

N° d'ordre : 774

50376
1979
170

50376
1979
170

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3ème CYCLE

par

Christine SAUVET

SYSTEMIE ET PHYTOTOXINES

DE PHOMA EXIGUA DESM.

VAR. FOVEATA (FOISTER) BOEREMA

AGENT DE LA GANGRENE DE LA POMME DE TERRE



Soutenue le 13 juillet 1979 devant la Commission d'Examen

MM.	E.J. BONNOT	Président
	L. LACOSTE	Rapporteur
	M. BODARD	Examineur
	J.C. CROSNIER	Examineur

A V A N T - P R O P O S

Ce travail a été réalisé dans la laboratoire de Cryptogamie de l'UER de Biologie à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, en collaboration avec la S.I.C.A. Plants du Cap Gris-Nez et l'Institut Technique de la Pomme de Terre grâce à une aide matérielle importante du Groupement National Interprofessionnel des Semences.

Je tiens ici à exprimer ma reconnaissance à :

Monsieur le Professeur LACOSTE, Directeur du laboratoire de Cryptogamie, qui a accepté de me confier ce travail et a veillé avec patience à sa réalisation.

Monsieur le Professeur BONNOT, qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le Jury de cette Thèse.

Monsieur le Professeur BODARD, de l'intérêt qu'il a manifesté pour ce mémoire en acceptant de le juger.

Monsieur CROSNIER, Directeur de l'Institut Technique de la Pomme de Terre, qui a suivi cette étude avec attention et bienveillance, et qui a accepté de participer à ce Jury.

Monsieur DELATTRE, Président, Monsieur LE BIHAN
et Monsieur CLAEYS, Directeur et Sous-Directeur de la S.I.C.A. Plants du
Cap Gris-Nez. Je leur sais infiniment gré de la chaleur de leur accueil,
de la gentillesse qu'ils m'ont témoignée et de l'aide qu'ils m'ont apportée
tout au long de ces essais.

Je remercie enfin tous ceux qui m'ont encouragée dans
les moments de lassitude et qui, de près ou de loin, ont contribué à la
réalisation de ce travail.

S O M M A I R E

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I - LA GANGRENE : AGENTS ET SYMPTÔMES.....	3
A - Les agents de la gangrène.....	3
1) synthèse des nomenclatures	
2) étude comparée de <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> et de <i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>	
B - Les symptômes.....	9
1) les symptômes sur tiges	
2) les symptômes sur tubercules	
II - LA CONTAMINATION DES TUBERCULES.....	12
A - Origine de l'inoculum.....	12
1) le sol	
2) les plantes hôtes intermédiaires	
3) les fanes	
4) le plant	
B - Facteurs influençant le taux d'inoculum.....	19
1) les facteurs climatiques	
2) l'assolement	
3) le défanage	
4) l'intervalle entre le défanage et l'arrachage	
III - CONDITIONS DE DEVELOPPEMENT DE LA MALADIE.....	23
A - Les modes de pénétration du parasite.....	23
1) les voies naturelles	
2) les blessures	
B - Facteurs intervenant sur le taux de blessure des tubercules.....	24
1) les fumures	
2) la nature et l'état du sol	
3) la mécanisation	
4) l'âge physiologique	
5) la température	

IV -	ROLE DU PLANT DANS L'EPIDEMIOLOGIE.....	28
------	---	----

	CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE.....	30
--	---------------------------------------	----

DEUXIEME PARTIE : ESSAIS EN CHAMP

I -	MATERIEL ET METHODES.....	32
	A - Les techniques culturales.....	32
	1) le choix du plant	
	2) les façons culturales	
	3) la conservation	
	B - La contamination artificielle.....	33
	1) préparation de l'inoculum	
	2) réalisation des inoculations en champ	
	C - Tests de détection de <i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>	34
	1) étude de la contamination des plantes feuillées	
	2) étude de la contamination des tubercules	
II -	RESULTATS OBTENUS EN CHAMP ET EN LABORATOIRE AU COURS DE LA CAMPAGNE 1973.....	38
	A - Essais en champ : Implantation et réalisation.....	38
	1) dispositif	
	2) calendrier	
	B - Résultats des prélèvements.....	39
	1) étude des tiges	
	2) notation de tubercules nécrosés	
	C - Etude des contaminations artificielles en serre.....	40
	1) réalisation	
	2) résultats	
	D - Interprétation, Conclusion.....	42
III -	RESULTATS DES CAMPAGNES 1974 ET 1975.....	43
	IIIA - CAMPAGNE 1974.....	43
	A - Essais en champ : Implantation et réalisation.....	43
	1) implantation et dispositif	
	2) calendrier	
	3) prélèvements et tests effectués sur les plantes feuillées	
	4) prélèvements et tests effectués sur tubercules	
	B - Essais en champ : résultats.....	47
	1) vérification des contaminations artificielles	
	2) étude des fanes	
	3) résultats des précultures avec traitement à la rindite	
	4) résultats des rétrocultures sur tubercules	
	5) résultats des précultures sans levée de dormance artificielle	
	6) taux de nécroses dues à <i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i> à la fin de la conservation	

C - Interprétation et discussion des résultats.....	51
Conclusion.....	52
IIIB - CAMPAGNE 1975.....	53
A - Essais en champ : Implantation et réalisation.....	53
1) implantation et dispositif	
2) calendrier	
3) prélèvements et tests effectués sur les plantes feuillées	
4) prélèvements et tests effectués sur tubercules	
B - Essais en champ : résultats.....	55
1) vérifications des contaminations artificielles	
2) étude des fanes	
3) résultats des précultures	
4) résultats des rétrocultures de tubercules	
C - Interprétation et discussion des résultats.....	58
IIIC - COMPARAISON DES CAMPAGNES 1974 ET 1975.....	58
IV - CAMPAGNE 1976.....	60
A - Essais en champ : Implantation et dispositif.....	60
1) implantation	
2) dispositif	
3) la conservation	
4) calendrier	
5) prélèvements et contrôles sur plantes feuillées	
6) prélèvements et tests sur tubercules	
7) climatologie au Cap Gris-Nez pendant la période des essais	
B - Essais en champ : résultats.....	63
1) étude des fanes	
2) résultats du test rétrocultures de tubercules	
3) résultats du test blessure	
C - Interprétation et discussion des résultats.....	65
1) taux de contamination interne ou taux d'inoculum I	
2) évolution des taux de nécroses après blessure	
D - Conclusion.....	67
CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE.....	70

TROISIEME PARTIE ; MISE EN EVIDENCE DE METABOLITES
 PHYTOTOXIQUES DANS LES FILTRATS DE CULTURE DE *PHOMA*
EXIGUA VAR. *FOVEATA*

I -	MATERIEL ET METHODES.....	72
A -	Matériel et méthodes.....	72
	1) l'origine	
	2) les caractères	
	3) l'entretien	
B -	La culture du champignon : milieu et conditions.....	73
	1) le milieu	
	2) les conditions de culture	
C -	Obtention du filtrat de culture.....	74
D -	Tests biologiques.....	75
	1) tests sur tubercules de pomme de terre	
	2) tests sur plantules de tomate	
II -	MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE PHYTOTOXIQUE DES FILTRATS DE CULTURE DE <i>PHOMA EXIGUA</i> VAR. <i>FOVEATA</i>	77
A -	Résultats obtenus avec les filtrats bruts.....	77
	1) résultats avec les tubercules	
	2) résultats avec les plantules de tomate	
B -	Résultats obtenus avec les extraits.....	79
	1) obtention de l'extrait	
	2) test sur tubercule	
	3) test sur tomate	
III -	FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	82
A -	Principe.....	82
B -	Réalisation.....	82
C -	Résultats.....	83
D -	Purification des fractions actives.....	83
IV -	MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES PIGMENTS PRESENTS DANS LES FRACTIONS ACTIVES.....	85
A -	Extraction des pigments du filtrat.....	85
B -	Chromatographie sur colonne.....	86
C -	Purification en chromatographie sur couche mince.....	87
V -	CARACTERISTIQUES DES PIGMENTS PURS.....	87
A -	Solubilité et stabilité.....	87

B - Spectres d'absorption.....	88
C - Comportement en chromatographie sur couche mince.....	88
D - Comparaison avec les pigments isolés par BICK et RHEE.....	89
E - Dosages biologiques.....	90
1) SA ₁	
2) SA ₂	
VI - DETECTION DES PIGMENTS ACTIFS DANS LES NECROSES DUES A PHOMA EXIGUA VAR. FOVEATA.....	91
A - Obtention des tissus nécrosés.....	91
B - Traitement des tissus nécrosés.....	92
C - Résultats du test biologique.....	92
D - Résultats de la chromatographie en couche mince.....	92
E - Comparaison avec <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	92
VII - PRODUCTION DES PIGMENTS ACTIFS PAR PHOMA EXIGUA VAR. FOVEATA EN FONCTION DE LA NUTRITION CARBONÉE.....	93
A - Principe.....	93
B - Réalisation.....	94
C - Résultats.....	95
1) croissance en poids de matière sèche	
2) tests biologiques	
3) résultats des dosages	
CONCLUSION	
CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE.....	98
CONCLUSION GENERALE.....	99
BIBLIOGRAPHIE.....	101

I N T R O D U C T I O N

La pomme de terre, plante originaire d'Amérique du sud, a une importance considérable ; sa culture est pratiquée dans le monde entier mais s'étend principalement dans les régions tempérées de l'hémisphère nord et plus spécialement en Europe continentale et en U.R.S.S. (BURTON, 1966).

Cependant, la pomme de terre est fréquemment l'objet d'attaques de natures diverses et de nombreuses maladies peuvent affecter la production et la conservation des tubercules. Parmi les maladies d'origine cryptogamique survenant en conservation, la gangrène, qui se manifeste par une nécrose des tubercules, est devenue ces dernières années l'une des plus préoccupantes du point de vue économique, alors qu'auparavant elle ne posait aucun problème majeur.

Connue en Ecosse depuis 1936 cette maladie, encore nommée le *Phoma* de la pomme de terre, est répandue dans la plupart des pays producteurs. Son extension a coïncidé avec le développement de la mécanisation et la généralisation de la conservation à basse température, préconisée pour freiner l'évolution physiologique des tubercules et ainsi ralentir leur vieillissement.

Au début de notre travail, qui a été limité à certains aspects de la gangrène, nous avons voulu faire la synthèse des données bibliographiques portant sur la contamination des jeunes tubercules et sur les facteurs conditionnant l'évolution de la maladie.

A partir de ces informations, nous avons cherché à analyser, en champ et en laboratoire, les rapports hôte-parasite dans la plante feuillée et le tubercule. Nous nous sommes attachée particulièrement au caractère systémique de l'infection, ainsi qu'à l'étude de certains facteurs susceptibles de modifier ces rapports.

Enfin, nous sommes parvenue à mettre en évidence dans les filtrats de culture du *Phoma* de la pomme de terre (*Phoma exigua* Desm. variété *foveata*) l'existence de composés toxiques, capables d'induire un début de nécrose dans les tubercules et permettant d'en expliquer partiellement le déterminisme biochimique.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les tubercules conservés à basse température constituent un milieu favorable au développement de la gangrène ; cependant, la croissance des champignons responsables de cette maladie est très lente dans ces conditions de température et les nécroses n'apparaissent que tardivement.

La contamination des tubercules peut être latente ; son évolution ultérieure en nécrose dépend d'un ensemble de facteurs appartenant à la fois aux conditions de culture et de conservation des tubercules. Si le rôle de certains de ces facteurs est bien connu, pour d'autres il n'en est pas de même et leur importance reste mal définie.

Avant d'analyser les modes de propagation de cette maladie et les interprétations qui en ont été données, il est nécessaire d'en présenter les agents et les symptômes.

I. LA GANGRENE : AGENTS ET SYMPTOMES

A - LES AGENTS DE LA GANGRENE

La gangrène de la pomme de terre est due à deux champignons appartenant à la classe des champignons imparfaits.

- *Phoma exigua* Desm. var. *exigua*

synonymes : *Phoma solanicola* Prillieux et Delacroix
Phoma tuberosa Melhus, Rosenbaum et Schultz

- *Phoma exigua* Desm. var. *foveata* (Foister) Boerema

synonymes : *Phoma solanicola* f. *foveata* (Foister) Malcomson
Phoma exigua Desm. f. sp. *foveata* (Foister)
 Malcomson et Gray.

Ces deux espèces ont des pycnides globuleuses, de couleur sombre, s'ouvrant par un ostiole arrondi, ce qui marque leur appartenance, dans l'ordre des Sphaeropsidales, à la famille des Sphaerioidacées. Grâce à leurs spores petites, unicellulaires et hyalines, ce sont des Hyalosporées du genre *Phoma*.

Ces *Phoma* provoquent les mêmes symptômes sur les tiges et sur les tubercules de pomme de terre ; de plus, leur morphologie ne permet pas de les distinguer, ce qui explique qu'une certaine confusion ait longtemps subsisté dans leur nomenclature.

Cependant, leurs caractères cultureux, physiologiques et biochimiques permettent de les identifier en culture pure ; cette distinction n'a pas seulement une importance systématique, la variété *foveata* ayant un pouvoir pathogène très supérieur à celui de la variété *exigua*.

1) Synthèse des nomenclatures utilisées

Le premier *Phoma* responsable d'une pourriture de tubercules de pomme de terre fut décrit en 1916 sous le nom de *Phoma tuberosa* Melhus, Rosenbaum et Schultz, d'abord en Amérique du Nord puis dans différents pays d'Europe.

Plus tard, en 1940, FOISTER publia la diagnose de *Phoma foveata* Foister n.v.sp., agent de la gangrène de la pomme de terre, maladie présente en Ecosse depuis 1936 (ALCOCK et FOISTER, 1936). Cette espèce se distinguait de la première par sa production de pigments brun-jaunes.

MALCOMSON (1958a), BOEREMA et VAN KESTEREN (1962) montrèrent que, par leur morphologie et les symptômes qu'ils provoquaient, ces *Phoma* parasites des tubercules appartenaient à l'espèce plus ancienne *Phoma solanicola* Prill. et Del., précédemment observée sur les tiges par PRILLIEUX et DELACROIX (1890).

La production de pigments par *Phoma foveata* Foister ne constituait pas, à cause de sa variabilité, un critère suffisant du point de vue taxonomique ; par conséquent ce parasite devait être considéré comme une forme de *Phoma solanicola* Prill. et Del.

Ultérieurement, MAAS (1965) démontra que les deux types de *Phoma solanicola* Prill. et Del. correspondaient à la description de l'espèce plus ancienne *Phoma exigua* Desm. (DESMAZIERES, 1847), champignon du sol, parasite faible de nombreuses plantes herbacées.

A la suite des travaux de MAAS (1965) et de TODD (1963) mettant en évidence la différence de pouvoir pathogène entre les souches productrices ou non productrices de pigments, BOEREMA (1967) estima qu'il fallait considérer les *Phoma* responsables de la gangrène comme deux variétés distinctes de *Phoma exigua* Desm. D'où leurs noms actuels :

- *Phoma exigua* Desm. var. *exigua* pour les souches peu pathogènes, dépourvues de pigments ;
- *Phoma exigua* Desm. var. *foveata* (Foister) Boerema pour les souches fortement pathogènes et productrices de pigments.

Généralement, on les désigne sans mentionner les noms d'auteurs ou en abréviation :

- *Phoma exigua* var. *exigua* ou *P. e.* var. *exigua*
- Phoma exigua* var. *foveata* ou *P. e.* var. *foveata*

C'est la nomenclature la plus courante bien que certains auteurs contestent le terme de variété et lui préfèrent celui de "*formae specialis*" (MALCOMSON et GRAY, 1968a).

Des auteurs russes, enfin, ont proposé d'appeler le *Phoma* de la pomme de terre *Phoma exigua* var. *solanicola*, dont la forme parfaite serait *Ophiobolus porphyrogonus* (Tode) Sacc. ; la description qu'ils en donnent pourrait correspondre à la variété la moins pathogène *Phoma exigua* var. *exigua* (POPKOVA et KOVALEVA, 1973 ; BOEREMA, 1976).

Tableau ¹ : Différences caractéristiques entre les *Phoma exigua* Desm. parasitant la pomme de terre.

Caractère	<i>Phoma exigua</i> Desm. var. <i>exigua</i>	<i>Phoma exigua</i> Desm. var. <i>foveata</i> (Foister) Boerema
Caractères cultureux	mycélium cotonneux blanc devenant gris pas de pigments croissance irrégulière colonies à bords crénelés ou lobés	mycélium ras blanc devenant brun olive pigments jaunes croissance régulière colonies zonées
Température optimale de croissance	24°C à 26°C	20°C à 22°C
Caractères biochimiques	production de l'antibiotique E qui se décompose en milieu basique en pigment α (bleu vert) puis β (rouge) réactions lentes	production de pigments anthraquinoniques - jaunes en milieu acide - rouge en milieu basique réactions immédiates
Pouvoir pathogène	faible	fort
Habitat	nombreuses plantes herbacées	pomme de terre

* Cette synthèse n'est pas spécifique de *Phoma exigua* var. *exigua*
60 % des souches de *Phoma exigua* var. *foveata* le produisent ainsi que d'autres variétés de *Phoma exigua* Desm.

2) Etude comparée de *Phoma exigua* var. *exigua* et *Phoma exigua* var. *foveata*

Des études comparatives des espèces de *Phoma* associées à la gangrène de la pomme de terre ont déjà été développées par différents auteurs ; nous retiendrons d'une part ce qui a trait aux caractères morphologiques et au pouvoir pathogène des variétés *exigua* et *foveata* , d'autre part ce qui concerne les différences culturales et biochimiques sur lesquelles repose leur identification en culture pure. (Tableau 1).

a) *différences morphologiques*

En pratique, il n'est pas possible de différencier les deux variétés *exigua* et *foveata* par la morphologie des pycnides et des pycniospores. Elles produisent toutes deux des pycnides globuleuses à sphériques, brunes ou noires, à paroi fine de taille et de forme très variables. Les pycniospores, émises dans un exsudat blanchâtre, sont ovoïdes, hyalines, généralement unicellulaires (LOGAN et KHAN, 1969 ; DORENBOSCH, 1970).

Seul KRANZ (1962) considère que ces deux *Phoma* diffèrent par la nature de la paroi des pycnides. Toutefois, ce critère trop dépendant du substrat de culture et des conditions de croissance, s'avère insuffisant.

b) *différences culturales*

De tous les milieux testés, le milieu gélosé à 2 % d'extrait de malt et à pH = 4,5 est celui qui permet la meilleure différenciation des deux *Phoma*, les cultures étant réalisées à 20°C et à l'obscurité (LOGAN et KHAN, 1969). Cette température correspond à l'optimum de croissance linéaire de *Phoma exigua* var. *foveata* qui se situe entre 20°C et 22°C, alors que l'optimum de *Phoma exigua* var. *exigua* est compris entre 24°C et 26°C.

Dans ces conditions, *Phoma exigua* var. *foveata* produit les premiers jours un mycélium blanc et ras. Au centre de la colonie apparaît une coloration jaune pâle qui s'intensifie et s'assombrit au fur et à mesure que la culture vieillit. Cette pigmentation, due à la synthèse de dérivés anthraquinoniques, finit par donner au mycélium une teinte brun-olive, diffusant dans la gélose. Dans les cultures âgées ces pigments

crystallisent sous forme d'aiguilles jaunes (BOEREMA et HOWELER, 1967). La croissance du champignon est très régulière. D'autre part peu de pycnides sont formées à l'obscurité ; les études réalisées ne mentionnent pas le comportement du champignon à la lumière.

Dans les mêmes conditions, *Phoma exigua* var. *exigua* forme un mycélium blanc devenant rapidement gris dont les hyphes aériens sont assez denses. La croissance étant irrégulière, les bords de la colonie sont crénelés ou lobés, caractère typique de ce champignon. Par ailleurs, il n'y a aucune synthèse de pigments. Les pycnides, sont rares à l'obscurité et au contraire très abondantes à la lumière (DORENBOSCH, 1970).

c) différences biochimiques

Seul *Phoma exigua* var. *foveata* synthétise des pigments jaunes diffusibles ; les souches issues de la variété *exigua* sont toujours dépourvues de pigments, par contre elles produisent une substance dite "E" possédant des propriétés antibiotiques.

-les pigments de *Phoma exigua foveata* : BICK et RHEE (1966) qui ont isolé ces pigments et établi leur structure chimique, ont montré qu'il s'agissait de dérivés anthraquinoniques, principalement la pachybasine, le chrysophanol, l'émodine et la phomarine.

Ces composés ont précédemment été isolés de plantes supérieures et de quelques champignons, mais jusqu'à présent *Phoma exigua* var. *foveata* est le seul *Phoma* et le seul parasite de la pomme de terre qui les produise. C'est pourquoi, la présence et les propriétés de ces pigments sont utilisées dans les méthodes de détection et d'identification de la gangrène.

Les dérivés anthraquinoniques, jaunes en milieu acide, virent au rouge en milieu basique. Le test à l'ammoniaque mis au point par LOGAN et KHAN (1969) utilise cette propriété pour déceler de très petites quantités de pigments dans les souches jeunes ou peu colorées, permettant ainsi une identification rapide de *Phoma exigua* var. *foveata* isolé de tiges ou de tubercules.

Utilisant la même propriété, la technique de chromatographie en couche mince, mise au point par MOOSCH et MOOI (1974) permet la détection des tubercules atteints de gangrène en mettant en évidence la présence des pigments de *Phoma exigua* var. *foveata* dans des extraits de tissus nécrosés.

La cristallisation des dérivés anthraquinoniques observée dans les cultures âgées, peut être accélérée par l'addition de méthylthiophanate au milieu de culture (TICHELAAR, 1974) ; l'emploi d'un tel milieu permettrait d'isoler *Phoma exigua* var. *foveata* de sols contaminés et de le distinguer du reste de la mycoflore du sol (BOEREMA, 1976).

-la substance antibiotique "E" : cette substance produite par *Phoma exigua* var. *exigua* a été nommée "E" initiale d'*exigua* ; elle est incolore, soluble dans l'eau et, dans certaines conditions, s'oxyde en pigments puis β (BOEREMA et HOWELER, 1967).

Cette réaction peut être démontrée en ajoutant de la soude à une culture de *Phoma exigua* var. *exigua* ; dans les minutes qui suivent le mycélium et la gélose virent au bleu-vert, couleur du pigment α en conditions alcalines puis au rouge couleur du pigment β . Cette réaction est utilisée pour identifier *Phoma exigua* var. *exigua* en culture pure.

Cette synthèse toutefois n'est pas spécifique de la variété *exigua* puisque 60 % des souches de la variété *foveata* et d'autres variétés de *Phoma exigua* Desm. produisent également ce composé.

Sur des souches de *Phoma exigua* var. *foveata* ne produisant pas cet antibiotique, l'addition de soude provoque un virage immédiat au rouge dû à la réaction des pigments anthraquinoniques.

La démonstration des propriétés antibiotiques de la substance "E" a été faite par LOGAN et O'NEIL (1970) sur certaines bactéries et deux champignons, *Fusarium caeruleum* et *Phytophthora infestans* ; selon ces auteurs, la production de cet antibiotique pourrait jouer un rôle dans la colonisation du substrat qu'est le tubercule de pomme de terre.

d) différences de pouvoir pathogène

Inoculés à des tissus blessés de tiges ou de tubercules, *Phoma exigua* var. *exigua* et *Phoma exigua* var. *foveata* se montrent pathogènes ; cependant, le second provoque sur les tubercules blessés des nécroses plus étendues et plus profondes.

La différence de pouvoir pathogène apparaît principalement dans les essais de contamination de tubercules non blessés. Dans ces conditions, *Phoma exigua* var. *exigua* est rarement capable d'induire la maladie,

tandis que *Phoma exigua* var. *foveata*, pénétrant par les yeux et les lenticelles, infecte tous les tubercules testés (LOGAN et KHAN, 1969 ; MALCOMSON, 1958b ; DENNIS, 1946 ; TODD et ADAM, 1967 ; BOEREMA, 1967).

Le pouvoir pathogène de *Phoma exigua* var. *foveata* est donc supérieur à celui de *Phoma exigua* var. *exigua*, ce que confirment les résultats des isolements réalisés sur les tubercules naturellement contaminés.

Enfin, dans la variété *foveata*, les souches capables de synthétiser l'antibiotique "E", caractéristique des isolements de *Phoma exigua* var. *exigua*, se montrent, d'après LOGAN et WOODWARD (1971), légèrement plus pathogènes que les autres. Mais les différences se situent surtout au niveau de l'aspect des lésions produites.

L'extension de la gangrène ainsi que son impact économique sont dûs à la variété *foveata* de l'espèce *Phoma exigua* Desm. . Etant données les similitudes existant entre les deux variétés *exigua* et *foveata*, certains auteurs considèrent cette dernière comme le résultat d'une adaptation particulière à un hôte, ici la pomme de terre.

B - LES SYMPTOMES

1) Les symptômes sur tiges

A la mort du feuillage naturelle après la senescence des plantes ou provoquée par défanage mécanique ou chimique, des macules blanchâtres apparaissent à la base des tiges (TODD et ADAM, 1967).

L'observation microscopique des macules montre un mycélium hyalin, abondant, ramifié entre des cellules mortes et vides (PRILLIEUX et DELACROIX, 1890).

Les deux variétés *exigua* et *foveata* forment des pycnides sur les tiges mais la seconde est beaucoup plus fréquente.

En mettant en culture des fragments de tiges vertes sur milieu nutritif, TODD et ADAM (1967) et KHAN et LOGAN (1968) ont montré que les

plantes pouvaient être parasitées sans symptômes apparents et sans que leur croissance en soit altérée, bien avant que n'apparaissent les pycnides.

2) Les symptômes sur tubercules

Sur tubercules, les signes de la maladie varient considérablement en fonction des variétés de pomme de terre, du stade de l'infection et du *Phoma* responsable.

a) *les symptômes externes*

Extérieurement, la gangrène se manifeste d'abord par une petite dépression de la peau apparaissant en n'importe quel endroit du tubercule. Celle-ci, s'étend ensuite pour donner le symptôme bien connu dit "en coup de pouce".

A un stade avancé de la maladie, une grande partie du tubercule est atteinte et la peau peut se plisser indiquant un effondrement du tissu interne. Ce stade peut, à première vue, être confondu avec la fusariose mais il n'y a ni les rides concentriques, ni les coussinets mycéliens caractéristiques des attaques de *Fusarium caeruleum* Lib.

En réalité, les symptômes ne sont pas toujours aussi nets, notamment lorsque différents champignons sont impliqués dans la pourriture du tubercule (ALCOCK et FOISTER, 1936 ; JOUAN et Coll., 1974). Dans le cas particulier d'une nécrose résultant de l'association de *Fusarium caeruleum* Lib. et de *Phoma exigua* var. *foveata*, ce sont les symptômes de la fusariose qui dominent à basse température ; par contre, les symptômes de la gangrène seront les plus marqués si les tubercules manquent de maturité, ce qui peut arriver à la suite de défanages ou d'arrachages trop précoces (PETT et EFFMERT, 1972 ; BOYD et LOGAN, 1967).

L'importance de la lésion externe n'est pas nécessairement le reflet de celle de la lésion interne : une petite dépression de la peau peut cacher une nécrose profonde et étendue, et inversement une grande surface du tubercule être atteinte et la lésion rester superficielle ; c'est le symptôme nommé "skin necrosis" (mentionné dans un feuillet d'information agricole britannique : advisory leaflet n° 545). Cette forme particulière surviendrait chez les tubercules provenant de sols acides et stockés à basse température (MALCOMSON et GRAY, 1968b).

b) *les symptômes internes*

L'infection se manifeste d'abord par un léger brunissement des tissus, puis, ceux-ci commençant à se dessécher, le brunissement s'accroît et de petites cavités peuvent se former au coeur des parties malades. L'observation microscopique révèle, dans les tissus atteints, la présence d'un mycélium septé, restant le plus souvent intercellulaire (ALCOCK et FOISTER, 1936).

La progression du champignon provoque une pourriture sèche, brune et granuleuse. Les cellules sont presque entièrement détruites à l'exception des grains d'amidon. Dans les parties gangrénées apparaissent de grandes cavités tapissées de mycélium gris-blanc, dans lesquelles on décèle parfois la présence de pycnides. Bien que les contours de la nécrose soient irréguliers, la limite entre les tissus sains et malades reste nette (JOUAN et Coll., 1974). De fins hyphes hyalins peuvent être détectés dans la zone immédiatement adjacente à la partie nécrosée, qui ne présente pas de symptômes visibles (WILSON et FOX, 1975).

D'après les travaux de LOGAN et WOODWARD (1971), la diversité des symptômes de la gangrène pourrait s'expliquer par l'existence des deux formes de *Phoma exigua* var. *foveata*, productrices ou non de l'antibiotique "E" ; les souches ne synthétisant pas de composé donnent des lésions irrégulières, comportant de grandes cavités ; les autres souches provoquent des nécroses brun-foncé, de texture humide et de contour assez régulier. Les pourritures dues à *Phoma exigua* var. *exigua* sont du second type mais moins étendues.

II. LA CONTAMINATION DES TUBERCULES

Dans le cas de la gangrène, les chercheurs se sont attachés avant tout à résoudre le problème pratique posé par la nécrose des tubercules bien plus qu'à connaître le mécanisme de la maladie. Leur but était de réduire l'incidence de la gangrène en diminuant la contamination des tubercules et en évitant l'apparition des nécroses. Dès lors, il leur importait moins de savoir comment se faisait la transmission de l'agent pathogène que d'en connaître l'origine. Leurs travaux se sont donc orientés vers la recherche des sources d'inoculum et des facteurs déterminant le taux de cet inoculum plutôt que vers la compréhension du mécanisme infectieux. Il en a été de même pour le phénomène de la nécrose : si les conditions d'apparition des nécroses ont été beaucoup étudiées, le processus nécrotique reste totalement inconnu.

Dans un premier temps, nous analyserons les différentes sources d'inoculum telles que les ont envisagées les auteurs ayant travaillé sur la gangrène de la pomme de terre et les facteurs déterminant cet inoculum.

A - L'ORIGINE DE L'INOCULUM

Les chercheurs britanniques ont depuis longtemps essayé d'établir le rôle que pouvait jouer le sol dans la contamination. Cependant, le sol n'est pas la seule source d'inoculum à prendre en considération et l'infection des tubercules peut avoir d'autres origines dont l'importance réelle n'est pas toujours clairement démontrée, le plant, les fanes et les plantes hôtes intermédiaires.

1) Le sol

Des méthodes simples permettent d'isoler les champignons saprophytes du sol ; c'est le cas de *Phoma exigua* var. *exigua* qui peut être mis en évidence par la méthode classique des dilutions de terre. Par contre, l'isolement de *Phoma exigua* var. *foveata* requiert des techniques plus élaborées.

Les méthodes d'isolement de *Phoma exigua* var. *foveata* reposent sur l'inoculation de sol dans des tubercules sains. En règle générale, ce sont des variantes de la technique mise au point par MAC KEE et BOYD (1952) pour la détection de *Fusarium solani* var. *caeruleum* Sacc. Le principe en est le suivant : les sols à tester sont inoculés à des tubercules entiers ou des fragments de tubercules désinfectés et blessés. Après 6 à 8 semaines d'incubation entre 5°C et 10°C, des isolements sont réalisés sur les tubercules présentant des lésions gangréneuses. Les modifications apportées par MALCOMSON et GRAY (1968b) ou KHAN et LOGAN (1968) concernent les modalités de blessure et de désinfection. Ce procédé présente l'inconvénient d'être particulièrement long, mais HIDE, GRIFFITH et ADAMS (1977) ont montré qu'un prétraitement des fragments de tubercules tests avec un mélange d'Agrimycine et d'isopropylphényl carbamate permettait de réduire le temps d'incubation à 2 ou 3 semaines. Des milieux d'isolement sélectif de *Phoma exigua* var. *foveata* ont été mis au point assez récemment par TICHELAAR (1974), BANNON (1975), MAC CRACKEN et LOGAN (1977).

Les techniques employées dans ces nouvelles méthodes sont assez voisines mais diffèrent par les moyens de détermination de l'agent pathogène. Il serait trop long de les exposer ici en détails mais elles permettent d'isoler rapidement et facilement le champignon de sols artificiellement contaminés et d'évaluer avec précision la quantité d'inoculum qui y est présente; jusqu'à présent, elles n'ont été que peu utilisées sur des sols naturellement contaminés, et, de toute façon, leur emploi s'orienterait plutôt vers la détermination de l'inoculum présent dans le sol adhérent aux tubercules.

Les recherches effectuées en Ecosse par MALCOMSON (1958b) et MALCOMSON et GRAY (1968b), en Irlande par KHAN et LOGAN (1968) ont révélé que *Phoma exigua* var. *foveata* se trouvait dans la plupart des sols ayant porté une culture de pomme de terre l'année précédente, *Phoma exigua* var. *exigua* y étant détecté occasionnellement. De plus, les deux champignons ont parfois été isolés de sols n'ayant pas porté de pomme de terre depuis plus de 5 ans. Si ce fait n'est pas surprenant pour *Phoma exigua* var. *exigua* qui est un champignon du sol, il n'en est pas de même pour *Phoma exigua* var. *foveata* dont les possibilités de survie dans le sol sont controversées.

MAICOMSON et GRAY (1968b) présument que sa survie serait favorisée dans les sols à forte humidité, ce qui expliquerait le potentiel élevé en gangrène des régions situées au nord ouest de l'Ecosse où l'humidité du sol est particulièrement forte.

Toutefois, les résultats de TODD et ADAM (1967) laisseraient penser que *Phoma exigua* var. *foveata* n'est pas un hôte constant du sol bien qu'il puisse s'y maintenir au moins plusieurs mois après une récolte de pomme de terre.

Les expériences réalisées par ENTWISTLE (1971) en laboratoire et en champ avec des sols contaminés artificiellement à l'aide de spores de *Phoma exigua* var. *foveata* et var. *exigua* ont démontré que le pouvoir infectieux des sols et l'incidence de la gangrène en conservation étaient fonction de la concentration de l'inoculum ; elles ont également confirmé le pouvoir pathogène supérieur de la variété *foveata* déjà mis en évidence par TODD et ADAM (1967) notamment pour les faibles concentrations d'inoculum.

Des deux variétés de *Phoma exigua* Desm. parasitant la pomme de terre, seule la variété *exigua*, la moins pathogène, est un élément habituel de la microflore du sol dont il est facile de l'isoler ainsi que le soulignent TODD et ADAM (1967) et DORENBOSCH (1970).

Phoma exigua var. *foveata* peut également être présent dans le sol ; pour cette raison de nombreux auteurs, dont FOISTER, WILSON et BOYD (1945), les premiers à l'avoir isolé, considèrent que le sol est à l'origine de la maladie. Cependant, il ne semble pas en être un habitant normal, et, TODD et ADAM (1967) estiment que sa présence y est liée à la culture de la pomme de terre. Par ailleurs, ses possibilités de survie à l'état saprophytique dans le sol n'ont jamais été clairement établies.

En pratique, les tubercules produits par un sol contaminé ou ayant porté récemment une récolte contaminée pourront montrer des taux de nécroses très supérieurs à ceux des tubercules produits par des sols sains (ENTWISTLE, 1971 ; LOGAN, 1974), justifiant l'adoption d'un système d'assolement sur plusieurs années, préconisée par LOGAN dans le but de réduire le taux d'inoculum du sol.

S'il semble bien y avoir une relation entre le potentiel infectieux du sol et le nombre de nécroses pouvant survenir en conservation, aucune précision n'est apportée sur le mode de transmission de l'agent pathogène ni sur le moment de l'infection des tubercules.

2) Les plantes hôtes intermédiaires

Phoma exigua var. *exigua* est connu comme étant un parasite sans spécificité d'hôte ; il peut envahir les tissus sénescents de nombreuses plantes herbacées assurant ainsi son maintien dans le sol en l'absence de culture de pomme de terre. Fréquemment observé en association avec des lésions sur tiges et sur feuilles, dans des racines et des tubercules pourrissants, il est considéré comme un parasite faible ou de blessure (BOEREMA et HOWELER, 1967).

Les choses sont différentes pour *Phoma exigua* var. *foveata*. Il ne fait aucun doute que la pomme de terre soit son hôte principal, bien qu'il ait été incidemment observé sur d'autres plantes. C'est ainsi que TODD (mention d'une communication personnelle de l'auteur à FOX et DASHWOOD, 1978) a pu l'isoler des tissus sénescents de trois plantes adventices : *Chenopodium album*, *Fumaria officinalis*, *Matricaria matricarioides*, provenant d'un champ ayant produit des tubercules fortement contaminés. En outre, en conditions artificielles, ce champignon fortement pathogène pour la pomme de terre, peut se conduire en parasite faible. En effet, FOX et DASHWOOD (1978) sont parvenus à infecter par voie racinaire des plantules de diverses espèces cultivées dont l'orge, la betterave, le blé, le pois et à isoler ensuite *Phoma exigua* var. *foveata* des tiges et feuilles. Ce champignon est donc capable de parasiter d'autres plantes que son hôte habituel apparemment de façon systémique et sans symptômes visibles. Les tiges ainsi contaminées, insérées dans des tubercules sains peuvent induire la formation de nécroses.

Pour FOX et DASHWOOD (1978), les plantes hôtes intermédiaires pourraient permettre la survie dans le sol de *Phoma exigua* var. *foveata*, notamment par l'association des repousses de pomme de terre et des plantes entrant dans la composition du système d'assolement, par exemple l'orge fréquemment employée en rotation avec la pomme de terre en Ecosse. Il est difficile en réalité d'évaluer le rôle des plantes hôtes intermédiaires dans

l'incidence de la gangrène. Elles seraient une explication simple du maintien de *Phoma exigua* var. *foveata* dans le sol en l'absence de la pomme de terre, mais jusqu'à présent ce champignon n'a été que trop rarement isolé d'autres plantes en conditions naturelles pour qu'on puisse se montrer affirmatif.

3) Les fanes

MALCOMSON (1958b) et TODD (1963) ont observé que la présence de pycnides de *Phoma* spp., en Grande Bretagne, était fréquente sur les tiges mortes de pomme de terre.

Dans les cas de contamination massive, naturelle ou artificielle, les pycnides peuvent couvrir une grande partie des tiges et appartiennent presque exclusivement à *Phoma exigua* var. *foveata*. Lors d'infections moins sévères, *Phoma exigua* var. *exigua* est également présent ainsi que d'autres *Phoma* non pathogènes, se développant en saprophytes sur les tissus morts, le plus fréquent étant *Phoma eupyrena* Sacc. .

Mais, les pycnides ne sont que le témoignage d'une contamination antérieure ; différents auteurs, TODD et ADAM (1967), KHAN et LOGAN (1968) ont mis en évidence par rétroculture de fragments de tiges vertes la présence latente de *Phoma exigua* var. *foveata* dans les tissus de la plante. Ces chercheurs écossais et irlandais ont montré que les plantes issues de tubercules atteints de gangrène ou cultivés dans des sols contaminés étaient rapidement parasitées et que le champignon pouvait être isolé des tiges dès la quatrième semaine qui suit la plantation jusqu'au moment de l'apparition des pycnides. Ces résultats prouvent que l'infection est systémique, mais ces auteurs n'ont pas attribué à l'infection des tiges dans la contamination des tubercules un autre rôle que l'accroissement du potentiel infectieux après l'extériorisation des pycnides et n'ont accordé aucune attention particulière à son caractère systémique. Ils en concluent simplement, comme TODD et ADAM (1967), qu'après le mûrissement des tiges, l'infection s'étend et devient visible par la formation des pycnides. Selon LOGAN (1967), les pycnides qui apparaissent sur les tiges mortes sont mûres trois semaines avant la récolte et contribuent à augmenter l'inoculum susceptible de contaminer les tubercules au niveau du sol.

Avant l'arrachage, la dissémination est assurée par les eaux de pluie ruisselant le long des tiges. La pluie peut être aussi responsable d'une dispersion des spores déterminant la contamination des plantes voisines. ENTWISTLE (1972) en collaboration avec LOGAN (1976) a pu mettre en évidence ce phénomène en utilisant des pièges aériens. Ces pièges étaient constitués par des séries de disques de papier filtre disposés à 5, 15 et 60 cm du sol, dans un champ planté de tubercules sains à l'exception d'une petite parcelle centrale plantée de tubercules atteints de gangrène. Ces disques étaient exposés à l'air pendant une semaine puis déposés en boîte de Pétri sur un milieu gélosé à l'extrait de malt. Après deux semaines d'incubation à 21°C, ENTWISTLE notait le nombre de colonies de *Phoma exigua* var. *foveata* et de *Phoma exigua* var. *exigua* qui s'étaient développées. Parallèlement, LOGAN étudiait l'incidence de la gangrène sur les tubercules récoltés. *Phoma exigua* var. *foveata* n'a été isolé qu'à proximité immédiate de la parcelle centrale et uniquement après le brûlage des tiges, la fréquence des isolements diminuant rapidement après la récolte. Les résultats obtenus avec les pièges situés à 15 cm du sol ont amené les auteurs à conclure que les éclaboussures de pluie étaient les principales responsables de cette dissémination des spores. Le taux de gangrène obtenu parallèlement dans les tubercules récoltés a confirmé cette dispersion très limitée de *Phoma exigua* var. *foveata* à partir de la parcelle contaminée. Par contre, la distribution de *Phoma exigua* var. *exigua* était uniforme pour l'ensemble du champ.

Au moment de la récolte, les tubercules peuvent encore être mis en contact avec les tiges parasitées et être éventuellement contaminés.

Selon LOGAN (1967, 1974), il existe une étroite corrélation entre le nombre de pycnides sur les tiges et le développement de la gangrène dans la descendance. Cependant, le rôle que LOGAN attribue à l'infection des tiges dans l'épidémiologie n'est pas constamment vérifié. MALCOMSON et GRAY (1968b) estiment au contraire qu'il ne s'agit pas d'une source d'inoculum importante, n'ayant pas observé, après sa suppression par arrachage des tiges avant l'apparition des pycnides, une réduction de la gangrène en conservation.

4) Le plant

Selon LOGAN (1967), la plantation de tubercules malades serait une double source d'inoculum, à la fois par les tiges infectées qui sont produites et par l'inoculum que représente la nécrose. De ses travaux publiés en 1974, résumant des essais réalisés entre 1966 et 1968, il ressort que le taux de tubercules atteints de gangrène dans la descendance des tubercules nécrosés peut être particulièrement élevé. Il a été démontré de façon certaine que l'infection des tiges pouvait jouer un rôle dans la contamination des tubercules, le rôle de la nécrose, par contre n'a pas été bien perçu. Si on s'en réfère à LOGAN, la décomposition du tubercule nécrosé dans le sol entraînerait une augmentation de son potentiel infectieux.

La comparaison du développement de la gangrène dans la production de tubercules nécrosés ou apparemment sains, mais prélevés dans des lots malades, a permis à BOYD et LOGAN (1967) et BOYD (1971) de constater que la descendance du plant apparemment sain pouvait être aussi contaminée que celle du plant nécrosé. En conséquence, il n'est pas nécessaire que le tubercule soit nécrosé pour devenir une source d'infection ; il peut être apparemment sain mais néanmoins porteur de la maladie à l'état latent et, s'il est planté, produire une génération de tubercules contaminés, représentant donc une source d'inoculum particulièrement dangereuse. D'après LOGAN (1974), l'infection des jeunes tubercules à partir d'un porteur sain se ferait après nécrose de celui-ci, le parasite sortant de son état de latence. Cette dernière hypothèse cadre d'ailleurs assez mal avec le rôle qu'il attribue aux pycnides dans l'évolution de la contamination.

Il est reconnu que *Phoma exigua* var. *foveata* n'entraîne, en culture, ni symptômes durant la période végétative, ni baisses de rendement. Ceci est confirmé par les expériences de HIRST et coll. (1970) et GRIFFITH et coll. (1974) qui affirment que tant que la proportion des tubercules nécrosés ne dépasse pas les 50 %, l'émergence des plantes n'est pas réduite et que le rendement n'est pas affecté. Il a simplement été remarqué (LOGAN, 1967, 1974) que les tubercules nécrosés produisaient des tiges de vigueur inégale, plus nombreuses et de mûrissement plus précoce que celles des plantes saines, ainsi qu'un nombre plus important de tubercules de petit calibre.

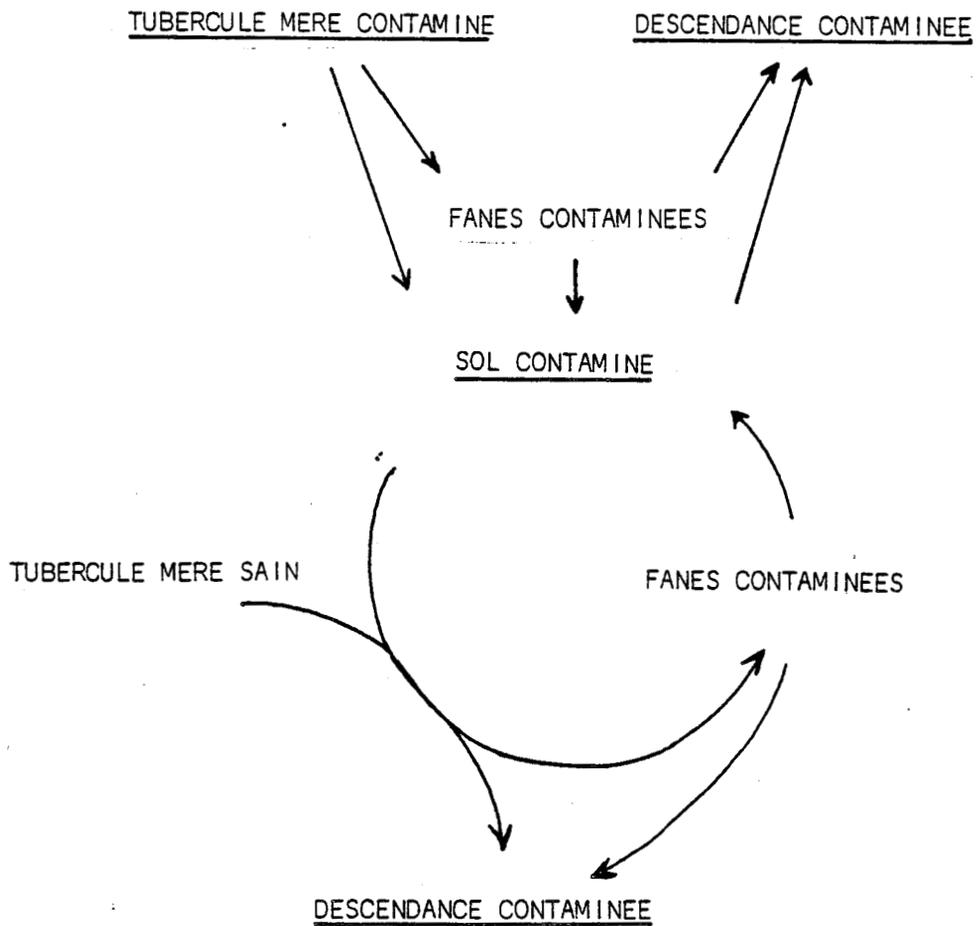


Schéma récapitulatif des sources d'inoculum dans la
 la contamination des tubercules par *Phoma exigua* var. *foveata*
 (à partir des données bibliographiques)

Il est malaisé d'évaluer l'importance relative du sol et du plant dans le développement de la gangrène, les fanes et les plantes hôtes intermédiaires n'étant que des corollaires des deux précédents. Si, dans les conditions de culture pratiquées en France, le plant est considéré comme le principal mode de propagation de la maladie, il n'en semble pas moins vrai que dans des contrées plus septentrionales comme l'Ecosse et l'Irlande, le sol peut représenter une source d'inoculum importante, ainsi qu'en témoignent la fréquence des isolements du sol de *Phoma exigua* var. *foveata* obtenus par MALCOMSON et GRAY (1968b), et KHAN et LOGAN (1968) dans ces régions.

Quelle que soit l'origine de la contamination, sol ou plant, le parasite peut être présent sans symptômes, tant au niveau des plantes feuillées qu'au niveau des tubercules, et, ne se manifester que beaucoup plus tard, sur les tiges sous forme de pycnides après le défanage, dans les tubercules sous forme de nécroses si les conditions de conservation permettent son développement. En effet, *Phoma exigua* var. *foveata* ne révèle jamais sa présence sur les tiges vertes et la gangrène se manifeste le plus souvent au cours du stockage à basse température, rarement dès l'automne et selon KHAN (1973) jamais avant la récolte quelle que soit l'importance de l'inoculum présent.

B - FACTEURS INFLUENCANT LE TAUX D'INOCULUM

1) Les facteurs climatiques

Dès 1952, FOISTER avait remarqué que le développement de la gangrène en conservation était particulièrement élevé les années très humides d'août à octobre. LOGAN (1967) l'interprète comme le résultat d'une meilleure dispersion des spores issues des pycnides présentes sur les fanes durant les saisons pluvieuses augmentant l'inoculum susceptible de contaminer les jeunes tubercules. Dans les expériences d'ENTWISTLE (1972), la fréquence des isolements de *Phoma exigua* var. *foveata* des pièges aériens avait été plus grande au cours de la plus humide des trois années d'essais, concordant avec la remarque et l'interprétation précédentes.

Mais, aucune étude sur l'incidence de la gangrène ou de la contamination des tubercules n'a été faite en fonction des données climatiques. De plus, d'après MALCOMSON (1958b) , MALCOMSON et GRAY (1968b) , les sols où se maintient une forte humidité favoriseraient la survie de *Phoma exigua* var. *foveata*, assurant le maintien de l'inoculum . Ceci expliquerait les problèmes particuliers posés par la gangrène en Ecosse .

Ces auteurs estiment par ailleurs que les plantes ont dans ces types de sol une croissance plus lente et que les tubercules qui, par conséquent, manquent de maturité à l'arrachage sont plus sensibles à la maladie. Adoptant dès le départ l'hypothèse d'une contamination externe des nouveaux tubercules, ils n'ont jamais envisagé le rôle des facteurs climatiques sur la nature systémique de l'infection.

2) L'assolement

Peu d'informations sont utilisables quant à la composition et la durée idéales de l'assolement par rapport au potentiel infectieux du sol. Cependant, certains auteurs pensent qu'un assolement sur plusieurs années devrait permettre de réduire le taux de *Phoma exigua* var. *foveata* présent dans le sol , sans toutefois l'éliminer complètement puisque le champignon semble être capable de survivre plus de 5 ans dans le sol en l'absence de pomme de terre (KHAN et OLGAN, 1968; LOGAN, 1974).

3) Le défanage

Dans les cultures de plant, le défanage est une pratique générale qui consiste à provoquer la mort du feuillage prématurément afin d'éviter les attaques tardives de pucerons vecteurs de virus et d'assurer le rendement maximum en petits et moyens tubercules commercialement plus recherchés (CROSNIER, 1973). Il est effectué soit mécaniquement par arrachage ou fauchage des tiges, soit chimiquement par l'application de produits comme le chlorate de soude, l'acide sulfurique ou des hormones de dessèchement.

Le nombre de pycnides présentes sur les tiges traitées et la rapidité avec laquelle elles apparaissent varie considérablement selon les modes de défanage, mais LOGAN, COPELAND et LITTLE (1976), comparant les effets de différents traitements physiques ou chimiques, ont observé que le

développement ultérieur de la gangrène n'était pas toujours fonction de leur abondance. Par ailleurs, la diminution de la maladie en conservation obtenue par LOGAN (1970) par l'arrachage des tiges, éliminant ainsi totalement le potentiel d'inoculum des pycnides, ne se vérifie pas toujours (MALCOMSON et GRAY, 1968b). Ces résultats hétérogènes, parfois contradictoires, remettent en cause, partiellement tout au moins, la relation que LOGAN (1967, 1974) établissait entre l'incidence des pycnides et l'incidence de la gangrène. Il semble qu'il faille nuancer le rôle que cet auteur attribue à l'infection des tiges dans l'épidémiologie et que dans certains cas elle ait peu d'influence sur la contamination des tubercules. Confirmant ce point de vue, la gangrène peut se développer dans des lots dont les plantes mères ne portaient que peu ou pas de pycnides après le défanage, ainsi que l'ont observé GRIFFITH et coll. (1974). La rapidité avec laquelle survient la mort du feuillage, variable selon les défanants chimiques, tout en agissant sur le moment d'apparition des pycnides, n'a pas de répercussions sur l'incidence de la gangrène en conservation (LOGAN, COPPELAND et LITTLE, 1976). FOX et DASEWOOD (1975a) ont cependant noté que la descendance des essais défanés par hormones de dessèchement dont l'action est lente peut être plus contaminée que celle des essais défanés mécaniquement ou chimiquement par l'acide sulfurique dont l'action est très rapide.

Récemment BANNON (1978) a montré *in vitro* que le paraquat, substance active de certains défanants, favorisait la sénescence des tissus de pomme de terre mais activait aussi l'apparition des pycnides chez les plantes contaminées ; et il reste possible qu'il y ait une relation entre l'extension de la maladie et l'utilisation de défanants chimiques.

En résumé, l'influence du défanage sur la contamination des tubercules apparaît aussi variable que celle de l'inoculum porté par les tiges. Dans les essais de MALCOMSON et GRAY (1968b), l'infection des tiges avait peu de conséquences sur la contamination des tubercules, et, l'influence du mode de défanage semblait limitée. Par contre, les expériences de LOGAN (1967, 1974) montraient un lien entre l'infection des tubercules, celle des tiges et le mode de défanage.

4) L'intervalle entre le défanage et l'arrachage

Les résultats obtenus en Ecosse par FOX et DASHWOOD (1975a) et confirmés par LOGAN et coll. (1976) en Irlande, montrent que d'une façon générale l'incidence de la gangrène augmente au fur et à mesure que s'étend l'intervalle entre le défanage et l'arrachage.

Qu'il s'agisse des essais de GRIFFITH et coll. (1974) ou de FOX et DASHWOOD (1972)', toute augmentation de la gangrène est interprétée comme la conséquence de l'accroissement du taux de *Phoma exigua* var. *foveata* dans le sol entourant le tubercule. Dans le cas présent cette augmentation serait liée à l'apparition des pycnides suivant le défanage.

Il semble donc que la pratique qui consiste à laisser les tubercules 3 à 4 semaines dans le sol après le défanage, afin de les rendre moins vulnérables, soit une erreur. D'après FOX et DASHWOOD (1972, 1975), l'idéal serait de récolter les tubercules à maturité mais suffisamment tôt pour diminuer les risques de contamination secondaire par les pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata*.

Cependant, il faut noter que les pycnides ne sont pas la seule cause de l'accroissement de la contamination des tubercules. Les travaux de COPELAND et LOGAN (1976), LOGAN et coll. (1976) montrent en effet que l'incidence de la contamination s'accroît dès la première semaine suivant le défanage donc avant la formation des pycnides sur les tiges. Ceci laisse supposer l'intervention d'une autre source d'inoculum, qui pourrait selon ces auteurs se situer sur les racines et les stolons.

Au terme de toutes ces expériences, il apparaît que dans l'ensemble, les auteurs ont perçu la nature systémique de l'agent pathogène mais qu'ils n'en ont pas tiré toutes les conséquences possibles reliant mal l'action des différents facteurs susceptibles d'intervenir avec ce caractère systémique.

III. CONDITIONS DE DEVELOPPEMENT DE LA MALADIE

Quelles que soient les divergences qui subsistent à propos des modalités de la contamination lorsque que le champignon est parvenu aux tubercules, deux questions se posent :

-l'agent pathogène étant incapable de pénétrer à travers un épiderme intact, quels peuvent être ses moyens de s'introduire dans les tubercules.

-quels sont les facteurs qui vont permettre le développement de la nécrose.

Ce sont les deux derniers points que nous aborderons dans cette étude bibliographique.

A - LES MODES DE PENETRATION DU PARASITE

1) Les voies naturelles

Il est admis que dans certains cas, peu fréquents, la pénétration du champignon puisse se faire par les lenticelles et les yeux. Les lenticelles qui éclatent sur les tubercules conservés dans des conditions excessives d'humidité sont assimilables à des blessures. Bien qu'expérimentalement, MALCOMSON (1958b) ait pu démontrer qu'elles pouvaient être une porte d'entrée pour *Phoma exigua* var. *foveata*, en pratique dans les conditions habituelles de conservation, ce mode de pénétration doit rester exceptionnel.

Ce même auteur a obtenu le développement de nécroses au niveau des yeux après contamination externe par trempage dans une suspension de spores et de mycélium de *Phoma exigua* var. *foveata*. Mais c'est principalement au moment de la germination que le parasite peut s'installer dans le tubercule au niveau des germes, la germination provoquant selon JOUAN et coll. (1974) de petites lésions dans les tissus voisins.

2) Les blessures

Les blessures occasionnées aux tubercules au moment de la récolte ou au cours des opérations de conditionnement durant la période de conservation, permettent la pénétration de l'agent pathogène présent dans le sol, sur l'épiderme ou dans le périderme.

L'importance des nécroses qui en résultent dépend du type de blessure : les coups, les meurtrissures sans rupture de l'épiderme, les lésions superficielles n'amènent qu'un faible taux d'infection (MALCOMSON, 1958b; JOUAN et coll., 1974). Par contre, de nombreuses lésions se développent à la suite des blessures profondes, notamment lorsqu'elles s'accompagnent d'un écrasement des tissus (GRIFFITH, 1970 ; UMAERUS, 1975). JELLIS (1975) explique l'extension plus ou moins grande du parasite en fonction de la profondeur des blessures par la plus grande sensibilité des tissus médullaires comparée à celle des tissus corticaux. Le cortex et l'anneau vasculaire seraient d'ailleurs le siège de la résistance des cultivars les moins sensibles à la gangrène (PIETKEWICZ et JELLIS, 1975). L'importance particulière des nécroses, lorsque les tissus sont fortement endommagés, pourrait être due, selon ADAMS et GRIFFITH (1978), d'une part au fait que le champignon y trouve un milieu favorable à sa croissance et que d'autre part la cicatrisation de ce type de blessure est plus lente et moins complète .

Les deux variétés de l'agent pathogène ne peuvent pénétrer dans les tubercules qu'à la faveur de blessures récentes ou incomplètement cicatrisées : des inoculations artificielles effectuées un certain temps après les blessures échouent totalement lorsque ce délai atteint 7 jours, les tubercules étant conservés à 15°C. En outre, PATERSON et GRAY (1972) ont trouvé qu'à cette même température un intervalle de 24 heures entre la blessure et l'inoculation inhibait en partie le développement du champignon bien que la première couche du périoderme de blessure ne soit pas encore formée et suggère l'action possible de substances inhibitrices dans les tissus de la pomme de terre.

B - FACTEURS INTERVENANT SUR LE TAUX DE BLESSURE DES TUBERCULES

1) Les fumures.

Peu d'études ont été faites sur les relations entre les fumures et la gangrène, il s'agit généralement de remarques empiriques ; ainsi dès 1952, FOISTER s'était aperçu que la gangrène était particulièrement grave dans les récoltes provenant de sols acides ou carencés. Les fumures déséquilibrées semblent augmenter l'incidence de la gangrène en prédisposant les tubercules aux blessures ; c'est le cas des excès d'azote qui

accroissent la vulnérabilité des tubercules , comme le mentionnent JOUAN et coll.(1974).

Selon les expériences de PATERSON et GRAY (1972), les tubercules blessés qui n'ont reçu que de faibles apports en azote, phosphore et potassium montrent moins de résistance à l'extension de *Phoma exigua* var. *foveata* que les tubercules cultivés dans de bonnes conditions, bien que l'épaisseur du périderme de blessure soit identique dans les deux cas . Dans ces expériences, de faibles apports signifient non pas des fumures déséquilibrées mais insuffisantes d'un point de vue quantitatif .

2) La nature et l'état du sol

L'enquête menée en 1973, par STATHAM (1975) en Grande Bretagne, a révélé qu'un pourcentage élevé des blessures survenant à la récolte, soit 31 %, tenait à la nature et l'état du sol, et que les dommages subis par les tubercules étaient d'autant plus importants que les sols étaient plus légers ou plus caillouteux. D'autre part, LOGAN (1974) voit également dans la sécheresse du sol à l'arrachage une source de blessure, la couche de terre protectrice entourant les tubercules n'étant plus suffisante.

3) La mécanisation

Nombreux sont les auteurs (dont GRAY et MALCOMSON, 1966; MALCOMSON et GRAY, 1968c) qui considèrent que les progrès de la mécanisation dans les opérations d'arrachage, de conditionnement et de transport , ont eu pour conséquence l'augmentation du nombre de tubercules blessés, multipliant ainsi les risques de gangrène par pénétration de l'inoculum présent sur le tubercule.

PROCTOR (1970) et STATHAM (1975) estiment que l'extension de la gangrène est d'autant plus liée à cette évolution technique que ces manipulations s'effectuent généralement dans des conditions défavorables à la cicatrisation des tubercules.

4) L'âge physiologique

L'importance de ce facteur, entrevue dès 1958(b) par MALCOMSON a été beaucoup plus tard confirmée par HIRST et GRIFFITH en 1975 et GRIFFITH et HIDE en 1976 : l'aptitude des tubercules à donner des nécroses dépend de leur âge physiologique et augmente au cours de la conservation .

Les tubercules semblent offrir au début de l'été un terrain moins propice au développement du parasite qu'à la fin de la conservation; LANGTON (1971) interprète cette évolution comme le résultat d'une diminution des réactions de cicatrisation et de défense .

5) La température

La gangrène est associée aux basses températures. Dans ces conditions, les réactions de cicatrisation des tubercules blessés, à la fois la subérisation et la formation du périderme de blessure sont lentes ainsi que le mettent en évidence les études anciennes d'ARTSCHWAGER (1927) et celle plus récentes de WIGGINTON (1974) et de WALKER et WADE (1976). A 5°C, 5 à 8 jours sont nécessaires pour obtenir la subérisation des surfaces blessées et 9 jours à 2°C. La formation du périderme de blessure n'est toujours pas induite après 10 jours à 5°C et 35 jours à 2°C.

Par conséquent, les basses températures favorisent la pénétration du *Phoma* dans les tubercules endommagés. WALKER et WADE (1976) ont d'ailleurs montré que les possibilités de pénétration par les blessures diminuaient peu après 35 jours de conservation des tubercules à 2°C. Par contre, l'incidence de la gangrène diminue à mesure que la température s'élève. A 18°C, les surfaces blessées sont subérisées dans les 48 heures et 2 jours plus tard, le périderme de blessure est initié, parallèlement la sensibilité des blessures diminue.

Les tubercules subissent en conservation une évolution physiologique irréversible d'autant plus rapide que la température est élevée. Parvenus à un stade avancé de cette évolution, ils donnent des plantes de levée irrégulière et de rendement faible, la capacité de croissance des germes étant fortement amoindrie (MONTIGNY, 1973).

Pour préserver la vitalité des plants de pomme de terre, il est indispensable de les stocker à des températures comprises entre 2°C et 4°C afin de freiner leur évolution physiologique. La conservation de la pomme de terre de consommation nécessite également un refroidissement des tubercules tout en répondant à d'autres impératifs : les tubercules destinés à la consommation à l'état frais doivent être maintenus turgescents tout en conservant leurs propriétés organoleptiques ; destinés à la transformation industrielle, ils doivent en plus être maintenus à une

température suffisamment élevée pour éviter l'accumulation de sucres réducteurs. Pour ces raisons, ils sont amenés à des températures comprises entre 8°C et 10°C (MONTIGNY, 1973).

Après la récolte, et avant tout refroidissement, il est nécessaire de permettre la cicatrisation des tubercules blessés au cours de l'arrachage. Ainsi, BAK HENRIKSEN (1975), ADAMS et GRIFFITH (1978) ont montré qu'on pouvait obtenir une réduction considérable du développement de la gangrène avec un préstockage d'environ deux semaines à une température comprise entre 15°C et 20°C et une humidité relative de 90 %, les tubercules humides étant séchés au préalable. ADAMS et GRIFFITH précisent que le maintien à 15°C ou 20°C doit être d'autant plus long que les arrachages sont plus tardifs. Les récoltes précoces, effectuées peu de temps après le défanage, ont des taux de gangrène inférieurs à ceux des récoltes tardives, non seulement parce que l'inoculum apporté par les fanes est réduit, mais surtout parce que les tubercules ont bénéficié de températures ambiantes plus douces et donc plus favorables à leur cicatrisation.

Dans la même optique, il est nécessaire de réchauffer les tubercules avant toute manipulation au cours de la conservation, les tubercules froids étant très sensibles aux chocs, et de les laisser ensuite se cicatriser avant de les replacer en chambre froide (PROCTOR, 1970 ; MONTIGNY, 1973 ; LOGAN, 1974). Cette dernière mesure permet d'atténuer les conséquences des endommagements au cours du conditionnement.

IV. LE ROLE DU PLANT DANS L'EPIDEMIOLOGIE

Les travaux que nous venons d'analyser ont montré les risques de contamination des tubercules, à partir de diverses sources d'inoculum. Mais très vite, le rôle que jouait le plant dans le devenir de la maladie, s'est avéré important. La visualisation de l'infection après apparition des nécroses a conduit tout naturellement à éliminer le plant malade. Plus grave est le risque constitué par des tubercules contaminés ne présentant pas de symptômes au moment de la plantation. Si on se réfère aux nombreux travaux des Britanniques que nous avons déjà mentionnés, à partir de ces tubercules malades mais apparemment sains, les jeunes tiges pourront être contaminées. Celles-ci après défanage porteront des pycnides, d'où une augmentation de l'inoculum. Pour LOGAN (1974), ces mêmes tubercules apparemment sains à la plantation, pourront ensuite se nécroser et accroître le potentiel infectieux du sol.

C'est pourquoi, ces dernières années, les efforts des chercheurs se sont orientés vers la détection de la contamination sans symptômes des tubercules destinés au plant. Ce dépistage systématique a été pratiqué dès 1972 en Hollande (Rapport non publié d'une mission d'étude de la F.N.P.P.T. en 1973), puis en France à partir de 1975 et en Belgique (VAN LUCHENE, 1976) et a permis d'éliminer du marché de nombreux lots atteints. Il est réalisé très aisément après blessure des tubercules qui, maintenus à 4°C, développent des nécroses dans un laps de temps compris entre 8 et 10 semaines. Un isolement peut être pratiqué à partir des pourritures obtenues pour en identifier l'agent pathogène.

La détection de *Phoma exigua* var. *foveata* s'est également orientée vers une détermination plus rapide de la contamination sans donner beaucoup de résultats. Ni le taux d'infection des tiges, ni le taux d'inoculum présent dans le sol adhérent aux tubercules ne permettent une bonne appréciation du potentiel infectieux. Selon FOX et DASHWOOD (1975a), la mise en culture de fragments de périderme en donnerait une plus juste indi-

cation. En effet, ces auteurs estiment que l'inoculum présent dans le sol adhérent aux tubercules doit pénétrer dans le périoderme au cours de la conservation. Ils se basent pour cela sur des résultats obtenus en conditions artificielles par TODD et ADAM (1967). Ces derniers ont démontré la présence du champignon dans le périoderme de tubercules contaminés 3 semaines plus tôt par trempage dans une suspension de cultures de *Phoma exigua* var. *foveata* et maintenus en atmosphère humide ; la contamination réalisée dans ces conditions résiste à une désinfection de surface. Sachant que l'humidité favorise la pénétration de l'agent pathogène par les lenticelles et qu'en outre ce mode de contamination est peu fréquent, il nous semble difficile à partir de ces résultats obtenus dans des conditions très particulières de tirer des conclusions pour un inoculum externe en conditions naturelles.

Enfin devant un plant susceptible d'être vecteur de la maladie il était normal d'essayer de combattre l'agent pathogène par traitements chimiques.

Peu de fongicides se sont révélés efficaces pour lutter contre la gangrène de la pomme de terre. Seules les formulations à base de thiabendazole ont donné des résultats satisfaisants (HIDE, HIRST et GRIFFITH, 1969 ; COPELAND et LOGAN, 1975), à condition d'être appliquées dès l'arrachage que ce soit par trempage ou pulvérisation à bas volume (LOGAN, COPELAND et LITTLE, 1975 ; CROSNIER, BEJEL et LARNICOL, 1978). L'inactivité des traitements ultérieurs est interprétée comme la conséquence de la pénétration du parasite dans le périoderme. Il faut remarquer, cependant, qu'un pourcentage très élevé de tubercules est blessé au cours des diverses opérations d'arrachage, transport et conditionnement ; on peut donc se poser la question suivante : l'efficacité du thiabendazole, s'il est appliqué immédiatement après la récolte, n'est-elle pas liée au fait que le traitement s'effectue souvent sur des tubercules blessés, amenant un contrôle effectif de la contamination, en permettant une meilleure pénétration de fongicide ?

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

Dans l'infection de la pomme de terre par *Phoma exigua* var. *foveata*, deux choses sont à considérer : la contamination et sa manifestation sous forme de nécrose. Lorsque celle-ci s'est déclarée, seule l'élimination des lots nécrosés est à prescrire. Par contre, lorsqu'il y a contamination sans signes extérieurs, le problème est autrement grave. Cette gravité n'a été pleinement perçue qu'au moment où les progrès techniques réalisés dans les domaines de la mécanisation et de la conservation ont entraîné une augmentation du nombre de tubercules nécrosés. Ainsi que le soulignent FOX et DASHWOOD (1975b) les problèmes causés par la gangrène ont été créés par l'homme. Sans l'action conjuguée de la mécanisation qui augmente le taux de tubercules blessés et de la conservation à basse température qui empêche leur cicatrisation, la gangrène serait vraisemblablement demeurée une des maladies mineures de la pomme de terre. L'importance du nombre de nécrosés après blessure est apparue comme une preuve de la contamination purement externe des tubercules par l'inoculum présent dans le sol, provenant soit du sol lui-même, soit du plant, soit des fanes. Ces constatations ont masqué l'éventualité d'une contamination systémique des tubercules à partir de l'infection sans symptômes des tiges. C'est pourquoi il nous a paru utile au terme de cette revue bibliographique d'envisager un travail de mise en évidence de la systémie de *Phoma exigua* var. *foveata* et de ses conséquences, tout au long du cycle végétatif de la pomme de terre. Ce premier objectif a constitué l'essentiel de notre travail en champ.

Ensuite, en laboratoire, nous avons envisagé l'un des facteurs susceptibles d'être à l'origine du processus nécrotique du tubercule au cours de la conservation.

DEUXIEME PARTIE : ESSAIS EN CHAMP

Ainsi que nous venons de l'exposer, l'analyse des données bibliographiques sur la contamination des tubercules nous a amenée à nous interroger sur le rôle de la systémie dans l'épidémiologie. Afin d'étudier les possibilités de contamination systémique des tubercules, nous avons principalement travaillé à partir d'inoculations artificielles sur des essais de type agronomique, mis en place par la S.I.C.A. plants du Cap Gris-Nez sur le littoral de la mer du Nord. Ce type d'essai présentait à la fois des avantages parce qu'il nous permettait de rester dans des conditions proches de la réalité et des inconvénients parce qu'il faisait intervenir de nombreux paramètres incontrôlables. Tout particulièrement, il nous rendait tributaire des conditions climatiques, ce qui dans le cas présent a été lourd de conséquences. L'expérimentation en champ était cependant la seule possibilité de suivre l'évolution de la maladie tout au long d'un cycle végétatif ; les cultures en serre, que nous avons utilisées de façon ponctuelle, ne permettaient pas d'obtenir des plantes qui aient une croissance et une descendance comparables à celles des plantes cultivées en conditions naturelles.

Nos essais en champ et en laboratoire se sont poursuivis sur quatre campagnes :

La première année, 1973, nous a servi à mettre au point une méthode de contamination artificielle des plantes feuillées et à suivre

le devenir du champignon dans ces plantes, ainsi que l'évolution naturelle de la maladie dans les tubercules fils.

Des résultats positifs nous ont incitée à répéter ces essais en 1974 et 1975, en introduisant la première année des traitements fongicides en cours de végétation et en comparant différents modes de contamination la seconde année.

Au cours de la dernière campagne, 1976, étant acquis que l'agent pathogène, déposé à l'apex des plantes feuillées, pouvait être transmis à la descendance, nous avons essayé de dégager l'influence de certains facteurs culturaux sur ce mode de transmission et sur l'incidence de la gangrène au cours de la conservation.

I. MATERIEL ET METHODES

Sous ce titre, sont regroupées à la fois les techniques culturales appliquées aux champs d'essai, la méthode d'inoculation artificielle et les tests de détection de *Phoma exigua* var. *foveata*. Il s'agit des modalités générales, par la suite ne seront mentionnées que les caractéristiques propres à chaque essai.

A - LES TECHNIQUES CULTURALES

A l'exception des essais préliminaires de 1973, les champs d'essais ont été menés, d'une façon générale, comme des cultures de plant.

1) Le choix du plant

Tous les essais ont été réalisés avec du plant hollandais, de variété Bintje, classe Elite, calibre 35/45 mm, les tubercules étant susceptibles d'être contaminés sans symptômes. Les plants ont été prélevés dans des lots exempts de toute pourriture à la fin de la conservation et n'ayant donné lieu à aucun litige. Les deux dernières années d'essai, nous avons cependant déterminé le taux de contamination de ces tubercules apparemment sains avant plantation.

2) Les façons culturales

Les fumures ont été la plupart du temps apportées au moment de la plantation. Etant données les faibles dimensions des parcelles, la plantation et l'arrachage ont dû être effectués à la main, ce qui nous garantissait un taux minimum de tubercules blessés.

A l'exception des premiers essais, qui n'ont subi aucun traitement, les cultures ont été défanées chimiquement 3 mois environ après la plantation.

3) La conservation

En 1973, après la récolte, les tubercules ont été triés et calibrés pour ne garder que le calibre 35/45; ils ont ensuite été conservés en sacs à la température ambiante des bâtiments de la S.I.C.A. comme l'ensemble de leur production .

Les autres années, en raison de la mauvaise conservation de l'essai précédent, les tubercules ont été placés en clayettes, sans triage, sauf en 1976 où le volume des essais nous imposait de ne conserver que les tubercules nécessaires aux tests de détection de *Phoma exigua* var. *foveata*. En outre, la S.I.C.A. disposant alors d'entrepôts frigorifiques, ils ont pu être conservés à 4°C à partir du mois d'octobre ou de novembre comme l'ensemble du plant transitant par la coopérative.

B - LA CONTAMINATION ARTIFICIELLE

1) Préparation de l'inoculum

Le champignon avait été isolé par micromanipulation de pycniospores formées sur des cultures de fragments de tubercules nécrosés. Ensuite, nous l'avons cultivé en tubes de 25/200 mm, sur milieu gélosé (20 g/l) à base d'eau de pomme de terre (50 g/l) glucosée (10 g/l). Les cultures étaient maintenues à 18°C, sous une alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Aucune des souches utilisées ne produisait l'antibiotique "E", dont font mention LOGAN et KHAN (1969).

En ajoutant 20 ml d'eau distillée à des cultures âgées de 3 à 4 semaines, on obtenait une suspension de spores à 10^4 spores/ml.

2) Réalisation des inoculations en champ

La suspension de spores était déposée à l'apex des plantes à contaminer à raison de 0,1 ml à 0,5 ml selon leur stade de développement.

Les deux premières années, les plantes ont été inoculées soit à la levée, soit à la tubérisation, soit à ces deux stades. Par la suite, les résultats obtenus n'étant pas différents selon le stade de développement des plantes au moment de l'inoculation, les contaminations n'ont plus été réalisées qu'au stade de la levée.

Pour assurer la réussite des contaminations, il est indispensable de maintenir une hygrométrie très élevée au niveau des plantes inoculées pendant un certain temps : les plantes sont arrosées juste avant le dépôt de la suspension de spores et la parcelle est recouverte pendant 24 heures d'un film plastique. L'enregistrement de l'hygrométrie et de la température montre qu'une augmentation même très importante de cette dernière n'a pas de répercussion sur la réussite des contaminations si l'hygrométrie est maximale.

C - TESTS DE DETECTION DE *PHOMA EXIGUA* VAR. *FOVEATA*

Dans ces essais, nous avons détecté la maladie sous ses différentes formes, dans les plantes feuillées et dans les tubercules.

1) Etude de la contamination des plantes feuillées

a) par la méthode des rétrocultures

Cette méthode permet d'une part de déceler le champignon parasitant les tiges sans symptômes, notamment lorsqu'elles sont issues de tubercules contaminés, d'autre part de mettre en évidence la pénétration et la migration de *Phoma exigua* var. *foveata* dans les différentes parties des plantes après inoculation artificielle.

Les rétrocultures sont préparées de la façon suivante : les plantes sont débarrassées de leurs racines et de leurs feuilles en prenant soin de ne pas arracher l'épiderme des tiges ; elles sont ensuite lavées et séchées avant d'être désinfectées. Dans le cas présent, la désinfection à l'hypochlorite de calcium à 4 %, pendant 30 minutes, précédée

d'un trempage des tiges et des stolons dans l'éthanol à 96°, durant 30 à 60 secondes, donne de très bons résultats. Les organes désinfectés sont rincés dans 3 bains successifs d'eau distillée stérile et placés entre deux feuilles de papier filtre, préalablement autoclavé.

Ensuite, les tiges et les stolons sont découpés en fragments de 7 à 8 mm de long et disposés dans des boîtes de Pétri, contenant un milieu nutritif à pH = 4,5. Ce milieu est à base d'extrait de malt Difco (20 g/l), gélosé à 2 % ; le pH = 4,5 limitant les proliférations bactériennes, permet d'éviter l'addition d'antibiotique dans le milieu. Les rétrocultures préparées sont maintenues à 18°C sous une alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les résultats sont généralement obtenus dans les 8 jours, au plus tard dans les 15 jours qui suivent les rétrocultures.

b) par l'observation des fanes

L'examen des fanes après la mort du feuillage, naturelle ou artificielle, permet de suivre l'extériorisation de la contamination et d'évaluer le taux d'inoculum présent sur les tiges et susceptible de contaminer les nouveaux tubercules.

Avant d'être examinées sous la loupe binoculaire, les fanes sont lavées, ce qui, en éliminant la terre, facilite l'observation et réhydrate les tissus. Les pycnides repérées sont écrasées dans un peu d'eau distillée et regardées au microscope avant d'êtreensemencées sur un milieu gélosé (2 %) à base d'extrait de malt Difco (2 %) et pH = 4,5. En quelques jours, les pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata* donnent des colonies zonées, de croissance régulière, pigmentées en jaune et réagissant en rouge après addition de soude normale.

2) Etude de la contamination des tubercules

Pour mettre en évidence la contamination des tubercules produits par les plantes feuillées inoculées artificiellement, nous avons utilisé plusieurs méthodes correspondant aux différents aspects de la maladie.

a) rétroculture de tiges de préculture

Sachant que la contamination des tubercules mères se transmet aux plantes feuillées, nous avons, par la méthode des rétrocultures

précédemment décrite, suivi l'évolution du parasite dans les tiges issues des tubercules récoltés dans nos essais.

Le test a été effectué sur des plantes de préculture qui ne peuvent être obtenues qu'après levée de dormance des tubercules.

En effet, au moment de la récolte, les tubercules sont dans un état de dormance dont la durée dépend de leur degré d'incubation et des conditions de conservation. Le stockage à basse température, entre 2°C et 4°C, notamment permet de maintenir jusqu'en mars-avril cet état de dormance, qui normalement s'achèverait en janvier ou février. La dormance peut être levée artificiellement par traitement à la gibbérelline ou avec des activants de germination, comme la Rindite. C'est ce qui est réalisé entre juillet et octobre pour les précultures obligatoires pour détecter les taux de viroses de la production destinée au plant. Nous avons procédé de la même façon pour obtenir des cultures en serre entre août et février.

Les tubercules dormants sont traités par l'activant de germination 4025 de Rhône-Poulenc, plus connu sous le nom de Rindite, qui neutralise les substances maintenant à l'état de repos les bourgeons des tubercules.

Au moment de subir l'action de la Rindite, les tubercules doivent être à une température voisine de 23°C, température à laquelle doit s'effectuer le traitement qui dure 48 heures. Ils sont ensuite aérés et placés une dizaine de jours dans une atmosphère obscure, chaude et humide. Lorsque les germes commencent à se former, les tubercules sont oeilletonnés de façon à ne prélever que les germes de la région apicale et les oeilletons après 24 heures de séchage sont plantés dans du terreau en serre. L'oeilletonnage permet d'obtenir une levée plus rapide et plus régulière que la plantation de tubercules entiers. La levée est obtenue 3 à 4 semaines après la mise en terre. Les jeunes plantes peuvent être étudiées par la méthode des rétrocultures 10 à 12 jours plus tard.

b) rétroculture de tubercules

Pour déterminer le taux de contamination interne de nos essais, nous avons adapté le test rétroculture déjà décrit aux tubercules. Les tubercules sont lavés et séchés avant d'être trempés dans l'éthanol à 96° et désinfectés 20 mn dans l'hypochlorite de calcium à 4,5 % ; ils sont ensuite longuement rincés à l'eau courante puis séchés. Ces tubercules sont

alors plongés dans l'alcool et flambés avant le prélèvement de fragments de 5 à 7 mm de côté et de 2 mm d'épaisseur au point d'insertion du stolon et à l'apex ; ces fragments sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif gélosé à base d'extrait de malt Difco et pH = 4,5. Au bout de 4 à 10 jours à 18°C, les champignons s'extériorisent et *Phoma exigua* var. *foveata* se reconnaît aisément à l'aspect de ses colonies et de sa pigmentation jaune.

Ainsi réalisée la désinfection permet d'éliminer la contamination externe de la surface du tubercule, due notamment à la dispersion de l'inoculum présent sur les tiges après le défanage. Son efficacité a été vérifiée sur des tubercules témoins trempés dans une suspension de spores et de mycélium de *Phoma exigua* var. *foveata* puis séchés. Ces tubercules donnent après désinfection des rétrocultures négatives. Les prélèvements au niveau de l'apex et du point d'insertion du stolon permettent de standardiser les conditions de réalisation du test, mais le champignon peut également être présent en d'autres points du tubercule.

c) test blessure

Ce test permet d'évaluer le potentiel infectieux des tubercules en permettant l'extériorisation sous forme de nécrose de la contamination présente sur les tubercules et dans les tubercules. Mis au point par LOGAN en 1967, il consiste à blesser les tubercules et à les maintenir à basse température afin de favoriser le développement de la gangrène. Dans nos essais, sur chaque tubercule étaient pratiquées 3 blessures identiques de 10 mm de profondeur, et l'extériorisation de la maladie était notée après 120 jours d'incubation à 4°C. Le repiquage des tissus nécrosés sur milieu gélosé (2 %) à base d'extrait de malt (2 %) et à pH = 4,5, après notation permettait d'en identifier la cause ; en effet, un pourcentage non négligeable de nécroses doit être rapporté aux *Fusarium* et non aux *Phoma* responsables de la gangrène.

Lors des essais préliminaires de 1973, nous n'avions suivi que l'évolution du taux de nécroses apparaissant spontanément au cours de la conservation, mais l'origine en était vérifiée par repiquage de tissus malades comme pour le test blessure.



Tableau 1 : Caractéristiques des champs d'essai mis en place en 1973.

Propriétaire	I	II	III
Nature du terrain	Argile	Sable	Sable et Argile
Assolement	72/73 friche 71/72 avoine 70/71 orge	blé pomme de terre maïs	pomme de terre blé pomme de terre
Particularité	n'a jamais porté de pomme de terre	rien à mentionner	parcelle ayant produit en 1972 une récolte for- tement contaminée par <i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>
Fumure organique/hectare	400 kg(NPK: 4/8/10) (Avril 1973)	400 kg (NPK:4/3/2) + paille enfouie (Octobre 1972)	50 t fumier (Mars 1973)
Fumure minérale/hectare	1500 kg (NPK:8/12/18) 600 kg(NPK:0/25/25) (16 Avril 1973)	1200 kg (NPK:10/20/20) 600 kg (NPK:0/25/25) (16 Avril 1973)	500 kg (NPK:15/13/22) (en Mars avant labour) 700 kg (NPK:7/15/30) (Avril 1973)

II. RESULTATS OBTENUS EN CHAMP ET EN LABORATOIRE AU COURS DE LA CAMPAGNE 1973

A - ESSAIS EN CHAMP : IMPLANTATION ET REALISATION

1) Dispositif

Trois champs expérimentaux, appartenant à la S.I.C.A., ou à ses adhérents, ont été mis à notre disposition ; la nature du terrain, les antécédents culturaux, ainsi que les apports minéraux et organiques sont rassemblés dans le tableau 1.

Chaque champ comprenait 6 parcelles de 200 pieds, 3 parcelles contaminées artificiellement alternant avec 3 parcelles témoins. Chaque parcelle élémentaire se composait de 20 rangs distants de 70 cm, comportant 10 pieds plantés à intervalles de 35 cm. Des allées de 1,50 m de large séparaient les parcelles les unes des autres et 3 rangs de pomme de terre de la variété Vivacks entouraient l'ensemble afin d'éviter les effets de bordure.

2) Calendrier

Hormis les contaminations artificielles, les essais n'ont subi aucun traitement entre la plantation, les 18 et 19 avril, et l'arrachage le 23 septembre. En particulier, ils n'ont pas été défanés artificiellement et la végétation a suivi son cours normal.

Les contaminations artificielles ont été effectuées soit à la levée, le 23 mai, soit à la tubérisation, le 19 juin, soit à ces deux stades les 23 mai et 19 juin.

3) Prélèvements et contrôles

a) *au niveau des plantes feuillées*

Pendant la végétation active, au mois d'août, un certain nombre de plantes provenant des parcelles contaminées et témoins ont été étudiées par la méthode des rétrocultures.

Etant données la taille des plantes et les difficultés de désinfection qui en découlaient, peu de rétrocultures ont pu être effectuées, soit 15 plantes contaminées et 6 plantes témoins.

Au début du mois de septembre, après le mûrissement et le dessèchement de leurs parties aériennes, 8 pieds par parcelle contaminée et 8 pieds témoins ont été prélevés sur les champs II et III.

b) au niveau de la descendance

Au cours de la conservation, nous avons suivi l'évolution naturelle de la maladie par le taux de nécroses apparaissant spontanément dans la descendance des plantes issues des parcelles contaminées et témoins.

Pour cela, 100 tubercules environ ont été prélevés dans la récolte issue de chacune des parcelles contaminées et de l'ensemble des parcelles témoins, à 4 reprises au cours de la conservation en novembre, décembre, janvier et février.

B - RESULTATS DES PRELEVEMENTS

1) Etude des tiges

Les rétrocultures des plantes contaminées, en cours de développement, indiquent que le champignon est présent à la base des tiges dans 60 % des plantes. Dans le cas présent, nous n'avons pu le mettre en évidence ni dans les stolons ni dans les racines pas plus que dans les plantes témoins.

L'observation des fanes et les isolements de pycnides confirment les résultats des rétrocultures et la réussite des contaminations artificielles : la plupart des plantes inoculées portent des pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata* alors que les plantes témoins n'en portent que rarement (tableau 2).

Remarque : les plantes témoins provenant du champ III n'apparaissent pas contaminées bien que cultivées sur un sol ayant produit une récolte fortement contaminée la saison précédente.

Tableau 3 : Taux de tubercules spontanément nécrosés au cours de la conservation des essais 1973, exprimé en pourcentage.

- dans la descendance des essais témoins

Prélèvement	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
I	-	2,5	3	12,7
II	3	8,4	6,4	18
III	3	7	4,5	5

- dans la descendance des essais contaminés

Prélèvement	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	
I	1	-	6,6	9,3	7,4
	2	-	5,6	14	29
	3	-	12	14,5	25,6
	M	-	8	12,6	20,6
II	1	19	36	36	37,7
	2	26,6	30	31	29
	3	8	16	17	15
	M	17,8	27,3	28	27,2
III	1	9	5,6	15	18,7
	2	12	8	12	16
	3	1	5	5,5	13,4
	M	7,3	6,2	10,8	16,0

LEGENDE DES TABLEAUX 3 et 4 :

- I : champ n'ayant jamais porté de pomme de terre
- II : champ ayant porté des pommes de terre 2 ans auparavant
- III : champ ayant porté une récolte contaminée l'année précédente.

- 1 : contamination à la levée
- 2 : contamination à la levée et à la tubérisation
- 3 : contamination à la tubérisation.

dates des prélèvements : P₁ : novembre 1973 - P₂ : décembre 1973 -
P₃ : janvier 1974 - P₄ : février 1974.



Tableau 2 : Nombre de plantes portant des pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata* au moment de la récolte dans les essais de 1973.

Contamination	à la levée	à la levée et à la tu- bérisation	à la tubé- risation	Témoin
II	6	7	7	1
III*	6	8	8	0

les essais n'ont pas été défanés artificiellement
8 pieds ont été prélevés pour chaque condition

*parcelle ayant porté en 1972 une récolte fortement contaminée.

2) Notations de tubercules nécrosés

De nombreux tubercules se sont nécrosés au cours de la conservation dans l'ensemble des essais mais la mise en culture des tissus malades a montré que les cas de fusariose étaient fréquents (tableaux 3 et 4).

Dans la descendance des parcelles témoins, le taux de nécroses dues à *Phoma exigua* var. *foveata* est demeuré faible soit 1,3 à 4 % pour le dernier prélèvement effectué en février, alors qu'il atteignait 10 à 18 % dans la descendance des essais contaminés. Ce dernier taux est important si on considère le caractère spontané de cette évolution (tableau 4). Nous avons, en plus, constaté que le nombre de tubercules atteints de gangrène tendait à augmenter au cours de la conservation.

C - ETUDE DES CONTAMINATIONS ARTIFICIELLES EN SERRE

1) Réalisation

Les inoculations artificielles s'effectuent de la même façon en serre qu'en champ, les plantes étant obtenues par préculture après levée de dormance des tubercules. Une goutte de suspension de spores est déposée à la pipette Pasteur à l'apex, condition essentielle en serre comme en champ, l'hygrométrie doit être maintenue à saturation pendant 24 heures, sinon les inoculations échouent.

Tableau 4 : Taux de tubercules spontanément atteints de gangrène au cours de la conservation des essais 1973 : (exprimés en pourcentages)

- dans la descendance des essais témoins

Prélèvement	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
I	-	2,8	0	4
II	3	2	1	3
III	2	2,5	1,7	1,3

- dans la descendance des essais contaminés

Prélèvement	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	
I	1	-	3	6,5	6
	2	-	5,6	11	22
	3	-	8	10	12
	M	-	5,5	9,1	13,1
II	1	7,5	8	17	26
	2	8,5	13	21	16
	3	1	8,3	8,5	12
	M	5,6	9,6	15,5	18
III	1	8	3,3	11,5	12
	2	8,6	4,4	10	9,3
	3	1	5	3,3	8
	M	5,8	4,2	8,3	9,7

même légende que le tableau 3



La pénétration et la progression du champignon dans les plantes ont été détectées par rétroculture des tiges et des stolons quand ils étaient formés . Ce test a été effectué sur 5 plantes comptant en moyenne 2 tiges , toutes les 24 heures jusqu'au 12ème jour après l'inoculation.

2) Résultats

Dans les plantes témoins non inoculées, nous n'avons jamais mis en évidence la présence de *Phoma exigua* var. *foveata* .

Par contre, dans les plantes contaminées, la pénétration du champignon est très rapide : 24 heures après le dépôt des spores aux apex , il est présent dans toutes les tiges testées mais seulement dans quelques fragments ; 3 à 6 jours après l'inoculation , il se trouve dans presque toute la tige , ensuite le nombre de fragments portant le parasite diminue et 11 jours après le dépôt de l'inoculum, il n'apparaît plus qu'à la base de la tige. Le champignon est également présent dans la plupart des stolons que nous avons testés entre le 8ème et le 11 ème jour après l'inoculation.

D - INTERPRETATION. CONCLUSION

Ainsi que le montrent les résultats des rétrocultures et des observations de tiges mortes, la contamination artificielle des plantes de pomme de terre par voie foliaire se fait très aisément, indépendamment de leur stade de développement, pourvu que soit maintenue une humidité suffisante au niveau des plantes inoculées. Le champignon est détecté dans les tiges moins de 24 heures après le dépôt des spores aux apex et migre dans les stolons où nous le retrouvons dès leur formation ; ensuite, il se maintient à l'état latent à la base des tiges mais ne semble pas demeurer dans les stolons puisque nous ne le retrouvons pas dans ceux des plantes adultes contaminées 5 à 8 semaines plus tôt. Il semble donc qu'il puisse y avoir une contamination systémique des tubercules à partir des tiges via les stolons.

Différents auteurs avaient déjà cherché à contaminer artificiellement les plantes feuillées de pomme de terre, les derniers en date étant WILSON et FOX (1975). La plupart des essais, notamment ceux de TODD et ADAM (1967), avaient été faits sur des tiges endommagées, la blessure induisant une réaction de l'hôte empêchant l'extension du parasite, l'inoculation dans ces conditions n'aboutit qu'à une infection limitée à la zone blessée. Quant aux essais de contamination de plantes intactes, ils n'avaient donné que des résultats négatifs, amenant les auteurs à conclure que le champignon devait être incapable de pénétrer dans les plantes. Il est probable que leurs échecs soient dus au fait que l'humidité n'ait pas été suffisante pendant les 24 heures qui suivaient le dépôt de l'inoculum.

Nous n'avons pas essayé de détecter la contamination systémique des tubercules fils cependant nous avons constaté que le taux de nécrose des essais inoculés était très supérieur à celui des essais témoins. Ceci indique que la contamination des plantes feuillées se transmet aux tubercules fils. Cependant, dans le cas présent, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une contamination par les pycnides apparues sur les tiges avant l'arrachage, le mois de septembre 1973 ayant été très pluvieux .

III. RESULTATS DES CAMPAGNES 1974 ET 1975

Cette seconde partie regroupe les résultats obtenus après deux années d'expérimentation en champ et en laboratoire bien que leurs objectifs initiaux aient été différents. La raison en est la suivante : ces cultures conduites de façon identique et contaminées selon le même protocole, ont donné à un an d'intervalle la première une récolte fortement contaminée, la seconde une récolte peu contaminée pour des conditions de conservation analogues. Les seules différences marquantes se situent au niveau des facteurs climatiques.

C'est pourquoi, il est apparu intéressant de les comparer par rapport à la contamination de leur descendance après avoir exposé les résultats de chacune d'elles en fonction de leurs objectifs propres.

IIIA. CAMPAGNE 1974

A - ESSAIS EN CHAMP : IMPLANTATION ET REALISATION

1) Implantation et dispositif

L'objectif de l'essai était de suivre le devenir des contaminations artificielles chez des plantes traitées par des fongicides considérés comme systémiques, à la fois dans les tiges et dans la descendance.

Trois composés ont été testés :

1. le prévicure, fabriqué par la société Schering ;
2. le benlate dont la matière active est le bénomyl et qui est produit par la firme Quinoléine ;
3. le tébuzate dont la matière active est le thiabendazole et qui est commercialisé par la société Prochim.

Ces fongicides ont été appliqués soit uniquement par trempage des tubercules avant la plantation, soit à la fois par trempage et par pulvérisation foliaire au stade de la levée ou de la tubérisation (tableau 5).

Tableau 6 : Comparaison des caractéristiques et des calendriers des champs d'essai de 1974 et 1975.

	Campagne 1974	Campagne 1975
nature du sol		limon argilo-sableux (argile : 192 pour 1000)
antécédents culturaux	1971 : avoine 1972 : colza 1973 : orge	1973 : colza 1974 : blé
fumure	minérale NPK : 122/119/376	organominérale (NPK:130/80/160) minérale (NPK:130/80/160)
plantation	23 avril	9 mai
contaminations artificielles	à la levée : 31 mai à la tubérisation : 19 juin	à la levée : - 10 juin (racinaire) - 17 juin (foliaire)
défanage	chimique : chlorate de soude : 6 août colorants nitrés : 13 août	chimique : colorants nitrés les 4 août et 9 août
arrachage	à la main : 16 septembre	à la main : 25, 26, 27 août
conditionnement	clayettes	clayettes
début de la conservation à 4°C	20 novembre	15 octobre

Tableau 5 : Traitements fongicides testés en 1974 : doses et modes d'application.

Mode d'application	Fongicide		
	Prévicure (Schéring)	Tébuazate (Prochim)	Benlate (Quinoléine)
trempage	dose	700 ml/hl	400 g/hl
	durée	5 mn	15 mn
pulvérisation foliaire		2290 ml/ha	750 g/ha
			400 g/ha

Les inoculations artificielles réalisées selon la méthode mise au point l'année précédente, à la levée, à la tubérisation ou à ces deux stades, suivaient les traitements de 7 à 10 jours.

Aux traitements correspondait un témoin non traité et aux contaminations un témoin non inoculé. Chaque essai comportait donc 16 parcelles de 40 pieds, séparées des voisines par des allées de 1,50 m de large. A l'intérieur des parcelles élémentaires, les pieds étaient disposés comme dans l'essai de 1973. Afin d'éviter les effets de bordure, 4 routes de pommes de terre appartenant à la variété Spartaan encadraient l'ensemble.

Les caractéristiques de l'essai sont rassemblées dans le tableau 6.

2) Calendrier

Les traitements par trempage ont été appliqués le 19 avril et la plantation a eu lieu le 23 avril. Les dates de pulvérisations foliaires sont le 24 mai pour les traitements de levée et le 11 juin pour les traitements de tubérisation. Les plantes ont été inoculées après traitements le 31 mai et le 18 juin.

Tous les essais ont été défanés chimiquement, une première fois au chlorate de soude le 8 août, une seconde fois aux colorants nitrés le 13 août. Les tubercules arrachés le 16 septembre ont été conservés à 4°C à partir du 20 novembre, et entreposés entretemps à la température ambiante des locaux de la S.I.C.A. .

3) Prélèvements et tests effectués sur les plantes feuillées

a) après les contaminations artificielles

La pénétration de *Phoma exigua* var. *foveata* après l'inoculation a été contrôlée par rétroculture de plantes contaminées, 7 à 12 jours après le dépôt de la suspension de spores.

b) en cours de végétation et après défanage

L'extériorisation des pycnides a été observée dans 3 conditions différentes :

- sur pieds entiers prélevés au cours de la végétation le 19 juillet et placés ensuite au pourrissoir afin de favoriser le développement des champignons; au mois de septembre, les pycnides étaient présentes sur les fanes.
- sur des tiges prélevées le 13 août, 5 jours après le premier défanage au chlorate de soude. Ces tiges n'étaient pas sèches mais seulement flétries et les pycnides n'étaient pas formées, mais s'extériorisaient 10 jours après.
- sur des tiges prélevées le 26 août, 13 jours après l'application des colorants nitrés. Au moment de l'échantillonnage, ces fanes étaient complètement sèches, blanchies et ponctuées de pycnides brunes.

Le premier échantillon ne concernait que les essais non traités soit 9 plantes par condition de contamination et 9 plantes témoins.

Les deuxième et troisième prélèvements, composés de tiges appartenant à des plantes différentes, comptaient respectivement 144 et 192 tiges soit 3 et 4 tiges par parcelles élémentaire.

Botrytis cinerea Pers. et *Alternaria solani* Sorauer étaient présents en abondance sur de nombreuses tiges. C'est là une caractéristique d'année humide.

4) Prélèvements et tests effectués sur tubercules

Par les tests de détection de *Phoma exigua* var. *foveata* sur la descendance des plantes inoculées artificiellement, nous avons cherché à déterminer de quelle façon les tubercules pouvaient être contaminés par le parasite présent dans les tiges. Pour cela, nous avons utilisé la méthode des rétrocultures à la fois sur précultures et sur tubercules. Une partie du travail a été faite sur des échantillons prélevés au cours de l'été avant la récolte des essais, l'autre durant l'hiver sur l'ensemble des tubercules mis en conservation.

a) tests sur précultures

Quatre séries de précultures ont été réalisées dans les serres de la S.I.C.A., entre septembre et mars, les 3 premières sur des prélèvements effectués avant la récolte et suivis de traitements de levée de dormance, la dernière à la fin de la conservation sans passage à la Rindite.

α -prélèvements avant la récolte : ces prélèvements avaient pour objet une détermination précoce de la contamination qui puisse être effectuée en même temps et de la même façon que les précultures pour le classement des plants. Des échantillons de tubercules ont été prélevés dès que leur développement a été suffisant, au niveau des parcelles inoculées artificiellement et témoins, qui n'avaient reçu aucun traitement fongicide.

- le 19 juillet et le 13 août, en même temps que les tiges, donc avant l'apparition des pycnides ;
- le 9 septembre, une semaine avant l'arrachage.

Le traitement à la Rindite ne pouvant être appliqué immédiatement sur des tubercules récoltés prématurément, un délai de 30 à 40 jours était nécessaire avant la plantation des oeilletons germés. Les dates de plantation des divers prélèvements ont donc été respectivement le 31 août, le 19 septembre et le 9 octobre. Chaque série comptait 10 témoins sur un minimum de 35 plantes. Le taux de contamination de ces précultures a été évalué par rétroculture des tiges, 10 à 20 jours après la levée.

β -prélèvement en cours de conservation : la dernière série de précultures comptait 120 tubercules au total, représentant les différentes conditions d'inoculation. Ces tubercules n'avaient pas été conservés à 4°C mais placés à 20°C au mois de novembre. La germination était suffisamment avancée au mois de janvier pour que les oeilletons puissent être plantés sans levée de dormance artificielle.

b) les tests sur tubercules

Nous avons évalué la contamination interne de la descendance de nos essais par rétroculture de tubercules après désinfection. Ce test a été réalisé pour l'ensemble des conditions entre novembre et décembre sur 30 tubercules par parcelle élémentaire.

B - ESSAIS EN CHAMP : RESULTATS

1) Vérifications des contaminations artificielles

Réalisées 7 à 12 jours après les inoculations au stade de la levée, les rétrocultures ont révélé des taux de contamination de 35 et 55 %, le parasite restant localisé à la base des tiges. Au moment du second prélèvement, deux plantes commençaient à tubériser, leurs stolons, mis en rétroculture comme les tiges, se sont également révélés porteurs de *Phoma exigua* var. *foveata*.

Le même test, pratiqué 12 jours après les inoculations au stade de la tubérisation, a montré que *Phoma exigua* var. *foveata* parasitait 75 % des plantes et 70 % de leurs stolons (tableau 7).

Les plantes testées provenaient à la fois des essais traités et non traités ; nous n'avons enregistré aucune différence dans la pénétration et la migration du champignon en relation avec l'application des fongicides.

Tableau 7 : Pourcentage de plantes ayant donné des rétrocultures de tiges positives après contamination artificielle.

Date de prélèvement ^(a)	Contamination à la levée (31 mai)	Contamination à la tubérisation (18 juin)
6 juin (7 jours après l'inoculation)	37,5	
11 juin (12 jours après l'inoculation)	57,5 ^(b)	
30 juin (12 jours après l'inoculation)		75 ^(c)

(a) chaque prélèvement comptait 28 plantes.

(b) deux plantes commençaient à tubériser ; testés leurs stolons ont donné des rétrocultures positives.

(c) toutes les plantes possédaient des stolons, 70 % des stolons des plantes contaminées ont donné des rétrocultures positives.

2) Etude des fanes

Examinées au mois d'octobre, toutes les plantes entières et toutes les tiges venant des parcelles contaminées portaient des pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata* indépendamment des traitements fongicides, de la date de prélèvement et des conditions de dessiccation. Un certain nombre de tiges témoins, 20 % environ, s'est également révélé contaminé (tableau 8) mais il faut remarquer que les pourcentages d'infection des tiges se basent uniquement sur le critère présence ou absence des pycnides, sans tenir compte de l'importance réelle de la contamination. En effet, les pycnides exceptionnellement abondantes sur les plantes inoculées qu'elles couvraient en partie, étaient peu nombreuses sur les tiges témoins, se limitant à la base de ces tiges.

Tableau 8 : Taux de plantes et de tiges portant des pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata* pour différentes conditions de prélèvement et de dessèchement des tiges.

	1	2	3
Parcelles contaminées	100 %	100 %	100 %
Parcelles témoins	20 %	30 %	19 %

1 : prélèvement en végétation active

2 : prélèvement après le premier défanage au chlorate de soude

3 : prélèvement après le second défanage aux colorant nitrés.

Remarque : ces valeurs ne tiennent compte que de la présence des pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata* et non de leur abondance.

3) Résultats des précultures avec traitement à la Rindite

La première série de rétroculture n'a porté que sur les tiges des précultures, les deux autres sur les tiges et les oeillets au point d'émergence des tiges. Nous avons constaté qu'un nombre important de plantes issues de la descendance des essais inoculés était contaminé mais que souvent, le champignon demeurait dans l'oeillette sans migrer dans les tiges, d'où les différences enregistrées entre la première série et les deux suivantes (tableau 9).

Tableau 10 : Pourcentage de rétrocultures de tubercules positives en fonction des conditions de contamination.

contamination	levée	levée + tubérisation	tubérisation	témoin
parcelles traitées	42,1	53,1	56,5	3,4
parcelles non traitées	40	39,3	35,1	3,6
moyenne	41,5	46,2	45,8	3,5

Tableau 11 : Pourcentage de rétrocultures de tubercules positives dans la descendance des essais inoculés, en fonction des traitements appliqués.

Mode d'application	FONGICIDE			Moyenne
	Préviculture	Benlate	Tébuzate	
Enrobage	46,8	43,5	41,9	43,6
Enrobage + pulvérisa- tion levée	60,5	55,7	67,3	60,3
Enrobage + pulvérisa- tion tubérisation	45	55,7	44,4	49,4
Moyenne	49,6	53,8	53,1	52,7

les moyennes sont faites sur 90 tubercules





Tableau 12 : Evaluation par rétroculture de la contamination des précultures obtenues sans traitement des tubercules.

	Témoin	Contamination à la levée	Contamination à la levée et la tubérisation	Contamination à la tubérisation
% de précultures contaminées	70	100	96	100

Tableau 13 : Comparaison des différentes séries de précultures réalisées sur la descendance des essais inoculés.

Série	Date de prélèvement	% de tiges portant des pycnides au moment du prélèvement	Traitement à la Rindite	% de précultures contaminées (a)
1	13 août	0	+	44
2	9 septembre	100	+	50
3	16 septembre	100	-	100

(a) = tests effectués sur les tiges et les oeilletons.

Tableau 9 : Evaluation en pourcentage de la contamination des précultures obtenues après traitement des tubercules à la Rindite.

Prélèvement	1	2	3
Parcelles témoins	0	0	0
Parcelles inoculées	18,7 ^(a)	44 ^(b)	50 ^(b)

- 1 : prélèvement le 19 juillet, plantation le 31 août
 2 : prélèvement le 13 août, plantation le 19 septembre
 3 : prélèvement le 9 septembre, plantation le 9 octobre.

- a : rétrocultures sur tiges
 b : rétrocultures sur tiges et oilletons.

Ces résultats démontrent que la contamination des tubercules s'est faite au cours de leur développement, avant l'apparition des pycnides qui n'étaient pas formées au moment des deux premiers prélèvements. Cette contamination n'a son origine ni dans le plant ni dans le sol puisque les témoins ont donné des rétrocultures négatives. Il faut en conclure qu'elle provient de la transmission de l'inoculum présent dans les tiges et apporté artificiellement à la levée ou la tubérisation des plantes feuillées.

4) Résultats des rétrocultures de tubercules

Les taux de contamination déterminés après désinfection des tubercules sont élevés pour l'ensemble des essais inoculés artificiellement, soit 40 à 50 %, alors qu'ils n'atteignent pas 4 % pour les témoins (tableau 10). Le stade de développement des plantes mères au moment de l'inoculation artificielle ne semble pas intervenir sur la contamination des tubercules fils.

La descendance des essais traités s'est révélée aussi contaminée que celle des essais non traités, quel que soit le fongicide testé, prévicure, benlate ou tébuzate et son mode d'application, trempage ou pulvérisation (tableau 11). Ces produits n'ont donc empêché ni la pénétration de l'agent pathogène dans les plantes ni sa transmission aux tubercules fils.

5) Résultats des précultures sans levée de dormance artificielle

Cette série de précultures obtenues sans traitement des tubercules à la Rindite a levé de façon très hétérogène et les cultures, qui portaient sur les tiges et les oeilletons, se sont réparties sur février et mars.

Pour la descendance des essais inoculés, presque toutes les rétrocultures ont donné des résultats positifs : 96 à 100 % de plantes contaminées ; pour les essais témoins, 70 % des plantes se sont révélées parasitées par *Phoma exigua* var. *foveata* (tableau 12).

Ceci étant dit, il est nécessaire de faire une distinction entre la contamination des témoins où peu de tiges et, dans ces tiges, peu de fragments étaient porteurs de *Phoma exigua* var. *foveata* et celle des essais inoculés qui était beaucoup plus importante quant au nombre de tiges et de fragments parasités.

Si on compare les résultats de ces dernières précultures effectuées sans levée de dormance et ceux des précédentes séries réalisées dans des conditions identiques mais avec des tubercules prélevés avant la récolte et traités à la Rindite, on constate que leur taux de contamination est beaucoup plus important (tableau 13).

A priori, ces écarts pouvaient s'expliquer :

- soit par une augmentation du potentiel infectieux des tubercules entre les différentes dates de prélèvement ;
- soit par un effet secondaire du traitement à la Rindite, composé considéré comme toxique pour l'homme et les animaux, sur la contamination des tubercules.

En admettant la première hypothèse, la dispersion de l'inoculum présent sur les tiges après le défanage pouvait être à l'origine d'une augmentation du potentiel infectieux. Dans ce cas, on s'explique mal les faibles différences de contamination des séries 1 et 2, la première ayant été prélevée avant l'apparition des pycnides et la seconde 20 jours après qu'elles se soient extériorisées. On ne peut pas davantage interpréter les écarts entre la contamination des séries 2 et 3 prélevées à 1 semaine d'intervalle (tableau 13).

Par contre, les différences apparaissent nettement entre les séries traitées ou non traitées à la Rindite qui semble agir comme un

désinfectant de surface. Testée en laboratoire sur des tubercules contaminés, elle s'est révélée presque aussi efficace que la désinfection à l'hypochlorite. Ce dernier point explique la similitude des résultats obtenus avec les précultures traitées à la Rindite et les rétrocultures de tubercules.

La contamination des tubercules provenant des essais témoins semble être principalement externe, puisque le test rétroculture sur tubercules n'avait révélé qu'un taux de contamination de 4 %, et que les précultures traitées à la Rindite avaient donné des résultats négatifs. Il est probable qu'elle soit due à la dispersion de l'inoculum présent sur les tiges après le défanage, mais nous ne pouvons en préciser l'origine.

6) Taux de nécroses dues à *Phoma exigua* var. *foveata* à la fin de la conservation

Au mois de mars, le reste des essais a été trié afin de sélectionner les tubercules destinés à être replantés et de déterminer l'incidence de la gangrène.

Malgré l'importance de la contamination latente détectée en conservation, peu de tubercules se sont nécrosés, moins de 1 % pour les témoins, 5 à 8 % pour la production des essais inoculés.

Ces faibles pourcentages de tubercules nécrosés par rapport au taux de tubercules contaminés montrent à quel point les mesures qui amènent une diminution du nombre des blessures au cours de l'arrachage, du conditionnement et de la conservation, permettent de limiter l'apparition de la gangrène.

C - INTERPRETATION ET DISCUSSION DES RESULTATS

Les contaminations artificielles ont la même évolution en champ qu'en serre : le champignon pénètre rapidement dans la plante, migre dans la tige et les stolons où on le met facilement en évidence 12 jours après l'inoculation. L'examen des fanes indique que toutes les plantes inoculées portent des pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata*, bien que seulement 50 à 75 % des rétrocultures sur tiges aient donné des résultats positifs. Il

est probable que ces différences soient dues aux difficultés de réalisation du test rétroculture sur des plantes cultivées en champ.

Les tests sur précultures, après levée de dormance à la Rindite des tubercules prélevés avant l'apparition des pycnides, indiquent que la descendance des plantes inoculées est contaminée de façon précoce.

Ces deux observations, présence de *Phoma exigua* var. *foveata* dans les stolons dès leur formation et mise en évidence de la contamination des tubercules au cours de leur croissance en l'absence de tout autre source d'inoculum que l'infection sans symptômes des tiges, montrent que l'agent pathogène peut être transmis de façon systémique des tiges aux tubercules par l'intermédiaire des stolons.

Les effets secondaires sur la contamination externe des traitements à la Rindite, qui agit comme un désinfectant de surface, ainsi que les rétrocultures de tubercules désinfectés prouvent que le champignon est dans le tubercule, bien que peu profond, contrairement aux idées admises jusqu'à présent.

Toutefois, en comparant les résultats obtenus avec les différentes méthodes de détection de *Phoma exigua* var. *foveata*, il apparaît nécessaire de nuancer l'interprétation des modalités de la contamination. En effet, les tests sur précultures obtenues sans traitement à la Rindite, donc sans élimination de l'inoculum externe, révèlent que celui-ci peut être très important.

CONCLUSION

Par conséquent, le potentiel infectieux d'une récolte doit tenir compte :

- de l'inoculum, que nous nommerons primaire, qui est transmis de façon systémique des tiges aux tubercules par l'intermédiaire des stolons. Ce mode de contamination se réalise au cours du développement des tubercules et des plantes ;
- de l'inoculum que nous nommerons secondaire, présent dans le sol ou à la surface des tubercules au moment de l'arrachage, cet inoculum qui résulte principalement, dans nos essais tout au moins, de la dispersion de l'infection des tiges après le défanage, est responsable d'une contamination tardive.

Le faible nombre de nécroses apparues au cours de la conservation, malgré le taux élevé de contamination des tubercules, souligne l'importance du facteur blessure dans l'incidence de la gangrène.

IIIB. CAMPAGNE 1975

A - ESSAIS EN CHAMP : IMPLANTATION ET REALISATION

1) Implantation et dispositif

En 1974, nous avons démontré les possibilités de contamination systémique des tubercules à partir d'inoculations artificielles par voie foliaire. L'année suivante, nous avons essayé de déterminer l'influence du mode de contamination des plantes sur le taux de *Phoma exigua* var. *foveata* présent dans la descendance.

Une partie du champ d'essai a été plantée avec des tubercules contaminés prélevés dans les essais de 1974, inoculés artificiellement à la levée, à la tubérisation, à la levée et la tubérisation. En même temps, nous avons planté des tubercules des essais témoins que les tests de détection de *Phoma exigua* var. *foveata* avaient révélé fortement contaminés.

L'autre partie a été réalisée avec du plant hollandais puis inoculée à la levée soit par voie foliaire selon le processus habituel soit par voie racinaire. Ces dernières contaminations sont faites en arrosant d'une suspension de spores et de mycélium de *Phoma exigua* var. *foveata* les racines des jeunes plantes, après les avoir soigneusement dégagées. L'efficacité de cette méthode avait auparavant été contrôlée en serre.

A la fin du mois d'avril, peu de temps avant la plantation, nous avons déterminé le taux de contamination interne des différents lots prélevés dans les essais de 1974 et celui des tubercules hollandais présumés sains (tableau 14).

Chaque condition de contamination, racinaire, foliaire, plant infecté et témoin était représentée par 8 parcelles de 40 pieds disposés comme dans les essais précédents. Les caractéristiques du champ sont mentionnées dans le tableau 5 .

Tableau 14 : Taux de contamination des tubercules plantés en 1975, déterminé en avril par le test rétroculture.

Série	Pourcentage de rétro-cultures positives
Elite Hollande	5 à 10
1	48
2	50
3	57
4	10

1,2,3,4 = descendance des essais de 1974

1 = plantes contaminées à la levée

2 = plantes contaminées à la levée et à la tubérisation

3 = plantes contaminées à la tubérisation

4 = témoins.

2) Calendrier

La plantation a été effectuée tardivement, le 9 mai, en raison de l'état des sols après l'automne très pluvieux de 1974.

Les contaminations racinaires ont été réalisées le 10 juin, les plantes étant à peine levées, et les contaminations foliaires le 17 juin.

Les essais ont été défanés chimiquement aux colorants nitrés les 4 et 9 août. Les tubercules ont été récoltés à la main les 25, 26 et 27 août, directement conditionnés en clayettes. Avant d'être conservés à 4°C à partir du 15 octobre, ils ont été stockés à la température ambiante des hangars de la S.I.C.A.

3) Prélèvements et tests effectués sur les plantes feuillées

a) après les contaminations artificielles

La réussite des contaminations artificielles a été vérifiée par rétroculture de plantes inoculées entre le 17 juin et le 4 juillet. En même temps nous avons vérifié le taux de *Phoma exigua* var. *foveata* des plantes issues des tubercules contaminés et des témoins.

Tableau 15 : Pourcentage de rétrocultures positives effectuées sur des plantes issues de tubercules contaminés ou inoculés artificiellement

Série	% de plantes contaminées	% de tiges atteintes dans les plantes contaminées	Etat du tubercule mère au moment du prélèvement
ER ^(a)	77,7	60,1	sain
EF ^(a)	97,7	74,3	sain
E ^(a)	44,4	21,7	sain
1 ^(b)	100	75,6	nécrosé dans 38% des cas
2 ^(b)	100	66,2	nécrosé dans 77% des cas
3 ^(b)	100	49,2	nécrosé dans 66% des cas
4 ^(b)	77,7	30,2	nécrosé dans 38% des cas

a = 45 plantes testées en 3 prélèvements, 7 à 30 jours après l'inoculation
 b = 18 plantes testées

ER = contamination racinaire

EF = inoculation foliaire

E = témoin

1 }
 2 }
 3 } descendances des essais inoculés en 1974

4 témoin 1974.

b) *au moment du défanage*

La contamination des tiges a été observée au mois d'octobre sur deux prélèvements :

- l'un réalisé au cours de la végétation avant le premier défanage les 2,3 et 4 août. Les tiges vertes au moment du prélèvement ont été entreposées dans les locaux de la S.I.C.A. jusqu'au mois d'octobre ;

- l'autre effectué après l'apparition des pycnides, 7 à 8 jours après la seconde application de colorants nitrés, c'est à dire du 16 au 18 août.

4) Prélèvements et tests effectués sur tubercules

La contamination de la descendance des essais a été déterminée comme l'année précédente par rétroculture de tubercules et de précultures obtenues après la levée de dormance à la Rindite.

B - ESSAIS EN CHAMP : RESULTATS

1) Vérification des contaminations artificielles

Toutes les plantes issues de la descendance des essais inoculés en 1974 donnent des rétrocultures positives et leurs tubercules mères se nécrosent dans le sol peu de temps après la levée (tableau 15), les témoins correspondants sont contaminés à 77 % ; ces résultats coïncident exactement avec ceux des précultures effectuées en serre sur ces lots sans traitement à la Rindite en janvier 1975.

Par contre, le test par rétroculture avant la plantation (tableau 14) avait révélé un taux de contamination légèrement supérieur, notamment pour les témoins, à celui que nous avons décelé en novembre au début de la conservation de ces tubercules (tableau 10). Cela est peut être du au fait qu'en avril les lots étaient germés, la germination pouvant, d'après les données bibliographiques, favoriser la pénétration de l'inoculum externe.

Un pourcentage élevé de plantes inoculées artificiellement par voie foliaire ou racinaire donne également des rétrocultures positives ; 44 % des plantes témoins apparaissent contaminées mais peu de tiges sont atteintes. Ce dernier pourcentage montre que le plant hollandais présumé sain n'était pas en fait exempt de *Phoma exigua* var. *foveata*. Par ailleurs,

le test rétroculture effectué avant la plantation avait révélé que 5 à 10 % des tubercules étaient contaminés de façon interne.

2) Etude des fanes

Aucune pycnide n'a été observée sur les tiges prélevées avant les défanages. Afin d'éviter la prolifération d'*Alternaria solani* et de *Botrytis cinerea* qui en auraient gêné l'observation, nous avons mis ces tiges vertes au moment de l'échantillonnage à sécher dans les hangars de la S.I.C.A. C'est ce maintien dans des conditions insuffisantes d'humidité qui a empêché l'extériorisation de la contamination, puisque en champ les pycnides se sont rapidement formées sur les plantes défanées aux colorants nitrés.

Contrairement aux années précédentes, les tiges témoins présentaient autant de pycnides que les tiges des plantes contaminées artificiellement ou par l'intermédiaire du plant (tableau 16). Cependant, les pycnides observées n'appartiennent pas toujours à *Phoma exigua* var. *foveata* et dans 50 % des cas sont dues à *Phoma eupyrena*.

Cette dernière constatation est importante parce qu'elle démontre qu'il est impossible de se baser sur l'observation des fanes pour évaluer le potentiel infectieux d'une récolte.

Tableau 16 : Pourcentages de tiges portant des pycnides de *Phoma* spp. après défanage chimique aux colorants nitrés, dans l'essai de 1975.

Série	EF	ER	E	1	2	3	4
% de tiges portant des pycnides de <i>Phoma</i> spp.	70,2	82,5	86	66	74	57	82

250 tiges observées en moyenne par série.

EF = essais contaminés par voie foliaire
 ER = essais contaminés par voie racinaire
 E = Elite Hollande - témoin

1-2-3 = descendance des essais inoculés en 1974
 4 = témoin des essais 1974.

3) Résultats des précultures

Les tubercules arrachés à la fin du mois d'août ont été traités à la Rindite en septembre et octobre afin d'être plantés en serre en octobre et novembre.

Les tests sur précultures ont fait apparaître un taux de contamination très faible pour l'ensemble des essais, que ce soit dans la descendance des plantes inoculées artificiellement ou celle des tubercules contaminés. Dans ces deux conditions, nous n'avons obtenu que 11 et 13 % en moyenne de précultures positives. La production des essais témoins et celle des tubercules prélevés dans l'essai témoin 1974, apparaissent plus faiblement contaminées encore que les précédentes soit 8 et 6 % de précultures positives.

Ces résultats sont les moyennes de 3 prélèvements, 20 plantes par condition de contamination étaient testées pour chacun d'eux.

4) Résultats des rétrocultures de tubercules

Les résultats représentent la moyenne des 4 prélèvements réalisés au cours de la conservation en octobre, novembre, février et mars, chaque échantillon comptant 90 tubercules apparemment sains (tableau 17).

Les taux de *Phoma exigua* var. *foveata* présent dans les tubercules sont très faibles et il y a peu de différences entre la descendance des parcelles inoculées artificiellement ou plantées avec des tubercules contaminés et celle des essais témoins.

Tableau 17 : Pourcentage de rétrocultures positives sur tubercules dans l'essai de 1975.

Condition de contamination	EF	ER	E	1	2	3	4
% de rétrocultures positives (a)	9,6	10	6,7	8	8,3	8,5	6

EF = contaminations foliaires - ER = contaminations racinaires
 E = témoin - 1 - 2 - 3 = descendance des essais inoculés en 1974
 4 = témoin des essais de 1974

(a) moyenne de 4 prélèvements portant chacun sur 90 tubercules.

C - INTERPRETATION ET DISCUSSION DES RESULTATS

Les différents modes de contamination expérimentés, voie racinaire, voie foliaire, tubercule mère, ne semblent pas avoir eu d'influence sur l'infection des tiges puisque *Phoma exigua* var. *foveata* est présent dans la plupart des plantes inoculées ou issues de tubercules contaminés.

Cependant, malgré la réussite des inoculations artificielles et le taux de contamination du plant issu de l'essai de 1974, les tubercules fils se sont révélés peu contaminés : 10 % dans la descendance des plantes inoculées et 8 % pour la production des tubercules porteurs de *Phoma exigua* var. *foveata*. Cela indique une faible transmission de l'inoculum présent à la base des tiges aux tubercules par l'intermédiaire des stolons et démontre qu'il ne suffit pas que les plantes mères soient contaminées pour que les tubercules fils le soient également.

Parallèlement, l'extériorisation des pycnides sur les tiges a été très irrégulière et le taux de nécroses dénombrées à la fin de la conservation, au mois d'avril, était négligeable, moins de 1 % pour l'ensemble des essais.

IIIC. COMPARAISON DES CAMPAGNES 1974 ET 1975

Ainsi que nous venons de le voir, la descendance des essais plantés en 1974 s'est révélée fortement contaminée contrairement aux tubercules fils récoltés en 1975 qui montraient des taux de *Phoma exigua* var. *foveata* faibles.

Ces deux essais présentaient cependant de nombreuses analogies :

- l'expérimentation en champ avait été conduite de la même façon, les techniques culturales et les modes de conservation des tubercules étaient identiques ;
- dans les deux cas, nous avons contrôlé par rétroculture que le parasite était présent dans les plantes feuillées inoculées artificiellement ou issues de tubercules contaminés.

Malgré cela, leurs résultats ont été très différents :

- à partir de l'infection massive des tiges, de nombreux tubercules ont été contaminés de façon systémique en 1974. Il s'est avéré l'année suivante que cette transmission du parasite par voie interne ne s'était que médiocrement réalisée ;
- la quantité d'inoculum externe susceptible de contaminer les tubercules entre le défanage et l'arrachage a varié dans le même sens : en 1974, toutes les fanes des essais inoculés portaient des pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata* ; en 1975, cette extériorisation était moins importante et moins régulière.

Il nous est donc apparu que la présence du parasite dans les plantes mères n'était pas une condition suffisante pour que les tubercules fils soient contaminés . Par conséquent, d'autres facteurs devaient intervenir sur la contamination des tubercules . Ces résultats nous ont amenée à comparer la température et la pluviométrie de ces deux années.

Nous avons tout d'abord constaté que les mois de juin, juillet et août avaient dans l'ensemble été plus chauds et plus secs en 1975 qu'en 1974 (relevés journaliers de température et de pluviométrie en 1974 et 1975).

Ensuite nous avons tout particulièrement remarqué que la pluviosité était importante en 1974, du 25 juin au 3 juillet, au moment où nous avons détecté le parasite dans les stolons au cours du développement des tubercules 12 jours après les inoculations artificielles. Comparativement en 1975, la pluviosité a été faible après les contaminations artificielles au début de la tubérisation , à la fin du mois de juin ; malheureusement, la détection du champignon n'a été faite cette année-là que sur les tiges et non sur les stolons. Il semble cependant, d'après les taux de contamination décelés sur tubercules désinfectés, qu'en 1974 la forte humidité après les inoculations ait favorisé la transmission systémique de l'agent pathogène des tiges aux tubercules. A l'inverse, en 1975, les faibles précipitations pendant la tubérisation semblent avoir empêché ce mode de contamination .

En outre, la pluviosité très importante, en 1974, les deux semaines qui ont précédé la récolte, le 16 septembre, a augmenté la dispersion de l'inoculum présent sur les tiges 10 à 12 jours après le défanage, augmentant les risques de contamination externe des tubercules. En 1975,

les pycnides n'étant apparues que peu de temps avant l'arrachage et les précipitations ayant été moindres, ces conditions ne se sont pas reproduites.

Il est intéressant de noter que l'évolution de la contamination au niveau de nos essais en 1974 et 1975 a reflété l'évolution de l'épidémie de gangrène qui a sévi dans la production de plant pour ces deux années. En effet, à la fin de la campagne 1973, 50 % de la production de la S.I.C.A. du Cap Gris-Nez avait donné lieu à des litiges principalement à cause du développement de la gangrène ; l'année suivante, ce pourcentage dépassait les 80 % au moment où nos propres essais se révélaient fortement contaminés. En 1975, très peu de nécroses sont apparues dans les lots en conservation, parallèlement nous avons enregistré une faible contamination de nos essais.

En conclusion, la maladie semble essentiellement tributaire des conditions météorologiques et il ne faut pas oublier qu'en pratique le problème de la gangrène se pose tout particulièrement dans les régions froides et humides de l'Europe Occidentale.

IV. CAMPAGNE 1976

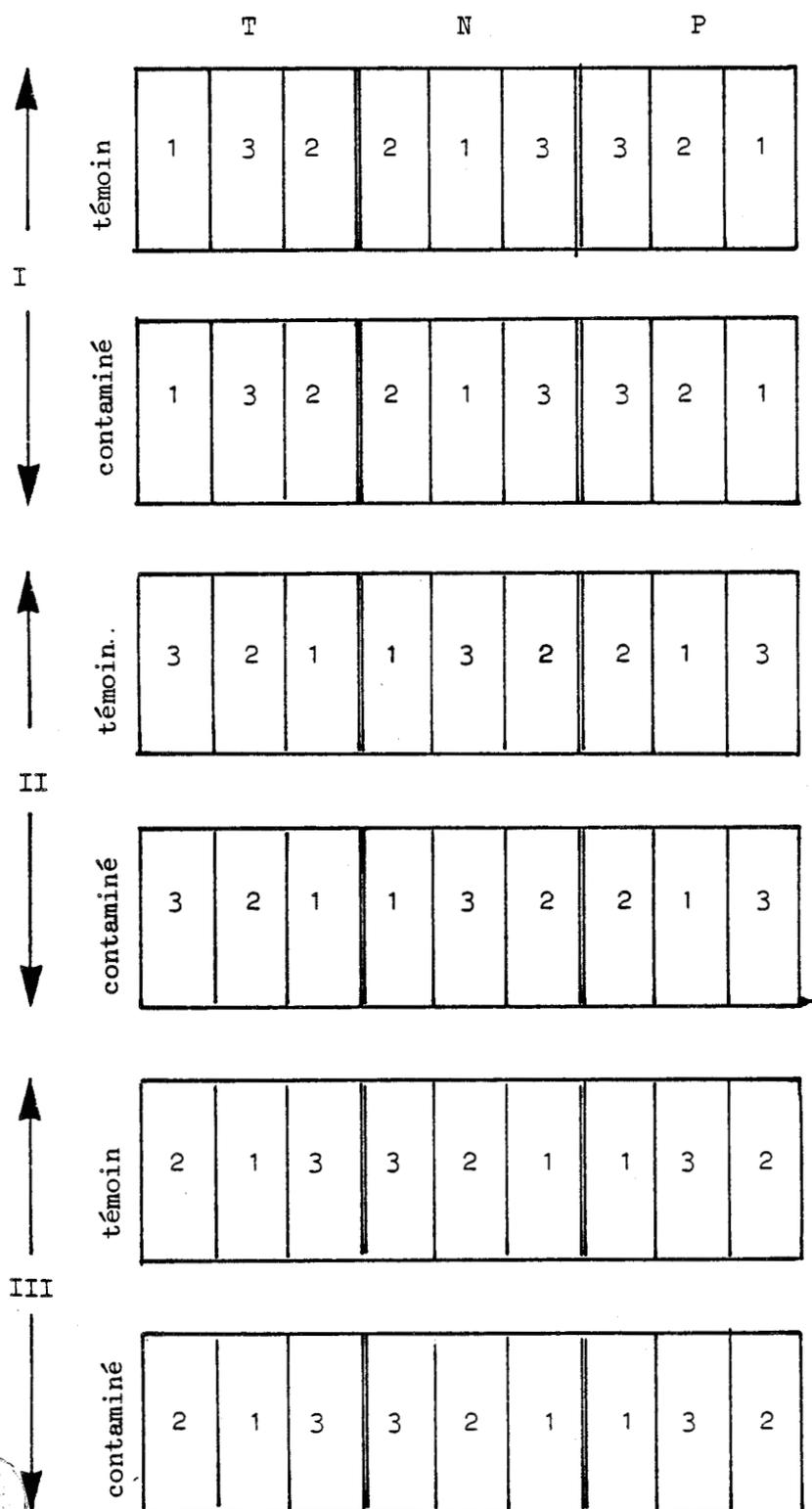
A - ESSAIS EN CHAMP : IMPLANTATION ET DISPOSITIF

1) Implantation

Les précédents essais nous ont permis de mettre en évidence la contamination latente des tubercules produits par les plantes inoculées artificiellement par voie foliaire. Cette contamination qui est à la fois interne, transmise par l'intermédiaire des stolons et externe, résultant principalement de la dispersion de l'inoculum présent sur les tiges après le défanage s'est avérée fortement dépendante des conditions climatiques.

Ces résultats étant acquis, en 1976 nous avons étudié l'incidence de certains facteurs cultureux sur le potentiel infectieux des tubercules et le développement des nécroses en conservation.

Schéma 1 : Dispositif des essais en champ (1976)



Conditions principales :

Dates de plantation

P (précoce)

N (normale)

T (tardive)

Conditions secondaires :

Dates d'arrachage

1 (précoce)

2 (normale)

3 (tardive)

I , II , III : Répétitions



Pour cela, nous avons adopté plusieurs dates de plantation et d'arrachage ce qui situait les cultures dans des contextes différents notamment vis-à-vis des conditions climatiques et faisait varier la durée de maintien dans le sol des tubercules.

Tous les essais ont été plantés avec le même lot de tubercules hollandais, considéré comme sain, d'un point de vue interne tout au moins, après les résultats négatifs du test rétroculture pratiqué au mois de mars. Une partie des essais a été inoculée par voie foliaire à la levée, l'autre a servi de témoin.

2) Dispositif

Les tubercules ont été plantés, à 15 jours d'intervalle, à trois dates différentes, qualifiées les unes par rapport aux autres de précoces, normales et tardives.

A chacune de ces dates correspondait une date de défanage, 90 jours après la plantation, cette durée de végétation représentant la durée normale d'une culture de plant.

Enfin, les tubercules ont été récoltés à 3 dates différentes considérées comme précoces, normales et tardives soit 10, 30, 50 jours après la destruction du feuillage.

L'essai était disposé en split-plot à 3 répétitions, tant pour les plantes contaminées que pour les plantes témoins. Les dates de plantation constituaient les conditions principales et les dates d'arrachage les conditions secondaires (schéma 1).

Chaque parcelle élémentaire comptait 4 rangs de 25 pieds, seuls les rangs centraux étant pris en considération afin d'éliminer tout effet de bordure ; les pieds étaient plantés à intervalles de 40 cm et les rangs espacés de 70 cm ; des allées de 2 m de large séparaient les parcelles dans le sens de la longueur.

3) La conservation

Les tubercules ont été récoltés à la main, triés et calibrés ; seuls ont été conservés les tubercules nécessaires aux tests de détection du *Phoma exigua* var. *foveata* en conservation, choisis de préférence dans le calibre 35/45 et complétés avec des tubercules de calibre 28/35 quand le premier était insuffisant. Les essais ont été placés à 4°C à partir du 25 novembre, après avoir été conservés à température ambiante dans les bâtiments de la S.I.C.A.

4) Calendrier

Dates plantation	Contamination	Défanage	Arrachage		
			précoce	normale	tardive
précoce : 7 avril	3 juin	8,9,20 juillet	17 juil.	5 août	26 août
normale : 20 avril	8 juin	20,22,29 juillet	29 juil.	20 août	8 septem.
tardive : 4 mai	22 juin	4,5 août	14 août	2 sept.	22 septem.

5) Prélèvements et contrôles sur plantes feuillées

La contamination des tiges , après défanage, a été étudiée sur des pieds entiers, 3 par parcelle élémentaire, prélevés et examinés au moment de chaque arrachage.

6) Prélèvements et tests sur tubercules

Le taux de *Phoma exigua* var. *foveata* présent dans la descendance des essais a été déterminée :

- par rétroculture de tubercules , permettant d'obtenir le taux de contamination interne. Ce test a été réalisé sur 25 tubercules par parcelle élémentaire;
- par blessure, nous avons préféré abandonner les tests sur précultures, parce que cette méthode était à la fois trop longue et trop délicate pour pouvoir être appliquée sur un grand nombre de tubercules.

Ce test a été effectué sur un total de 50 tubercules par parcelle élémentaire, fractionné en plusieurs prélèvements au cours de la conservation.

7) Climatologie au Cap Gris-Nez durant la période des essais agronomiques

L'année 1976 a connu une sécheresse exceptionnelle entraînant une production anormalement faible des cultures de pomme de terre, qu'il s'agisse du plant ou de la consommation (relevés de température et de pluviométrie). Dans la région du Cap Gris-Nez, à un début de printemps froid et sec, qui a retardé la levée des plantes, ont succédé trois mois particulièrement chauds, juin, juillet et août, dont les plantes ont d'autant plus souffert que la pluviosité était presque nulle.

Il est évident que ces conditions climatiques ont perturbé les essais à la fois dans le développement des plantes et l'évolution de la maladie, ce qui situe les relations hôte - parasite dans un contexte très particulier, mais il nous est impossible d'évaluer dans quelle mesure les résultats obtenus ont été influencés par la sécheresse et la chaleur.

Nous avons observé au niveau des plantes feuillées et des tubercules néo-formés des phénomènes de repousse, qui ont nécessité un troisième défanage aux colorants nitrés. De plus, les tubercules produits étaient déjà fortement incubés au moment des arrachages en raison des fortes chaleurs de l'été, ce qui intervenait dans leur physiologie et dans leur évolution en conservation.

B - ESSAIS EN CHAMP : RESULTATS

9

1) Etude des fanes

Les tiges n'étaient pas encore sèches au moment des arrachages précoces, 10 jours après les défanages, et peu de pycnides étaient formées. Dans le cas des essais de plantation précoce, nous n'avons observé aucune pycnide au moment de la première récolte, mais 7 jours plus tard elles étaient apparues sur 60 % des plantes et 30 % de leurs tiges. Par contre,



Tableau 18 : Taux de contamination des essais au moment de la récolte , en pourcentages de plantes et de tiges portant des pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata* .
(Tableau récapitulatif des essais contaminés artificiellement)

		DATES D'ARRACHAGE					
		Précoce (a)		Normale (b)		Tardive (c)	
		% plantes ^d <i>Ph. e. f.</i> ⊕	% de tiges ^e <i>Ph. e. f.</i> ⊕	% plantes <i>Ph. e. f.</i> ⊕	% de tiges <i>Ph. e. f.</i> ⊕	% plantes <i>Ph. e. f.</i> ⊕	% de tiges <i>Ph. e. f.</i> ⊕
Dates de plantation	Précoce	0	0	100	63	90	79
	Normale	33	16	77	50	77	40
	Tardive	15	25	66	33	66	33
Moyenne		16	13,6	81	48,6	73,6	50,6

- a = 10 jours après défanage - b = 30 jours après défanage -
 c = 50 jours après défanage - d = Pourcentage de plantes portant des pycnides
 de *Phoma exigua* var. *foveata*
 e = Pourcentages de tiges portant des pycnides de *Phoma exigua* var. *foveata*
 dans les plantes contaminées

30 et 50 jours après le défanage, au moment des arrachages dits normaux et tardifs, un nombre élevé de pieds et de tiges était visiblement parasité par *Phoma exigua* var. *foveata* (tableau 18) .

Ces observations confirment la réussite partielle tout au moins des contaminations artificielles bien qu'elles n'aient pas toujours été réalisées dans des conditions optimales de température et d'humidité. Ce fut le cas des inoculations des plantations normale et tardive, effectuées dans des périodes défavorables à la fois chaudes et sèches (relevé climatique 1976).

2) Résultats du test rétroculture sur tubercules

Les taux de contamination déterminés après désinfection des tubercules ne dépassent pas 5 % dans la descendance des essais témoins alors qu'ils atteignent 11 à 18 % en moyenne dans la descendance des essais inoculés artificiellement. Ceci montre qu'il y a eu une certaine transmission de l'inoculum aux tubercules fils bien qu'elle soit restée limitée (Tableau 19).

L'analyse statistique des résultats pour la descendance des essais inoculés artificiellement indique qu'il n'y a pas de différences significatives entre les taux de contamination en fonction des dates d'arrachage et de plantation (tableaux 19a et 19b) bien que les essais de plantation normale et de plantation tardive semblent avoir des taux de contamination légèrement moindres.

Dans cet essai, la contamination latente des tubercules résultant de la transmission systémique du parasite à partir des tiges infectées sans symptômes, n'est pas liée à la date de plantation et à la durée de maintien dans le sol des tubercules.

3) Résultats du test blessure

Les taux de nécroses dues à *Phoma exigua* var. *foveata* après blessure ont été très variables dans la descendance des essais inoculés artificiellement selon les différentes dates d'arrachage et de plantation soit 8,6 % à 50 % en moyenne (tableau 20). Dans la descendance des essais témoins, 3 à 8 % des tubercules se sont nécrosés après blessure.

L'analyse statistique des résultats obtenus avec les tubercules fils des essais inoculés indique que les différences sont significatives

Tableau 19 : Pourcentage de rétrocultures positives sur tubercules dans la descendance des essais inoculés. Tableau récapitulatif : moyenne des 3 répétitions.

	Conditions secondaires : dates d'arrachage			Moyenne	
	Précoce	Normale	Tardive		
Conditions principales : dates de plantation	Précoce	17,3	20	17,3	18,2
	Normale	8	9,3	20,6	12,6
	Tardive	12,3	9,3	12	11,2
	Moyenne	12,5	12,8	16,	14

au seuil de 1 % en fonction des dates d'arrachage et que l'interaction dates de plantation x dates d'arrachage est significative au seuil de 5 % (tableaux 20a et 20b).

Par conséquent, le potentiel infectieux global comprenant l'inoculum interne et l'inoculum externe, qu'exprime le pourcentage de nécroses après blessure, semble dépendre de la date d'arrachage donc de la durée de maintien des tubercules dans le sol après défanage. Cependant l'interaction significative indique que la date de plantation modifie cette relation.

C - INTERPRETATION ET DISCUSSION DES RESULTATS

Compte-tenu du contexte climatique peu favorable à la maladie, il convient d'être prudent dans l'interprétation des résultats.

Dans cet essai, deux choses sont à considérer : le taux de contamination interne représenté par l'inoculum I transmis de façon systémique et l'évolution de la contamination latente en nécroses après blessure.

1) Taux de contamination interne ou taux d'inoculum I

La contamination systémique des tubercules n'apparaît pas avoir été influencée par la date de plantation. A partir de ces essais, nous comptons obtenir des données concernant la transmission systémique de l'inoculum des tiges en fonction de différentes conditions d'humidité et de température au moment de la tubérisation. Malheureusement, le froid au mois d'avril qui a retardé la levée des plantations précoces et la sécheresse qui a ensuite freiné le développement des plantes ont en quelque sorte annulé les effets des différentes dates de plantation. Cette transmission ne semble pas davantage avoir été influencée par les dates d'arrachage, qui correspondent à différentes durées de maintien dans le sol des tubercules. Cela concorde avec les résultats que nous avons précédemment obtenus indiquant que le mode de contamination des tubercules était précoce.

2) Evolution des taux de nécroses après blessure

Les effets des dates d'arrachage se répercutent à deux niveaux : sur la physiologie des tubercules et sur leur potentiel infectieux externe.

La maturité des tubercules dépend de la durée de leur maintien dans le sol donc de la date d'arrachage et on considère que le développement de la nécrose est lié à l'état physiologique du tubercule (cf. bibliographie). Dans le cas présent, ce facteur n'a pu avoir qu'une importance toute relative dans la réponse du test blessure. Les fortes chaleurs de l'été ont en effet accéléré la maturation et l'incubation des tubercules ce qui a atténué les différences que nous aurions pu observer.

De la date d'arrachage dépendent les risques de contamination externe des tubercules après le défanage. Au moment des arrachages précoces, 10 jours après les applications de colorants nitrés, ils étaient minimes, les pycnides étant peu ou pas formées sur les tiges. A ces récoltes, correspondent les taux de nécroses les plus faibles pour chaque condition de plantation. Les possibilités de contamination externe étaient plus importantes 30 et 50 jours après le défanage, les pycnides s'étant extériorisées sur les tiges. Mais, à partir de ces possibilités, la contamination effective des tubercules ne pouvait se réaliser qu'après dissémination de l'inoculum présent sur les fanes. Cette dispersion des pycniospores étant principalement assurée par la pluie, la contamination externe des tubercules dépendait des conditions climatiques qui ont été variables entre la première récolte effectuée 30 jours après défanage et le dernier arrachage tardif (relevé journalier des températures et de la pluviométrie en 1976). Ces variations expliquent les interactions significatives entre les dates d'arrachage et de plantation. La sécheresse ayant persisté jusqu'au 29 août, le potentiel infectieux des tubercules arrachés avant cette date était peu différent de celui des essais récoltés prématurément. C'est le cas de toutes les conditions de plantation précoce, et les tubercules arrachés 10, 30 et 50 jours après le défanage donnent après blessure des taux de nécroses peu différents. Le passage progressif d'une période sèche à une période humide du 29 août au 16 septembre, jour des derniers arrachages, a permis une dissémination plus ou moins grande de l'inoculum dû aux pycnides.

La conséquence en a été une augmentation de la contamination externe entraînant un accroissement du potentiel infectieux des essais, ce qui s'est traduit après blessure par un taux plus élevé de nécrose. Cette évolution de la contamination est particulièrement frappante pour les essais de plantation tardive.

D - CONCLUSION

Les conditions climatiques exceptionnelles de 1976 n'ont pas empêché la pénétration de *Phoma exigua* var. *foveata* dans les plantes feuillées, encore que les inoculations semblent avoir réussi de façon inégale, si on se base sur l'observation des tiges.

Le taux d'inoculum interne présent dans les tubercules s'est révélé relativement faible par rapport à la surcontamination apportée au niveau des plantes. Ces résultats indiquent que les conditions n'ont pas été favorables à la transmission du champignon par voie systémique et il semble que ce soit, comme en 1975, la conséquence d'une période sèche au moment de la tubérisation. Le taux d'inoculum interne s'est montré indépendant des conditions de plantation et des dates d'arrachage, pour cet essai. Par contre, la contamination externe des tubercules augmente en même temps que l'intervalle entre le défanage et l'arrachage si les conditions climatiques permettent la dispersion de l'inoculum présent sur les tiges.

Bien que ces essais ne se soient pas déroulés dans des conditions optimales, ni pour le développement des plantes ni pour l'évolution de la maladie, ils nous ont permis de confirmer les résultats acquis antérieurement à savoir que la maladie était essentiellement tributaire des conditions climatiques.

Légende

P : Essais de plantation précoce
N : Essais de plantation normale
T : Essais de plantation tardive

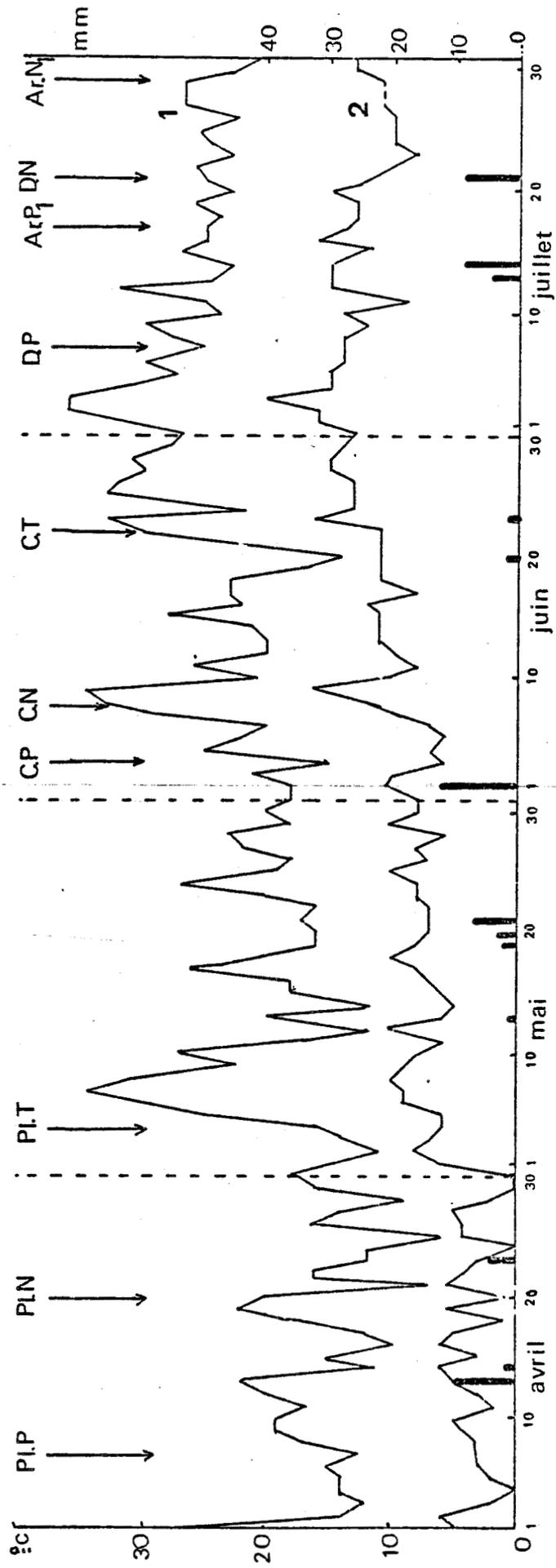
Pl. : Dates de plantation
C. : Dates de contamination artificielle
D. : Dates de défanage
Ar. : Dates d'arrachage

1 : Arrachages précoces (10 jours après défanage)
2 : Arrachages normaux (30 jours après défanage)
3 : Arrachages tardifs (50 jours après défanage)

Température

1 : maxima

2 : minima



Relevés journaliers de température
et de pluviométrie pour la période des essais
en 1976

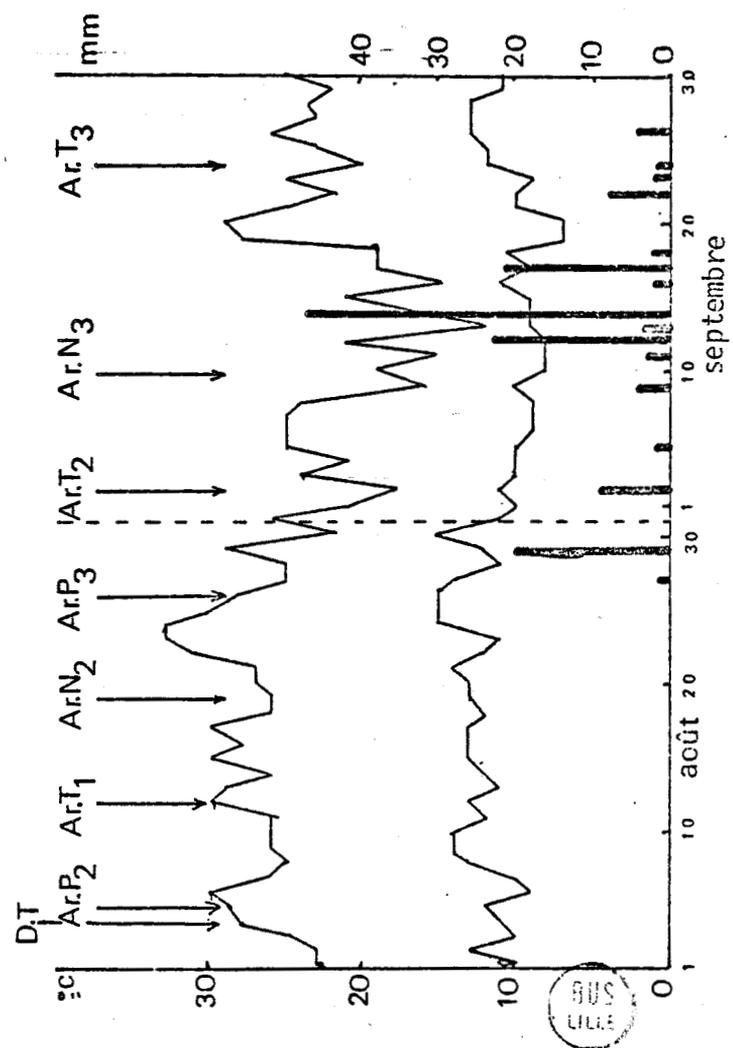


Tableau 20 Pourcentages de nécroses obtenues après blessure

(Tableau récapitulatif des essais inoculés artificiellement)

Conditions principales : dates de plantation				Conditions secondaires : dates d'arrachage			Moyenne
				Précoce	Normale	Tardive	
Précoce	Normale	Tardive	Moyenne	23	23,3	21,3	22,5
				10,6	14,6	31,3	18,8
Tardive	Moyenne	8,6	24,6	50,6	28		
		14,12	20,8	34,4			

— Passage d'une période sèche à une période humide.

Tableau 19a : Pourcentage de rétrocultures positives sur tubercules dans la descendance des essais inoculés. Résultats parcellaires.

		Conditions secondaires : dates d'arrachage			Total	
		Précoce	Normale	Tardive		
Conditions principales : dates de plantation	Précoce	1	20	16	12	48
		2	16	20	24	60
		3	16	24	16	56
		total	52	60	52	164
	Normale	1	12	8	20	40
		2	4	12	16	32
		3	8	8	26	42
		total	24	28	62	114
	Tardive	1	20	8	16	44
		2	0	4	4	8
		3	17 xm	16	16	49
		total	37	28	36	101
TOTAL		113	116	150	379	

bloc	Total par bloc
1	132
2	100
3	147
total	379

Moyennes sur 25 tubercules
Tubercules conservés à 4°C à partir du 25 novembre
xm = estimation de la parcelle manquante.





Tableau 19b : Analyse statistique des résultats du test rétroculture sur tubercules

Origine de la variation	Somme des carrés	degrés de liberté	Variance	F.calculé	F.théorique 5 %
Total. Dates de plantation	623	8			
blocs	128,11	2	64,0	0,7	9,55
Plantation	373,99	2	186,9	2,4	9,55
Erreur plantation	249	4-1=3	83		
Arrachages	93,88	2	46,94	1,96	3,98
Interaction. Plantation x arrachage	227,24	4	56,81	2,37	3,36
Erreur arrachage	263,89	12-1=11	23,99		
TOTAL GENERAL	1181	26			

89

Il y avait une parcelle manquante dans les essais de plantation tardive, arrachage précoce, le résultat en a été estimé selon la formule suivante (LECOMPT, 1965) :

$$x_m = \frac{k_B x'_v + k_N X'_{NV} - X'_v}{(k_B - 1)(k_N - 1)}$$

Il faut alors enlever un degré de liberté à l'erreur.

x_m = résultat de l'estimation de la parcelle manquante · k_B = nombre de répétitions

k_N = nombre de conditions secondaires x'_v = total incomplet relatif à la condition principale contenant la donnée manquante

X'_{NV} = total incomplet des parcelles qui ont la même combinaison condition principale et condition secondaire que la parcelle manquante.

X'_v = total incomplet relatif à la condition principale contenant la donnée manquante.

Tableau 20a : Pourcentages de nécroses obtenues après blessure
 (Résultats parcelles des essais inoculés artificiellement)

	Conditions secondaires : dates d'arrachage			Total
	Précoce	Normale	Tardive	
Précoce	1	8	34	60
	2	29,1	14	69,1
	3	22	16	74
	total	69,1	64	203,1
Normale	1	8	20	38
	2	12	32	56
	3	12	42	76
	total	32	44	170
Tardive	1	12	46	90
	2	8	64	86
	3	6 xm	42	76
	total	26	74	252
TOTAL	127,1	188	310	625,1

Conditions principales :
dates de plantation

bloc	Total par bloc
1	188
2	211,1
3	226
total	625,1

Test sur 50 tubercules - xm = estimation de la parcelle manquante.





Tableau 20b : Tableau d'analyse de la variance. Taux de nécroses après blessure.

Origine de la variation	Somme des carrés	degrés de liberté	Variance	F. calculé	F. théorique	
					5 %	1 %
Total plantation	687,4	8				
Blocs	81,49	2	40,74	0,536	9,55	30,81
Plantation	378,2	2	189,1	2,99	9,55	30,81
Erreur plantation	227,71	3	75,9			
Arrachage	1927,62	2	963,81	8,78	3,98	7,20
Interaction	1496,25	4	374,06	3,43	3,36	5,67
Arrachage x plantation						
Erreur arrachage	1207,33	11	109			
TOTAL GENERAL	5318,6	26				

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

Tout au long de cette expérimentation, nous avons étudié les modalités de la contamination des tubercules à partir de l'infection systémique des tiges. Si les risques de contamination externe après l'extériorisation des pycnides sur les fanes, sont bien connus, l'éventualité d'une transmission interne à partir des tiges parasitées était toujours restée dans l'ombre. Dans un premier temps, l'objectif de notre étude a été de vérifier cette hypothèse. Ce travail ne pouvait être entrepris sans disposer d'une méthode fiable de contamination artificielle. A l'inverse des auteurs britanniques, nous sommes rapidement parvenue à mettre au point un protocole d'inoculation des plantes feuillées, ce qui allait nous permettre de suivre le devenir de *Phoma exigua* var. *foveata* dans la plante. Ainsi, nous avons pu constater que le champignon, déposé à l'apex, en présence d'une hygrométrie élevée, pénétrait rapidement dans la plante et migrait dans les tiges et les stolons. Ces observations, suivies de la détection de l'agent pathogène dans des tubercules récoltés prématurément sans interaction possible avec l'inoculum résultant de l'extériorisation des pycnides, nous ont amenée à conclure qu'il avait été transmis de façon systémique aux tubercules par l'intermédiaire des stolons.

Il nous est ensuite apparu que le taux de contamination des tubercules récoltés après défanage pouvait être très supérieur à celui des tubercules prélevés avant la destruction du feuillage, les écarts résultants de la dispersion de l'inoculum présent sur les tiges après le défanage.

Par conséquent, les possibilités de contamination des tubercules à partir des tiges parasitées par *Phoma exigua* var. *foveata* sont doubles : internes par une transmission systémique et précoce du champignon empruntant la voie des stolons, externes et tardives après l'extériorisation des pycnides sur les fanes.

Enfin, la comparaison des résultats obtenus après 3 années d'essais consécutives nous a fait saisir l'importance des facteurs climatiques dans l'évolution de la maladie. En effet, nous avons constaté qu'une période sèche au moment de la tubérisation était défavorable à la transmission systémique du parasite et entraînait une diminution du taux de contamination interne des tubercules . Par ailleurs, nous avons vu qu'une pluviosité faible entre l'apparition des pycnides et l'arrachage réduisait considérablement les risques de contamination externe .

TROISIEME PARTIE : MISE EN EVIDENCE DE
METABOLITES PHYTOTOXIQUES DANS LES FILTRATS
DE CULTURE DE *PHOMA EXIGUA* VAR. *FOVEATA*

La comparaison des pouvoirs pathogènes des deux variétés de *Phoma exigua* Desm. responsables de la gangrène montre que la variété *foveata* a non seulement un pouvoir de pénétration dans le tubercule supérieur à celui de la variété *exigua*, mais qu'en outre sa progression y est plus rapide.

En effet, après inoculation de tubercules blessés, ce qui élimine les différences dues au pouvoir de pénétration, les nécroses dues à *Phoma exigua* var. *foveata* se développent plus vite et sont plus étendues que celles causées par *Phoma exigua* var. *exigua*. A partir de ces observations, nous avons cherché si des produits du métabolisme du champignon pouvaient être impliqués dans l'évolution du processus nécrotique. Les résultats de cette étude constituent le troisième volet de ce travail.

I. MATERIEL ET METHODES

Cette partie traite des modalités expérimentales générales ; par la suite, ne seront mentionnées que les modifications qui ont dû leur être apportées ainsi que les techniques propres à chaque essai.

A - LES SOUCHES : ORIGINE, CARACTERES, ENTRETIEN

1) L'origine

Dans les premiers essais, plusieurs souches de *Phoma exigua* var. *foveata* ont été testées. Elles provenaient d'isolements récents effectués sur des tubercules naturellement atteints de gangrène. Toutes possédaient un pouvoir pathogène élevé et leur inoculation à des tubercules sains provoquait la formation rapide de nécroses étendues. Par la suite, n'obtenant pas de résultats différents selon les souches, nous n'en avons conservé qu'une, correspondant à l'isolement le plus récent.

2) Les caractères

Les cultures obtenues avec ces souches sont fortement pigmentées ; leur inactivité sur les bactéries sensibles à l'antibiotique "E" prouve qu'elles ne produisent pas ce composé ; par conséquent, contrairement aux souches qui le synthétisent, les zones pigmentées en jaune virent immédiatement au rouge après addition de soude normale (LOGAN et O'NEIL, 1970) ainsi que nous l'avons mentionné dans l'étude bibliographique.

3) L'entretien

Les souches sont repiquées chaque mois sur tubes de milieu gélosé à 2 %, soit extrait de malt à 2 % soit eau de pomme de terre à 5 %, glucosée à 1 %. Les cultures sont maintenues à 18°C avec une alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

B - LA CULTURE DU CHAMPIGNON : MILIEU ET CONDITIONS

1) Le milieu

Le Champignon est cultivé en fioles de ROUX d'un litre, contenant 100 ml de milieu liquide.

Au départ, nous avons utilisé un milieu à 2 % d'extrait de malt Difco. Ce milieu donnait de bons résultats mais l'extraction des filtrats obtenus était rendue difficile par la formation d'émulsions stables. C'est pourquoi ce milieu a été abandonné au profit d'un milieu synthétique qui ne présentait pas cet inconvénient. Ce milieu, choisi arbitrairement, est le milieu

mis au point par DEHORTER (1972) pour *Nectria galligena*, dans lequel le maltose, qui est la source de carbone initiale, est remplacé par du glucose. Sa composition est la suivante :

- KH_2PO_4	0,8 g	- Glucose.....	20 g
- MgSO_4	0,250 g	- Asparagine.....	180 mg
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$	100 mg	- Acide γ aminobutyrique.....	300 mg
- CaCl_2	50 mg		
		- $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}/\text{EDTA Na}_2$	15/10 mg
		- $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	15 mg
		- $\text{MnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg
		- BO_3H_3	3 mg
		- $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	1 mg
		- $\text{MoNa}_2\text{O}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	1 mg
		- Thiamine.....	200 μg
		- Pyridoxine.....	200 μg
		- Biotine.....	10 μg
		- H_2O distillée.....	1000 ml
		- le pH de ce milieu est de	5,0.

2) Les conditions de culture

Les fioles sont placées à l'obscurité, à 21°C, température de croissance optimale de *Phoma exigua* var. *foveata*.

C - OBTENTION DU FILTRAT DE CULTURE

Après 15 jours de culture, le contenu des fioles est recueilli, centrifugé à 4 000 tours/minute pendant 30 minutes. Nous ne conservons que le filtrat de culture qui est testé biologiquement, brut **et** après extraction dans le chloroforme. Cependant, au cours des essais préliminaires, une partie du mycélium centrifugé a été lyophilisée et extraite comme le filtrat pour être testée .

Lors de l'extraction des pigments actifs, le volume des cultures étant important nous avons dû procéder de la façon suivante : les pigments jaunes adhèrent au fond des fioles et sous la nappe mycélienne ; comme ils sont solubles dans l'acétone, nous en récupérons la plus grande partie en rinçant les fioles à l'acétone et en l'ajoutant au filtrat et au mycélium recueillis. Le lendemain, le tout est filtré sous vide afin d'éliminer le mycélium. Le mélange filtrat-acétone est ensuite concentré sous vide et finalement lyophilisé. Le processus d'extraction se fait à partir du filtrat sec.

D - TESTS BIOLOGIQUES

1) Test sur tubercules de pomme de terre

L'activité biologique des filtrats de culture et de leurs extraits a d'abord été testée sur tubercules de pomme de terre. Pour la mise au point de ce test, nous nous sommes inspirée des méthodes utilisées pour évaluer la sensibilité variétale de la pomme de terre à la gangrène causée par *Phoma exigua* var. *foveata* (LANGTON, 1971, 1972 ; JELLIS, 1975 ; PIETKEWICZ et JELLIS, 1975 ; ROGERS et KILLICK, 1975).

Les tubercules testés appartiennent à la variété Bintje et sont stockés à 4°C. Après avoir été lavés et séchés, ils sont trempés dans l'éthanol et désinfectés au chlorure mercurique à 2 % pendant 10 minutes. Ils sont ensuite soigneusement rincés et séchés à nouveau.

Sur ces tubercules nous pratiquons des blessures standard de 2 types. Les unes dites blessures corticales n'atteignent pas la zone vasculaire, située sous le tissu cortical dont l'épaisseur moyenne est comprise entre 5 et 10 mm ; ce sont des blessures peu profondes de 5 mm de diamètre et 3 mm de profondeur. Les autres, dites blessures médullaires, sont des blessures profondes de 5 mm de diamètre et 15 mm de profondeur, qui incluent la zone vasculaire. Cependant, il faut préciser que les blessures évitent les germes et le point d'insertion du stolon où la zone vasculaire est très superficielle.

Les filtrats ou les solutions à tester sont déposés à la micropipette dans ces blessures qui sont recouvertes d'un pansement adhésif

afin d'éviter un dessèchement trop rapide des solutions déposées. Les tubercules traités sont placés, entre deux nappes de coton maintenues humides, dans des terrines de matière plastique recouvertes de papier d'aluminium. La désinfection préalable des tubercules est indispensable pour empêcher les pourritures bactériennes et fongiques.

La lecture du test se fait après 30 jours d'incubation à 10°C. Au cours des essais, cette température s'est montrée la plus favorable au bon développement du test ; en effet, à 18°C il est difficile de maintenir une humidité suffisante au niveau des blessures et à 4°C, le développement complet du test est plus long qu'à 10°C. Après la période d'incubation, les tubercules sont coupés transversalement au niveau des blessures dont on note l'aspect et l'évolution en taille.

Ce test est d'une utilisation très limitée en raison de sa durée d'incubation et la quantité de produit à tester qu'il requiert. Il était notamment impossible de l'employer au cours des étapes de purification des substances actives.

2) Test sur plantules de tomate

Il nous fallait disposer d'un test qui, tout en donnant une réponse rapide, ne nécessite qu'une faible quantité de composé à essayer. C'est pourquoi les filtrats et leurs extraits ont été testés sur la tomate, plante fréquemment utilisée dans les études de toxicité.

Les plantules de tomate se sont révélées très sensibles aux substances actives contenues dans les filtrats de culture de *Phoma exigua* var. *foveata*. Pour la réalisation de ce test, nous utilisons des plantules de la variété Marmande cultivées sur terreau, à 24°C en phytotron. Au moment de leur utilisation, elles sont âgées de 14 à 20 jours et sont au stade deux feuilles. Les effets des filtrats et de leurs extraits peuvent être évalués par trempage des plantules ou par application directe sur des plantules décapitées.

Pour le test trempage, les plantules coupées à la base de l'hypocotyle pour plus de facilité, sont plongées dans des tubes à hémolyse contenant 5 ou 6 ml de la solution à tester. On note ensuite l'évolution du flétrissement toutes les 24 heures pendant 96 heures.

Le test décapitation a été mis au point sur un autre matériel, le Chou (BOUDART, non publié). Nous avons appliqué la même méthode à la tomate ; les plantules sont décapitées à mi-hauteur de l'hypocotyle et la quantité voulue d'extrait est déposée à la micropipette sur l'hypocotyle sectionné. Les extraits provoquent, en fonction de leur activité, la plasmolyse d'une certaine longueur de l'hypocotyle ; 48 heures après le dépôt, on mesure la longueur plasmolysée.

L'avantage du test décapitation en plus de sa rapidité et de sa simplicité est d'être réalisable avec des dépôts de 1 μ l, ce qui le rend particulièrement adapté à la vérification de l'activité biologique au cours des étapes d'extraction et de purification. Le test par trempage est également très sensible et nous l'avons utilisé pour déterminer le seuil d'activité biologique des composés purs.

II. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE PHYTOTOXIQUE DES FILTRATS DE CULTURE DE *PHOMA EXIGUA* VAR. *FOVEATA*

L'activité biologique a été expérimentée sur tubercules de pomme de terre et sur plantules de tomate avec des filtrats bruts et leurs extraits.

A - RESULTATS OBTENUS AVEC LES FILTRATS BRUTS

Avant leur application, les filtrats bruts doivent être rendus acellulaires par filtration sur membrane millipore de 0,45 μ .

1) Résultats avec les tubercules

Dans le cas présent, les blessures sont de type médullaire et les dépôts sont de 100 µl ; les filtrats sont testés tels quels et concentrés 10 fois ; l'incubation est de 30 jours à 4°C. A titre de comparaison, des tubercules blessés sont inoculés avec du mycélium de *P. exigua* var. *foveata*. Les témoins sont réalisés avec un dépôt de 100 µl d'eau distillée (tableau 1).

Non concentrés, les filtrats provoquent un brunissement des tissus entourant la blessure dont l'accroissement est minime, inférieur ou égal à 2 mm en profondeur et en diamètre.

Concentrés, ils provoquent un brunissement plus marqué des tissus ainsi qu'un début de nécrose, qui se traduit par une augmentation de la taille des blessures initiales, supérieure ou égale à 7 mm en profondeur et 5 mm en diamètre. Cette évolution est comparable en taille à celle que produit le développement du Champignon dans les tubercules inoculés. A titre indicatif, LANGTON et JELLIS obtiennent, après inoculation de *P. exigua* var. *foveata* à différentes variétés, un accroissement moyen de 5 à 8 mm en profondeur et de 4 à 8 mm en diamètre, pour une durée d'incubation de 3 semaines à 10°C (LANGTON et JELLIS, 1974). Chez les témoins, les blessures sont parfaitement cicatrisées, sèches et grisâtres, sans augmentation de taille.

2) Résultats avec les plantules de tomate

Les plantules de tomate plongées dans des filtrats de culture bruts non concentrés, présentent dans les 48 heures un flétrissement, caractéristique de l'action toxique. Par contre, les filtrats concentrés ne peuvent être testés car la plasmolyse des plantules survenant dans les 6 heures qui suivent le traitement n'est peut être pas due uniquement à l'activité toxique mais aussi à l'hypertonie des solutions (tableau 1).

Tableau 1 : Effets des filtrats de culture bruts de *Phoma exigua* var. *foveata* sur tubercules de pomme de terre et plantules de tomate.

Plante testée	Concentration du filtrat	
	1	10
<u>Tubercule</u> ^{**} brunissement des tissus évolution des blessures diamètre profondeur	peu accentué minime } < 2 mm	très marqué lésions creuses début de nécroses ≥ 5 mm ≥ 7 mm
<u>Tomate</u>	flétrissement complet en 48 heures	solutions hypertoniques : résultats non interprétables

* les blessures sont de type médullaire. L'incubation est de 30 jours à 4°C. Les dépôts de 100 µl.

B - RESULTATS OBTENUS AVEC LES EXTRAITS DES FILTRATS

1) Obtention de l'extrait

1000 ml de filtrat sont extraits deux fois par 100 ml de chloroforme. La phase chloroformique est recueillie et déshydratée ; le solvant est éliminé par évaporation sous vide et le résidu d'extraction est repris par 1 ml de méthanol.

Les tests réalisés parallèlement avec des extraits mycéliens montrent qu'ils n'ont pas d'activité phytotoxique. Par contre, une faible activité de la phase aqueuse montre que l'extraction au chloroforme n'est pas complète.

2) Test sur tubercules

L'extrait est appliqué à raison de 10 µl par tubercule ; l'incubation du test est de 30 jours à 4°C et 10°C (tableau 2).

Les blessures évoluent de la même façon à 4°C et à 10°C. Les effets des extraits sont similaires à ceux des filtrats bruts : brunissement des tissus, induction d'un début de nécrose ; les lésions montrent un accroissement de 4 mm en profondeur et en diamètre de la blessure initiale. Le début de nécrose interne se manifeste à la surface du tubercule par une zone déprimée entourant la blessure et indiquant un effondrement du tissu interne. Le témoin au méthanol ne montre aucune évolution.

Tableau 2 : Effets des extraits des filtrats de culture de Phoma exigua var. foveata sur tubercules de pomme de terre.

température d'incubation		4°C	10°C
blessures corticales	aspect des lésions	zone déprimée externe. brunissement des tissus. début de nécrose.	
	évolution diamètre profondeur	} 3 mm	} 4 mm
blessures médullaires	aspect des lésions	brunissement des tissus. début de nécrose.	
	évolution diamètre profondeur	4 mm 1 mm	5 mm 4 mm

les dépôts d'extraits sont de 10 µl
(100 ml de filtrat donnent 100 µl d'extrait dans le méthanol)
l'incubation du test est de 30 jours.

3) Test sur tomate

L'extrait testé à raison de 5 µl pour 1 ml d'eau distillée provoque le flétrissement complet des plantules en moins de 24 heures. Les plantules trempées dans le mélange témoin eau et méthanol ne montrent aucun signe de flétrissement.

Conclusion

Les tests biologiques montrent la présence, dans les filtrats de culture de *Phoma exigua* var. *foveata*, de métabolites possédant une activité phytotoxique. Ces composés, solubles dans le méthanol et le chloroforme, sont capables d'induire un début de nécrose chez la pomme de terre et de provoquer le flétrissement des plantules de tomate.

III. FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

A - PRINCIPE

L'extrait obtenu à partir des filtrats de culture est chromatographié sur couche mince ; le chromatogramme est ensuite divisé en 10 bandes égales dont on teste l'activité biologique.

B - REALISATION

Après évaporation du chloroforme, l'extrait obtenu comme précédemment est repris par un volume minimal de méthanol, soit 200 μ l pour 1000 ml de filtrat brut.

La chromatographie est effectuée sur plaques de silicagel MERCK, type G, de 0,5 mm d'épaisseur, préparées avec un applicateur DESAGA. Avant l'emploi, les plaques sont activées à 105°C pendant 20 minutes.

L'extrait (350 μ l) est déposé en une bande continue à 2 cm du bord inférieur de la plaque. Le système de migration choisi est le mélange benzène/acétone (70/30, v/v). Pour obtenir une bonne migration, il est indispensable, après avoir effectué le dépôt, de saturer la plaque avec les vapeurs du système solvant.

Le chromatogramme est divisé en 10 bandes égales, la première incluant la totalité de la bande de dépôt et la dixième correspondant au front du solvant. Pour chaque bande, les substances sont recueillies en grattant le silicagel et éluées par du méthanol. Après évaporation sous vide, le résidu est repris par 200 μ l de méthanol et testé biologiquement.

Tableau 3 : Activité des fractions après chromatographie sur couche mince des extraits des filtrats de culture de *Phoma exigua* var. *foveata*.

Fraction	Aspect des blessures	Evolution de la taille des blessures (en mm)	
		en profondeur	en diamètre
Témoin (Méthanol)	sèches et cicatrisées grisâtres	0	0
F ₁	léger brunissement au niveau des dépôts	0	0
F ₂	zone externe déprimée. Brunis- sment marqué des tissus. Lésion très sèche, très creuse	4	7
F ₃	évolution du même type que la précédente mais plus faible	4	4
F ₄	lésions sèches et brunes	2	4
F ₅	zone déprimée externe. Lésion humide, nécrose humide et brune entourant la cavité formée	4	7
F ₆	léger brunissement des tissus lésions légèrement creusées	2	3
F ₇	faible brunissement	0	0
F ₈	identiques aux blessures témoins	0	0
F ₉ -F ₁₀	identiques aux blessures témoins	0	0

- blessures médullaires
- volume déposé = 20 µl/tubercule
- conditions d'incubation = 21 jours à 10°C.



C - RESULTATS

Les fractions sont testées sur plantules de tomate par trempage et sur tubercules de pomme de terre après blessures profondes. Dans ce dernier cas, l'incubation à 10°C n'est que de 21 jours.

Deux zones biologiquement actives sont ainsi détectées : la première est limitée aux fractions 2 et 3, la fraction 2 étant la plus active ; la seconde zone comprend les fractions 4, 5 et 6, mais l'activité est principalement située au niveau de la fraction 5 (tableau 3).

Les fractions toxiques provoquent le flétrissement des plantules de tomate au bout de 20 à 24 heures.

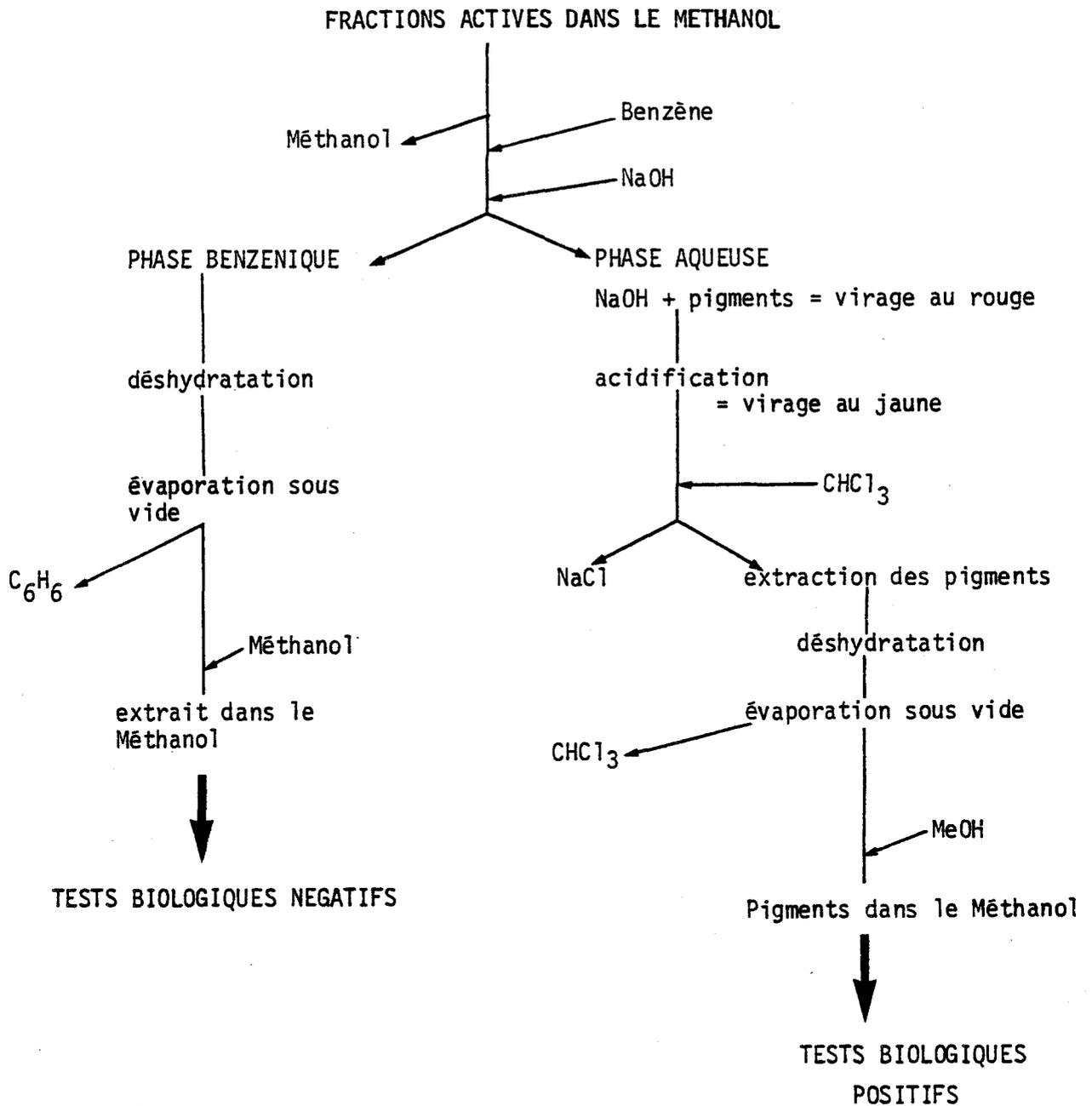
Sur les tubercules, elles ont des effets analogues à ceux des extraits : dépression de l'épiderme autour de la blessure, nécrose brune des tissus internes ; cependant, les fractions de la première zone active provoquent des nécroses sèches et les fractions de la seconde zone des nécroses humides dans lesquelles la cavité formée est entourée d'une pourriture brune et humide.

- Conclusion

La phytotoxicité des filtrats de culture de *Phoma exigua* var. *foveata* est au moins due à deux composés distincts ; chacun d'eux est capable d'induire un début de nécrose chez les tubercules traités ainsi qu'un flétrissement rapide des plantules de tomate.

D - PURIFICATION DES FRACTIONS ACTIVES

Les fractions actives sont toutes fortement colorées ; leur analyse par chromatographie en couche mince dans le mélange benzène/acétone (70/30, v/v), révèle la présence de pigments ainsi que de nombreux composés visibles après pulvérisation sur le chromatogramme d'acide sulfurique à 50 % et chauffage.



SCHEMA 1 : Schéma de purification des fractions actives.

Après évaporation sous vide du méthanol, chacune des fractions actives est reprise par du benzène et traitée par une solution de soude à 5 % qui provoque le virage immédiat au rouge, typique des pigments anthraquinoniques. La solution de soude est ensuite acidifiée à l'acide chlorhydrique jusqu'à virage au jaune des pigments qui sont alors extraits au chloroforme. La phase organique après séchage est évaporée sous vide et le résidu pigmenté repris dans du méthanol pour être testé biologiquement (schéma 1).

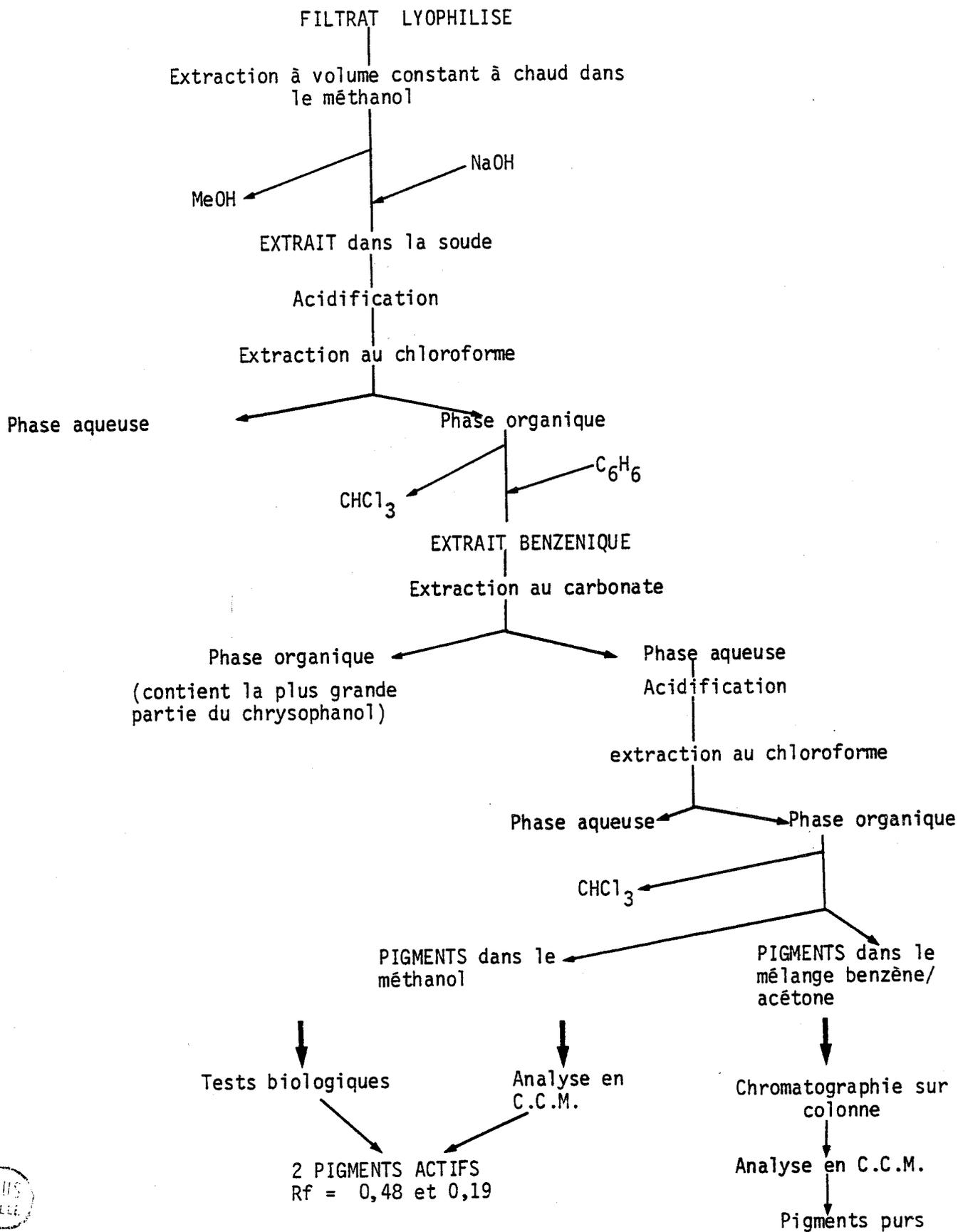
La phase benzénique contenant les autres composants du filtrat est déshydratée ; le solvant est éliminé et le résidu est repris dans du méthanol afin d'être également testé.

Le test par trempage des plantules de tomate montre que seuls les extraits renfermant les pigments sont actifs. Leur analyse par chromatographie sur plaque de silicagel dans le mélange benzène/acétone (70/30, v/v), révèle :

- pour le premier extrait la présence d'un pigment jaune orangé, de $R_f = 0,19$, et de nombreux pigments roses migrant de façon diffuse ;
- pour le deuxième extrait, la présence de deux pigments principaux, l'un de couleur orange et de $R_f = 0,57$ l'autre jaune pâle de $R_f = 0,48$ et une pigmentation diffuse rose, comme dans le premier extrait.

La révélation par pulvérisation d'acide sulfurique à 50 % et chauffage de la plaque, montre l'absence d'autres composés que les pigments. En conséquence, il y a de fortes présomptions pour que les toxines soient des pigments. Testés sur plantules de tomate par trempage, après élution dans le méthanol, seuls les pigments de $R_f = 0,19$ et $0,48$ se révèlent phytotoxiques. Mais à ce stade de purification, nous ne les récupérons pas parfaitement purs et des traces de pigments roses sont élués en même temps que le pigment principal.

Cette méthode de purification après fractionnement n'a pu être que qualitative parce que sur plaque les composés présents dans les extraits migraient de façon irrégulière ; c'est pourquoi, nous avons cherché à mettre au point une technique quantitative d'obtention des pigments actifs.



SCHEMA 2 : Méthode d'extraction des pigments anthraquinoniques actifs de *Phoma exigua* var. *foveata*.

IV. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES PIGMENTS PRESENTS DANS LES FRACTIONS ACTIVES

Les principaux pigments anthraquinoniques produits en culture par *Phoma exigua* var. *foveata* sont le chrysophanol, la pachybasine, l'émidine et la phomarine ; leur étude et leur isolement sont dus à BICK et RHEE (1966). Leur méthode d'extraction est basée sur les différences de solubilité des dérivés anthraquinoniques dans les solutions de soude, de carbonate et de bicarbonate de soude. Cependant, en présence de mélanges et d'impuretés, ces solubilités sont considérablement modifiées et l'application de cette méthode ne nous a pas permis la séparation des pigments présents dans les fractions actives. Néanmoins, par une technique voisine, nous arrivons à extraire du filtrat de culture un ensemble de pigments anthraquinoniques comprenant les dérivés actifs ; l'extrait est ensuite fractionné par chromatographie sur colonne et les pigments sont finalement purifiés par chromatographie en couche mince.

A - EXTRACTION DES PIGMENTS DU FILTRAT

Le filtrat de culture lyophilisé est extrait au méthanol jusqu'à ce que tous les composés colorés aient été prélevés (schéma 2). Après évaporation sous vide du méthanol, l'extrait est repris par une solution de soude à 5 % (poids/volume) amenant le virage au rouge des anthraquinones. Cette solution est acidifiée à l'acide chlorhydrique et les pigments régénérés sous leur forme jaune sont extraits au chloroforme. Après déshydratation de la phase organique qui seule est conservée, le solvant est éliminé et remplacé par du benzène. Une partie des pigments est extraite par une solution de carbonate de soude à 5 %. La phase benzénique qui contient les pigments insolubles dans le carbonate est écartée. La phase aqueuse est acidifiée et les pigments sont extraits au chloroforme. Cette dernière phase organique est déshydratée avant d'être évaporée sous vide et l'extrait coloré est repris dans un mélange benzène/acétone (70/30, v/v), pour être chromatographié sur colonne.



Tableau 4 : Résultats de la chromatographie sur colonne des extraits pigmentés.

Pigments présents dans l'extrait		Fractions obtenues après chromatographie sur colonne de silicagel	
Couleur et Rf (dans benzène/acétone, 70/30) sur silicagel G	Activité biologique	Eluant	Solubilité dans le méthanol
Jaune Rf = 0,72	--	C ₆ H ₆	+
Orange Rf = 0,57	--	C ₆ H ₆ / acétone (70/30)	---
Jaune pâle Rf = 0,48	+	C ₆ H ₆ / acétone (70/30)	---
Jaune Rf = 0,30	-	C ₆ H ₆ / acétone (60/40)	+
Jaune-brun Rf = 0,19	++	C ₆ H ₆ / acétone (50/50)	++
Rose diffus Rf = 0,0 à 0,6	--	fixés sur le silicagel	

L'analyse de cet extrait repris par du méthanol en chromatographie sur couche mince de silicagel avec le mélange benzène/acétone (70/30, v/v) comme système de migration montre qu'il est composé de 5 pigments principaux jaunes ou oranges et de nombreux pigments mineurs ; ces principaux pigments ont les Rf suivants : 0,72, 0,57, 0,48, 0,30 et 0,19. Testés biologiquement par trempage des plantules de tomate, seuls les pigments de Rf = 0,19 et 0,48 se révèlent phytotoxiques. Les autres pigments apparaissent inactifs (tableau 4). A ce stade de purification, les bandes récupérées ne sont pas pures, des traces de pigments roses étant éluées en même temps que le pigment principal

B - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Les meilleures séparation et purification sont obtenues sur colonne de silicagel MERCK, type 60, dans le benzène. Le silicagel fixe toutes les impuretés et la plupart des pigments roses. Seuls sont élués les 5 pigments principaux. A titre indicatif, une colonne de 15 cm de long et 4 cm de diamètre permet la séparation de 10 ml d'extrait (ces 10 ml proviennent des filtrats de culture de 180 fioles).

Une première fraction de couleur jaune, nommée F₁ est éluée par le benzène ; 3 autres fractions F₂, F₃, F₄ sont éluées par un mélange benzène/acétone contenant respectivement 30, 40 et 50 % d'acétone. La première des 3 fractions est de couleur orangée, les deux autres de couleur jaune (tableau 4).

Le solvant ou le mélange est évaporé sous vide et les fractions sont reprises par du méthanol pour être chromatographiées sur couche mince de silicagel dans le mélange benzène/acétone (70/30, v/v). La fraction F₁, éluée par le benzène ne contient qu'un seul pigment de Rf = 0,72. La fraction F₂ contient deux pigments l'un orange de Rf = 0,57 et l'autre jaune de Rf = 0,48, valeur identique à celle du pigment actif contenu dans le second extrait décrit précédemment dans le chapitre III. La fraction F₃ contient des traces des deux pigments précédents et un pigment de Rf = 0,30. La dernière fraction contient le pigment déjà caractérisé dans le premier extrait actif (chapitre III) ; son Rf est de 0,19.

A l'inverse de ceux des autres fractions, les pigments contenus dans la fraction F_2 sont peu solubles dans le méthanol et forment un abondant précipité.

C - PURIFICATION EN CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Seules les deux fractions F_2 et F_4 sont finalement purifiées par chromatographie en couche mince de silicagel G de 0,5 mm d'épaisseur.

Pour la première, le système de migration est le mélange benzène/éthyl formiate/acide formique (75/24/1, v/v/v), utilisé dans la séparation des colorants anthraquinoniques (RANDERATH, 1965). Le mélange benzène/acétone ne donne pas une séparation suffisante des 2 pigments.

Pour la seconde fraction, la migration se fait dans le mélange habituel benzène/acétone (70/30, v/v).

Les pigments phytotoxiques sont récupérés puis élués au méthanol ; après évaporation sous vide, les éluats sont repris par un volume minimal de méthanol.

Le pigment actif de $R_f = 0,19$ est parfaitement soluble dans le méthanol ; l'autre pigment jaune pâle de $R_f = 0,48$ est peu soluble dans cet alcool et cristallise. Ces deux composés sont respectivement nommés SA_1 et SA_2 .

Avec 18 l de milieu de culture initiaux, nous avons extrait 36 mg de SA_1 et 54 mg de SA_2 .

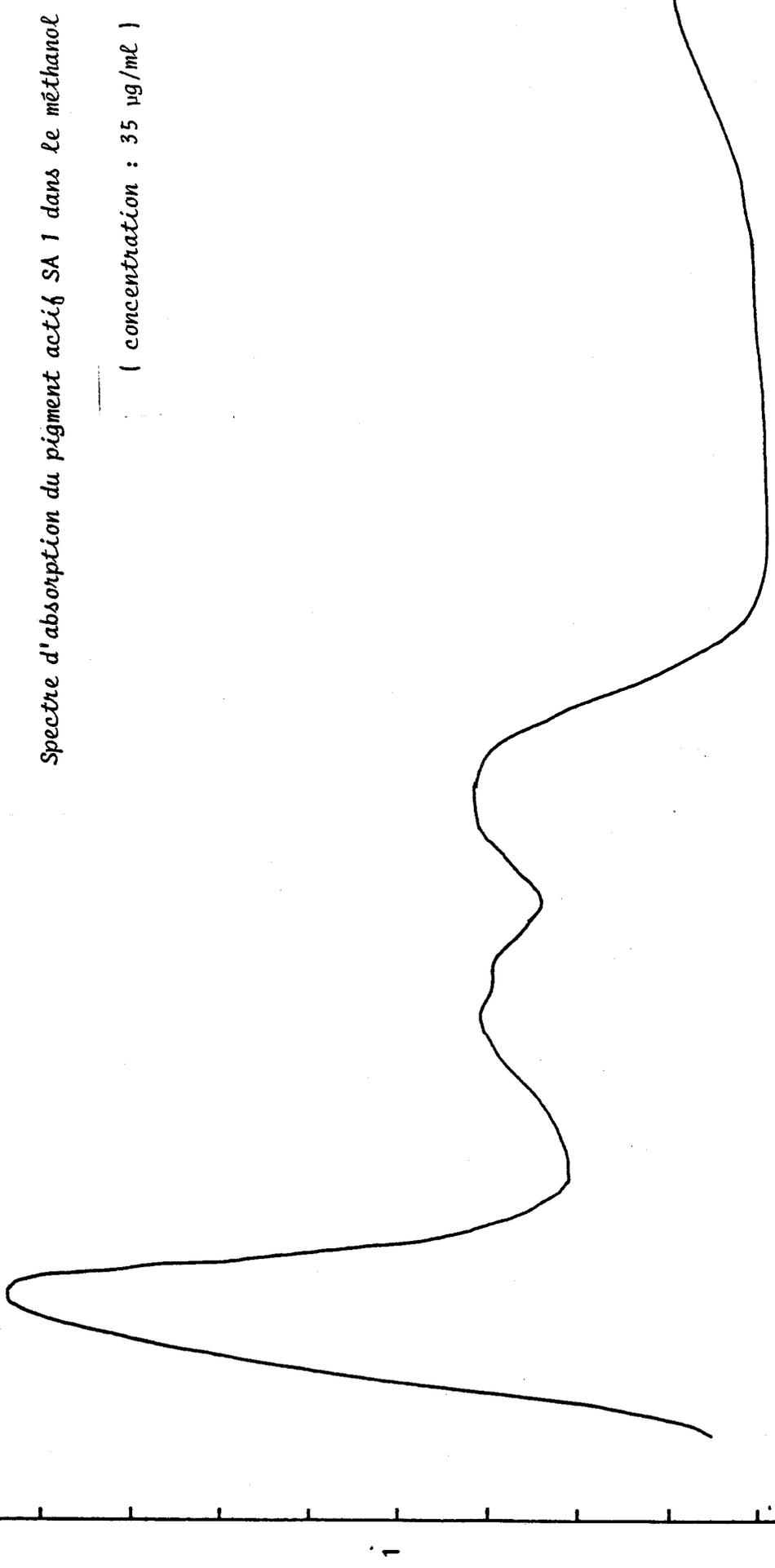
V. CARACTERISTIQUES DES PIGMENTS PURS

A - SOLUBILITE ET STABILITE

La première substance active, SA_1 , se présente sous l'aspect d'une poudre de couleur brun-rouge ; elle est soluble dans les solvants organiques que nous avons eus à utiliser : méthanol, éthanol, acétone,

Absorbance

2



Spectre d'absorption du pigment actif SA 1 dans le méthanol

(concentration : 35 µg/ml)



benzène, chloroforme, acétate d'éthyl ainsi que dans les solutions de carbonate et de bicarbonate de soude ; par contre, sa solubilité dans l'eau est faible.

La seconde substance active, SA₂, est de couleur jaune-pâle ; à froid, elle est peu soluble dans le méthanol et cristallise sous forme d'aiguilles courtes ; à chaud, sa solubilité augmente ; elle est relativement soluble dans le chloroforme, l'acétone, le formiate et l'acétate d'éthyl, faiblement soluble dans le benzène, l'hexane et les solutions de carbonate et bicarbonate de soude et totalement insoluble dans l'eau. En présence d'impuretés ou en mélange, sa solubilité augmente considérablement, notamment dans le méthanol.

Ces pigments perdent rapidement leur activité même lorsqu'ils sont conservés à basse température. Le pigment SA₂ est relativement stable à l'inverse du pigment SA₁ qui se décompose très rapidement notamment à température ambiante.

B - LES SPECTRES D'ABSORPTION

Les spectres d'absorption dans le visible et en lumière ultraviolette ont été déterminés dans le méthanol à la concentration de 35 µg/ml pour le pigment SA₁ et de 40 µg/ml pour le pigment SA₂.

Les maxima d'absorption se situent aux longueurs d'onde suivantes :

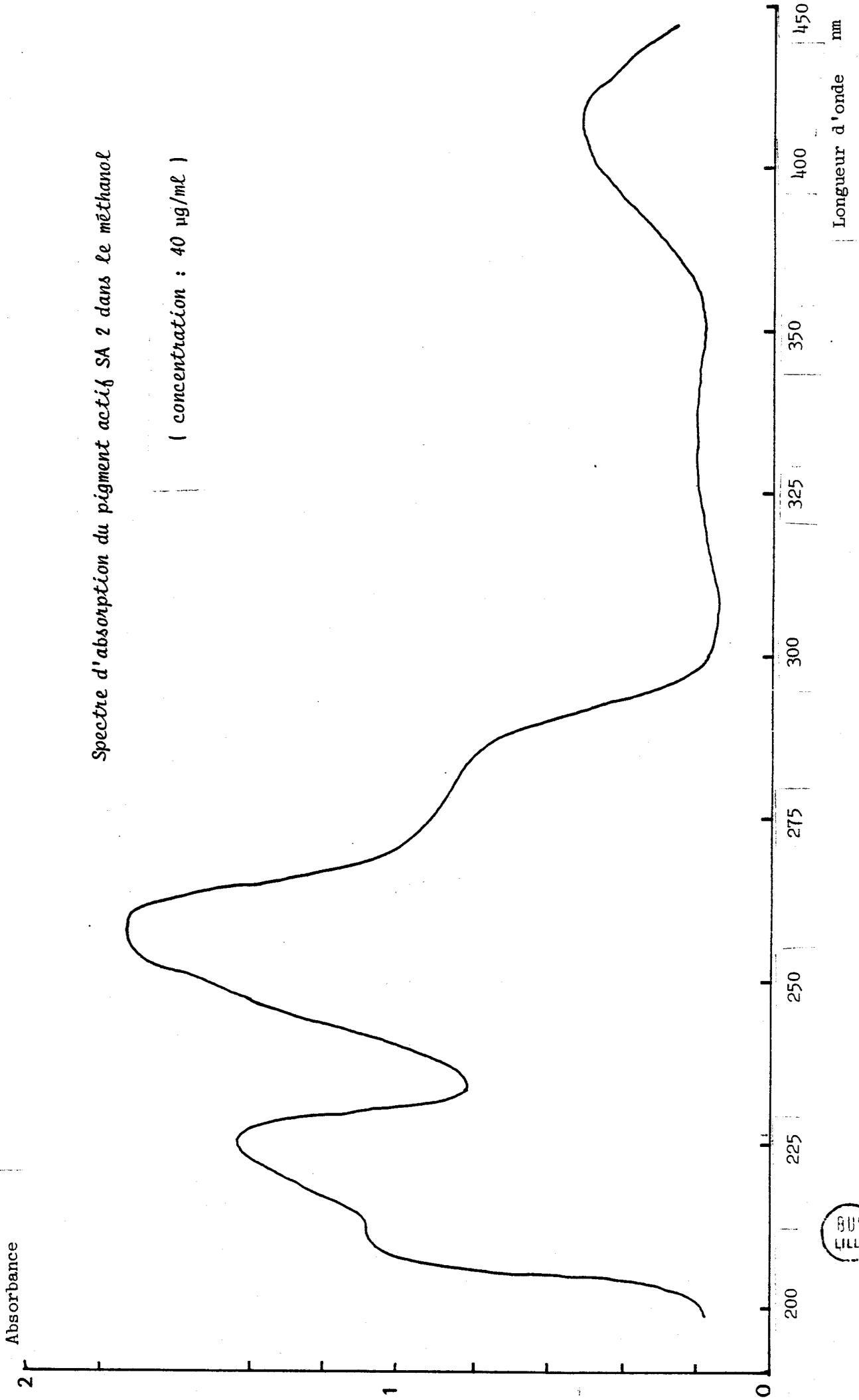
- pour SA₁ : 412, 279, 265 (épaulement), 252 et 218 nm ;
- pour SA₂ : 406, 283 (épaulement), 254 et 220 nm.

C - COMPORTEMENT EN CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Chromatographiés sur plaque de silicagel G de 0,25 mm d'épaisseur, les pigments SA₁ et SA₂ ont respectivement les R_f suivants :

Spectre d'absorption du pigment actif SA 2 dans le méthanol

(concentration : 40 µg/ml)



BUS
LILLE

- 0,19 et 0,48 dans le mélange benzène/acétone (70/30, v/v) ;
- 0,10 et 0,36 dans le mélange benzène/éthyl formiate/acide formique (75/24/1, v/v/v).

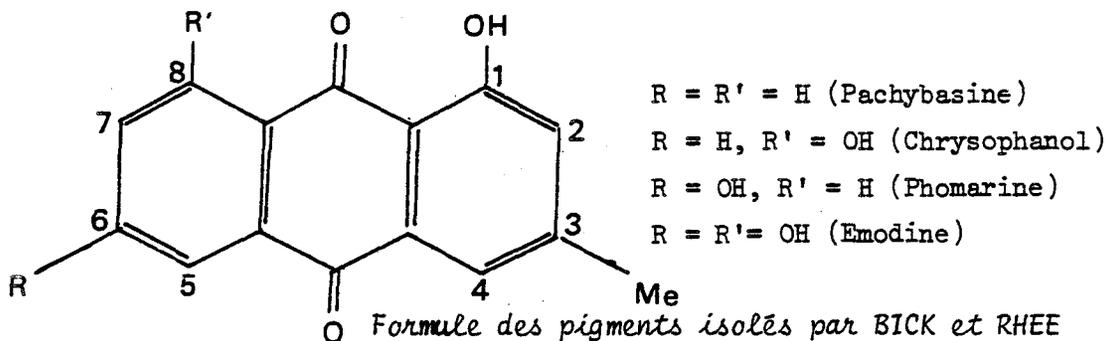
Après pulvérisation du chromatogramme à l'acide sulfurique à 50 % et chauffage, SA₁ donne une tache brune alors que la coloration jaune de SA₂ reste inchangée.

En raison de leur structure anthraquinonique, ils virent au rouge, rouge violacé pour SA₁ et rouge vif pour SA₂ après pulvérisation d'un mélange de 10 % de KOH dans l'éthanol.

L'examen de la plaque sous lumière ultraviolette (350 nm) révèle que seul le pigment SA₂ possède une fluorescence, de couleur orangée.

D - COMPARAISON AVEC LES PIGMENTS ISOLES PAR BICK ET RHEE

Les 4 pigments anthraquinoniques étudiés par BICK et RHEE dans les filtrats de culture de *Phoma exigua* var. *foveata* ont des formules voisines qui ne diffèrent que par le nombre et la position des groupements hydroxyl sur les carbones 6 et 8 (BICK et RHEE, 1966).



Deux d'entre eux, le chrysophanol et l'émodyne sont présents (SHARMA, RANGA et SWAMY, 1977 ; RAI, 1977) chez d'autres champignons et chez de nombreuses plantes supérieures. La comparaison directe avec des échantillons du commerce de ces composés, montre qu'ils sont présents dans les filtrats de culture mais qu'ils ne correspondent pas aux dérivés actifs ; le chrysophanol est le pigment qui, peu soluble dans les solutions de carbonate reste en grande partie dans la phase benzénique au cours de l'extraction ; dans le mélange benzène/acétone (70/30, v/v), en couche

Tableau 5 : Détermination du seuil d'activité de SA₁ sur plantules de tomate (test à tempage).

Concentration de SA ₁ (en µg/ml)	Evolution du flétrissement			
	18 heures	24 heures	48 heures	72 heures
Témoin : méthanol + eau	-	-	-	-
5	-	-	-	-
12,5	-	début de flétrissement	flétrissement complet	
25	flétrissement avancé	flétrissement complet		
50	flétrissement complet			
75	flétrissement complet			
100	flétrissement complet			

- = aucune activité



mince, son Rf est de 0,72. L'émodine est le pigment orangé qui en chromatographie sur colonne est élué avec le pigment SA₂.

Pour les deux autres, la comparaison directe étant impossible, nous avons comparé à partir des données bibliographiques leurs comportements au cours des extractions, leurs spectres d'absorption et leurs points de fusion avec ceux des pigments actifs ; la phomarine ne correspond ni à l'un ni à l'autre des pigments actifs ; par contre, la pachybasine et le pigment SA₂ ont des comportements voisins : pures, ces substances cristallisent dans le méthanol et sont insolubles dans les solutions de carbonate et de bicarbonate de soude ; elles ont des spectres d'absorption proches dont les maxima se situent aux longueurs d'onde suivantes : 406, 283 (épaulement), 254, 220 pour SA₂ et 403, 281 (épaulement), 252 nm, 224 nm pour la pachybasine (BICK et RHEE, 1966). Leurs points de fusion sont 181°C pour SA₂ et 176°C pour la pachybasine. Ces différentes caractéristiques nous font penser qu'il s'agit du même composé. Les légères différences observées sont vraisemblablement dues à l'état de pureté de la substance SA₂. Seule l'étude de la structure de cette molécule permettra de savoir de façon certaine si ce pigment est effectivement la pachybasine.

Le pigment SA₁ ne correspond à aucun des pigments étudiés par BICK et RHEE ; c'est un composé instable qui se dégrade rapidement à température ambiante.

E - DOSAGES BIOLOGIQUES

1) SA₁ —

Le seuil d'activité de ce composé a été déterminé par trempage des plantules de tomate dans des solutions de concentrations allant de 5 à 100 µg/ml.

Plongées dans des solutions de concentrations comprises entre 12,5 µg/ml et 100 µg/ml, les plantules flétrissent entre 18 et 72 heures ; à la concentration de 5 µg/ml aucune toxicité n'est observée (tableau 5).

Ce pigment a également été testé sur tubercules après blessure profonde et avec une durée d'incubation de 30 jours à 10°C. Deux doses ont été appliquées : 10 et 25 µl d'une solution à 8µg/µl. A 10 µl, on observe une légère augmentation de la taille des blessures initiales de 3 à 4 mm en profondeur et en diamètre ainsi qu'un dessèchement et un brunissement des tissus entourant la lésion. Pour un dépôt de 25 µl, le brunissement des tissus est très marqué, les blessures augmentent de 4 mm en profondeur et de 7 mm en diamètre ; à la surface du tubercule, une zone déprimée se forme autour de la blessure initiale.

2) SA₂

Pur, ce pigment cristallise dans le méthanol dans lequel sa solubilité est inférieure à 2 % . De plus, une solution méthanolique de SA₂ floccule puis précipite lorsqu'elle est mélangée à de l'eau distillée. L'évaluation de son activité par le test trempage est donc sujette à caution, toutefois des solutions à 50 µg/ml amènent une plasmolyse des hypocotyles en 48 heures et un flétrissement des plantules en 72 heures ; pour des solutions à 25 µg/ml aucune activité n'est observée.

En raison de sa faible solubilité dans le méthanol, pour le test sur tubercule nous n'avons pu l'appliquer dissoute qu'aux doses de 50, 25, 10 µl à la concentration de 2 µg/ µl. A ces concentrations, cette substance n'a aucune activité ; à des concentrations supérieures, elle cristallise dans le solvant et sous forme cristallisée n'a pas plus d'effet.

VI. DETECTION DES PIGMENTS ACTIFS DANS LES NECROSES DUES A *PHOMA EXIGUA* VAR. *FOVEATA*

A - OBTENTION DES TISSUS NECROSES

Des fragments de mycélium de *Phoma exigua* var. *foveata* sont inoculés à des tubercules blessés, préalablement désinfectés. Après 9 semaines d'incubation à 4°C des tubercules traités, nous prélevons les tissus nécrosés.

B - TRAITEMENT DES TISSUS NECROSES

Après avoir été lyophilisés et broyés, les tissus sont extraits de la même façon que les filtrats de culture, à la soude et au carbonate de soude. L'extrait final dans le méthanol est centrifugé et le culot est éliminé ; 10 µl d'extrait correspondant à 20 mg de tissu lyophilisé. Le surnageant est concentré afin d'être analysé en chromatographie en couche mince et testé biologiquement.

C - RESULTATS DU TEST BIOLOGIQUE

Disposant de faibles quantités d'extraits, nous avons choisi de les tester sur plantules de tomate décapités. 72 heures après le dépôt de 2 µl d'extrait de tissu nécrosé sur la section des hypocotyles, nous observons une plasmolyse sur une longueur de 4 mm.

D - RESULTATS DE LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Les extraits sont déposés sur plaque de silicagel ainsi que des dépôts témoins de 1 µg des pigments purs dans le méthanol. Le système de migration est le mélange benzène/acétone (70/30, v/v).

De nombreux composés sont extraits en même temps que les pigments ; néanmoins nous pouvons identifier dans les extraits de nécroses dues à *Phoma exigua* var. *foveata* les principaux pigments synthétisés par le champignon *in vitro* : le chrysophanol, l'émodyne, le pigment de Rf = 0,30 ainsi que les dérivés actifs SA₁ et SA₂.

E - COMPARAISON AVEC *PHOMA EXIGUA* VAR. *EXIGUA*

Parallèlement, nous avons réalisé le même essai avec le second agent de la gangrène, *Phoma exigua* var. *exigua*. Ce champignon a été cultivé sur le milieu synthétique adopté pour la variété *foveata* dans les mêmes conditions que ce dernier, afin de tester l'activité des filtrats de culture et de leurs extraits ; nous avons pu constater que testés par trempage de plantules de tomate ils ne possédaient aucune activité, qu'il s'agisse des filtrats bruts ou des extraits. Par contre, les extraits de nécroses dues à *Phoma exigua* var. *exigua* possèdent une légère toxicité : appliqués sur plantules décapitées, ils provoquent la plasmolyse de l'hypocotyle sur 2 mm de longueur. Cette activité est peut être imputable aux

produits de réactions ou de dégradation des tubercules puisqu'à partir de cultures pures, nous n'observons aucune activité. Cependant, nous ne pouvons que le supposer n'ayant pas effectué de tests avec des extraits de tubercules non inoculés, blessés ou non. Il est par ailleurs possible que le milieu de culture que nous avons utilisé ait été impropre à la production de composés toxiques spécifiques de *Phoma exigua* var. *exigua* en quantité suffisante pour être décelée par les tests biologiques.

Analysés par chromatographie en couche mince, les extraits de culture pure ou de nécroses révèlent la présence de nombreux composés, mais nous ne détectons jamais de dérivés anthraquinoniques.

Nous n'avons pas non plus décelé dans les filtrats de culture de notre souche de *Phoma exigua* var. *exigua*, ni dans les extraits de tissus nécrosés, la cytochalasine B. Ce composé phytotoxique a été mis en évidence par BOUSQUET et BARBIER dans les cultures de plusieurs variétés de *Phoma exigua* Desm., dont des souches de la variété *exigua* isolées à partir de nécroses de pomme de terre. Ce composé présent dans les cultures de *Phoma exigua* var. *inoxydabilis* Boerema et Vegh, parasite de la pervenche mineure, est absent des filtrats de culture des souches de *Phoma exigua* var. *foveata* utilisées au cours de notre expérimentation.

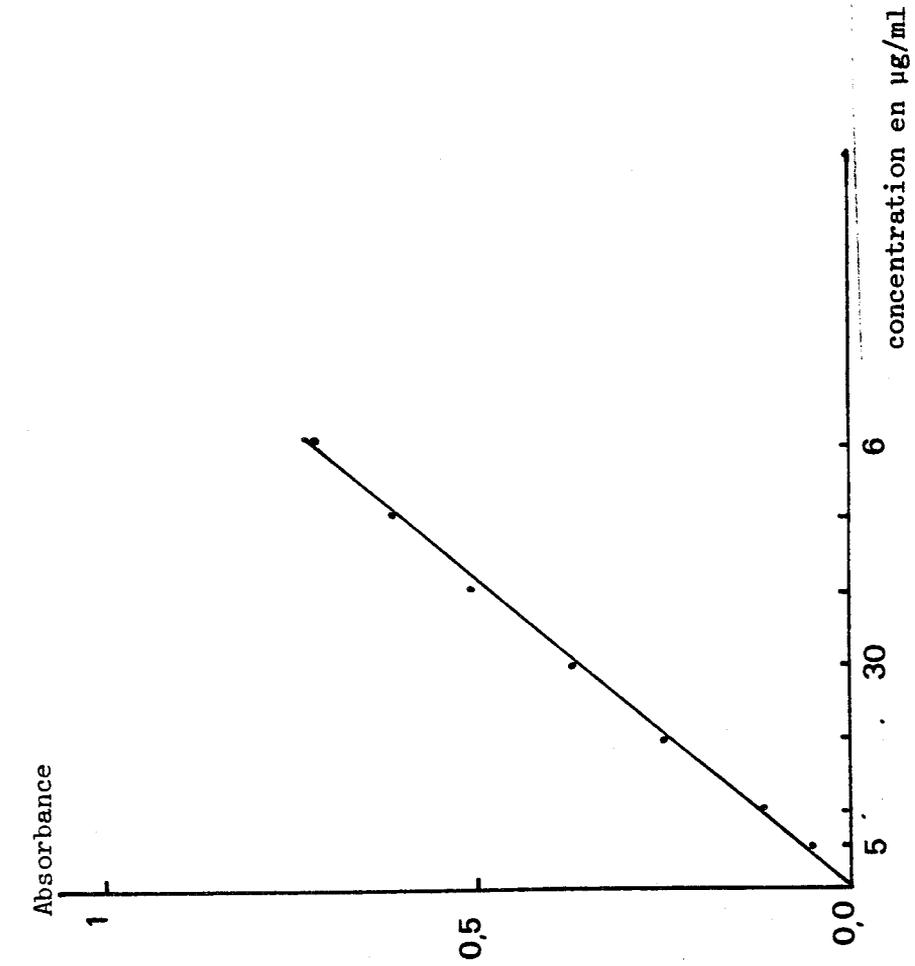
VII. PRODUCTION DE PIGMENTS ACTIFS PAR *PHOMA EXIGUA* VAR. *FOVEATA* IN VITRO EN FONCTION DE LA NUTRITION CARBONÉE

A - PRINCIPE

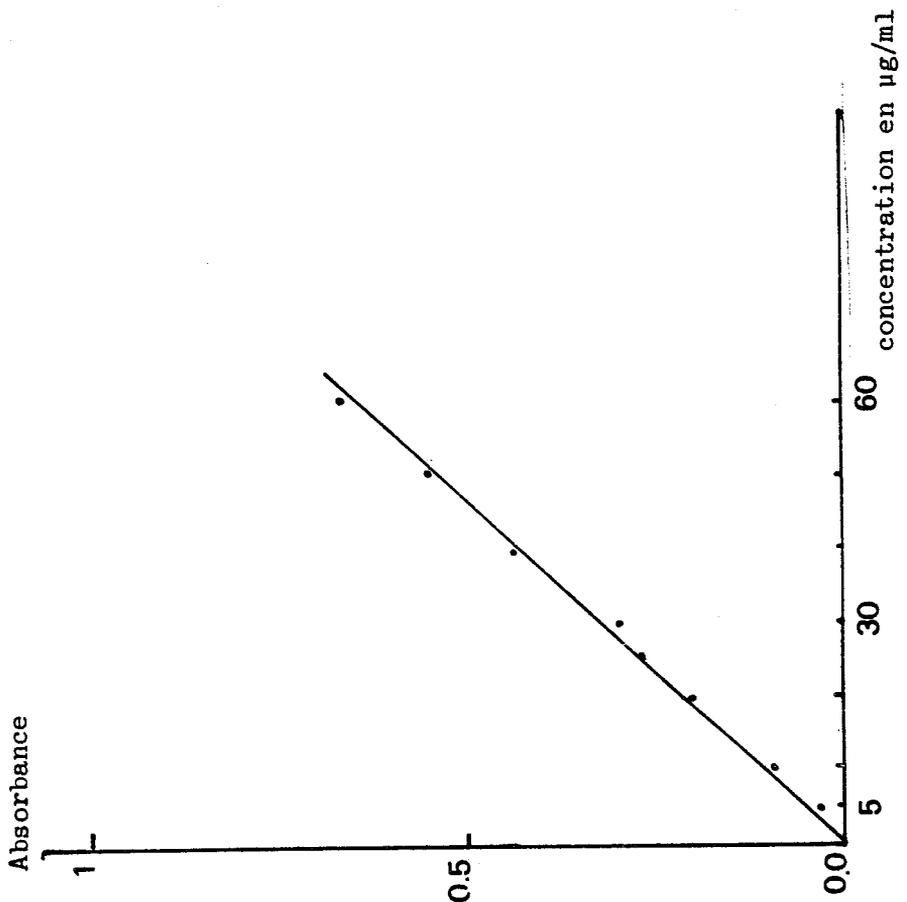
Lors d'essais préliminaires, nous avons constaté que *Phoma exigua* var. *foveata* se développait bien sur différents milieux, naturels ou synthétiques, pourvu que l'apport en glucides fût suffisant. Contrairement à la croissance, la production de pigments se montrait très variable non seulement d'un milieu à l'autre mais aussi sur un même milieu en fonction de la source de carbone. D'une façon générale, les cultures réalisées sur glucose ou diholosides étaient beaucoup plus pigmentées que les cultures sur polysaccharides.



Graphe 1 : Gamme étalon du pigment SA 2 à 406 nm
dans le méthanol



Graphe 2 : Gamme étalon du pigment SA 1 à 412 nm
dans le méthanol



Le but de cet essai a été de comparer la quantité de pigments produits et l'activité biologique des cultures de *Phoma exigua* var. *foveata* en fonction de la nutrition carbonée.

B - REALISATION

Nous avons cultivé *Phoma exigua* var. *foveata* en présence de différents sucres : un hexose, le glucose, un diholoside, le saccharose et deux polysaccharides, les maltodextrines et l'amidon. Chacun de ces éléments est ajouté au milieu à raison de 20 g/l. Les filtrats de culture obtenus et leurs extraits sont testés biologiquement sur plantules de tomate et les pigments actifs SA₁ et SA₂ sont dosés au spectrophotomètre après purification.

Le champignon est cultivé dans les conditions habituelles ; le milieu minéral et azoté reste le même, seule varie la source de carbone.

Après 15 jours de culture, nous comparons la croissance de *Phoma exigua* var. *foveata* sur les différents milieux en mesurant le poids de matière sèche obtenu dans chacun des cas. Les filtrats recueillis servent aux dosages des pigments et aux tests biologiques. Les pigments sont extraits selon la méthode précédemment décrite.

Les pigments SA₁ et SA₂ ont été dosés dans le méthanol respectivement à 412 nm et 406 nm.

Pour chacun des pigments à doser, nous avons réalisé à partir d'une solution mère à 100 µg/ml des solutions à 60, 50, 40, 30, 20, 10 et 5 µg/ml ; nous obtenons ainsi une gamme étalon qui nous permet de déterminer la quantité de pigment présente dans l'extrait et le filtrat brut initial (graphes 1 et 2).

Pour pouvoir doser les pigments par cette méthode, il est nécessaire de les obtenir purifiés. Les pigments extraits dans un premier temps dans une solution de carbonate, sont purifiés par deux chromatographies successives sur gel de silice en utilisant le mélange benzène/acétone (70/30, v/v) et le mélange benzène/éthyl formiate/acide formique (75/24/1).

Parallèlement aux dosages au spectrophotomètre nous avons comparé l'activité biologique des filtrats et de leurs extraits ; les tests ont été effectués à deux reprises sur plantules de tomate par trempage : la première fois sur les extraits méthanoliques des filtrats bruts lyophilisés, la seconde fois sur les extraits de pigments solubles dans le carbonate.

C - RESULTATS

1) Croissance en poids de matière sèche

La croissance de *Phoma exigua* var. *foveata*, en poids sec, est homogène sur tous les milieux bien que l'aspect des cultures soit différent.

Poids de matière sèche obtenue après 15 jours de culture à 21°C à l'obscurité

<u>Milieu</u>	<u>Poids de matière sèche</u>
Glucose	0,843 g
Saccharose	0,849 g
Maltodextrines	0,878 g
Amidon	0,793 g

Chaque mesure représente la moyenne obtenue avec 6 fioles de Roux, contenant initialement 100 ml de milieu de culture.

2) Tests biologiques

avec les filtrats lyophilisés extraits au méthanol : les extraits méthanoliques des filtrats bruts sont dilués dans l'eau distillée, de façon à obtenir une concentration équivalente à celle du filtrat initial ; ainsi testés les filtrats de culture de *Phoma exigua* var. *foveata* sur amidon et malto-dextrines n'ont aucune activité ; seuls les extraits des cultures sur saccharose et glucose sont actifs, ce sont aussi les plus pigmentés.

Tableau 6 : Activité biologique des extraits en fonction de la nutrition carbonée de *Phoma exigua* var. *foveata*.

Durée du test	SOURCE CARBONÉE											
	Glucose concentration de l'extrait/ml			Saccharose concentration de l'extrait/ml			MDO ₃ concentration de l'extrait/ml			Amidon concentration de l'extrait/ml		
	20µl	10µl	5µl	20µl	10µl	5µl	20µl	10µl	5µl	20µl	10µl	5µl
24 heures	F.C.	F.A.	-	F.C.	F.A.	-	F.C.	F.D.	-	-	-	-
40 heures		F.C.	F.D.		F.C.	F.D.		F.A.	-	-	-	-
48 heures			F.D.			F.D.		F.C.	-	-	-	-
72 heures			F.D.			F.D.			-	-	-	-

Le test est effectué sur plantules de tomate

Légende : F.C. = flétrissement complet - F.A. = flétrissement avancé
 F.D. = début de flétrissement - - = aucune activité

20 µl - 10 µl - 5 µl = concentrations des extraits/ml de solution



avec les extraits de pigments solubles dans le carbonate : nous les avons testés à 3 concentrations différentes, 5, 10, 20 $\mu\text{l/ml}$, 500 ml de filtrat brut initial donnant un volume d'extrait égal à 2,5 ml. A ces concentrations, les extraits des cultures sur amidon ne sont pas toxiques, alors que ceux obtenus sur maltodextrines le sont aux doses de 10 et 20 $\mu\text{l/ml}$. Les extraits de culture sur saccharose et glucose sont légèrement toxiques à la concentration de 5 $\mu\text{l/ml}$, l'activité devenant plus marquée quand la concentration augmente (tableau 6).

3) Résultats des dosages

Phoma exigua var. *foveata* produit les mêmes pigments quelle que soit la source de glucide ; quantitativement les différences sont très importantes : le pigment SA_2 est toujours produit en quantités plus importantes que le pigment SA_1 . En présence de glucose, de saccharose et de maltodextrines, le rapport de production SA_2/SA_1 est de 1,5 ; en présence d'amidon SA_1 n'est synthétisée qu'à l'état de traces, de l'ordre de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de filtrat.

Concentrations en pigments actifs pour les différentes sources de carbone (exprimées par rapport au glucose servant de référence)		
	$\frac{\text{SA}_1}{-}$	$\frac{\text{SA}_2}{-}$
glucose	1	1
saccharose	0,8	1,1
maltodextrines	0,5	0,5
amidon	0,05 (traces)	0,15 à 0,20

Ces résultats concordent avec ceux des tests biologiques : les extraits de culture sur glucose et saccharose ont des concentrations en pigments actifs proches et des activités voisines. La production de pigments en présence d'amidon est faible et l'activité biologique nulle. Entre ces deux extrêmes, la pigmentation et la toxicité des cultures sur maltodextrines est moyenne.

Conclusion

De cet essai, deux faits sont à retenir :

1 - l'activité biologique des filtrats de culture est fonction de leur pigmentation ; plus la synthèse des dérivés anthraquinoniques est importante, plus la toxicité des filtrats de culture est élevée ;

2 - la production des pigments *in vitro* dépend de la nutrition du champignon ; pour le milieu que nous avons adopté, elle est favorisée en présence de glucose et de saccharose faible sur amidon et moyenne sur maltodextrines, confirmant le schéma général précédemment entrevu.

Il est à noter que ces glucides, glucose, saccharose et amidon, représentent avec le fructose et leurs dérivés glucose-6-phosphate et fructose-6-phosphate la presque totalité des glucides de la pomme de terre, milieu hôte du champignon.

CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE

L'agent de la gangrène de la pomme de terre, *Phoma exigua* var. *foveata* produit en culture *in vitro* des substances phytotoxiques. Ces composés, qui ont une action non spécifique, amènent un flétrissement rapide des plantules de tomate. Chez la pomme de terre, ils provoquent un début de nécrose comparable à celui que produit l'inoculation du champignon dans un tubercule blessé. Après extraction et purification, les substances actives se sont révélées être deux des pigments anthraquinoniques qui donnent aux cultures de *Phoma exigua* var. *foveata* leur couleur jaune. L'un de ces dérivés, de couleur jaune pâle, n'a qu'une activité faible ; et, il semble qu'il s'agisse de la pachybasine précédemment mise en évidence dans les cultures de *Phoma exigua* var. *foveata* par BICK et RHEE ; le second de couleur brun-jaune se montre beaucoup plus toxique.

Leur présence dans les tissus nécrosés suggère qu'ils pourraient jouer un rôle dans le développement de la gangrène au cours de la conservation. Dans les conditions que nous avons expérimentées, leur production *in vitro*, comme celle des autres pigments, dépend de la nutrition carbonée du champignon : faible sur amidon, elle est favorisée par la présence du glucose ou de saccharose dans le milieu de culture. Bien que nos essais sur la production des composés toxiques en relation avec la nutrition carbonée de *Phoma exigua* var. *foveata* aient été très limités, cette dernière observation nous semble particulièrement importante. En effet, de nombreux facteurs sont susceptibles de modifier les teneurs relatives en glucides des tubercules au cours de la conservation : notamment le vieillissement, la conservation à basse température, les blessures augmentent les taux de saccharose et de sucres réducteurs. Par conséquent, l'état physiologique des tubercules blessés conservés à 4°C permettrait de fournir des conditions favorables au développement du parasite à la fois à cause de la lenteur de la cicatrisation mais également à cause de leur teneur élevée en sucres réducteurs et en saccharose.

CONCLUSION GENERALE

L'analyse des différents travaux portant sur la gangrène de la pomme de terre due à *Phoma exigua* var. *foveata* nous a montré que le problème pratique posé par la nécrose des tubercules recouvrait une réalité autrement préoccupante, la contamination sans symptômes du plant. Cette infection latente, susceptible d'évoluer en nécrose au cours de la conservation ou de se transmettre aux tubercules fils l'année suivante, a eu de très lourdes conséquences commerciales, en entamant la confiance que pouvaient avoir les acheteurs dans certaines productions de plant. La relation triangulaire existant entre cette contamination latente, la blessure et l'apparition de la nécrose a tout naturellement conduit à ne voir la maladie que sous un aspect externe. Cette interprétation paraissait d'autant plus logique que les possibilités de contamination externe des tubercules étaient multiples mais, elle a eu pour conséquence de méconnaître le rôle de l'infection latente des tiges dans la contamination des tubercules et de négliger l'éventualité d'une contamination systémique de l'agent pathogène.

Par des expériences en champ, entreprises à la suite de cette analyse, nous avons pu démontrer qu'à partir des tiges parasitées, le champignon pouvait être transmis aux tubercules selon deux modes différents :

- par voie interne, de façon systémique par l'intermédiaire des stolons ;
- par voie externe après la formation des pycnides sur les fanes.

Le rôle des facteurs climatiques s'est révélé capital dans la réalisation de ce double mécanisme infectieux.

Cette contamination latente, interne ou externe, ne donnera de nécroses qu'après blessure, et nous pouvons penser que l'évolution du



processus nécrotique dans les tubercules endommagés est liée à la production de composés phytotoxiques par le champignon.

Ces deux facteurs, contamination systémique des tubercules et production de toxines par *Phoma exigua* var. *foveata* font entrevoir la maladie sous un jour nouveau.

La contamination interne des tubercules expliquerait l'inefficacité des fongicides qui sont principalement des traitements de surface, lorsqu'ils ne sont pas appliqués dès la récolte ou dès le conditionnement, ce qui sous-entend sur des tubercules blessés. Leur inefficacité progressive ne proviendrait pas d'une pénétration de l'inoculum externe dans le périoderme, ainsi que le supposent certains auteurs, mais de la cicatrisation du tubercule empêchant le fongicide d'atteindre l'inoculum interne.

Ce mode de contamination, par voie systémique des tubercules, nous semble prépondérant dans la propagation de la maladie :

- d'une part, parce que l'inoculum ainsi transmis ne peut pas être éliminé par des traitements externes ;
- d'autre part, parce qu'un taux d'inoculum interne, même minime, du plant peut amener, si les conditions climatiques sont favorables, un taux élevé de tubercules fils contaminés. En outre, lorsque les facteurs externes sont peu propices à la maladie, la transmission systémique du parasite n'est jamais nulle et assure ainsi le maintien d'un certain potentiel infectieux.

La production de toxines par *Phoma exigua* var. *foveata* expliquerait le développement particulier des nécroses dans les tubercules blessés maintenus à 4°C. Ce mode de conservation, qui est nécessaire pour préserver la vitalité du plant, favorise le parasite latent dans la compétition qui existe au niveau des tubercules blessés contaminés entre la cicatrisation et le développement du champignon. En effet, il est bien connu qu'à des températures égales ou supérieures à 15°C, la formation du périoderme de blessure est très rapide et les nécroses n'apparaissent pas. A 4°C, au contraire, ces réactions sont à la fois lentes et incomplètes et bien que le parasite se développe lentement dans ces conditions, sa croissance pourrait être suffisante pour que les composés toxiques soient produits enclanchant le processus nécrotique. Par ailleurs, la conservation à basse température modifie l'équilibre biochimique des tubercules dans le sens d'une augmentation du taux de sucres réducteurs, qui *in vitro* se sont révélés favorables à la production de ces composés phytotoxiques.

B I B L I O G R A P H I E

- ADAMS M.J. et R.L. GRIFFITH, 1978. - The effect of harvest date and duration of wound healing conditions on the susceptibility of damaged potato tubers to infection by *Phoma exigua* (gangrene). *Ann. appl. Biol.*, 88 : 51-55.
- ALCOCK N.L. et C.E. FOISTER, 1936. - A fungus disease of stored potatoes. *Scott. J. Agric.*, 19 : 252-257.
- ARTSCHWAGER E., 1927. - Wound periderm formation in the potato as affected by temperature and humidity. *J. agric. Res.*, 35 : 995-1000.
- BAK HENRIKSEN J., 1975. - Infection by gangrene (*Phoma exigua* var. *foveata*) as influenced by temperature and humidity. In : *6th Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Wageningen* : 186-188.
- BANNON E., 1975. - Selective isolation of *Phoma exigua* var. *foveata* and other species of *Phoma* from soil. In : *6th Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Wageningen* : 34-36.
- BANNON E., 1978. - Detection of species of *Phoma* on stems and leaves of Potato. In : *7th Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Warsaw* : 215-217.
- BICK I.R.C. et C. RHEE, 1966. - Anthraquinone pigments from *Phoma foveata* Foister. *Biochem. J.*, 98 : 112-116.
- BOEREMA G.H., 1967. - The *Phoma* organisms causing gangrene of potatoes. *Netherlands J. Pl. Path.*, 73 : 190-192.
- BOEREMA G.H., 1976. - The *Phoma* species studied in culture by Dr. R.W.G. DENNIS. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 67 : 289-319.

- BOEREMA G.H. et H.A. VAN KESTEREN, 1952.- *Phoma* = achtige schimmels bij aardappel. *Versl. Mededel. Plantenziektenk. Dienst*, 136 : 201-209.
- BOEREMA G.H. et L.H. HOWELER, 1967. - *Phoma exigua* Desm. and its varieties . *Persoonia*, : 15-28 .
- BOUSQUET J.F. et M. BARBIER, 1972. - Sur l'activité phytotoxique de trois souches de *Phoma exigua* et la présence de Cytochalasine B (ou Phomine) dans leur milieu de culture . *Phytopath. Z.*, 75 : 365-367.
- BOYD A.E.W., 1971.- The effect of planting seed tubers affected by dry rot (*Fusarium caeruleum*) and gangrene (*Phoma foveata*). *Rep. Edinburgh Sch. of Agricult. for 1970* : 20-21.
- BOYD A.E.W. et J.W.H. LOGAN, 1967.- The effect of planting seed tubers affected by dry rot (*Fusarium caeruleum*) and gangrene (*Phoma foveata*). *Rep. Edinburgh Sch. of Agricult. for 1966*: 25-27.
- BURTON W.G., 1966. - The potato (second edition). H. VEENMAN and ZONEN N.V., Wageningen, The Netherlands.
- COPELAND R.B. et C. LOGAN, 1975. - Control of tuber diseases, especially gangrene with Benomyl, Thiabendazole and other fungicides. *Potato Res. Netherland*, 18 : 179-188.
- COPELAND R.B. et C. LOGAN, 1976. - The effect of interval from haulm destruction to harvest on the gangrene potential of tubers in storage. *Potato Res.*, 19 : 203-213.
- CROSNIER J.C., 1973. - Culture de plants. Production de petits et moyens tubercules. *Fiche Inform. ITP n° 49*.
- CROSNIER J.C., P. BEGEL et J.C. LARNICOL, 1978. - Nouvelles techniques de traitement des plants de pomme de terre utilisées pour lutter contre les maladies de conservation. In : *7th Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Warsaw* : 129-130.
- DEHORTER B., 1972. - Biologie et physiologie de la reproduction sexuée de *Nectria galligena* Bres. *Thèse 3ème Cycle, Lille*.
- DENNIS R.W.G., 1946. - Notes on some british fungi ascribed to *Phoma* and related genera. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 29 : 11.
- DESMAZIERES J.B.H.J., 1849. - Dix-septième notice sur les plantes cryptogames récemment découvertes en France. *Ann. Sc. Nat., Bot., Sér.*, 3, 11 : 273-285, 339-365.
- DORENBOSCH M.M.J., 1970. - Key to nine ubiquitous soil-borne *Phoma*-like fungi. *Persoonia*, 1 : 1-14.
- ENTWISTLE A.R., 1971. - The infection of potatoes by *Phoma exigua*. *Ann. appl. Biol.*, 69 : 213-222.

- ENTWISTLE A.R., 1972. - Study of *Phoma exigua* population in the field. *Trans. Br. mycol. soc.*, 58 : 217-223.
- FEDERATION NATIONALE DES PRODUCTEURS DE PLANTS DE POMMES DE TERRE, 1973. - Mission d'étude aux Pays-Bas, non publié.
- FOISTER C.E., 1940. - Descriptions of new fungi causing economic diseases in Scotland. *Trans. bot. soc. Edimburgh*, 33 : 65-68.
- FOISTER C.E., 1952.- The distribution and prevalence of potato gangrene. *Pl. Path.*, 1 : 85 - 86 .
- FOISTER C.E., A.R. WILSON et A.E.W. BOYD, 1945. - Potato dry rot and gangrene as soil-borne diseases. *Nature*, 155 : 793-794 .
- FOX R.A. et E.P. DASHWOOD, 1972. - Potato gangrene. *Scott. Agricult.*, 51 : 372-376.
- FOX R.A. et E.P. DASHWOOD, 1975a . - Observations on the relationships between viable counts on tubersphere and soils, data from tuber baiting and the incidence in stored tubers of gangrene (*Phoma exigua* var. *foveata*). *6th Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Wageningen*, 24-26.
- FOX R.A. et E.P. DASHWOOD, 1975b.- The effect of timing and method of haulm destruction and interval to harvest on the incidence of gangrene (*Phoma exigua* var. *foveata*) on stored potato tubers. *6th Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Wageningen*, 88-89.
- FOX R.A. et E.P. DASHWOOD, 1978. - Observation on potential alternative hosts of the potato gangrene fungus *Phoma exigua* var. *foveata*. *7th Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Warsaw*, 217-219.
- GRAY E.G. et J.F. MALCOMSON, 1966. - A study of potato gangrene (*Phoma* sp.) in Northern Scotland. *3rd Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Zurich*, 217 .
- GRIFFITH R.L., 1970. - Pathogen, wound type, temperature and gangrene infection. *Rep. Rothamsted Exptl. Stat. 1969*, I : 165-166.
- GRIFFITH R.L., G.A. HIDE, J.M. HIRST et O.J. STEDMAN, 1974. - Effects of gangrene (*Phoma exigua*) on potatoes. *Ann. appl. Biol.*, 77 : 237-250 .
- GRIFFITH R.L. et G.A. HIDE, 1976. - Efficacy of benomyl and thiabendazole in controlling potato gangrene relative to the time of tuber injury. *Pl. Pathol.*, 25 : 178-181 .
- HIDE G.A., HIRST J.M. et R.L. GRIFFITH, 1969. - Control of potato tuber diseases with systemic fungicides. *Proc. 5th Br. Insectic. Fungic.*, 2 : 310-314 .
- HIDE G.A., R.L. GRIFFITH et M.J. ADAMS, 1977. - Methods of measuring the prevalence of *Phoma exigua* on potatoes and in soil. *Ann. appl. Biol.*, 87 : 7-15.

- HIRST J.M., G.A. HIDE, R.L. GRIFFITH et O.J. STEDMAN, 1970. - Improving the health of seed potatoes. *J. Roy. Agricult. Soc. England*, 131 : 87-106.
- HIRST J.M. et R.L. GRIFFITH, 1975. - Potato gangrene studies. *Rep. Edinburgh Sch. Agricult.* 1974, 9-10.
- JELLIS G.J., 1975. - The susceptibility of potato tuber tissues to infection by *Phoma exigua* var. *foveata*. *Potato Res.*, 18 : 116-119.
- JOUAN B., J.M. LEMAIRE et E. LEMARCHAND, 1974. - Etat actuel de nos connaissances sur la gangrène de la pomme de terre. *Inst. Techn. Pomme de terre*, n° 32.
- KHAN A.A., 1975. - Time of infection of *Phoma exigua* var. *foveata* causing potato gangrene. *Indian Phytopath.*, 27, 3 : 340-341.
- KHAN A.A. et C. LOGAN, 1968. - A preliminary study of the sources of potato gangrene infection. *Eur. Potato J.*, 11 : 77-87.
- KRANZ J., 1962. - Vergleichende Untersuchungen an *Phoma*. Isolierungen von der Kartoffel (*Solanum tuberosum*). *Sydowia*, 16 : 1-40.
- LANGTON F.A., 1971. - The development of a laboratory test for assessing potato varietal susceptibility to gangrene caused by *Phoma exigua* var. *foveata*. *Potato Res.*, 14 : 29-38.
- LANGTON F.A., 1972. - The reliability of a laboratory test for assessing gangrene susceptibility. *Potato Res.*, 15, 3 : 266-269.
- LECOMPT M., 1965. - L'expérimentation et les engrais. *Extrait Bull. Engrais*.
- LOGAN C., 1967. - Potato stem infection by *Phoma solanicola* Prill. and Delacr. f. *foveata* (Foister) Malcomson. *Pl. Path.*, 16 : 64-67.
- LOGAN C., 1970. - The effect of potato haulm treatment on the incidence of potato gangrene in storage. *Plant Path.*, 19 : 95-98.
- LOGAN C., 1974. - The effect of soil and tuber-borne inoculum on the incidence of potato gangrene. *Ann. appl. biol.*, 78 : 251-259.
- LOGAN C., 1976. - The spread of *Phoma exigua* within the potato crop. *Ann. appl. biol.*, 82 : 169-174.

- LOGAN C. et A.A. KHAN, 1969. - Comparative studies of *Phoma* spp. associated with potato gangrene in Northern Ireland. *Trans. Br. mycol. soc.*, 52 : 9-17.
- LOGAN C. et R. O'NEIL, 1970. - Production of an antibiotic by *Phoma exigua*. *Trans. Br. mycol. soc.*, 55, 1 : 67-75.
- LOGAN C. et J.F. WOODWARD, 1971. - Pathogenicity differences within *Phoma exigua* var. *foveata*. *Rec. Agricult. Res. Min. Agricult. Northern Ireland*, 19 : 27-31.
- LOGAN C., R.B. COPELAND et G. LITTLE, 1975. - Potato gangrene control by ultralow volume sprays of thiabendazole. *Ann. appl. biol.*, 80, 2 : 199-204 .
- LOGAN C., R.B. COPELAND et G. LITTLE, 1976. - The effects of various chemical and physical haulm treatments on the incidence of potato gangrene. *Ann. appl. biol.*, 84 : 221-229.
- LOGAN C., R.B. COPELAND et G. LITTLE, 1978. - Experiments with foliar sprays of thiabendazole and captan for control of potato gangrene. *Ann. appl. biol.*, 89 : 47-50 .
- MAAS P.W. Th., 1965. - The identity of the foot rot fungus of flax. *Neth. J. Pl. Path.*, 71 : 113-121.
- MAC CRACKEN A.R. et C. LOGAN, 1977. - A selective medium for the isolation of *Phoma exigua* var. *foveata* from soil. *Rec. Agricult. Res.*, 25 : 71-76.
- MAC KEE R.K. et A.E.W. BOYD, 1952. - Dry rot disease of the potato. III. A biological method of assessing soil infectivity. *Ann. appl. biol.*, 39 : 44-53.
- MALCOMSON J.F., 1958a. - A consideration of the species of *Phoma* which parasitize potatoes. *Trans. Br. mycol. soc.*, 41 : 413-418.
- MALCOMSON J.F., 1958b. - Some factors affecting the occurrence and development of gangrene in potatoes caused by *Phoma solanicola* Prill. and Delacr. *Ann. appl. biol.*, 46 : 639-650.
- MALCOMSON J.F. et E.G. GRAY, 1968a. - A note on fungi assigned to *Phoma exigua* with special reference to those causing gangrene of potato. *Trans. Br. mycol. soc.*, 51, 3-4 : 618-620.
- MALCOMSON J.F. et E.G. GRAY, 1968b. - Factors affecting the occurrence of gangrene (*Phoma exigua*), in potatoes. *Ann. appl. Biol.*, 62 : 77-87.
- MALCOMSON J.F. et E.G. GRAY, 1968c. - The incidence of gangrene of potatoes caused by *Phoma exigua* in relation to handling and storage. *Ann. appl. biol.*, 62 : 89-101.
- MELHUS I.E., J. ROSENBAUM et E.S. SCHULTZ, 1916. - Studies of *Spongospora subterranea* and *Phoma tuberosa* on the irish potato. *J. agric. Res.*, 7 : 213-254.

- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, 1974. - Potato gangrene. *Advisory leaflet*, 545.
- MONTIGNY C., 1973. - La conservation de la pomme de terre. *Inst. techn. Pomme de terre*, n° 31.
- MOOI J.C. et W.H.M. MOSCH, 1975. - Identification of potato tuber rot, caused by *Phoma exigua* var. *foveata* by application of thin layer chromatography. *Meded. Fac. landbouwwet Rijksuniv. Gent.*, 27, 1 : 573-576.
- MOSCH W.H.M. et J.C. MOOI, 1975. - A chemical method to identify tuber rot in potato caused by *Phoma exigua* var. *foveata*. *Netherl. J. Plant Pathol.*, 81, 2 : 86-88.
- PATERSON M.I. et E.G. GRAY, 1972. - The formation of wound periderm and the susceptibility of potato tubers to gangrene (caused by *Phoma exigua*) in relation to rate of fertiliser application and time of planting. *Potato Res.*, 15 : 1-11.
- PETT B. et M. EFFMERT, 1972. - Symptome künstlich erzeugter Mischinfektionen an Kartoffelknollen mit *Phoma solanicola* Prill. et Delc. and *Fusarium coeruleum* (lib.). *Zentralbl. Bakt. Parasitenk. Infekt. Kankh. Hyg.*, 2, 127 : 227-231.
- PIETKIEWICZ J.B. et G.J. JELLIS, 1975. - Laboratory testing for the resistance of potato tubers to gangrene (*Phoma exigua* var. *foveata*). *Phytopathol. Z. Dtsch.*, 83 : 289-295.
- POPKOVA K.V. et L.V. KOVALEVA, 1973. - *Ophiobolus porphyrogonus* (Tocle) Sacc., an ascus state of the pathogen of phomosis of potato. *Mikol. Fitopat.*, 7, 3 : 235-237.
- PRILLIEUX H.E. et DELACROIX J.J., 1890. - Sur une maladie de la pomme de terre produite par le *Phoma solanicola* nov. sp. *Bull. Soc. Myc. France*, 6 : 178-181.
- PROCTOR J.M., 1970. - Seed potato gangrene. *Agricult. Lond.*, 77, 8 : 363-366.
- RAI P.P., 1977. - Anthraquinones in *Cassia siamea* (lett). *Curr. Sci. India*, 46, 23 : 814.
- RANDERATH K., 1965. - Thin layer chromatography. *Verlag chemie. Academic Press*.
- ROGERS W.G. et R.J. KILLICK, 1975. - Factors affecting the assessment of resistance of potatoes to gangrene (*Phoma exigua* var. *foveata*). *Ann. appl. biol.* 81,1 : 51-59
- SHARMA M. et S. RANGA SWAMI, 1977. - Chemical components of roots of *Rumex acetosa*. Isolation of omega-acetoxy-aloe-emodin, a new 1,8 dihydroxyanthraquinone derivative. *Indian J. chem.*, sect. B, 15, 10 : 884-885.

- STATHAM O.J.H., 1975. - The extent and causes of tuber damage in Great Britain in 1973. *6th Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Wageningen*, 104-106.
- TICHELAAR G.M., 1974. - The use of thiophanate methyl for distinguishing between the two *Phoma* varieties causing gangrene of potatoes. *Netherl. J. Plant Pathol.*, 80, 5 : 169-170.
- TODD J.M., 1963. - The development and control of potato dry rot, gangrene and skin spot. *Seed potato*, 3 : 14-18.
- TODD J.M. et J.W. ADAM, 1967. - Potato gangrene : some interconnected sources and factors. *Proc. 4th Br. Insect. and Fung. Conf.*, 1 : 276-284.
- UMAERUS W., 1975. - Screening methods for resistance to mechanical damage. *6th Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Wageningen*, 66-68.
- VANLUCHENE I.G., 1976. - Testing of testing potatoes for *Phoma exigua* Desm. var. *foveata* (Foister) Boerema. *Bull. OEPP*, 6, 4 : 247-248.
- WALKER R.R. et G.C. WADE, 1976. - Epidemiology of potato gangrene in Tasmania. *Australian J. Bot.*, 24 : 337-347.
- WIGGINTON M.J., 1974. - Effects of temperature, oxygen tension and relative humidity on the wound healing process in the potato tuber. *Potato Res.*, 17 : 200-214.
- WILSON H.M. et A.R. FOX, 1975. - Histological observations on the host-parasite relationships in the *Phoma exigua* complex in potatoes with special reference to *Phoma exigua* var. *foveata*. *6th Trienn. Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Wageningen*, 30-31.

