

ORSTOM Institut de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération,
Montpellier, France

La Nécrose du Phloème du Tronc de l'Hévéa en Côte d'Ivoire: 2. Etiologie de la maladie

Par D. NANDRIS, J. C. THOUVENEL, M. NICOLE, J. GIANNOTTI, C. DECLERT,
H. CRESTIN, B. RIO et M. NOIROT

Abstract

Phloem Necrosis of the trunk of the rubber tree in Ivory Coast. 2. Etiology of the disease. Numerous experiments were performed in order to identify the causal pathogen of rubber tree Phloem Necrosis. Trials of control by fungicides and bactericides, of identification of the microorganisms isolated from decayed tissues, of transmission from diseased to healthy trees and also, microscopic observations of necrotic phloem samples, all failed in practice. However, symptomatology and epidemic spread in plantation suggest a pathological cause of this disease.

1 Introduction

La Nécrose du Phloème du Tronc de l'Hévéa (NPTH) a été détectée dans des plantations du Sud-Ouest de la Côte d'Ivoire à partir de 1983 (NANDRIS et al. 1984a). Les symptômes précoces de la maladie sont essentiellement des taches nécrotiques au niveau de la zone subéro-phellodermique et le tarissement du panneau de saignée (NANDRIS et al. 1991). Ultérieurement, les attaques se traduisent par une excoriation du tronc. L'existence de zones nécrotiques à la base du tronc, détectables avant même la mise en exploitation des jeunes arbres, constitue un des éléments de discrimination par rapport à des affections comme le Bark Cracking (PERIES et SATCHUTHANANTHAVALA 1964) d'origine virale ou comme le Brown Bast dont il est admis qu'il résulterait d'une surexploitation des arbres (KEUCHENIUS 1924; PARANJOTHY et YEANG 1977). En fait, seul le syndrome décrit par le Rubber Research Institute of Malaysia (RRIM 1965; RAO 1975; RRIM 1976) sous le nom de Bark Necrosis présente de réelles similitudes avec la Nécrose du Phloème. En Indonésie au Nord de Sumatra, cette maladie provoque de graves dégâts (LUKMAN 1989; IIRDB 1989). Cependant, son étiologie demeure toujours incertaine. Ainsi, RAO (1975) associe *Fusarium* et *Colletotrichum* au Bark Necrosis sans pouvoir apporter de démonstrations de leur responsabilité réelle. Selon HARMIDI SOEPENA (1982) et SUWARTO et al. (1983), *Fusarium* et *Botryodiplodia* pourraient être la cause de cette maladie.

En Côte d'Ivoire, l'extension rapide de la Nécrose du Phloème la situe d'emblée au rang des affections graves de l'hévéa (*Hevea brasiliensis*). Dans ce contexte, un programme de recherches a été réalisé avec pour objectifs de décrire la symptomatologie détaillée de cette maladie, de préciser la nature de l'agent causal, de mettre au point une méthode de lutte et enfin d'étudier la dynamique de la maladie en plantation. Le premier point ayant été considéré dans l'article précédent (NANDRIS et al. 1991), les résultats des diverses investigations mises en œuvre pour élucider l'étiologie de la maladie et essayer de la contrôler constituent le fondement de la présente publication.

Les recherches menées pour mettre en évidence un agent pathogène responsable des dommages subis par les arbres malades ont été conduites selon des axes complémentaires

U. S. Copyright Clearance Center Code Statement: 0300-1237/91/2106-0340/\$ 02.50/0

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 36.498 ex 1

Cote : B

03 AOUT 1992

qui font appel à des méthodologies diverses: essais d'isolement de micro-organismes (champignons, bactéries), observations microscopiques des tissus nécrosés, essais de transmission de la maladie pour reproduire les symptômes observés, traitements différentiels ciblant les divers types d'agents pathogènes suspectés dans cette affection.

2 Matériels et méthodes

2.1 Recherche de champignons

Isolements

Les isolements ont été échelonnés durant une année complète – en mai et juin durant la saison des pluies, en janvier, février et avril durant la saison sèche – afin de prendre en compte une éventuelle incidence climatique sur la microflore inféodée à l'hévéa. La plupart des prélèvements ont été réalisés sur des arbres encore peu affectés extérieurement par la nécrose mais présentant une altération au niveau du phloème. Les portions d'écorce sont lavées à l'eau puis stérilisées superficiellement à l'alcool. De petits fragements du phloème interne sont alors prélevés stérilement puis mis en culture en boîte de Petri, soit sur milieu malté gélosé (à 2%), soit sur le milieu aux antibiotiques (Vancomycine + Pimafucine + PCNB) élaboré par TSAO (1976) pour isoler sélectivement les Pythiacées, soit enfin, incubés dans l'eau pendant plusieurs jours au contact de feuilles de *Petunia*. Cette dernière technique de piégage (DECLERT et NANDRIS 1981) est spécifique des espèces fongiques à biologie aquatique et tout particulièrement des Pythiacées. Les différents thalles qui se développent dans ces diverses conditions sont repiqués afin d'obtenir des fructifications permettant de les identifier. Les cultures pures servent également pour les réinoculations.

Observations microscopiques

Les échantillons ont été prélevés sur des arbres sains et malades. Les coupes sont effectuées au rasoir, colorées par le bleu coton et le bleu de méthylène puis observées au microscope optique Orthoplan. Des confirmations sont effectuées sur des coupes semi-fines (2 μ) de matériel inclus dans la résine Epoxy (Epon 812) selon une méthode décrite antérieurement (NICOLE et al. 1991).

Essais d'inoculation de champignons

Des trous dans l'écorce d'arbres sains ont été pratiqués à l'emporte-pièce (diam. 10 mm) sous l'encoche de saignée pour inoculer des cultures (mycélium) de *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pythium* ou de bactéries ayant été isolées de tissus nécrosés. Aussitôt après l'inoculation, la pastille d'écorce saine est replacée dans le trou et maintenue pendant trois semaines par une bande plastique. Pour chaque modalité, on inocule 10 arbres (à raison de 2 trous par arbre) et à titre de témoin, 4 arbres reçoivent de l'eau.

2.2 Recherche de virus ou mycoplasme

La recherche d'un agent pathogène de type virus ou mycoplasme a été effectuée par les méthodes classiques utilisées en Phytovirologie.

Tentatives de purification d'agents de type viral

Différents tampons (phosphate ou borate en présence d'anti-oxydants à un pH proche de la neutralité) ont été utilisés pour le broyage des tissus malades (écorces et feuilles), le chloroforme étant employé comme solvant organique pour la clarification (NOORDAM

1973). Les extraits ont été concentrés par ultra-centrifugation puis clarifiés par centrifugation à faible vitesse. Le produit des tentatives de purification a été analysé spectrophotométriquement après passage sur gradient de saccharose. Il a également servi à préparer des grilles observées en microscopie électronique, et à réaliser des inoculations mécaniques sur un lot de plantes pour vérifier son pouvoir infectieux.

Essais de transmission en serre

Des lots de différentes familles de plantes (Solancées, Légumineuses, Chénopodiacées, Euphorbiacées) ainsi que de plantules d'hévéa ont été inoculés mécaniquement par frottement de leurs feuilles, en présence d'abrasif, avec un extrait brut provenant de tissus malades (cf. ci-dessus).

Essais de transmission en plantation

Implantation de tissus nécrosés sur arbres adultes. Des pastilles de phloème nécrosé (disques de 1 cm de diamètre prélevés à l'emporte-pièce) sont implantées dans des trous de même diamètre pratiqués sur des troncs d'arbres sains (de même clone et de même âge) à 15 cm en dessous de l'encoche de saignée. Dans un premier motif de 20 arbres receveurs, le phloème provient d'arbres atteints uniquement dans la zone cambiale. Dans le second motif, les implantations sont réalisées à partir de taches nécrotiques externes. Les deux motifs témoins sont constitués respectivement par des greffages de phloème d'arbre sain sur des arbres sains et par de simples prélèvements de tissus sur l'arbre receveur avec réimplantation immédiate des pastilles afin d'estimer la part de l'effet traumatique sur le phloème.

Après l'implantation ou la réinoculation, les arbres sont maintenus en exploitation pendant un an afin de maximiser les chances de prise de la greffe, de favoriser un flux de latex susceptible de mobiliser dans l'arbre un agent pathogène présent dans l'implant et enfin, d'observer l'épaisseur des tissus juste après la saignée. Pendant 3 ans, chaque arbre subit un examen trimestriel minutieux au niveau des zones d'implantation.

Greffage de matériel nécrosé sur de jeunes plants en pépinière. Des portions de tissus ont été prélevées au niveau de la zone péri-cambiale d'un arbre nécrosé. Les premières assises cellulaires différenciées de part et d'autre du cambium sont séparées à l'aide d'un scalpel puis disposées entre l'ébauche du bourgeon du jeune plant receveur et le bois de greffe. Trois motifs ont été réalisés en utilisant soit du bois de greffe d'arbre sain avec des fragments de phloème nécrosé ou des fragments de xylème nécrosé, soit uniquement du bois de greffe provenant des branches de l'arbre malade donneur. Après recépage et débouillage d'un bourgeon, les jeunes hévéas d'un an sont plantés dans une parcelle. Le suivi de cet essai à long terme est effectué par examen de chaque plant tous les semestres.

Transmission par cuscutes

Des graines de cuscute (*Cuscuta campestris*, *C. europeae* et *C. subinclusa*) ont été traitées une demi-heure à l'acide sulfurique avant d'être mises à germer en boîte de Pétri sur un papier filtre imbibé d'eau stérile (SCHMELZER 1956). Les plantules sont disposées ensuite sur de jeunes plants de *Vinca rosea* pour y commencer leur développement et y implanter des suçoirs dans les tiges. Ultérieurement, des paquets de ces lianes parasites ont été installés en plantation sur des branches d'hévéas atteints de NPTH. Cette méthode permet la transmission d'un éventuel agent pathogène (virus ou mycoplasme) en mettant en contact directement la sève de la plante malade et celle d'une plante saine.

Observations microscopiques

Les prélèvements sur les arbres ont été réalisés successivement en mars durant la saison sèche, en juillet pendant la saison des pluies et en décembre avant la défoliation. En microscopie photonique (microscope Leitz Orthoplan), les coupes sont colorées par le 4'-6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) pour la visualisation en fluorescence de l'ADN et de microorganismes ainsi que par la thionine et l'acridine orangée pour la recherche des mycoplasmes. En microscopie électronique à transmission, les échantillons sont fixés puis inclus dans la résine époxy. Les coupes ultra-fines, contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, ont été observées avec un microscope Siemens Elmiskop 102 au GERME d'Abidjan (Côte d'Ivoire) et avec un microscope Siemens Elmiskop 101 à l'Université de Dakar (Sénégal).

2.3 Recherche de viroïdes

Extraction des acides nucléiques et électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Des extractions (au phénol en présence de SDS) d'acides nucléiques totaux ont été effectuées pour rechercher dans les arbres malades la présence de molécules d'acides nucléiques de taille voisine de celle d'un viroïde. Cette technique a été appliquée à des échantillons de feuilles d'arbres malades, d'écorce nécrosée, et de sérum de latex (après élimination des lutoïdes). Après broyage et centrifugation pour récupérer le surnageant, la dénaturation des protéines a été réalisée par une combinaison de phénol et de chloroforme puis par précipitation à l'alcool. Les acides nucléiques indésirables ont été éliminés par un traitement au chlorure de lithium (MORRIS et SMITH 1977). Les acides nucléiques restants ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivant la technique de PEACOCK et DINGMAN (1968).

Essai de transmission mécanique à des hôtes spécifiques

Les tentatives de transmission par inoculation mécanique d'extraits bruts de feuilles et d'écorce d'arbres nécrosés ont été renouvelées en utilisant des plantes-hôtes connues pour leur réceptivité à certains viroïdes: *Capsicum*, *Datura*, *Gynura*, *Lycopersicon*, *Nicandra*, *Petunia*, *Physalis*, *Scopolia*, *Solanum*, *Zinnia* (PETERS et RUNIA 1985).

2.4 Traitements différentiels

Le traitement d'arbres malades par différents pesticides ayant une action sélective (contre champignons, bactéries, agents flagellés ou mycoplasmes) permet de déterminer indirectement la nature d'un agent causal suspecté, si l'un ou l'autre des produits testés présente une action curative ou préventive contre la maladie.

Traitements fongicides et bactéricides

L'expérimentation a été réalisée simultanément sur arbres âgés (clone GTI, planté en 1973) et sur jeunes arbres (clone AF 51 de 1978). Dans chacun de ces deux sites, l'essai comprend cinq modalités soit un témoin représenté par des hévéas non traités qui sert de référence pour suivre l'évolution de la maladie et quatre traitements avec des produits différents. Le premier est le mercure (Antimucin); ce fongicide a tout d'abord été préconisé en Malaisie pour lutter contre le *Phytophthora* des panneaux de saignée (RINGENBACH 1959), puis pour contrôler une affection de l'écorce de l'hévéa (Bark Necrosis) sensiblement comparable à la maladie étudiée (RRIM 1965). Le metalaxyl (Ridomil) est un fongicide efficace contre les Syphomycètes en général et contre les Pythiacées en particulier. Le thiophanate-méthyl (PELT 44) a un spectre d'action assez large, incluant en particulier *Fusarium*, *Cercospora*,

Botryodiplodia etc. Enfin, un produit à base de cuivre (Cuprocol) est considéré ici essentiellement pour ses propriétés bactéricides car, contrairement aux antibiotiques, il peut être aisément utilisé à peu de frais sur des superficies importantes.

Les traitements des arbres ont été réalisés, pendant 2 ans, par pulvérisation manuelle hebdomadaire sur le tronc, entre la base du collet et l'encoche de saignée. Par arbre, la dose de produit commercial est de 0,5 % dans 0,5 l de solution. Pour chaque modalité, la parcelle élémentaire est constituée par un segment de ligne de 20 arbres (sains et malades). Le motif de base regroupe les quatre traitements et le témoin sur cinq lignes adjacentes dont les positions sont randomisées. Ce motif de 100 arbres est répété 14 fois, soit 1400 arbres par site ou 280 arbres par modalité; au total, 2800 arbres sont concernés par cette expérience.

Les caractéristiques des arbres malades ont été notées avec précision avant le début des traitements car elles constituent la base de référence permettant de quantifier un effet ultérieur des produits testés. A cette fin, onze paramètres ont été retenus pour décrire, sur chacun des deux panneaux de l'hévéa, les symptômes de la NPTH et leur évolution (Tableau 1). Chaque semestre, les hévéas sont examinés individuellement. Une fiche décrivant la nature et la localisation des symptômes ainsi que le pourcentage d'encoche sèche, a été établie pour les arbres malades au début de l'essai et pour ceux apparus ultérieurement. De même, les effectifs en hévéas sains et malades avant le début des traitements, puis le nombre de nouveaux arbres nécrosés et d'arbres sains restants à chacune des rondes ont été recensés pour chacune des lignes de 20 arbres. L'interprétation statistique des données a été réalisée par analyse de variance et analyse multivariée (Analyse Factorielle des Correspondances) à l'aide d'un logiciel de statistiques (NOIROT et al.).

Tableau 1. Paramètres utilisés pour décrire l'état sanitaire des arbres

Paramètres descripteurs	Abréviations
- Tache nécrotique dans l'encoche de saignée	EN
- Altérations du tronc	
tache basse (au collet)	TB
tache médiane	TM
tache haute (près de l'encoche)	TH
fissure basse	FB
fissure médiane	FM
fissure haute	FH
- Pourcentage de sécheresse de l'encoche	ES
- Longueur totale de l'encoche (en mm)	ET
- Présence de nodule sous-cortical	NO
- Note sanitaire moyenne affectée au panneau (cf. barème)	NS

Antibiothérapie

Des injections de solutions de tetracycline (Teramycin) et de streptomycine (Agrimycin) dont l'efficacité est reconnue contre des mycoplasmes et certains agents flagellés affectant le cocotier, le poirier ou l'orme, ont été réalisées dans des troncs d'arbres malades (clone PB 235) au travers de trous (diam. 1 cm, prof. 8 cm) forés à la perceuse au-dessus du collet. Après injection, le trou est obturé par une capsule plastique. Les doses (3 g de matière active par arbre), la fréquence et la durée de l'essai sont inspirées des protocoles d'expérimentations décrits dans la bibliographie (DHANDA et BANSAL 1983). En raison du coût des produits et des difficultés d'application, cette expérimentation est réalisée à petite échelle. Ainsi pour chaque antibiotique, on traite 16 hévéas malades avec la solution et à titre de témoins, 16 hévéas malades avec de l'eau, 5 arbres sains avec la solution et 5 arbres sains avec de l'eau. Quatre injections successives ont été effectuées, respectivement en

juillet et octobre puis en février et mai. Outre l'observation initiale effectuée pour relever les caractéristiques de chaque arbre malade avant injection, les suivantes ont été réalisées après 7 et 15 mois de traitements.

3 Résultats

3.1 Recherche de champignons et de bactéries pathogènes

Caractérisation après mise en culture

En fonction des dates de prélèvements et des techniques d'isolement, le spectre fongique se résume à une dizaine d'espèces (Tableau 2) dont on retiendra essentiellement les genres: *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Botryodiplodia*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Pestalozzia* et *Trichoderma*. Compte tenu de leur comportement essentiellement parasite, les trois premiers champignons sont à considérer avec un intérêt particulier. La première souche de *Phytophthora* sp. a été isolée (par le technique des feuilles de *Petunia*) à partir de tissus prélevés près du cambium. Des isolements ultérieurs ont confirmé la présence de *Phytophthora* et de *Pythium* dans le phloème d'arbres malades (saignés ou non) au niveau du collet ou de l'encoche ainsi que dans certains échantillons de xylème prélevés sous les

Tableau 2. Caractéristiques et résultats des isolements réalisés sur arbres sains et nécrosés (clones AF51 et GT1)

Caractéristiques	Origine	Protocole	Isolement
Clone AF51, 1978			
arbres nécrosés	phloème	milieu maltéa	<i>Botryodiplodia</i> <i>Fusarium</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Pestalozzia</i> <i>Trichoderma</i> <i>Verticillium</i> bactéries
		milieu antibiotique	
		piégage par <i>Petunia</i>	<i>Phytophthora</i> bactéries
arbres sains	phloème	milieu maltéa	<i>Fusarium</i> bactéries
Clone GT1, 1973			
arbres nécrosés	phloème	milieu maltéa	<i>Fusarium</i> <i>Phytophthora</i> <i>Didymostilbe</i> <i>Pythium</i> <i>Pestalozzia</i> <i>Botryodiplodia</i> <i>Trichoderma</i> bactéries
		bois sous encoche	<i>Phytophthora</i>
		bois sous collet	Pythiacées
arbres sains	phloème	milieu maltéa	<i>Curvularia</i> <i>Trichoderma</i> <i>Fusarium</i>
		bois sous collet	<i>Trichoderma</i> <i>Fusarium</i>

zones nécrotiques. Par ailleurs, différentes colonies bactériennes isolées en culture ont été étudiées plus en détail. La plupart d'entr'elles sont des bactéries gram négatives dont deux se sont révélées pathogènes sur tabac après inoculation sur une gamme d'hôtes.

Essais d'inoculation

Des inoculations par ces champignons et bactéries ont été effectuées sur des arbres sains. Après six mois de saignée, des secteurs d'encoches sèches ainsi qu'une légère brunissure interne ont été observés alors que ces manifestations n'existaient pas sur les motifs témoins. Ces symptômes ont cependant disparu avec le temps. En définitive, plus de deux ans après le début de cette expérimentation, aucun indice d'un développement fongique ou bactérien n'était décelable au sein du phloème des arbres receveurs.

Traitements fongicides et bactéricides

Sur la base d'une détection par symptômes externes, les taux initiaux d'arbres malades dans les parcelles retenues pour l'essai sont de 23 % pour les arbres âgés et à 15,6 % pour les jeunes arbres. Dans le premier cas, on constate une importante variabilité initiale qui se traduit par des différences dans la nature, la gravité et la localisation des altérations nécrotiques. En revanche dans le second cas, plus de 70 % des altérations nécrotiques détectables sur les troncs correspondent à des taches basses ce qui indique un faciès ascendant et un récent développement de la maladie.

L'interprétation des résultats des traitements est réalisée selon deux approches: La première concerne la recherche d'un effet curatif se traduisant par la régression de la maladie sur des arbres déjà nécrosés. Sur arbres âgés, une AFC réalisée sur l'ensemble des variables

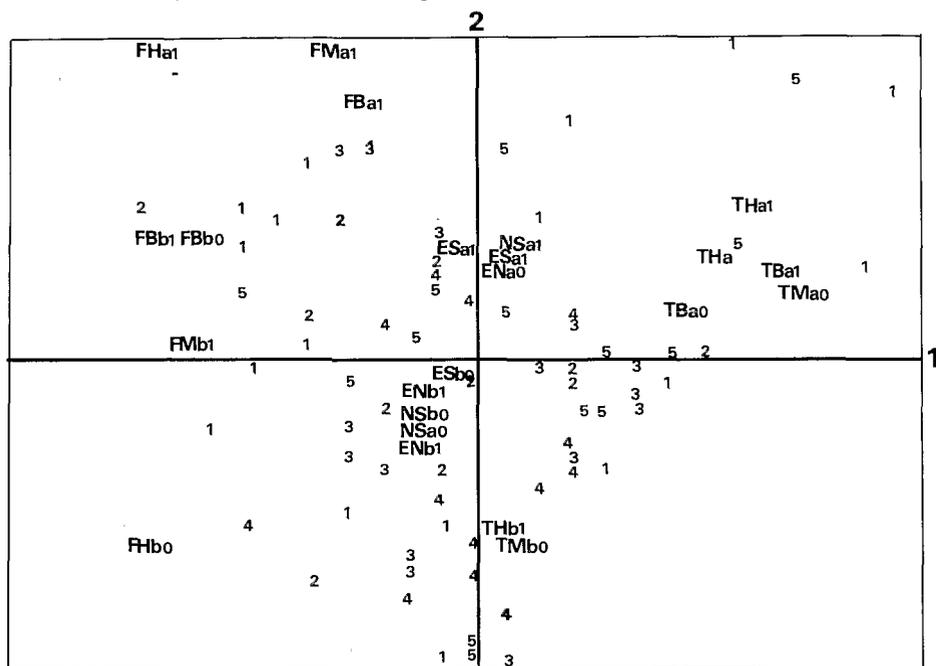


Fig. 1. Traitements différentiels, recherche d'un effet curatif. Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) sur les données de cet essai après 12 mois de traitement (R1); projection des points (identifiés par le numéro du traitement) et des variables sur le plan 1/2 (Exemple: NSa2 = Note Sanitaire du panneau A à la ronde 2; cf. Tab. 1)

caractérisant l'état des arbres après 6 mois de traitement, rend compte de 53 % de la variabilité contenue dans le fichier. Le premier axe caractérise la sévérité et l'ancienneté de l'attaque (NSa0 → NSa1), le second axe traduit la localisation des symptômes sur l'arbre (FB → FM → FH; TB → TH). La figure 1 représente la projection des individus (l'identificateur de chaque arbre a été remplacé par le numéro du traitement qu'il a subi) et des variables selon ces deux axes. On constate sur le plan 1/2, l'absence de sous-groupes traduisant un regroupement spatial particulier des individus ayant subi un même traitement. Cette dispersion des individus, quel que soit le traitement considéré, suggère la non-efficacité des produits appliqués aux arbres. Effectivement, l'analyse des données recueillies après 12, 18 et 24 mois de traitements, ne révèle pas de positionnement particulier dans la répartition spatiale des arbres traités. Cette même procédure a été appliquée aux sous-populations de nouveaux hévéas malades détectés durant les rondes 2, 3 ou 4 ainsi qu'à la population de jeunes hévéas. Aucune des diverses AFC ainsi réalisées n'indique d'effet traitement sur l'évolution des symptômes de la NPPTH durant cette période (par souci de simplification et compte tenu de la similitude des approches et des résultats négatifs obtenus, les figures représentant ces analyses successives n'ont pas été présentées).

La seconde approche consiste à évaluer un effet préventif des traitements au travers d'une diminution significative du nombre de nouveaux arbres malades détectés à chaque ronde. Les différentes valeurs de la variable F correspondant aux analyses de variance sur le nombre d'arbres sains restants (SAR) à chacune des rondes sont regroupées dans le tableau 3. Pour la plupart, les résultats de ces analyses de variance sont non significatifs (F seuil 5 % = 2,53). Cela indique que les traitements chimiques appliqués aux arbres sains et malades n'ont pas eu d'influence sur l'apparition des nouveaux hévéas nécrosés détectés à l'occasion des observations 1, 2, 3 et 4.

Une procédure similaire à la précédente a été réalisée sur jeune culture (Tableau 3). A partir de la ronde 3, on enregistre un effet des traitements puisque, comparativement au témoin, le nombre d'arbres sains restants à partir de la ronde R3 est inférieur dans les modalités avec traitements. Ce résultat paradoxal suggère l'existence d'une phytotoxicité des produits appliqués aux troncs.

Tableau 3. Traitements différentiels: analyses de variance sur les proportions d'arbres sains restants (SAR) à chaque notation

Une nouvelle variable SAR_n/SAR_0 (rapport entre l'effectif en arbres sains à une ronde donnée et l'effectif initial) a été constituée pour réduire l'hétérogénéité initiale existant, dans chacune des modalités, entre les proportions en arbres sains et malades

Variables	Valeurs de Fcal.			
	Clone GT1	Risque α	Clone AF51	Risque α
SAR 1	1,15	22,4 %	2,39	7,1 %
SAR 2	3,69	1,1 %	2,35	7,9 %
SAR 3	1,91	11,9 %	3,81	0,7 %
SAR 4	1,05	38,9 %	2,71	3,7 %
SAR 1/SAR ₀	1,27	29,1 %	0,80	53,1 %
SAR 2/SAR ₀	2,01	10,4 %	1,03	39,9 %
SAR 3/SAR ₀	1,32	57,8 %	2,63	4,2 %
SAR 4/SAR ₀	0,72	27,2 %	1,49	21,5 %

Observations microscopiques

Les colorations utilisées en microscopie photonique n'ont pas révélé de champignons ou de bactéries dans les tissus encore peu nécrosés. En revanche dans le phloème fortement altéré, l'observation de filaments fongiques n'est pas rare, même dans les couches cellulaires internes du tissu. Ces filaments sont vraisemblablement à mettre au compte d'infec-

tions secondaires sur un substrat en voie de dégradation. En microscopie électronique, l'examen de coupes ultrafines de tissus nécrosés, confirme l'absence de filaments fongiques, de bactéries ou de structures analogues (NICOLE et al. 1991).

3.2 Caractérisation de virus ou de mycoplasme

Tentatives de purification et de transmission à une gamme d'hôte

Les différentes méthodes utilisées pour rechercher la présence de virus ou de mycoplasmes sont toutes demeurées infructueuses dans la mesure où aucune nucléo-protéine particulière n'a pu être décelée. Les essais d'inoculations à partir de ces jus bruts sur une gamme d'hôte et sur des plants d'hévéa de 10 mois se sont soldés par un échec.

Transmission d'arbre à arbre

Dix mois après l'implantation de rondelles de phloème d'arbres malades dans des troncs d'arbres sains, de petites taches brunes, de petits secteurs d'encoche sèche ainsi qu'une décoloration interne du phloème ont été notés, juste après la saignée, sur certains arbres. Dans le motif témoin, seuls des secteurs d'encoches sèches étaient repérables au niveau de l'encoche au dessus de l'implant. Après 6 mois, ces légères différences entre motif traité et motif témoin se sont atténuées rapidement. A terme, aucune autre observation n'a révélé d'indice permettant de confirmer une transmission à partir des arbres ayant reçu des implants nécrosés.

Plus de trois ans après le greffage de matériel nécrosé sur de jeunes plants, aucun symptôme particulier n'est observable. Cependant, en raison de l'aspect encore juvénile de ces plants, cette expérience doit être considérée à long terme.

Transmission par cuscutes

Il est apparu que l'hévéa n'était pas un bon matériel pour la prolifération des cuscutes et à ce titre, la présence de latex dans les tissus pourrait être un facteur défavorable. En effet, aucun établissement pérenne de cette liane n'a pu être obtenu. Les cuscutes ont implanté des suçoirs dans les branches mais leur développement a tourné court; les plantes ont fleuri et produit des graines avant de dépérir.

Antibiothérapie

Les arbres atteints de nécroses présentaient avant traitement antibiotique des symptômes différant par leur localisation et leur gravité. Une classification ascendante hiérarchique opérée sur ces caractéristiques n'a pas montré cependant de différences significatives au sein des trois groupes (tétracycline/agrimycin/eau).

Sept mois après la première injection d'antibiotique, aucune agrégation particulière des individus traités n'était décelable par rapport aux témoins sur le plan 1/2 d'une AFC. Une seconde AFC sur les données caractérisant l'état des arbres après 15 mois de traitement représente 70 % de la variabilité totale en 3 axes. Le plan 2/3 (Figure 2) est intéressant à considérer car on observe un regroupement des arbres malades témoins (traités avec de l'eau) dans la partie inférieure de la figure. La majorité des arbres malades traités avec des antibiotiques (sans discrimination entre les deux produits) constitue un nuage de points situé à proximité des variables NSa2 et NSb2 (Notes sanitaires sur les panneaux A et B) qui font les valeurs positives de l'axe 2. Cela suggère que l'évolution de la maladie sur les arbres traités par antibiotiques serait plus importante que dans les arbres témoins. A l'opposé, 25 % des arbres traités par la Tétracycline présentaient sous l'écorce altérée un début de régénération du phloème, contre 3 % seulement chez les arbres témoins et 0 % pour le motif Agrimycin.

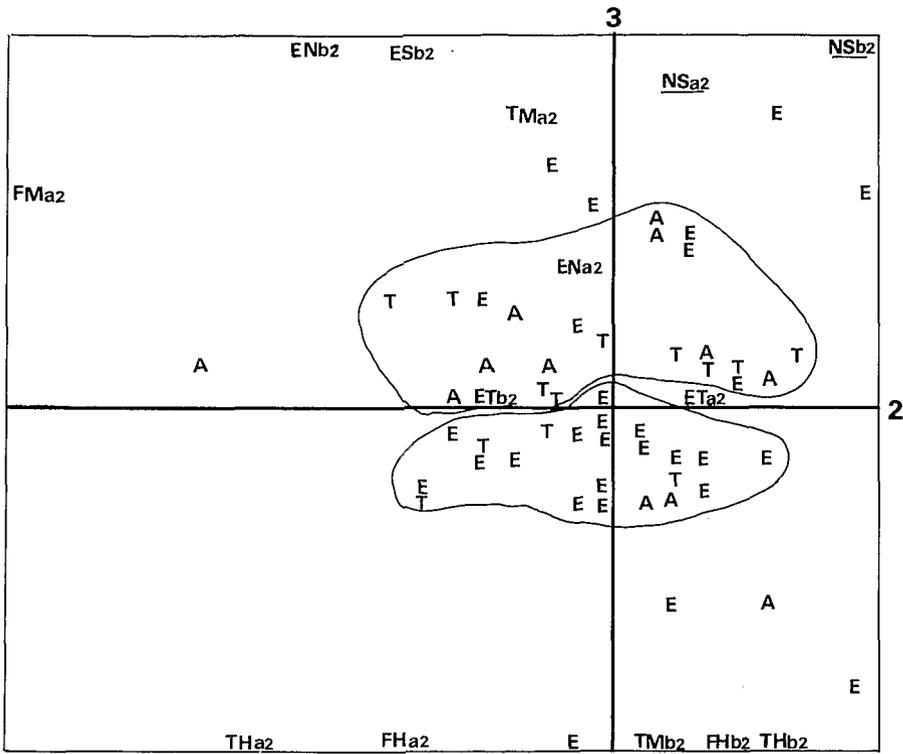


Fig. 2. Antibiothérapie, résultats de l'AFC après 15 mois de traitement; projection des points sur le plan 2/3 en fonction des caractéristiques des arbres (A = Agrimycine; T = Tétracycline; E = eau)

3.3 Recherche de viroïde

Les extractions d'acides nucléiques et les tentatives de transmission par inoculation mécanique de plantes réceptives aux viroïdes n'ont pas apporté de résultats positifs. De même, les profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide ne présentent pas de différences entre le matériel sain et le matériel malade.

4 Conclusions et discussion

Parmi les champignons isolés et identifiés à partir de phloème nécrosé, *Fusarium*, *Botryodiplodia*, *Curvularia* et *Pestalozzia* sont connus comme parasites de faiblesse de l'hévéa (BUGNICOURT 1946; CHEE 1971; ROGER 1954). Ils sont en effet responsables d'altérations des sillons tracés dans le tronc pour servir de génératrices à la spirale de saignée (RRIM 1971), de fissurations de l'écorce à la suite d'un trop fort ensoleillement au niveau du collet (Sun scorch), ou enfin de fines craquelures (stem bleeding) sur le tronc de jeunes plants en pépinière (RRIM 1969; WASTIE 1975). Plus récemment en Indonésie, SUWARTO et al. (1983) et LUKMAN (1989) ont également rapporté la responsabilité de *Fusarium* et *Botryodiplodia* dans le Bark Necrosis (RAO 1975) qui sévit dans les plantations d'hévéa de ce pays. Mais de manière générale, l'écorce, le panneau de saignée ainsi que leurs altérations parasitaires constituent essentiellement des réceptacles favorables à leur existence en phase saprophytique. *Colletotrichum* est quant à lui essentiellement la cause de l'antracnose des

feuilles de l'hévéa (WASTIE 1975). En revanche, la mise en évidence de *Phytophthora* sp. dans les tissus nécrosés présentait un intérêt particulier car les Pythiacées provoquent des infections parfois sévères (CHEE 1969; RRIM 1969) au niveau du tronc (maladie des raies noires, chancre de l'écorce) et des fruits (ROGER 1954; TSAO 1975). Les tentatives de réinoculation des Pythiacées identifiées n'ayant jamais abouti, il demeure délicat de les associer à la nécrose ou de les considérer simplement comme contaminants à partir d'autres sites d'infection sur les arbres.

Dans cette optique, des traitements différentiels ont été mis en œuvre pour contribuer à l'identification d'un agent pathogène responsable des dommages observés. L'interprétation des résultats s'est cependant heurtée à un handicap inhérent au caractère particulier de la maladie étudiée. Avant traitement, un certain nombre d'arbres «apparemment sains» étaient déjà nécrosés au niveau du phloème interne mais, en l'absence de test de détection non traumatisant pour l'écorce, ces symptômes internes de la NPTh n'étaient pas décelables. Pour ces arbres, la révélation progressive des manifestations nécrotiques, totalement indépendante des traitements prodigués, aura interféré avec l'apparition des cas nouveaux véritables. Cela étant, aucun indice significatif confortant l'implication de champignons dans l'affection étudiée n'est apparu à l'issue de deux ans de pulvérisation hebdomadaire de fongicides (dont deux sont particulièrement efficaces contre les Pythiacées) sur les troncs.

La présence d'un éventuel microorganisme susceptible d'être l'agent causal de la maladie a été également recherchée par observation microscopique. Tous les types cellulaires distribués entre le cambium et la zone pierreuse du phloème, ont été soumis, en vain, à un examen minutieux. Dès lors, l'hypothèse de la responsabilité d'un champignon ou d'une bactérie en tant qu'agent causal de la nécrose du phloème de l'hévéa, semble pouvoir être infirmée, les champignons isolés à partir de tissus nécrosés ne constituant très certainement qu'une flore secondaire de faiblesse ou à caractère saprophytique.

En parallèle, des traitements par antibiothérapie ont été réalisés pour rechercher la présence de mycoplasmes ou de flagellés. Les traitements par injections répétées de tetracycline ou d'agrimycin dans des troncs d'hévéas malades n'ont pas eu d'effet curatif directement perceptible. En fait, l'évolution des symptômes a semblé plus rapide chez les arbres traités et une régénération corticale plus vigoureuse a été notée chez les arbres traités par la Tetracycline. La mise en évidence d'un effet bénéfique de l'antibiotique demeure difficile à confirmer dans ce type d'expérimentation. En effet, étant donné que les nouveaux tissus différenciés par le cambium repoussent le phloème nécrosé, l'évolution ou la régression de la maladie provoquent de toute façon des fissurations et des desquamations de l'écorce. Comment alors dissocier réellement une aggravation de la maladie d'une simple extériorisation de zones nécrotiques internes? En outre, dans les cas présent, une majorité d'arbres malades et sains, traités par antibiotique, présentait une putréfaction du phloème et une oxydation du bois autour du trou d'injection révélant ainsi une phytotoxicité des antibiotiques déjà rapportée par PETERSON et SINHA (1977). Pour ces diverses raisons, il semble prudent de ne pas écarter définitivement l'hypothèse de l'intervention d'un mycoplasme ou d'un agent flagellé dans l'affection étudiée tant que des améliorations méthodologiques n'auront pas été apportées à ce type d'expérience.

En outre, une étiologie viroïde peut toujours être légitimement envisagée. En effet, d'après DIENER (1979), cette éventualité représente une hypothèse de départ dans le cas d'une maladie de cause inconnue s'il n'y a pas de microorganisme associé de façon logique à la maladie et si aucune particule virale n'a pu être identifiée en microscopie électronique sur des extraits ou sur des sections de tissus infectés. Les viroïdes se distinguent des virus par l'absence de capsidie protéique. Ils sont responsables, entre autres, de graves maladies comme l'exocortis des *Citrus* et le cadang-cadang du cocotier (RANDES et al. 1977). Les méthodes actuellement utilisées pour mettre en évidence ces particules ne sont pas forcément adaptées à la nécrose car il n'est pas certain, par exemple, que tous les viroïdes soient

mécaniquement transmissibles ou qu'ils soient tous composés d'acide ribonucléique (DIENER 1979).

En conclusion, les différentes tentatives de mise en évidence d'un agent causal de la NPTH sont toutes restées infructueuses alors que, comparativement, l'étiologie du Brown Bast a pu être successivement attribuée à des bactéries (KEUCHENIUS 1921), à des virus (RRIM 1965) ou très récemment, à des organismes apparentés à des rickettsies (ZHENG et al. 1988). Il faut considérer cependant que la durée entre l'infection initiale de l'arbre et la manifestation des premiers symptômes de cette maladie demeure inconnue. Il est donc impossible de savoir si l'absence de résultats positifs enregistrés après deux ou trois années d'expérimentations, indique effectivement un échec démontrant la non-existence du pathogène dans les tissus implantés, ou plutôt l'utilisation de méthodologies inadéquates, ou bien encore, une incubation de la maladie dans l'arbre. En outre, les agents pathogènes suspectés ont souvent des durées de vie courtes et/ou ne sont pas forcément localisés dans l'hôte au niveau des sites d'apparition des symptômes ce qui complique les investigations d'ordre étiologique.

Par ailleurs, les symptômes de la Nécrose du Phloème et les particularismes de son extension en plantation (foyers linéaires et extension aux arbres sains de part et d'autre de l'arbre nécrosé) militent fortement en faveur de l'hypothèse d'une maladie faisant intervenir un agent pathogène (NANDRIS et al. 1984b). En outre, l'observation microscopique a révélé une lyse des espaces intercellulaires qui pourrait résulter de l'action d'enzymes peptiques sécrétées par un micro-organisme (NICOLE et al. 1991). En tout état de cause, l'identification formelle d'un agent pathogène puis l'observation, après réinoculation sur arbres, de symptômes typiques, en constitueront seules les preuves définitives. Aussi, la description précise, dans ce document, des méthodes mises en œuvre et des résultats obtenus, devrait-elle contribuer à l'avancement des futures recherches sur l'étiologie de cette maladie.

Remerciements

Les auteurs remercient vivement MM. JONAS SERY OMPLEON, SÉVERIN DIGBEU KHEULI et JÉROME LAVILLE (Laboratoires de Phytopathologie et Virologie, ORSTOM) pour leur part de collaboration à ces investigations.

Résumé

La maladie affecte essentiellement les arbres adultes en exploitation mais existe également sur de jeunes arbres non encore saignés. Ce n'est donc pas l'exploitation de l'arbre qui est à l'origine de l'apparition de la maladie. Par ailleurs, des analyses biochimiques du latex ont fait également la part entre nécrose et encoche sèche physiologique. Diverses approches ont alors été suivies pour déterminer la cause de cette affection.

La première a consisté à faire des isollements à partir d'écorces nécrosées. Une importante flore fongique (dont *Phytophthora*, *Pythium*, *Colletotrichum*) ainsi que des colonies bactériennes ont été caractérisées mais les essais de réinoculations de ces germes sur des hévéas sains ont échoué. De même, les observations en microscopies photonique et électronique n'ont jamais révélé la présence de filaments mycéliens ou de bactéries dans des tissus en cours d'altération. En parallèle, des traitements différentiels reposant sur l'application de divers pesticides spécifiques ont été réalisés dans des zones infestées. Après deux ans de pulvérisation hebdomadaire, aucun effet bénéfique – soit curatif, par régression de la maladie, soit préventif par réduction du pourcentage de nouveaux cas – n'a pu être décelé. Aussi peut-on supposer que les isollements n'ont révélé en fait qu'une flore secondaire à caractère saprophytique ou de faiblesse.

La seconde approche concernait la recherche d'un agent pathogène de type virus, mycoplasme ou viroïde. Elle reposait sur des essais de transmission de la maladie par inoculation, implantation d'écorce, greffage ou utilisation de cuscutes, sur des tentatives de purification et d'extraction d'acides nucléiques à partir de tissus nécrosés et enfin, sur des observations en microscopie électronique d'extraits bruts et de matériel inclus. Toutes ces tentatives sont restées infructueuses. Il en est de même pour un essai d'antibiothérapie réalisée en injectant à des hévéas malades des solutions de Tétracycline ou de Streptomycine dont l'efficacité est démontrée contre des mycoplasmes, des bactéries et certains agents flagellés. Ces résultats tendent à remettre en cause la responsabilité d'un agent pathogène de type classique comme les virus, les bactéries ou les mycoplasmes. L'hypothèse d'un viroïde devrait être approfondie car la symptomatologie et l'épidémiologie militent fortement pour une maladie de nature épidémique.

Summary

Since mature as well as non-tapped young rubber trees are affected by the disease, latex yielding should not be its causative factor. Moreover, biochemical analyses of latex from healthy and diseased trees have shown that bark necrosis and dry tap differ significantly. Accordingly, various experimentations have been performed in order to identify the causal pathogen of this disease. Isolations from necrotic tissues indicated the existence of many fungal (including *Phytophthora*, *Pythium*, *Colletotrichum*) and bacterial species but trials of re-inoculation into healthy trees have failed. Light and electron microscopic observations never revealed mycelial hyphae or bacteria in these decaying tissues. Diverse disease control measurements have been applied but no evidence of curative or preventive effects of the specific treatments could be found. This suggests that the isolated fungal and bacterial species were mostly saprophytes or secondary pathogens.

The second approach deals with the possible existence of viruses, viroids or mycoplasma-like organisms. Numerous trials of disease transmission by inoculation, bark implantation, grafting, Cuscutes, as well as extraction and purification of nucleic acids and also microscopic observations remained unsuccessful. Similar results have been obtained after two years of curative injections of antibiotic (tetracycline, streptomycin) into the trunk of diseased trees.

Whereas all the experiments conducted during this study failed to produce the expected disease symptoms in the plantation epidemiological surveys suggest a pathogen as the cause of this disease.

Zusammenfassung

Phloemnekrose bei Hevea brasiliensis an der Elfenbeinküste. 2. Ätiologie der Krankheit

Nachdem alte *Hevea brasiliensis*-Bäume ebenso wie junge, noch nicht zur Latexgewinnung angezapfte Bäume von der Krankheit befallen werden, dürfte die Primärursache der Krankheit nicht in der Latexgewinnung zu suchen sein. Vielmehr haben biochemische Analysen von Latex gesunder und kranker Bäume gezeigt, daß Rindennekrose und das Versiegen des Latexflusses sich erheblich unterscheiden.

Es wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um das die Krankheit verursachende Pathogen zu identifizieren. Isolierungen aus krankem Gewebe ergaben die Anwesenheit vieler Pilzarten (darunter *Phytophthora*, *Pythium*, *Colletotrichum*) und Bakterien. Reinokulationen in gesunde Bäume blieben jedoch erfolglos. In licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen waren Myzel oder Bakterien in den geschädigten Geweben nie nachzuweisen. Über zwei Jahre verlaufende Versuche zur Krankheitsbekämpfung erbrachten keine Hinweise auf eine heilende oder vorbeugende Wirkung der speziellen Behandlungen. Dies läßt die Annahme zu, daß die isolierten Pilze und Bakterien zumeist Saprophyten oder Sekundärschädlinge waren.

Eine zweite Reihe von Untersuchungen beschäftigte sich mit der möglichen Anwesenheit von Viren, Viroiden oder MLO. Zahlreiche Versuche zur Krankheitsübertragung durch Inokulation (Rindenimplantation, Pfropfung, Verwendung von *Cuscuta*) sowie Reinigung und Extraktion von Nucleinsäure und auch mikroskopische Untersuchungen verliefen ergebnislos. Ähnliche Ergebnisse wurden nach zwei Jahre dauernden Behandlungen kranker Bäume mit Antibiotica (Tetracyclin, Streptomycin) erzielt. Während epidemiologische Bestandsaufnahmen ein Pathogen als Krankheitsursache annehmen lassen, schlugen alle Versuche, die Krankheit experimentell auszulösen, fehl.

Références

- BUGNICOURT, R., 1946: La maladie des raies noires de l'écorce saignée. Cahiers de l'IRCI 1, 1–30.
- CHEE, K. H., 1969: Variability of *Phytophthora* species from *Hevea brasiliensis*. Trans. Br. Mycol. Soc. 52 (3), 425–436.
- 1971: A new disease of *Hevea brasiliensis* caused by *Fusarium solani* and *Botryodiplodia theobromae*. Pl. Dis. Reporter 55 (2), 152–153.
- DHANDRA, R. S.; BANSAL, R. D., 1983: Mortality of *Eucalyptus* hybrid – Mycoplasma as one possibility. J. Tree Sci. 2 (1 and 2), 32–37.
- DECLERT, C.; NANDRIS, D., 1981: Attaque de fruits d'hévéa, avant maturité, par *Phytophthora palmivora*. Coll. Intern. Prot. Cult. Trop., juillet 1981, Lyon.
- DIENER, T. O., 1979: Viroids and viroid diseases. Ed. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. pp. 119–120.
- HARMIDI SOEPENA, 1982: Bark necrosis on hevea rubber and its control in North Sumatra. Balai Penelitian Perkebunan Sungei Putih, 4 p.
- IRRDB, 1989: Workshop on tree dryness. June 1989, Penang, Malaysia. pp. 162.
- KEUCHENIUS, P. E., 1921: Die Rindenbräune der *Hevea brasiliensis*; eine kritische Untersuchung. Rev. appl. Mycol. 1, 263–267.
- 1924: Considerations on Brown Bast Disease. Arch. Rubbercult. 8, 803–816.

- LUKMAN, 1989: Tapping panel dryness in Indonesia. IRRDB Workshop on tree dryness. Penang, Malaysia. 99-112.
- MORRIS, T. J.; SMITH, E. M., 1977: Potato spindle tuber disease: procedures for the detection of viroid RNA and certification of disease-free potato tubers. *Phytopathology* 67, 145-150.
- NANDRIS, D.; CHRESTIN, H.; GEIGER, J. P.; NICOLE, M.; THOUVENEL, J. C., 1984a: Occurrence of a phloem necrosis on the trunk of rubber trees. "75th Ann. Rub. Res. in Sri Lanka", Intern. Rubb. Conf., septembre 1984, Colombo, Sri Lanka. Proceedings p. 59.
- 1984b: La nécrose corticale de l'hévéa en Côte d'Ivoire. 27ème Coll. Soc. Fran. Phytopath. «Les pourridiés et autres maladies racinaires des essences ligneuse. Paris, novembre 1984. Abstract in: *Agronomie* 1985, 5 (6), p. 563.
- NANDRIS, D.; CHRESTIN, H.; NOIROT, M.; NICOLE, M.; THOUVENEL, J. C.; GEIGER, J. P., 1991: La Nécrose du Phloème de l'hévéa. 1. Symptomatologie et caractéristiques biochimiques. *Eur. J. For. Path.* 21, 325-339.
- NICOLE, M.; THOUVENEL, J. C.; GIANNOTTI, J.; CHRESTIN, H.; GEIGER, J. P.; NANDRIS, D.; RIO, B., 1991: The histology of *Hevea brasiliensis* phloem necrosis. *Eur. J. For. Path.* 21, 27-35.
- NOIROT, M.; DESJARDIN, J.; MULLON, C.; SAVY, L.: Logiciel de Statistiques pour les biologistes. à paraître.
- NOORDAM, D., 1973: Identification of plant viruses. Methods and experiments. Wageningen: Pudoc.
- PARANJOTHY, K.; YEANG, H. Y., 1977: A consideration on the nature and control of brown bast. *Proc. RRIM Planter's Conf.* 74-90.
- PEACOCK, A. C.; DINGMAN, C. W., 1968: Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry* 7, 668-674.
- PERIES, O. S.; SATCHUTHANANTHAVALA, R., 1964: Incidence, Symptoms, and Histology of Bark cracking in *Hevea brasiliensis* Müll.-Arg. *Trop. Agriculture, Trin.*, 41 (4), 266-275.
- PETERS, D.; RUNIA, W. T., 1985: The host range of viroids. In: "Subviral Pathogens of plants and animals: Viroids and Prions". Ed. by K. MARAMOROSH, J. J. MCKELVERY, JR. Academic Press. 39-74.
- PETERSON, E. A.; SINHA, R. C., 1977: Uptake, distribution and persistence of tetracycline antibiotics in various plant species susceptible to mycoplasma infection. *Phytopath. Z.* 90 (3), 250-256.
- RANDLES, J. W.; BOCCARDO, G.; RETUERMA, M. L.; RILLO, E. P., 1977: Transmission of the RNA species associated with Cadang-Cadang of coconut palm and the insensitivity of the disease to antibiotics. *Phytopathology* 67 (10), 1211-1216.
- RAO, B. S., 1975: Maladies of Hevea in Malaysia. pp. 108. RRIM, Kuala Lumpur, Malaysia.
- RIGGENBACH, A., 1959: Antimucin, a new water miscible fungicide for the control of black stripe. *RRIC, Quarterly Journal* 35 (1), 8-9.
- ROGER, L., 1954: *Phytopathologie des pays chauds*. Encyclopédie mycologique, Tome 3, 2789-2792. Editions Le Chevallier, Paris.
- RRIM, 1965: Diseases of the tapping pannel and stem. In: Pathological Division, Annual Report. 58-59.
- 1969: Stem canker. *Planter's Bulletin* 102, 103-104.
- 1971: A new panel necrosis. *Planter's Bulletin* 113, 882.
- 1976: Bark necrosis. *Planter's Bulletin* 147, 146-148.
- SCHMELZER, K., 1956: *Phytopath. Z.* 28, 1.
- SUWARTO, A. E.; HARMIDI SOEPENA, 1983: Kasus penyakit bark necrosis pada tanaman karet klon GYT 577. Balai Penlitian Perkebunan Sungei Putih, 14 p.
- TSAO, P. H., 1975: Occurrence of *Phytophthora palmivora* on hevea rubber in Thailand. *Plant Dis. Rep.* 59, 955-958.
- 1976: Recovery of *Phytophthora* species from old, badly decayed, infected tissues of *Hevea brasiliensis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66 (3), 557-558.
- ZHENG, G. B.; CHEN, M. R.; YUNG, S. W.; CHEN, Z. Y.; SHEN, J. Y., 1988: A further report on the study of causative agents and control of brown bast disease of rubber trees. *J. South China Agric. Univers.* 9, 22-23.
- WASTIE, R. L., 1975: Diseases of rubber and their control. *PANS* 21, 268-288.

Adresses actuelles des auteurs: D. NANDRIS, J. C. THOUVENEL, M. NICOLE, C. DECLERT, H. CHRESTIN, B. RIO, M. NOIROT, ORSTROM, Laboratoires de Phytopathologie, Virologie, Physiologie végétale et Génétique, 2051, Avenue du Val de Montferand, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France; J. Giannotti, INRA, Station de Pathologie comparée, 30380 Saint-Christol-les-Alès, France

Reception du ms.: 19.10.1990