron, 1942) des thalles à croissance réduite de type fcb (fig. 3.9 et 3.10).

- Collodionnage dans une solution d'éthanol absolu - éther (1/1) à 1% de nitrocellulose (5 minutes),
- trempage dans l'éthanol à 80% pour durcir le collodion (10 minutes),
- rinçage à l'eau distillée,
- fixation au Helly acétique (15 minutes),
composition du Helly acétique : HgCl₂, 5 g; K₂Cr₂O₇, 2.5 g; H₂O, 100 ml;
solution à laquelle on ajoute au moment de l'emploi 5 ml d'acide acétique glacial et 5 ml de formol (35%),
- rinçage à l'eau courante,
- séchage à l'air chaud,

- hydrolyse HCl 1N à 60°C (1 heure),
- rinçage à l'eau distillée,
 - mordantage à l'alun de Fe (5%) pendant 24 heures,
 - rinçage à l'eau distillée,
 - coloration à l'hématoxyline selon Regaud (24 heures);
composition de la solution d'hématoxyline préparée une dizaine de jours
avant emploi : 10 ml d'une solution alcoolique d'hématoxyline en cristaux
10 ml de glycérine (à 10%)
80 ml d'H₂O.
 - rinçage à l'eau,
 - observation à travers le film de collodion.

Remarque : l'opération de collodionnage provoque dans certains cas la sortie du contenu cellulaire, visible nettement avec les souches fc très pigmentées.

2.3.2. Dans les spores (fig. 3.1) : méthode au Giemsa

Un carpophore jeune est suspendu au dessus d'une lame sèche stérilisée reposant sur un milieu solide d'eau gélosée dans une boîte de Petri incubée à 12°C. Lorsque le carpophore a déchargé ses spores, la lame est séchée à l'air et la sporée est rapidement recouverte par une goutte de collodion.

On effectue ensuite les opérations suivantes :

- trempage dans l'éthanol à 70%,
- fixation dans le liquide de Carnoy (12 minutes),
- trempage dans l'éthanol à 95%,
" " " à 70%,
- rinçage dans l'eau distillée,
- hydrolyse HCl 1N à 60°C (7 minutes),
- rinçage dans l'eau distillée,
- rinçage dans 5 bains successifs de tampon phosphate (pH 6.9),
- coloration dans la solution du Giemsa pendant une demi-journée,
- rinçage dans l'eau puis trempage dans le tampon phosphate,
- observation à travers le film de collodion.

2.4. Essais d'inoculation de l'orge par Typhula incarnata.

Les essais ont été réalisés avec les variétés d'orge d'hiver "Gerbel" ou "Franka". Gerbel était au début de cette décennie la variété la plus

productive en Belgique mais en raison de sa très grande sensibilité à la mosaïque jaune, nous avons eu recours de plus en plus à la variété Franka qui est aujourd'hui une des rares orges du catalogue à présenter une très bonne tolérance à cette virose.

2.4.1. Inoculation en chambre froide.

Les semis ont été réalisés en serre froide dans des pots de terre de 12 cm de diamètre, à raison de 5 graines par pot. Les plantules y ont été élevées pendant environ 3 semaines avant d'être placées en chambre froide entre 0 et 4°C avec 3000 lux de lumière, 8 heures par jour, afin d'induire un durcissement au froid avant leur inoculation par T. incarnata. L'inoculation de la maladie s'est effectuée dans les mêmes conditions de température et de lumière, les pots étant saturés d'humidité. Après une période de temps variable selon les essais, les plantes ont été transférées à l'extérieur pour y effectuer la reprise de leur croissance. En été, une quinzaine de jours ont suffi à mettre en évidence des différences de croissance entre les plantes gravement atteintes par la maladie et celles qui l'étaient moins. Après cette période de récupération, le nombre de tiges par plante survivante et le poids sec des plantes sans les racines ont été mesurés pour rendre compte de l'effet de l'infection sur l'orge.

L'inoculum de T. incarnata se présentait sous forme de mycélium ou de sclérotés.

2.4.1.1. Inoculation par mycélium de T. incarnata

La forme mycélienne de T. incarnata a été produite sur milieu PDA recouvert d'une feuille de cellophane. Au moment de l'inoculation, la pellicule de mycélium a été séparée de son support de cellophane et découpée en bandelettes de 2 cm de long sur 3 à 4 mm de large. Une bandelette a été enroulée autour du collet de chaque plante inoculée et maintenue fermement en contact avec les tissus de la plante par un ruban de coton hydrophile (fig. 2.1). Une couche de coton hydrophile a été disposée entre les plantes inoculées et maintenue humide pendant toute la durée d'incubation en chambre froide.

2.4.1.2. Inoculation par sclérotés de T. incarnata

Les sclérotés ont été produits sur grains d'orge stérilisés dans des bouteilles incubées à l'obscurité pendant deux mois à 12°C et ont été

conservés à sec avant usage. L'inoculation s'est faite par enfouissement de 3 sclérotés au pied de chaque plante.



Figure 2.1 : Réalisation de l'inoculation par mycélium de Typhula incarnata.

2.4.2. Essais au champ.

Plusieurs essais ont été implantés à Jandrain sur une sole en rotation triennale (betterave, froment d'hiver, orge d'hiver). Le semis a été réalisé le 15 octobre 1984 avec des graines de la variété d'orge d'hiver "Franka" désinfectée avec un produit organo-mercurique. La densité du semis à la levée était de 305 plantes/m². Les essais ont bénéficié des mêmes techniques culturales que l'ensemble du champ où ils étaient inclus (chlortoluron en préémergence, diméthoate en automne, 130 unités d'azote fractionnées en 0/60/30/40, propiconazol-chlorothalonil (1/1) + éthéphon au stade barbes).

L'inoculation a été effectuée par épandage de sclérotés sur des segments de ligne de culture préalablement délimités à l'intérieur de certains périmètres. La conception particulière des différents essais sera précisée lors de leur présentation.

2.5. Analyse des sucres solubles dans les plantes d'orge.

2.5.1. Préparation des échantillons de plantes.

Soigneusement lavées, les talles feuillées sont séparées de leurs racines de façon à obtenir un lot de feuilles + collets et un lot de racines. Ce matériel végétal est conservé plusieurs mois au congélateur puis lyophilisé avant d'être broyé finement dans un moulin IKA (A10) avec une charge en talc lorsque le volume de matière est trop faible.

Une prise d'essai d'environ 200 mg de matière sèche (MS)/échantillon est mise en suspension dans 15 ml d'eau pour HPLC. Les sucres solubles sont extraits par agitation pendant 3 x 30 minutes. Après chaque extraction, la suspension est centrifugée pendant 15 minutes à 13640 g, le surnageant filtré sur filtre plat (ϕ 125 mm, Schleicher et Schüll 589[®]) et le culot remis en suspension dans 15 ml d'eau.

Le produit des 3 extractions est réduit par lyophilisation de façon à obtenir un résidu sec qui est conservé au congélateur avant analyse.

2.5.2. Analyse HPLC. (High Pressure Liquid chromatography).

Le résidu lyophilisé est récupéré par 5 ml d'une solution aqueuse contenant l'étalon interne (8 mgr/ml d'acide lactique). Cette solution est filtrée sur membrane "millex" (0,45 μ) avant d'être injectée dans le chromatographe à raison de 20 μ l/dose.

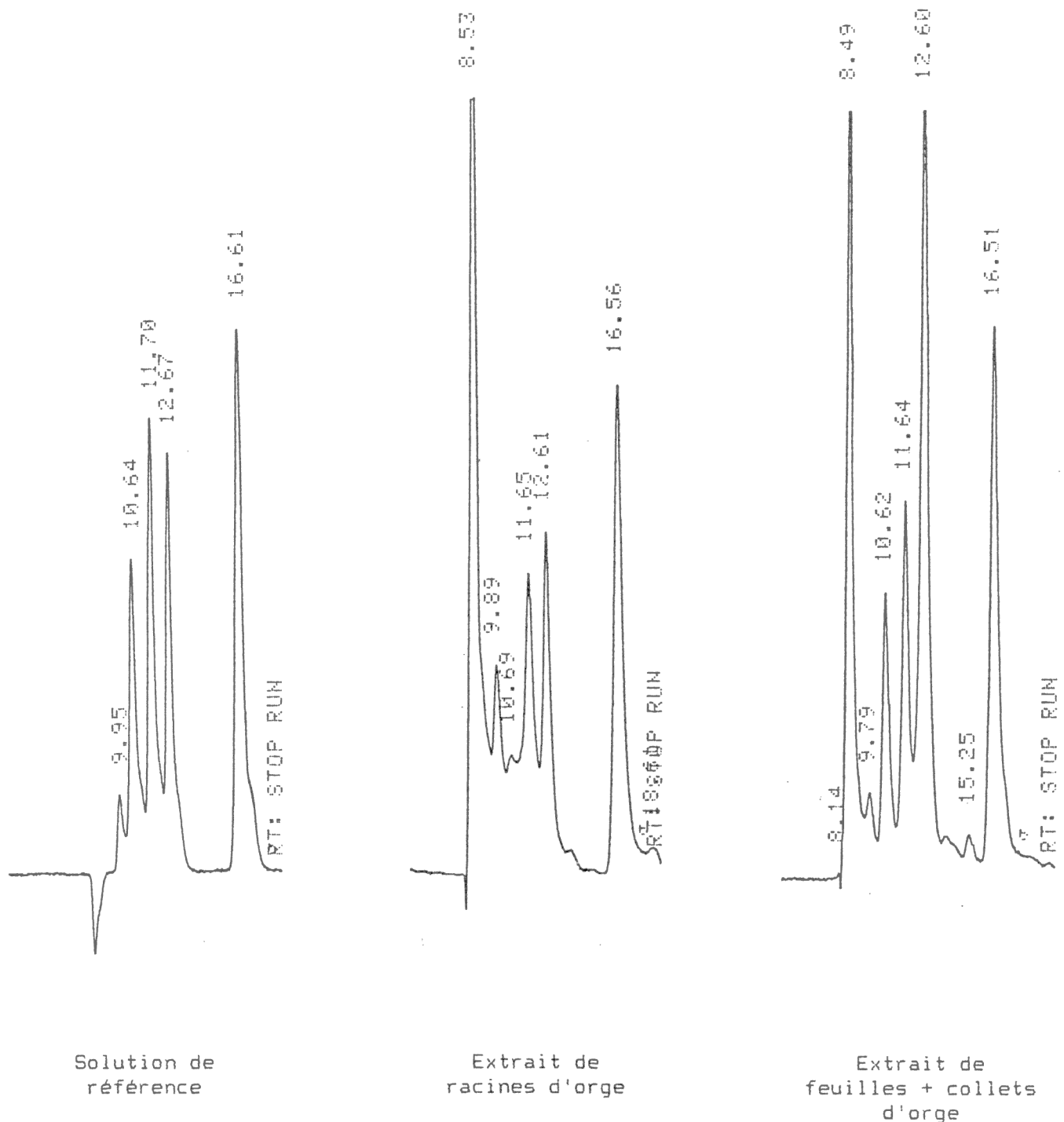
Le chromatographe HPLC Hewlett Packard 1090 est équipé :

- d'un détecteur différentiel à indice de réfraction R401 Waters (Millipore)
- d'une colonne aminex HPX 87H (Biorad), ϕ intérieur 4 mm, longueur 300 mm.

Les conditions de travail sont : solvant, H₂SO₄ 0.01N; flux, 0.45ml/min; pression, 50 bars; t° colonne, 45°C.; temps maximum, 22'.

La figure 2.2 présente un exemple de chromatogramme HPLC d'un extrait aqueux de feuilles d'orge. Le premier pic venant après le solvant est celui du saccharose, séparé des pics du glucose et du fructose par un pic non identifié.

Bien que le temps de rétention de la substance non identifiée correspond à celui de l'acide citrique, la présence d'une concentration relativement importante de cette substance demandait confirmation via d'autres méthodes d'analyse.



Solution de
référence

Extrait de
racines d'orge

Extrait de
feuilles + collets
d'orge

Figure 2.2 : Exemple de chromatogrammes HPLC (indice de réfraction) montrant la position respective des pics du saccharose (9.8-9.9), de la substance indéterminée (10.6-10.7), du glucose (11.6-11.7), du fructose (12.6-12.7) et de l'étalon interne (acide lactique; 16.5-16.6).

2.5.3. Essai d'identification de l'acide citrique et confirmation de la présence de fructose et de glucose.

a) Au détecteur UV, l'absorbance de l'acide citrique est maximale à 207 nm pour une solution pure d'acide citrique, de fructose et de glucose (fig. 2.3). Par ailleurs, la substance indéterminée dans l'échantillon a une absorbance maximale à 201 nm (fig. 2.4). En fortifiant l'échantillon avec de l'acide citrique, on observe un décalage important des spectres obtenus à partir des différentes fractions du pic non identifié (fig. 2.5) alors que ces spectres se superposent relativement bien lorsque l'échantillon n'est pas fortifié (fig. 2.6). L'analyse au détecteur UV des différentes fractions recueillies par HPLC ne permet donc pas d'identifier formellement l'acide citrique (Baquet, communication personnelle).

b) Quelques échantillons ont été silylés et analysés en chromatographie gazeuse sur une colonne pleine (pyridine comme solvant). Le chromatogramme obtenu comporte peu de pics : le premier pic se situe exactement entre celui du fructose et du mannose; viennent ensuite le pic de l' α glucose et celui du β glucose, un pic correspondant à l'inositol et le pic du saccharose (Wathelet, communication personnelle).

c) Ces mêmes échantillons entraînés par de l'hélium dans une colonne capillaire de 50 m CP-Sil 5CB (ϕ 0.32 mm; P = 0.85 Bar; 39°C/min entre 100 et 140°C, 5°C/min entre 140 et 300°C) présentent un spectre beaucoup plus complexe (fig.2.7) que l'on peut décrire comme suit (Marlier, communication personnelle)

- une succession de pics comprenant notamment des dérivés silylés d'acides gras,
- un grand pic précédant de près les pics du fructose,
- les deux pics de l' α et du β glucose,
- deux autres pics relativement importants dont le premier serait celui de l'inositol.

Le spectre de masse du pic qui se présente juste avant ceux du fructose correspond, d'après le catalogue, à celui de l'acide citrique. La spectrographie de masse de la substance non identifiée par HPLC mais isolée par cette méthode, montre qu'il ne s'agit pas d'un produit pur et que l'acide citrique n'est présent qu'en de très faibles quantités, confirmant l'analyse UV en HPLC (Marlier, communication personnelle).

Le fructose présente 5 pics distincts, le spectre de masse du 5ème pic du fructose (f_5) est pollué par le pic de l' α glucose (g_1).

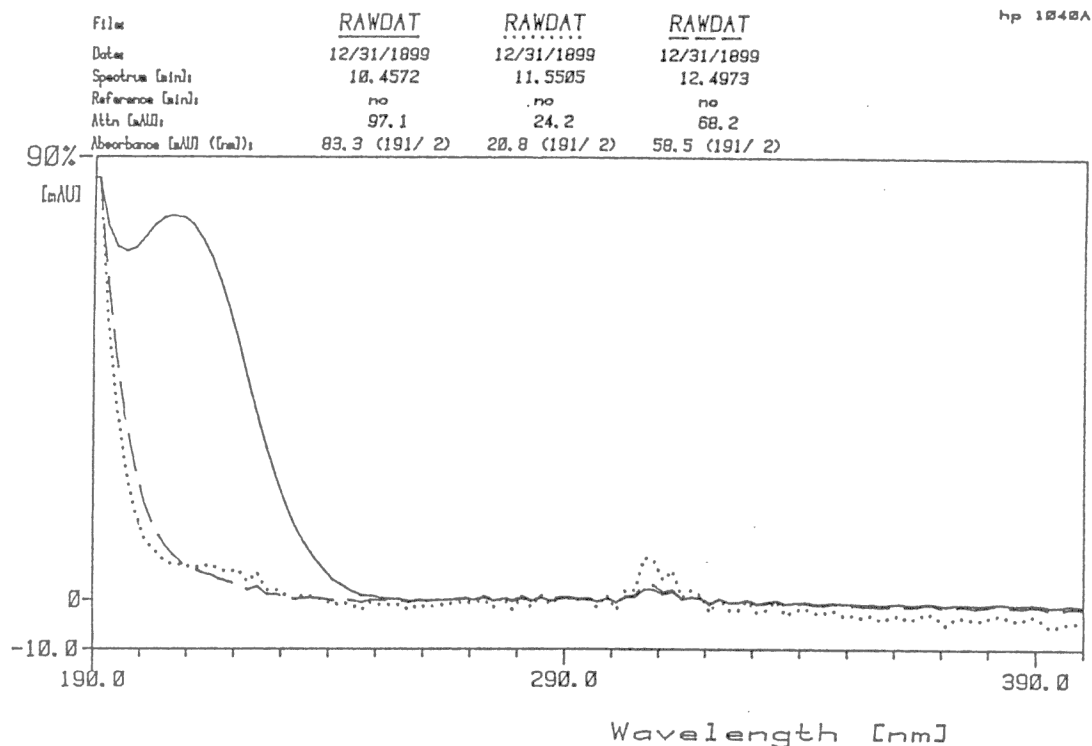


Figure 2.3 : Spectre UV de différentes fractions recueillies par HPLC (solution pure d'acide citrique + glucose + fructose)
Temps de rétention de l'acide citrique ,10.45 ; du glucose, 11.55
du fructose, 12.49.

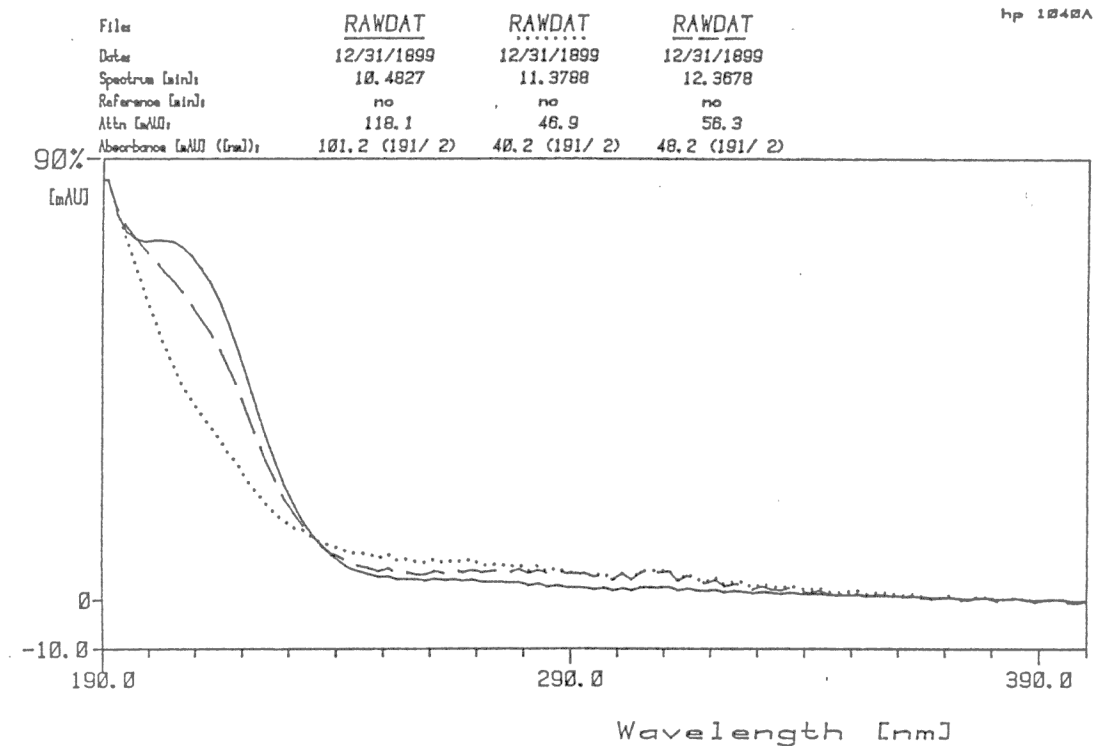


Figure 2.4 : Spectre UV des fractions recueillies par HPLC (échantillon de feuilles d'orge) : substance indéterminée (temps de rétention 10.48), glucose (t.r. 11.37), fructose (t.r. 12.36).

File	RAWDAT	RAWDAT	RAWDAT
Date	12/31/1899	12/31/1899	12/31/1899
Spectrum [in]	10.4725	10.3605	10.5663
Reference [in]	no	no	no
Attn [mAU]	63.5	26.5	30.2
Absorbance [mAU] (nm)	54.4 (101/ 2)	22.7 (101/ 2)	25.9 (101/ 2)

hp 1040A

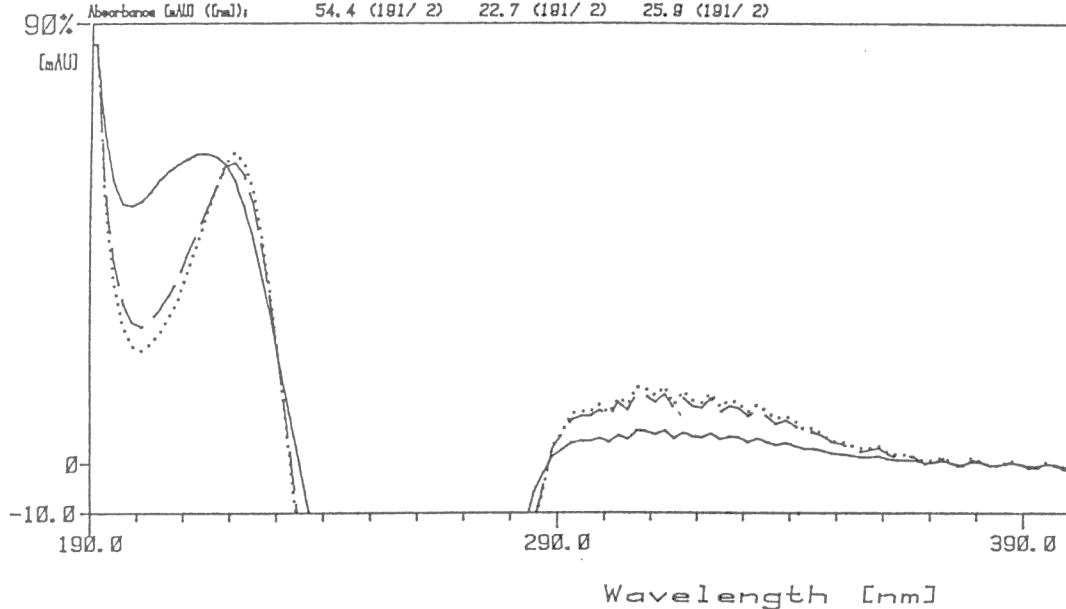


Figure 2.5 : Spectre UV de la fraction correspondant à la substance indéterminée de l'extrait de feuilles d'orge fortifié avec de l'acide citrique et recueillie par HPLC.
 Sommet du pic : temps de rétention, 10.47
 Dans la partie ascendante du pic : t.r. 10.36
 Dans la partie descendante du pic : t.r. 10.56

File	RAWDAT	RAWDAT	RAWDAT
Date	12/31/1899	12/31/1899	12/31/1899
Spectrum [in]	10.4867	10.3930	10.5797
Reference [in]	no	no	no
Attn [mAU]	102.1	86.4	76.8
Absorbance [mAU] (nm)	87.5 (101/ 2)	74.1 (101/ 2)	65.8 (101/ 2)

hp 1040A

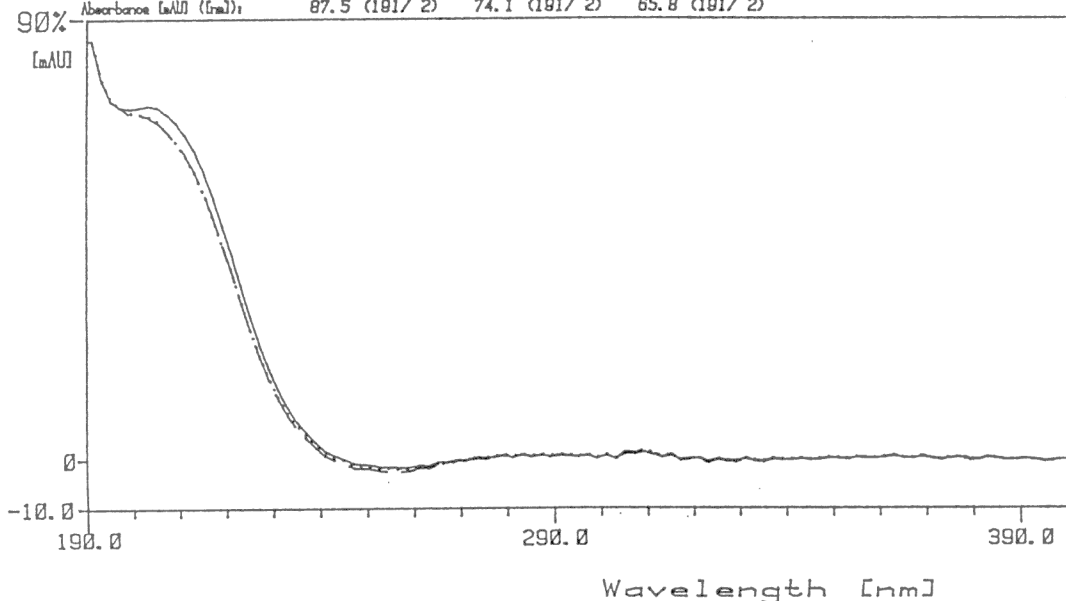


Figure 2.6 : Spectre UV de la fraction correspondant à la substance indéterminée de l'extrait de feuilles d'orge recueillie par HPLC.
 Sommet du pic : temps de rétention, 10.48
 Partie ascendante du pic : t.r. 10.39
 Partie descendante du pic : t.r. 10.57

Le pic du β glucose (g_2) est pur : son spectre de masse est identique à celui de l' α glucose, ainsi qu'à celui du mannose. Pour ces 3 sucres, seuls les temps de rétention diffèrent. Il n'y a aucune trace de mannose dans les échantillons, ce qui confirme l'analyse HPLC.

En résumé, la séparation des sucres solubles par la méthode HPLC est meilleure que celle obtenue en chromatographie gazeuse où, sur la colonne pleine, le fructose est associé à une substance composite et où, sur la colonne capillaire, le fructose est mélangé à l' α glucose.

En HPLC au contraire, l' α et le β glucose présentent le même temps de rétention, passant 1 minute avant le fructose et 1 minute après la substance indéterminée.

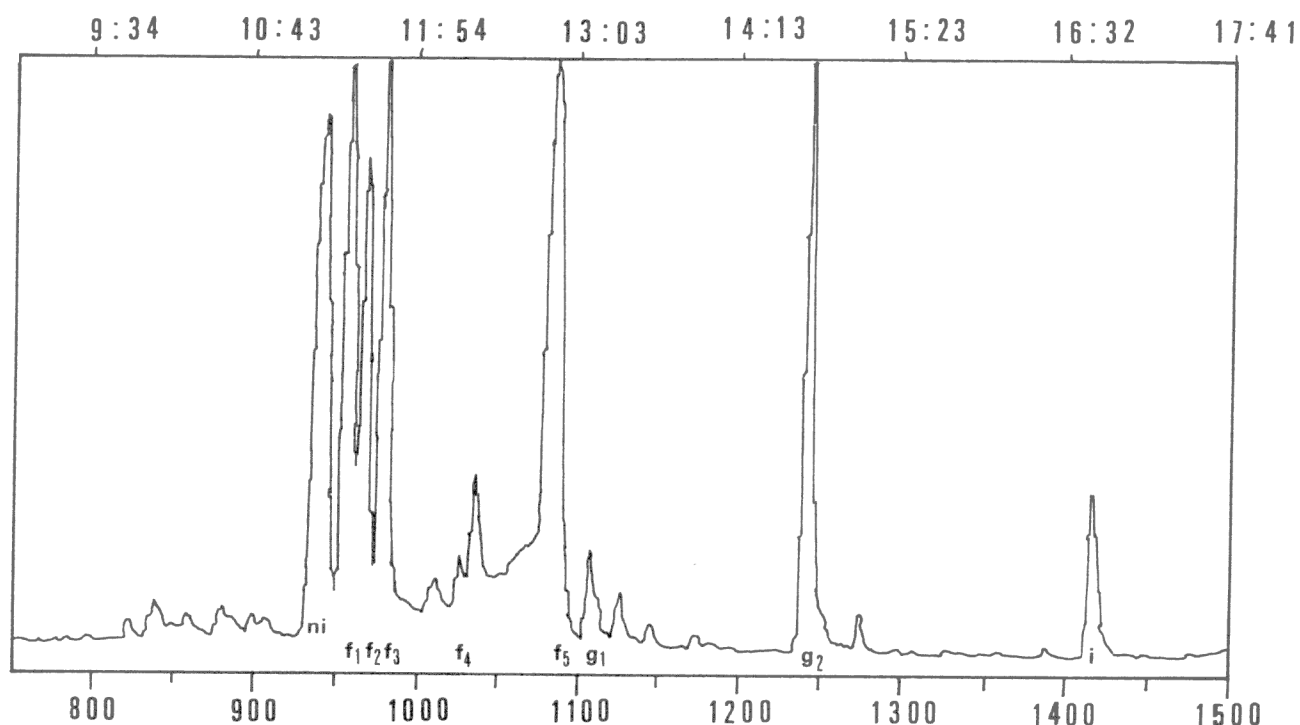


Figure 2.7 : Résultats de la chromatographie en phase gazeuse d'un extrait de feuilles d'orge : la spectrographie de masse a permis de confirmer la présence de fructose (f_1 , f_2 , f_3 , f_4 , f_5), de glucose (g_1 , g_2) et d'inositol (i). Une substance non identifiée présente un pic intense (ni) peu avant le passage du fructose. Par ailleurs, la spectrographie de masse révèle aussi que le pic f_5 est pollué par le pic g_1 .

CHAPITRE 3

ANALYSE DESCRIPTIVE DE TYPHULA INCARNATA.

3.1. Systématique et morphologie.

Typhula incarnata Lasch ex Fries est un homobasidiomycète de la classe des aphylophorales et de la famille des clavariacées. Il a été classé par Fries (1818) dans le genre Typhula et par Berthier (1976) dans le sous-genre Microtyphula (type : T. erythropus Fries) qui regroupe les espèces possédant un carpophore avec une clavule plus ou moins distincte d'un stipe long, pourvues d'un sclérote non gélifié (sauf précisément chez T. incarnata où un mince gel imprègne la bordure du sclérote) à épidermoïde normal superficiel (T. incarnata) ou avec cutis. T. incarnata possède un stipe pourvu d'une écorce épaisse, très peu gélifiée. Les spores sont ellipsoïdes (fig. 3.1) et faiblement amyloïdes (Berthier, 1976).

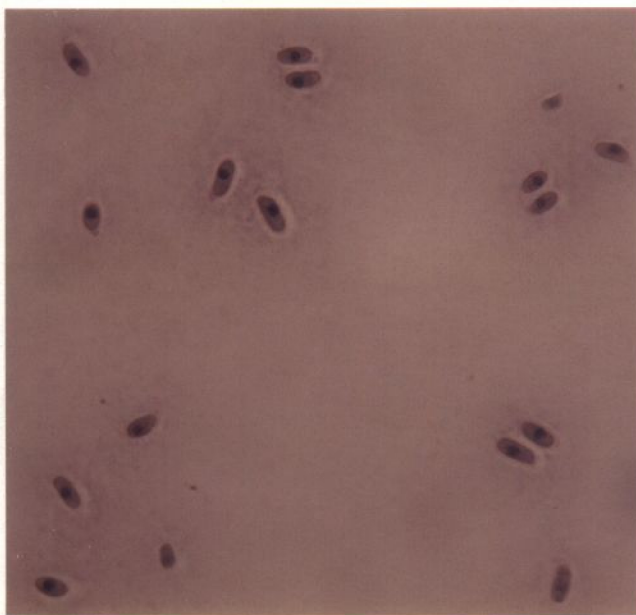


Figure 3.1 : Basidiospores de Typhula incarnata :
coloration des noyaux au giemsa. (x 600)

La morphologie du sclérote représente un critère taxonomique intéressant. L'épidermoïde est dit normal quand il est constitué par l'extrémité des hyphes internes du sclérote et recouvert d'une cuticule amorphe et colorée (Berthier, 1976). La surface du sclérote de T. incarnata observée par transmission à travers un scalp, présente des cellules lobées (fig. 3.2 : sclérote naturel) ou des protubérances cuticulaires digitées (Remsberg, 1940) (fig. 3.2 : sclérote artificiel) semblables à celles décrites par Berthier (1976) pour T. variabilis.

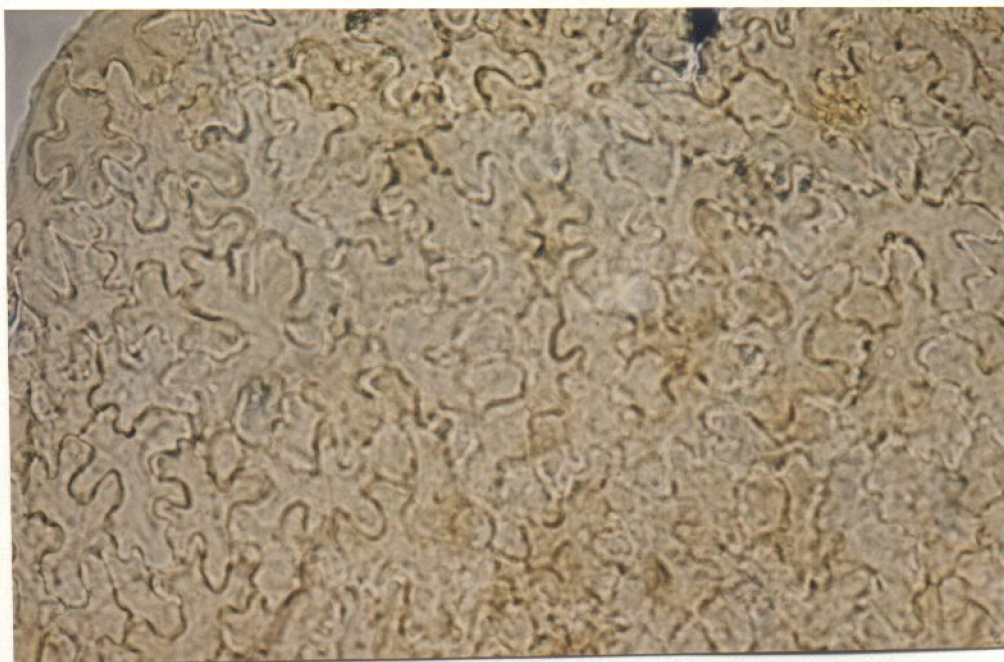
Le carpophore est toujours issu d'un sclérote brun-rougeâtre (fig.3.3A). Selon sa taille (0.5 - 5 mm de diamètre) et la profondeur d'enfouissement, le sclérote donne naissance à un ou plusieurs carpophores. Translucide et recouvert de minuscules poils (fig. 3.3B), le stipe du carpophore est formé d'un cordon d'hyphes dressés, parallèles et peu ramifiés (Corner, 1950). Le stipe est surmonté d'une clavule généralement cylindrique, rose clair en conditions humides, rose vif en atmosphère relativement sèche (fig. 3.3C). Celle-ci se présente comme la prolongation du cordon d'hyphes du stipe dont la croissance longitudinale s'est arrêtée et dont les extrémités perpendiculaires à son axe forment l'assise hyméniale donnant naissance aux basides (Corner, 1950).

La formation de la clavule est induite par l'exposition du stipe à des rayons ultraviolets proches (Lehmann, 1965a) et ne peut donc pas survenir dans le sol. La clavule se forme à une distance variable du sclérote qui dépend du trajet parcouru par le stipe jusqu'à la lumière. Les plus grands carpophores que nous ayons trouvés mesuraient 3 cm de longueur (fig. 3.4A).

Exposé à la pleine lumière, le sclérote en germination à la surface du sol produit un stipe très court (fig. 3.4B). Sous une culture dérobée de vesces, l'ensemble du carpophore apparaît blanchâtre (par manque de lumière) bien que la clavule soit fertile (Cavelier, 1986a). Sous la neige, les clavules sont aplaties et longuement ellipsoïdes. A partir de sclérotés produits sur grains d'orge stérilisés, les carpophores apparaissent parfois comme des excroissances digitées (fig. 3.4C). Dans tous les cas, les clavules sont fertiles, même au niveau de leur partie apicale; elles peuvent produire des spores plusieurs jours durant.

La morphologie de T. incarnata est comparable à celle d'une espèce voisine que nous avons identifiée sur feuilles pourrissantes de Prunus avium. Contrairement à T. incarnata, les sclérotés de cette espèce possèdent un épidermoïde inversé (c'est-à-dire composé d'une assise de cellules distinctes des hyphes internes du sclérote) surmonté d'un cutis orné de ponctuations (fig. 3.5A). La germination "in vitro" de ces sclérotés donnent naissance à des hyphes sans boucle et à des carpophores blancs qui ne nécessitent pas

A.



B.

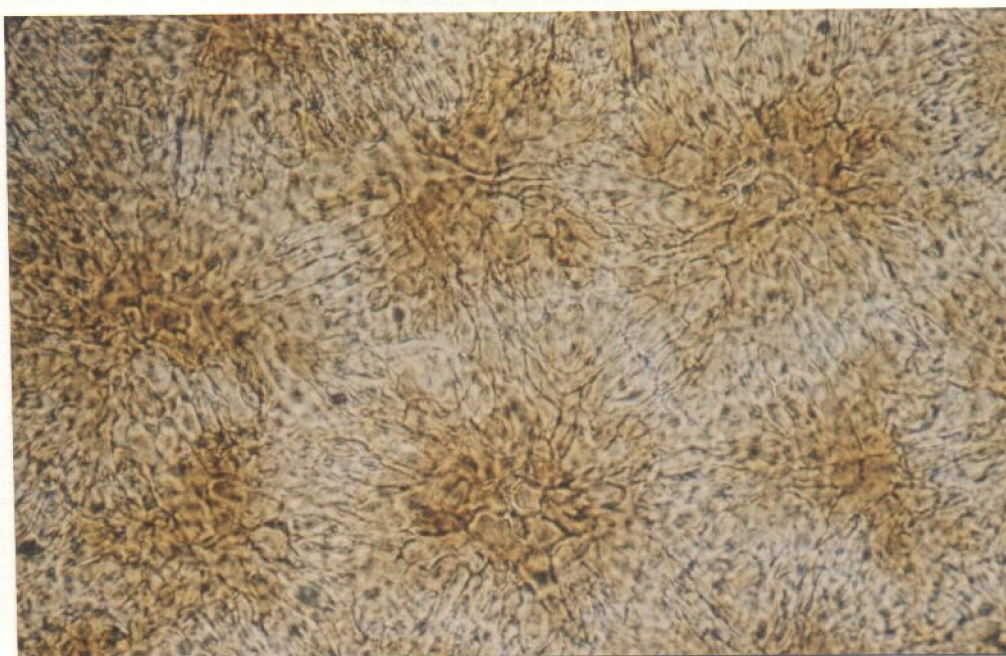


Figure 3.2 : Détail de la surface de sclérotés de Typhula incarnata observée en lumière transmise à travers l'épidermoïde. (x 750)

- A. Cellules lobées à la surface d'un sclérote formé sur une plante d'orge.
- B. Cellules digitées en étoiles à la surface d'un sclérote obtenu sur grain d'orge stérilisé.

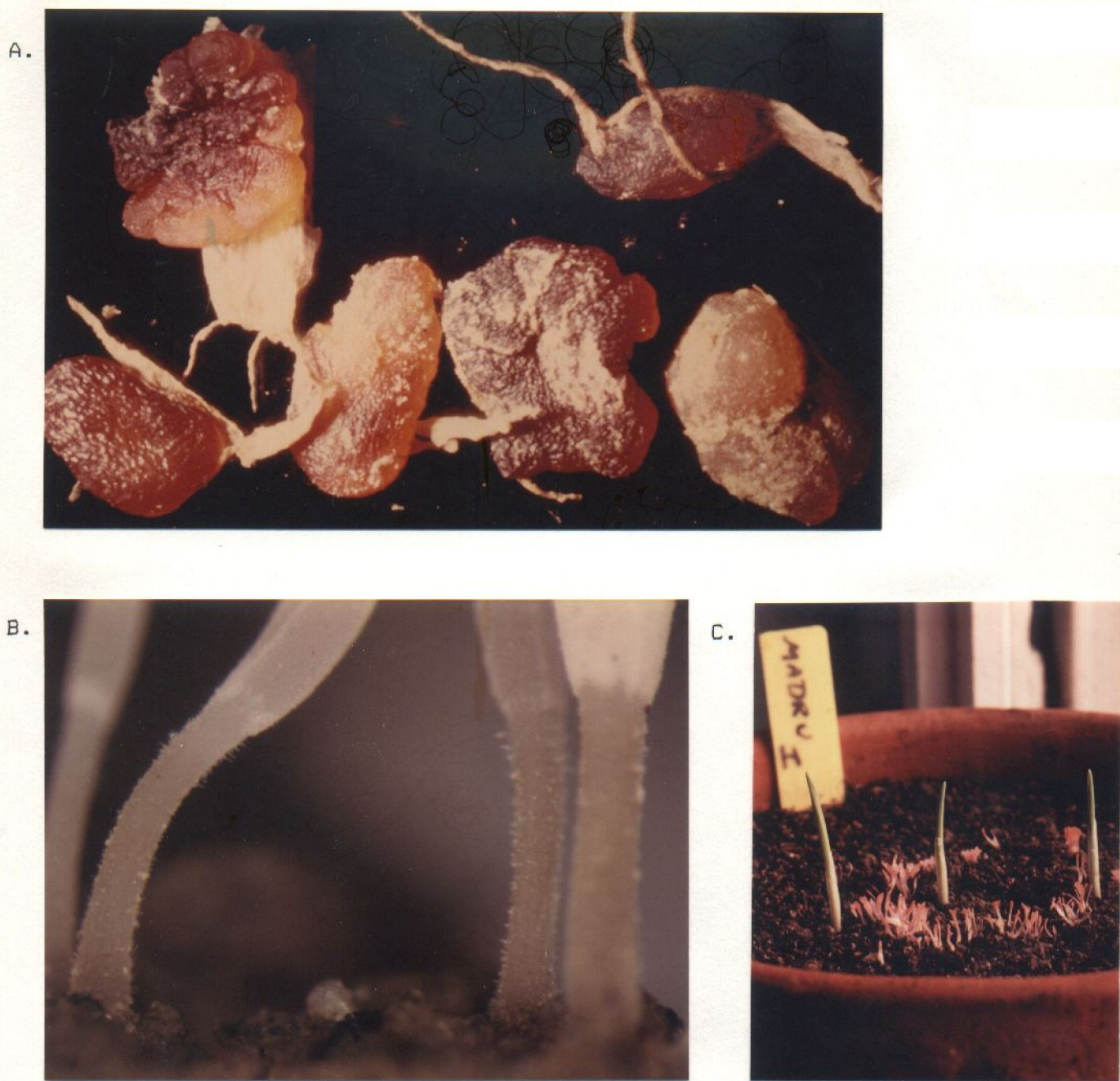


Figure 3.3 :

- A. Sclérotés de *Typhula incarnata* où adhèrent encore des fragments de tissus de l'hôte (photo G. Parmentier).
- B. Vue très agrandie (comparer avec la photo de droite) montrant les stipes translucides des carpophores, couverts de poils courts.
- C. Carpophores de *T. incarnata* dont la couleur des clavules est à l'origine du nom de l'espèce (la germination des sclérotés est indépendante de la germination de l'orge).

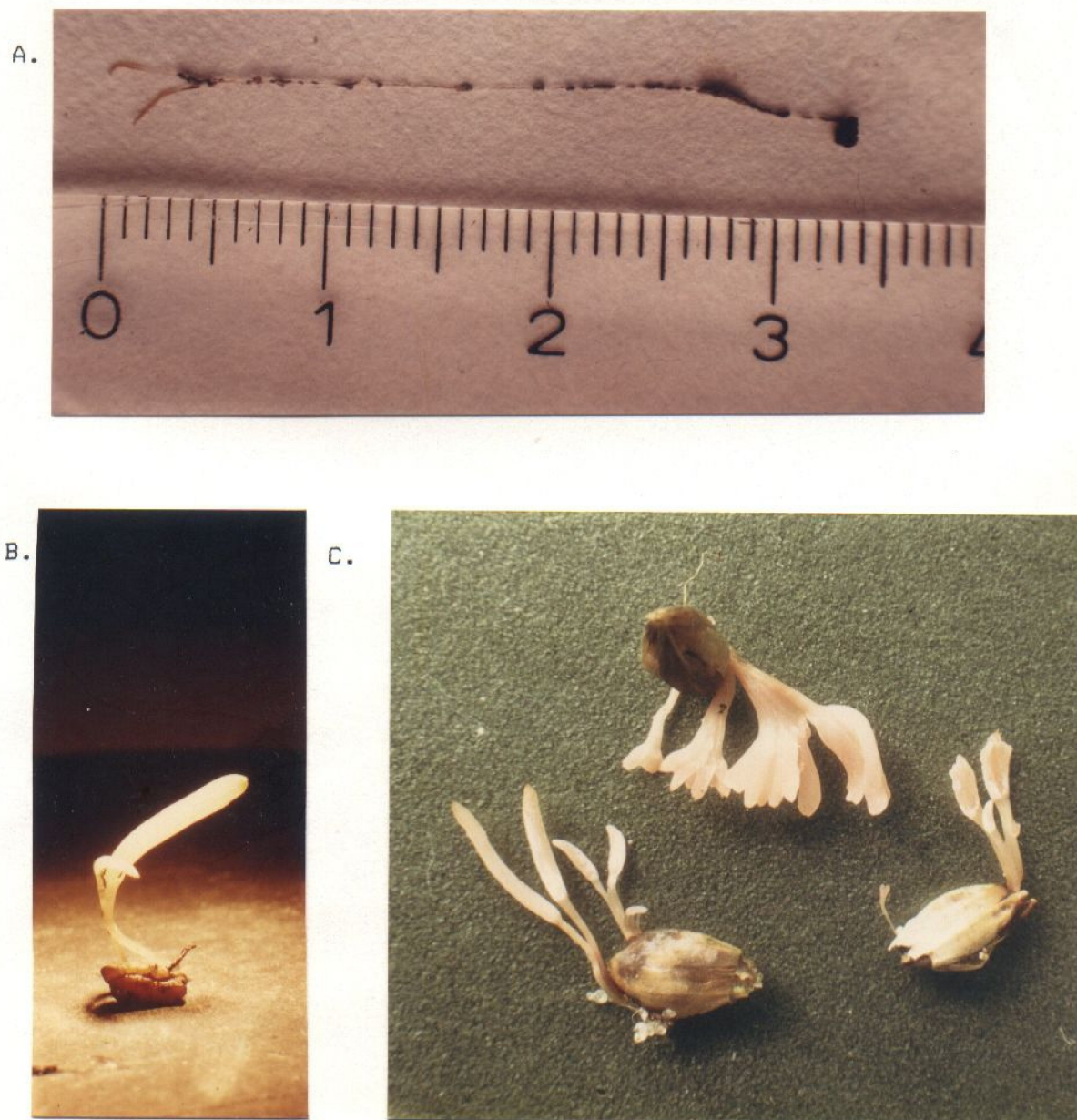


Figure 3.4 : A. Carpophores de *Typhula incarnata* possédant deux stipes soudés de grande taille ayant traversé 3 cm de terre arable avant d'avoir été exposés à la lumière nécessaire à l'induction de la formation des clavules.

B. Résultat de la germination d'un sclérote à la surface du sol (stipes courts).

C. Formes variées du carpophore de *Typhula incarnata* produites sur grains d'orge stérilisés.

d'exposition aux ultraviolets pour devenir fertiles (fig. 3.5B). D'après Berthier (1979), cette espèce, probablement parthénogénétique, serait apparentée à T. setipes classée par Berthier (1976) dans le sous-genre Cnazonaria.

3.2. Examen microscopique des thalles, comportement nucléaire et morphogénèse.

Les hyphes du mycélium primaire sont issus des basidiospores à partir de 1 ou 2 points germinatifs (fig. 3.6). Les articles sont mononucléés et ne présentent pas d'anse d'anastomose (fig. 3.7). Certaines souches monospermes présentent une morphologie particulière (fig. 3.8) que nous avons désignée sous l'abréviation fc_b (forme culturale brune) (Cavelier, 1982a, 1985). Les cellules des hyphes de ces colonies sont beaucoup plus courtes que celles des colonies de type sauvage (fig. 3.9). L'abondance de pigments dans le cytoplasme empêche bien souvent la révélation des noyaux par les techniques de coloration (fig. 3.10).

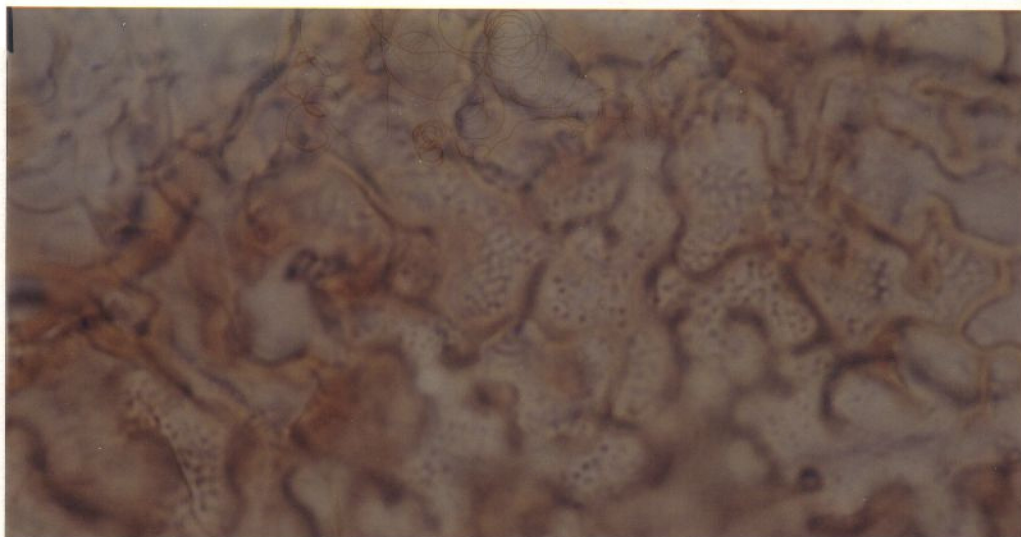
Chez certaines souches fc_b, on observe la formation de conidies produites peu après la germination de la basidiospore par des phialides simples peu différenciées (fig. 3.11A), ou sur un thalle plus développé, à l'extrémité d'hyphes minces, ramifiés ou soudés dans un gel qui prend intensément le bleu coton ou le Giemsa (fig. 3.11B). Les conidies en suspension ne germent pas, mais de nombreux points de croissance naissent à partir des fragments d'hyphes très fragiles qui se détachent des thalles au moment de leur immersion dans l'eau.

Typhula incarnata est une espèce hétérothalle, c'est-à-dire que deux thalles différents ne peuvent se croiser qu'à condition de ne posséder aucun allèle d'incompatibilité en commun, on dit alors que le croisement est compatible; dans le cas contraire, le croisement est incompatible ou illégitime. La compatibilité d'un croisement entraîne la formation d'un dicaryon composé de cellules binucléées (fig. 3.12) où chaque paire de noyaux est formée par l'association de deux noyaux d'origine différente en provenance de chacun des parents. Le mycélium dicaryotique ou mycélium secondaire (par rapport au mycélium primaire monocaryotique) est pourvu d'anses d'anastomose qui sont le siège de la division d'un des deux noyaux (Kühner, 1976) (fig. 3.13).

Les hyphes dicaryotiques résultent donc d'un croisement compatible entre deux thalles monocaryotiques (croisement mono-mono), entre deux dicaryons (croisement di - di) ou entre un dicaryon et un monocaryon (croisement di-mono).

L'hétérothallie est tétrapolaire parce qu'elle est basée sur un système d'incompatibilité à deux facteurs (A et B), lesquels se trouvent sur des

A.



B.



Figure 3.5 :

- A. Détail de la surface du sclérote d'un Typhula apparenté à T.setipes montrant l'ornementation typique (ponctuations) du cutis de l'épidermoïde qui est dit "inversé" chez cette espèce. (x 750)
- B. Carpophores de la même espèce se formant in vitro à partir des sclérotés d'une colonie mère. Une colonie fille (à droite de la photo) se développe à partir des basidiospores d'une sporée d'un des carpophores.



Figure 3.6 :

Germination
de basidiospores
de Typhula incarnata
(x 300)

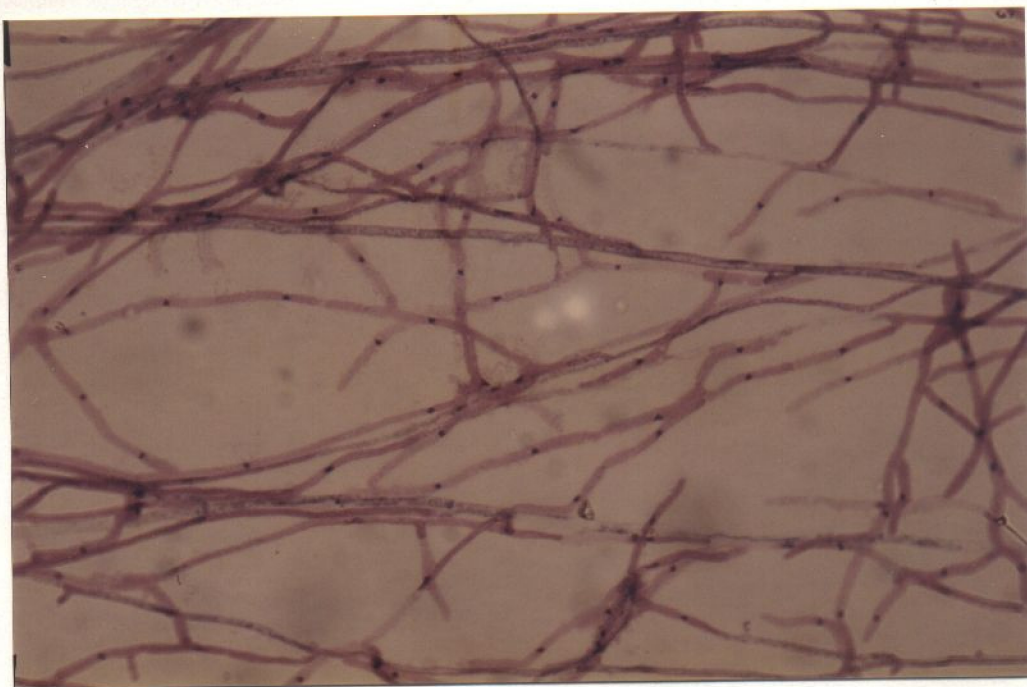


Figure 3.7 : Thalle monokaryotique de la souche 74Gn :
coloration des noyaux au giemsa. (x 400)



Figure 3.8 : Aspect sur milieu V8 de deux colonies monocaryotiques de *Typhula incarnata*
 - à gauche : colonie de type fcb
 - à droite : colonie de type normal

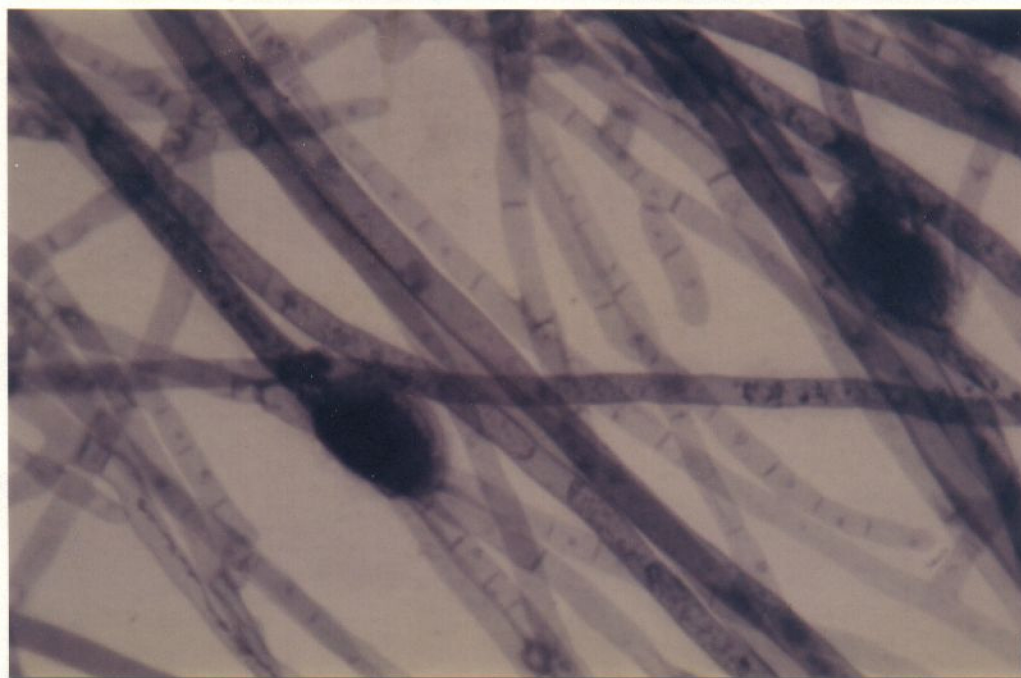


Figure 3.9 : Thalle monocaryotique de la souche fcb 4CH4 :
 les noyaux et les parois des articles courts
 sont bien visibles (coloration à l'hématoxyline)
 (x 1000)

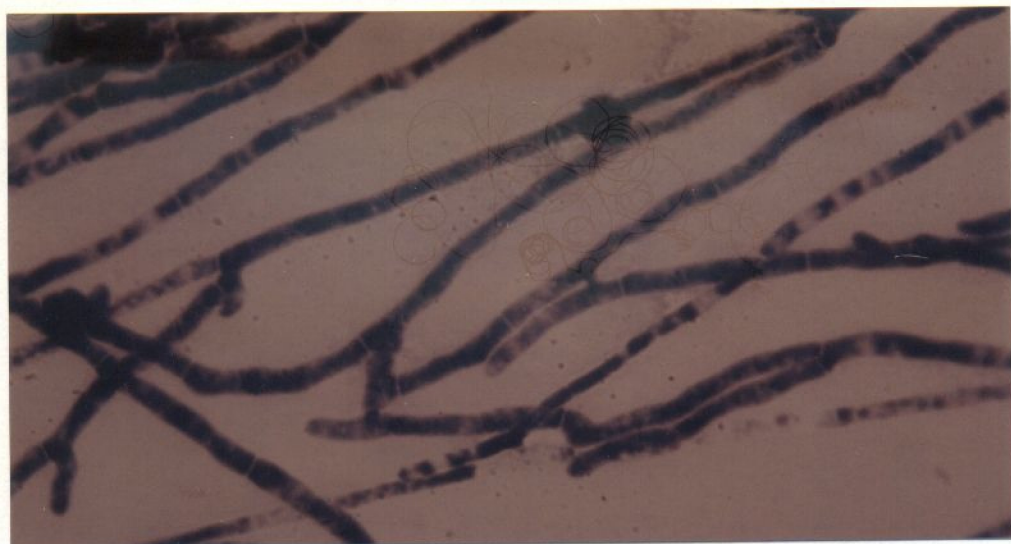


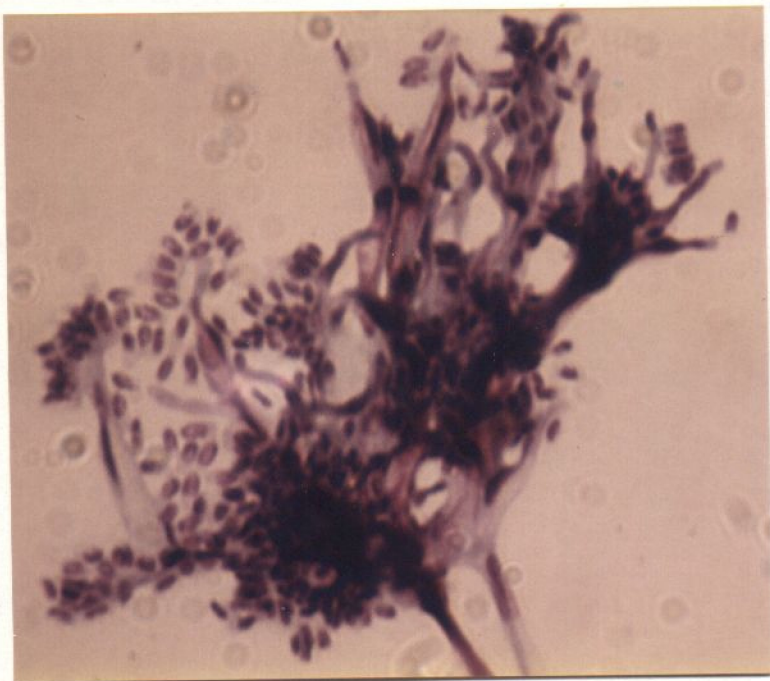
Figure 3.10 : Thalle monocaryotique de la souche fcb 16-3C10 : parois claires et cytoplasme très pigmenté (x 750) (même technique de coloration que dans la figure 3.9)



A.

Figure 3.11 :

- A. Hyphe primaire issu de la germination d'une basidiospor et producteur de conidies.
- B. Structure d'hyphes en bouque producteur de conidies (souche 16-3C10) : coloration au giemsa. (x600)



B.



Figure 3.12 : Thalle dicaryotique de la souche (9P x 59G) (X 300)



Figure 3.13 : Détail des hyphes de la souche (9P x 59G)
au contraste interférentiel : pont d'anastomose
et anses d'anastomose. (X 1250)

chromosomes différents et comportent des allèles multiples (Raper, 1978). Après la fusion des deux noyaux hétérocaryotiques dans la baside (A1B1 + A2B2 par exemple), les facteurs d'incompatibilité ségrègent indépendamment à la méiose pour produire quatre types de spores dont deux sont les types parentaux (A1B1) et (A2B2), et deux sont les types dérivés (A1B2) et (A2B1) (Bruehl et Machtmes, 1978; Cavelier et Auquier, 1980).

Chez *T. incarnata*, la désignation du facteur A par rapport au facteur B est arbitraire car leur rôle spécifique n'a pas pu être déterminé. Cela vient du fait qu'aucun hétérocaryon hémicompatible A ou B n'a jamais encore pu être isolé et observé de façon durable.

Si on admet qu'il y a des similitudes entre les systèmes d'incompatibilité de certaines espèces tétrapolaires, on peut supposer, par analogie avec celui de *Schizophyllum commune*, que la migration nucléaire est induite par une différence allélique du facteur B, tandis que l'apparition des noyaux et la formation de l'anse, la division conjuguée des noyaux et la formation de la paroi de l'anse sont induits par des allèles A différents. Chez cette dernière espèce, la fusion de l'anse avec la cellule voisine n'est possible que si non seulement les allèles A mais également les allèles B diffèrent entre eux (Raper, 1978).

Plusieurs modèles moléculaires ont été proposés pour rendre compte du mode de fonctionnement des allèles d'incompatibilité dans le contrôle de la morphogénèse sexuée chez les basidiomycètes.

Nous exposons brièvement les deux modèles principaux (selon Raper, 1978) se rapportant à l'allèle B β . Le modèle de Kuhn - Parag (1972) suppose que la reconnaissance de soi (versus non-soi) résulterait de la capacité de certaines protéines à interagir dans le cytoplasme pour former des agrégats qui seraient actifs dans la régulation de la morphogénèse. Des sous-unités identiques ne formeraient pas d'agrégats actifs, contrairement aux non-identiques. Dans un homocaryon, la présence d'un seul allèle induirait le codage d'un seul type de sous-unités protéiniques. Des sous-unités différentes mais étroitement apparentées, seraient donc codées par des allèles différents. Kuhn et Parag (1972) supposent un nombre limité de sites de reconnaissance dans les sous-unités protéiniques. Une différence au niveau d'un seul site pourrait rendre l'agrégation effective. Les produits des gènes seraient supposés actifs à l'état hétéroallélique.

Le modèle d'Ullrich (Raper, 1978) se fonde sur la complémentarité des bases de deux brins d'acide nucléique pour expliquer le phénomène de reconnaissance. Il suppose la division du locus d'incompatibilité en deux zones : une région spécifique (S) pour les interactions de reconnaissance de soi versus non soi, et une région fonctionnelle (F) responsable de la synthèse des molécules de régulation de la morphogénèse. La région F serait la même pour tous les allèles du locus considéré alors que la région S serait variable. Le modèle suppose que les deux chromatides du locus entier sont copiées et que les produits de ces deux brins migrent séparément hors du noyau à travers le cytoplasme vers un site où ils se recombineraient. Les produits d'allèles identiques seraient tout à fait complémentaires et se recombineraient en tout point pour former des homoduplex, alors que les produits d'allèles non identiques qui seraient complémentaires dans la région F, mais pas dans la région S, formeraient des hétéroduplex. Cette forme d'hétéroduplex serait la configuration active qui promouvrait la synthèse des molécules de régulation codées dans la région F. La région S fonctionnerait donc comme un commutateur moléculaire induisant des configurations actives (hétéroduplex) ou inactives (homoduplex) sur le plan de la morphogénèse.

Sans entrer dans le détail de la discussion menée par Raper (1978) à propos du mérite respectif de ces modèles, relevons que le modèle d'Ullrich (1973) paraît plus réaliste dans la mesure où il rend mieux compte du fait que les produits de nombreux allèles différents doivent interagir pour produire un effet identique (l'induction de la morphogénèse) sans qu'il y ait un effet de complémentation entre eux.

3.3. Croissance de Typhula incarnata in vitro.

Typhula incarnata est un champignon psychrophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 8 et 16°C pour les dicaryons (fig. 3.14) et entre 6 et 10°C pour les monocaryons (fig. 3.15). En ce qui concerne les dicaryons, cette gamme de variation de l'optimum thermique correspond à celle observée par plusieurs chercheurs cités par Lehmann (1965a), Lehmann lui-même et Maraitte et al. (1981). Une température optimale de croissance des monocaryons distincte de celle des dicaryons n'avait jamais été signalée. Cette différence de comportement est peut-être liée à l'origine des souches choisies pour cette expérimentation.

La température maximale de croissance de T. incarnata se situe vers 22°C, les températures supramaximales n'étant pas immédiatement léthales. Avant la reprise de la croissance lors du transfert des colonies à 10°C, on observe une

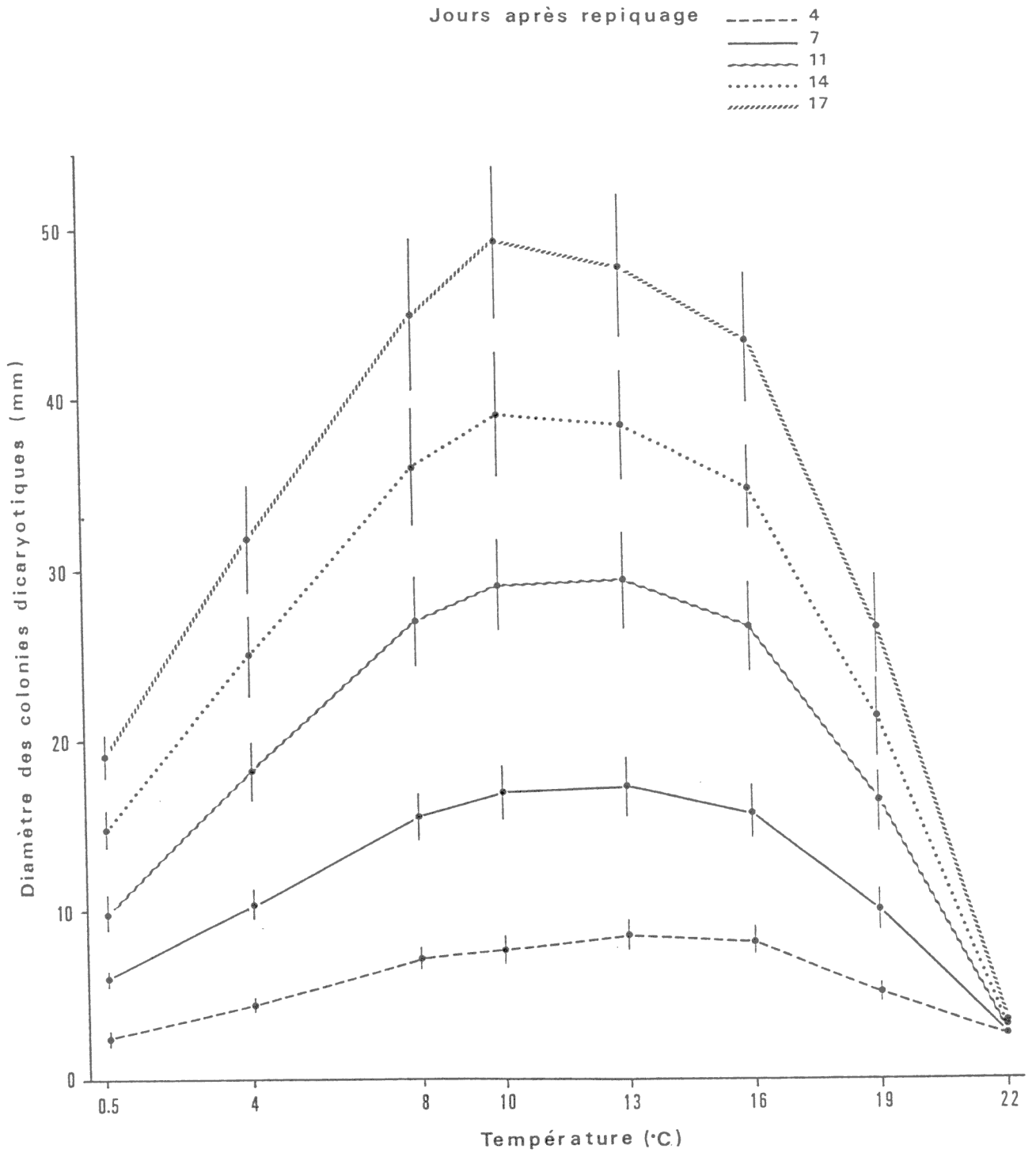


Figure 3.14 : Croissance moyenne de 21 dicaryons en fonction de la température sur milieu PDA (les intervalles sont calculés pour un degré de confiance de 95 %).

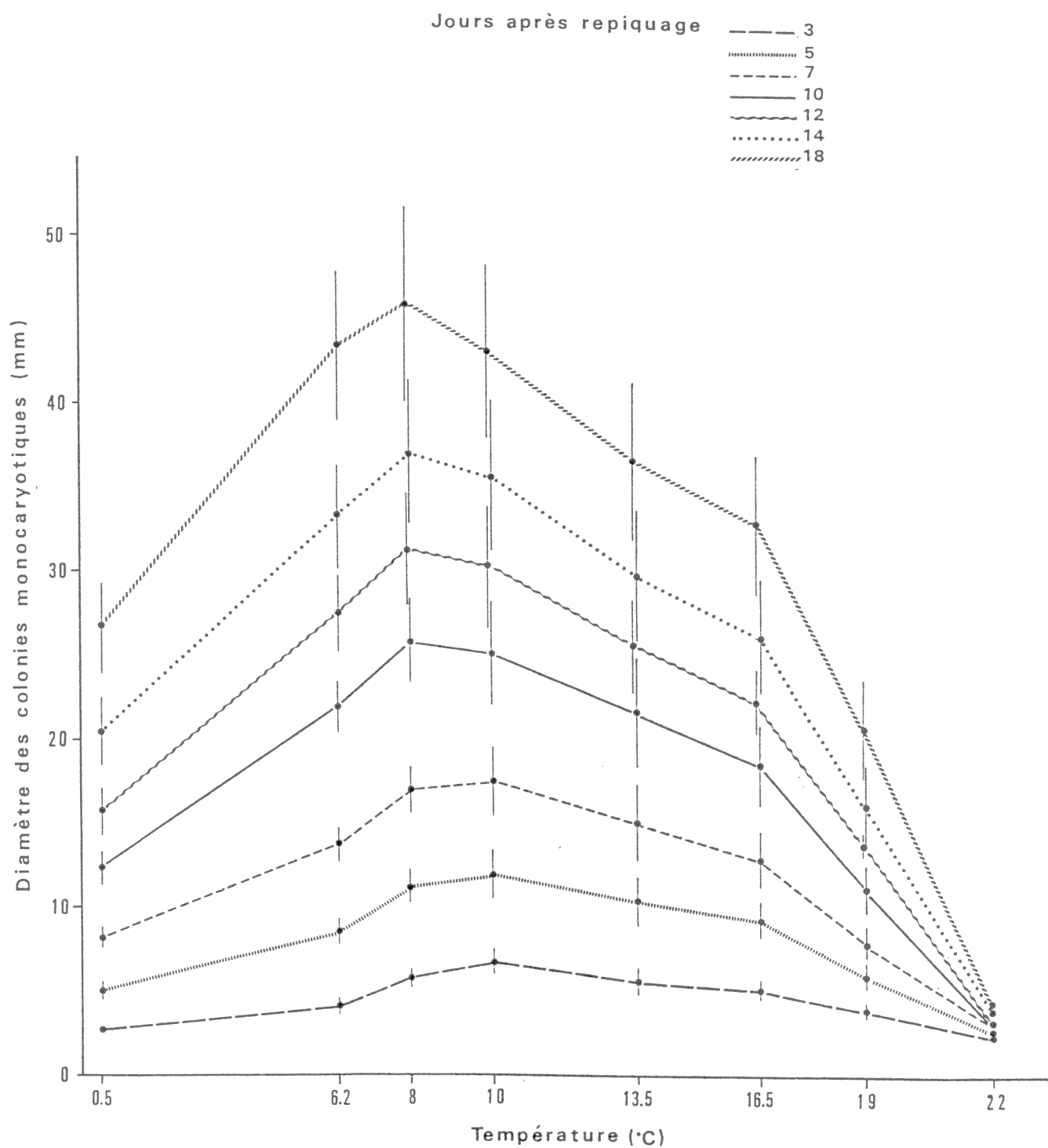


Figure 3.15 : Croissance moyenne de 13 monocaryons en fonction de la température sur milieu PDA (les intervalles sont calculés pour un degré de confiance de 95 %)

période de latence qui est proportionnelle à la durée d'exposition des colonies à des températures plus élevées (Dejardin et Ward, 1970). Ces chercheurs ont également constaté que la respiration de T. incarnata augmentait avec l'élévation de la température bien au-delà de l'optimum thermique pour la croissance.

Après une exposition prolongée des cultures à une température qui ne permet plus leur croissance (30°C), la teneur du mycélium en protéines est fortement réduite. Les chaînes polypeptidiques qui persistent sont de faibles masses moléculaires (20 à 30 kDa) et sont comparables à celles que l'on trouve dans les sclérotés mûrs du champignon (Newsted et al., 1985). Dès lors, ces auteurs supposent que l'augmentation de l'activité respiratoire de T. incarnata qui va de pair avec une élévation de la température et un ralentissement de la croissance mycélienne, induit la formation de sclérotés. Lehmann (1965a) avait déjà remarqué que le développement des sclérotés était favorisé par l'exposition des colonies à des températures supraoptimales pour la croissance des hyphes.

Les variations de pH comprises entre 5 et 7 dans les milieux de culture non tamponnés ont peu d'influence sur la croissance de T. incarnata (Dejardin et Ward, 1970). La baisse de pH observée pendant la croissance est due à des substances acides élaborées par le mycélium. La meilleure croissance des hyphes a été obtenue pour un pH de départ de 7.6 ayant évolué jusque 4.8 (Lehmann, 1965a). Cavelier (1982a) observe une acidification beaucoup plus importante du milieu PDA avec des souches fcb. Sur des milieux de culture tamponnés selon Romanos et al. (1980), la croissance mycélienne la plus rapide a été obtenue à pH 6 mais les pH 5.3 et 7 ont donné des résultats très voisins (fig. 3.16), quelle que soit la souche considérée.

La souche monocaryotique 16-3C10 développe une morphologie tout à fait particulière. Cela est dû à l'effet inhibiteur de la toxine fcb (Cavelier, 1982a) qui empêche pratiquement toute croissance de cette souche dès le 14^{ème} jour après le repiquage (fig. 3.16). Le monocaryon 4CH4 (également fcb) a une croissance intermédiaire entre la souche 16-3C10 et la souche monocaryotique de type sauvage 56Gn.

La vitesse de croissance des dicaryons testés (fig. 3.16) est nettement supérieure à celle des souches parentales monocaryotiques ce qui corrobore les observations de Lehmann (1965a). L'effet inhibiteur du caractère fcb dans les souches dicaryotiques ne s'est pas manifesté à pH 5.3, 6 et 7, ce qui confirme des observations antérieures (Cavelier, 1985). Cependant à pH 4.5, la croissance du dicaryon doublement fcb (16-3C10 x 4CH4) s'est trouvée réduite par rapport à celle du dicaryon ne comportant qu'une fois ce facteur.

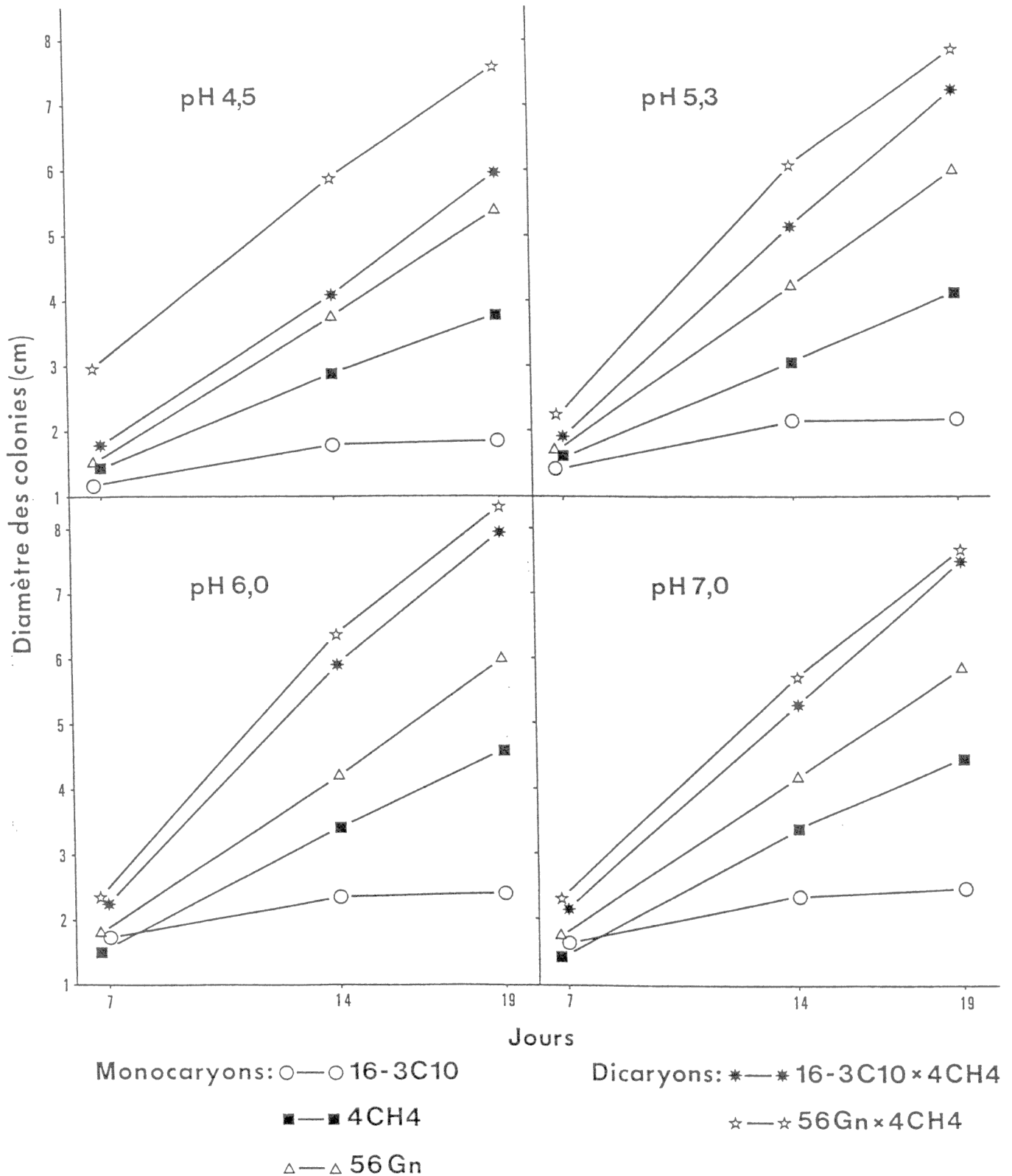


Figure 3.16 : Croissance à 10°C de 3 colonies monocaryotiques et de 2 colonies dicaryotiques de *Typhula incarnata* sur milieu PDA tamponné à pH 4.5, 5.3, 6.0 et 7.0 (moyenne de 3 répétitions).

CHAPITRE 4

CONTRIBUTION DES BASIDIOSPORES AU POTENTIEL D'INFECTION
DE TYPHULA INCARNATA

4.1. Etat des connaissances en la matière

La reproduction sexuée de Typhula incarnata a été relativement peu étudiée, car les fructifications minuscules de cette espèce ne sont pas facilement observables en conditions naturelles. En 1978, nous avons trouvé pour la première fois à Gembloux des carpophores de T. incarnata dans une repousse d'orge d'hiver recouverte par une culture de vesces (Cavelier et Maroquin, 1978) ainsi que dans une terre laissée en jachère après une culture d'orge d'hiver infectée par le pathogène (Cavelier, 1980). Hindorf (1980a) a fait la même découverte en 1979 dans des cultures d'orge d'hiver de seconde année situées dans la région de Cologne et d'Aix-la-Chapelle.

Jusqu'en 1975, les manifestations de T. incarnata étaient restées fort discrètes en Belgique et dans le nord de la France, alors que la maladie sévissait déjà en Allemagne depuis plus d'une décennie (Lehmann, 1965b). Dès 1976, la maladie s'est généralisée dans la plupart des régions de grandes cultures en Belgique (Cavelier et Maroquin, 1978) tandis qu'elle s'aggravait en Allemagne (Hindorf et Kiewnick, 1978) malgré des essais de lutte fongicide. Les effets de cette dernière ont été parfois inattendus, notamment l'augmentation du nombre de sclérotés produits dans les cultures traitées au triadiméfon ou au fenpropimorph (Mielke, 1984).

Comme les thalles dicaryotiques de T. incarnata ne produisent pas de conidies, on a attribué cette dissémination rapide aux basidiospores. En laboratoire, les basidiospores isolées ont produit des thalles monocaryotiques, introuvables au champ, ce qui a permis d'étudier le système d'incompatibilité tétrapolaire du champignon et indirectement sa dispersion géographique.

Chez T. idahoensis, des différences intéressantes de comportement ont été mises en évidence grâce à l'étude des allèles d'incompatibilité (Bruehl et al., 1978). Chez cette espèce, les populations de l'Etat de l'Idaho et de l'Utah sont presque stériles, mais beaucoup plus agressives que les populations de l'Etat de Washington, qui sont très fertiles, avec un nombre limité d'allèles d'incompatibilité (12 allèles A et 12 allèles B seulement pour 36 isolats).

Les populations de T. incarnata aux Etats-Unis sont constituées d'une

mosaïque très diversifiée de souches (35 allèles A et 37 allèles B sur 30 isolats inventoriés) (Bruehl et Machtmes, 1978). Ces auteurs ont montré également que la répartition des allèles d'incompatibilité parmi ces isolats est telle que les croisements entre souches, réputées pourtant très fertiles, ne sont pas très fréquents (no evidence for recent interbreeding).

Il ressort d'une analyse comparable réalisée en Belgique sur un effectif limité (Cavelier et Auquier, 1980), que l'épidémie imprévue de 1975-1976 a dû se développer à la faveur de conditions encore indéterminées (Cavelier et Maroquin, 1978), soit à partir d'une grande variété de souches implantées depuis longtemps (mais dont les manifestations seraient restées jusqu'alors très discrètes), soit par une importation massive de spores en provenance de contrées fortement colonisées (Allemagne, Etats-Unis). Cette dernière proposition apparaît peu probable. En effet, d'après Lehmann (1965a), la germination des basidiospores sur le sol serait inhibée par un facteur thermolabile, ce qui est en accord avec le fait qu'on ne trouve pas d'infection hors des aires inoculées avec des sclérotés ayant fructifié abondamment (Cavelier, 1980). L'implantation de nouveaux thalles au champ via les spores de T. incarnata serait donc un événement rare, ce qui limiterait les échanges entre souches éloignées géographiquement, augmentant l'importance relative de l'inbreeding (croisements entre souches soeurs), alors qu'en raison de l'incompatibilité tétrapolaire, les possibilités d'inbreeding sont théoriquement inférieures à celles de l'outbreeding (Koltin, 1978).

Cavelier (1982b) suggère que le potentiel d'infection des souches de T. incarnata se modifierait au hasard des rencontres entre les mycéliums dicaryotiques issus des sclérotés et ceux des carpophores ayant incorporé certains noyaux provenant de la recombinaison sexuée.

Cunfer et Bruehl (1973) observent un taux d'infection de 17 % chez les plantes de froment inoculées exclusivement par des basidiospores de T. idahoensis. Comme les monocaryons de cette espèce sont non agressifs (Bruehl et Cunfer, 1971), il faut en conclure que ce potentiel infectieux résulte de la dicaryotisation mutuelle des basidiospores. En conditions naturelles, des basidiospores étrangères peuvent aussi "fertiliser" des monocaryons et promouvoir ainsi l'outbreeding du champignon (Bruehl et al., 1975).

Ce phénomène de "fertilisation" a également été observé en Belgique chez T. incarnata au cours de deux campagnes successives où plusieurs souches monocaryotiques avaient été inoculées sous forme de sclérotés à proximité de souches dicaryotiques très fertiles (fig. 1.2a). En 1983, des dégâts importants ont été provoqués à l'orge d'hiver à la suite de la dicaryotisation de 3 souches monocaryotiques inoculées au champ par sclérotés, nonobstant le fait

qu'une de ces souches était non agressive à l'état monocaryotique (Cavelier, 1986b). La dicaryotisation du matériel monocaryotique s'est effectuée soit par anastomoses avec du mycélium dicaryotique présent naturellement dans le sol, soit par le biais de spores produites en abondance au voisinage des sclérotés de l'inoculum. Le manque de protection des plantes par la souche non agressive indique que la contamination avait été très précoce. En 1984, un essai d'inoculation avec des souches monocaryotiques incompatibles a été mis en place afin d'observer le moment de la dicaryotisation et les conséquences de celle-ci sur le niveau d'infection (voir point 4.2).

4.2. Description de l'essai de dicaryotisation

Les conditions d'implantation de l'essai de dicaryotisation sont décrites au chapitre 2. Cet essai fut placé à proximité d'autres essais d'inoculation de T. incarnata, offrant ainsi un environnement propice à la contamination par les basidiospores.

Des inoculations de T. incarnata ont été réalisées le 2 novembre 1984 sur des fractions de ligne de 50 cm de longueur distantes de 1.5 m l'une de l'autre, délimitées selon un schéma en carré latin (6 traitements dont un témoin non inoculé, x 6 répétitions). On a testé l'agressivité de 3 souches monocaryotiques incompatibles (tableau 4.1) inoculées séparément ou en mélange deux à deux sous forme de sclérotés (0.2g de sclérotés/souche/50 cm de ligne de culture).

Le nombre de talles-épi et la présence de sclérotés au pied des plantes ont été utilisés comme critère pour comparer les différents traitements entre eux, trois semaines avant la récolte.

4.3. Résultats

Vers la mi-décembre 1984, des clavules sont apparues tant dans les fractions de ligne inoculées avec une seule souche monosperme que dans celles inoculées avec deux souches monospermes en mélange (tableau 4.1). Ces clavules étaient relativement peu nombreuses par rapport à celles nées de la germination de sclérotés dicaryotiques dans des essais voisins : elles se sont révélées fertiles et ont donné naissance à des thalles dicaryotiques sur milieu de culture.

Tableau 4.1: Effets de l'inoculation (1) au champ de l'orge d'hiver "Franka" par des souches monocaryotiques incompatibles de T. incarnata

Souches de <u>T. incarnata</u> et géotypes d'incompatibilité (2)	Quantité d'inoculum par répétition (g)	Présence (+) de clavules en automne et de sclérotés à la récolte	Nombre de talles à la récolte par plante vivante en automne
74Gn (A2B2)	0.2	+	1,3 a (3)
15M (A2B6)	0.2	+	1,3 a
69G (A2B2)	0.2	+	1,3 a
74Gn et 15M	0.4	+	1,0 a
74Gn et 69G	0.4	+	1,1 a
Témoin non inoculé	0		1.6 b

1. Inoculation réalisée le 02/11/1984 - 0.2 g de sclérotés/souche/50 cm de ligne de culture - 6 répétitions en carré latin.
2. La souche 74Gn est agressive tandis que la souche 69G ne l'est pas (Cavelier, 1986b). L'agressivité de la souche 15M n'était pas connue avant la réalisation de l'essai.
3. Les moyennes sont significativement différentes entre elles si elles sont suivies par des lettres différentes ($\alpha = 0.05$) (test de Newman et Keuls).

L'état monocaryotique de l'inoculum de départ a été contrôlé au laboratoire ; les essais de croisement entre les différentes souches ont été négatifs. D'autre part, aucune clavule n'a été observée en dehors des aires d'inoculation (tableau 4.1).

L'identité des allèles d'incompatibilité de trois produits dicaryotisés prélevés dans le champ d'essai, a été recherchée par des croisements di-mono (Cavelier, 1982), technique plus rapide que la mise à fruit du champignon et l'isolement de monospores.

Les isollements ayant été réalisés à partir de clavules fertiles, les isolats comportaient nécessairement un mélange de deux types de dicaryons dont les allèles d'incompatibilité étaient répartis de la façon suivante: (AxBx : AyBy) et (AxBy : AyBx). En supposant qu'AxBx était le monocaryon inoculé et dicaryotisé, la spore contaminante ne pouvait être qu'AyBy. Afin de procéder à

des croisements hémicompatibles A ou B, il était donc nécessaire d'isoler au préalable AyBy par un croisement di-mono, AxBx + isolat. L'isolat dérivé (Ax Bx + AyBy) a ensuite été croisé avec des monocaryons-tests connus (contenant soit Ax soit Bx) afin de déterminer par l'analyse des compatibilités, la nature de Ay et de By (tableau 4.2). Les monocaryons-test ont été choisis en fonction des sources de contamination éventuelles, à savoir les essais d'inoculation mis en place à proximité durant la même période et comportant les dicaryons : (A1B1 : A4B4), (A2B2 : A5B17) et (A1B1 : A5B17).

Sept types de basidiospores susceptibles d'avoir dicaryotisé les monocaryons 74Gn et 69G, ont été différenciés sur base des résultats de croisements effectués entre les isolats dérivés (A2B2 + AyBy) et 5 monocaryons-test (tableau 4.2).

L'analyse des résultats montre que le noyau A1B4 est le contaminant du monocaryon 69G tandis que le noyau A4B1 est le contaminant du monocaryon 74Gn. D'une manière analogue, on a pu montrer que l'isolat prélevé dans l'objet (15M) contenait le noyau A1B4. Les contaminants identifiés provenaient tous de l'essai de dicaryons le plus proche, situé à quelques mètres des objets étudiés.

Les spores contaminantes ont modifié le potentiel d'infection des inocula monocaryotiques en présence : la dicaryotisation précoce dont ils ont fait l'objet peu après leur inoculation, les a tous rendus également agressifs (tableau 4.1). Les résultats d'infection des souches isolées ne sont pas statistiquement différents au seuil 0.05 de ceux des souches mélangées, démontrant que la dicaryotisation s'est effectuée de manière uniforme, indépendamment de la concentration de l'inoculum monocaryotique.

Sur les plantes non inoculées, l'absence de sclérotés à la récolte dénote que les basidiospores, produites à la fois à l'extérieur et à l'intérieur de l'essai, n'ont pas réussi à développer des infections là où le sol ne contenait pas le parasite au préalable (tableau 4.1).

Tableau 4.2: Origine des spores contaminantes responsables de la dicaryotisation des monocaryons 74Gn et 69G au champ

Composition éventuelle des isolats dérivés de la dicaryotisation de 74Gn et de 69G	Résultats théoriques des croisements di-mono avec les monocaryons-test suivants :					Séquence des résultats effectivement observés
	56Gn	1Na2	8P	48G	3Na2	
A2B2 + AyBy	A1B2	A5B2	A2B4	A2B1	A2B17	
A2B2 + A1B4	-	+	-	+	+	confirmé pour A2B2 = 69G
+ A1B1	-	+	+	-	+	x
+ A4B1	+	+	+	-	+	confirmé pour A2B2 = 74Gn
+ A4B4	+	+	.	+	+	x
+ A5B17	+	-	+	+	-	x
+ A1B17	-	+	+	+	-	x
+ A5B1	+	-	+	-	+	x

- Croisement di-mono non compatible
- + Croisement di-mono compatible
- x non observés, ni pour 69G, ni pour 74Gn

4.4. Discussion et conclusions

Bien qu'Hindorf (1980b) considère avec d'autres (Lehman, 1965b; Sprague, 1952; Tomiyama, 1955) que les basidiospores ne jouent pratiquement aucun rôle dans l'infection primaire de l'orge d'hiver, on peut se demander comment l'extension rapide de la maladie en Europe de l'ouest depuis 1975 aurait pu se faire sans leur appoint. Il est vraisemblable que c'est à proximité des carpophores, sur un sol déjà colonisé par *Typhula*, que les basidiospores ont le plus de chance d'être dicaryotisées. Nos essais au champ ont apporté la preuve matérielle non seulement que cette dicaryotisation par spores était possible, mais qu'elle pouvait se produire à une certaine distance du lieu de fructification, ce qui suppose le transport des spores par le vent. Il est remarquable que la dicaryotisation a été précoce au point de rendre immédiatement fertiles des sclérotés monocaryotiques en germination (figure 1.2A), confirmant que des échanges nucléaires entre basidiospores et thalles dicaryotiques sont

possibles, bien que difficilement vérifiables sans une étude complexe utilisant plusieurs marqueurs génétiques.

Hindorf (1980b) démontre d'une façon indirecte que les basidiospores modifient le potentiel d'infection des thalles dicaryotiques en comparant, sur extrait de malt, la production de sclérotas à partir d'un thalle lui-même issu de sclérote, avec celle de sclérotas issus d'un carpophore fertile.

L'apport de matériel génétique nouveau par les basidiospores requiert néanmoins la présence de souches réceptrices susceptibles de les incorporer. Depuis plusieurs années que nous réalisons des essais d'inoculation au champ, les témoins non inoculés sont toujours restés indemnes du parasite, sauf dans une terre naturellement infectée dont le précédent cultural était une jachère d'escourgeon (Cavelier, 1986b).

Il est donc vraisemblable que les basidiospores de *T. incarnata* peuvent être dispersées par le vent mais leurs chances de survie en tant que propagules infectieuses sont très faibles par manque de base nutritive et à cause d'un potentiel saprophytique insuffisant (Detiffe et al., 1985). Nous avons tenté d'infecter de l'orge d'hiver avec des basidiospores en suspendant pendant 48 heures à 15°C une quarantaine de clavules de *T. incarnata* à des couvercles de boîte de Petri placés au dessus des plantes sur des verres de lampe à pétrole. L'incubation des plantes à 2°C pendant deux mois n'a produit aucune infection. De même, aucun symptôme ne s'est développé à la suite du dépôt de basidiospores de *T. incarnata* dans des gouttelettes d'eau à l'aisselle des premières feuilles de plantules d'orge incubées à 5°C (Perry et Hal-Hashimi, 1985).

En conclusion, bien qu'on ignore tout des conditions qui rendent possibles une infection de l'orge par les basidiospores, on peut supposer qu'elles sont assez restrictives, ce qui expliquerait que les régions de grandes cultures de céréales en Belgique sont restées à l'abri d'une contamination généralisée par *T. incarnata* jusqu'en 1975-76. C'est seulement au Japon que les basidiospores ont clairement été impliquées dans la dispersion de la maladie, des monocaryons ayant été isolés à partir de plantes infectées sous la neige (Matsumoto et Tajimi, 1985).

CHAPITRE 5

SUSCEPTIBILITE DE L'ORGE D'HIVER VIS-A-VIS DE TYPHULA INCARNATA
EN FONCTION DU PRETRAITEMENT DES PLANTES AU FROID.

5.1. Introduction

La plupart des chercheurs qui ont étudié les "moisissures de neige" du genre Typhula se sont interrogés sur les conditions propices au développement de ces agents qui commencent à se développer en automne et prospèrent ensuite pendant le repos végétatif des cultures sensibles durant la période hivernale.

Pour Lehmann (1965b), Typhula incarnata est incapable d'infecter un tissu sain et intact. L'attaque débiterait sur le coléoptile et les gaines foliaires des feuilles les plus âgées (Tomiyama, 1955; Matsumoto et Araki, 1982). L'infection se généraliserait à la suite de l'affaiblissement de la plante sous l'effet de facteurs climatiques (couverture nivale) ou artificiels (recouvrement des plantes d'orge par du papier ciré par exemple), l'augmentation de la respiration des tissus infectés diminuant encore la résistance de la plante au pathogène et au gel.

Au champ, les très jeunes plantules de froment d'hiver peuvent parfois échapper à l'infection par T. idahoensis (Bruehl et Cunfer, 1971); en phase de tallage, les plantes âgées sont moins vulnérables que les plantes plus jeunes car elles possèdent un plateau de tallage très développé qui leur confère une résistance élevée, même si leurs feuilles sont complètement détruites. Cette résistance à T. idahoensis semble être en relation non seulement avec la taille des plantes mais également avec l'état d'endurcissement des plantes au froid (Bruehl, 1967c).

L'effet de l'âge de la plante sur l'endurcissement des graminées à l'hiver a été observé par plusieurs auteurs. Les prairies de première année sont généralement plus gravement endommagées par les moisissures de neige que les prairies permanentes (Arsvoll, 1977).

Dans l'Etat de Washington, l'état d'endurcissement au froid du froment d'hiver avant les chutes de neige varie selon les variétés. Les variétés les plus résistantes à T. idahoensis sont celles qui ont le taux de glucides le plus élevé avant l'incubation de la maladie mais surtout celles qui épuisent le moins vite cette réserve une fois qu'elles sont soumises aux conditions d'enneigement. A l'obscurité, les variétés de froment d'hiver sensibles à T.

idahoensis restent vertes plus longtemps que les variétés résistantes, maintenant de la sorte une activité physiologique qui épuise rapidement leurs réserves en glucides (Bruehl et Cunfer, 1971).

Detiffe et al. (1983b) montrent que le mycélium de T. incarnata pénètre par les déchirures des cylindres foliaires occasionnées naturellement par le déploiement successif de nouvelles feuilles au cours du tallage de l'orge d'hiver. Ce type de pénétration, considéré par ces auteurs comme le plus fréquent, ne nécessite pas la sénescence des feuilles et corrobore le fait que les plantes d'orge peuvent être infectées très tôt en automne. Detiffe et al. (1983b) observent secondairement une pénétration de Typhula par les stomates des feuilles âgées.

Toutefois, Bruehl et Cunfer (1971) prouvent expérimentalement que des attaques sévères de T. idahoensis peuvent se produire sur des plantules de froment d'hiver avant qu'elles ne commencent à taller. Chez l'orge d'hiver, on observe également une forte mortalité de plantules non endurcies inoculées par T. incarnata au stade pré-tallage, alors qu'au même stade de développement, des plantules endurcies au froid pendant 1 mois survivent à l'infection (Cavelier, 1986b).

Quel que soit le mode de pénétration du champignon dans la plante, il semble donc que la progression de l'infection vers le plateau de tallage et les racines dépende autant de l'état physiologique des tissus au moment de la contamination par le pathogène que de l'âge de la plante en termes de croissance et de taille.

5.2. Relation entre l'âge de la plante-hôte et sa susceptibilité à Typhula

5.2.1. Orge d'hiver

Lehmann (1965b) réalise des inoculations artificielles de T. incarnata échelonnées du 13 septembre au 14 mars et montre que les infections précoces (jusqu'au 22 novembre) sont les plus dommageables.

5.2.2. Froment d'hiver

Toutes les études portant sur le froment d'hiver montrent que les plantes âgées résistent mieux que les jeunes à une attaque de T. idahoensis. Au champ, les plantes issues de semis précoces présentant une végétation très fournie au moment de la contamination par Typhula, sont plus résistantes à l'infection bien qu'elles abritent davantage de sclérotés que les plantes moins

développées. Dans des expérimentations en pot, des résultats analogues ont été obtenus en inoculant simultanément des semis d'âge différent (Bruehl, 1967c ; Bruehl et Cunfer, 1971) ou en inoculant à différentes dates des plantes de même âge (Kiyomoto et Bruehl, 1977).

Dans ces différents essais, comme l'endurcissement naturel au froid est toujours lié à l'âge de la plante, il n'est pas possible de dissocier ces deux paramètres et d'évaluer leurs effets individuels sur la susceptibilité à Typhula.

Bruehl (1967c) suppose que les tissus des plantes jeunes et âgées sont également susceptibles, la destruction des plantes les plus développées exigeant toutefois une durée plus longue d'incubation de la maladie et un plus grand potentiel d'infection du pathogène.

5.2.3. Graminées

Arsvoll (1977) soumet des semis de Phleum pratense d'âge différent à une période de 2 semaines d'endurcissement au froid en conditions contrôlées et montre que les plantes âgées sont les plus résistantes à T. ishikariensis. Matsumoto et Sato (1983) n'observe pas une telle différence de résistance lorsque différents semis de cette espèce sont endurcis en conditions naturelles. Toutefois, avec Lolium perenne, les plantes les plus résistantes à T. ishikariensis appartiennent au semis le plus précoce (donc les plantes les plus âgées).

Cependant, quelle que soit l'espèce de graminée, Matsumoto et Sato (1983) observent après l'hiver une perte relative en poids sec beaucoup moins importante chez les plantes jeunes que chez les plantes âgées alors que ces dernières s'appauvrissent le moins en sucres solubles. Néanmoins, en valeur absolue, les plantes âgées présentent toujours un poids sec et un contenu en sucres plus élevés que les plantes jeunes, que ce soit avant ou après l'hivernage des plantes.

5.3. La notion d'endurcissement des plantes au froid en relation avec leur résistance à Typhula

5.3.1. Contrôle métabolique du processus d'endurcissement au froid (d'après Levitt, 1972)

Le premier effet des basses températures consiste en un ralentissement des processus métaboliques qui varie selon les coefficients de température des

réactions et l'épuisement des substrats.

Dans un second temps, la phosphorylation oxydative, indépendante de la lumière, est fortement ralentie. L'utilisation des différents assimilats est freinée plus drastiquement que le taux de photosynthèse ne diminue, ce qui provoque une accumulation nette de sucres solubles qui inhibe l'assimilation de CO₂.

Dans ces conditions, la photophosphorylation continue cependant, eu égard à ses faibles exigences thermiques. Les molécules d'ATP et NADPH produites, n'étant pas utilisées pour la fixation du carbone lors de la phase sombre de la photosynthèse, participent à l'augmentation du pouvoir réducteur d'une série de protéines et de lipides, contribuant à l'activation de l'amylase β , à la formation de protéines SH et de phospholipides insaturés.

Ces mécanismes permettent une augmentation de la pression osmotique et de la perméabilité cellulaire (sortie d'eau), une protection lipidique de la membrane (fluidité des lipides) et un renforcement du caractère hydrophobe du protoplasme en évitant la formation de ponts disulfures.

5.3.2. Teneur en sucres solubles et tolérance au froid

Le degré d'endurcissement au froid peut être mesuré soit par l'évaluation directe de la résistance des plantes au gel, soit par l'estimation de la quantité de sucres solubles présents dans les tissus, bien que cette accumulation ne soit pas la cause de la tolérance au gel, mais résulte de l'accroissement du pouvoir réducteur du contenu cellulaire par suite de l'activité photosynthétique à basse température (Levitt, 1972).

L'accumulation de proline libre accompagne le développement de la tolérance au gel de l'orge d'hiver (Havaux et Lannoye, 1982); cependant, une telle accumulation peut résulter également d'un stress hydrique.

La tolérance des cultures au froid dépend des interactions complexes entre les fluctuations de l'ensoleillement et le régime des températures, la croissance des plantes et les pratiques culturales (Lorenzetti *et al.*, 1971).

Le contenu en sucres solubles est par exemple beaucoup plus élevé chez de jeunes semis d'orge croissant sur substrat pauvre en NPK que sur substrat enrichi (Fritsch et Jung, 1984). Parallèlement, la fertilisation azotée des cultures en automne induit une croissance active des plantes qui diminue leur capacité d'endurcissement à l'hiver (Arsvoll et Larsen, 1977).

Chez le froment d'hiver, plusieurs auteurs cités par Levitt (1972) mettent en évidence des corrélations positives entre les degrés de résistance au gel et les teneurs en sucres solubles. Les accumulations de saccharose,

glucose et fructose seraient les plus notables. Sous forme de fructosanes (liaisons 2-6), le D-fructose constitue la majeure partie des sucres de nombreuses graminées.

Le coléoptile du froment d'hiver plongé dans une solution sucrée peut accumuler différents sucres sans accroître nécessairement sa résistance au gel (Trunova, 1963). Parmi les sucres qui pénètrent dans les cellules, seuls ceux qui ont la propriété d'être rapidement métabolisé en cétooses procurent au coléoptile un durcissement accru au froid. Le remplacement, dans la solution nutritive, du saccharose par le mélange fructose - glucose augmente la teneur en sucres ainsi que la résistance au gel des coléoptiles (Trunova, 1963).

Chez le ray-gras, il n'existe pas non plus de relation simple entre teneur en sucres solubles et tolérance au froid (Lawrence et al., 1973).

Dans le cas de graminées pérennes, des inhibiteurs de croissance apparaissent à la fin de l'été et au début de l'automne, ce qui contribue à accumuler les substances cryoprotectrices résultant de l'endurcissement au froid. C'est pourquoi, les plantes pérennes possèdent un plus haut niveau de tolérance au gel que les plantes annuelles endurcies (Levitt, 1972).

5.3.3. Endurcissement au froid et résistance à Typhula

Lorsque les emblavements de froment d'hiver sont précoces (plusieurs talles par plante au début de l'hiver), les taux en sucres solubles des plantes sont toujours élevés (Kiyomoto et Bruehl, 1977). En fait, la résistance variétale à T. idahoensis n'est pas corrélée au taux de sucres avant recouvrement des plantes par la neige, mais bien à la décroissance de ce taux sous la neige. En effet, les variétés qui offrent une bonne résistance au pathogène, perdent rapidement leurs feuilles à l'obscurité (baisse rapide du taux de chlorophylle) et maintiennent une défense active contre le pathogène, grâce à une consommation modérée de leurs glucides (Kiyomoto et Bruehl, 1977).

Tronsmo (1983) étudie le comportement de Phleum pratense et Phalaris arundinacea et montre qu'à l'égard de T. ishikariensis, il existe une corrélation étroite entre les niveaux de résistance des plantes non endurcies et ceux des plantes endurcies au froid : au contraire, en ce qui concerne la résistance des plantes à la congélation, il y a indépendance de réaction entre les deux types de plantes. De plus, les plantes de Phleum pratense qui ont été désendurcies par un séjour de 2 semaines à 15°C, perdent leur tolérance au froid sans perdre pour autant leur résistance à T. ishikariensis. Ces observations suggèrent que la tolérance au froid et la résistance à Typhula représentent des phénomènes distincts bien qu'ils soient induits par les mêmes

stimuli (température et lumière) (Tronsmo, 1983).

C'est également l'avis de Arsvoll (1977) qui établit néanmoins une bonne corrélation entre l'endurcissement au froid des graminées (Phleum pratense et Festuca pratensis) et leur résistance à Typhula.

Abe et Matsumoto (1981) tirent les mêmes conclusions pour des cultures de Dactylis glomerata soumises aux attaques de T. ishikariensis et T. incarnata dans l'île d'Hokkaido.

L'endurcissement des plantes au froid augmente non seulement leur résistance à l'égard des champignons psychrophiles mais également vis-à-vis des rouilles (Tronsmo, 1983), ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'un phénomène général de résistance des plantes aux agents pathogènes.

5.4. Description des essais

Le champ d'essai de Jandrain (voir chapitre 2) a servi de cadre à une expérimentation ayant pour but de mesurer l'effet d'une série d'inoculations de T. incarnata échelonnées de la fin-octobre à la mi-décembre (30/10, 08/11, 19/11, 29/11, 10/12, 20/12), en utilisant des sclérotés de la souche agressive (9P + 596). L'unité expérimentale consistait en une fraction de ligne de culture de 70 cm de longueur inoculée avec 0.3 g de sclérotés. L'essai, construit selon un schéma en carré latin à 6 répétitions, s'étendait en largeur sur 6 plaines de semis (soit sur 10 mètres) et occupait 11 mètres dans le sens du semis. Le nombre de talles-épi rapporté au nombre de plantes inoculées a été compté 3 semaines avant la récolte (figure 5.1).

Parallèlement à cet essai de champ, on a réalisé le 16 octobre 1984 à Gembloux, un semis d'orge d'hiver dans des pots remplis de terre de culture en provenance de Jandrain. Ces pots ont été placés à l'extérieur dans une couche de terreau pour les préserver de la dessiccation et des brusques variations de température. Des analyses de sucres solubles à l'HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) ont été effectuées dans plusieurs lots de plantes prélevées le 01/11, 12/11, 22/11, 3/12, 11/12 et 20/12/1984, c'est à dire durant toute la période d'endurcissement naturel des semis au froid (tableau 5.1).

Lorsqu'un lot de plantes était sacrifié pour l'analyse des sucres, un autre lot comportant le double de plantes était déplacé en chambre froide non éclairée pour que la décroissance de son contenu en sucres solubles après 25 et 50 jours d'"hivernage" à l'obscurité puisse être mesurée (tableau 5.2 et figure 5.2).

Des semis d'orge d'hiver "Franka" ont été effectués en pots dans du terreau le 5/11, 16/11, 27/11 et 07/12/84 et cultivés en serre à 18°C jusqu'au 19/12/84. A cette date, un premier lot de plantes (plantes non endurcies au froid) a été prélevé pour réaliser une analyse de sucres solubles à l'HPLC. (tableau 5.3 et figure 5.3). Le reste des plantes a séjourné en chambre froide à 2°C avec 8h30 de lumière par 24 heures jusqu'au 18/01/85, date à laquelle un second lot de plantes (plantes endurcies au froid) a été prélevé pour une analyse de sucres tandis que le lot restant a été partagé en deux groupes : un groupe témoin non inoculé et un groupe de plantes inoculées avec des bandelettes de mycélium de la souche (9P + 59G) dont les sclérotés avaient servi d'inoculum au champ (voir ci-dessus). Le 7 mars 1985, soit après 49 jours d'incubation en chambre froide, les plantes inoculées comme les plantes non inoculées ont été placées à l'extérieur pour permettre la reprise de leur croissance (figure 5.4 et 5.5). L'essai a été clôturé le 19 avril 1985. Les plantes ont été pesées et leur contenu en sucres solubles a été analysé (tableau 5.4).

5.5. Résultats

5.5.1. Evolution du contenu en sucres solubles des plantes d'orge en automne

La teneur en saccharose dans les feuilles et collets était négligeable, sauf dans le lot de plantes du 01/11 (tableau 5.1). Un enrichissement sensible en saccharose s'est produit dans les racines entre le 2d et le 6ème prélèvement.

La teneur en glucose était relativement stable à travers toutes les analyses de feuilles + collets (0.94 ± 0.29) et de racines (0.75 ± 0.18).

La teneur en fructose dans les feuilles et collets a été en augmentation constante jusqu'au 11/12, pour décroître en suite. Dans les racines, la teneur en fructose, notablement plus élevée dans les échantillons du premier et du dernier prélèvement, n'a pratiquement pas évolué au cours des prises d'essai intermédiaires.

La teneur en une substance indéterminée a augmenté sensiblement du 3ème au 6ème prélèvement dans les feuilles et collets; cette substance n'a pas été détectée dans les racines.

Tableau 5.1 : Evolution de la teneur en sucres solubles (en % de matière sèche) dans des plantules d'orge semées le 16 octobre 1984 (substrat : terre de champ), et soumises à un durcissement naturel au froid.

Dates de prélèvements	01/11	12/11	22/11	03/12	11/12	20/12
Nombre de jours après le semis	16	27	37	48	56	65
<u>Feuilles et collets</u>						
Saccharose	2.7 ± 0.2 ⁽²⁾	<LS	<LS	<LS	<LS	<LS
Substance indéter. ⁽¹⁾	1.1 ± 0.0	2.0 ± 0.3	1.7 ± 0.2	2.3 ± 0.4	3.0 ± 0.7	3.1 ± 0.4
Glucose	1.2 ± 0.0	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.0	1.3 ± 0.1
Fructose	1.3 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.4 ± 0.3	4.5 ± 0.3	3.0 ± 0.1
<u>Racines</u>						
Saccharose	0.7 ± 0.1	<LS	1.5 ± 0.1	2.1 ± 0.4	2.5 ± 0.3	3.0 ± 0.5
Glucose	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Fructose	1.4 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.6 ± 0.2

(1) Cette substance n'ayant pas pu être identifiée, les teneurs renseignées doivent être considérées à titre indicatif, pour leur valeur relative uniquement.

(2) Valeur moyenne (± écart-type estimé) portant sur 2 à 4 échantillons indépendants. LS = 0.6 : limite de sensibilité de la méthode de mesure.

La figure 5.1 montre que la teneur en sucres solubles (saccharose + glucose + fructose) dans les feuilles et collets (courbe B1) augmente à partir du 12 novembre (jour 27) pour atteindre un maximum 56 jours après le semis tandis que, dans les racines (courbe B2), elle semble ne pas avoir encore atteint sa valeur maximale au 65ème jour.

Les plantules d'orge à peine levées (jour 16) qui ont un taux élevé en sucres solubles (par rapport aux plantes prélevées le 27ème jour) présentent un stade de développement critique au point de vue de leur capacité d'endurcissement au froid.

Deux lots de plantes d'orge âgées de 16 et de 27 jours respectivement (voir tableau 5.1) ont été soumis à des périodes différentes d'endurcissement en chambre froide (20 jours pour le lot de plantes âgées de 16 jours, 9 jours pour le lot de plantes âgées de 27 jours) afin de mesurer leur enrichissement respectif en sucres solubles 36 jours après le semis ainsi que la décroissance de cette teneur en sucres après 25 jours supplémentaires de séjour à l'obscurité (tableau 5.2).

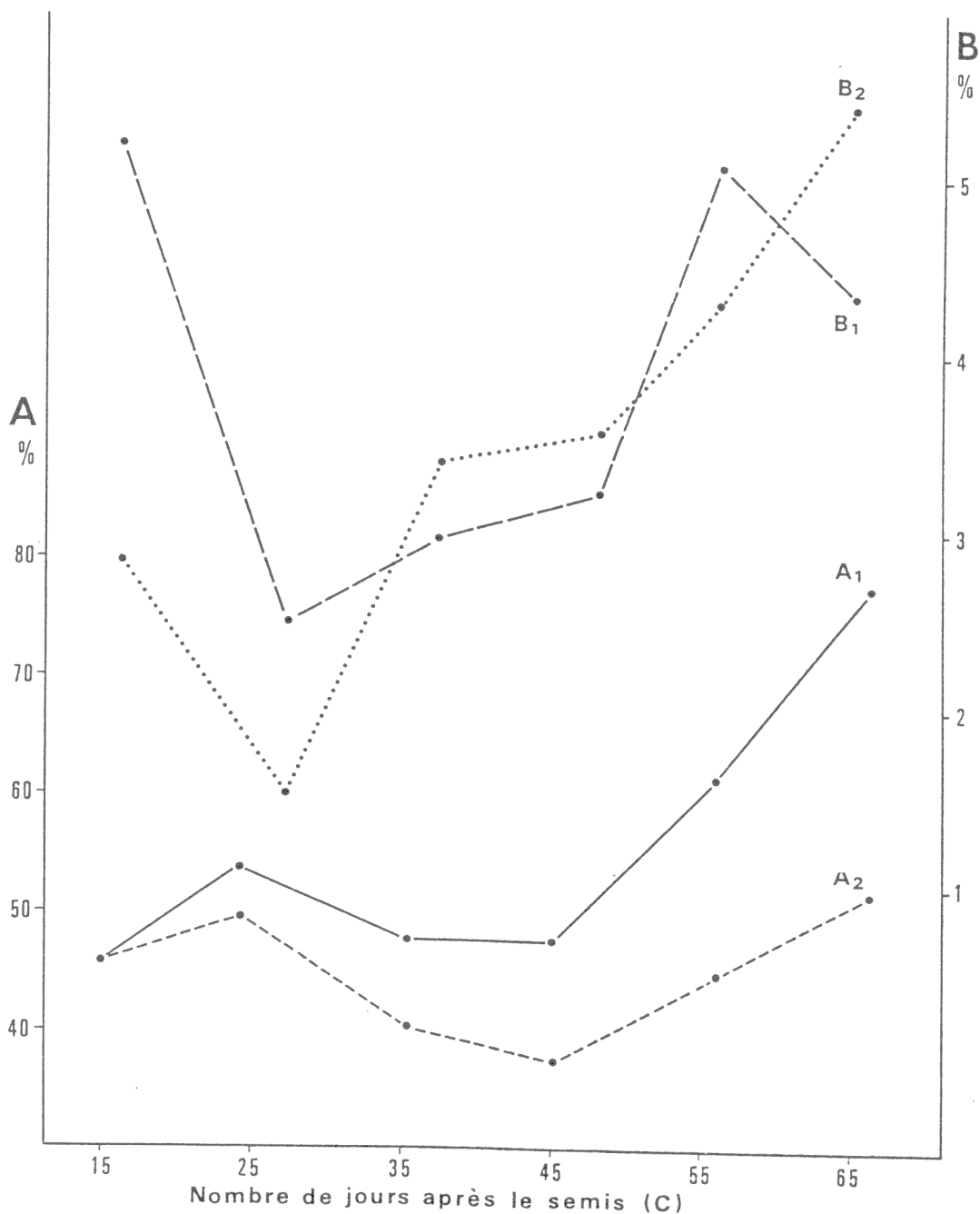


Figure 5.1 :

Evolution du nombre de talles-épi/plante d'orge en fonction de la date d'inoculation au champ et du contenu en sucres solubles (saccharose + glucose + fructose) de plantes d'orge cultivées en pots à l'extérieur durant la même période.

A. Nombre moyen de talles-épi/plante inoculée en % d'un témoin non inoculé.
 -A1 valeurs réelles observées (durée d'incubation variant de 101 à 152 jours)
 -A2 valeurs théoriques sur base d'une durée unique d'incubation de 152 jours.

B. Teneur moyenne en sucres solubles (% de matière sèche).
 -B1 dans les feuilles + collets (limites de confiance ($\alpha = 0.05$) variant de ± 0.29 à ± 0.41 selon les points).
 -B2 dans les racines (limites de confiance ($\alpha = 0.05$) variant de ± 0.47 à ± 0.66 selon les points).

C. Nombre de jours correspondant aux dates d'inoculation pour A (15,24,35,45, 56,66) et aux dates de prélèvements pour B (16,27,37,48,56,65).

Tableau 5.2 : Influence d'un traitement au froid de durée variable sur l'accroissement de la teneur en sucres solubles (% de matière sèche) de deux lots de plantes d'orge var. FRANKA d'âges différents et sur la décroissance de cette teneur après 25 jours à l'obscurité.

Séries de prélèvement		Premier lot de plantes			Second lot de plantes		
		I	II	III	IV	V	VI
Dates de prélèvement		01/11	21/11	16/12	12/11	21/11	16/12
Saccharose	F	2.7 ¹	1.1	<LS	<LS	<LS	<LS
	R	0.7	4.7	1.0	<LS	4.2	<LS
Glucose	F	1.2	1.3	<LS	0.9	<LS	<LS
	R	0.6	<LS	<LS	0.7	<LS	<LS
Fructose	F	1.3	2.4	1.8	1.6	2.6	1.1
	R	1.4	1.3	1.2	0.8	2.2	<LS
TOTAL	F	5.2	4.8	1.8	2.5	2.6	1.1
	R	2.7	6.0	2.2	1.5	6.4	<LS

I Plantes d'orge prélevées 16 jours après le semis (8 jours après la levée).

II Mêmes plantes qu'en I, placées 20 jours en chambre froide (2°C) avec 8h30 d'éclairage par jour.

III Mêmes plantes qu'en II, placées 25 jours en chambre froide (2°C) à l'obscurité.

IV Plantes d'orge prélevées 27 jours après le semis.

V Mêmes plantes qu'en IV, placées 9 jours en chambre froide (2°C) avec 8h30 d'éclairage par jour.

VI Mêmes plantes qu'en V, placées 25 jours en chambre froide (2°C) à l'obscurité.

F : feuilles et collets.

R : racines.

(1) Valeur moyenne portant sur 2 à 4 échantillons indépendants.

Erreur standard comprise entre 5 et 25%.

LS = 0.6 : limite de sensibilité de la méthode de mesure.

Le premier lot de plantes a bénéficié d'un arrêt de croissance au stade pré-tallage en conservant un taux de saccharose assez élevé dans les feuilles jusqu'à la fin de la période d'endurcissement. Tout se passe comme si l'établissement de conditions favorables à un endurcissement rapide en chambre froide avait supprimé la phase de déclin de la teneur en sucres provoquée en automne par la croissance rapide de la plantule et l'épuisement des réserves en glucides de la semence (figure 5.1).

L'accroissement en sucres solubles des racines du second lot de plantes

(au stade début tallage) est encore plus élevé que celui des plantes du premier lot. Cependant, les plantes du second lot ont épuisé plus rapidement que les autres leurs réserves en sucres solubles après 25 jours d'obscurité en chambre froide.

Tout indique donc qu'un endurcissement très précoce des plantes d'orge est favorable à l'accumulation et à la conservation des sucres solubles dans les tissus. Les teneurs réduites en sucres solubles après 25 et 50 jours de séjour des plantes à l'obscurité confirment l'allure générale de la courbe d'accumulation en sucres jusqu'au 56ème jour (figure 5.2). Notons que c'est au stade correspondant au 48ème jour de la croissance des plantules d'orge que la réduction de la teneur en sucres est la moins importante, montrant que les plantes les plus développées (contenant le plus de sucre) ne conservent pas nécessairement mieux leurs glucides à l'obscurité.

L'appauvrissement des feuilles et collets en sucres solubles est très marqué après 25 jours de séjour des plantes à l'obscurité, mais ne s'accroît pas tellement au bout de 50 jours sans lumière. La teneur en sucres solubles a même tendance à augmenter de nouveau dans les catégories de plantes les plus développées (figure 5.2). Cela pourrait s'expliquer par une translocation de sucres des racines vers les collets. Cependant, la teneur en sucres solubles dans les racines est trop faible après 25 jours d'obscurité pour justifier cette hypothèse (tableau 5.2). L'augmentation des monosaccharides dans les feuilles et collets pourrait être due à l'hydrolyse de polysaccharides de réserve, notamment de levane (chaîne de β fructofuranose).

5.5.2. Effet de la durée d'incubation de la maladie à Typhula sur le niveau des pertes en talles-épi de l'orge au champ

Si on considère que la période d'incubation de la maladie s'est terminée le 31 mars 1985, les infections qui ont commencé à se développer dans les 50 jours après le semis (4 premières inoculations), ont bénéficié d'au moins 100 jours d'incubation (110 jours à la 4ème inoculation moins 10 jours pour la germination des sclérotés), provoquant la mort d'environ 50% de talles par rapport au témoin non inoculé (figure 5.1, courbe A1).

La dernière inoculation de décembre (66ème jour après le semis) est responsable de la mort de 22% de talles par rapport au témoin non inoculé, ce qui est significativement inférieur ($\alpha = 0.05$) aux taux de mortalité provoqués par les 5 inoculations précédentes qui statistiquement ne peuvent pas être considérées comme différentes les unes des autres.

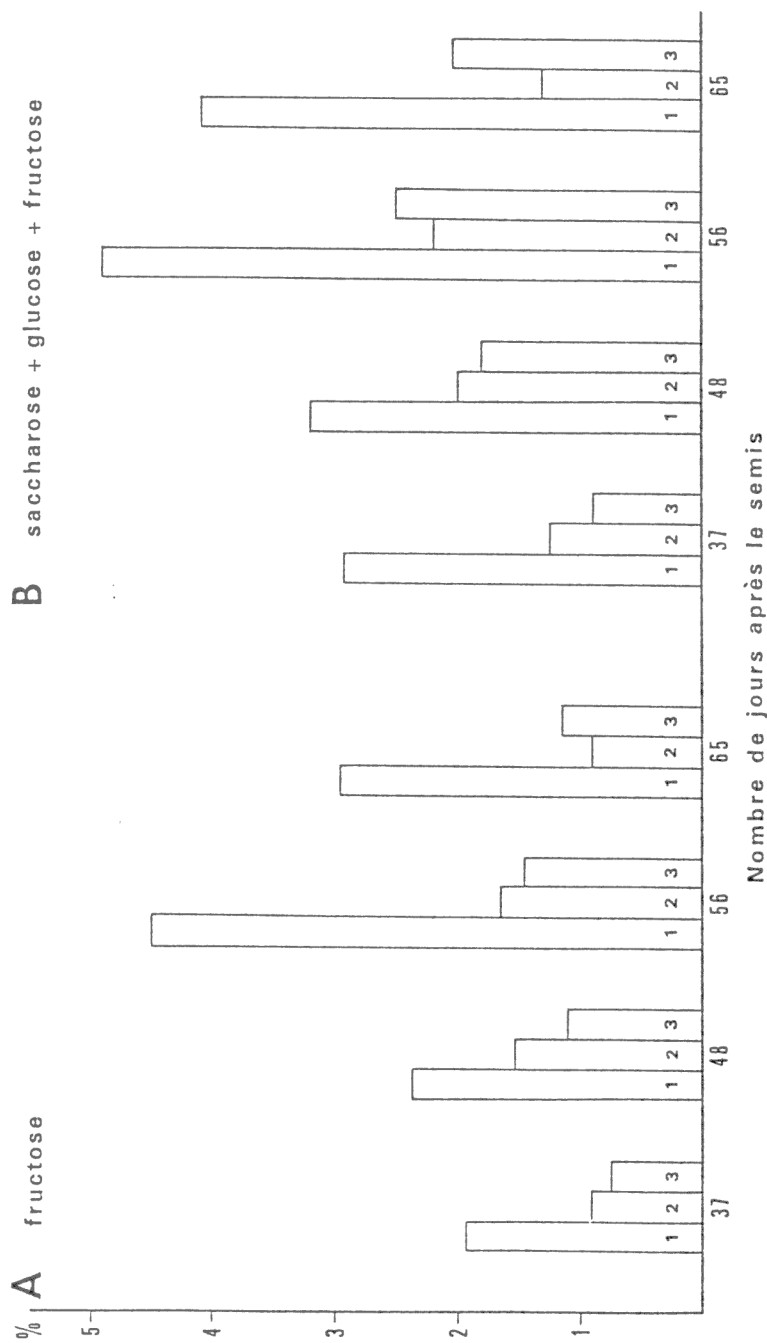


Figure 5.2 : Evolution de la décroissance de la teneur en fructose (A) et de la teneur en saccharose + glucose + fructose (B) dans les feuilles et collets de plantules d'orge soumisses, à différents stades de leur développement, à un séjour de 25 ou de 50 jours en chambre froide non éclairée.

1. Plantes ayant grandi à l'extérieur en conditions naturelles.
2. Plantes de même développement qu'en 1 mais ayant en plus séjourné 25 jours en chambre froide (1°C) à l'obscurité.
3. Plantes de même développement qu'en 1 mais ayant en plus séjourné 50 jours en chambre froide (1°C) à l'obscurité.

Les moyennes portent sur 2 à 4 échantillons indépendants :
les limites de confiance pour $\alpha = 0.05$ varient comme à la figure 5.1.

En supposant que toutes les plantes, quel que soit leur âge, aient pu être incubées pendant 152 jours (période maximale d'incubation), le nombre de talles survivant à l'infection aurait représenté, d'après cette hypothèse, 40 à 50% de celui observé chez les plantes non inoculées (figure 5.1, courbe A2). Cette courbe qui exprime le niveau théorique des pertes en talles, indépendamment de la durée d'incubation, fait ressortir uniquement l'influence du stade de développement de la plante sur sa susceptibilité à Typhula. Cette influence, non significativement mesurable, est faible eu égard au paramètre étudié (nombre de talles-épi) dont les variations sont compensées par des phénomènes de croissance liés au rétablissement partiel de la culture au printemps.

5.5.3. Relation entre l'évolution des teneurs en sucres solubles des plantes d'orge en automne et leur degré d'infection par Typhula incarnata au champ

L'évolution des teneurs en sucres solubles (saccharose + glucose + fructose) durant la période d'endurcissement des plantes au froid a été comparée aux résultats d'infection résultant d'inoculations échelonnées au cours de cette même période (figure 5.1).

L'enrichissement naturel des plantes en sucres solubles augmente avec leur âge. Entre le 25ème et le 45ème jour, cet enrichissement n'améliore pas la résistance de l'orge (voisine de 50%) à T. incarnata. Entre le 45ème et le 65ème jour, l'enrichissement en sucres correspond à une augmentation de la résistance à Typhula mais, pour ces infections tardives, il est probable que le raccourcissement de la durée d'incubation (voir point 5.5.2) a limité l'incidence de la maladie, indépendamment des variations de la teneur en sucres solubles de l'orge.

5.5.4. Influence du prétraitement des plantes d'orge en chambre froide sur leur contenu en sucres solubles

Les teneurs en sucres solubles des plantes d'orge endurcies en conditions artificielles (tableau 5.3) sont nettement supérieures à celles observées dans des plantes d'orge endurcies naturellement (tableau 5.1).

Etant donné la nature des substrats utilisés (du terreau dans l'essai en chambre froide et de la terre de culture dans l'essai à l'extérieur), cette observation n'est pas en accord avec plusieurs résultats de recherche cités au point 5.3.2, montrant que les substrats pauvres sont plus favorables à l'accumulation des sucres solubles dans les plantes d'orge que les substrats riches en NPK.

Tableau 5.3 : Teneurs en sucres solubles (% de matière sèche) de plantes d'orge var. "Franka" en fonction du stade de développement atteint par les plantes avant leur endurcissement en chambre froide ; mesures effectuées avant et après endurcissement.

Stade de développement des plantes		Pré-tallage	Début tallage	Plein tallage	
Nombre de jours après le semis		12	22	33	44
<u>Feuilles et collets</u>					
Saccharose	NE	<LS ¹	0.8 ± 0.4	<LS	<LS
	E	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.6	1.2 ± 0.4
Glucose	NE	1.5 ± 0.1	<LS	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.5
	E	2.6 ± 0.2	4.1 ± 0.7	4.1 ± 1.2	5.2 ± 0.6
Fructose	NE	2.8 ± 0.5	2.7 ± 0.1	2.2 ± 0.3	1.9 ± 0.1
	E	5.4 ± 0.3	7.7 ± 0.5	7.5 ± 0.4	8.0 ± 2.1
<u>Racines</u>					
Saccharose	NE	<LS	<LS	<LS	<LS
	E	3.0 ± 0.6	5.3 ± 0.4	6.5 ± 0.5	6.6 ± 1.2
Glucose	NE	<LS	<LS	0.7 ± 0.2	<LS
	E	1.4 ± 0.2	1.9 ± 0.4	1.4 ± 0.2	<LS
Fructose	NE	<LS	<LS	1.4 ± 0.3	3.0 ± 0.8
	E	2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.5	2.3 ± 0.3	2.5 ± 1.4

NE : plantes non endurcies (avant la période d'endurcissement).

E : plantes endurcies (après une période d'endurcissement de 30 jours).

(1) valeur moyenne ± écart-type estimé (portant sur 2 à 4 échantillons indépendants). LS = 0.6 : limite de sensibilité de la méthode de mesure.

Toutefois, le substrat de culture n'est pas le seul facteur en cause; il est certain que les conditions d'endurcissement des plantes d'orge en chambre froide sont plus stables et donc plus favorables à leur enrichissement en sucres solubles que les conditions de plein air.

L'enrichissement des plantes d'orge en sucres solubles, en fonction de leur stade de développement durant l'endurcissement, est observé aussi bien en conditions naturelles (figure 5.1) qu'en chambre froide (figure 5.3).

Cet enrichissement contraste avec l'appauvrissement de la teneur en sucres solubles constaté chez les plantes les plus développées avant endurcissement. Le facteur de multiplication de la concentration en sucres solubles qui exprime le rapport entre la teneur en sucres des plantes endurcies et celle des plantes non endurcies, illustre l'allure du phénomène (figure 5.3).

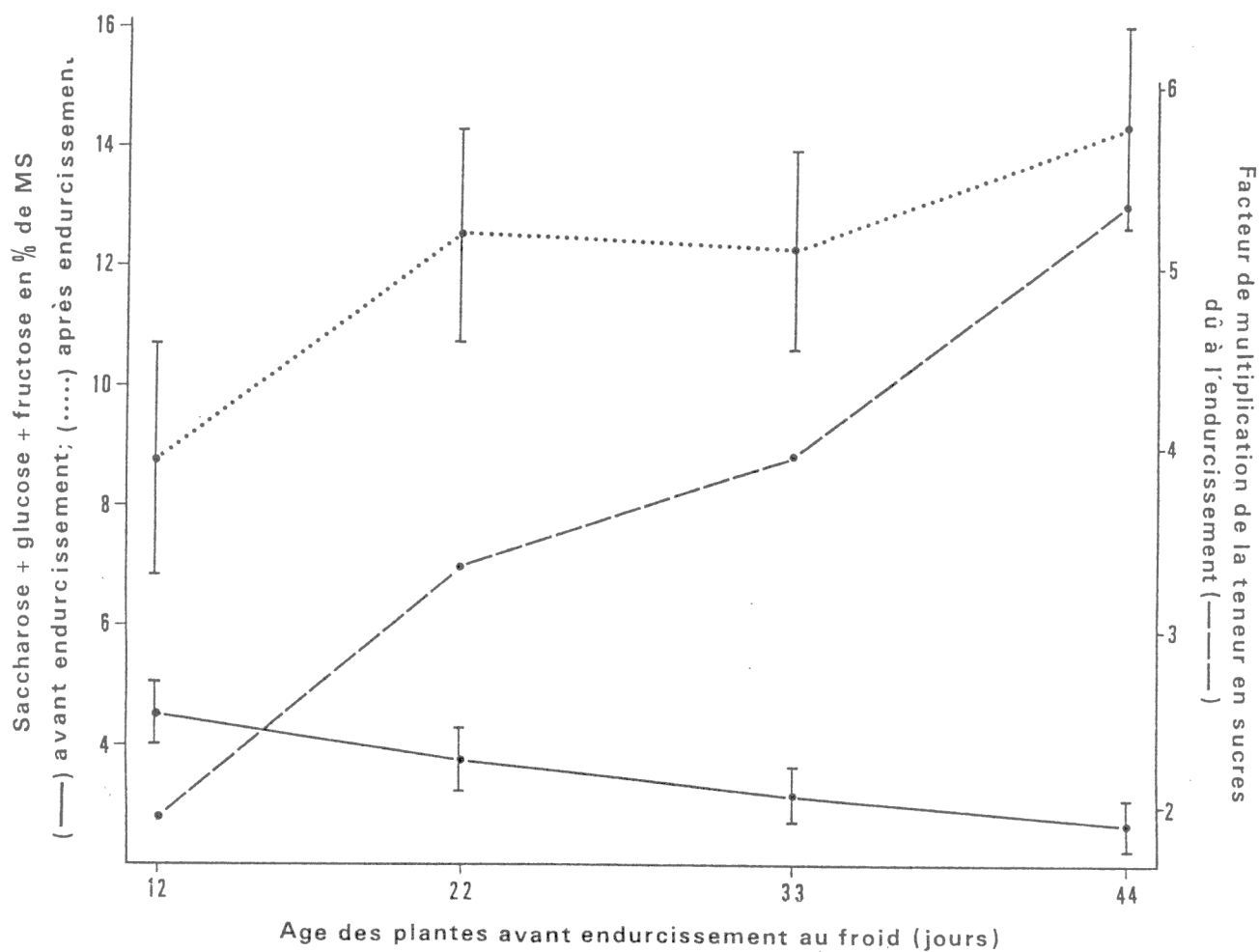


Figure 5.3 : Moyennes des teneurs en sucres solubles des feuilles et collets de plantes d'orge en fonction du stade de développement des plantes avant leur endurcissement au froid. Chaque point est assorti des limites de confiance pour $\alpha = 0.05$.

- 12ème jour après le semis : stade pré-tallage
- 22ème jour " : " début tallage
- 33ème et 44ème jour " : " plein tallage

L'analyse des sucres solubles dans les plantes d'orge après la reprise de la croissance, ne montre plus de différence entre plantes d'âges différents ni entre plantes infectées par T. incarnata et plantes saines (tableau 5.4), sauf en ce qui concerne la teneur en saccharose qui n'est pas détectable par la méthode utilisée dans les feuilles et collets des plantes saines, alors qu'elle représente en moyenne plus de 1% de la matière sèche chez les plantes infectées.

Tableau 5.4 : Evolution de la teneur en sucres solubles dans 4 semis d'orge var. "FRANKA" d'âges différents, en fonction du stade de développement atteint par les plantes avant leur endurcissement au froid (mesures effectuées 43 jours après leur sortie de chambre froide et la reprise de la croissance à l'extérieur au printemps).

Stade de développement des plantes		Pré-tallage	Début tallage	Plein tallage	
Nombre de jours après le semis		12	22	33	44
Saccharose	PS	<LS	<LS	<LS	<LS
	PI	1.3 ± 0.5 ^(*)	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.4
Glucose	PS	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.3	1.3 ± 0.1
	PI	1.3 ± 0.4	2.0 ± 0.3	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2
Fructose	PS	4.0 ± 0.9	2.3 ± 1.0	4.1 ± 1.4	3.9 ± 1.0
	PI	2.6 ± 0.6	3.5 ± 0.7	3.2 ± 0.8	3.2 ± 0.8
TOTAL des 3 sucres	PS	5.4 ± 1.1	3.5 ± 0.9	5.9 ± 1.7	5.1 ± 0.9
	PI	5.2 ± 0.8	6.9 ± 0.8	6.2 ± 1.0	5.7 ± 1.1

PS = plantes saines; PI = plantes infectées par T. incarnata.

* % de matière sèche (feuilles + collets uniquement) ± écart-type estimé (8 répétitions). LS = 0.6 : limite de sensibilité de la méthode de mesure.

5.5.5. Effet de l'âge sur la prédisposition de la plante d'orge vis-à-vis de Typhula incarnata

L'effet de l'âge et du stade de développement de l'orge sur sa résistance à T. incarnata a été évalué pour une même durée d'endurcissement des plantes au froid et ~~une durée~~ une même durée d'incubation de la maladie (figure 5.4 et 5.5).

Dans cet essai, les plantes saines les plus développées ont produit plus de talles et plus de matière sèche que les plantes moins développées.

En ce qui concerne les plantes infectées par Typhula, seul le lot de plantes ayant acquis un endurcissement au froid au stade pré-tallage (jour 12)

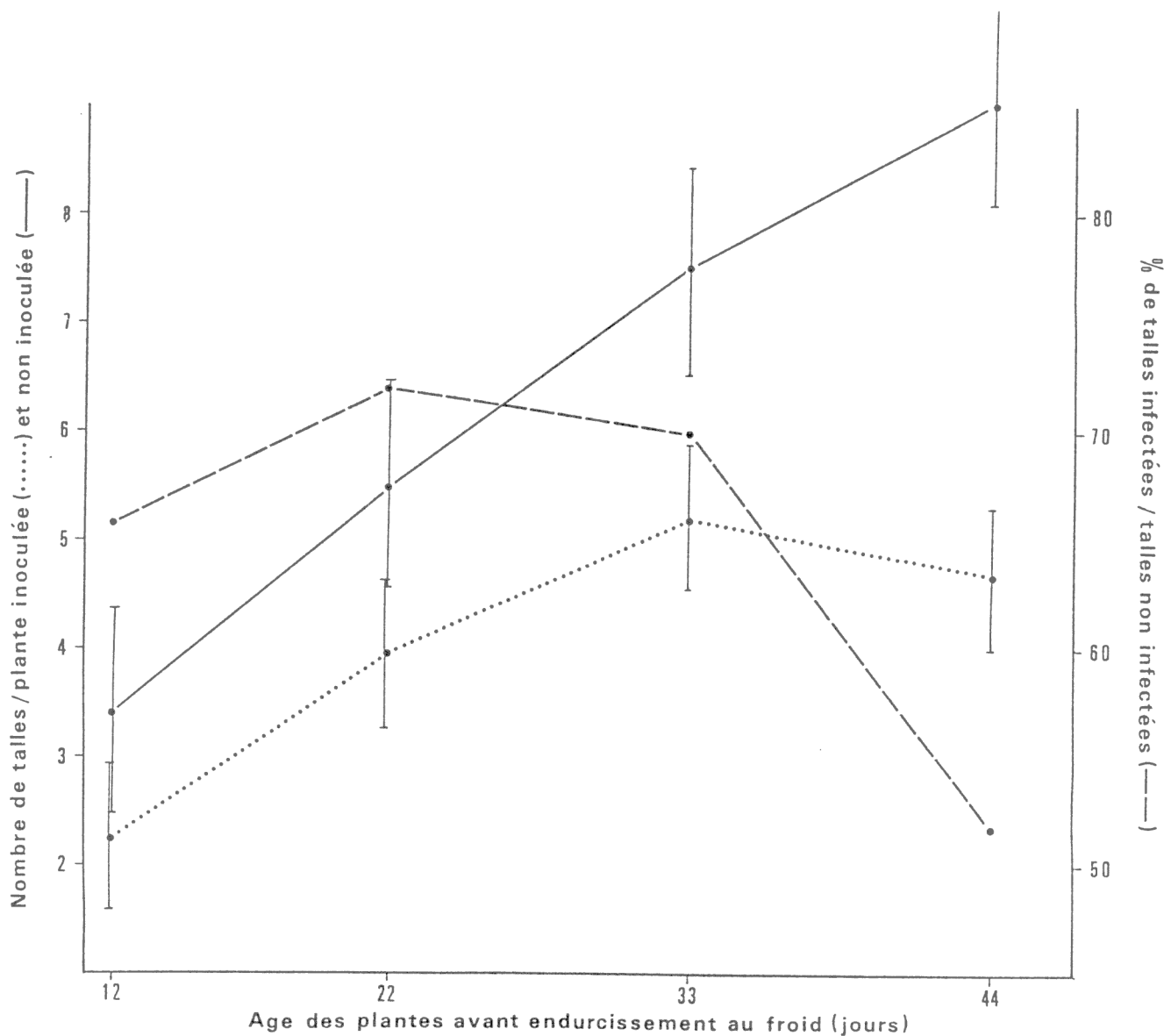


Figure 5.4 : Importance de la reprise de croissance de l'orge (mesurée par le nombre moyen de tiges, en 4 répétitions pour les plantes non inoculées et en 8 répétitions pour les plantes inoculées) en fonction du stade de développement des plantes avant leur endurcissement au froid (même légende que figure 5.3). Chaque point est assorti des limites de confiance pour $\alpha = 0.05$.

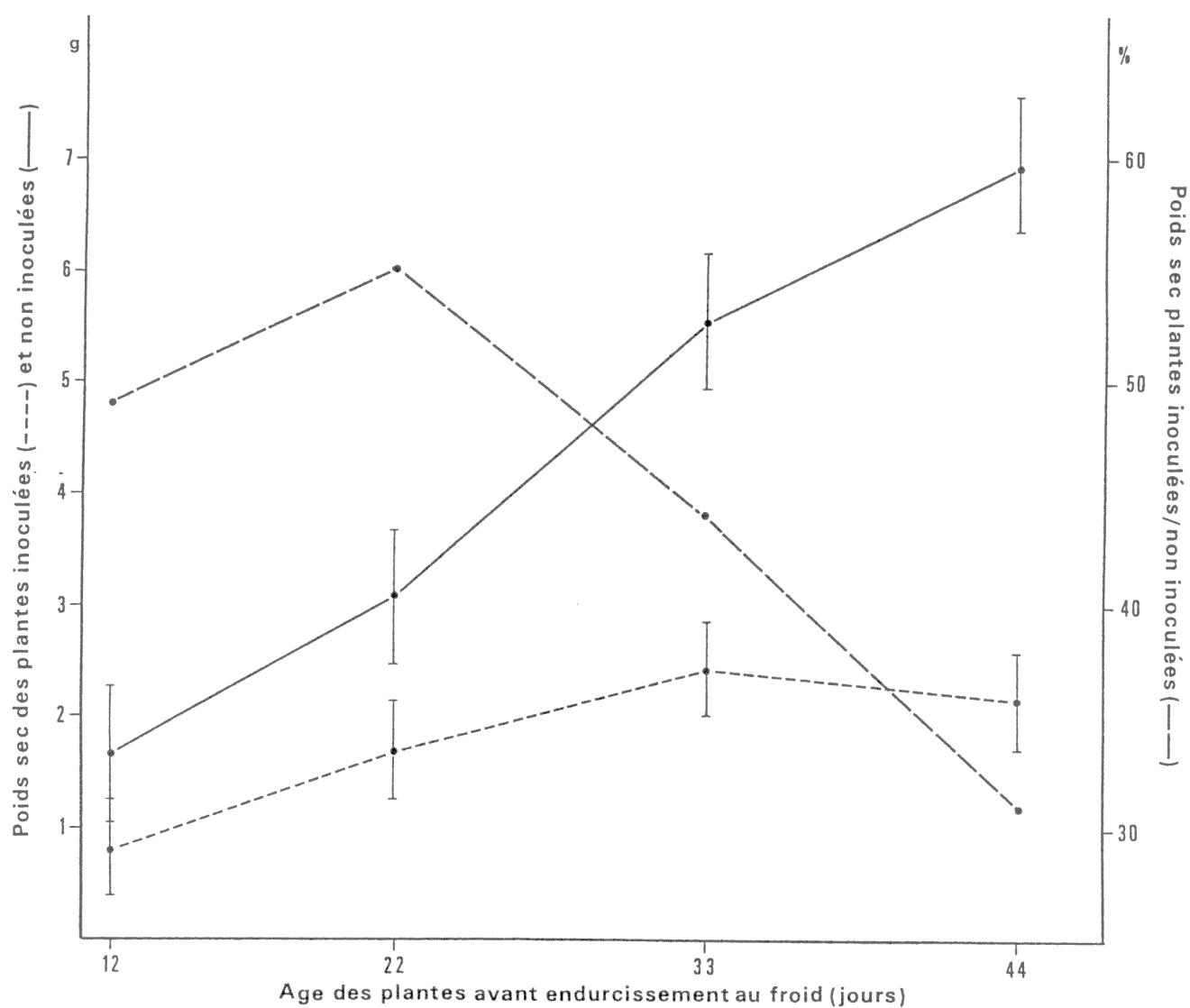


Figure 5.5 : Importance de la reprise de croissance de l'orge (mesurée par le poids sec moyen des feuilles + collets, en 4 répétitions pour les plantes non inoculées et en 8 répétitions pour les plantes inoculées) en fonction du stade de développement des plantes avant leur endurcissement au froid (même légende que figure 5.3). Chaque point est assorti des limites de confiance pour $\alpha = 0.05$.

s'est distingué significativement des 3 autres lots par sa faible croissance en poids sec (figure 5.5) en relation avec un petit nombre de talles survivantes (figure 5.4). Cependant, les plantes infectées qui se trouvaient au stade début tallage avant leur placement en chambre froide (jour 22), ont présenté le pourcentage le plus faible de réduction en poids sec (figure 5.5) et en nombre de talles (figure 5.4).

Il apparaît donc clairement que les plantes âgées, qui accumulent plus de sucres solubles que les jeunes (figure 5.3), sont également celles qui récupèrent le moins bien après une attaque de T. incarnata (figure 5.4 et 5.5).

5.6. Discussion et conclusions

Au champ, les plantes d'orge inoculées début novembre n'ont pas souffert davantage de l'infection par T. incarnata que les plantes inoculées fin novembre (figure 5.1). Etant donné qu'elles ont été soumises à la durée maximale d'incubation de la maladie, on peut en conclure que les jeunes plantes d'orge possèdent un degré de résistance supérieur à celui des plantes plus développées. D'autre part, on peut également en déduire que la taille des plantes au moment de l'inoculation n'est pas un facteur limitant de la maladie, pourvu que la durée d'incubation soit suffisamment longue. Il apparaît en effet que c'est en raison d'une durée d'incubation brève que les inoculations de décembre ont été moins dommageables sur l'orge que celles de novembre. D'une façon générale, l'incubation de T. incarnata nécessite une période plus longue au champ qu'en chambre froide, à cause des arrêts de croissance du champignon provoqués par le gel.

Si on excepte les travaux de Arsvoll (1977) sur le couple Phleum pratense - T. ishikariensis, la question de l'influence de l'âge des plantes sur la susceptibilité de l'hôte à Typhula n'avait jamais été traitée en dissociant l'effet de la durée nécessaire à l'endurcissement des plantes au froid, et celui du degré de leur développement au moment de l'inoculation du pathogène.

Le respect d'une même durée d'endurcissement des plantes et d'une même durée d'incubation de la maladie, indépendamment du stade de développement de l'orge lors de l'inoculation, a permis de montrer que, pour le couple orge d'hiver - T. incarnata, les plantes en phase de début tallage résistaient le mieux à l'infection, avec des pertes limitées en nombre de talles et en poids sec (figures 5.4 et 5.5).

La présence d'un grand nombre de talles ne constitue donc pas en soi un facteur de résistance à l'égard de T. incarnata, ce qui confirme les résultats obtenus au champ. Nos observations rejoignent en partie celles de Tomiyama

(1955), Lehmann (1965b) et Matsumoto et Araki (1982) selon lesquelles les plantes âgées, du fait de l'abondance de feuilles sénescentes, seraient plus rapidement attaquées par Typhula que les jeunes plantes. Selon ces auteurs, la sensibilité des feuilles âgées serait liée à l'épuisement de leurs réserves en glucides, spécialement à l'obscurité sous une épaisse couche de neige.

L'endurcissement naturel des plantes d'orge en automne est lié à un enrichissement progressif de leur contenu en sucres solubles (figure 5.1). L'endurcissement artificiel des plantes d'orge augmente plus rapidement encore leur teneur en sucres solubles (figure 5.3). Par rapport aux plantes non endurcies, il est frappant de constater que les plantes endurcies qui sont les plus développées accumulent davantage de sucres solubles. Toutefois, après un séjour de 3 semaines en chambre froide, les jeunes plantes (pré-tallage et début tallage) accumulent 3 à 10 fois plus de sucres solubles (dans les feuilles et collets et dans les racines respectivement) que les plantes non endurcies au même stade de développement.

Au vu des résultats d'infection en chambre froide, la résistance de l'orge à T.incarnata n'est pas corrélée avec les teneurs en sucres solubles relevées dans les plantes endurcies au froid, soit que le niveau d'endurcissement soit dans tous les cas supérieur au niveau induisant la résistance à Typhula, soit que cette résistance s'établisse indépendamment de l'enrichissement en sucres solubles des tissus de l'hôte.

Les plantes de froment d'hiver à peine levées échappent en grande partie à l'infection par T.idahoensis en raison de leur teneur élevée en glucides provenant des réserves de la semence (Bruehl, 1982). Dans nos essais, la résistance de l'orge d'hiver vis-à-vis de T.incarnata est également remarquable peu après la levée des plantes, mais elle diffère peu de la résistance de l'orge au début du tallage lorsque les photosynthétats remplacent les glucides fournis par la semence.

Kiyomoto et Bruehl (1977) établissent un rapport entre la résistance du froment à T.idahoensis et la capacité des plantes à utiliser modérément à l'obscurité les sucres solubles accumulés pendant la phase d'endurcissement au froid. Chez l'orge, nous avons constaté que les plantes âgées, bien qu'accumulant plus de sucres solubles que les plantes jeunes (figure 5.3), montraient une décroissance de la teneur en sucres solubles à l'obscurité aussi importante que celles-ci (figure 5.2).

Typhula idahoensis se multiplie aussi bien sur les feuilles des variétés de froment résistantes que sur celles des variétés sensibles (Bruehl et Cunfer, 1971). Comme pour le froment, la résistance variétale de l'orge réside probablement dans la résistance finale du plateau de tallage. La récupération

des plantes survivant à Typhula est d'ailleurs fonction de leur aptitude à former de nouvelles racines au printemps (Detiffe et al., 1983b).

Toutefois, il est difficile d'établir des comparaisons entre les résultats de nos travaux et ceux des chercheurs américains, car les méthodes d'expérimentations adoptées par ces derniers sont fort éloignées des nôtres (Cavelier et Auquier, 1980). En particulier, si nous avons réalisé nos essais d'inoculation en absence de lumière (comme Bruehl, 1967c), il est probable que la taille du plateau de tallage (conditionnant sa capacité de stockage en glucides) aurait pu avoir une incidence majeure sur la survie de l'orge à l'infection par T.incarnata.

En Belgique, les infections naturelles de T.incarnata se produisent le plus souvent en présence de lumière. Contrairement aux résultats obtenus avec le froment par Bruehl et Cunfer (1971) aux Etats-Unis, les orges jeunes, y compris celles de début tallage, résistent le mieux à l'infection par T.incarnata.

CHAPITRE 6

HEREDITE ET STABILITE DU POUVOIR PATHOGENE DE TYPHULA INCARNATA:
CARACTERISATION D'UN FACTEUR D'HYPOAGRESSIVITE

6.1. Introduction

L'"agressivité" utilisée dans le sens de "pouvoir pathogène" est une propriété intrinsèque d'une souche de champignon, dont l'expression peut être modifiée par les conditions du milieu dans lesquelles se déroule l'infection (voir chapitre 5). Cette agressivité se distingue de la "virulence" au sens de Vanderplank (1968) dans la mesure où les souches de T. incarnata ne présentent aucune interaction différentielle avec les variétés de l'hôte (Bruehl, 1967 a et b); il n'y a pas de gène de résistance connu chez Hordeum qui satisfasse à l'hypothèse gène pour gène de Flor (1971).

Hormis les résultats de nos travaux (Cavelier, 1980, 1982b, 1986b), pratiquement rien n'est connu de l'agressivité des souches de T. incarnata. Tomiyama (1955) est probablement le premier à avoir constaté que l'agressivité des souches monocaryotiques était inférieure à celle des souches dicaryotiques. Cependant, contrairement aux monocaryons de T. idahoensis (Kiyomoto et Bruehl, 1976), les monocaryons de T. incarnata sont loin d'être dépourvus d'agressivité (Lehmann, 1965b; Cavelier, 1982a, 1986b), bien qu'ils provoquent des mortalités de plantes après une durée d'incubation généralement beaucoup plus longue que celle nécessaire aux dicaryons. L'agressivité de T. incarnata peut donc être estimée à l'état haploïde, indépendamment des complémentations qui s'exercent à l'état hétérocaryotique dans le dicaryon.

Des tests de sensibilité à T. incarnata, appliqués à différentes graminées et céréales, ont été réalisés par plusieurs chercheurs avec des isolats dicaryotiques provenant d'infections naturelles, qui étaient soit maintenus en croissance sur différents substrats nutritifs, soit conservés à sec sous forme de sclérotés pendant plusieurs années. Aucune étude n'a pris en compte les changements d'agressivité qui auraient pu résulter du maintien prolongé de l'inoculum à l'état latent sur substrat nutritif, ou à l'état de sclérotés.

Plusieurs études ont mis en évidence, chez différents champignons, des variations du pouvoir pathogène résultant d'une phase d'adaptation aux conditions de vie saprophytique ou d'une phase de spécialisation parasitaire

distincte de la modification de virulence au sens de Vanderplank (1968).

La variation du pouvoir pathogène observée dans un clone monocaryotique haploïde de Verticillium alboatrum vis-à-vis de la tomate, montre l'importance de la phase saprophytique sur le comportement pathogène ultérieur de ce champignon (Boisson et Lahlou, 1982).

Certains isolats de Gaeumannomyces graminis, l'agent du piétin-échaudage, peuvent perdre leur pouvoir pathogène à la suite de transferts répétés sur milieu de culture artificiel. Toutefois, les souches adaptées à la croissance saprophytique retrouvent parfois leur pouvoir pathogène lorsqu'elles sont réisolées à partir d'une plante-hôte qu'elles ont réussi à infecter (Skou, 1984).

Le pouvoir pathogène peut également varier selon la plante-hôte-résidu sur laquelle survit l'agent du piétin-verse, Pseudocercospora herpotrichoides (Cavelier, 1973).

Enfin, la nature de l'hôte ou de l'organe infecté peut modifier le pouvoir pathogène de Septoria nodorum (Skajennikoff et Rappilly, 1983). Ces changements d'agressivité sont tantôt réversibles (transfert sur épis à partir de feuilles), tantôt apparemment irréversibles (transfert du triticales sur froment).

Chez T. incarnata, des variations morphologiques ont été mises en évidence à la suite de stress provoqués par des arrêts de croissance (Dejardin et Ward, 1971). L'agressivité des dicaryons peut diminuer après plusieurs mois de culture sur milieu artificiel (Cavelier, 1980). Le pouvoir pathogène de T. incarnata est variable lorsqu'on considère les dicaryons dérivés résultant de la reconstitution d'un dicaryon parental scindé par croisements hémicompatibles (Cavelier, 1982b).

Les facultés de variation du dicaryon (Raper, 1965), sont de nature à affecter la reproductibilité des résultats d'infection dans les essais d'inoculation artificielle. C'est pourquoi les inocula dicaryotiques sont toujours renouvelés à partir d'un croisement récent entre les souches monocaryotiques parentales, beaucoup plus stables (Cavelier, 1986b).

En ce qui concerne l'hérédité de l'agressivité chez T. incarnata, on peut faire des hypothèses par analogie avec le comportement de T. idahoensis, dont l'étude sur froment d'hiver a conduit aux conclusions suivantes (Kiyomoto et Bruehl, 1976):

- les dicaryons de champ présentent une grande diversité d'agressivité;
- il n'y aurait pas de relation gène pour gène entre l'hôte et le pathogène;
- il n'y aurait pas de lien entre les gènes d'incompatibilité et les gènes

d'agressivité;

- la ségrégation en F1 et F2, à partir d'un isolat de champ, produit un spectre complet d'agressivité, compatible avec une hérédité quantitative de celle-ci.

Le présent chapitre analyse le pouvoir pathogène de T. incarnata à partir de souches sélectionnées dont l'agressivité a déjà été éprouvée (Cavelier, 1986b).

6.2. Caractérisation d'une souche hypoagressive.

Parmi les souches qui ont fait l'objet de nos investigations (Cavelier et Auquier, 1980), la souche suisse CH4 provenant de l'isolat n° 4 (Schmidt, Station fédérale de Changins, Suisse) apparaît intéressante à plusieurs points de vue. Testée à Gembloux sur orge et froment d'hiver, cette souche s'est révélée être nettement moins agressive que la souche dérivée de l'isolat belge M (Milmort) tant sur base de la mortalité des plantes atteintes que sur base du nombre de sclérotés formés sur les plantes survivantes (Cavelier, 1980).

La culture monocaryotique 4CH4 de formule A5B17, obtenue à partir de cette souche, possède le phénotype fc_b (Cavelier, 1985) qui implique une perte du pouvoir pathogène du champignon (Cavelier, 1982a). Mais contrairement aux souches B2 affectées par le caractère fc_b, la souche 4CH4 produit toujours des dicaryons complètement non agressifs, même lorsqu'elle est associée avec des souches dont l'agressivité à l'état monocaryotique est très élevée (Cavelier, 1986b).

L'analyse de la descendance du dicaryon doublement fc_b (4CH4 + 56Gb) a montré que ce caractère affectait toutes les souches B17, mais seulement une seule souche B2 (tableau 6.1). La faible transmission héréditaire du caractère fc_b via les souches B2 est à mettre en rapport avec l'instabilité de ce caractère dans les cultures in vitro (Cavelier, 1982a). La forme culturale brune liée à B17 et affectant la souche 4CH4 paraît beaucoup plus stable que son homologue B2. Aucune autre souche B17 issue de la sporée de la souche CH4 n'a été affectée par le caractère fc_b.

L'étude de la souche 4CH4 soulève une série de questions:

- la faible agressivité de la souche-mère CH4 résulte-t-elle d'un affaiblissement de son potentiel d'infection à la suite de sa culture prolongée in vitro, comme des résultats avec d'autres souches le laisseraient supposer (Cavelier, 1980)?
- Le manque d'agressivité de la souche 4CH4, résulte-t-il de la faible

agressivité de la souche mère CH4 ?

- Le caractère fc_b, spontanément apparu dans la souche 4CH4 (Cavelier, 1985), masque-t-il une agressivité potentielle ?
- Quelle est l'agressivité de la descendance de la souche 4CH4 ?

Tableau 6.1. Héritéité du facteur fc_b de *I. incarnata* en fonction de l'origine allélique du facteur d'incompatibilité B.

Croisement	4CH4 (A5B17 <u>fc_b</u>) + 56Gb (A1B2 <u>fc_b</u>)			
	A5B17	A1B2	A5B2	A1B17
Souches-filles				
Nombre de souches <u>fc_b</u>	6	0	1	4
Nombre de souches <u>fc_b</u> ⁺	0	2	7	0

6.3. Quelle est l'agressivité des monocaryons issus de la souche (4CH4+74Gn)?

L'obtention d'un dicaryon hypoagressif à partir de la souche non agressive (4CH4, A5B17 fc_b) et de la souche agressive (74Gn, A2B2 fc_b⁺) nous a fourni l'occasion d'analyser la ségrégation de l'agressivité dans les produits monocaryotiques résultant de la méiose. Comme la moitié des spores issues de la fructification contenaient le gène B17 qui implique la présence du caractère fc_b, dont le phénotype est obligatoirement non agressif, seules les souches B2 ont été analysées. Au total, 35 souches A5B2 et 49 souches A2B2, dont la souche parentale 74Gn, ont été testées. Une souche fc_b A5B17 (n°129) a été également incluse dans l'essai à titre de témoin non agressif (tableau 6.2).

La distribution des poids secs des plantes inoculées à la fin de la période de récupération a été ajustée à une distribution normale (fig.6.1: $\chi^2_{\text{obs}} = 8.7 < \chi^2_{0.95} = 11.1$). Outre la variabilité de l'agressivité du pathogène, cette distribution traduit la variation de la réponse à l'inoculation en fonction des conditions fluctuantes régnant en chambre froide et des légères différences au niveau de la prédisposition des plantes, ce qui est inévitable, même dans un semis très homogène.

Bien que les différences d'agressivité entre monocaryons ne puissent être analysées statistiquement, faute de répétition, il est intéressant de noter que les valeurs extrêmes de la distribution sont celles qui correspondent d'un côté à l'infection sévère provoquée par la souche parentale agressive (74Gn) et de l'autre côté à l'absence d'infection du témoin non inoculé.

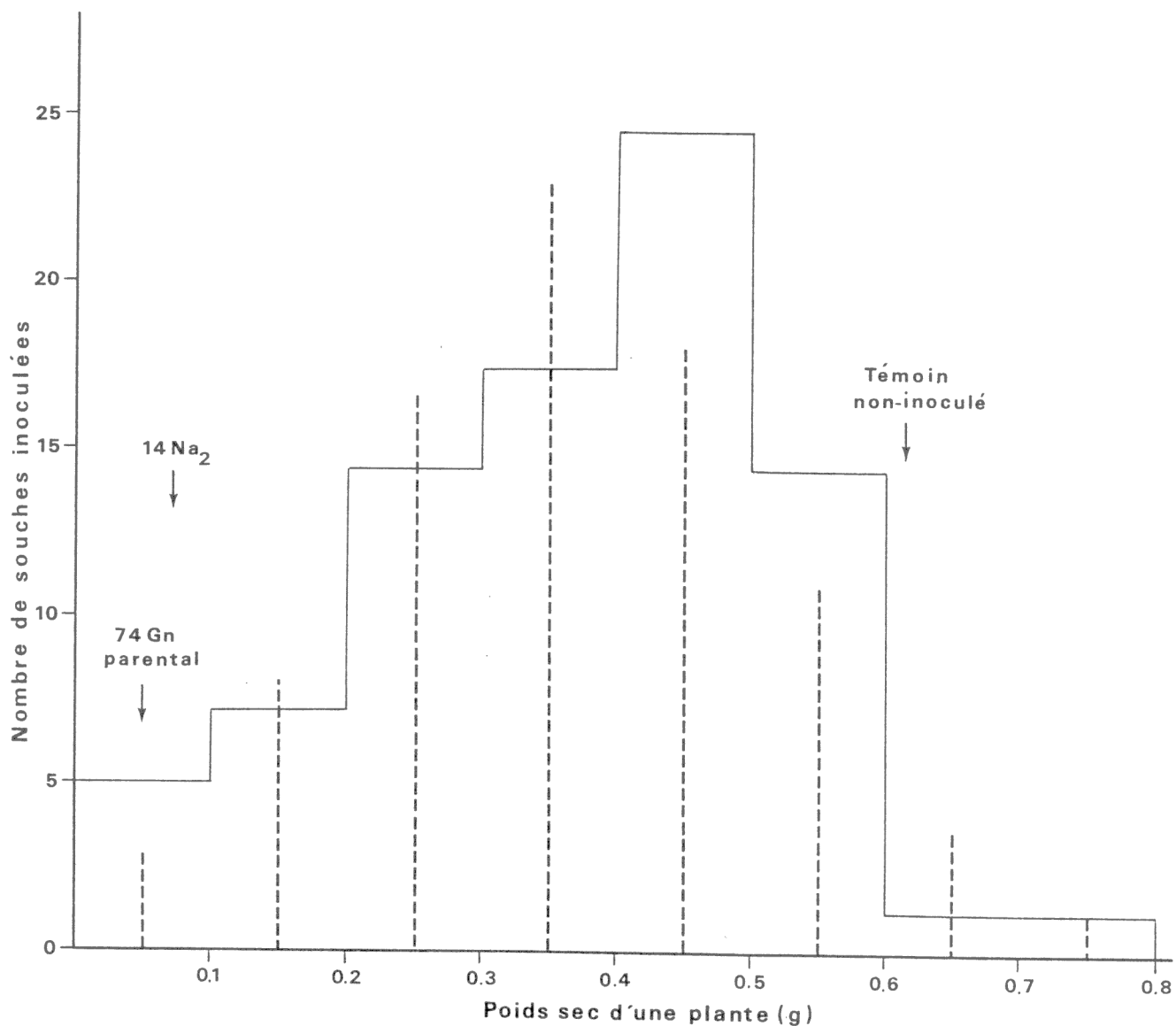


Figure 6.1 : Distribution de fréquence du poids sec des plantules d'orge d'hiver inoculées par 83 souches monocaryotiques de *Typhula incarnata*, A2B2 et A5B2 confondues, provenant de la mise à fruit du dicaryon non agressif Na2 (4CH4 + 74Gn). Pour les conditions de l'essai, voir tableau 6.2.

- en trait plein : distribution observée.
- en trait interrompu : ajustement à une distribution normale.

Tableau 6.2. Agressivité moyenne des souches monocaryotiques de *T. incarnata* issues du croisement 4CH4 (A5B17 fcb) + 74Gn (A2B2 fcb⁺),

Type de monocaryon	Nombre de souches testées	Poids sec des plantes inoculées en % du témoin non inoculé (variété Gerbel)
A5B2 <u>fc</u> b ⁺	35	62 ± 8.8
A2B2 <u>fc</u> b ⁺	48	57 ± 6.4
74Gn (A2B2 <u>fc</u> b ⁺)	1	5
n° 129 (A5B17 <u>fc</u> b)	1	85

Age des plantules d'orge avant endurcissement au froid: 21 jours.
 Durée d'endurcissement des plantes à 2-4°C : 67 jours.
 Durée d'incubation de la maladie en chambre froide: 84 jours.
 Période de récupération à l'extérieur en septembre-octobre: 23 jours.

6.4. Analyse des générations F1 issues des dicaryons hypoagressifs résultant des croisements entre les monocaryons agressifs (74Gn et 59G) et le monocaryon non agressif (4CH4).

6.4.1. Hypothèse de travail.

La descendance issue de la mise à fruit de (4CH4 + 74Gn) et de (4CH4 + 59G) se compose de 50 % de monocaryons fcb et de 50 % de monocaryons fcb⁺ (Cavelier, 1985). Comme ce caractère est lié au facteur d'incompatibilité B, les seuls croisements possibles ont été fcb x fcb⁺.

En supposant que la non agressivité soit dominante mais non liée à l'allèle fcb, la descendance monocaryotique devrait être composée de:

- 25 % de fcb de type (a), agressivité récessive inhibée par le gène fcb;
- 25 % de fcb de type (Na), non agressif dominant;
- 25 % de fcb⁺ de type (a), agressivité exprimée à l'état monocaryotique;
- 25 % de fcb⁺ de type (Na).

Dans cette hypothèse, les croisements fcb x fcb⁺ produiraient plus de 3/4 de dicaryons totalement non agressifs, c'est-à-dire tous les produits contenant l'allèle Na (3/4 des croisements) auxquels s'ajoutent les produits non agressifs des croisements (a + a) résultant de la variation quantitative de l'agressivité dans une population normale.

Par contre, si le gène dominant de non agressivité était lié au facteur fcb, c'est la F1 tout entière qui serait non agressive.

5.4.2. Réalisation du test d'agressivité portant sur les générations F1

L'essai a été réalisé au champ sur la variété d'orge d'hiver "Franka" avec 152 produits de croisements différents pour la F1 de (4CH4 + 74Gn) et 74 produits de croisements pour la F1 de (4CH4 + 59G).

Chacune des F1 a été répartie au hasard à l'intérieur de parcelles par inoculation de fractions de ligne de 80 cm (8 lignes-test/parcelle) disposées géométriquement autour de lignes-témoin inoculées ou non par une des souches de référence. Ces lignes-témoin étaient réparties d'une parcelle à l'autre selon un schéma en carré latin incomplet (Lin et Poushinsky, 1983) ce qui permettait de mesurer la variabilité entre parcelles (fig. 6.2). Le dispositif comprenait en outre des lignes-témoin supplémentaires (en lieu et place de lignes-test) afin d'estimer la variabilité à l'intérieur des parcelles elles-mêmes.

Le dispositif en (4 x 5) de la F1 de (4CH4 + 74Gn) comprenait les témoins suivants:

- n° 1 (69G + 59G)
- n° 2 (59G + 16-3C10)
- n° 3 (4CH4 + 74Gn), souche parentale non agressive
- n° 4 témoin non inoculé.

Le dispositif en (3 X 4) de la F1 de (4CH4 + 59G) comprenait les témoins suivants:

- n° 1 (4CH4 + 59G), souche parentale non agressive
- n° 2 (74Gn + 59G), souche normalement agressive (Cavelier, 1986b)
- n° 3 témoin non inoculé.

Les inoculations ont été réalisées le 31/10/1984 pour la F1 (4CH4 + 74Gn) et le 08/11/1984 pour la F1 (4CH4 + 59G) à raison de 0.4 g de sclérotés/80 cm de fraction de ligne inoculée.

Un mois avant la récolte, on a relevé le nombre de talles-épi par fraction de ligne de 80 cm, ce facteur de rendement étant celui qui est le plus influencé par la maladie à Typhula (Cavelier et Maroquin, 1980). Le rapport entre le nombre de talles au mois de juin et le nombre de plantes inoculées en automne a également été calculé.

6.4.3. Résultats

La variance observée à l'intérieur des parcelles est du même ordre de grandeur que la variance observée entre les parcelles. L'ajustement des résultats, en tenant compte de l'arrangement particulier du dispositif expérimental

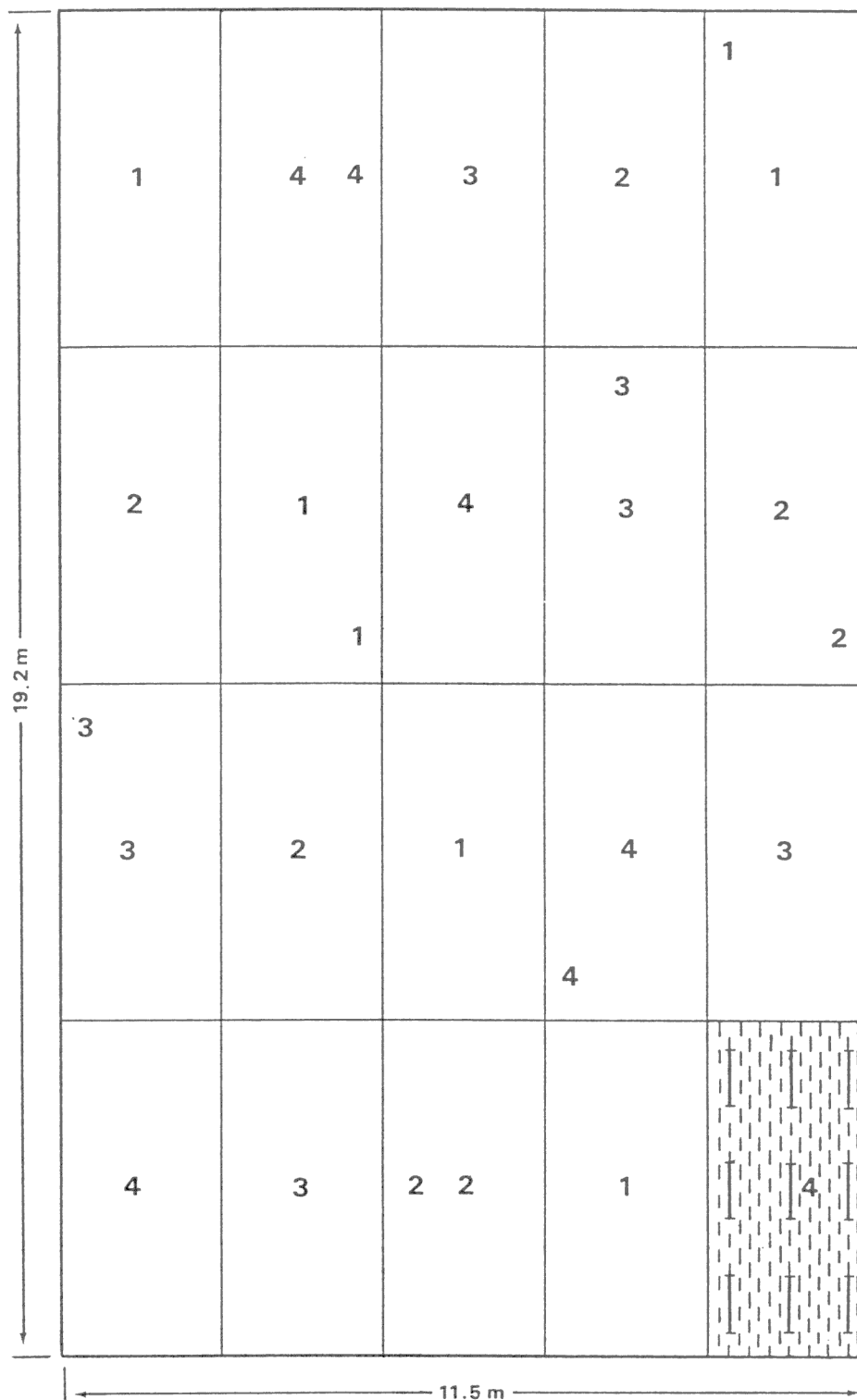


Figure 6.2 : Dispositif en carré latin incomplet réalisé au champ pour tester l'agressivité de 152 dicaryons F1 (4CH4 + 74Gn) de *Typhula incarnata* sur la variété d'orge d'hiver "Franka" : les fractions de ligne inoculées (9 par parcelle) sont séparées entre elles par 4 lignes de culture non inoculées : les numéros 1 à 4 sont ceux attribués aux fractions de lignes-témoins de l'essai (voir texte)

s'avère donc sans intérêt. Par conséquent, l'estimation de l'erreur expérimentale est basée sur l'estimation de la variance se rapportant à chacun des témoins, quelle que soit sa localisation dans l'essai comme si le schéma expérimental avait été complètement aléatoire (tableau 6.3).

Tableau 6.3 : Comparaison des lignes d'orge d'hiver var.FRANKA inoculées par la F1 de (4CH4 + 59G) et par deux souches de référence de Typhula incarnata.

	Nombre de talles-épi /80 cm	Nombre de talles-épi /Nbre plantules à la levée (x 100)
Valeurs moyennes des lignes-témoins		
4CH4 + 59G (1)	64.8	195.0
746n + 59G (2)	52.6	146.9
Témoin non inoculé (3)	64.7	172.7
Plus petites différences significatives ($\alpha = 0.05$)		
- Comparaison des moyennes entre lignes - témoins		
(1) - (2)	11.8	33.6
(1) - (3)	12.3	35.0
(2) - (3)	12.7	36.1
- Comparaison des moyennes entre lignes - témoins et lignes - tests		
(1)	24.2	68.8
(2)	24.4	69.4
(3)	24.7	70.1
- Comparaison entre deux lignes - tests		
	32.3	91.7

Les plantes d'orge infectées par les souches F1 de *T. incarnata* présentent une variation continue du nombre de talles-épi qui est semblable à celle observée chez les plantes témoins non inoculées ou chez les plantes inoculées par les souches parentales (4CH4 + 74Gn) et (4CH4 + 59G) (fig. 6.3 et 6.4). L'agressivité des monocaryons entrant dans la composition de la F1 (4CH4 + 74Gn) ne peut donc pas être déduite des résultats d'infection (tableau 6.4). La descendance F1 apparaît homogène dans ses effets sur l'orge d'hiver au champ dans la mesure où la non agressivité qui affecte tous les dicaryons testés est dominante et liée à l'allèle *fcB* B17.

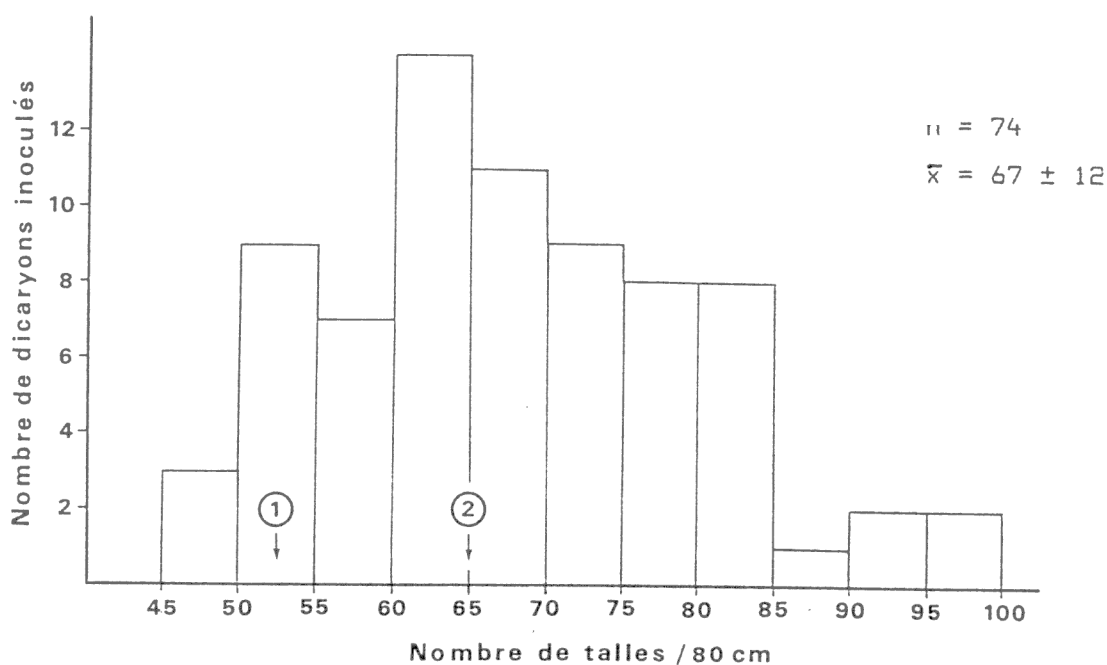


Figure 6.3: Distribution de fréquence du nombre de talles-épi par fraction de ligne de culture de 80 cm résultant de l'inoculation par les dicaryons F1 (4CH4 + 59G) de *T. incarnata* (voir tableau 6.3).

1. Moyenne du témoin-souche agressive.
2. Moyenne du témoin non-inoculé \approx moyenne du témoin-souche parentale.

6.4.4. A propos de la reproductibilité des résultats d'infection par les souches témoins de référence.

L'interprétation des essais au champ doit prendre en compte le fait que les souches agressives de référence (69G + 59G, 16-3C10 + 59G) et dans une moindre mesure (74Gn + 59G) se sont révélées être peu ou pas agressives.

La viabilité des sclérotés utilisés comme inoculum ne peut être mise en

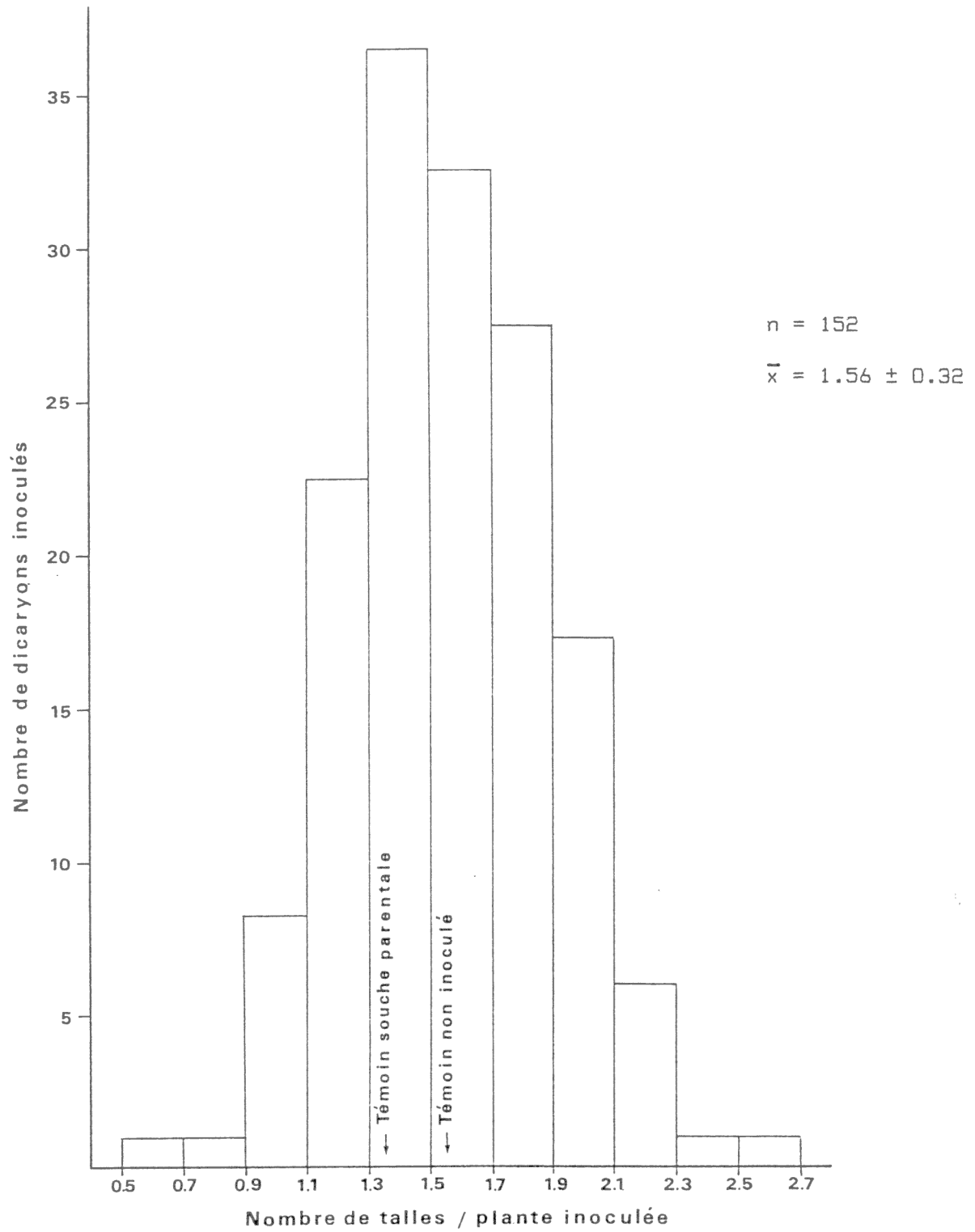


Figure 6.4 : Histogramme de fréquence portant sur le nombre de talles-epi à la récolte par rapport au nombre de plantules inoculées en automne par les dicaryons F1 (4CH4 + 74Gn) de *Typhula incarnata*.

Tableau 6.4 : Effet respectif des monocaryons de *Typhula incarnata* entrant dans la composition de la F1 (4CH4 + 74Gn)

Identification du monocaryon	Nbre de dicaryons testés ayant ces monocaryons en commun	Nbre de talles-épi à la récolte par plante inoculée en automne par ces dicaryons
N° 33 A5B17	3	1.32 ± 0.30 ¹
30 A2B17	6	1.33 ± 0.43
8 A2B2	9	1.39 ± 0.21
28 A5B17	10	1.40 ± 0.32
29 A5B17	7	1.41 ± 0.34
11 A2B17	10	1.42 ± 0.39
24 A2B2	9	1.42 ± 0.31
32 A2B2	9	1.44 ± 0.29
10 A5B2	7	1.46 ± 0.29
15 A2B17	6	1.46 ± 0.18
20 A2B17	5	1.46 ± 0.39
14 A5B2	11	1.47 ± 0.36
1 A5B2	9	1.48 ± 0.34
2 A2B2	7	1.49 ± 0.23
12 A2B17	5	1.49 ± 0.31
4 A5B17	13	1.50 ± 0.32
36 A2B2	5	1.50 ± 0.29
31 A5B17	10	1.53 ± 0.28
34 A2B2	8	1.53 ± 0.23
6 A5B17	8	1.55 ± 0.26
23 A5B17	9	1.56 ± 0.27
27 A2B17	6	1.59 ± 0.30
9 A5B2	11	1.61 ± 0.34
21 A2B17	4	1.61 ± 0.30
25 A2B2	6	1.61 ± 0.34
35 A2B2	5	1.62 ± 0.30
22 A5B2	11	1.64 ± 0.33
3 A2B17	8	1.66 ± 0.25
7 A2B2	9	1.67 ± 0.25
16 A5B17	10	1.67 ± 0.22
13 A2B17	6	1.68 ± 0.24
26 A2B2	8	1.70 ± 0.39
5 A5B17	14	1.74 ± 0.32
19 A5B2	11	1.74 ± 0.43
17 A2B17	6	1.76 ± 0.31
18 A2B17	4	1.94 ± 0.53
Témoin non inoculé	7	1.54 ± 0.32

1. moyenne ± écart-type estimé.

cause, toutes les souches testées ayant été reconnues fertiles suite à la formation de nombreuses clavules en automne.

Des observations effectuées au moment de la récolte ont montré qu'à quelques exceptions près, seules les souches de référence antérieurement agressives avaient formé des sclérotés sur les plantes inoculées. Une partie de ces sclérotés ont été récoltés afin de tester leur éventuelle agressivité après passage sur la plante-hôte (voir point 6.5).

L'inocuité des souches agressives de référence pourrait être attribuée à un manque de susceptibilité des plantes d'orge; cette hypothèse ne peut cependant être retenue puisque, dans le même champ, la souche (9P + 59G) a provoqué de fortes infections, même en inoculation tardive début décembre (voir chapitre 5).

D'autre part, la présence d'une multitude de spores produites par les souches non agressives dans le voisinage immédiat des souches de référence aurait pu provoquer un mélange de souches susceptible d'inhiber le potentiel d'infection des souches les plus agressives. Ce risque cependant est pratiquement inexistant, étant donné que les sclérotés constituant la majeure partie de l'inoculum, sont impliqués dans la contamination avant les basidiospores (règle du premier occupant: Cavelier, 1986b), ces dernières ne pouvant interférer que par le biais de croisements avec des souches réceptrices (chapitre 4) où leur contenu génétique est très dilué.

L'inoculum du dicaryon (59G + 16-3C10) qui, à l'instar du dicaryon obtenu à partir du croisement inverse, aurait dû être agressif (Cavelier, 1986b), s'est montré non agressif dans un essai où il se trouvait cependant à proximité d'un inoculum responsable de graves infections (souche Slins, chapitre 7). Ces observations démontrent que les basidiospores des souches inoculées à proximité l'une de l'autre, ne peuvent interférer sur le niveau respectif des infections causées par ces souches.

La perte d'agressivité des souches (16-3C10 + 59G) et (69G + 59G) semble constituer un phénomène intrinsèque à ces souches et ne résulte pas d'un environnement contraire à l'expression de leur potentiel d'infection.

Pour vérifier cette hypothèse, une partie aliquote d'un lot de sclérotés ayant servi à l'inoculation des souches de référence au champ, a été testé en chambre froide sur les variétés "Franka" et "Gerbel", sans la présence de basidiospores et sans endurcissement préalable des plantes au froid, afin de mesurer le potentiel maximal d'agressivité de ces souches.

Les résultats sont comparables à ceux obtenus au champ (tableau 6.5). L'absence d'endurcissement au froid augmente le degré d'infection provoqué par la souche (74Gn + 59G) (fig. 6.5A) et crée les conditions favorables à la

formation de sclérotés sur les gaines foliaires des plantes inoculées par la souche non agressive (4CH4 + 74Gn) (fig. 6.5B). Celle-ci induit le brunissement caractéristique de la base des plantes (Cavelier, 1982a) lié à l'activité du gène fc porté par 4CH4, permettant à l'infection de demeurer superficielle. Les deux autres souches précédemment agressives mais ayant perdu leur agressivité au champ (16-3C10 + 59G et 69G + 59G), ne produisent pas de symptôme sur les plantes en chambre froide. On peut considérer qu'elles ont perdu toute agressivité étant donné les conditions de l'expérimentation très favorables à l'infection puisque les plantes n'étaient pas endurcies au froid. Ce manque total d'agressivité se vérifie non seulement sur "Franka", mais également sur "Gerbel" dont le niveau de sensibilité à Typhula incarnata est pourtant élevé (Mielke, 1984).



Figure 6.5A : Effet de l'inoculation de la souche agressive (74Gn + 59G) de Typhula incarnata sur plantes d'orge non endurcies au froid: chlorose des gaines foliaires et flétrissement des plantes par attaque du plateau de tallage.



Figure 6.5B : Effet de l'inoculation de la souche non agressive (4CH4 + 74Gn) de *Typhula incarnata* sur plantes d'orge non endurcies au froid: brunissement caractéristique des gaines foliaires extérieures sous l'effet de la toxine *fc*_b; formation de sclérotés mais résistance élevée des plantules à l'infection.

La cause des pertes d'agressivité des inocula de sclérotés n'est pas connue, mais il semble qu'elle soit liée à la durée de leur conservation à sec après leur production, en relation avec la capacité variable des souches à tirer parti de leur base nutritive. A cet égard, il faut signaler que les sclérotés des générations F1 ont été produits peu de temps avant leur utilisation au champ, tandis que les sclérotés des souches de référence faisaient partie d'un lot qui avait déjà été utilisé comme inoculum un an auparavant.

Tableau 6.5. Agressivité en chambre froide des inocula de T. incarnata utilisés au champ comme souches de référence dans les lignes-témoins des essais d'inoculation des F1

Souches de <u>Typhula incarnata</u> ¹	Poids sec des plantes d'orge d'hiver (g) à la fin de la période de récupération	
	Var. "Franka"	Var. "Gerbel"
(74Gn + 59G)	0.48 ± 0.44 ^a	0.07 ± 0.08
(69G + 59G)	1.61 ± 0.51	1.76 ± 0.63
(16-3C10 + 59G)	1.66 ± 0.46	1.97 ± 0.32
(4CH4 + 74Gn)	2.09 ± 0.62	1.93 ± 0.74
Témoin non inoculé	2.06 ± 0.53	2.48 ± 0.45

1. Inoculation de 3 sclérotés/plante/souche.
2. Poids sec des feuilles vertes pour un pot comprenant 5 plantes inoculées (6 répétitions: moyenne ± écart-type estimé).

Age des plantules au moment de l'inoculation : 23 jours sans endurcissement au froid.

Durée d'incubation de la maladie: 63 jours en chambre froide.

Durée de récupération: 15 jours pendant le mois de juillet.

6.5. Stabilité de l'agressivité des souches de Typhula incarnata

Les essais ci-dessus montrent que les sclérotés produits in vitro sur grains stérilisés et conservés à sec peuvent, chez certaines souches, perdre leur agressivité au bout d'un an, sans perdre pour autant leur vitalité comme en témoignent les carpophores produits au moment de la germination.

Des pertes d'agressivité ont également été observées chez certains dicaryons après leur croissance prolongée sur milieu artificiel (Cavelier, 1980).

Nous avons recherché si le potentiel d'agressivité de ces souches pouvait s'exprimer après passage sur l'hôte sensible. L'essai présenté au tableau 6.6 consistait à tester en chambre froide l'agressivité de sclérotés récoltés au champ en provenance de l'essai relatif aux générations F1 (point 6.4). Comme souches témoins, on a réutilisé l'inoculum de sclérotés des souches (74Gn + 59G) et (4CH4 + 74Gn) ayant servi comme souches de référence au champ, et dont l'agressivité avait été contrôlée en chambre froide sur plantes non endurcies au froid (tableau 6.5). Une souche témoin très agressive au champ (souche Slins: voir chapitre 7), a également été incluse dans le présent essai qui

Tableau 6.6 : Contrôle en chambre froide de l'agressivité de certains inocula et de différentes récoltes de sclérotés prélevés sur des plantes d'orge d'hiver infectées par *Typhula incarnata*.

Inocula (1)		Résultats d'infection (2)		
produits sur	nature	Nombre de plantes survivantes	Poids sec moyen par pot(3)	
grains d'orge stérilisés	74Gn + 59G	25/30	0.69	b
"	4CH4 + 74Gn dénommé Na2	29/30	1.02	c
"	souche SLINS	20/30	0.46	ab
plantes infectées au champ	n°104 origine (14Na2 x 12Na2)	30/30	1.06	c
"	n°89 origine (69G + 59G)	29/30	0.97	c
"	n°156 "	20/30	0.54	ab
"	n°131 origine (59G + 16-3C10)	15/30	0.38	a
"	n°175 "	23/30	0.71	b
Témoin non inoculé		30/30	1.14	c

(1) Inoculum de 2 sclérotés/plante (5 plantes/pot, 6 répétitions)

(2) - âge des plantes avant endurcissement au froid : 17 jours
 - période d'endurcissement avant inoculation : 11 jours
 - période d'incubation de la maladie en chambre froide : 73 jours
 - période de récupération à l'extérieur (octobre-novembre) : 25 jours

(3) Poids sec (g) de la biomasse verte à la fin de la période de récupération: les moyennes suivies par une même lettre ne sont pas statistiquement différentes entre elles au niveau 0.05 (test de Newman et Keuls).

diffère essentiellement du précédent (tableau 6.5) par le fait que les plantes sont demeurées 11 jours en chambre froide avant d'être inoculées.

Les résultats d'infection relatifs aux souches témoins (74Gn + 59G), (4CH4 + 74Gn) et Slins sont conformes à ceux obtenus antérieurement.

Au champ, la souche (74Gn + 59G) avait été la seule souche de référence à montrer une certaine agressivité (fig.6.3) alors que les deux autres, (69G + 59G) et (16-3C10 + 59G), en étaient totalement dépourvues, comme confirmé par l'essai en chambre froide, sans durcissement préalable des plantes au froid (tableau 6.5). Après 11 jours d'endurcissement des plantes au froid, l'inoculum (74Gn + 59G), issu du même lot de sclérotés, était toujours agressif (tableau 6.6), ce qui indique que le potentiel d'infection de cette souche n'a pas été altéré par la conservation des sclérotés à sec pendant deux ans, contrairement aux deux autres souches précitées.

L'isolat n° 104 provient d'une des rares récoltes de sclérotés de seconde génération produites par les souches F1 non agressives (point 6.4). Seul cet isolat, issu du croisement (14Na2 x 12Na2)*, nous a fourni suffisamment de sclérotés pour effectuer une inoculation en chambre froide; à l'instar de la souche parentale au champ, cette souche de seconde génération s'est révélée être totalement non agressive (tableau 6.6).

Enfin, les sclérotés parfois très nombreux, résultant des infections de l'orge par les souches (69G + 59G) et (59G + 16-3C10), se sont montrés très agressifs après inoculation en chambre froide dans 3 cas sur 4 (tableau 6.6), surpassant de loin le niveau d'agressivité des souches parentales qui n'avaient pas été dommageables au champ (point 6.4). Les sclérotés formés sur des plantes d'orge inoculées par une souche de T.incarnata sont donc potentiellement plus agressifs que les sclérotés de cette même souche produits in vitro, surtout quand l'infection a été initiée par un inoculum relativement ancien (1 an ou plus).

6.6. Agressivité des dicaryons obtenus par croisement du monocaryon 59G avec les monocaryons fc^b produits par le dicaryon (4CH4 + 74Gn).

Les dicaryons de la génération F1 (4CH4 + 74Gn) étant totalement non agressifs du fait de l'omniprésence du caractère fc^b lié à l'allèle B17 (voir point 6.4), on s'est assuré de l'agressivité de leurs composantes B2 en les croisant avec un monocaryon commun, la souche 59G (A1B1), connue pour produire des dicaryons agressifs avec 74Gn, 69G, 16-3C10 et 9P (Cavelier, 1986b).

* Na2 = souche (4CH4 + 74Gn)

12 et 14Na2 = descendants monocaryotiques n°12 et 14 de Na2.

L'objectif était de vérifier la présence des gènes d'agressivité mis en évidence lors de l'analyse des souches B2 à l'état monocaryotique (voir point 6.3).

La figure 6.6 (nombre de talles (I) et poids sec (I) des plantes inoculées à la fin de la période de récupération) montre qu'un grand nombre de dicaryons (59G x souche B2) sont agressifs et que l'allure unimodale des histogrammes de fréquence est comparable à celle de la figure 6.1 relative à la population monocaryotique B2.

Le manque d'agressivité de la F1 (4CH4 + 74Gn) résulte donc bien de la présence de l'allèle B17 dans tous les dicaryons testés et non de la présence de gènes de faible agressivité dans les souches de type B2.

Cependant, les résultats d'infection relatifs à la population monocaryotique (fig. 6.1) ne sont pas corrélés à ceux de la population dicaryotique correspondante (fig. 6.6) ($r = 0.04$), ce qui suppose que l'agressivité est contrôlée en l'occurrence par des combinaisons particulières de gènes récessifs propres à chacun des croisements.

6.7. Conclusions relatives à la souche 4CH4.

Si la faible agressivité de la souche CH4 résulte d'une perte du potentiel d'infection de son inoculum (comme on l'a prouvé pour 69G + 59G et 16-3C10 + 59G), la souche 4CH4 ne peut pas en avoir hérité, l'expression de l'agressivité étant conditionnée, dans ce cas, par le type de substrat (plante-hôte ou milieu de culture) sur lequel l'inoculum a été produit.

Si le manque relatif d'agressivité de l'inoculum de la souche CH4 a des causes génétiques, il est normal que sa descendance en soit affectée. Toutefois, le caractère de non agressivité qui domine dans les différents dicaryons de la F1 (4CH4 + 74Gn) et de la F1 (4CH4 + 59G) ne se manifeste pas dans la souche CH4, qui avait produit des sclérotés sur froment alors que cette espèce est moins sensible à *Typhula* que l'orge d'hiver (Cavelier, 1980).

L'analyse de la descendance B2 issue de (4CH4 + 74Gn) montre d'ailleurs que le génôme 4CH4 a participé à la création de souches très agressives (fig.6.6). On peut donc affirmer que la souche 4CH4 a hérité d'un potentiel d'infection qui ne peut s'exprimer à cause de la mutation fcb.

6.8. Survie du gène fcb B17 au champ

La plupart des souches dicaryotiques non agressives fcb B17 ne produisent pratiquement aucun sclérote à partir de plantes inoculées alors qu'elles en

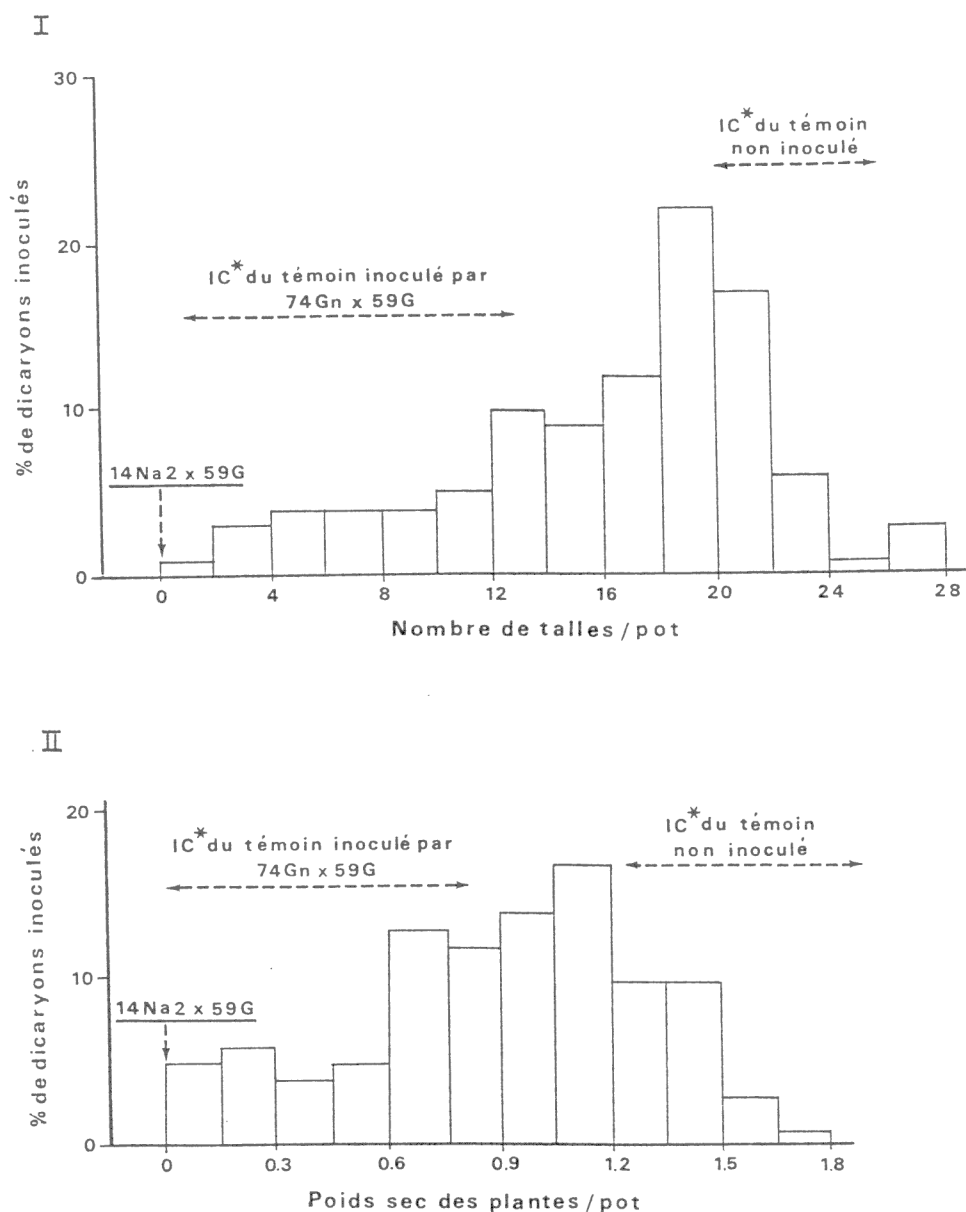


Figure 6.6 : Distribution de fréquence du nombre de talles (I) et du poids sec (II) des plantes inoculées par les souches (nNa2 x 59G), nNa2 représentant 78 monocaryons B2 produits par le dicaryon non agressif (4CH4 + 74Gn) de Typhula incarnata.

Unité de répétition : 1 pot de 5 plantes.

Nombre de pots : 1 par souche (nNa2 x 59G),

18 pour la souche témoin agressive (74Gn x 59G),

6 pour le témoin non inoculé.

Age des plantules d'orge (var. Gerbel) avant leur endureissement au froid : 16 jours.

Durée d'endureissement avant inoculation : 12 jours.

Durée d'incubation de la maladie : 77 jours.

Période de récupération des plantes après infection : 12 jours en serre à 20°C.

* IC : intervalle de confiance ($\alpha = 0.05$).

produisent de nombreux sur grains d'orge stérilisés (Cavelier, 1986b). Dans une perspective de lutte biologique, le développement de sclérotés à partir de plantes infectées par des souches non agressives serait cependant nécessaire pour assurer le renouvellement spontané des souches en cause.

Pour l'ensemble des croisements effectués entre souches B2 fc_b⁺ et B17 fc_b (point 6.4), seul le croisement entre la souche 14Na2 de formule (A5B2) et la souche 12Na2 de formule (A2B17) a produit une infection suffisante pour induire au champ la formation de nouveaux sclérotés sur la variété d'orge "Franka" (récolte 104). Les allèles d'incompatibilité de cette nouvelle génération de sclérotés ont été identifiés après leur mise en germination et l'analyse des spores produites par deux clavules (tableau 6.7). Cette analyse permet d'affirmer que la récolte de sclérotés n° 104 appartient bien à la génération F2 de (4CH4 + 74Gn).

Tableau 6.7. Appartenance de la récolte 104 à la F2 de (4CH4 + 74Gn)¹

Croisements entre	Souches monocaryotiques-test			
	Parents de la F1		Parents de la F2	
	4CH4(A5B17)	74Gn(A2B2)	12Na2(A2B17)	14Na2(A5B2)
Souches monospermes de la récolte 104 (F2)				
1-J104 <u>fc_b</u> ⁺	-	-	+	-
5-J104 <u>fc_b</u> ⁺	+	-	-	-
11-J104 <u>fc_b</u>	-	+	-	-
14-J104 <u>fc_b</u>	-	-	-	+

1. La récolte 104 est une récolte de sclérotés provenant des plantes d'orge infectées par le produit du croisement (12Na2 x 14Na2), Na2 étant la souche (4CH4 + 74Gn).

+ Compatible / - Non compatible.

La mise en évidence de l'allèle fc_b B17 dans la descendance 104 souligne l'intérêt de la souche 14Na2 comme vecteur de la non-agressivité du pathogène.

La souche 14Na2 est très agressive aussi bien à l'état monocaryotique (fig. 6.1) qu'à l'état dicaryotique quand elle est associée à une souche sauvage fc_b⁺ (fig.6.6). Paradoxalement, la transmission horizontale de la non-agressivité nécessite une souche très agressive capable de maintenir un niveau d'infection minimal suffisant pour assurer la pérennité de l'allèle B17 et de ses deux caractères liés (fc_b et non agressivité dominante).

6.9. Application du modèle moléculaire d'Ullrich à l'expression du caractère fc_b dans certaines souches de Typhula incarnata

Le facteur fc_b n'a été trouvé jusqu'à présent que dans quelques souches de type B2 et B17 (Cavelier, 1982a et 1985). Les colonies monocaryotiques fc_b sont toujours non agressives (Cavelier, 1986b).

L'expression de ce caractère dans les monocaryons de type B2 est instable en culture et peut être modifiée par l'exposition des cultures à des températures supramaximales de croissance (Cavelier, 1982a). L'instabilité des souches se présente aussi in vivo chez les dicaryons (B1fc_b⁺ x B2fc_b), tantôt moins agressifs que leurs homologues (B1fc_b⁺ x B2fc_b⁺) (Cavelier, 1982a), tantôt aussi agressifs qu'eux (Cavelier, 1986b).

Le caractère fc_b ne se transmet pas par anastomose entre hyphes incompatibles ce qui suppose que son support génétique n'est pas cytoplasmique. Le caractère fc_b de type B2 ne se transmet pas aisément par voie sexuée (tableau 6.1) alors que le caractère fc_b de type B17 se retrouve dans tous les produits méiotiques B17 (Cavelier, 1985). Contrairement au gène fc_b lié à B2, le gène fc_b lié à B17 implique dans tous les cas la non agressivité des dicaryons qui le renferment (Cavelier, 1986b; point 6.4; voir aussi chapitre 8).

L'analyse du comportement d'une population-fille a montré que l'agressivité n'était pas déterminée par l'agressivité du parent le plus agressif, mais variait quantitativement d'une souche à l'autre (fig. 6.1 et 6.6), sans aucun rapport avec la ségrégation des facteurs d'incompatibilité. Chez T. idahoensis, les gènes d'agressivité ne sont pas non plus liés aux facteurs d'incompatibilité (Kiyomoto et Bruehl, 1976).

Il est donc plus que probable que le gène fc_b, qui est lié au facteur B (Cavelier, 1985), est un gène modifiant l'expression des gènes d'agressivité par épistasie. Les souches fc_b contiennent par conséquent des gènes d'agressivité non exprimés à l'état monocaryotique (cas des souches fc_b de type B2 et B17) et inhibés à l'état dicaryotique (cas des souches fc_b B17).

Selon l'hypothèse d'Ullrich, le locus B β serait composé d'une région spécifique S et d'une région fonctionnelle F (point 1.4).

Si le caractère fc_b était dû à un gène sauteur ou à une mutation localisée dans la région S du locus B β , la stabilité et l'expression de ce gène pourraient être liées à la configuration des produits de cette région dans le cytoplasme; stable et actif dans les homoduplex propres aux monocaryons, instable et inactif dans les hétéroduplex propres aux dicaryons S1/S2

(cas de fc_b lié à l'allèle B2).

Cependant, si le caractère fc_b était dû à un gène sauteur ou à une mutation localisée dans la région F du locus B β (dont la configuration des produits dans le cytoplasme ne varie pas de l'état monocaryotique à l'état dicaryotique), la stabilité et l'expression du gène seraient assurées en toutes occasions, ce qui est le cas de fc_b lié à l'allèle B17.

6.10. Conclusions

Nos travaux antérieurs et ceux présentés dans ce chapitre ont permis de préciser plusieurs aspects de l'agressivité de I. incarnata vis-à-vis de l'orge d'hiver.

1. L'absence d'endurcissement des plantes au froid augmente l'effet pathogène d'un inoculum agressif, mais n'augmente pas la susceptibilité de l'hôte vis-à-vis d'un inoculum peu agressif (tableau 6.5).
2. L'agressivité de sclérotés produits in vitro sur grains d'orge stérilisés peut être perdue au cours de leur conservation à sec, sans affecter toutefois leur pouvoir germinatif. Cependant, les sclérotés de seconde génération résultant de l'inoculation de plantes d'orge par des sclérotés produits in vitro, récupèrent l'agressivité initiale de leurs parents (tableau 6.6).
3. L'agressivité de monocaryons-frères, ne présentant pas le caractère fc_b, constitue une variable continue (fig 6.1) dont l'expression à l'état dicaryotique est fonction des variations propres à chaque combinaison de gènes récessifs portés par l'un et l'autre des noyaux hétérocaryotiques (fig. 6.6 I et II).
4. Un gène dominant inhibant l'expression des gènes d'agressivité est lié à l'allèle fc_b de type B17. Les souches F1 et F2 dont les parents contiennent ce gène, sont non agressives (fig. 6.3 et 6.4, tableau 6.6) et ne produisent généralement pas de sclérote au champ, mais bien sur grains d'orge stérilisés.
5. Une souche monocaryotique très agressive, croisée avec une souche fc_b B17, a exceptionnellement produit des sclérotés sur les plantes inoculées, ce qui a permis la survie au champ, du gène inhibant l'agressivité du pathogène.

CHAPITRE 7

INFLUENCE DE L'INTERACTION ENTRE SOUCHES DE TYPHULA INCARNATA
SUR LA REPONSE DE L'ORGE D'HIVER A L'INFECTION.

7.1. Importance des interactions entre souches dans la microflore parasite.

Au champ, la distribution de l'inoculum de Typhula incarnata dans le sol résulte des pratiques phytotechniques portant sur l'ensemble du cycle culturel. Cet inoculum est constitué par la fraction de sclérotés produits sur les plantes sensibles de la rotation (orge et froment d'hiver, plantes adventices) qui ont survécu aux conditions biotiques et abiotiques de l'environnement.

La survie des sclérotés de T. incarnata est considérée au Japon comme très faible par rapport à celle de T. ishikariensis (Matsumoto et Tajimi, 1985). Ces auteurs supposent que la dispersion de T. incarnata par les basidiospores pourrait compenser la faible survie des sclérotés. Toutefois, ce mode de propagation semble incertain en Belgique (chapitre 4). Bien qu'aucune théorie satisfaisante de l'évolution épidémiologique de T. incarnata n'ait été proposée jusqu'à présent, il apparaît que l'orge se succédant à lui-même subit souvent de graves attaques de Typhula (Mielke, 1984; Kämpf, 1984; Perry et Al-Hashimi, 1984).

La densité d'occupation d'une terre de culture par les sclérotés de Typhula peut s'exprimer par unité de volume de sol pour une profondeur de labour donnée. Cette densité est proportionnelle à la concentration des sclérotés produits par unité de surface par les plantes infectées.

De faibles quantités d'inoculum suffisent à perpétuer et à accroître le nombre de sclérotés de T. idahoensis dans le sol lorsque les conditions d'infection sont favorables (Davidson et Bruehl, 1972). Avec cette espèce, l'impact de la maladie n'augmente plus guère au delà de 150 sclérotés par kg de sol. Ce seuil est encore plus faible avec T. incarnata dans la mesure où ses sclérotés supportent mieux l'enfouissement dans le sol que ceux de T. idahoensis (Jacobs et Bruehl, 1986; Detiffe et al., 1985).

Il est apparu qu'une souche agressive de T. incarnata produisait beaucoup plus de sclérotés sur orge qu'une souche peu agressive, alors que sur le froment d'hiver, nettement plus résistant à Typhula, cette différence entre souches n'était pas sensible (Cavelier, 1980). Etant donné qu'un seul sclérote suffit à provoquer l'infection d'une plante sensible, le passage de Typhula sur froment d'hiver tend à égaliser les quantités de sclérotés des différentes

souches en présence, pour autant que celles-ci aient survécu à l'absence de plante-hôte pendant la première année de la rotation triennale. On a montré, en effet, que le potentiel d'inoculum présent dans le sol sous forme de sclérotés était considérablement diminué après une culture de pommes de terre (Cavelier, 1980).

L'inoculum de T. incarnata peut donc être considéré sous un double aspect : l'aspect quantitatif qui résulte de l'interaction du pathogène avec les paramètres climatiques et biologiques de l'environnement, et l'aspect qualitatif qui résulte de la proportion relative des souches agressives et non agressives. Si l'environnement est favorable à l'infection, c'est l'aspect qualitatif qui sera déterminant dans l'intensité des attaques observées dans une culture donnée.

La diversité d'agressivité des souches de T. incarnata a des causes multiples : citons la redistribution des gènes d'agressivité par voie sexuée (T. incarnata est très fertile) et par voie parasexuelle (phénomène de Büller; voir chapitre 8), l'adaptation parasitaire possible à des hôtes de différentes sensibilités - variétés d'orge et de froment - sans modification de la virulence des souches au sens de Vanderplank (1968), la sélection éventuelle de souches du parasite par les pratiques culturales (fumure, pesticides, etc...).

En présence de souches d'agressivités différentes, le niveau des infections est en grande partie déterminé par la manière dont se déroule la contamination des plantes. L'initiation de l'infection est précédée par la germination des sclérotés : la profondeur d'enfouissement de ceux-ci et leur éloignement par rapport aux lignes de semis, restreignant la capacité du champignon à accéder aux plantes sensibles. A cet égard, les réserves potentielles des sclérotés liées à leur taille et à la souche concernée déterminent le volume de terre pouvant être exploré par le champignon avant qu'il n'atteigne son hôte. La dynamique de l'infection varie donc dans le temps et dans l'espace en fonction de la séquence des contaminations réalisées par des souches d'agressivités différentes.

Cette situation a déjà été simulée par plusieurs chercheurs à des fins de lutte biologique. Par exemple, pour lutter contre le piétin-échaudage, on induit une protection croisée du froment en provoquant une primo-infection des racines par un champignon faiblement pathogène, Phialophora radicicola, (Deacon, 1976) ou par des souches hypoagressives de Gaeumannomyces graminis (Lemaire et al., 1977); de fait, en s'appropriant précocement les sites d'infection, ces souches préviennent l'infection de la plante par une souche agressive du parasite (Cook, 1977). La bactérisation des racines de froment par des colonies de Pseudomonas putida-fluorescens (Weller et al., 1981) a

également été réalisée ; la protection du site d'infection serait due dans ce cas à l'action d'antibiotiques (Gurusiddaiah et al., 1986) ou à une compétition pour le Fe entre G. graminis et les sidérophores produits par les bactéries (Wong, 1984).

Suzuki (1980) a montré que Pyricularia oryzae formait des appressoria sur les feuilles de riz atteintes d'helminthosporiose; toutefois la pénétration, l'élongation des hyphes et le développement des lésions ne se produisaient que sur les tissus dépourvus de lésions d'helminthosporiose.

Nous avons montré que des souches de T. incarnata non agressives, inoculées par sclérotas, étaient capables de protéger l'orge d'hiver de l'infection ultérieure par une souche agressive inoculée 14 jours plus tard sous forme de mycélium (Cavelier, 1986b). Ce laps de temps peut paraître long étant donné que l'induction d'une prémunition nécessite habituellement une durée équivalente à celle qui est nécessaire pour provoquer une infection (Suzuki, 1980); mais il comprenait également le temps nécessaire à la germination des sclérotas (\approx 10 jours).

Les mélanges d'inocula composés de souches de différentes agressivités peuvent également inhiber le déroulement des infections causées par Colletotrichum lindemuthianum sur feuilles de haricot, de Phytophthora infestans sur feuilles de pomme de terre, de Puccinia striiformis sur feuilles de froment (Suzuki, 1980). Cependant, mis à part le cas où il y a un antagonisme direct entre souches, le mécanisme suppresseur de l'agressivité par inoculation d'un mélange de souches n'est pas aussi efficace que celui induit par la primo-infection d'une souche peu agressive.

En effet, quand la plante-hôte se trouve confrontée simultanément à différents inocula, il n'y a pas de "colonisateur pionnier" qui puisse induire en temps utile une modification des tissus de l'hôte ou mobiliser des substances de croissance, produire des antibiotiques ou induire des phytoalexines en quantités suffisantes pour inhiber complètement la souche agressive inoculée en mélange.

Smith et Arsvoll (1975) et Arsvoll (1976) ont utilisé comme inoculum des mélanges de mycélium broyé provenant de plusieurs souches agressives de T. incarnata. La faible agressivité de ces mélanges comparée à l'agressivité respective des souches utilisées individuellement, a été mise en rapport avec certains phénomènes naturels tel que le reverdissement des zones confluentes aux abords des ronds de sorcière provoqués par Marasmius oreades (Smith et Arsvoll, 1975). Il s'agit, d'après ces auteurs, de l'expression d'un phénomène d'antagonisme mutuel entre souches. Toutefois, on peut aussi supposer que la faible agressivité des souches de Typhula, résulte d'une modification de

l'inoculum provoquée par le broyage du mycélium. En effet, à partir d'un broyat de deux dicaryons compatibles, on crée au minimum 4 dicaryons supplémentaires dont l'agressivité sera probablement inférieure à celle de leurs parents puisque le pouvoir pathogène de T. incarnata est déterminé par des combinaisons particulières de gènes récessifs (voir chapitre 6).

L'inoculation de mélanges de souches de T. incarnata à partir de sclérotites a donné lieu à des interactions différentes avec l'orge (Cavelier, 1986b). Lorsque les souches étaient d'agressivités opposées (une agressive contre une non agressive), le mélange d'inocula était toujours moins agressif au champ que la souche agressive inoculée individuellement. En revanche, aucune perte d'agressivité n'a été constatée en chambre froide lorsque le mélange d'inocula était composé de souches d'égales agressivités. Ces résultats confortent l'idée de l'indépendance des effets pathogènes de chacune des souches en présence dans le cadre de la règle du premier occupant (Cavelier, 1986b).

Etant donné que les mécanismes qui gouvernent les relations mutuelles des souches de Typhula sur l'hôte sont loin d'avoir été complètement élucidés, nous nous proposons d'approfondir cette question en tenant compte des caractères génétiques des souches.

7.2. Effet sur l'infection, de la compatibilité et de la nature des souches de Typhula incarnata inoculées en mélange sur l'orge d'hiver var. "Gerbel".

La primo-infection par une souche non agressive de T. incarnata peut empêcher l'infection de l'orge par une souche agressive inoculée postérieurement. Cet effet passe toutefois inaperçu dans le cas où une augmentation sensible de la résistance, indépendante de la primo-infection, se produit par suite du séjour prolongé des plantes au froid avant l'inoculation par la souche agressive. Ces observations ont toujours été effectuées en utilisant des souches de T. incarnata compatibles entre elles (Cavelier, 1986b).

On s'est donc demandé si l'emploi de souches incompatibles n'était pas susceptible d'induire une protection de l'orge de façon à pouvoir annuler complètement le délai entre les deux inoculations. Deux essais, structurés en 6 blocs aléatoires complets, ont été réalisés à cet égard en chambre froide. L'inoculation consistait à placer de part et d'autre du coléoptile des plantules d'orge, une bandelette de mycélium appartenant à l'une ou l'autre des souches de T. incarnata (fig.7.1). Un contact étroit a donc été établi immédiatement entre la plante d'orge et les deux inocula de T. incarnata.

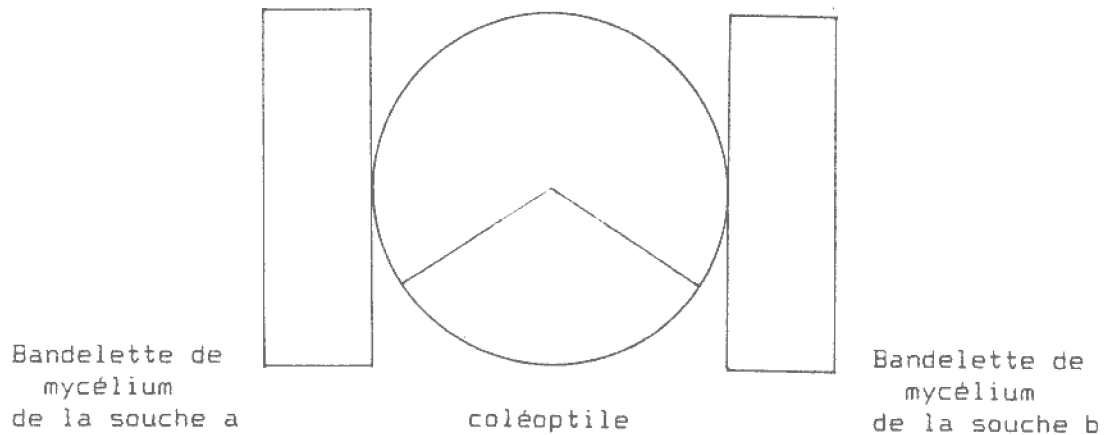


Figure 7.1. Vue en coupe transversale du cylindre foliaire au niveau du collet de la plante d'orge et position respective des bandelettes de mycélium de T. incarnata utilisées comme inocula, par rapport au coléoptile

7.2.1. Essai n°1

Des couples de souches incompatibles, hémicompatibles ou compatibles ont été inoculées comme ci-dessus (figure 7.1) et les infections obtenues ont été comparées à celles des différents partenaires inoculés séparément (tableau 7.1). La souche dicaryotique (16-3c10 x 59G), résultant d'un croisement renouvelé, s'est révélée une fois encore très agressive (Cavelier, 1986b). Le caractère fc très prononcé de la souche 16-3c10 n'a pas empêché l'expression des gènes d'agressivité de cette souche à l'état dicaryotique, alors qu'à état monocaryotique, cette souche est non agressive comme toutes les souches fc.

La confrontation des souches deux à deux montre que les souches agressives incompatibles 74Gn et 56Gn ont été inhibées par les souches non agressives 69G et 16-3C10 (avec une efficacité plus grande de la part de la souche fc que de la souche sauvage). En revanche, l'incompatibilité ou l'hémicompatibilité n'a eu aucun effet sur la réponse à l'infection de l'orge par un couple de souches également agressives (16-3C10 + 59G avec 56Gn et 74Gn).

Parmi les souches confrontées deux à deux, les souches (16-3c10 + 59G) et 16-3c10 présentent le degré de parenté le plus élevé ; leur confrontation apparaît totalement compatible, car aucune interaction entre noyaux ne vient interférer avec celle qui préexiste dans le dicaryon. Les résultats de l'infection montre que la totale compatibilité entre ces deux souches annule complètement sur l'hôte l'action protectrice de la souche monocaryotique hypo-agressive. La souche 16-3c10 perd, en effet, toute autonomie d'action vis-à-vis de son prolongement dicaryotique (16-3c10 + 59G). Cette observation corrobore le fait que la dicaryotisation d'un monocaryon est irréversible et

que la forme dicaryotique prime toujours sur la forme monocaryotique compatible. Mais cette observation montre aussi qu'au delà du simple échange de noyaux, la compatibilité somatique entre souches de *T. incarnata* peut avoir des conséquences sur la relation hôte-parasite.

Tableau 7.1. : Infection de l'orge d'hiver var.FRANKA par des souches compatibles ou incompatibles de *Typhula incarnata*⁽¹⁾

Nature des souches inoculées et génotype d'incompatibilité	Nombre de plantes survivantes (%)	Poids sec/plante après infection (%)
Témoin non inoculé	100 (d) ⁴	100 (d) ⁴
<u>Inoculations simples</u>		
74Gn (A2B2)	60 (c)	40 (b)
56Gn (A1B2)	37 (b)	18 (a)
16-3C10 (A4B2) <u>fc</u>	100 (d)	77 (c)
(16-3C10 + 59G) (A4B2 + A1B1)	7 (ab)	4 (a)
<u>Inoculations doubles</u>	Compatibilité ³	
(74Gn) + (69G) ²	NC	93 (d)
(74Gn) + (16-3C10)	NC	100 (d)
(16-3C10 + 59G) + (16-3C10)	C	0 (a)
(16-3C10 + 59G) + (74Gn)	HC	13 (ab)
(16-3C10 + 59G) + (56Gn)	NC	13 (ab)
(56Gn) + (16-3C10)	NC	90 (d)
		76 (c)

1. essai en 6 répétitions (5 plantes/répétition)

- âge des plantes avant endurcissement au froid : 18 jours
- période d'endurcissement au froid : 14 jours
- temps d'incubation de la maladie : 58 jours
- période de récupération après infection : 19 jours

2. 69G : génotype d'incompatibilité A2B2, monocaryon sauvage non agressif

3. C, compatible : HC, hémicompatible : NC, non compatible

4. Deux % suivis par une même lettre ne sont pas statistiquement différents entre eux au niveau 5% (Test de comparaisons multiples de moyennes de NEWMAN-KEULS).

7.2.2. Essai n°2

Afin de vérifier si les observations précédentes sont généralisables à l'ensemble des interactions entre souches de *T. incarnata*, on a introduit dans le schéma expérimental deux types de souches non agressives, la souche 16-3c10 précédemment utilisée (dont le phénotype *fc*b est masqué à l'état dicaryotique) et la souche 4CH4 qui est connue pour établir des dicaryons non agressifs (Cavelier, 1986b), et dont le caractère *fc*b est dominant (chapitre 6).

On a effectué 4 séries d'inoculations, chacune mettant en oeuvre un dicaryon agressif dont le degré de compatibilité avec la souche 16-3c10 était différent, tandis qu'il restait inchangé avec la souche 4CH4, cette dernière étant entièrement compatible avec les deux composants de chacun des dicaryons testés.

Les résultats des interactions entre les différents dicaryons et la souche non aggressive 16-3c10, confirment dans l'ensemble les résultats du premier essai (tableau 7.2). La souche 16-3c10 apporte en effet une protection partielle (3ème série) ou complète (1ère série) de la plante si elle présente avec la souche aggressive une relation d'hémicompatibilité ou d'incompatibilité. Par contre, la compatibilité totale entre souche aggressive et non aggressive correspond à l'absence complète d'inhibition de la part de la souche non aggressive (4ème série).

L'interaction produite dans la 2ème série est particulière. La souche SLINS, vraisemblablement à cause de sa culture prolongée sur milieu artificiel, n'exprime plus son agressivité originelle en inoculation simple, alors qu'associée à la souche 16-3c10, elle provoque une forte infection des plantes. A nouveau, il semble que la relation de compatibilité soit à la base de la révélation de l'agressivité de la souche SLINS (agressive à l'origine) et/ou de l'agressivité de la souche 16-3c10 à l'état dicaryotique.

En revanche, les résultats des interactions entre souches où intervient la souche non aggressive 4CH4 diffèrent de ceux obtenus avec la souche 16-3c10. Dans les 4 séries d'inoculations, la relation de compatibilité n'annule pas l'action inhibitrice de la souche 4CH4. Au contraire, l'effet de la souche 4CH4 dans une relation compatible avec une autre souche est analogue à celui de la souche 16-3c10 dans une relation d'hémicompatibilité (3ème série) et presque aussi prononcé que celui de cette souche quand il y a incompatibilité (1ème série). La souche 4CH4 n'a pas stimulé l'agressivité latente de la souche SLINS (2ème série) et a réduit quelque peu l'agressivité de la souche (16-3c10 + 59G) (4ème série).

Tableau 7.2 : Infection de l'orge d'hiver var.FRANKA en fonction de la nature hypoagressive des souches inoculées en mélange avec une souche pathogène de Typhula incarnata.

Nature des souches inoculées	Génotype d'incompatibilité	Interaction fongique	Nbre de talles par pot ¹	Poids sec des plantes par pot(g) ¹
<u>1ière série</u>				
(9P x 74Gn)	(A4B4 x A2B2)	-	7.2 ab ^e	0.41 a ^e
(") + (16-3C10)	(") + (A4B2)	NC ^a	30.7 f	1.83 d
(") + (4CH4)	(") + (A5B17)	C	20.3 de	1.41 cd
<u>2de série</u>				
SLINS	indéterminé	-	27.7 f	1.79 d
(") + (16-3C10)	(") + (A4B2)	C	8.8 ab	0.53 ab
(") + (4CH4)	(") + (A5B17)	C	25.2 ef	1.50 d
<u>3ième série</u>				
(59G x 9P)	(A1B1 x A4B4)	-	3.3 a	0.15 a
(") + (16-3C10)	(") + (A4B2)	HC	13.3 bcd	0.80 abc
(") + (4CH4)	(") + (A5B17)	C	13.5 bcd	0.77 abc
<u>4ième série</u>				
(16-3C10 x 59G)	(A4B2 x A1B1)	-	11.7 bc	0.74 abc
(") + (16-3C10)	(") + (A4B2)	C	13.0 bcd	0.82 abc
(") + (4CH4)	(") + (A5B17)	C	18.5 cde	1.20 bcd
Témoin non inoculé			29.2 f	2.42 e

1. Essai en 6 répétitions (5 plantes/pot/répétition)

- âge des plantes avant endurcissement au froid : 19 jours
- période d'endurcissement au froid : 14 jours
- temps d'incubation de la maladie : 64 jours
- période de récupération après infection :

2. Test de Newman et Keuls ($\alpha = 0.05$); les valeurs suivies par des lettres identiques ne peuvent pas être considérées comme différentes les unes des autres.

3. C, compatible; HC, hémicompatible; NC, non compatible

C'est vraisemblablement le caractère non agressif lié au phénotype fcb dominant qui confère à la souche 4CH4 un grand pouvoir d'interférence à l'égard des souches qui lui sont associées, ce qui expliquerait qu'au champ les inoculations simultanées où figure cette souche réduisent sensiblement le taux d'infection des plantes (Cavelier, 1986b).

7.3. Les mélanges de souches compatibles de Typhula incarnata au champ. (tableau 7.3)

L'interaction des souches de T. incarnata au champ a été étudiée au moyen de la souche (16-3c10 + 59G) et de 6 isolats génétiquement indéterminés utilisés en mélange selon différentes combinaisons. Les inocula étaient tous dicaryotiques et se présentaient sous forme de sclérotés produits sur grains d'orge stérilisés. L'essai était installé sur environ 1 are de culture divisé en 6 blocs aléatoires complets. L'unité de répétition comprenait toutes les plantes d'orge réparties sur une fraction de ligne de culture de 50 cm de longueur. Perpendiculairement au semis, ces fractions de ligne étaient séparées les unes des autres par 5 autres lignes et dans le sens du semis par 1,5 m de culture. Les caractéristiques phytotechniques de cet essai ont été décrites au chapitre 2. L'inoculation a été réalisée le 01 novembre 1984 avec différentes souches de T. incarnata dont la plupart n'étaient pas génétiquement caractérisées.

Les inoculations individuelles ont permis de distinguer 3 catégories d'isolats en fonction de leur agressivité; très agressif (SL), moyennement agressif (HO, GD, ST), peu agressif (Li, S3 et 16-3c10 + 59G).

Les sclérotés de la souche (16-3c10 + 59G) ont produit un inoculum non agressif contrastant avec celui qui avait provoqué de graves infections de l'orge dans les précédents essais. La perte du pouvoir pathogène des sclérotés après un certain temps de survie, a déjà été signalé, notamment pour cette souche, au chapitre 6.

Les différentes combinaisons testées expriment généralement le niveau d'agressivité de la souche la plus agressive, ce qui est en accord avec les interactions entre souches complètement compatibles observées dans les essais en chambre froide, pour autant qu'aucune souche de type fcb B17 (4CH4) n'interfère avec le processus.

En effet, les combinaisons les plus agressives sont celles qui associent soit la souche SLINS (SL) avec des souches peu agressives (SL + GD + Li, SL + Li, SL + S3), soit deux souches moyennement agressives (GD + ST, ST + HO + S3). Les combinaisons les moins agressives comportent soit deux souches non agressives (Li + S3, 16-3c10 + 59G + Li) soit une souche moyennement aggressive

(GD) avec une souche non agressive (Li ou S3). Ces dernières interactions signifient peut-être qu'il y aurait eu une légère incompatibilité entre ces 3 souches ou que les sclérotés de la souche (GD) auraient germé moins rapidement que ceux des autres souches, retardant l'appropriation de l'hôte au profit de Li et S3.

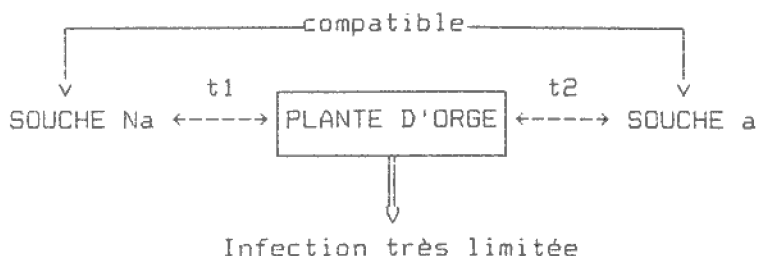
Tableau 7.3 : Réaction de l'orge d'hiver "Franka" à l'inoculation de différents mélanges d'isolats de Typhula incarnata au champ.

Nature et quantité ¹ de l'inoculum	Nombre de talles à la récolte par nombre de plantes en automne ²	
SL (0.4)	0.70	a
SL (0.2) + GD (0.2) + Li (0.2)	0.97	ab
SL (0.2) + Li (0.2)	1.09	abc
GD (0.2) + ST (0.2)	1.13	abc
HO (0.2)	1.35	bcd
SL (0.2) + S3 (0.2)	1.47	bcde
GD (0.2)	1.58	cde
ST (0.2) + HO (0.2) + S3 (0.2)	1.59	cde
ST (0.2)	1.61	cde
Li (0.2) + S3 (0.2)	1.82	def
GD (0.2) + S3 (0.2)	1.88	def
Li (0.4)	1.92	def
GD (0.2) + Li (0.2)	1.97	def
(16-3C10 + 59G) (0.4)	2.08	ef
(16-3C10 + 59G) (0.2) + Li (0.2)	2.32	f
S3 (0.2)	2.34	f
Li (0.2)	2.35	f
Témoin non inoculé ³	2.44	f

1. Quantité de sclérotés en g répartis sur 50 cm de ligne de culture
2. Deux moyennes suivies par une même lettre ne sont pas statistiquement différentes au niveau 0.05 (test de NEWMAN-KEULS)
3. Aucun sclérote n'a été trouvé à la base des plantes non inoculées.

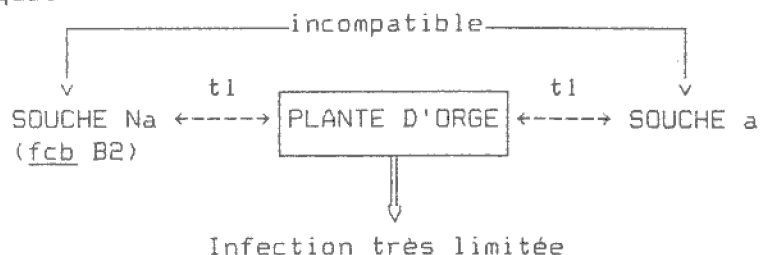
7.4. Interprétation générale des phénomènes de compétition entre souches de Typhula incarnata.

L'effet protecteur d'une primo-infection par une souche dicaryotique non agressive (5S + 59G) ou (59G + 4CH4) peut se manifester vis-à-vis d'une souche agressive (59G + 9P) (Cavelier, 1986b).



La relation entre la plante et la souche non agressive (Na) inoculée au temps (t1) est incompatible. Une infection ultérieure ne peut pas se développer sur l'hôte quelle que soit la souche Na inductrice de la protection. En conséquence, la relation entre la plante et la souche agressive (a) inoculée au temps (t2) devient également incompatible.

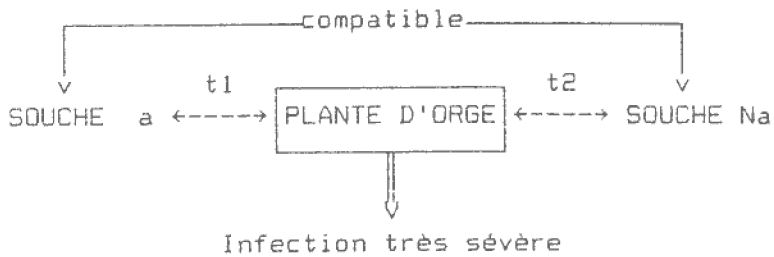
On observe un effet protecteur équivalent dans le cas de contaminations simultanées par une souche non agressive et une souche agressive lorsque la première (en occurrence la souche 16-3c10) est protégée de l'immixtion de la souche agressive (74Gn, 56Gn ou 9P + 74Gn) en raison d'une incompatibilité somatique.



On note un effet protecteur moins marqué en utilisant la souche non agressive de type sauvage 69G (fcb⁺ B2) comme agent de protection vis-à-vis de 74Gn.

ON PEUT DES LORS CONCLURE QUE L'INCOMPATIBILITE SOMATIQUE CONSACRE DE MANIERE DEFINITIVE L'APPROPRIATION DES SITES D'INFECTION DE L'ORGE PAR LES DIFFERENTES SOUCHES DE T. INCARNATA CE QUI PERMET A LA PLANTE-HOTE D'ETRE PROTEGEE DE L'INFECTION PAR LA SOUCHE NON AGRESSIVE.

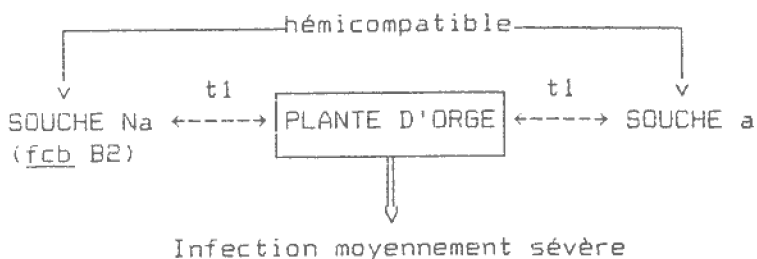
En revanche, aucun effet de protection de la plante-hôte n'est obtenu si la souche agressive s'approprie en premier lieu la totalité des sites d'infections (59G + 9P suivi de 59G + 4CH4; Cavelier, 1986b).



Si les deux souches sont également agressives, leurs inoculations simultanées produisent aussi bien des infections virulentes lorsqu'elles sont incompatibles (16-3c10 + 59G vis à vis de 56Gn) que lorsqu'elles sont compatibles entre elles (69G + 59G vis à vis de 9P + 5S, Cavelier, 1986b)(6D vis-à-vis de ST).

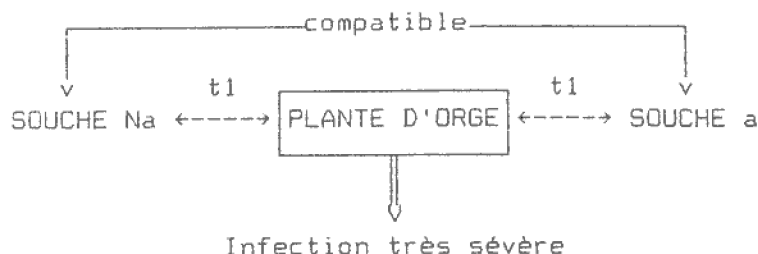


De même, une relation hémicompatible ne provoque aucun effet inhibiteur sur un dicaryon agressif lorsque la souche monocaryotique qui lui est opposée est également agressive (16-3c10 + 59G vis-à-vis de 74Gn) alors que, dans les mêmes conditions, une souche monocaryotique non agressive est capable de diminuer les conséquences d'une infection virulente (59G + 9P vis à vis de 16-3c10).



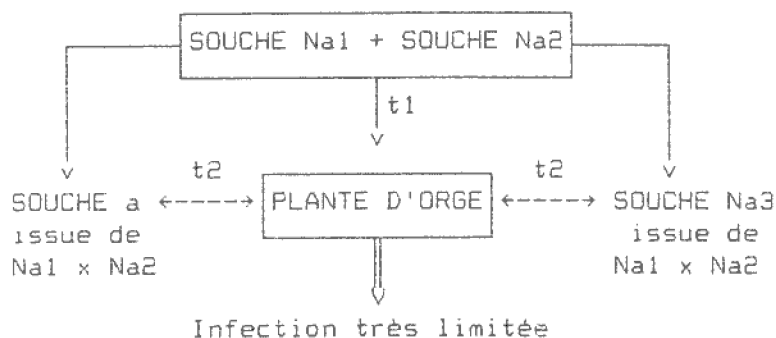
LA REGLE DU PREMIER OCCUPANT, EFFECTIVE DANS LE CAS D'UNE PRIMO-INFECTIION, EST REMPLACÉE PAR UNE INTERACTION ENTRE SOUCHES BASÉE SUR LEUR DEGRÉ DE COMPATIBILITÉ.

Lorsque deux souches d'agressivités différentes sont confrontées simultanément dans une relation entièrement compatible, il n'y a pas de site sur la plante qui puisse être préservé de la souche agressive (souche SLINS vis-à-vis de la souche Li ou de la souche S3; 16-3c10 + 596 vis-à-vis de 16-3c10). Tout se passe comme si la souche agressive ne rencontrait aucun obstacle dans sa progression et comme si la souche non agressive perdait le contrôle éphémère des sites qu'elle occupait.

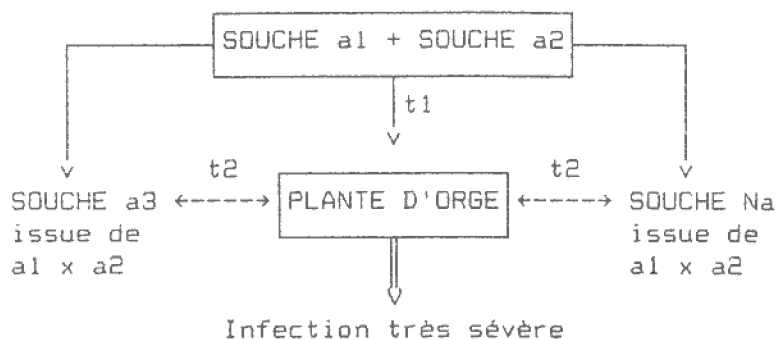


Théoriquement, la réciproque pourrait se manifester, mais lorsque l'action parasitaire de la souche agressive a débuté, la souche non agressive n'a habituellement pas un pouvoir compétitif suffisant pour empêcher son développement.

Même si la règle du premier occupant n'est pas d'application entre souches compatibles inoculées simultanément, il y a lieu de considérer que l'appropriation commune des sites d'infection précède celle entreprise par les produits de croisement entre ces souches. Il en est ainsi des éventuels dicaryons agressifs résultant de croisements entre souches non agressives compatibles (Li et S3 par exemple) ou entre leurs souches-filles. Or le niveau des infections ne révèle en aucun cas la présence de ces dicaryons de seconde génération, ce qui ne signifie pas nécessairement qu'ils soient inexistant, mais bien qu'ils sont incapables de modifier l'évolution parasitaire initiée par les souches de première génération. Dans ce cas, la règle du premier occupant est d'application.



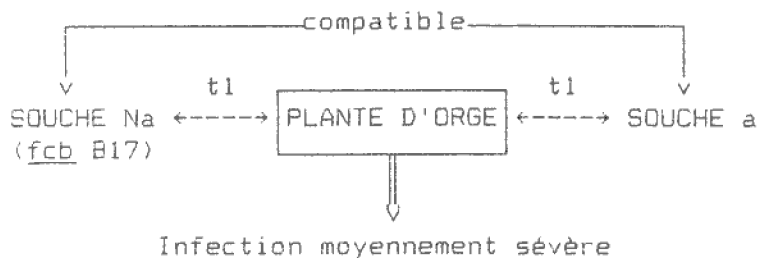
De la même manière, les dicaryons non agressifs de seconde génération ne peuvent pas changer le cours des infections résultant des souches agressives qui leur ont donné naissance.



L'emploi de la souche 4CH4 à la place de la souche 16-3C10 comme souche non agressive montre cependant que la clause de compatibilité entre souches ne suffit pas toujours à rendre compatible l'interaction entre l'hôte et la souche agressive.

Le caractère fc lié à l'allèle B2 dans la souche 16-3c10 est instable, sinon récessif dans un dicaryon (Cavelier, 1986b). Comme le manque d'agressivité de cette souche est lié essentiellement à l'expression de ce caractère, l'immixtion d'une autre souche inhibe son action par dicaryotisation. La réponse à l'inoculation dépend alors uniquement de la vitesse d'occupation des sites d'infection.

En revanche, le caractère fc lié à l'allèle B17 est extrêmement stable (Cavelier, 1985) et confère une non-agressivité dominante au dicaryon qui le porte (chapitre 6). De ce fait, la souche 4CH4 (A5B17) possède un pouvoir de compétition remarquable, même dans les interactions compatibles. Tout se passe comme si cette souche neutralisait la progression de la souche agressive en préservant le site qu'elle occupait sur la plante-hôte, empêchant par là-même l'appropriation totale de celle-ci par la souche agressive.



L'efficience de cette protection est cependant fonction de la vitesse de colonisation des différentes souches en présence. L'effet protecteur procuré par la souche 4CH4 est d'autant plus marqué que ces sites d'infection sont occupés par elle en premier lieu (règle du premier occupant). En présence de souches très agressives, les circonstances particulières à chacune des inoculations font que la protection induite par l'allèle fc_b B17 peut être partielle et même parfois totalement inopérante (4CH4 vis à vis de 16-3c10 + 59G et 4CH4 vis-à-vis de 59G + 9P).

Ces observations corroborent les résultats obtenus au champ à la suite d'une double inoculation par sclérotas comprenant la souche 4CH4 (Cavelier, 1986b). Le nombre de tiges survivant à l'infection était pratiquement le double de celui obtenu par l'inoculation de la seule souche agressive, montrant ainsi que la moitié de l'inoculum agressif était devenu inopérant tandis que l'autre moitié avait réussi à produire une infection virulente. La distribution du mélange de sclérotas étant tout à fait aléatoire, on peut supposer que la moitié des tiges avaient été colonisées en priorité par les souches agressives tandis que l'autre moitié l'avaient été par les souches non agressives. Ce résultat indique que chacune des souches a pu établir une relation durable avec l'hôte, qui n'a été rendue possible que par l'emploi de l'allèle fc_b B17 dans la souche non agressive. Comme nous l'avions envisagé antérieurement (Cavelier, 1986b), les produits de croisement entre souches interviennent peu sur la réponse à l'infection. S'il en avait été autrement, l'impact des souches non agressives aurait été beaucoup plus marqué en raison des relations d'hémicompatibilité n'autorisant que les croisements avec les noyaux 4CH4.

7.5. Localisation sur l'hôte du site de l'interaction entre souches de Typhula incarnata.

Nous avons vu que la réponse de l'orge à l'infection traduisait une interaction des souches de T. incarnata contrôlée selon leur degré de compatibilité et leur degré d'agressivité. La compétition entre souches peut avoir pour objet l'occupation des sites d'infection de l'hôte (effet du premier occupant) ou la reconnaissance du parasite par l'hôte avec production de phytoalexines.

Nous avons abordé le problème en dissociant le site d'infection habituel (le collet de la plante), et le site de sensibilisation de la plante que nous avons situé à 4 cm au-dessus du plateau de tallage. Des plantes d'orge préalablement endurcies au froid ont été raccourcies et préinoculées à ce niveau par une souche sensibilisatrice. L'inoculation fut effectuée en posant sur la

section encore fraîche du cylindre foliaire, un morceau d'agar nutritif colonisé par *Typhula*. La plante raccourcie, chapeautée de son inoculum, fut recouverte d'une cloche en verre destinée à saturer l'air ambiant d'humidité, permettant ainsi la croissance active du champignon dans le cylindre foliaire (fig.7.2). Après deux semaines, on a ôté la cloche en verre et certaines plantes ont été recepées une nouvelle fois (moins 1,5 cm) pour les soustraire à la colonisation plus avancée du pathogène par cette voie. Afin de vérifier si les plantes avaient bien été sectionnées en dessous du front d'avancement du parasite, les fragments de cylindre foliaire ainsi prélevés ont fait l'objet d'un isolement sur eau gélosée (1%) enrichie de 6 mg/l d'orthophénylphénol (Russel, 1956) et de 300 mg/l de streptomycine. Toutes les plantes, recepées ou non, ont ensuite été inoculées au collet avec une souche agressive, selon la méthode habituelle. Dans le cas où l'inoculum de sensibilisation était maintenu sur les plantes, le croisement éventuel entre les souches provenant des deux inocula était prévenu par la présence d'au moins 1 allèle commun d'incompatibilité, conférant ainsi à une souche non agressive une influence prépondérante sur toute autre souche agressive (voir point 7.4).



Figure 7.2 : Dispositif de protection sous cloche d'un inoculum de sensibilisation (souche 16-3010) placé sur une coupe fraîche pratiquée dans les cylindres foliaires de l'orge à 4cm du plateau de tallage.

Un premier essai a provoqué la mort de toutes les plantes infectées, la souche inoculée en second lieu au collet de la plante ayant été incubée pendant 44 jours. Dans une seconde expérience, cette durée d'incubation a été ramenée à 34 jours (tableau 7.4).

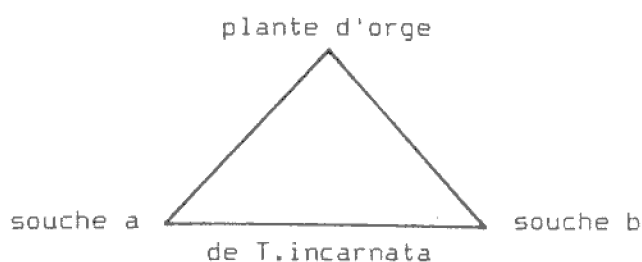
Dans le second essai, l'attaque des souches agressives a laissé moins de 11% de survivants sur l'ensemble des plantes inoculées rabattues à 4 cm. Une attaque aussi foudroyante de la part des souches monocaryotiques de T. incarnata résulte d'une perte totale de la résistance des plantes que nous attribuons à l'absence des feuilles, l'inoculation de plantes non rabattues n'ayant provoqué aucune mortalité (tableau 7.4).

On peut tirer deux enseignements de ces essais.

Le manque total de résistance à Typhula de la part des plantes d'orge endurecies puis rabattues à 4 cm du collet est comparable à la sensibilité élevée des plantes d'orge non rabattues et non endurecies au froid (Cavelier, 1986b). Si les premières n'ont pas résisté à l'infection par une souche agressive de T. incarnata alors qu'elles avaient été inoculées à 4 cm du collet par une souche non agressive (tableau 7.4), en revanche, les secondes ont résisté parfaitement à l'inoculation de plusieurs souches non agressives (tableau 6.5).

La réponse de l'orge à l'infection ne semble donc pas être influencée par une interaction à distance entre les souches de T. incarnata. En particulier, le brunissement caractéristique des tissus provoqué au sommet des cylindres foliaires sur plus d'un centimètre par les souches fcb (16-3C10 et 3Na2) n'a eu aucun effet sur l'infection des plantes d'orge au collet. Même quand les souches agressives 74Gn et 56Gn ont été utilisées comme souches sensibilisatrices, aucune réaction de défense de la plante n'a été observée.

La réponse à l'infection résulte donc essentiellement d'une interaction triangulaire au site d'infection habituel de la plante (le collet).



Un second enseignement important peut-être considéré : les cultures d'orge appâtées en automne et en hiver par les lapins et les lièvres, étant privées de leurs feuilles, pourraient perdre toute résistance à Typhula. Cette relation causale expliquerait la fréquence des attaques de Typhula dans certaines terres visitées par le gibier.

Tableau 7.4 : Effet de la préinoculation des cylindres foliaires par une souche sensibilisatrice de Typhula incarnata sur l'infection de l'orge au collet de la plante par une souche agressive du pathogène.

Souches préinoculées au sommet des cylindres foliaires (11 juin)	Souches inoculées au collet des plantes (25 juin)	Suppression du premier inoculum (25 juin)	Nbre de plantes sur lesquelles l'éradication du 1er inoculum n'a pas réussi	Nbre de plantes survivantes à la fin de l'essai (13 août)
Non inoculé	Non inoculé			35
Non inoculé	74Gn (A2B2)			2
Non inoculé	56Gn (A1B2)			3
<u>Epicoccum nigrum</u>	74Gn	non		10
74Gn	74Gn	oui	2/35	2
56Gn	74Gn	oui	4/35	2
69G (A2B2)	74Gn	oui	1/35	4
16-3C10 (A4B2)	74Gn	non		5
3Na2 (A2B17)	74Gn	non		6
74Gn	56Gn	oui	3/35	1
56Gn	56Gn	non		0
56Gn	56Gn	oui	1/35	4
69G	56Gn	non		6
69G	56Gn	oui	2/35	4
16-3C10	56Gn	non		5
16-3C10	56Gn	oui	0/35	3
Non inoculé	74Gn (plantes non recepees)			35

7.6. Interactions entre souches de Typhula incarnata confrontées in vitro.

Les interactions entre souches de T. incarnata observées après inoculation de l'orge d'hiver, sont fonction de la nature et de la compatibilité des souches en présence. Il était intéressant d'observer le comportement de ces souches soumises à une confrontation in vitro.

Les essais d'identification des allèles d'incompatibilité et les croisements di-mono ont déjà permis d'effectuer de telles confrontations. En général, les colonies établissent le contact entre elles, mais demeurent individualisées, sans qu'une zone de démarcation ne les sépare. La rencontre des fronts de croissance détermine souvent une ligne frontière correspondant à un ralentissement de l'extension mycélienne. L'envahissement d'une souche par une autre, constaté par Smith et Arsvoll (1975), a été rarement observé : tout au plus, observe-t'on un mélange d'hyphes des deux colonies qui ne s'étend pas au delà du centimètre de part et d'autre de la ligne de rencontre sur milieu PDA. La zone de contact est le lieu privilégié où s'échangent les noyaux compatibles qui migrent sélectivement dans les colonies opposées indépendamment du système d'incompatibilité (Cavelier, 1982b).

Des résultats analogues ont été obtenus en réalisant une série de confrontations entre souches, en tenant compte de leur origine (parenté), de leur compatibilité et de leur nature (fc_b, auxotrophie) (tableau 7.5).

Ces essais in vitro ont été réalisés sur 4 milieux différents (Malt-agar (MA), Lima bean agar (LBA), V8-agar et milieu complet, MC). Le rapport des distances entre le centre des colonies et leur point de rencontre a été comparé au rapport de leurs rayons respectifs, mesurés perpendiculairement à la droite reliant leurs centres (Ponchet, 1966). Ces rapports étant dans presque tous les cas égaux, toute action compétitive à distance ou par contact semble exclue, même dans les confrontations avec la souche 4CH4 émettant une substance fongistatique dans le milieu (fig. 7.3).

En général, on n'observe pas non plus de distinction à cet égard entre croisement compatible et incompatible. A titre d'exemple, les confrontations entre la souche 74Gn et 6 souches différentes sont comparées entre elles (fig. 7.4). La souche 74Gn détermine invariablement une ligne frontière avec la souche qui lui est opposée, quelle que soit sa nature.

La composition du substrat influence très fort le degré de pigmentation des colonies fc_b. Sur milieu LBA, les colonies sont très ténues et les confrontations offrent peu d'intérêt (fig. 7.3 et 7.5c). Sur milieu MA, l'effet fongistatique de la toxine est faible et les colonies confrontées se sont rejointes (fig. 7.5). Des touffes de mycélium aérien semblables à celles

Tableau 7.5 : Liste des souches confrontées in vitro deux à deux avec indication du degré de compatibilité et de parenté pour chacune des paires.

Souches confrontées		Degré de compatibilité	Parenté entre noyaux compatibles
Souche a	Souche b		
74Gn	(12R x 5S)	C	non parents
16Dr3	(9P x 12R)	C	non parents
4CH4	(59G x 9P)	C	non parents
16-3C10	(5S x 12R)	C	non parents
74Gn	(59G x 5S)	C	1 parent
16-3C10	(16-3C10 x 59G)	C	parents
74Gn	(16-3C10 x 59G)	HC	parents
8P	(9P x 5S)	HC	non parents
74Gn	(48G x 56Gn)	NC	
56Gn	(16-3C10 x 59G)	NC	
16-3C10	(9P x 74Gn)	NC	
74Gn	56Gn	NC	
74Gn	9P	C	non parents
(74Gn x 12R)	(9P x 5S)	C	non parents
(74Gn x 59G)	(9P x 5S)	C	non parents
(4CH4 x 74Gn)	(12R x 9P)	C	non parents
(6S x 4S)	(74Gn x 15-4A38)	3/4 C	non parents
(6S x 4S)	(5S x 12R)	HC	non parents
(4CH4 x 56Gn)	(74Gn x 59G)	HC	non parents
(6S x 4S)	(5S x 9P)	1/4 C	non parents
(74Gn x 59G)	(48G x 56Gn)	NC	
(4CH4 x 74Gn)	16Dr3	HC	parents
<u>Epicoccum nigrum</u>	(59G x 5S)		
<u>Fusarium nivale</u>	(59G x 5S)		

observées chez Rhizoctonia solani sur milieu PDA + charbon de bois (Bolkan et Butler, 1974) se sont développées à la périphérie de la colonie 16-3c10, même dans le cas du croisement incompatible (fig. 7.5a).

Chez R. solani, le développement de ces touffes de mycélium indique la formation d'hétérocaryons. Chez T. incarnata, elle est le résultat soit de la dicaryotisation progressive du monocaryon dans un croisement di-mono (fig. 7.5), soit de la formation de dicaryons dérivés, surtout dans les croisements où la compatibilité entre deux dicaryons est partielle, entraînant des échanges sélectifs de noyaux (fig. 7.6).

Dans les croisements incompatibles, la souche fc16-3c10 joue un rôle actif dans la formation des touffes de mycélium, via l'induction de recombinaisons somatiques, soit en acceptant des noyaux (fig. 7.5a) soit en jouant le rôle de donneur de noyaux lorsqu'elle fait déjà partie d'un dicaryon (fig. 7.7a). Les croisements incompatibles réalisés avec des souches sauvages (fig. 7.4b, 4c et 7b) n'ont pas produit de dicaryons dérivés.

Sur milieu MC et V8, la colonie 16-3c10 est très pigmentée et la diffusion de sa toxine empêche la colonie opposée de la rejoindre. La croissance de (9P x 74Gn), souche incompatible, en est affectée (fig. 7.5a), de même que celle de (59G + 16-3c10) malgré la présence des mêmes noyaux 16-3c10 dans l'une et l'autre souche confrontée (fig. 7.5b). La colonie dicaryotique composée des deux souches non parentes (5S) et (12R) est moins sensible au gradient de toxine (fig. 7.5c).

Chez tous les champignons hétérothalliques, l'incompatibilité somatique entre monocaryons prévient l'inbreeding. Chez certaines espèces, l'interaction entre mycelia hétérocaryotiques dépend aussi du degré de compatibilité et de parenté entre souches. Chez les pourridiés Coriolus versicolor et Stereum hirsutum, des zones d'interaction relativement préservées de la décomposition, sont fréquemment observées entre différentes colonnes de pourriture du bois. En réalité, les dicaryons du basidiomycète tétrapolaire C. versicolor sont mutuellement antagonistes (Rayner et Todd, 1979). De même, les hétérocaryons du basidiomycète bipolaire S. hirsutum développent entre eux une zone d'antagonisme d'autant plus marquée qu'ils appartiennent à des souches complètement compatibles et surtout non parentes (Coates et al, 1981). Cet antagonisme mutuel n'empêche pas les échanges réciproques de noyaux mais, en les retardant, contribuent à la naissance ou à la survie de certains mycelia secondaires qui, sans ce processus, auraient été éliminés ou remplacés immédiatement au profit de combinaisons nucléaires sélectionnées sur base de leur plus grand degré d'hétérozygotie. A travers ce phénomène d'antagonisme, c'est donc l'outbreeding qui est réfréné.

Chez Sclerotium rolfsii, basidiomycète pathogène vivant dans le sol, existent des groupes d'anastomose (Punja et Grogan, 1983) comparables à ceux existant chez Rhizoctonia solani. In vitro, les isolats appartenant à un même groupe croissent l'un dans l'autre sans développer de zone d'antagonisme alors que les hyphes de ceux qui appartiennent à des groupes distincts se lysent peu de temps après leur anastomose.

Nous n'avons pas observé in vitro d'antagonisme comparable entre souches compatibles de T. incarnata, chaque espèce réalisant de manière particulière l'équilibre inbreeding – outbreeding nécessaire à sa survie (Cavelier, 1986a). Chez T. incarnata, l'incompatibilité somatique assurant l'isolement végétatif des hyphes n'est pas différente en effet de l'incompatibilité sexuelle.

Une étude portant sur Schizophyllum commune (Ahmad et Miles, 1970) nous apprend que la fréquence des fusions d'hyphes est plus élevée entre souches monocaryotiques compatibles qu'entre souches incompatibles, sauf si ces dernières sont sensibilisées par des souches compatibles. Les souches monocaryotiques confrontées à elles-mêmes présentent des fusions d'hyphes moins nombreuses que dans les confrontations entre monocaryons différents. Entre souches dicaryotiques, ce sont les croisements compatibles ou hémicompatibles A qui présentent le plus de fusions d'hyphes et, dans les zones d'interaction, comme chez T. incarnata, aucune manifestation d'antagonisme n'a jamais été observée.

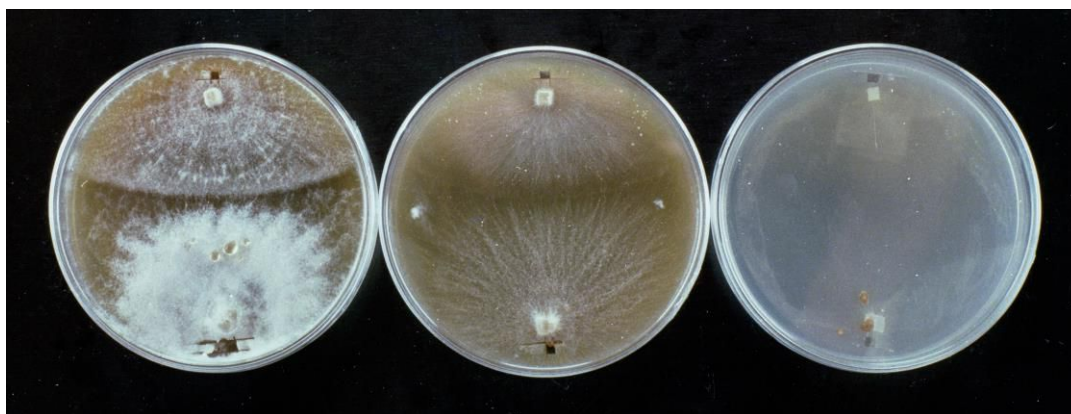
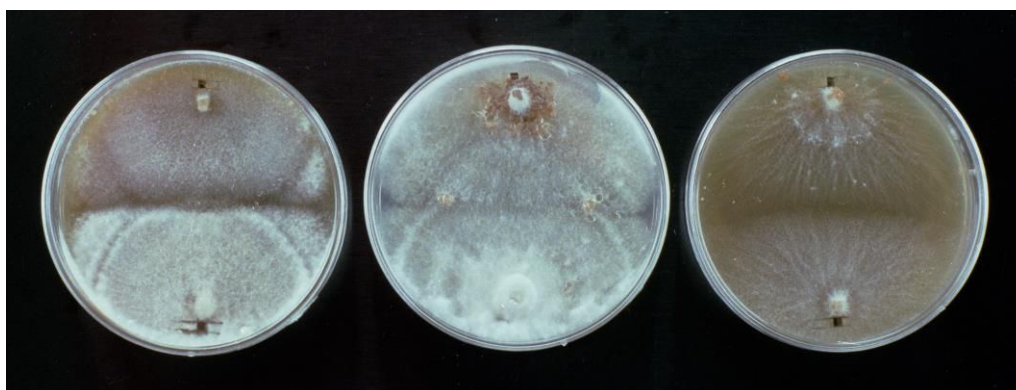
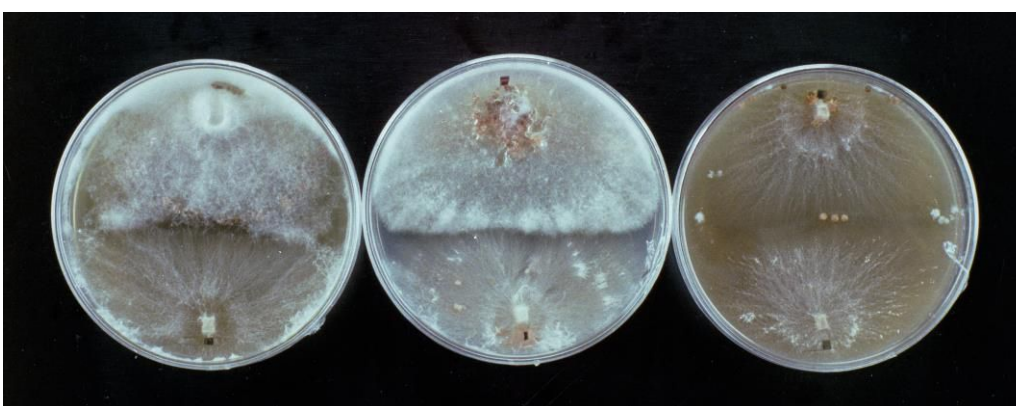


Figure 7.3: Confrontation de la souche fcb 4CH4 (au dessus) avec la souche (9P x 59G) (en dessous) sur milieux MA, V8 et LBA (de gauche à droite).



a



b



c

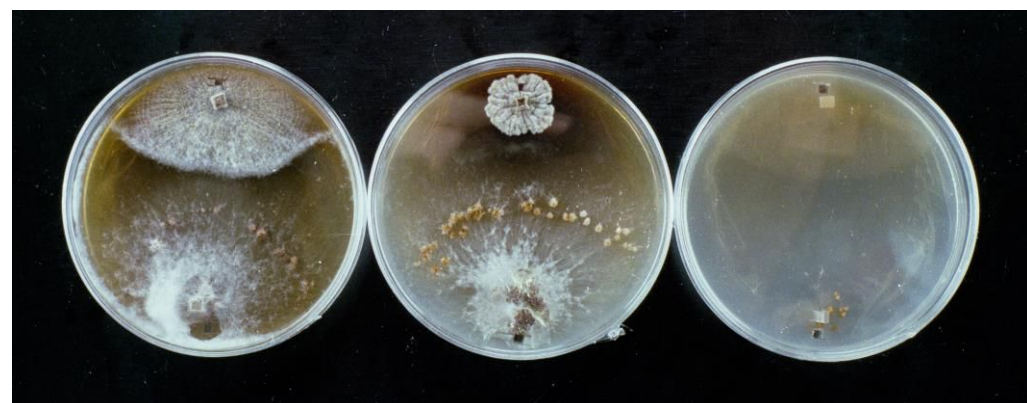
Figure 7.4 : Confrontation de la souche 74Gn (A2B2) (au dessus) avec
 a la souche 9P (A4B4) ; relation compatible entre souches non parentes
 b la souche 56Gn (A1B2) ; relation incompatible
 c la souche (48G x 56Gn) (A2B1 x A1B2) ; relation incompatible
 en dessous, sur milieux MA, MC et V8 (de gauche à droite)



a : incompatibles



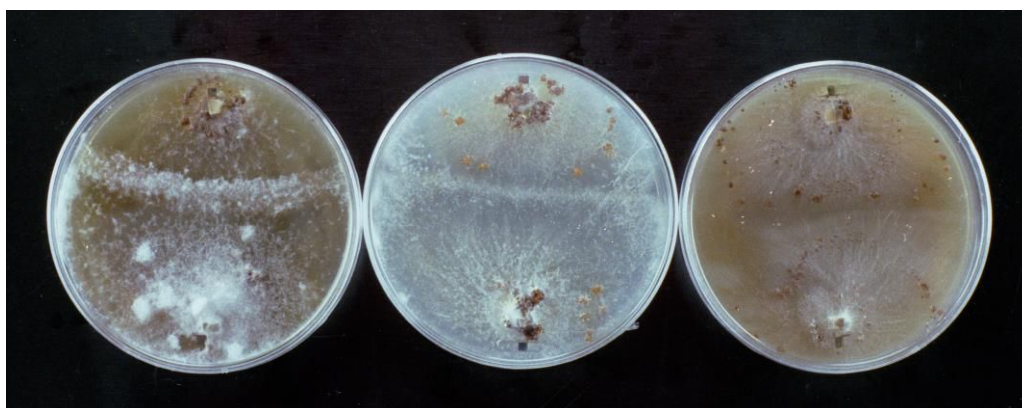
b : compatibles et parentes



c : compatibles et non parentes

Figure 7.5 : Confrontation de la souche fcb 16-3C10 (A4B2) (au dessus)
avec en dessous :

- a la souche (9P x 74Gn) (A4B4 x A2B2) sur milieux MA, MC et V8
(de gauche à droite)
- b la souche (59G x 16-3C10) (A1B1 x A4B2) sur milieux MA, MC et V8
(de gauche à droite)
- c la souche (5S x 12R) (A5B5 x A8B9) sur milieux MA, MC et LBA
(de gauche à droite)



a : 1/4 compatible



b : 1/2 compatible



c : 3/4 compatible

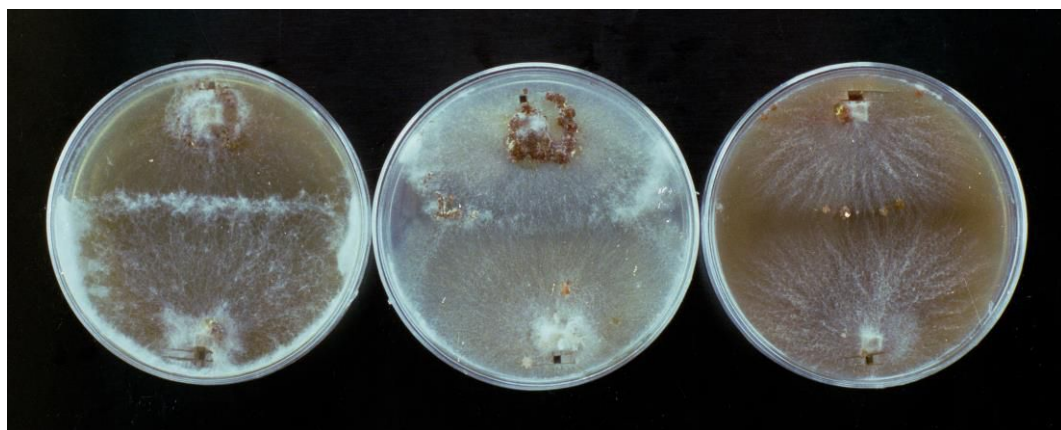
Figure 7.6 : Influence du degré de compatibilité entre souches dicaryotiques :
confrontation de la souche (4S x 6S) (A4B5 x A5B3) (au dessus)

avec en dessous ; a la souche (9P x 5S) (A4B4 x A5B5)
b la souche (5S x 12R) (A5B5 x A8B9)
c la souche (74Gn x 15-4A38) (A2B2 x A4B1)

sur milieux MA, MC et V8 (de gauche à droite)



a : au dessus, la souche monocaryotique 56Gn (A1B2)
 en dessous, dicaryon 59G x 16-3C10 (A1B1 x A4B4)



b : au dessus, dicaryon 59G x 74Gn (A1B1 x A2B2)
 en dessous, dicaryon 48G x 56Gn (A2B1 x A1B2)

Figure 7.7 : Aspect de deux confrontations incompatibles
 (de gauche à droite, sur milieux MA, MC et V8)

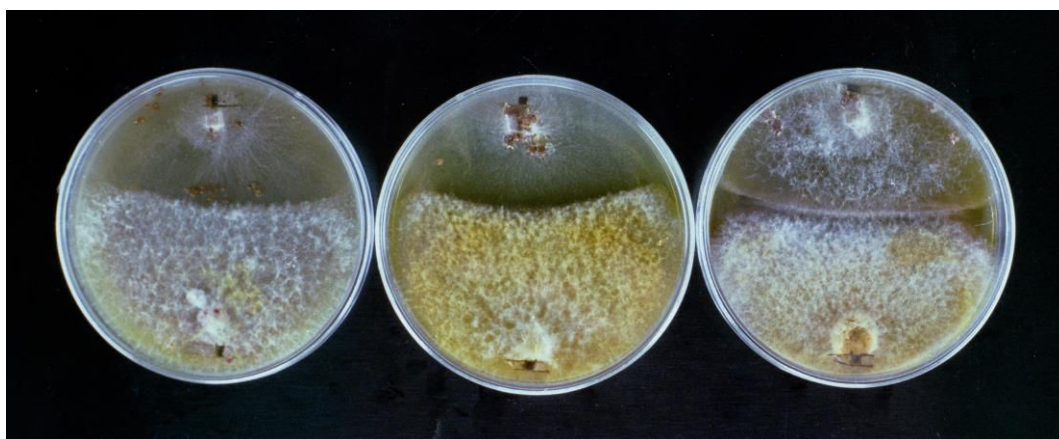
a croisement di-mono avec formation d'un mycélium recombinant envahissant le monocaryon sur milieu MA

b croisement di-di où l'arrêt de la croissance des dicaryons est signalé par la formation de quelques hyphes aériens de même nature que ceux se présentant de façon dispersée dans le dicaryon (48G x 56Gn) sur milieu MA

7.7. Interaction entre T. incarnata et d'autres champignons.

Les confrontations de champignons appartenant à des genres différents ont montré que l'isolat d'Epicoccum nigrum était faiblement antagoniste à l'égard d'une souche de Typhula incarnata, alors que cette dernière était indifférente vis-à-vis d'un isolat de Fusarium nivale (fig. 7.8).

Harder et Troll (1973) ont montré que les sclérotos de T. incarnata pouvaient être parasités par plusieurs espèces de Trichoderma. Au Canada, certains isolats de Acremonium boreale, champignon à sclérotos oranges se rencontrant sur une grande diversité de plantes, sont antagonistes des moisissures de neige (Smith et Davidson, 1979).



a



b

Figure 7.8 : Confrontation de la souche (59G x 5S) de Typhula incarnata (au dessus) avec en dessous : a Epicoccum nigrum
b Fusarium nivale

sur milieux MA, MC et V8 (de gauche à droite)

7.8. Influence de la compatibilité entre souches de Typhula incarnata sur l'interaction hôte-pathogène : une hypothèse explicative.

L'ensemble des cas de figure décrits dans le cadre de l'interaction hôte-pathogène (à l'exception de ceux où est impliquée la souche 4CH4) montre que la co-inoculation de souches diversement agressives provoque toujours une interaction compatible lorsque les souches du pathogène sont elles-mêmes compatibles entre elles.

Si une souche non agressive produit localement, aux sites d'infection de la plante, des éliciteurs de phytoalexines rendant l'interaction hôte-pathogène incompatible, il faut se demander pourquoi une souche agressive co-inoculée avec la précédente serait capable d'interférer avec le mécanisme de protection induite au point que l'interaction hôte-parasite en devienne compatible.

Ce manque de protection a aussi été constaté dans le système soja - Phytophthora megasperma f.sp. glycinea où on a reconnu des résidus de β 1-3 glucanes produits par le champignon fonctionnant comme éliciteurs non spécifiques de phytoalexines (Ayers et al., 1976).

Dans le système orge - T. incarnata, ce phénomène peut être étudié en fonction de l'incompatibilité de l'interaction hôte-parasite observée lorsque les souches co-inoculées (agressive et non agressive vis-à-vis de l'hôte) sont incompatibles entre elles.

Le comportement ambivalent du monocaryon non agressif 16-3c10 selon qu'il est compatible ou non avec un dicaryon agressif co-inoculé, mérite d'être analysé à la lumière des différents travaux de recherche qui ont mis en évidence le rôle des molécules complexes d'hydrates de carbone dans les mécanismes de défense des plantes (Albersheim et Darvill, 1985).

Dans le système orge - T. incarnata, ces mécanismes pourraient être mis en oeuvre par la libération de résidus de glucanes de la paroi fongique du champignon et/ou par la présence d'une polygalacturonase d'origine fongique capable d'attaquer les parois cellulaires de l'hôte et de libérer des éliciteurs endogènes de phytoalexines (nous pensons au brunissement du collet de l'orge provoqué par les souches fcB : figure 6.5B).

Lorsqu'il y a incompatibilité entre souches, on peut supposer que leur interaction est nulle et que les éliciteurs de phytoalexines résultant de l'interaction hôte-souche non agressive, sont à la base d'une réaction de résistance de l'hôte (interaction hôte-pathogène incompatible).

En revanche, lorsque les souches sont compatibles entre elles, la migration des noyaux du dicaryon dans le monocaryon provoquerait, comme chez Schizophyllum commune, une augmentation très importante de R - glucanase

nécessaire à la dissolution des parois des hyphes (Wessels, 1978). Ces enzymes interféreraient avec le système de l'enzyme polygalacturonase ou interfèreraient avec le couple éliciteur (champignon ou plante) - récepteur (plante) qui active la séquence des réactions biochimiques conduisant à la production de phytoalexines (en libérant des suppresseurs qui inhiberaient les récepteurs de la plante ?).

En tout état de cause, les phytoalexines ne seraient plus produites, même après dicaryotisation quand l'activité de la R - glucanase diminue (Wessels, 1978), excepté dans le cas où l'agressivité est encore réprimée à l'état dicaryotique par le gène fcg de type B17.

En effet, malgré la compatibilité entre souches, la protection de l'orge serait dans ce cas assurée par une production continue d'éliciteurs de phytoalexines. Cette protection serait cependant moins efficace que celle rendue possible par l'incompatibilité entre souches car elle ne pourrait s'imposer que dans un second temps, après la dicaryotisation de la souche et le retour à une faible activité de la R-glucanase (Wessels, 1978).

Les interactions de souches dicaryotiques, toujours compatibles au champ, ne contredisent pas cette hypothèse puisque les échanges de noyaux se produisant entre thalles dicaryotiques, impliquent également une augmentation de R-glucanase, ce qui confirme la prépondérance des souches agressives sur les non agressives (en absence du gène fcg B17). Dans ce cas, on peut également supposer que le niveau d'activité de la R-glucanase est fonction de la capacité différentielle des souches à fonctionner en donneur ou en récepteur de noyaux (Cavelier, 1986b).

7.9. Conclusions.

Le comportement in vitro des souches de T. incarnata est peu révélateur de leurs interactions pour lesquelles l'hôte est un partenaire indispensable. Que ce soit par le biais de l'occupation des sites primo-infectés ou par celui de l'induction de phytoalexines ou d'antibiotiques, la plante d'orge est capable de réagir globalement à l'infection de T. incarnata en fonction de la séquence d'application des souches contaminantes et de leur pouvoir compétitif.

Ce pouvoir compétitif dépend essentiellement du degré de compatibilité entre souches et de la présence éventuelle de gènes dominants. Le tableau 7.6 donne un aperçu de l'ensemble des situations observées qui peuvent se résumer comme suit : l'incompatibilité entre souches ou l'occupation prioritaire des sites d'infection permet à une souche non agressive de rendre l'interaction hôte - pathogène définitivement non compatible ; en cas de compatibilité entre

Tableau 7.6 : Infection de l'orge d'hiver par Iyphula incarnata en fonction de la nature et de la compatibilité des souches inoculées par paires.

Type d'inoculation	Degré d'infection provoqué par l'inoculation de souches de <u>Iyphula incarnata</u>	Degré d'infection		
		Compatibles	Hémicompatibles	Incompatibles
Deux souches d'agressivités égales inoculées en t1	(a1 + a2) _{t1}	T.S	T.S	T.S
Deux souches d'agressivités différentes inoculées en t1	(a + Na) _{t1}	T.S		M.S
Idem que précédemment mais la souche non agressive est de type <u>fcB</u> B2	(a + <u>fcB</u> B2) _{t1}	T.S	M.S	T.L
Idem que précédemment mais la souche non agressive est de type <u>fcB</u> B17	(a + <u>fcB</u> B17) _{t1}	M.S	M.S	-
Deux souches non agressives inoculées en t1	(Na1 + Na2) _{t1}	T.L	-	-
Préinoculation d'une souche non agressive suivie 14 jours plus tard de l'inoculation d'une souche agressive	(Na) _{t1} + (a) _{t2}	T.L		-

a souche agressive

Degrés d'infection - T.S : infection très sévère

Na souche non agressive

- M.S : infection moyennement sévère

- T.L : infection très limitée

- non testé

souches et d'occupation simultanée des sites d'infection, seul un gène supprimeur de l'agressivité tel que le gène fc_b de type B17 est capable de réduire sensiblement le degré d'infection. En outre, toutes ces interactions ne peuvent avoir lieu qu'au collet de la plante indépendamment de l'inoculation ou de l'infection par le pathogène à un autre endroit de la plante, car l'effet de prémunition induit par certaines souches n'est pas systémique.

En conséquence, il existe 3 moyens de réduire le taux d'infection de I. incarnata en inoculant des souches de ce pathogène :

1. LA PREINOCULATION D'UNE SOUCHE NON AGRESSIVE QUELCONQUE DEUX SEMAINES AVANT QUE LA PLANTE NE SOIT SUJETTE A L'ATTAQUE DE LA SOUCHE AGRESSIVE.

Au champ, cette opération pourrait paraître impossible à réaliser puisque les souches agressives que l'on veut combattre occupent initialement le terrain. Néanmoins, si l'inoculation de la souche non agressive intervient suffisamment tôt, avant que le processus naturel d'infection ait commencé (juste après le semis par exemple), les sclérotés inoculés auront un léger avantage sur les sclérotés résidents parce que les premiers se trouveront à la surface du sol, plus proches du collet des plantes sensibles que ne le seront les seconds enfouis dans le sol.

2. L'INOCULATION D'UNE SOUCHE NON AGRESSIVE INCOMPATIBLE QUELQUES JOURS AVANT OU EN MEME TEMPS QUE LA SOUCHE AGRESSIVE.

Cette solution est pratiquement très limitée en raison du fait que les dicaryons sont universellement compatibles entre eux. L'emploi de souches monocaryotiques est impraticable, car elles ne résistent pas à la dicaryotisation. De plus, le pouvoir de compétition d'une souche monocaryotique non agressive est conditionné par sa capacité à rester insensible aux variations de l'environnement, ce qui semble être uniquement le cas des souches fc_b qui sont invariablement non agressives, même lorsque les plantes inoculées sont non endurcies au froid. Cependant, les souches fc_b monocaryotiques ne produisent pas d'inoculum de sclérotés, seule forme d'inoculum utilisable au champ.

3. L'INOCULATION D'UNE SOUCHE DICARYOTIQUE NON AGRESSIVE CONTENANT LE GENE fc
B17 QUELQUES JOURS AVANT OU EN MEME TEMPS QUE LA SOUCHE AGRESSIVE.

Cette dernière possibilité offre le plus de perspective d'avenir en vue de la lutte biologique. Nos conclusions rejoignent celles du chapitre 6 sur l'emploi éventuel de souches dicaryotiques fc B17 qui aurait sur l'orge un effet protecteur indépendamment de leur compatibilité avec les souches résidentes à combattre.

CHAPITRE 8

LES RECOMBINAISONS SOMATIQUES CHEZ TYPHULA INCARNATA.

8.1. Introduction

Les recombinaisons somatiques chez les champignons présentent un intérêt particulier, que ce soit par le biais des crossing-over mitotiques dans les diploïdes transitoires (Aspergillus nidulans, Pontecorvo et Käfer, 1958; Schizophyllum commune, Parag, 1968) ou par l'échange de chromosomes entiers au cours de la division synchrone des noyaux du dicaryon (Puccinia coronata, Bartos et al, 1969). Le cycle parasexuel qui conduit à l'isolement d'haploïdes recombinants est d'autant plus efficace que le cycle sexuel fait défaut (Puccinia striiformis) ou que, en raison du mode de dispersion du champignon, l'inbreeding est plus fréquent que l'outbreeding. Chez une espèce tétrapolaire comme Typhula incarnata, 25% des croisements sont compatibles au voisinage d'une clavule fertile, donnant lieu à la formation de nombreux couples di-mono incompatibles susceptibles de donner naissance à des recombinants somatiques (voir point 7.6).

Une des propriétés du phénotype fc_b (Cavelier, 1982b) est précisément sa capacité de lever l'incompatibilité d'un croisement illégitime entre un dicaryon utilisé comme donneur de noyaux et un monocaryon utilisé comme accepteur de noyaux. La dicaryotisation du monocaryon incompatible est forcée par la présence du gène mutant fc_b (Cavelier, 1982b). L'analyse des croisements de retour effectués entre les dicaryons dérivés des croisements illégitimes et les monocaryons d'origine (Papazian, 1950) appuie l'interprétation de ces observations.

La présente étude montre que la confrontation d'un dicaryon avec un monocaryon incompatible induit la formation d'un noyau compatible avec ce dernier, en transférant une fois sur quatre une mutation nutritionnelle propre à un des noyaux du dicaryon parental. Le comportement de la descendance d'un dicaryon recombinant, du point de vue de son agressivité, a également été étudié en chambre froide.

8.2. Obtention de dicaryons dérivés à partir de croisements illégitimes

a) Formation du dicaryon parental (fig. 8.1a).

4CH4 (A5B17 fcb) X 11-3E41 (A2B1 aux)

- 4CH4 est un monocaryon fcb, caractère génétiquement lié à l'allèle d'incompatibilité B17 (Cavelier, 1985).
- 11-3E41 est un monocaryon auxotrophe incapable de croître sur milieu minimum à base d'asparagine comme source azotée (voir chapitre 2)

b) Réalisation du croisement di-mono illégitime : un explantat du dicaryon parental est déposé au coeur de la colonie monocaryotique (Cavelier, 1982b) en croissance sur milieu PDA (fig. 8.1b).

3Na2 (A2B17) + [4CH4 (A5B17) X 11-3E41 (A2B1)]

- 3Na2 est un monocaryon fcb issu du dicaryon [4CH4 (A5B17) X 74Gn (A2B2)] (voir chapitre 6).

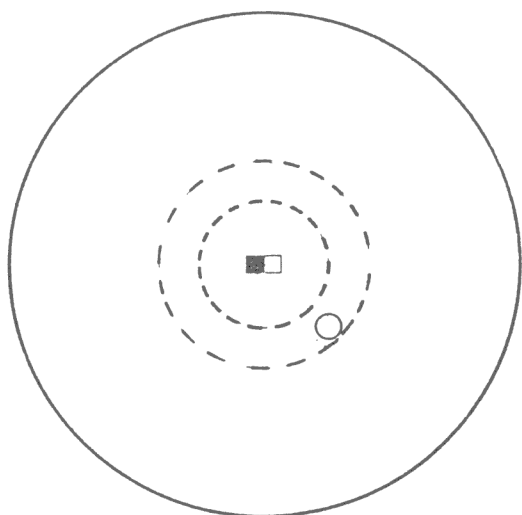
c) Réalisation des croisements de retour avec une douzaine de dicaryons dérivés obtenus trois semaines après les croisements illégitimes (tableau 8.1) (fig. 8.1c).

Outre la présence régulière d'anses d'anastomose observées au microscope optique, la présence exclusive de cellules binucléées dans les dicaryons dérivés a été confirmée par une coloration des différents thalles au Giemsa.

La fréquence de dicaryotisation de la souche 3Na2 suppose une proportion importante de dicaryons dérivés recombinants. La fréquence relative des croisements compatibles avec 48G (2/12) et 4CH4 (3/12) dont les génotypes d'incompatibilité sont les mêmes que ceux des dicaryons parentaux peut s'expliquer par :

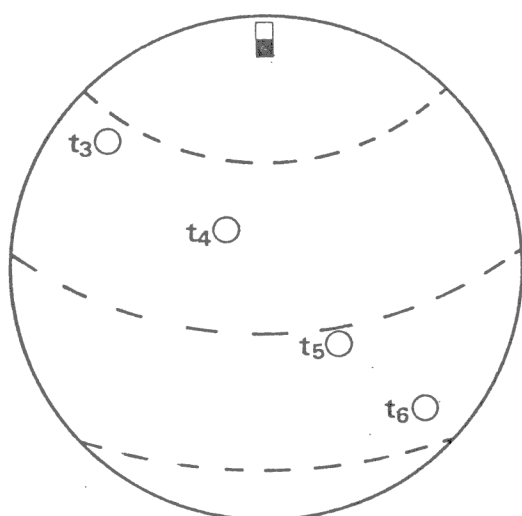
- La présence du dicaryon parental dans l'isolat (erronément dénommé, dans ce cas, dicaryon dérivé) à la suite d'une transgression du dicaryon parental dans le monocaryon incompatible du croisement illégitime de départ (fig.8.1b). Rawitscher (1933) et Papazian (1950 a,b) ont postulé et prouvé

a. Formation du dicaryon parental



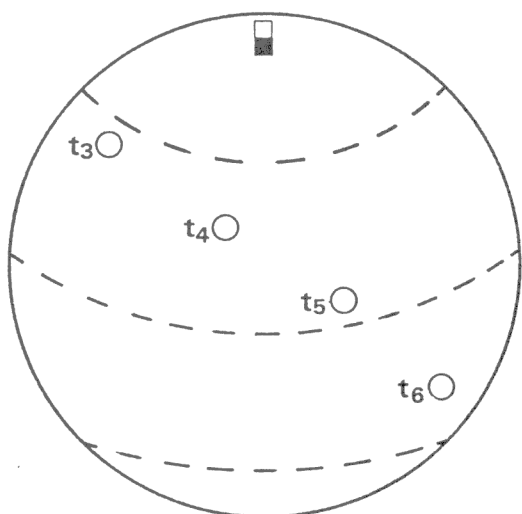
- souche 4CH4 (temps 1)
- souche 11-3E41 (temps 1)
- prélèvement d'une biopsie (4CH4 x 11-3E41) (temps 2)

b. Croisement illégitime



- souche 3Na2 (temps 1)
- explantat (4CH4 x 11-3E41) (temps 2)
- prélèvements au temps 3,4,5 (→ dicaryons dérivés)

c. Contrôle du dicaryon dérivé par croisements de retour



- monocaryon test (temps 1)
- explantat dicaryon dérivé (temps 2)
- prélèvements au temps 3,4,5 (→ présence d'anses d'anastomoses ?)

Figure 8.1 : Chronologie des opérations conduisant à l'obtention de dicaryons dérivés à partir de croisements illégitimes (voir texte)

l'existence de ce phénomène chez Schizophyllum commune.

- Une transgression du dicaryon dérivé jusqu'à l'endroit du prélèvement dans la zone de croissance du monocaryon 48G ou 4CH4 (fig. 8.1c)
- Une recombinaison du dicaryon dérivé vers le type parental (fig.1c). Ceci est assez probable dans le cas de la dicaryotisation de la souche 4CH4 étant donné son caractère fc. Remarquons que les dicaryotisations de 48G et de 4CH4 ne se présentent pas simultanément pour un même dicaryon dérivé, ce qui laisse supposer que c'est la nature du monocaryon accepteur de noyaux qui est déterminante en matière de compatibilité dans le croisement di-mono et non la nature du dicaryon dans la biopsie en croisement. C'est dans ce même ordre d'idées qu'il convient d'interpréter le fait que la souche 11-3E41 n'a en aucun cas été dicaryotisée (tableau 8.1.) alors que ce monocaryon possède le même génotype d'incompatibilité que la souche 48G.

Tableau 8.1 : Nombre de jours après lesquels on observe la présence d'anses d'anastomose dans les explantats des monocaryons-test en croisement avec les dicaryons dérivés.

Dicaryons dérivés	Monocaryons-test				
	48G	11-3E41	4CH4	3Na2	4Na1
	A2B1	A2B1	A5B17	A2B17	A5B1
1	14			8	8
2				8	8
3	8			14	8
4				14	8
5				8	8
6				8	8
7				19	8
8			14	8	14
9				7	7
10			7	7	7
11			7	7	
12				7	

L'obtention de dicaryons dérivés de formule (A2B17 + A5B1) ne fait donc pas de doute. Cependant, on ne connaît pas le degré de pureté du produit isolé : y-a-t'il formation d'un seul thalle dérivé ou d'un mélange de thalles qui seraient responsables des résultats divers mentionnés au tableau 8.1.?

L'utilisation d'un marqueur auxotrophe permettrait de différencier entre eux les dicaryons dérivés et de vérifier si aucun dicaryon parental ne les accompagne. Le dicaryon parental est porteur, dans cette perspective, d'une mutation nutritionnelle dont le transfert éventuel dans le dicaryon dérivé

permettrait de préciser le schéma de recombinaison conduisant à lever l'incompatibilité du croisement illégitime (voir ci-dessous).

8.3. Etude de l'hérédité d'une mutation nutritionnelle par analyse de la descendance de deux dicaryons recombinants.

Quarante cultures monospermes ont été obtenues à partir de la sporée d'une clavule appartenant au dicaryon recombinant n°3 (Dr3) et 33 autres en provenance du dicaryon recombinant n°6 (Dr6) (tableau 8.2).

Seuls les monocaryons B17 ont été affectés par le gène fcb, ce qui confirme des résultats antérieurs (chapitre 6). Une proportion importante de monocaryons sont auxotrophes (14/40 issus du dicaryon n°3, 14/33 issus du dicaryon n°6) ; l'auxotrophie affecte n'importe quel type de souche, indépendamment du génotype d'incompatibilité ou du caractère fcb.

Tableau 8.2 : Identification des souches monospermes fournies par la mise à fruit de deux dicaryons recombinants.

Génotypes d'incompatibilité	Nombre de souches monospermes obtenues à partir du					
	Dicaryon recombinant n°3			Dicaryon recombinant n°6		
	Total	<u>fc</u> b	<u>aux</u>	Total	<u>fc</u> b	<u>aux</u>
A5B17	11	11	6	5	5	5
A2B1	8	0	4	10	0	2
A2B17	10	10	2	12	12	4
A5B1	11	0	2	6	0	3

Tous les croisements réalisés entre les monocaryons auxotrophes et les monocaryons de type sauvage ont donné des dicaryons prototrophes (tableau 8.3), ce qui indique que le facteur nutritionnel responsable de l'auxotrophie est récessif. Par ailleurs, il est vraisemblable qu'un seul gène soit impliqué dans cette auxotrophie car tous les croisements réalisés entre les descendants auxotrophes du dicaryon recombinant n°3 ont produit des dicaryons eux-mêmes auxotrophes (tableau 8.3).

Tableau 8.3 : Mise en évidence du caractère monogénique récessif de la mutation nutritionnelle (aux).

Génotypes d'incompatibilité	A2B1					A5B1			
	Auxotrophes 13 36 42 49				Prototrophe 18	Auxotrophes 16 56		Prototrophes 3 8	
Auxotrophes									
A5B17 2	-1	-	-	-	+1				
" 5	-	-	-	-	+				
" 26	-		-	-	+				
" 27	-		-	-	+				
" 32	-		-	-	+				
" 40	-		-	-	+				
A2B17 6						-	-	+	+
" 44						-	-	+	+
Prototrophe									
A1B2 56Gn	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1. Croissance (+) ou non croissance (-) sur milieu minimum de différents produits dicaryotiques résultant de croisements compatibles entre souches auxotrophes et souches prototrophes.

8.4. Utilisation du facteur de déficience nutritionnelle comme marqueur de la recombinaison somatique.

D'après les produits de la recombinaison sexuelle (point 8.3) observée chez deux dicaryons recombinants (Dr3 et Dr6), il apparaît qu'un seul noyau de l'association dicaryotique est porteur du génotype responsable de la déficience nutritionnelle. Ce génome est issu de la recombinaison des noyaux au sein du dicaryon parental (soit A5B1) puisque le monocaryon (A2B17) utilisé dans le croisement illégitime était de type sauvage (aux+).

Hartley et Williams (1971) supposent qu'une colonie dicaryotique contiendrait plus de deux génotypes haploïdes et que des génomes supplémentaires se formeraient par échange de chromosomes entiers durant la mitose synchrone des noyaux (Day, 1974). De plus, l'haploïdisation serait rarement accompagnée

d'une recombinaison à l'intérieur des groupes de liaison (Pontecorvo et Käfer, 1958).

Dans le cas des dicaryons recombinants n°3 et n°6, le facteur aux est localisé soit sur le même chromosome que celui portant l'allèle d'incompatibilité B1, soit sur un chromosome différent de celui qui porte le facteur A ou le facteur B d'incompatibilité. Toutefois, s'il s'avérait que tous les dicaryons recombinants étaient porteurs du gène d'auxotrophie, il serait probable que ce gène se trouverait sur le même chromosome que celui qui porte le facteur B, à une distance suffisamment grande de ce facteur pour justifier la grande fréquence de recombinaison observée dans les produits méiotiques (tableau 8.2).

Le tableau 8.4 présente une succession de croisements à partir des 3 types de dicaryons possibles dérivés des croisements illégitimes. Deux sont des recombinants, le troisième est le dicaryon parental dont il faut toujours envisager la présence en association avec les dicaryons recombinants. L'éventualité de la formation du dicaryon (A2B17aux + A5B1) n'a pas été retenue car les dicaryons dérivés ont été prélevés dans une zone A2B17 préexistante (fig.8.1b) impropre à la migration du noyau A2B17aux.

Ces trois formules peuvent être différenciées l'une de l'autre dans une suite de croisements di-mono dont les produits sont testés à chaque étape sur milieu minimum.

La dicaryotisation ne réussit pas toujours, même dans un croisement di-mono hémicompatible. C'est ainsi que 9 monocaryons A5B1 sur 38 n'ont pas été dicaryotisés. Ce phénomène est connu et est à mettre en rapport avec la sélection nucléaire (Cavelier, 1982b). Tous les monocaryons n'ont pas la même faculté de donner et de recevoir des noyaux (Bruehl *et al*, 1975). Dans le cas d'un matériel non caractérisé de ce point de vue, il est préférable de réaliser les croisements di-mono avec plusieurs souches-test différentes afin de limiter le nombre de résultats non exploitables.

Cependant, l'absence de dicaryotisation résulte le plus souvent d'une incompatibilité qui est pratiquement insurmontable quand il s'agit d'un croisement illégitime dans lequel le monocaryon accepteur de noyaux est dépourvu du gène fc_b. C'est pourquoi 36 monocaryons A2B1 sur 38 n'ont pas été dicaryotisés. Ce résultat implique qu'aucun dicaryon (A2B17 aux + A5B2) n'a été formé à l'étape précédente et que tous les dicaryons prototrophes issus du croisement avec les monocaryons A2B17 sont de formule (A2B17 aux + A5B1).

Il semble, par conséquent, que parmi les 11 dicaryons dérivés des croisements illégitimes, 3 sont des recombinants de type (A2B17 + A5B1 aux) et 8 de type (A2B17 + A5B1). Il est en effet peu probable que la non-dicaryoti-

Tableau 8.4 : Identification des dicaryons dérivés de croisements illégitimes par le biais d'une succession de croisements di-mono dont les produits sont testés pour la présence ou l'absence d'une auxotrophie.

Dicaryons dérivés (total 11)	X 746n (A2B2)	X 44Dr3 (A2B17) <u>aux</u>	X 13Dr3 (A2B1) <u>aux</u>	X 16Dr3 (A5B1) <u>aux</u>	Nombre de cas observés
Tous prototrophes		et	et	et	
	X 6Dr3 (A2B17) <u>aux</u>	X 36Dr3 (A2B1) <u>aux</u>	X 56Dr3 (A5B1) <u>aux</u>		
Parental A5B17 + A2B1 <u>aux</u>	A2B2 + A5B17 (prototrophe)	Illégitime └(1)→ A2B17 <u>aux</u> + A5B2 (prototrophe)	A2B1 <u>aux</u> + A5B2 (prototrophe)	A5B1 <u>aux</u> + A2B17 <u>aux</u> (auxotrophe)	0
→ A2B17 + A5B1 <u>aux</u>	A2B2 + A5B1 <u>aux</u> (prototrophe)	A2B17 <u>aux</u> + A5B1 <u>aux</u> (auxotrophe)	Illégitime └(2)→ A2B1 <u>aux</u> + A5B17 <u>aux</u> (auxotrophe)	A5B1 <u>aux</u> + A2B17 <u>aux</u> (auxotrophe)	3
Recombinants					
→ A2B17 + A5B1	A2B2 + A5B1 (prototrophe)	A2B17 <u>aux</u> + A5B1 (prototrophe)	Illégitime └(2)→ A2B1 <u>aux</u> + A5B17 (prototrophe) ou └(2)→ A2B1 <u>aux</u> + A5B17 <u>aux</u> (auxotrophe)	A5B1 <u>aux</u> + A2B17 <u>aux</u> (auxotrophe)	8
Nombre de produits dicaryotiques prototrophes	11/11	13/22	0/38	0/38	
" auxotrophes	0/11	6/22	2/38	29/38	
monocaryotiques auxotrophes	0/11	3/22	36/38	9/38	

(1) recombinaison somatique rapide grâce au gène fcb présent dans le monocaryon accepteur de noyaux.

(2) recombinaison somatique lente ou impossible, en absence du gène fcb dans le monocaryon accepteur de noyaux.

sation de 3 monocaryons (A2B17) sur 22 soit due à une incompatibilité avec un hypothétique (A2B2 + A5B17), surtout en présence du gène fcb. D'autre part, la dicaryotisation a bien eu lieu dans tous les cas avec au moins une des deux souches utilisées (6Dr3 ou 44Dr3), ce qui infirme l'apparente illégitimité du croisement.

Parmi les 3 recombinants (A2B17 + A5B1 aux), on retrouve les deux dicaryons Dr3 et Dr6. L'ensemble des résultats du tableau 8.4 permet de supposer que le gène d'auxotrophie est localisé sur un chromosome différent des chromosomes qui portent les facteurs d'incompatibilité, confirmant l'observation faite sur les produits de la recombinaison sexuelle (tableau 8.2).

8.5. Agressivité de la descendance d'un dicaryon recombinant.

L'agressivité de la descendance du dicaryon recombinant n°3 a été analysée en chambre froide après croisement avec la souche compatible 56Gn, qui s'était montrée très agressive dans un essai antérieur (Cavelier, 1986b). Comme le dicaryon n°3 comportait à la fois le gène fcb et le gène aux, il était intéressant de distinguer parmi la descendance de ce dicaryon, les souches possédant l'un ou l'autre de ces facteurs.

Les résultats d'infection montrent que la descendance du dicaryon recombinant présente une variation discontinue de l'agressivité due au gène fcb (tableau 8.5a). La comparaison des résultats d'infection, selon que les souches possèdent ou ne possèdent pas le gène fcb B17, est révélatrice de l'incidence de ce facteur sur l'agressivité (tableau 8.5b). Par contre, la différence entre la moyenne des résultats relatifs aux souches de type aux⁺/aux et celle relative aux souches de type aux⁺/aux⁺ est minime. Le facteur récessif aux responsable d'une déficience nutritionnelle n'altère pas le potentiel d'agressivité des souches dicaryotiques là où il ne se présente que sur un seul génome. Nous n'avons pas pu tester des dicaryons auxotrophes car nous ne possédions pas d'homocaryon compatible aux autre que fcb B17, dont l'emploi aurait entraîné à priori une perte d'agressivité.

L'effectif de monocaryons fcb⁺ est insuffisant pour pouvoir mettre en évidence une éventuelle interaction de aux et de l'agressivité. En moyenne, par rapport aux témoins non inoculés, les inocula monocaryotiques ne modifient pas les paramètres étudiés (nombre de talles et poids sec des plantes). L'effet de leur inoculation à l'orge d'hiver se situe néanmoins à mi-chemin entre l'effet bénéfique des inoculations par dicaryons fcb B17/fcb⁺ B2 (augmentation des paramètres étudiés) et l'effet dépressif des inoculations par dicaryons fcb⁺ B1/fcb⁺ B2 (diminution des paramètres observés).

Tableau 8.5a : Agressivité, vis-à-vis de l'orge d'hiver "Gerbel"⁽¹⁾, de la descendance d'un dicaryon de *Typhula incarnata* obtenu par recombinaison somatique.

Descendance monocaryotique du dicaryon Dr3	Génotype			Infection des plantes par monocaryons Dr3				Nbre de pots
	Facteurs	Marqueurs		Nbre de talles	Foids sec des plantes	Nbre de talles	Foids sec des plantes	
No monocaryons	A et B	<u>fcb</u>	<u>aux</u>					
20	A5B17	<u>fcb</u>	<u>aux</u> ⁺			26.5 ⁽²⁾	2.05 ⁽²⁾	2
29	"	"	"			27.5	2.06	"
39	"	"	"			26.5	2.06	"
47	"	"	"			21.5	1.75	"
53	"	"	"			22.5	2.09	"
7	A2B17	"	"			21.5	1.44	"
9	"	"	"			22.5	1.93	"
14	"	"	"			21.0	1.82	"
15	"	"	"			18.0	1.67	"
34	"	"	"			22.0	1.81	"
43	"	"	"			22.0	2.12	"
46	"	"	"			30.5	2.49	"
50	"	"	"			20.5	1.62	"
2	A5B17	"	<u>aux</u>			24.0	1.84	"
5	"	"	"			21.5	1.50	"
26	"	"	"			23.0	2.07	"
27	"	"	"			25.0	2.01	"
32	"	"	"			29.5	2.66	"
40	"	"	"			21.0	1.65	"
6	A2B17	"	"			27.5	2.11	"
44	"	"	"			25.0	1.89	"
		moyenne <u>fcb</u>				24.0	1.94	
10	A2B1	<u>fcb</u> ⁺	<u>aux</u> ⁺	17.0 ⁽²⁾	1.25 ⁽²⁾	19.5	1.50	2
18	"	"	"	16.5	1.49	12.5	0.80	"
22	"	"	"			15.5	1.07	"
35	"	"	"			7.5*	0.51	"
3	A5B1	"	"	21.0	1.71	21.5	1.85	"
8	"	"	"	19.0	1.36	16.5	1.08	"
21	"	"	"			18.0	1.45	"
30	"	"	"			17.5	1.21	"
33	"	"	"			20.0	1.46	"
45	"	"	"			23.0	1.53	"
48	"	"	"			19.0	1.55	"
52	"	"	"			23.0	1.58	"
54	"	"	"			15.5	1.27	"
13	A2B1	"	<u>aux</u>	16.0	1.07	7.0*	0.45	"
36	"	"	"	23.5	1.91	19.0	1.48	"
42	"	"	"			5.5*	0.22	"
49	"	"	"			15.5	1.07	"
16	A5B1	"	"	22.0	1.63	20.5	1.41	"
56	"	"	"	31.0	2.34	24.0	1.56	"
		moyenne <u>fcb</u> ⁺		21.0	1.62	16.9	1.21	
Témoins								
566n	A1B2	<u>fcb</u> ⁺	<u>aux</u> ⁺	15.5	1.22			2
566n x 9P	A1B2/A4B4	<u>fcb</u> ⁺ / <u>fcb</u> ⁺	<u>aux</u> ⁺ / <u>aux</u> ⁺			5.2*	0.32*	16
16-3C10 x 4CH4	A4B2/A5B17	<u>fcb</u> / <u>fcb</u>	<u>aux</u> ⁺ / <u>aux</u> ⁺			22.5	1.95	2
Non inoculés				22.2	1.81			6

* Significativement différent du témoin non inoculé (test de Dunnet $\alpha = 0.05$)

(1) Âge des plantules avant endurcissement au froid : 14 jours
 période d'endurcissement au froid avant inoculation : 16 jours
 durée d'incubation de la maladie : 71 jours
 récupération en serre à 20°C : 18 jours

(2) Nombre de talles et poids sec (en g) des plantes/pot à la fin de la période de récupération.
 Coefficient de variation résiduelle : 23.7% pour les talles, 33.4% pour les poids secs.

Tableau 8.5b : Comparaison du nombre de talles (A)¹ et du poids sec des plantes (B)¹ infectées ou non par *Typhula incarnata* en fonction de la nature des inocula : comparaisons multiples de moyennes par la méthode de la plus petite différence significative.

Traitements		Monocaryons (56Gn x 9P)		Dicaryons	Dicaryons	Dicaryons	Dicaryons
		<u>fc</u> b ⁺	<u>fc</u> b ⁺ B2/ <u>fc</u> b ⁺ B4	<u>fc</u> b ⁺ B1/ <u>fc</u> b ⁺ B2	<u>fc</u> b B17/ <u>fc</u> b ⁺ B2	<u>aux</u> / <u>aux</u> ⁺	<u>aux</u> ⁺ / <u>aux</u> ⁺
A. Nbre de talles	Moyenne	21.0	5.2	16.9	24.0	20.9	20.4
Témoin non inoculé	22.2	1.2 [*]	17.0 [*]	5.3 [*]	1.8	1.3	1.8
Monocaryons <u>fc</u> b ⁺	21.0		15.8 [*]	4.1 [*]	3.0 [*]	0.1	0.6
Témoin (56Gn x 9P)	5.2			11.7 [*]	18.8 [*]	15.7 [*]	15.2 [*]
Dicaryons <u>fc</u> b ⁺ B1/ <u>fc</u> b ⁺ B2	16.9				7.1 [*]		
Dicaryons <u>aux</u> / <u>aux</u> ⁺	20.9						0.5
B. Poids sec	Moyenne(g)	1.62	0.32	1.21	1.94	1.56	1.61
Témoin non inoculé	1.81	0.19	1.49 [*]	0.60 [*]	0.13	0.25	0.20
Monocaryons <u>fc</u> b ⁺	1.62		1.30 [*]	0.41 [*]	0.32 [*]	0.06	0.01
Témoin (56Gn x 9P)	0.32			0.89 [*]	1.62 [*]	1.24 [*]	1.29 [*]
Dicaryons <u>fc</u> b ⁺ B1/ <u>fc</u> b ⁺ B2	1.21				0.73 [*]		
Dicaryons <u>aux</u> / <u>aux</u> ⁺	1.56						0.05

1. Nombre de talles et poids sec des plantes/pot à la fin de la période de récupération (voir chapitre 2).
2. Différence entre deux moyennes; la présence de l'astérisque signifie que celle-ci est significative au niveau 0.05.

Le test de Dunnet (appliqué aux résultats du tableau 8.5a) montre que, pour le nombre de talles, 3 souches dicaryotiques sur les 19 susceptibles de faire valoir une agressivité en absence du gène fcb, se distinguent des témoins non inoculés de façon significative. Le coefficient de variation résiduelle des poids secs est cependant trop élevé que pour mettre en évidence une différence significative autre que celle existant entre les témoins agressifs (56Gn x 9P) et les témoins non inoculés.

8.6. Conclusions

Notre étude confirme les possibilités de recombinaison somatique chez *T. incarnata*, déjà mises en évidence dans les croisements di-mono illégitimes (Cavelier, 1982b).

L'utilisation d'un marqueur auxotrophe a permis de s'assurer de l'absence du dicaryon parental dans les différents produits de la recombinaison somatique. Le fait que le marqueur aux ne soit pas présent dans tous les dicaryons dérivés indique que l'haploïdisation qui conduit à l'isolement de noyaux compatibles, est précédée d'une phase aneuploïde impliquant plus d'un chromosome.

La recombinaison somatique n'a pas modifié fondamentalement le potentiel d'agressivité de la descendance monocaryotique d'un dicaryon recombinant dont la mise à fruits s'était déroulée normalement.

Les caractéristiques liées à l'état nucléaire des souches se sont maintenues à savoir:

- l'agressivité des monocaryons plus faible que celle des dicaryons.
- la variation continue de l'agressivité des dicaryons fcb⁺/fcb⁺.
- l'innocuité des dicaryons fcb⁺/fcb B17 qui ont un effet bénéfique pour les plantes infectées. Il se confirme dès lors que le caractère fcb B17 est dominant et implique la non-agressivité du pathogène.

D'autre part, le facteur responsable de la déficience nutritionnelle aux, récessif in vitro, n'a pas affecté in vivo l'agressivité des dicaryons prototrophes aux⁺/aux.

CHAPITRE 9

CONCLUSIONS GENERALES

9.1 Prédisposition de l'orge d'hiver à l'attaque par Typhula incarnata

L'ablation des limbes foliaires au moment de l'inoculation de Typhula incarnata, rend de jeunes plantules d'orge, prétraitées au froid, extrêmement sensibles au pathogène (tableau 7.4). Bien que l'endurcissement des plantes soit nécessaire à l'induction d'une certaine résistance à T. incarnata (Cavelier, 1986b), son effet ne se maintient au site d'infection de la plante (le collet) qu'en présence de feuilles, ce qui suggère le rôle actif de la photosynthèse en la matière.

Comme l'énergie photosynthétique disponible dépend de l'état d'enneigement des cultures, ce dernier facteur interfère avec la résistance des plantes d'orge à Typhula. En Belgique, l'infection de l'orge a lieu généralement en novembre (Detiffe et al., 1981), bien avant que la neige ne recouvre les cultures. En hiver, l'épaisseur de neige est rarement suffisante pour empêcher toute activité chlorophyllienne des plantes, l'atténuation de la lumière étant de 85% sous 10cm de neige fraîche (Geiger, 1961). La neige représente surtout une protection contre le froid du fait de sa très faible conductivité thermique : le gain en température est d'environ 1°C par centimètre de neige (Geiger, 1961), de sorte qu'il est rare que le sol atteigne, sous la couverture de neige, la température critique de -3°C à -4°C à laquelle il gèle. Les conditions favorables aux "moisissures de neige" (neige tombant en abondance sur un sol non gelé) sont rarement rencontrées en Belgique du fait de l'alternance des périodes de gel et de dégel, et de l'occurrence de gelée sans couverture nivale. Dans ce cas, la conductivité thermique du sol étant très élevée, ce dernier est rapidement gelé, ce qui a pour effet d'inhiber la croissance de T. incarnata qui ne tolère pas les pressions osmotiques élevées (Bruehl et al., 1966). En Belgique, T. incarnata se développe principalement sous un régime de photopériode courte (avec ou sans neige), lorsque la température de l'air est supérieure à 0°C.

L'efficacité photosynthétique des feuilles décroît rapidement avec l'âge (Wardlaw, 1968). Or, les plantes d'orge en plein tallage comportent un appareil foliacé beaucoup plus important que les jeunes plantes. La sénescence des feuilles de la base diminue leur résistance à Typhula et l'installation du

pathogène sur l'ensemble de la plante serait rendue plus aisée à partir de ces feuilles âgées (Bruehl et al., 1966; Matsumoto et Araki, 1982; Matsumoto et sato, 1982). Par contre, Detiffe et al. (1983b) considèrent T. incarnata comme un parasite de blessures dont le potentiel saprophytique compétitif est faible : la présence de feuilles sénescentes et de feuilles blessées ne faciliterait pas l'infection de l'orge par le pathogène (Detiffe et al., 1983a).

Ces deux points de vue, apparemment contradictoires, trouvent conciliation dans notre étude. D'une part, des infections de T. incarnata peuvent se développer sur de jeunes plantes d'orge avant que le coléoptile ne se décompose, et peuvent même être très sévères lorsque les plantes manquent d'endurcissement au froid (Cavelier, 1986b). D'autre part, après un prétraitement au froid, les jeunes plantes d'orge résistent mieux à l'infection que les plantes fort développées (fig. 5.4 et 5.5), alors que ces dernières sont considérées comme plus endurcies au froid (Levitt, 1972) en raison de leur teneur élevée en sucres solubles (fig. 5.3). Au champ, les plantules d'orge de début tallage ne sont pas plus sensibles à T. incarnata que celles de plein tallage, alors que ces dernières sont normalement plus endurcies au froid et sont soumises à une durée d'incubation plus brève que les premières.

En conclusion, si la pénétration de T. incarnata dans la plante d'orge ne nécessite pas la sénescence des feuilles, il n'en demeure pas moins que les plantes âgées sont plus susceptibles au pathogène que les plantes jeunes.

Cette proposition est confortée par les 3 observations suivantes :

- Il n'existe pas de corrélation entre l'état d'endurcissement des plantes d'orge au froid et leur degré de résistance à T. incarnata, bien que ces deux phénomènes soient induits par les mêmes stimuli. L'enrichissement de la teneur en sucres solubles en fonction de l'âge des plantes n'augmente donc pas la résistance à Typhula des plantes les plus développées.
- Etant donné qu'en présence de lumière, l'activité photosynthétique crée les conditions de résistance des plantes d'orge à Typhula, la capacité de stockage en glucides du plateau de tallage revêt à cet égard une importance secondaire : les plantes les plus développées ne sont donc pas avantagées par rapport aux plantes moins développées. En revanche, lorsqu'elle n'est pas entretenue par l'activité photosynthétique des feuilles (chambre d'incubation à l'obscurité ou infection sous une épaisse couche de neige), la résistance des plantes est conditionnée par la base nutritive localisée au niveau du plateau de tallage, plus abondante chez les plantes développées (Bruehl et Cunfer, 1971).
- Les plantes d'orge les plus développées (plein tallage) présentent plus de déchirures foliaires et donc plus de portes d'entrée pour T. incarnata

(Detiffe et al., 1983a), que les plantes peu développées (début tallage).

La différence de susceptibilité des plantes d'orge en fonction de leur degré de développement plaide en faveur d'un semis en octobre plutôt qu'en septembre. Le report du semis au début octobre présente l'avantage de permettre aux cultures d'échapper aux vols de pucerons, vecteurs de la jaunisse narisante. Les semis tardifs pallient aussi l'installation précoce des parasites du feuillage, cause possible d'une rapide dégradation de l'état sanitaire au printemps.

Cependant, le report du semis en vue de réduire l'impact des attaques de Typhula n'est pas préconisé en raison du risque que courrait la culture de ne pas développer un nombre suffisant de talles avant l'hiver. Cette contrainte est renforcée par le fait que les cultures à forte densité de végétation, issues de semis précoce, compensent souvent dans nos régions les pertes parfois élevées en talles/plante dues aux attaques de Typhula. Ceci est illustré par la figure 5.4 montrant la différence entre les pertes relatives et absolues, en talles, en fonction du stade de développement des plantes. Dans ces conditions, il est difficile de créer des variétés d'orge résistantes à Typhula.

Certes, on peut classer les variétés selon leur degré de résistance mesuré au printemps et pondéré en fonction des résultats de la récolte (Mielke, 1978 et 1980; Cavelier et Maroquin, 1980): à cet égard, il est d'ailleurs plus approprié de parler de tolérance à la maladie que de résistance au parasite. Face à ce problème, les améliorateurs de céréales sont assez démunis car la résistance au froid et la tolérance à Typhula ne relèvent pas des mêmes mécanismes, bien qu'elles soient responsables globalement du comportement hivernal de la céréale.

Les efforts d'analyse du déterminisme génétique très complexe de la résistance du froment d'hiver aux "moisissures de neige" n'ont pas encore abouti (Bruehl, 1983). La sélection massale est à l'origine de certaines sources de résistance obtenues aux Etats-Unis à partir de la "USDA World Cereal Collection" (Bruehl, 1982). Malheureusement, tous les froments d'hiver tolérants aux "moisissures de neige" présentent une paille trop fragile. Des essais de croisements sont en cours aux Etats-Unis pour associer, dans des variétés productives, la résistance à la verse avec la tolérance aux "moisissures de neige".

9.2. Dispersion de Typhula incarnata par les basidiospores.

Dans les conditions de nos observations au champ, les basidiospores de T. incarnata n'ont jamais été infectantes, ce qui ne signifie pas qu'elles n'aient pas survécu à leur dissémination. La formation de clavules fertiles à partir de sclérotés monocaryotiques en germination au champ s'explique par la dicaryotisation de stipes stériles réalisée par des basidiospores produites à proximité et transportées par le vent. Les basidiospores peuvent donc être incorporées à du matériel de T. incarnata préexistant dans les cultures et modifier à terme le potentiel d'infectieux des souches ainsi contaminées.

Dans le cas de la dicaryotisation d'un matériel monocaryotique (jamais trouvé naturellement au champ, sauf au Japon), l'agressivité du pathogène est modifiée très rapidement (chapitre 4) car le dicaryon en formation est toujours plus infectant que le monocaryon mais l'expression de cette agressivité sur la plante dépend des éventuelles primo-infections réalisées par les monocaryons d'origine.

La modification des souches dicaryotiques résultant de leur croisement avec des basidiospores n'est pas perceptible sur la plante. Dans ce cas en effet, le noyau migrant de la spore contaminante entre en compétition avec les noyaux résidents du dicaryon sans pour autant modifier le potentiel d'infection des paires de noyaux qui sont intervenus en premier lieu dans la colonisation de la plante (voir point 9.3.1). Ce processus n'interfère donc pas avec les résultats d'inoculation au champ, lesquels sont uniquement fonction du niveau d'agressivité des souches dicaryotiques inoculées.

En conditions naturelles, l'apport d'un contenu génétique étranger via les basidiospores constitue une sorte de "spermatisation" qui contribue aux croisements intraspécifiques, ce qui expliquerait la mosaïque très diversifiée de souches de T. incarnata rencontrée dans le monde entier (Cavelier et Auquier, 1980).

9.3. Agressivité de Typhula incarnata et interaction hôte-pathogène.

Les analyses génétiques réalisées chez plusieurs champignons du sol ont porté sur les types de croisement et de compatibilité entre souches qui, sans influencer directement sur le comportement pathogène ou saprophyte, influencent les mécanismes de variation qui semblent très importants chez ces champignons (Flentje, 1970). La compatibilité sexuée, la recombinaison somatique et la sélection nucléaire sont les seuls mécanismes de variation mis en évidence par

l'analyse des allèles d'incompatibilité chez T. incarnata. Aucune forme hétérocaryotique autre que le dicaryon, formé par l'association de deux noyaux compatibles A et B, n'a été mise en évidence (Cavelier, 1982b). Les recombinaisons somatiques issues de croisements illégitimes n'ont pas permis de mettre en évidence des allèles d'incompatibilité différents de ceux qui participaient aux croisements. D'autre part, aucune forme d'antagonisme entre souches dicaryotiques ou monocaryotiques ne s'est manifestée in vitro (chapitre 7). Contrairement à d'autres champignons (Parmeter, 1970), la compatibilité somatique chez T. incarnata n'est pas différente de la compatibilité sexuée.

La génétique du caractère d'agressivité chez T. incarnata est semblable à celle de T. idahoensis. L'agressivité est héritée de façon quantitative, vraisemblablement par plusieurs gènes récessifs (chapitre 6). L'étude de l'agressivité de T. incarnata a pu être réalisée à partir des souches monospermes, ce qui n'avait pas été possible pour T. idahoensis où aucun monocaryon n'est agressif (Kiyomoto et Bruehl, 1976).

Les souches dicaryotiques de T. incarnata cultivées in vitro sont sujettes à des pertes d'agressivité affectant soit directement le mycélium qui se développe sur milieu de culture artificiel, soit le mycélium issu de sclérotés formés sur grains d'orge stérilisés et conservés à sec au laboratoire (chapitre 6). Ce phénomène résulte peut-être de l'épuisement des réserves endogènes du champignon ou de la manifestation d'une adaptation résultant de la nature binucléée du dicaryon, où chacun des noyaux jouit d'un potentiel d'infection et d'un potentiel saprophytique différents, déterminant ensemble l'aptitude du thalle à coloniser un substrat donné, mais dont l'expression pourrait se modifier après un certain temps si le substrat venait à changer (cas de la transplantation de mycélium) ou à manquer (cas des sclérotés). On pourrait en effet supposer qu'une période de latence comme celle observée pour la croissance de Typhula par Dejardin et Ward (1971) en fonction de la température (chapitre 3), puisse exister également sur le plan de l'expression de l'agressivité lorsqu'une souche dicaryotique est transférée d'un substrat inerte à un milieu vivant, ou lorsqu'elle est privée de base nutritive durant une période de temps plus longue que celle correspondant à son cycle biologique (1 an).

En revanche, les souches monocaryotiques sont, par définition, uninucléées et n'ont donc pas la possibilité, comme les dicaryons, d'adapter leur comportement en fonction du potentiel respectif de deux noyaux haploïdes différents présents au sein d'une même cellule. En effet, les souches monocaryotiques ont gardé leur niveau d'agressivité nonobstant leur maintenance en culture sur milieu PDA pendant 8 ans.

C'est la première fois qu'on signale chez T.incarnata une perte d'agressivité du potentiel d'infection des sclérotas sans diminution corrélative de leur faculté germinative. En relation avec leur sensibilité respective vis-à-vis de la microflore du sol, les sclérotas dicaryotiques de T.incarnata produits sur avoine ont une très faible survie par rapport à ceux de T.ishikariensis sur luzerne (Matsumoto et Tajimi, 1985). A cet égard, il serait intéressant de comparer le taux de survie et le niveau d'agressivité de différents lots de sclérotas en fonction de leur base nutritive. Dejardin et Ward (1971) montrent en effet que les taux d'absorption de l'O₂ chez T.idahoensis varient en fonction de la source de carbone dans le milieu de culture.

Quoi qu'il en soit, la conservation d'un inoculum dicaryotique fait problème. C'est pourquoi les inocula de dicaryons devraient toujours provenir d'un croisement récent entre les monocaryons parentaux et être utilisés dans les plus brefs délais. Restaurer le pouvoir agressif des dicaryons ayant perdu toute agressivité, sans avoir recours au croisement initial, passe nécessairement par l'infection d'un hôte sensible capable d'induire à nouveau la formation de sclérotas potentiellement agressifs (point 6.5).

Indépendamment des conditions susceptibles de faire varier la prédisposition de l'orge à l'égard de T.incarnata (chapitre 5), l'interaction hôte-parasite est fonction essentiellement de trois facteurs:

- la règle du premier occupant;
- la présence ou l'absence du gène mutant fc_b;
- le degré de compatibilité entre souches.

9.3.1. La règle du premier occupant.

La règle du premier occupant a été explicitée dans un article récent (Cavelier, 1986b). Selon cette règle, la souche première occupante (en anglais, "pioneer colonist") a un effet décisif sur l'issue de l'infection. Si la souche pré-inoculée est non agressive, l'interaction hôte-pathogène est incompatible, quelle que soit l'agressivité potentielle de la souche inoculée en second : c'est le phénomène de protection induite par une souche non agressive. N'importe quel type de souche (sauvage ou mutante fc_b), pourvu qu'elle soit non agressive, est susceptible d'induire cette protection.

L'induction de phytoalexines, localisées aux sites d'infection de la plante, n'a pas été démontré.

Le gène mutant fc_b et la compatibilité entre souches de T.incarnata sont des facteurs de modulation de la règle du premier occupant.

9.3.2. Présence du gène mutant fc_b.

Le manque total d'agressivité des monocaryons fc_b ne semble pas causé par la mutation d'un gène d'agressivité car, en raison du lien étroit existant entre le caractère fc_b et le facteur B (Cavelier, 1985), cela signifierait que l'agressivité serait transmise en tout ou en partie avec les facteurs d'incompatibilité. Or, il apparaît que ce n'est pas le cas pour les souches sauvages. En conséquence, bien qu'il n'appartient pas au génome déterminant l'agressivité du parasite, le gène muté fc_b semble modifier l'expression de cette agressivité (épistasie). Ce caractère fc_b pourrait résulter d'une mutation du locus B lui-même, sans affecter les séquences morphogénétiques induites par ce facteur d'incompatibilité, en cas de dicaryotisation (point 6.9).

Les monocaryons fc_b présentent l'avantage de pouvoir provoquer des recombinaisons somatiques dans les croisements illégitimes. Celles-ci ne concernent pas seulement les chromosomes porteurs des allèles d'incompatibilité, mais peuvent entraîner également la ségrégation d'autres chromosomes homologues portant des gènes d'auxotrophie par exemple (chapitre 8).

La germination des sclérotés produits par des dicaryons recombinants somatiques, conduit à la formation de carpophores normalement constitués ; apparemment, le cycle sexuel s'y accomplit sans modifier les caractères étudiés (fc_b, auxotrophie et agressivité).

Alors que le gène fc_b lié à l'allèle d'incompatibilité B2 est sans effet sur l'agressivité du pathogène à l'état dicaryotique (Cavelier, 1986b), il permet en revanche, lorsqu'il est associé à B17, de réduire l'infection au champ. En effet, la stabilité du caractère fc_b dans la descendance B17 de T. incarnata et la grande compétitivité des dicaryons qui en sont porteurs, vis-à-vis des souches très agressives du pathogène (chapitres 6 et 7), en font un matériel de choix dans des essais de lutte biologique.

9.3.3. La compatibilité entre souches de Typhula incarnata.

Lorsque deux souches de T. incarnata entrent en compétition directe sur une plante d'orge, celle-ci ne développe pas de symptômes de maladie, pour autant que l'une des souches soit à la fois non agressive et incompatible avec la souche agressive co-inoculée. Cela a été clairement établi en inoculant un monocaryon fc_b avec un dicaryon agressif réuni dans une relation d'incompatibilité : celle-ci favoriserait l'interaction entre la souche non agressive et la plante-hôte sur laquelle la souche agressive n'aurait plus prise.

Par contre, en cas de compatibilité entre le dicaryon agressif et le monocaryon non agressif, ce dernier n'aurait pas d'influence sur l'hôte suite à sa dicaryotisation rapide au niveau des sites d'infection de la plante, laissant libre cours à l'infection par la souche aggressive.

Ce type de réaction diffère du phénomène observé chez les souches de Rhizoctonia solani, où l'agressivité des produits varie a posteriori selon le type de croisement (hétérocaryon x hétérocaryon ou homocaryon x homocaryon) (Bolkan et Butler, 1974).

Il s'agit dans le cas de Typhula d'une protection de l'hôte qui est rendue possible par la nature incompatible de la relation entre souches et qui est annulée en cas de compatibilité entre souches. Dans ce dernier cas, l'absence de protection induite ne résulte pas de la création de nouvelles souches, car la confrontation du monocaryon non agressif avec son produit dicaryotique (plutôt qu'avec tout autre dicaryon compatible), provoque également des infections sévères (tableau 7.2). Par ailleurs, nous avons constaté que dans toutes les situations, le potentiel d'infection des produits de croisement entre souches ne modifiait pas leur effet pathogène.

L'absence de protection de l'hôte ne relève donc pas d'une interaction entre les potentiels d'agressivité des deux souches compatibles en présence, mais plutôt d'une interférence du système de reconnaissance entre souches sur l'interaction hôte-pathogène, au site d'infection de la plante.

L'intervention de substances-messager, d'éliciteurs de phytoalexines, ou d'enzymes de type glucanase (dont l'activité augmente dans les hyphes participant aux croisements entre souches compatibles, Wessels, 1978), pourrait jouer un rôle dans le processus de reconnaissance entre l'hôte et la souche non aggressive.

BIBLIOGRAPHIE.

- ABE, J. & MATSUMOTO, N., 1981. Resistance to snow mould disease caused by Typhula sp. in cocksfoot. Journal of the Japanese Society of Grassland Science, 27 : 152-158.
- AHMAD, S.S. & MILES, P.G., 1970. Hyphal fusions in the Wood-rotting fungus Schizophyllum commune. 1. The effects of incompatibility factors. Genet. Res. Camb., 15 : 19-28.
- AKERBERG, E., 1957. Arsberättelse över Sveriges Utsädesforenings verksamhet år 1956. Sverig. Utsädesfören. Tidskr., 67 : 69-177.
- ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A., 1985. Les oligosaccharines. Pour la Science. 18-26.
- ANONYME, 1964. Jaarboek 1964. Versl. Meded. Plziektenk. Dienst Wageningen 142 : 161 pp.
- ARSVOLL, K., 1973. Winter damage in Norwegian grasslands, 1968-1971. Meld. Norg. LandbrHogsk., 52 (3), 21 pp.
- ARSVOLL, K., 1976. Mutual antagonism between isolates of Typhula ishkariensis and Typhula incarnata. Meld. Norg. LandbrHogsk., 55 (19), 6 pp.
- ARSVOLL, K., 1977. Effects of hardening, plant age, and development in Phleum pratense and Festuca pratensis on resistance to snow mould fungi. Meld. Norg. LandbrHogsk., 56 (28), 14 pp.
- ARSVOLL, K. & LARSEN, A., 1977. Effects of nitrogen, phosphorus, and potassium on resistance to snow mould fungi and freezing tolerance in Phleum pratense. Meld. Norg. LandbrHogsk., 56 (29), 14 pp.
- ARSVOLL, K. & SMITH, J.D., 1978. Typhula ishkariensis and its varieties, var. idahoensis comb. nov. and var. canadensis var. nov. Can. J. Bot., 56 : 348-364.
- AYERS, A.R, EBEL, J., VALENT, B. & ALBERSHEIM, P., 1976. Host pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of Phytophthora megasperma var. sojae. Plant Physiol., 57 : 760-765.
- BAQUET, A., 1987. Communication personnelle.
- BARTOS, P., FLEISCHMANN, G., SAMBORSKI, D.J. & SHIPTON, W.A., 1969. Studies on asexual variation in the virulence of oat rust, Puccinia coronata f. sp. avenae and wheat leaf rust, Puccinia recondita. Can. J. Bot. 47 : 1383-87.
- BERTHIER, Y., 1976. Monographie des Typhula FR., Pistillaria FR. et genres voisins. Spéc. Bull. Soc. Linnéenne de Lyon, n°45, 213 p.

- BERTHIER, Y., 1979. Communication personnelle.
- BOISSON, C. & LAHLOU, H., 1982. Etude du polymorphisme intracloonal chez le Verticillium albo-atrum, forme à microsclérotos. II. Influence de l'âge des thalles sur leur descendance par microconidies. Can. J. Bot., 60 : 19-25.
- BOLKAN, H.A. & BUTLER, E.E., 1974. Studies on heterokaryosis and virulence of Rhizoctonia solani. Phytopathology, 64 : 513-522.
- BRUEHL, G.W., SPRAGUE, R., FISCHER, W.R., NAGAMITSU, M., NELSON, W.L. & VOGEL, O.A., 1966. Snow molds of winter wheat in Washington. Bull. Wash. agric. Exp. Stn, 677 : 21p.
- BRUEHL, G.W., 1967a. Lack of significant pathogenic specialisation within Fusarium nivale, Typhula idahoensis and Typhula incarnata and correlation of resistance in winter wheat to these fungi. Plant Dis. Rep., 51 : 810-814.
- BRUEHL, G.W., 1967b. Correlation of resistance to Typhula idahoensis, Typhula incarnata and Fusarium nivale in certain varieties of winter wheat. Phytopathology, 57 (3) : 308-310.
- BRUEHL, G.W., 1967c. Effect of plant size on resistance to snowmold of winter wheat. Plant Dis. Rep., 51 : 815-819.
- BRUEHL, G.W. & CUNFER, B.M., 1971. Physiologic and environmental factors that affect the severity of snow mould of wheat. Phytopathology, 61 : 792-799.
- BRUEHL, G.W., MACHTMES, R. & KIYOMOTO, R., 1975. Taxonomic relationships among Typhula species as revealed by mating experiments. Phytopathology, 65 : 1108-1114.
- BRUEHL, G.W., KIYOMOTO, R., PETERSON, C. & NAGAMITSU, M., 1976. Testing winter wheats for snow mold resistance in Washington. Plant Dis. Rep., 59 (7) : 566-570.
- BRUEHL, G.W., MACHTMES, R., KIYOMOTO, R. & CHRISTEN, A., 1978. Incompatibility alleles and fertility of Typhula idahoensis. Phytopathology, 68 : 1307-1310.
- BRUEHL, G.W. & MACHTMES, R., 1978. Incompatibility alleles of Typhula incarnata. Phytopathology, 68 : 1311-1313.
- BRUEHL, G.W. & MACHTMES, R., 1979. Alleles of the incompatibility factors of Typhula ishikariensis. Canadian Journal of Botany, 57 (11) : 1252-1254.
- BRUEHL, G.W. & MACHTMES, R., 1980. Cultural variation within Typhula idahoensis and T. ishikariensis and the species concept. Phytopathology, 70 : 867-817.
- BRUEHL, G.W., 1982. Developing wheats resistant to snow mold in Washington State. Plant Dis. Rep., 66 (11) : 1090-1095.

- BRUEHL, G.W., 1983. Nonspecific genetic resistance to soilborne fungi. *Phytopathology*, 73 : 948-951.
- CAVELIER, M., 1973. Recherche sur le spectre d'hôtes et sur la survie de Cercospora herpotrichoïdes Fron, agent du piétin verse du froment. Mémoire de fin d'études. Laboratoire de phytopathologie et de mycologie générale, U.C.L., 80 pp.
- CAVELIER, M. & MAROQUIN, C., 1978. Interférence d'une épidémie provoquée pour la première fois en Belgique par Typhula incarnata Lasch ex Fr., et recrudescence de la jaunisse nanisante de l'orge sur escourgeon. Caractérisation des symptômes et évaluation de leurs incidences respectives sur les rendements. *Parasitica*, 34 : 277-295.
- CAVELIER, M. & MAROQUIN, C., 1979. Problèmes actuels relatifs à la protection des grandes cultures. 2. Un nouveau complexe parasitaire dans les cultures d'escourgeon. *Revue de l'Agriculture*, 32 : 423-429.
- CAVELIER, M. & AUQUIER, E., 1980. Caractérisation de quelques souches de Typhula incarnata Lasch ex Fr. *Parasitica*, 36 : 25-38.
- CAVELIER, M., 1980. Rôle du froment d'hiver dans la survie de Typhula incarnata Lasch dans un système de rotation triennale. *Parasitica*, 36 : 78-89.
- CAVELIER, M. & MAROQUIN, C., 1980. Sensibilité variétale de l'escourgeon à Typhula incarnata Lasch et au virus de la jaunisse nanisante de l'orge. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 15 : 309-326.
- CAVELIER, M., 1982a. Description et propriétés d'une forme culturale particulière de Typhula incarnata Lasch ex Fr.. *Parasitica*, 38 : 109-117.
- CAVELIER, M., 1982b. Utilisation de croisements entre dicaryons et monocaryons pour l'étude de l'agressivité de Typhula incarnata Lasch ex Fr. sur l'orge d'hiver. *Parasitica*, 38 : 119-138.
- CAVELIER, M. & MAROQUIN, C., 1984. Les viroses des céréales mettent-elles la culture de l'orge d'hiver en question? *Annales de Gembloux*, 90 : 109-120.
- CAVELIER, M., 1985. Spontaneous mutation of a gene linked to an incompatibility factor in Typhula incarnata Lasch ex Fr. *Parasitica*, 41 : 39-41.
- CAVELIER, M., 1986a. Contribution des basidiospores au potentiel d'inoculum de Typhula incarnata Lasch ex Fries. *Med. Fac. Landbouww. Rijkuniv. Gent*, 51/2b, 547-555.
- CAVELIER, M., 1986b. Competition between Typhula incarnata strains as source of variation of Typhula blight in winter barley. *Journal of Phytopathology*, 116 : 147-161.
- COATES, D., RAYNER, A.D.M. & TODD, N.K., 1981. Mating behaviour, mycelial antagonism and the establishment of individuals in Stereum hirsutum. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 76 : 41-51.

- COOK, R.J., 1977. Management of the associated microbiota. In : Plant Disease an Advanced Treatise. Vol. I : How disease is managed.
 Edited by HORSFALL J.G. and COWLING E.G. Academic Press.
- CORNER, E.J.H., 1950. Clavaria and Allied genera. Annals of Botany.
 Mémoires n°1 : 655-677.
- CUNFER, B.M. & BRUEHL, G.M., 1973. Role of basidiospores as propagules and observations on sporophores of Typhula idahoensis. Phytopathology, 63 : 115-120.
- DAVIDSON, R. & BRUEHL, G.M., 1972. Factors affecting the effectiveness of sclerotia of Typhula idahoensis as inoculum. Phytopathology, 62 : 1040-1045.
- DAY, P.R., 1974. Genetics of host-parasite interaction. W.H. FREEMAN AND COMPANY, San Francisco, 238 p.
- DEACON, J.W., 1976. Biological control of the take-all fungus Gaeumannomyces graminis, by Phialophora radicicola and similar fungi.
 Soil Biol. Biochim., 8 : 275-283.
- DEJARDIN, R.A. & WARD, E.W.B., 1971. Growth and respiration of psychrophilic species of the genus Typhula. Can. J. Bot., 49 : 339-347.
- DE MERLEIRE, H. & VERBEKE, D., 1976. La pourriture des neiges. Maladie assez peu connue des céréales. Phytoma, 283 : 18-19.
- DETIFFE, H., MARAITE, H. & MEYER, J.A., 1981. Evolution de Typhula incarnata Lasch ex Fries sur escourgeon en Belgique. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 46 : 841-849.
- DETIFFE, H., MARAITE, H. & MEYER, J.A., 1983a. Potentiel saprophytique compétitif de Typhula incarnata Lasch ex Fries. Parasitica, 39 : 129-144.
- DETIFFE, H., MARAITE, H. & MEYER, J.A., 1983b. Infection et colonisation de l'escourgeon par Typhula incarnata Lasch ex Fries. Parasitica, 39 : 161-177.
- DETIFFE, H., MARAITE, H. & MEYER, J.A., 1985. Facteurs affectant la formation et l'orientation des cordons mycéliens lors de la germination des sclérotés de Typhula incarnata Lasch ex Fries. Parasitica, 41 : 3-12.
- DETIFFE, H. & MARAITE, H., 1985. Influence des conditions météorologiques sur la germination des sclérotés de Typhula incarnata Lasch ex Fries au champ. Parasitica, 41 : 79-90.
- EBENEBE, C. & FEHRMANN, H., 1974. Evaluation of a number of systemic fungicides for the control of Typhula incarnata in winter barley. Z. PflKrankh. PflSchutz, 81 : 711-716.
- EBENEBE, C. & FEHRMANN, H., 1976. Effect of benlate and other systemic fungicides on the mycelial growth and sclerotia production of Typhula incarnata Lasch ex Fries. Phytopathologische Zeitschrift, 85 : 163-169.

- EKSTRAND, H., 1955. Overwintering of winter cereals and forage grasses. Statens Växtskyddsanstalt, Medd., 67 : 1-125.
- FLENTJE, N.T., 1970. Genetical aspects of pathogenic and saprophytic behaviour of soil-borne fungi : basidiomycetes with special reference to Thanatephorus cucumeris. In : Root diseases and soil borne pathogens. Edid. by T.A. TOUSSOUN, R.V. BEGA & P.E. NELSON, University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London : 45-49.
- FLOR, H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Ann. Rev. Phytopathol., 9 : 275-296.
- FRIES, E.M., 1818. Obs. Myc. I-X + 1-372.
- FRITSH, H. & JUNG, J., 1984. Enzyme activities and leaf constituents in barley seedlings at different levels. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 114 : 433-442.
- GEIGER, R., 1961. Das Klima der bodennahen Luftschicht. Die Wissenschaft, FRIEDR. VIEWEG & SOHN, BRAUNSCHWEIG , Band 78 : 646 pp.
- GLEMAS, P., PINEAU, R. & VERBEKE, D., 1977. Manifestations de Typhula sp. sur escourgeon en Lorraine. Bull. Techn. Inform. Min. Agr. Paris, 231 : 349-355.
- GRAY, E.G., 1963. New or uncommon plant diseases and pests. Snow moulds in North Scotland. Plant Path., 12 : 184.
- GURUSIDDIAIAH, S., WELLER, D.M., SARKAR, A. & COOK, R.J., 1986. Characterization of an antibiotic produced by a strain of Pseudomonas fluorescens inhibitory to Gaeumannomyces graminis var. tritici and Pythium sp.. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 29 : 488-495.
- HARDER, P.R. & TROLL, J., 1973. Antagonism of Trichoderma spp. to sclerotia of Typhula incarnata. Plant Dis. Rep., 57 : 924-926.
- HARTLEY, M.J. & WILLIAMS, P.G., 1971. Genotypic variation within a phenotype as a possible basis for somatic hybridization in rust fungi. Can. J. Bot., 49 : 1085-87.
- HAVAUX, M. & LANNOYE, R., 1982. Changements biochimiques observés pendant l'adaptation au froid de l'orge. Agronomie, 2 (10) : 923-930.
- HINDORF, H. & KIEWNICK, L., 1978. Zur Verbreitung der Typhula-Fäule in wintergerstenbeständen nordwestlich von Köln. Gesunde Pfl., 30 : 128-132.
- HINDORF, H., 1980a. Zum Auftreten der Sporophoren von Typhula incarnata im rheinischen Wintergersten-Anbau. Pflanzenkrankh., 87 : 501-508.
- HINDORF, H., 1980b. Bedeutung der Sporophoren von Typhula incarnata Lasch ex Fries für die Ausbreitung der Wintergersten-Fäule. Med. Fac. Landbou. Rijsuniv. Gent, 45/2 : 121-127.
- HOLLIDAY, R., 1956. Nature, 178 : 987.
- HOLTON, C.S., 1953. Observations and experiments on snow mold of winter wheat in Washington States. Plant Dis. Rep., ?

- HUNGERFORD, C.W.A., 1923. A serious disease of wheat caused by Sclerotium rhizodes in Idaho. *Phytopathology*, 13 : 463.
- IMAI, S., 1929. On the clavariaceae of Japan. *Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc.*, 11 : 38-44.
- JACKSON, N., 1962. Turf disease notes 1962. *J. Sports Turf Res. Inst.*, 10 : 410-415.
- JACOBS, D.L. & BRUEHL, G.W., 1986. Occurrence of Typhula species and observations on numbers of sclerotia in soil in winter wheat fields in Washington and Idaho. *Phytopathology*, 76 : 278-282.
- JAMALAINEN, E.A., 1951. The occurrence of overwintering fungi on pasture grasses in Finland. *Nord. Jordbr. Forskn.*, 1-2 : 529-534.
- KAMPF, R., 1984. Continuous large-scale cultivation of winter barley over a six-year period in relation to factorial cultivar trials. *Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch*, 61 : 807-815.
- KIEWNICK, L., 1968. Die Typhula-Fäule der Wintergerste. *Gesunde Pfl.* 20 (5) : 107-110, 112.
- KIYOMOTO, R.K. & BRUEHL, G.W., 1976. Sexual incompatibility and virulence in Typhula idahoensis. *Phytopathology*, 66 : 1001-1006.
- KIYOMOTO, R.K. & BRUEHL, G.W., 1977. Carbohydrate accumulation and depletion by winter cereals differing in resistance to Typhula idahoensis. *Phytopathology*, 67 : 206-211.
- KOLTIN, Y., 1978. Genetic structure of incompatibility factors. The ABC of sex. In : *Genetics and morphogenesis in the basidiomycetes* (Marvin N. Schwalb et Philip G. Miles, ed.) New York-London, Academic Press, 31-54.
- KUHN, J. & PARAG, Y., 1972. Protein subunit aggregation model for self-incompatibility in higher fungi. *J. Theor. Biol.* 35 : 77-91.
- KÜHNER, R., 1977. Variation of nuclear behaviour in the homobasidiomycetes. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 68 : 1-16.
- LANCRENON, P., 1976. Des escurgeons semés tôt devront-ils être retournés ? *La France Agricole*, 32ème année, n° 1610.
- LANGERON, M., 1942. *Précis de microscopie*. Masson et Cie Editeurs, 530p.
- LAWRENCE, T., COOPER, J.P. & BREESE, E.L., 1973. Cold tolerance and winter hardiness in Lolium perenne. 2. Influence of light and temperature during growth and hardening. *J. Agric. Sc. Camb.*, 80 : 341-348.
- LEHMANN, H., 1965a. Untersuchungen über die Typhula-Fäule des Getreides. I. Zur Physiologie von Typhula incarnata Lasch ex Fr. *Phytopathology*, 53 : 255-288.
- LEHMANN, H., 1965b. Untersuchungen über die Typhula-Fäule des Getreides. II. Zur Pathologie durch Typhula incarnata Lasch ex Fr. erkrankter Wirtspflanzen. *Phytopathology*, 54 : 209-239.

- LEMAIRE, J.M., DOUSSINAULT, G., TIVOLI, B., JOUAN, B., PERRATON, B., DOSBA, F., CARPENTIER, F. & SOSSEAU, C., 1977. La lutte biologique contre le piétin échaudage des céréales. Le monoculture du blé est-elle possible ? Institut Technique des Céréales et des Fourrages, 21-32.
- LEVITT, J., 1972. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York and London. 697pp.
- LIN, C.S. & POUISHINSKY, G., 1983. A modified augmented design for an early stage of plant selection involving a large number of test lines without replication. *Biometrics*, 39 : 553-561.
- LORENZENTTI, F., TYLER, B.F., COOPER, J.P. & BREESE, E.L., 1971. Cold tolerance and winterhardiness in Lolium perenne. 1. Development of screening techniques for cold tolerance and survey of geographical variation. *I. Agric. Sc. Camb.*, 76 : 199-209.
- MÄKELÄ, K., 1981. Winter damage and low-temperature fungi in leys in North Finland. *Ann. Agric. Fenn.*, 20 : 102-131.
- MARAITE, H., KINT, M., MONFORT, J. & MEYER, J.A., 1981. Germination des sclérotés, vitesse de croissance et optimum thermique d'isolats belges et étrangers de Typhula incarnata. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 46 : 831-840.
- MARLIER, M., 1987. Communication personnelle.
- MARSCHALL, M.G. & SCHEIN, R., 1960. Occurrence of snow mold, Typhula itoana Imai, on winter oats in Pennsylvania. *Plant Dis. Rep.*, 44, n° 12.
- MATSUMOTO, N. & ARAKI, T., 1982. Field observation of snow mold pathogens of grasses under snow cover in Sapporo. *Res. Bull. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn.*, 135 : 1-10.
- MATSUMOTO, N., SATO, T. & ARAKI, T., 1982. Biotype differentiation in the Typhula ishikariensis complex and their allopatry in Hokkaido. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 48 : 275-280.
- MATSUMOTO, N. & SATO, T., 1982. The competitive saprophytic abilities in Typhula incarnata and T. ishikariensis. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 48 : 419-424.
- MATSUMOTO, N., 1983. Communication personnelle.
- MATSUMOTO, N. & SATO, T., 1983a. Factors involved in the resistance of timothy and perennial ryegrass to Sclerotinia borealis and Typhula ishikariensis. *Res. Bull. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn.*, 136 : 23-30.
- MATSUMOTO, N. & SATO, T., 1983b. Niche separation in the pathogenic species of Typhula. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 49 : 293-298.
- MATSUMOTO, N. & TAJIMI, A., 1985. Field survival of sclerotia of Typhula incarnata and of T. ishikariensis biotype A. *Can. J. Bot.*, 63 : 1126-1128.

- MIELKE, H., 1977. Investigations of the years 1975 and 1976 on the susceptibility of winter barley varieties to Typhula incarnata Lasch ex Fr. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 29 : 42-45.
- MIELKE, H., 1978. Untersuchungen zur Schadwirkung im Typhula incarnata Lasch ex Fr. der wintergerstensorten. Z. Acker und Pflanzenbau, 147 : 161-170.
- MIELKE, H., 1980. Untersuchungen über die Anfälligkeit verschiedener Wildgerstenarten gegenüber Typhula incarnata. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 32 : 39.
- MIELKE, H., 1981. Untersuchungen zur Wirksamkeit von Agrochemikalien gegenüber Typhula incarnata Lasch ex Fr. Gesunde Pflanzen., 33 : 257-267.
- MIELKE, H. & HOPP, H., 1982. Investigations into the influence of peracetic acid on foot rot disease of cereals. Journal of Plant Disease and Protection, 89 : 282-290.
- MIELKE, H., 1984. Typhula-Fäule. Information zum integrierten Pflanzenschutz. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 36 : 109-110.
- NEWSTED, W.J., HUNER, N.P.A., INSELL, J.P., GRIFFITH, M. & HUUSTEE, R.B., 1985. The effects of temperature on the growth and polypeptide composition of several snow mold species. Can. J. Bot., 63 : 2311-2318.
- OHTSUKI, S. & FUJINAMI, A., 1982. Rizolex (tolelofos - methyl). Technical news. Japan pesticide information n°41 : 21-25.
- PAPAZIAN, H.P., 1950. Physiology of the incompatibility factors in Schizophyllum commune. Bot. Gaz., 112 : 143-163.
- PARAG, Y., 1968. Phase-microscopic observations of fusions in somatic cells of a heterokaryon of Schizophyllum commune. Amer. J. Bot. 55 : 984-988.
- PARMENTIER, G. & CAVELIER, M., 1976. Lutte intégrée contre les maladies des céréales. Rapport d'activité, Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat Gembloux : 37.
- PARMENTIER, G., MAROQUIN, C. & CAVELIER, M., 1979. La maladie des jaunissements dispersés chez l'escourgeon. In : Fumure et Protection phytosanitaire des céréales (Gembloux, le 1er mars 1979) C.R.A. et Fac. Sc. Agron. Gembloux : 23-25.
- PARMETER, J.R., 1970. Mechanisms of variation in culture and soil. In : Root diseases and soil borne pathogens. Edid. by T.A. TOUSSOUN, R.V. BEGA & P.E. NELSON, University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London : 63-68.
- PERRY, D.A. & AL-HASHIMI, M., 1984. Epidemiology and etiology of fungal root diseases of cereals. In Report of the Scottish Crop Research Institute, 1983. Invergowrie Dundee, UK, 94-95.

- PERRY, D.A. & AL-HASHIMI, M., 1985. Snow rot on winter barley. In Annual Report, Scottish Crop Research Institute, 1984. Invergowrie, Dundee, UK, 98-100.
- PONCHET, J., 1966. Etude des communautés mycopéricarpiques du caryopse de blé. Annales des épiphyties, 17, numéro hors série.
- PONTECORVO, G. & KÄFER, E., 1958. Genetic analysis by means of mitotic recombination. *Advanc.Genet.*, 9 : 71-104.
- PUNJA, Z.K. & GROGAN, R.G., 1983. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single - basidiospores strains of Athelia (Sclerotium) rolfsii. *Phytopathology*, 73, 9 : 1279-1284.
- RAPER, J.R., 1966. Genetics of sexuality in higher fungi. The Ronald Press Company, New York : 283pp.
- RAPER, C.A., 1978. Genetics and morphogenesis in the basidiomycetes. Marvin N. Schwalb and Philip G. Miles, Academic Press, New York : 3-29.
- RAWITSCHER, E., 1933. Besprechungen. *Z. Bot.*, 26 : 134-136.
- RAYNER, A.D.M. & TODD, N.K., 1979. Population and community structure and dynamics of fungi in decaying wood. *Advances in Botanical Research*, 7 : 333-420.
- REMSBERG, R.E., 1940. Studies in the genus Typhula. *Mycologia*, 32 : 52-96.
- ROBERTS, D.W.A. & GRANT, M.N., 1968. Changes in cold hardiness accompanying development in winter wheat. *Can. J. Plant - Sci*, 48 : 369-376.
- ROMANOS, M.A., RAWLINSON, C.J., ALMOND, M.R. & BUCK, K.W., 1980. Production of fungal growth inhibitors by isolates of Gaeumannomyces graminis var. tritici. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 74 : 79-88.
- RUSSEL, P.A., 1956. A selective medium for isolation of basidiomycetes. *Nature*, 177 : 1038-1039.
- SCHMIDT, D., 1976. Observations sur la pourriture des neiges affectant les graminées. *Revue Suisse d'Agriculture*, 8 : 8-14.
- SHIMANUKI, T., SATO, R., MATSUMOTO, N. & SATO, T., 1981. Chemical control of Bentgrass snow blights caused by Typhula spp. *Ann. Rept. Plant Prot. North Japan*, 32 : 132-133.
- SKAJENNIKOFF, M. & RAPILLY, F., 1983. Etudes sur l'agressivité de Septoria nodorum Berk.: effets des hôtes (triticale et blé) et des organes attaqués. *Agronomie*, 3 : 131-140.
- SKOU, J., 1984. Pathogenic variation. Proceedings of the first international workshop on take-all of cereals. Victorian Crops Research Institute, Horsham, Victoria, Australia (10-11 august 1983). Edited by J.F. Kollmorgen : 308.
- SMITH, J.D., 1975a. Snow molds on winter cereals in northern Saskatchewan in 1974. *Canadian Plant Disease Survey*, 55 : 91-96.

- SMITH, J.D., 1975b. Resistance of turfgrasses to low - temperature - basidiomycete snow mold and recovery from damage. *Can. Plant. Dis. Surv.*, 55 : 147-154.
- SMITH, J.D. & REITER, W.W., 1976. Snow mold control in bentgrass turf with fungicides. *Can. Plant. Dis. Surv.*, 56 : 104-108.
- SMITH, J.D. & ARSVOLL, K., 1975. Competition between basidiomycetes attacking turf grasses. *The Journal of the Sports Turf Research Institute*, 51 : 46-51.
- SMITH, J.D., 1976. Snow molds on winter cereals in northern Saskatchewan in 1974. *Can. Plant Dis. Surv.*, 55 : 91-96.
- SMITH, J.D. & DAVIDSON, J.G.N., 1979. Acremonium boreale n.sp., a sclerotial low - temperature - tolerant, snow mold antagonist. *Can. Journal of Botany*, 57 : 2122-2139.
- SPRAGUE, R., 1952. Contributions to the life history and control of snow molds of winter wheat in Washington (Abstr.). *Phytopathology*, 42 : 475.
- SUZUKI, H., 1980. Defenses triggered by previous invaders. In *Plant Disease, an Advanced Treatise*, vol. V. : How Plants defend themselves. Edited by HORSFALL J.G. and COWLING E.G., Academic Press.
- TASUGI, H., 1929. On the snow-rot fungus, Typhula graminum Karst. of graminaceous plants. *Journ. Imper. Agr. Exp. Stat. Nishigahara, Tokyo*, I : 41.
- TOMIYAMA, K., 1955. Studies on the snow blight disease of winter cereals. *Rep. Hokkaido Agric. Exp. Sta.*, 47 : 234 pp.
- TRAQUAIR, J.A. & SMITH, J.D., 1982. Sclerotial strains of Coprinus psychromorbidus, a snow mold basidiomycete. *Can. J. Plant Pathology*, 4 : 27-36.
- TRONSMO, A.M., 1983. Induced resistance to biotic stress factors in grasses by frost hardening. *Plant Production in the North Proceedings from "Plant Adaptation Workshop"*, Tromso Norway, 1983. Ed. Kaurin, A., O. Junttila & J. Nilsen.
- TRUNOVA, T.I., 1963. Significance of various forms of sugar in raising the winter hardiness of coleoptiles. *Physiologie des plantes (Moscou)*, 10 : 588-594.
- ULLRICH, R.C., 1973. Genetic determination of sexual diversity in the Sistotrema brinkmannii aggregate. Ph. D. Thesis, Harvard University, 141 p.
- VANDERPLANK, J.E., 1968. *Résistance des plantes aux maladies*. Academic Press, New-York and London, 223 pp.
- VARGAS, J.M. & BEARD, J.B., 1970. Chloroneb, a new fungicide for the control of Typhula blight. *Pl. Dis. Rep.*, 54 : 1075-1077.

- VARGAS, J.M. & KELLY jr and K.J., 1981. Typhula blight (Gray snow mold).
Extension Bulletin E-1538, File 27.3, Sept. 1981. Cooperative Extension
Service, Michigan State University, E. Lansing, MI 48824.
- VOLK, V.A., 1937. Untersuchungen über Typhula graminum Karst. Zeitschrift für
Pflanzenkrankheiten, 47 : 338-365.
- WARDLAW, I.F., 1968. The control and pattern of movement of carbohydrates in
plants. Bot. Rev., 34 : 79-105.
- WATHELET, J.P., 1987. Communication personnelle.
- WELLER, D.M., 1983. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad
suppressive to take-all. Phytopathology, 73 : 1548-1553.
- WESSELS, J.G.H., 1978. Incompatibility factors and the control of biochemical
processus. In : Genetics and morphogenesis in the basidiomycetes
(Marwin N., Schwalb et Philip G. Miles, ed.). New York-London, Academic
Press, 81-104.
- WONG, P.T.W., 1984. Interactions between microbial residents of cereals roots
In : Ecology and management of soilborne plant pathogens. Edited by
C.A. PARKER, A.D. ROVIRA, K.J. MOORE, P.T.W. WONG & J.F. KOLLMORGEN :
144-147.
- YOUNG, P.A., 1929. Sclerotium blight (Typhula graminum). USDA Bur. PL. Indus.
PL. DIS. Repr., 13 : 70.
- ZWATZ, B., 1969. Typhula-Fäule an Wintergetreide. Pflanzenarzt., 22 : 34-36.
333-420.

LISTE DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES UTILISEES DANS LES ESSAIS

Souches monospermes	Isolat dicaryotique parental ¹	Souches monospermes	Croisement d'origine ²
4CH4 (A5B17) ³	CH4 (1974)	16-3C10 (A4B2) ³	56Gn + [74Gn + (59G x 9P)] dénommé 3C10
48G (A2B1) 56Gn (A1B2) 56Gb (A1B2) ³ 59G (A1B1) 69G (A2B2) 74Gn (A2B2) 78G (A1B1)	G (1976)	1-3E41 (A2B4) ⁴ 11-3E41 (A2B1) ⁴ 4Na1 (A5B1)	13P + [69G + (78G x 9P)] dénommé 3E41 4CH4 + 59G dénommé Na1
15M (A2B6)	M (1978)	1Na2 (A5B2) 3Na2 (A2B17) ³ 12Na2 (A2B17) ³ 14Na2 (A5B2) 129Na2 (A5B17) ³	4CH4 + 74Gn dénommé Na2
8P (A2B4) 9P (A4B4) 13P (A2B4)	P (1978)	1-J104 (A5B2) 5-J104 (A2B2) 11-J104 (A5B17) ³ 14-J104 (A2B17) ³	12Na2 x 14Na2 dénommé J104
12R (A8B9)	R (1978)		
4S (A4B5) 5S (A5B5) 6S (A5B3)	S (1978)	6Dr3 (A2B17) ³⁴ 13Dr3 (A2B1) ⁴ 16Dr3 (A5B1) ⁴ 36Dr3 (A2B1) ⁴ 44Dr3 (A2B17) ³⁴ 56Dr3 (A5B1) ⁴	3Na2 + (4CH4 x 11-3E41) dénommé Dr3

1. voir Cavelier et Auquier (1980).
2. voir tableau 2.1b (page 30).
3. souche fcb (Cavelier, 1982a et 1985).
4. souche auxotrophe (page 31).

DEFINITION DE CERTAINS TERMES

Dans la littérature scientifique en phytopathologie, il y a une certaine confusion dans l'emploi du terme français "sensibilité" (peu utilisé par les anglo-saxons) et du terme anglais "susceptibility", pour définir le degré d'infection d'une plante à un parasite. Nous n'y avons pas échappé. Gageons qu'en fonction du contexte, le lecteur trouvera lui-même le sens qu'il convient de donner à ces termes ambigus.

Dans notre esprit, la "susceptibilité" est une notion qui s'applique à une variation de la réponse de l'hôte à l'infection, modulée par les facteurs biotiques ou abiotiques de l'environnement. Il s'agit, en l'occurrence, d'une réceptivité de la plante au parasite en fonction de sa résistance physiologique à l'infection (synonyme en anglais de "predisposition" ou de "physiological, acquired or induced susceptibility". L'endurcissement au froid et la protection induite par une souche non agressive sont deux phénomènes changeant la susceptibilité de la plante au parasite sans modifier sa résistance génétique et, par conséquent, sa sensibilité vis-à-vis du pathogène.