



Institut de recherche
pour le développement

Centre Agronomique Tropical
de Recherche et d'Enseignement
7170 Turrialba, Costa Rica

Institut de Recherche
pour le Développement
911 Avenue d' Agropolis,
BP 64501
34394 Montpellier cedex 5

Ecole Nationale Supérieure
d'Agronomie de Toulouse
Avenue de l'Agrobiopole
BP 107 Auzeville-Tolosane
31326 Castanet-Tolosan

**ETUDE DU COMPORTEMENT DU
NEMATODE *Meloidogyne exigua* CHEZ DES
CAFEIERS (*Coffea arabica* L.) RESISTANTS
ET SENSIBLES**

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur
Agronome en Biotechnologies, Amélioration et Protection des Plantes,
présenté par M^{elle} Audrey Martinez

Période du 1^{er} avril au 30 août 2002

Stage proposé et encadré par Monsieur François Anthony, Généticien
UMR IRD-CIRAD-INRA-ENSAM
Equipe de « Physiologie et Génétique de la résistance des plantes tropicales aux parasites »

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dominique Coquart, ancien Directeur, et Michel Candau, Directeur de m'avoir admis sur titre à l'ENSAT et permis de suivre ces deux années de formation. Je remercie Michel Petitprez, responsable de DAA, de m'avoir accepté dans la spécialisation « Biotechnologie, Amélioration et Protection des Plantes ». Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à Bernard Bouyjou, Professeur d'Entomologie, pour son aide précieuse lors de la recherche de ce stage.

Je remercie Michel Nicole, responsable IRD de l'équipe « Physiologie et Génétique de la résistance des plantes tropicales aux parasites », qui m'a confié cette mission. Je remercie également Pedro Ferreira Rossi, Directeur Général, et Al Moslemi, Directeur de l'école de « Post-grado », de m'avoir accueilli au CATIE.

Je tiens à remercier François Anthony, Directeur de stage, Généticien pour ses conseils et sa disponibilité, et Benoît Bertrand, co-encadreur, Généticien, pour sa précieuse aide « statistique ». Je remercie très chaleureusement Patrick Topart, co-encadreur, Nématologiste, pour son encadrement, son soutien, sa disponibilité et les connaissances qu'il m'a transmis.

Je remercie tout particulièrement Paolo Peralta, assistant de recherche, pour son aide précieuse, sa gentillesse, sa bonne humeur et ses cours d'espagnol.

Mes remerciements s'adressent aussi à Maria Elena Aguilar, responsable du laboratoire de Biotechnologies du CATIE, et à tout le personnel pour leur accueil au sein de l'équipe.

Enfin, je remercie mes parents et grands parents sans lesquels je n'aurais pu faire ce stage et découvrir un si beau pays.

RESUME

Les nématodes endoparasites (*Meloidogyne* spp.) représentent une limitation importante pour le développement de la caféiculture du fait de la sensibilité des variétés les plus cultivées au monde, celles appartenant à l'espèce *Coffea arabica*. Une résistance à *M. exigua* a été identifiée chez *C. canephora* et dans des lignées dérivées de l'Hybride de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*). Elle est contrôlée par un gène majeur (Mex-1) et agirait selon le modèle gène-pour-gène. Des efforts sont déployés pour développer des variétés résistantes, à utiliser directement comme cultivar ou comme porte greffe. Afin d'exploiter de manière durable les résistances génétiques, il est nécessaire d'avoir une bonne connaissance des mécanismes physiologiques et génétiques de leur expression.

Nous avons étudié le comportement de *M. exigua* chez des plantes résistantes (cv. IAPAR et *C. canephora*) et sensibles (cv. Caturra) par la réalisation d'observations cytologiques et l'évaluation du nombre de nématodes présents sur le système racinaire.

Les données permettent de proposer une nouvelle méthode d'évaluation de la résistance, basée sur l'estimation du nombre et de la taille des galles et sur la quantité de nématodes extraits par sept jours de nébulisation.

La cinétique de pénétration et de développement des nématodes semble être la même entre les plantes résistantes et sensibles alors que les niveaux d'infestation sont différents. Des zones foncées pouvant s'apparenter aux zones nécrosées caractéristiques de la Réponse Hypersensible ont été observées sur le cultivar résistant. Le développement du caféier ne semble pas avoir d'influence sur le comportement des nématodes.

Mots clés : *Coffea arabica*, *Meloidogyne exigua*, résistance génétique, modèle gène-pour-gène, Réponse Hypersensible, évaluation de la résistance.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Ma contribution à la création de variétés de caféiers résistants à *M. exigua*.
- Figure 2** : Généalogie des principales variétés traditionnelles.
- Figure 3** : Cycle schématisé des *Meloidogyne*.
- Figure 4** : Observations cytologiques (colorations à la fuschine acide) de racines de *C. arabica* inoculées par *M. exigua*.
- Figure 5** : Galles provoquées par *M. exigua* sur un système racinaire de Caturra (stade physiologique 6 paires de feuilles).
- Figure 6** : Galle provoquée par *Meloidogyne* sp. sur une jeune racine de tabac.
- Figure 7** : Le modèle d'interaction gène-pour-gène.
- Figure 8** : Modèle simplifié de l'activation des mécanismes de défense d'une cellule hôte, basé sur une étape de reconnaissance gène-pour-gène.
- Figures 9** : **a** ; la chambre d'asperseur utilisée pour l'extraction par nébulisation et **b** ; la méthode d'extraction par nébulisation.
- Figure 10** : Préparation des plantes pour l'essai 4.
- Figure 11** : Pourcentage de plantules de cv. IAPAR59 et de cv. Caturra présentant de une à trois paires de feuilles (stades physiologiques 5, 6, 7, 8) à trois dates d'évaluation (essai 1).
- Figure 12** : Pourcentage de plantules de cv. IAPAR59 et de cv. Caturra présentant de une à trois paires de feuilles (stades physiologiques 5, 6, 7, 8) à trois dates d'évaluation (essai 1).
- Figure 13** : Taux de multiplication des nématodes sur des caféiers d'indice de galles 2, 3 et 5, calculés après une extraction par nébulisation et par hypochlorite (essai 2).
- Figure 14** : Régression linéaire du nombre de nématodes extraits au bout de 7 et 14 jours de nébulisation ($R1+R2$) en fonction du nombre de nématodes extraits au bout de 7 jours $R1$ (essai 3).
- Figure 15** : Régression linéaire du nombre de nématodes extraits après 7 jours de nébulisation ($R1$) en fonction du nombre de galles (essai 3).
- Figure 16** : Nombre total de nématodes extraits en fonction de l'indice de galles, exprimé par gramme de matière sèche du système racinaire (essai 3).
- Figure 17** : Pourcentage de pénétration des juvéniles chez cv. Caturra et cv. IAPAR dans les essais 1, 4, 5 et 6.
- Figures 18** : Observations histologiques de racines de cv. IAPAR et de cv. Caturra inoculées par *M. exigua* (coloration à la fuschine acide).
- Figure 19** : Nombre de juvéniles observés dans les racines de cv. Caturra et cv. IAPAR59 à quatre stades de développement (essai 1).
- Figure 20** : Nombre de femelles observées dans les racines de cv. Caturra et cv. IAPAR59 à quatre stades de développement (essai 1).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résistance et la tolérance d'une plante face à l'attaque de nématodes.

Tableau 2 : La pathogénicité et la virulence d'un nématode sur une plante hôte.

Tableau 3 : Synthèse des résultats des principales évaluations de la base génétique *C. arabica*, *C. canephora* disponible en Amérique Latine, vis-à-vis des principales espèces de *Meloidogyne*.

Tableau 4 : Correspondance entre le nombre de galles d'un système racinaire et son IG.

Tableau 5 : Effet de la date de semis sur le taux de germination des graines (essai 1).

Tableau 6 : Analyse de la variance du pourcentage de plantules ayant de une à trois paires de feuilles (stades 5, 6, 7 et 8 de développement) le 11/06/02 (essai 1).

Tableau 7 : Analyse de la variance du taux de multiplication en fonction de l'indice de galles (IG 2, 3 et 5) et de la méthode d'extraction (hypochlorite ou nébulisation) (essai 2).

Tableau 8 : Corrélations entre l'indice de galles, le nombre de galles, le nombre de nématodes extraits au bout de 7 jours de nébulisation (R1) et de 14 jours (R2), et le nombre total de nématodes extraits (R1+R2) (N = 90) (essai 3).

Tableau 9 : Nombre moyen de nématodes extraits en fonction de l'indice de galles, exprimé en gramme de matière sèche du système racinaire (essai 3).

Tableau 10 : Cinétique de la pénétration et du développement de *M. exigua* dans les racines de cv. IAPAR59 et cv. Caturra dans quatre essais.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. La diversité des ressources génétiques du caféier.....	5
I.1 Les caféiers à la conquête du monde.....	5
I.2 Les ressources génétiques conservées dans les collections.....	7
I.3 La diversité génétique disponible chez <i>C. arabica</i>	8
I.4 Les objectifs de l'amélioration génétique en Amérique centrale.....	10
II. Les nématodes endoparasites sédentaires du caféier.....	11
II.1 Les pertes occasionnées par les nématodes du caféier.....	11
II.2 Les principales espèces parasites.....	11
II.3 Les nématodes du genre <i>Meloidogyne</i>	12
II.3.1 La diversité des espèces de <i>Meloidogyne</i> parasitant les caféiers.....	12
II.3.2 Le cycle biologique.....	12
II.3.3 La sexualité et la reproduction.....	13
II.3.4 Les symptômes.....	14
II.3.5 L'écologie du parasite.....	15
III. Les mécanismes de résistance aux nématodes identifiés chez les plantes.....	16
III.1 Définitions.....	16
III.2 Les mécanismes de défense dans une réaction incompatible.....	18
III.2.1 Activation de la défense et mécanismes de reconnaissance.....	18
III.2.2 La Réaction Hypersensible (HR).....	19
III.2.3 La production de phytoalexines.....	21
III.2.4 Le renforcement des barrières structurales.....	21
III.2.5 L'accumulation des protéines en relation avec la pathogénicité PR.....	21
III.2.6 La Résistance Systémique Acquise (SAR).....	21
IV. Les méthodes de lutte contre les nématodes parasites du caféier.....	22
IV.1 Le contrôle biologique.....	22
IV.2 Le contrôle culturel.....	22
IV.3 Le contrôle chimique.....	24
IV.4 Le contrôle génétique.....	24
IV.4.1 La résistance aux <i>Meloidogyne</i>	24
IV.4.2 Exploration des ressources génétiques du café pour la résistance à <i>M. exigua</i>	25
IV.4.3 Etude de la transmission des caractères de résistance et identification de marqueurs moléculaires de la résistance.....	25
IV.4.4 Les méthodes conventionnelles de l'amélioration génétique du caféier.....	26
IV.4.5 Les marqueurs moléculaires, un nouvel outil pour l'amélioration génétique du café.....	28
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES.....	29
I. MATERIEL VEGETAL.....	30
II. METHODES UTILISEES.....	30
II.1 Préparation de l'inoculum de <i>Meloidogyne exigua</i> et inoculation des caféiers.....	30
II.2 Evaluation de la résistance par l'Indice de Galle (IG).....	30
II.3 Méthodes d'extraction des nématodes.....	31

II.3.1 Extraction des nématodes par nébulisation (Seinhorst, 1950)	31
II.3.2 Extraction des nématodes à l'hypochlorite (Hussey et Barker, 1973)	31
II.3.3 Comptage des nématodes	32
II.4 Coloration d'échantillons racinaires par la fuchsine acide	32
II.5 Analyses statistiques des données	32
III. Dispositifs expérimentaux	33
III.1 Essai 1	33
III.2 Essai 2	35
III.3 Essai 3	35
III.4 Essai 4	36
III.5 Essai 5	36
III.6 Essai 6	36
III.7 Essai 7	36
PARTIE III : RESULTATS	37
I. Influence du substrat de culture sur le développement des caféiers	38
II. Comparaison de deux méthodes d'extraction des nématodes	40
III. Relations entre l'indice de galles, le nombre de galles et le nombre de nématodes	41
IV. comportement du nématode sur des caféiers résistants et sensibles	44
IV.1 Comportement de <i>M. exigua</i> chez <i>C. arabica</i> cv. IAPAR59 et cv. Caturra	44
IV.2 Comportement de <i>M. exigua</i> chez des caféiers <i>C. canephora</i> résistants	45
IV.3 Observation cytologique de la réaction de résistance et durée de son expression	46
IV.4 Caractérisation du phénotype de la résistance	46
V. Influence du développement des caféiers sur le comportement du nématode	46
V.1 Comportement du nématode aux stades précoces de développement des caféiers	46
V.2 Estimation du nombre de galles et de nématodes aux stades précoces de développement des caféiers	48
V.3 Observations cytologiques aux stades précoces de développement des caféiers	48
PARTIE IV : DISCUSSION	49
I. Mise au point d'un protocole d'évaluation de la résistance du caféier à <i>Meloidogyne exigua</i>	50
I.1 Choix du substrat de culture des caféiers	50
I.2 Analyse critique des évaluations basées sur l'indice de galles (IG)	50
I.3 Choix de la méthode d'extraction des nématodes	51
I.4 Préparation des plantes en vue d'observations cytologiques	51
II. Caractérisation de la réaction de résistance des caféiers à <i>Meloidogyne exigua</i>	52
III. Age d'expression de la résistance chez les caféiers	53
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	55

INTRODUCTION

Mon stage de fin d'étude est réalisé au sein de l'équipe « Physiologie et Génétique de la résistance des plantes tropicales aux parasites » appartenant à l'UMR IRD-CIRAD-INRA-ENSAM « Diversité et Génome des plantes cultivées ». Il s'intègre dans un projet plus vaste d'étude de la résistance des caféiers aux nématodes du genre *Meloidogyne*. Mon travail est effectué au CATIE (Centre Agronomique Tropical de Recherche et d'Enseignement, Costa Rica) dans le cadre de la coopération entre l'IRD et le CATIE en biotechnologie du caféier (*Coffea arabica* L.). Le CATIE est une association civile à but non lucratif et à vocation régionale, qui développe des activités de recherche et d'enseignement supérieur (Annexe 1). Le but de ce stage est de mettre en évidence des différences de comportement de *M. exigua* chez des caféiers résistants et sensibles.

Le café est une des boissons les plus populaires au monde et un produit agricole d'exportation à haute valeur ajoutée. Il représente le deuxième produit d'exportation après le pétrole. Deux espèces de caféiers sont cultivées au niveau mondial : *C. arabica* (70 % de la production mondiale) et *C. canephora* (30 %). La meilleure qualité est produite à partir du caféier *C. arabica* L.. La culture de l'Arabica est une source importante de revenus et d'emplois dans les pays en développement d'Amérique latine, d'Afrique et d'Asie. Le Costa Rica est le 6^e pays producteur de café au niveau mondial (3,263 millions de quintaux en 2001). La surface occupée est de 106.000 ha et le pays compte environ 73.700 producteurs (CEPAL, 2002).

La plupart des espèces de caféiers ont été décrites dans le genre *Coffea* (environ 80 espèces). *C. arabica* se distingue des autres espèces par son centre d'origine (les hauts plateaux d'Afrique de l'Est), son niveau de ploïdie ($2n = 4x = 44$ chromosomes au lieu de $2n = 2x = 22$) et sa reproduction par autogamie au lieu de l'allogamie pour la plupart des autres espèces (Carvalho, 1988). L'origine amphidiploïde de *C. arabica* provient très vraisemblablement de l'hybridation de deux génomes d'espèces diploïdes très proches de *C. eugenoides* et *C. canephora* (Lashermes *et al.*, 1999). Le comportement méiotique diploïde de *C. arabica* (Grassias, 1980) a été récemment confirmé par l'étude de la ségrégation de marqueurs moléculaires (Lashermes *et al.*, 2000).

La dispersion des caféiers *C. arabica* dans le monde à partir de leur centre d'origine a été marquée par plusieurs réductions de leur diversité génétique (Anthony *et al.*, 2002). Les trois cultivars actuellement les plus plantés (Caturra, Mundo novo et Catuai) furent sélectionnés à partir d'une étroite base génétique, formée vraisemblablement par les descendances de moins de 10 plantes sauvages d'Ethiopie.

La sélection de variétés à partir de cette base génétique a abouti à la diffusion de cultivars hautement productifs mais sensibles aux parasites (rouille, anthracnose des fruits, nématodes, scolyte des baies, ...etc) (Bertrand *et al.*, 1999).

Les nématodes endoparasites (*Meloidogyne* spp.) représentent une limitation importante pour le développement de la caféiculture en raison de leur large distribution et de leur abondance dans les sols (Campos *et al.*, 1990). L'espèce la plus commune est *M. exigua*, laquelle peut provoquer entre 10 et 20 % de pertes économiques au Costa Rica (Aguilar *et al.*, 1997). Aucune résistance à *M. exigua* n'a été identifiée chez les caféiers sauvages ou cultivés de *C. arabica* (Anthony *et al.*, 2002). Cependant, elle existe chez *C. canephora* et dans des lignées dérivées d'un hybride interspécifique naturel appelé Hybride de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*) (Curi *et al.*, 1970 ; Morera et López, 1987 ; Bertrand *et al.*, 2001). L'analyse de l'héritabilité de cette résistance a montré qu'elle est contrôlée par un gène majeur, appelé Mex-1 (Noir *et al.*, 2002). Au niveau cellulaire, Cristina *et al.* (2000) observent une réaction de type hypersensible (HR) chez les caféiers résistants, inoculés par *M. exigua*, laquelle indique la présence de gènes de résistance selon le modèle gène pour gène (Flor, 1955).

L'utilisation de cultivars résistants dans la lutte contre les nématodes constitue un moyen de lutte efficace, peu coûteux pour le producteur, non polluant et qui ne requiert généralement pas de modification de l'itinéraire technique (Luc et Reversat, 1985). Du fait que les nématodes constituent un problème très grave en Amérique Centrale et que le potentiel d'utilisation de ces résistances semble *a priori* important chez le caféier, des efforts sont déployés pour développer des variétés résistantes, à utiliser directement comme cultivar ou comme porte greffe. Afin d'exploiter de manière durable les résistances génétiques, il est nécessaire d'avoir une bonne connaissance des mécanismes physiologiques et génétiques de leur expression. C'est l'objectif des travaux réalisés conjointement à l'IRD et au CATIE (Figure 1).

Ma contribution au développement de la lutte génétique contre *M. exigua* a consisté à étudier le comportement du nématode chez des plantes résistantes et sensibles. Les données permettent de proposer une nouvelle méthode d'évaluation de la résistance, plus fiable que la méthode actuellement utilisée et basée sur l'estimation du nombre de galles, trois mois après inoculation. Celle-ci ne prend pas en compte le fait que les galles n'ont pas toutes la même taille, de grosses galles ayant été observées chez les caféiers sensibles. De plus, des plantes avec et sans Mex-1 peuvent présenter le même nombre de galles. Il est donc apparu nécessaire de développer un protocole d'évaluation qui permette d'étudier l'expression du gène de résistance au cours des premières étapes de l'infestation et au bout d'un cycle de multiplication du nématode.

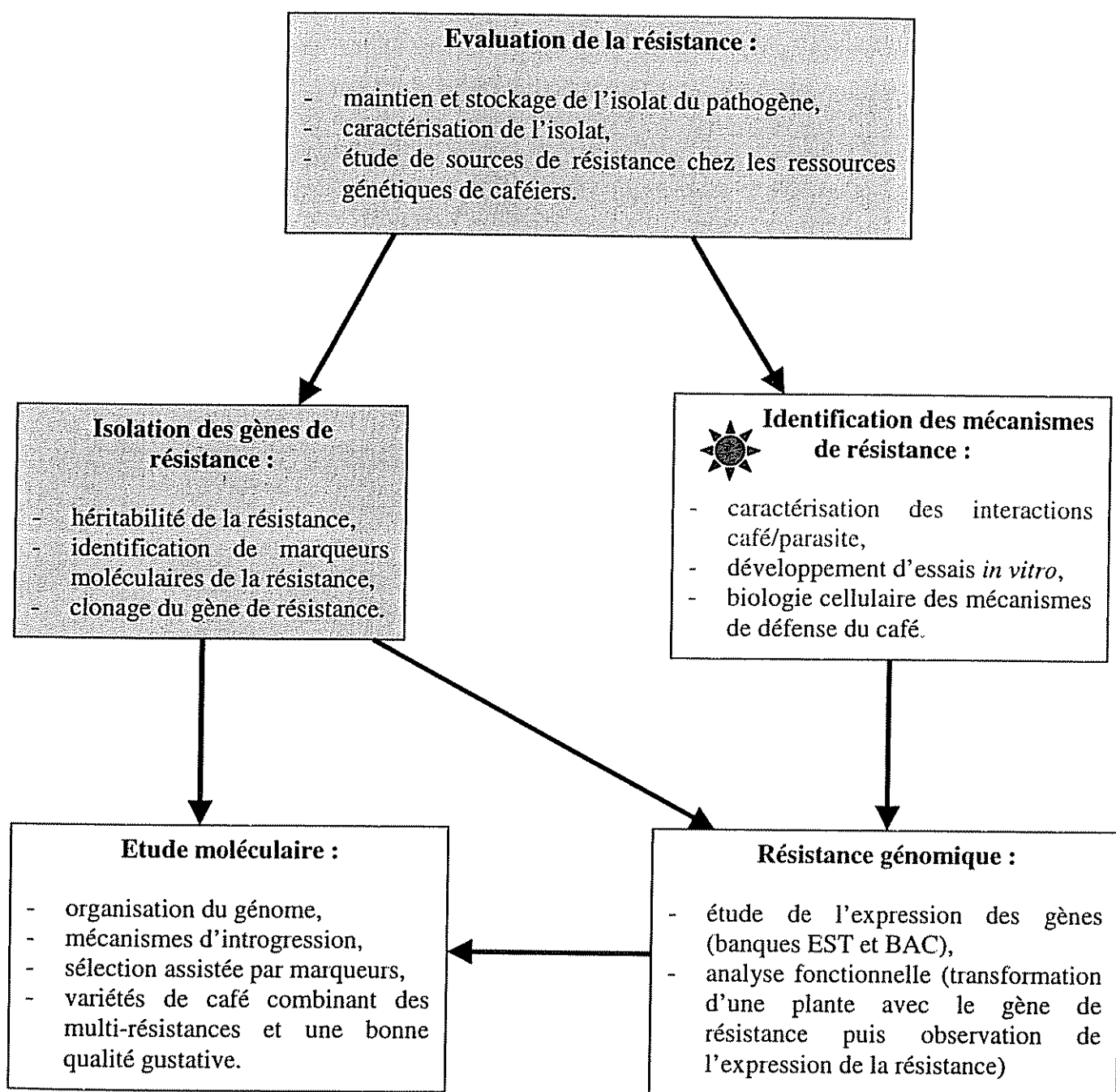


Figure 1 : Représentation schématique des recherches entreprises à l'IRD sur la résistance du caféier aux nématodes. Ma contribution est marquée en rouge. Les couleurs de fond indiquent le degré d'avancement des activités : en cours, début.

Ce rapport est structuré en quatre parties. Une première partie synthétise les connaissances actuelles sur la diversité génétique des caféiers, la biologie du parasite, les mécanismes de résistance chez les plantes cultivées et les méthodes possibles de lutte contre les nématodes. Une deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisés au cours du stage. Les résultats sont décrits dans la troisième partie, puis discutés dans la quatrième partie.

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA DIVERSITE DES RESSOURCES GENETIQUES DU CAFEIER

Les ressources génétiques d'une plante cultivée correspondent à l'ensemble des plantes avec lesquelles elle peut échanger des gènes. Pour *C. arabica*, les ressources génétiques incluent une centaine d'espèces décrites dans le genre *Coffea* et les espèces moins connues du genre *Psilanthus*. Toutes ces espèces possèdent un génome de base commun qui permet l'obtention d'hybrides par croisements contrôlés.

A ce jour, les programmes d'amélioration génétique du café ont utilisé seulement une partie infinitésimale de la grande réserve de gènes qui sont disponibles dans les collections. En Amérique latine, les programmes d'amélioration ont exploité une base génétique limitée, introduite au XVIII^e siècle, puis plus récemment, vers 1950, la résistance à la rouille orangée, identifiée chez un hybride interspécifique naturel (*C. arabica* x *C. canephora*), appelé Hybride de Timor. Cette sous-utilisation des ressources génétiques s'explique par le fait que les collectes de caféiers sauvages ont été entreprises récemment, durant la deuxième moitié du XX^e siècle. Il en résulte un manque d'information sur les caractéristiques intéressantes pour l'amélioration et l'organisation de la diversité génétique.

I.1 Les caféiers à la conquête du monde

La culture du café arabica a débuté en Ethiopie, son lieu d'origine, où il se rencontre à l'état sauvage. La date est incertaine et pourrait être au commencement du VIII^e siècle. La culture s'est maintenue comme un monopole des Arabes, à proximité de la mer rouge jusqu'au XV^e siècle, avec une forte expansion en Arabie du sud (actuellement le Yémen) au XIV^e siècle, et au Moyen Orient durant le siècle suivant. Les intérêts commerciaux liés à l'essor de la boisson ont entraîné des vols de plantes et de graines (Anthony *et al.*, 1999).

- **Le caféier Arabica vers l'Asie et l'Europe**

Le premier vol de café connu fut l'œuvre d'un migrateur hindou, qui, au commencement du XVII^e siècle, a introduit quelques graines au sud de l'Inde. La culture s'est maintenue sporadiquement jusqu'à l'arrivée des Anglais à la fin du XVIII^e siècle (Perrard, 1993).

L'introduction du café en Europe fait l'objet de plusieurs versions qui diffèrent sur les conditions de sortie des plantes d'Arabie vers la Hollande, à la fin du XVII^e siècle, et sur les étapes du voyage jusqu'en Hollande. Cependant, toutes mentionnent que le premier transfert s'est effectué de Java au jardin botanique d'Amsterdam (1706) et fut d'une seule plante.

Cet individu a joué un rôle exceptionnel dans l'histoire de la création variétale car il est à l'origine de la majorité des variétés cultivées dans le monde (Chevalier et Dragon, 1928 ; Carvalho, 1946). Au début du XVIII^e siècle, la culture de café s'est propagée rapidement en Indonésie puis aux Philippines.

En 1714, après la signature du traité de paix de Utrecht entre la Hollande et la France, un bourgeois d'Amsterdam offrit un plant de café au roi Louis XIV. Il grandit dans une serre du jardin des plantes de Paris et produisit rapidement des graines (Chevalier et Dragon, 1928). En 1715, la France reçut quelques plantes de la part du sultan du Yémen qui furent envoyées à l'île Bourbon (île de la Réunion) (Perrard, 1993).

- **Le caféier Arabica dans le continent américain**

Les premières introductions dans le continent américain datent du début du XVIII^e siècle. Des plantes furent envoyées depuis Amsterdam à la Guyane hollandaise (Surinam), et de Paris à la Martinique. La culture s'étendit rapidement à la Guyane française puis au Brésil en 1727. Apparemment, les graines produites en grande quantité en Guyane française furent à l'origine du développement de la culture en Martinique (Chevalier et Dragon, 1928).

Les Anglais introduisirent des caféiers en Jamaïque en 1730. A la fin du XVIII^e siècle, la culture s'étendit aux Caraïbes (Cuba, Puerto Rico, Saint Domingue, ...), Mexique et Colombie.

Des caféiers de l'île Bourbon furent introduits au Brésil entre 1860 et 1870. Des graines d'autres caféiers, s'apparentant à ceux de l'île Bourbon et identifiés comme « café de Sumatra », arrivèrent au Brésil en 1896 depuis Londres (Krug *et al.*, 1939). Ces introductions permirent la sélection de nouvelles variétés.

En définitif, les caféiers du Yémen donnèrent origine à deux types d'Arabica : *C. arabica* var. *arabica*, connu comme Typica et qui fut cultivé dans le jardin botanique d'Amsterdam, et *C. arabica* var. *bourbon* diffusé à partir de l'île Bourbon (Krug *et al.*, 1939 ; Carvalho *et al.*, 1969). Toutes les variétés cultivées en Amérique Latine proviennent de la base génétique Typica qui fut constituée par la descendance d'un seul caféier

- **Les autres espèces cultivées**

En 1834, seules quatre espèces de café étaient connues, mais un siècle plus tard, après la colonisation des pays du golfe de Guinée, elles étaient plus de cinquante (Chevalier, 1929).

Les essais de culture d'autres espèces furent motivés par les dégâts provoqués dans les plantations de *C. arabica* par des maladies comme la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*) et des ravageurs comme les vers blancs du tronc (*Xylotrechus quadripes*) et la « broca » (*Hypothenemus hampei*). Seulement deux espèces furent reconnues comme alternatives à *C. arabica* : *C. canephora* (café Robusta) cultivé à grande échelle à Java, Afrique tropicale et Madagascar ; et *C. liberia* var. *dewevrei* (café Excelsa) présent en petite quantité à Java, Indochine et Afrique tropicale (Chevalier, 1947). Les plantations africaines furent dévastées par une épidémie de tracheomycoses (*Fusarium xylarioides*) entre 1930 et 1950, et uniquement quelques origines de *C. canephora* manifestèrent des caractères de résistance (Charrier et Berthaud, 1988).

Une autre espèce de caféier, *C. racemosa*, est encore cultivée au Mozambique, pour la consommation locale. Le café, connu comme « café de Inhambane », serait semblable au café de la variété Moka, célèbre pour sa bonne qualité (Chevalier, 1947).

1.2 Les ressources génétiques conservées dans les collections

Proposer une solution génétique aux problèmes de la caféiculture consiste à explorer la diversité génétique disponible dans la nature pour transférer de nouvelles potentialités aux variétés cultivées. Une telle solution dépend des ressources naturelles disponibles et des connaissances sur les caractères utiles et sur les modalités de leur transfert.

- **L'origine de caféiers sauvages**

A l'exception de quelques espèces du genre *Psilanthus* originaires d'Asie et d'Océanie, les caféiers se rencontrent à l'état sauvage dans les forêts de la zone intertropicale de l'Afrique et à Madagascar. Ils se présentent sous la forme d'arbres ou d'arbustes et parfois de buissons. Plus d'une centaine d'espèces de café ont été décrites par les botanistes, lesquelles indiquent une grande diversification en réponse à l'évolution des milieux forestiers naturels (Anthony *et al.*, 1999).

- **Les principales collections**

Il existe 10 collections importantes pour l'espèce *C. arabica* : cinq en Afrique (Ethiopie, Kenya, Tanzanie, Cameroun, Côte d'Ivoire), une à Madagascar, une en Asie (Inde) et trois dans le continent américain (Costa Rica, Colombie, Brésil). A l'exception de *C. canephora* représenté dans quatre collections importantes (Côte d'Ivoire, Cameroun, Madagascar et Inde), les autres ressources génétiques ont eu une diffusion très restreinte, limitée à quelques individus.

L'Amérique centrale dispose de la collection du CATIE, avec plus de 1.700 introductions. Elle contient la quasi-totalité de la diversité génétique de l'espèce *C. arabica*. Cependant, comme la majorité des collections existant dans le monde, elle possède seulement une représentation très réduite des autres espèces de caféier. De plus, le mode de conservation en champs ne permet pas de garantir la préservation de ces ressources à long terme. En effet, le matériel souffre d'une érosion génétique due aux pressions de sélection exercées par l'environnement. D'autres modes de conservation, basés sur des méthodes faisant appel aux biotechnologies, devraient être utilisés en complément.

1.3 La diversité génétique disponible chez *C. arabica*

La diversité génétique disponible pour l'amélioration s'évalue à deux niveaux : le génotype, grâce aux marqueurs moléculaires, et le phénotype, au moyen d'observations agro-morphologiques. A la différence des marqueurs agro-morphologiques, les marqueurs moléculaires sont neutres et présentent un important polymorphisme. Leur expression ne dépend pas du milieu d'étude et ne varie pas avec l'âge des individus.

- **Les individus sauvages**

En 1964 et 1965, la FAO, puis l'ORSTOM (maintenant IRD) en 1966 ont organisé des collectes de caféiers spontanés et sub-spontanés en Ethiopie (FAO, 1968 ; Guillaumet et Hallé, 1978). Ce matériel a été distribué dans plusieurs collections mondiales dont celle du CATIE. Plusieurs études ont été réalisées à partir de ces collections et aboutissent à la conclusion d'une forte variabilité phénotypique qui se structure sur la base de données biogéographiques (Charrier, 1978).

Face aux maladies, les caféiers sauvages constituent une source de gènes de résistance. En ce qui concerne la rouille orangée (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.), il semble que certaines accessions présentent un bon niveau de résistance partielle (Gil, 1988 ; Holguin, 1993). Certaines origines présentent des résistances aux CBD (*Colletotrichum kahawae*) et aux nématodes *Meloidogyne* spp. (Anzueto *et al.*, 2001 ; Bertrand *et al.*, 2001).

La diversité des caféiers sauvages apparaît cependant moins importante lorsqu'elle est étudiée par des marqueurs moléculaires. Le centre de diversité de l'espèce *C. arabica* se trouve en Ethiopie, sur le plateau de Boma au Soudan (Thomas, 1942) et sur le Mont Marsabit au Kenya (Anthony *et al.*, 1987). Le Yémen est considéré comme un centre de diversité secondaire. Cependant, les distances génétiques entre ces différents groupes de caféiers sont très faibles.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la variabilité phénotypique et la faible diversité génétique : l'action d'un nombre restreint de gènes à effets pléiotropiques et des variations épigénétiques dans la régulation de l'expression des gènes (Bertrand, 2002).

- **Les variétés cultivées**

L'histoire de la domestication de l'espèce est caractérisée par des réductions successives de diversité génétique. Les études menées avec des marqueurs moléculaires RAPD et AFLP (Lashermes *et al.*, 1996 ; Anthony *et al.*, 2001b), confirment l'existence de deux groupes, Typica (provenant du Yémen) et Bourbon (provenant de l'île de la Réunion) et la présence d'un polymorphisme dans le groupe Bourbon légèrement supérieur à celui constaté chez le Typica. Ce dernier résultat confirme des données historiques selon lesquelles la base génétique Bourbon s'est constituée à partir de plusieurs individus alors que la base Typica provient d'une seule plante. Finalement, ces deux bases génétiques se distinguent des caféiers sauvages par les marqueurs moléculaires mais avec de faibles distances génétiques.

Malgré une base génétique très étroite, les sélectionneurs ont pu créer des variétés très productives. Jusque dans les années 1950-1960, le progrès génétique se résume par le remplacement progressif des plantations, alors constituées essentiellement de « Typica » par des lignées de « Bourbon ». On considère en général que les « Bourbon » sont des caféiers plus compacts et plus productifs (40% de plus que le Typica pour les meilleures sélections) et qu'ils supportent mieux le plein ensoleillement (Carvalho, 1988).

En 1935, un arbre de petite taille fut découvert au Brésil dans une population de Bourbon. La variété créée à partir de cet individu a été appelée « Caturra ». Avec l'utilisation du plein ensoleillement et de fortes fumures, les variétés naines comme cv. Caturra sont très largement avantagées (Bertrand *et al.*, 1999). Cv. Caturra joua le rôle de catalyseur pour l'adoption de nouvelles pratiques culturales, et on peut considérer l'adoption de cette variété « naine » comme le véritable point de départ d'une « révolution verte » en arabicaulture (Bertrand *et al.*, 1999).

La figure 2 résume la généalogie des trois principales variétés issues des bases génétiques diffusées au XVIII^e siècle. Actuellement, ces variétés composent de 70-80% du verger latino-américain et doivent être considérées comme base de comparaison pour estimer le progrès génétique des nouvelles sélections.

L'idée de faire appel aux espèces diploïdes proches, pour améliorer l'espèce *C arabica* a pris de l'ampleur en Amérique latine lors de l'arrivée de la rouille orangée.

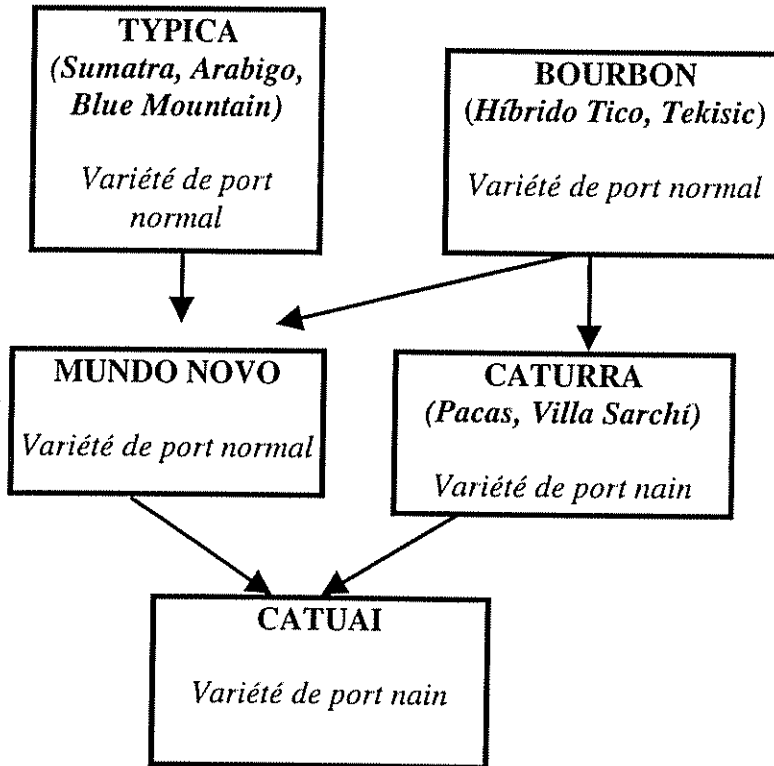


Figure 2 : Généalogie des principales variétés traditionnelles (Bertrand *et al.*, 1999); 2 flèches indiquent un croisement, 1 flèche indique une mutation.

L'attention des chercheurs s'est portée sur des descendance de l'Hybride de Timor, issu d'une hybridation interspécifique naturelle entre *C. arabica* et *C. canephora* (Bettencourt, 1973). Cet hybride tétraploïde ($2n = 4x = 44$) possède en effet de nombreux gènes de résistance à la rouille orangée qui proviennent de son parent *C. canephora* et se prêtent bien à des rétrocroisements par *C. arabica* (Moreno, 1989). Trois origines de l'Hybride de Timor ont été croisées avec des variétés traditionnelles (Annexe 2). L'intérêt des lignées introgressées pour leurs résistances à divers pathogènes a été confirmé. Notamment, la résistance de cv. IAPAR59, dérivée d'un croisement entre cv. Villa Sarchi et l'Hybride de Timor, vis-à-vis des nématodes (*Meloidogyne* spp.).

I.4 Les objectifs de l'amélioration génétique en Amérique centrale

La définition claire des objectifs de sélection est essentielle au départ d'un programme d'amélioration. Cette définition se base sur une analyse des risques biologiques (exogènes et endogènes au système de culture), ainsi que des contraintes économiques et commerciales. Les caractéristiques de l'arabica culture en Amérique centrale peuvent se résumer ainsi :

- une grande diversité des zones de culture, des reliefs et des microclimats aboutissant à une grande diversité des terroirs,
- une faible disponibilité des terres agricoles qui entraîne une nécessaire intensification de la culture et donc la recherche de gains de productivité,
- des problèmes liés à une faible durabilité des systèmes de production, qui s'opposent à l'intensification de la culture,
- de fortes variations des prix qui entraînent souvent des modifications des pratiques agronomiques,
- une part croissante des cafés fins ou des cafés « terroirs » dans la demande,
- une pression du marché pour un café sans résidus de pesticides et si possible biologique.

Ces contraintes multiples aboutissent à la définition de nouveaux types de variétés à développer. Celles-ci doivent combiner :

- une résistance aux principales maladies (rouille, anthracnose des baies, nématodes),
- une productivité supérieure à celle des meilleures lignées actuelles (cv. CR95 dans le cas de l'Amérique Centrale),
- une qualité à la tasse comparable ou supérieure à celle de cv. Caturra,
- une bonne adaptabilité à une réduction des intrants (en cas de crise économique ou dans le cas d'une caféiculture biologique), c'est-à-dire une bonne stabilité de production,

- un port nain pour une plantation à haute densité, avec une fertilité comparable à celle du cv. Caturra.

II. LES NEMATODES ENDOPARASITES SEDENTAIRES DU CAFEIER

II.1 Les pertes occasionnées par les nématodes du caféier

Les problèmes phytosanitaires posés par les nématodes phytoparasites ont une incidence économique très importante à l'échelle mondiale à cause de leur grande aire de répartition, de la diversité des cultures attaquées (plus de 2.000 espèces végétales) et des dommages qu'ils provoquent. Un tiers au moins de la production agricole perdue chaque année dans le monde peut être imputé directement ou indirectement aux dégâts provoqués par les attaques des nématodes phytoparasites dans les cultures (IFAS, 1989 ; Whitehead, 1998). Ces pertes sont estimées à 100 milliards de dollars chaque année (Cai *et al.*, 1997).

Des échantillonnages effectués dans certains pays ont montré que des surfaces importantes dédiées à la culture du caféier étaient concernées. Par exemple, plus de 40 % de la caféiculture au Guatemala (Villain *et al.*, 1999) ou plus de 54 % des exploitations caféicoles au Salvador (Bertrand, 2002). Au Guatemala, Alvarado (1997) avance une perte de 20 % de la production due aux nématodes dans l'une des régions caféicoles les plus importantes de ce pays.

II.2 Les principales espèces parasites

Le caféier est une plante-hôte de plusieurs genres et espèces de nématodes dans le monde. En Amérique Latine, il existe deux genres principaux de nématodes parasitant les caféiers : *Pratylenchus* ou nématodes des lésions et *Meloidogyne* ou nématodes à galles. Ces deux nématodes sont fréquemment associées dans les racines de caféiers comme c'est souvent le cas en milieu tropical (Luc et Reversat, 1985). Par ailleurs, les nématodes sont souvent associés à d'autres agents pathogènes, champignons et/ou bactéries, qui augmentent considérablement les dégâts (Powel, 1971). Chez le caféier, Negrón et Acosta (1989) ont mis en évidence l'existence d'une pathologie complexe entre *Fusarium oxysporum* et *M. incognita*. Plus récemment, Bertrand *et al.* (2000b) ont montré que le couple *F. oxysporum* / *M. arabicida* était à l'origine d'une étiologie appelée « corchosis ».

II.3 Les nématodes du genre *Meloidogyne*

II.3.1 La diversité des espèces de *Meloidogyne* parasitant les caféiers

Il existe de nombreuses espèces de *Meloidogyne* qui parasitent les caféiers. En Amérique Latine et dans les Caraïbes, plus de 10 espèces sont mentionnées sur *Coffea* spp. Bertrand (2002) propose une échelle de grandeur qui permet la comparaison des symptômes de plusieurs nématodes à galles présents sur caféiers en Amérique Latine (Annexe 3). Lors de différentes enquêtes menées sur ce continent, il apparaît que le nématode le plus fréquent est *M. exigua*, suivi de *M. incognita* puis de *M. paranaensis*. Parmi les espèces de nématode qui provoquent la mort des caféiers, le cas de *M. paranaensis* est très préoccupante par l'étendue de son aire de distribution (Carneiro *et al.*, 2000). Les nématodes *M. arenaria*, *M. arabicida* et *M. konaensis* provoquent des dégâts importants mais relativement localisés. Le nématode le moins agressif pour le caféier est sans doute *M. exigua*. Les baisses de production sont de l'ordre de 10 à 15% (Bertrand *et al.*, 1997).

II.3.2 Le cycle biologique

Le cycle de développement des nématodes du genre *Meloidogyne* comprend quatre stades larvaires et un stade adulte, séparés par quatre mues (Figure 3) (De Guiran et Netscher, 1970). En ce qui concerne les femelles, seules importantes du point de vue parasitisme, il est divisé en deux phases : la phase sol ou exophyte (en dehors de la plante hôte) qui va de la ponte à la pénétration des larves de deuxième stade dans les racines et la phase endophyte qui comprend le développement et la reproduction à l'intérieur des tissus. Dans des conditions favorables le cycle se déroule en trois ou quatre semaines.

Les femelles adultes pondent des œufs réunis par une substance gélatineuse en une masse à l'intérieur de laquelle on peut trouver des œufs à tous les stades de leur développement, depuis le stade unicellulaire jusqu'aux larves prêtes à éclore. Le développement d'un œuf entre ces deux stades prend de sept à neuf jours à 28°C. Pendant cette période, les nématodes subissent une première mue et les larves qui éclosent sont donc des larves de deuxième stade, appelées J2 (Annexe 4).

Une fois écloses, les larves se déplacent dans le sol. Les nématodes du genre *Meloidogyne* étant des parasites obligatoires, les larves ne peuvent continuer leur cycle et parvenir au stade adulte que si elles parviennent à pénétrer à l'intérieur des racines d'une plante hôte. Elles se regroupent généralement autour de la zone sous-apicale des racines en croissance où elles détruisent la paroi par l'action de leur stylet. Elles peuvent alors pénétrer dans les tissus. Le point de pénétration attire souvent d'autres larves et une pénétration massive a lieu à cet endroit (Figure 4a).

Ayant pénétré dans la racine, les larves se déplacent à la fois dans les niveaux intra et inter-cellulaires. Elles parviennent ainsi au voisinage du cylindre central le long duquel elles s'immobilisent, la tête figée dans le plérome (Figure 4b) (De Guiran et Netscher, 1970).

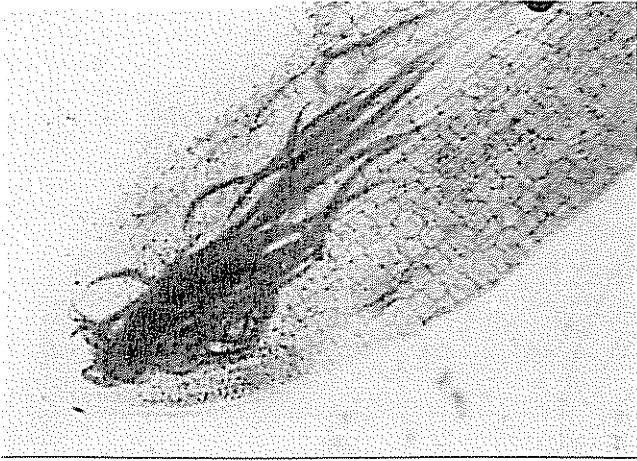
Linford (1937 et 1942) a observé la façon dont se nourrissent les larves. Ces dernières percent la paroi des cellules par des mouvements répétés du stylet, en injectant des sécrétions œsophagiennes, puis, après quelques secondes de repos, elles aspirent le contenu prédigéré des cellules grâce à leur bulbe médian. Les larves se nourrissent ainsi sur les cellules épidermiques, puis sur les cellules corticales, et enfin sur celles du cylindre central. Elles provoquent des modifications anatomiques : déformation du tissu vasculaire, apparition de « cellules géantes » polynuclées, hypertrophie des cellules corticales, le tout aboutissant à la formation des galles caractéristiques, dont la genèse sera étudiée plus loin (chap II.3.4).

Le développement de *M. javanica* a été étudié par Bird (1959) dans les racines de tomate. Bien que la durée de ce développement dépende de l'espèce de nématode, de la plante-hôte, de sa physiologie et de facteurs externes comme la température, les différents stades se succèdent toujours de la même manière. Pendant les deux premières semaines la superficie de la coupe longitudinale des larves est presque triplée. Après deux semaines, les larves subissent une deuxième mue. Les quatre jours qui suivent sont marqués par deux autres mues. Entre la 2^e et la 4^e mue, le stylet n'est pas présent et les nématodes ne peuvent pas se nourrir. Après la 4^e mue, les nématodes ont atteint le stade adulte. Ils se sont alors transformés soit en mâle, soit en femelle (Figure 4c et 4d). Le stylet est réapparu et les gonades se sont développées.

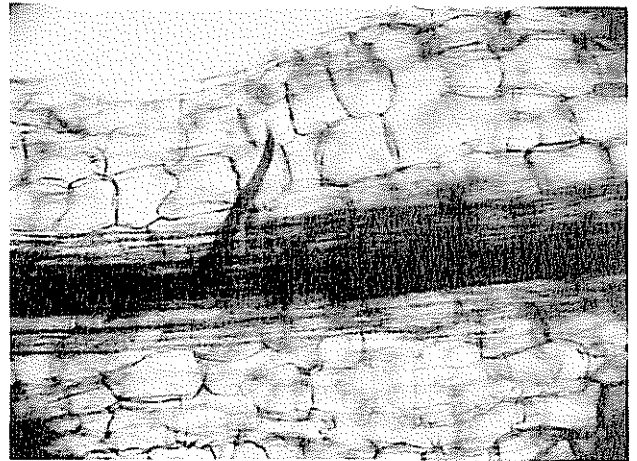
Les jeunes femelles restent en place et se nourrissent des cellules géantes situées autour de leur tête. Elles pénètrent ces cellules avec leur stylet et y injectent un liquide sécrété par la glande dorsale de l'œsophage. Les femelles grossissent rapidement (Figure 4e) et commencent à pondre des œufs environ trois semaines après la pénétration dans la racine (Figure 4f) (De Guiran et Netscher, 1970).

II.3.3 La sexualité et la reproduction

Les nématodes endoparasites peuvent se reproduire par parthénogenèse. La densité des populations, la température, la nutrition de la plante et l'application d'hydrazide maléique sur ses feuilles ont une influence sur l'expression du sexe. En général, des conditions défavorables pour la plante induisent une augmentation de la proportion de mâles, ce qui réduit la capacité de reproduction de la population.



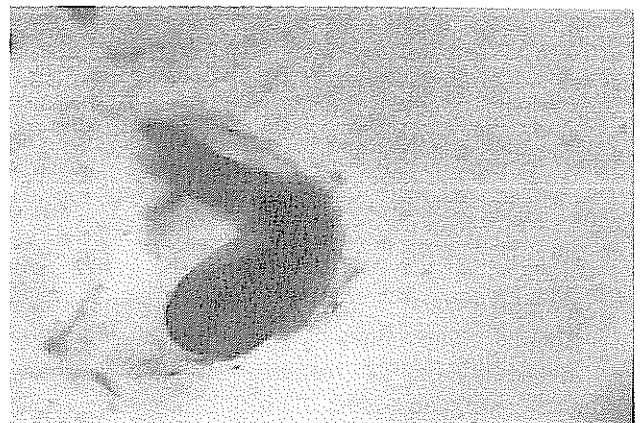
a : Pénétration massive des larves de deuxième stade dans un apex racinaire de Caturra (T+4, essai 5) G : x 50



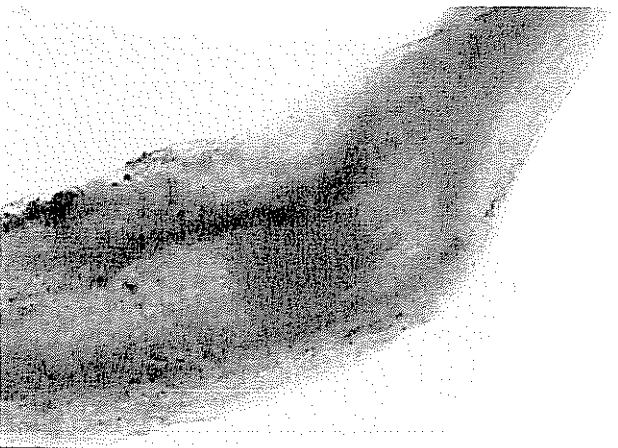
b : Larve de deuxième stade, la tête figée dans le plérome du cylindre central d'une racine de Caturra (T+4, essai 5). G : x 125



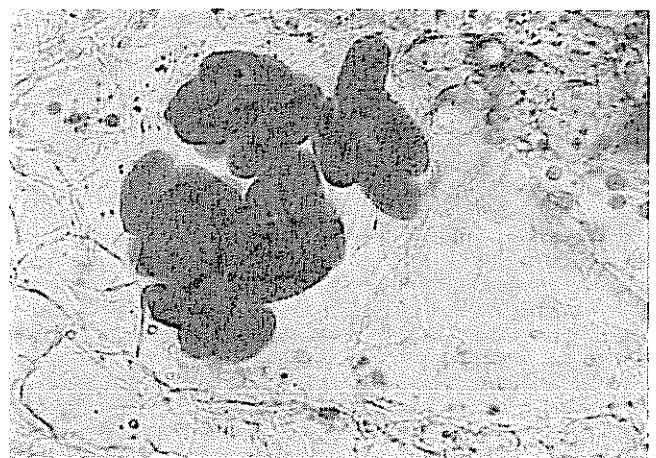
c : Renflement d'un apex racinaire contenant plusieurs femelles pyriformes (Caturra, T+13, essai 5) G : x 50



d : Femelle pyriforme en cours de grossissement (Caturra, T+25, essai 6) G : x 125



e : Femelle sphérique (IAPAR, T+29, essai 1) G : x 50



f : Masse d'œufs (Caturra, T+46, essai 6) G : x 125

Figure 4 : Observations cytologiques (colorations à la fuschine acide) de racines de *C. arabica* inoculées par *M. exigua*

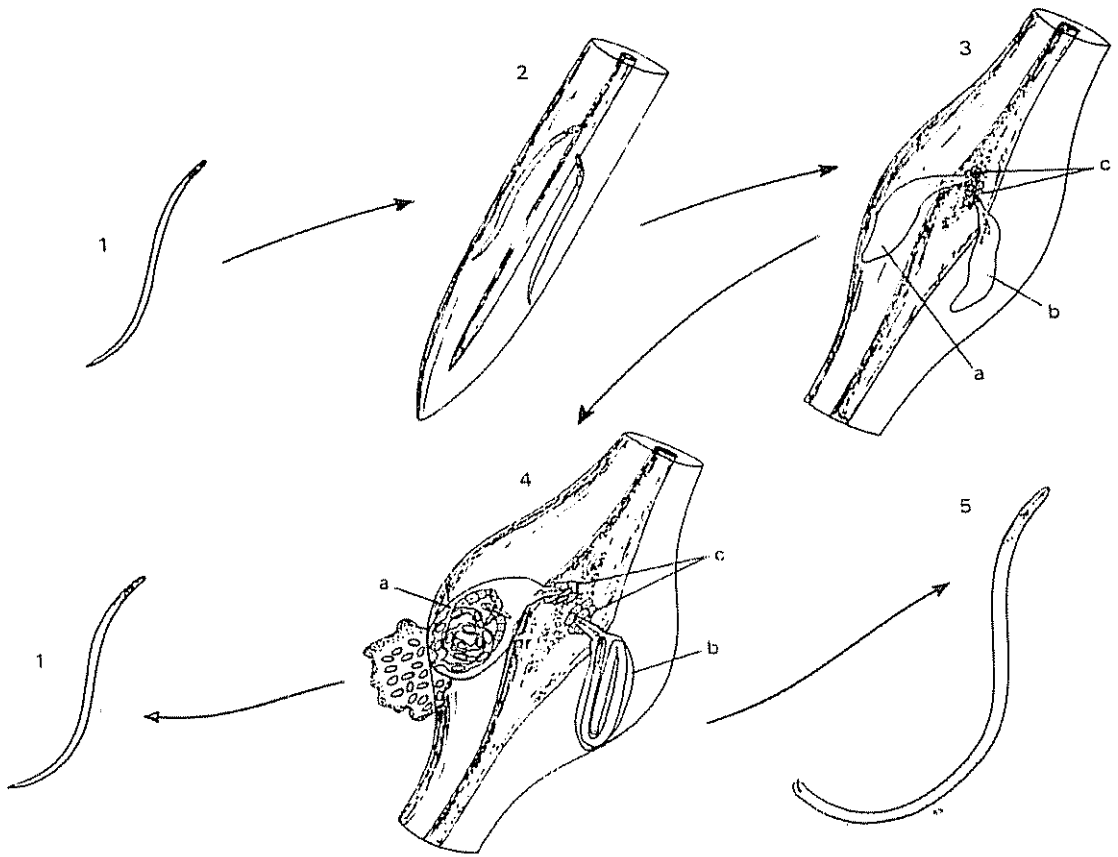


Figure 3 : Cycle schématisé des *Meloidogyne* (De Guiran et Netscher, 1970) 1 : larve libre de deuxième stade ; 2 : larve de deuxième stade ayant pénétré dans une racine en croissance ; 3 : galle en début de formation, a-b larves de deuxième stade renflées, c cellules géantes ; 4 : galle contenant, a femelle adulte ayant pondu ses œufs dans la substance gélatineuse, b mâle adulte pelotonné dans les enveloppes larvaires, c cellules géantes ; 5 : mâle adulte ayant recouvré sa liberté

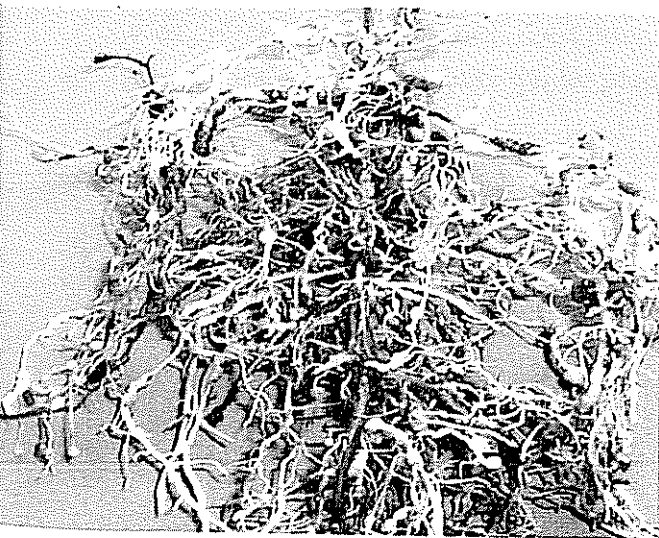


Figure 5 : Galles provoquées par *Meloidogyne exigua* sur un système racinaire de Caturra (stade physiologique 6 paires de feuilles)

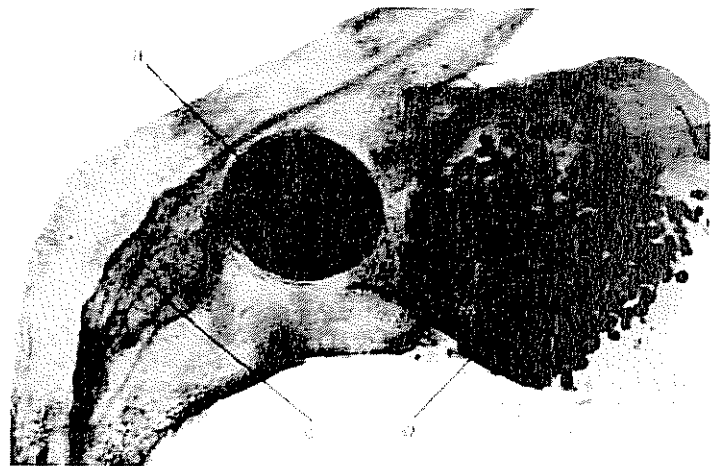


Figure 6 : Galle provoquée par *Meloidogyne* sp. sur une jeune racine de tabac Coloration par le bleu coton à froid (De Guiran et Netscher, 1970) a : femelle ; b : masse d'œufs ; c : cellules géantes

II.3.4 Les symptômes

- **Les symptômes locaux (racines)**

Le symptôme primaire, typique d'une infection par *Meloidogyne*, est la présence de galles sur les racines (Figure 5). Ces galles, malgré des différences de taille et de forme, ont toujours le même mode de formation et la même structure de base. Dès son entrée dans la racine, la larve de deuxième stade provoque, par les sécrétions qu'elle expulse à travers son stylet, l'hypertrophie des cellules corticales.

Elle migre ensuite vers la future zone vasculaire le long de laquelle elle vient s'immobiliser, la tête logée dans la partie externe de cette zone. Les cellules entourant la tête de la larve subissent alors une série de modifications qui ont été décrites très en détail par Christie (1936) et par Cristina *et al.* (2000). Ces cellules grossissent en même temps que leurs noyaux se divisent par mitose, puis les membranes disparaissent entre plusieurs cellules adjacentes, avec coalescence des cytoplasmes. Ceci aboutit à la formation de « cellules géantes » plurinucléées. La prolifération du cytoplasme et des organites, la plurinucléation et le développement d'un mur cellulaire suggère une grande activité métabolique.

Peu de temps après la maturation des femelles, Paulson et Webster (1970) observent une déstructuration de ces cellules, caractérisée par une diminution de la perméabilité membranaire et la disparition des organites. Bird (1962) a montré que les cellules géantes ne pouvaient se former et subsister qu'avec un stimulus permanent émanant de la larve. Réciproquement, la larve ne peut se développer et parvenir à maturité qu'en présence de ces cellules. Il est donc probable que c'est d'elles et d'elles seules que la larve tire les éléments nutritifs qui lui permettent d'accomplir son développement.

Dans une galle formée par une seule larve femelle, on trouve donc au centre un renflement du cylindre central où les éléments vasculaires sont fortement déformés et qui contient de quatre à six cellules géantes entourant la tête du nématode (Figure 6). La partie globuleuse du corps de la femelle est entourée par le parenchyme cortical qui a subi à la fois une hyperplasie et une hypertrophie cellulaire. L'extrémité postérieure de la femelle, où s'ouvre la vulve, affleure à la surface de la galle et la masse gélatineuse englobant les œufs fait saillie à l'extérieur des tissus de l'hôte.

La forme, la taille et l'aspect des galles peuvent varier selon leur âge, la nature de la plante-hôte et l'espèce de *Meloidogyne* en cause. Elles peuvent parfois être absentes malgré la présence de femelles gravides. Dans ce cas, la racine ne subit pas d'hypertrophie et seules quelques cellules géantes peuvent être observées au point d'infection.

De telles situations correspondent souvent à des attaques bénignes mais sont d'autant plus dangereuses qu'elles sont difficilement décelables, tout en assurant la multiplication du parasite. Mais la gravité de l'attaque peut généralement être évaluée d'après l'aspect des racines.

La taille des galles varie selon les plantes-hôtes. Elles sont d'autant plus volumineuses que la plante demeure longtemps en terre. Les galles croissent en effet avec les racines. Les premières femelles, ainsi que les œufs qu'elles ont pondus, sont englobés dans les tissus. Certains de ces œufs éclosent et les larves issues de ces éclosions réinfectent la même galle qui peut donc contenir des individus à tous les stades, appartenant à plusieurs générations.

- **Les symptômes généraux (parties aériennes)**

Il n'existe pas de symptômes spécifiques sur les parties aériennes, qui traduisent sans doute possible le parasitisme de *Meloidogyne*. Il s'agit plutôt d'une déficience générale, consécutive d'une part à l'action du parasite qui modifie le métabolisme de la plante et en détourne une partie à son profit, et d'autre part à la réduction du système racinaire qu'entraîne sa présence (De Guiran et Netscher, 1970). Cette réduction a pour première conséquence une diminution de l'alimentation minérale de la plante. La partie aérienne présente alors un aspect chétif : la croissance est retardée, les feuilles sont réduites et peuvent accuser des symptômes de déficience minérale (chlorose, décoloration,...). La floraison et la fructification peuvent être fortement diminuées. L'absence de chevelu racinaire entraîne en outre une perturbation dans l'alimentation en eau : la plante attaquée souffrira plus vite de la sécheresse. Tout ceci amène inmanquablement une diminution de rendement, quelle que soit la partie de la plante qui doit être récoltée. Cette diminution est fonction de la population qui vit aux dépens de la plante et qui tend évidemment à croître lorsqu'on cultive pendant plusieurs années une plante sensible sur un terrain infesté.

II.3.5 L'écologie du parasite

Le développement d'une population de *Meloidogyne* sur une culture dépend de trois facteurs : la possibilité qu'aura le parasite de se conserver dans le sol en attendant qu'une plante-hôte y soit installée, celle de se déplacer pour atteindre les racines d'une plante-hôte et enfin celle d'y pénétrer, de s'y développer et de s'y reproduire (De Guiran et Netscher, 1970).

La conservation dans le sol peut être limitée par un certain nombre de facteurs dont les plus importants en culture tropicale sont l'excès de sécheresse ou d'humidité.

Le parasite dans sa phase exophyte peut résister, dans une certaine mesure, à ces conditions défavorables : la sécheresse du sol suspend l'éclosion des œufs et l'excès d'humidité induit une quiescence des larves. Mais le cycle relativement court, surtout en milieu tropical, et le grand pouvoir reproducteur du parasite lui permettent de reconstituer rapidement des populations importantes et de provoquer des dégâts sur les cultures d'autant plus prononcés que le sol favorisera la migration des larves vers les racines en croissance et que les conditions permettront un développement et une reproduction rapides dans les tissus.

III. LES MECANISMES DE RESISTANCE AUX NEMATODES IDENTIFIES CHEZ LES PLANTES

Ce chapitre présente les mécanismes de défense intervenant chez les plantes suite à l'attaque par un pathogène. Ces mécanismes sont précisés dans le cas d'une interaction plante / nématode puis caféier / nématode.

III.1 Définitions

- **Résistance et tolérance**

Le terme de résistance concerne exclusivement l'effet de la plante sur la reproduction du nématode. Il décrit l'action des gènes de l'hôte qui visent à limiter ou empêcher la multiplication du nématode.

La tolérance aux dégâts est indépendante de la résistance. Elle désigne la capacité du génotype de l'hôte à se remettre des dommages dus à l'attaque du nématode. Une plante tolérante subit peu de dégâts malgré une forte infestation alors qu'une plante non tolérante subit plus de dégradations (Trudgill, 1991).

Tableau 1 : Résistance et tolérance d'une plante face à l'attaque de nématodes (Trudgill, 1991).

		Croissance de l'hôte	
		Bonne	Mauvaise
Reproduction du nématode	Bonne	Tolérance/non résistant	Intolérance/non résistant
	Mauvaise	Tolérance/résistant	Intolérance/résistant

- **Pathogénicité et virulence**

La pathogénicité est la capacité à causer des dégâts (mesurés par une diminution de production) et la virulence la capacité à surmonter les gènes de résistance de l'hôte (Trudgill, 1991). Leur incidence sur la croissance de la plante hôte et sur la reproduction du nématode est résumée dans le tableau 2.

Tableau 2 : La pathogénicité et la virulence d'un nématode sur une plante hôte (Trudgill, 1991).

		Croissance de l'hôte	
		Bonne	Mauvaise
Reproduction du nématode	Bonne	non pathogène/virulent	pathogène/virulent
	Mauvaise	non pathogène/avirulent	pathogène/avirulent

- **Résistance et sensibilité**

Une plante sensible permet la multiplication du nématode. On distingue ici les plantes tolérantes, qui ne subissent pas de dommages et dont la production n'est pas altérée, des plantes non tolérantes qui souffrent du parasitisme. Une plante résistante ne permet pas la multiplication des nématodes. Entre deux plantes résistante et sensible, on peut trouver des plantes partiellement résistantes qui entretiennent des taux intermédiaires de reproduction du nématode (Gheysen, 1998).

- **La relation gène-pour-gène, compatibilité et incompatibilité**

La spécificité d'un système parasitaire est contrôlée par les génomes de l'hôte et du parasite. A tout gène de résistance de l'hôte correspond un gène d'avirulence chez le parasite (Flor, 1955 et 1971 ; Person 1959). La relation gène-pour-gène a été constatée dans plusieurs systèmes parasitaires qui impliquent des champignons, des bactéries, des insectes, des virus et également des nématodes (Sidhu et Webster, 1981).

On parlera d'incompatibilité pour définir les conséquences des mécanismes physiologiques et les régulations métaboliques qui, dans les plantes résistantes, empêchent le développement des nématodes (avirulents). A l'opposé, on désignera sous le terme de compatibles, les interactions favorables au développement des nématodes (virulents) dans les plantes sensibles. Les réactions incompatibles se caractérisent par un système de reconnaissance activant l'expression des mécanismes de défense de la plante alors que pour les réactions incompatibles, cette étape de reconnaissance n'ayant pas lieu, l'hôte ne se défend pas (Figure 7) (Ordenana, 2002).

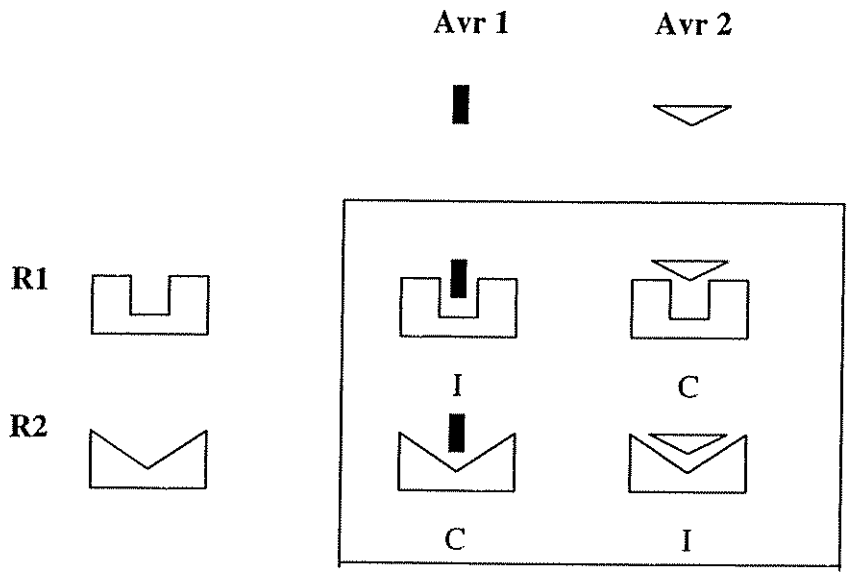


Figure 7 : Le modèle d'interaction gène-pour-gène. Modèle simplifié illustrant comment la présence ou l'absence de gènes de résistance (R) dans l'hôte et de gènes d'avirulence (Avr) correspondant dans le pathogène déterminent la reconnaissance et définissent un type d'interaction compatible (C) ou incompatible (I) ; Ordenana, 2002.

III.2 Les mécanismes de défense dans une réaction incompatible

Une fois que le pathogène est reconnu, une série de mécanismes de défense s'activent à la suite de cascades de signaux qui ne sont pas toutes caractérisées (Figure 8). Ces mécanismes incluent principalement la mort cellulaire par la réaction hypersensible (HR), l'accumulation de métabolites secondaires à action antimicrobienne, l'accumulation d'enzymes hydrolitiques et le dépôt de substance de renforcement des parois (Collinge *et al.*, 1994).

III.2.1 Activation de la défense et mécanismes de reconnaissance

- **Activation de la défense**

Les inducteurs spécifiques sont des protéines codées par les gènes d'avirulence du parasite et qui sont capables d'activer les mécanismes de défense chez des cultivars possédant les gènes de résistance correspondant. L'interaction entre les produits des gènes de résistance et d'avirulence entraîne une cascade de signaux conduisant à l'expression des gènes de défense.

- **Mécanismes de reconnaissance**

La caractérisation moléculaire de gènes de résistance a révélé la présence de séquences similaires dans la majorité des protéines de résistance. Il s'agit de répétitions riches en leucine ou LRR de 20 à 30 acides aminés et dont la variabilité confère la spécificité de la reconnaissance.

Les protéines de résistance peuvent avoir deux localisations dans la cellule végétale, transmembranaire ou cytosolique.

Chez les transmembranaires, les séquences LRR sont situées dans la partie externe où elles assurent une reconnaissance extra-cellulaire (Gabriel, 1999). C'est le cas des gènes *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* et *Cf-9* de la tomate qui confèrent la résistance aux races de *Cladosporium fulvum* possédant les gènes *Avr2*, *Avr4*, *Avr5* et *Avr9*, *Xa21* de résistance à *Xanthomonas oryzae* chez la tomate ou *Hs1pro1* de la betterave contre le nématode *Heterodera schachtii* (Takken et Joosten, 2000).

Les protéines localisées dans le cytoplasme reconnaissent les produits des gènes d'avirulence qui arrivent jusqu'à l'intérieur de la cellule hôte. Ce type de protéine n'a pas encore été rencontré dans des systèmes nématode / hôte. On peut cependant citer comme exemple la protéine N du tabac contre le TMV (Virus de la Mosaïque du Tabac) ou le gène *Pto* de tomate contre *Pseudomonas syringae* (Ordenana, 2002).

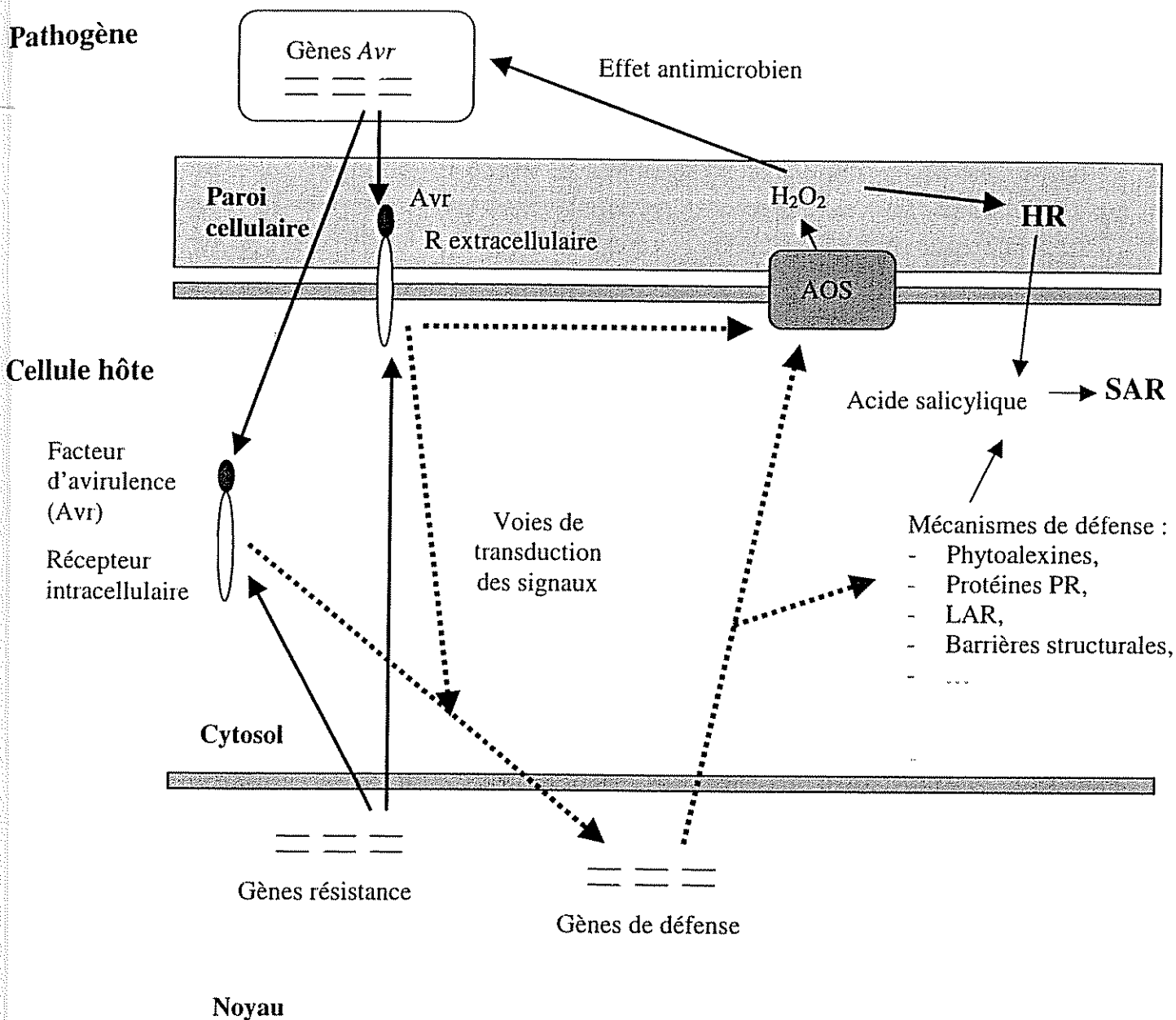


Figure 8 : Modèle simplifié de l'activation des mécanismes de défense d'une cellule hôte, basé sur une étape de reconnaissance gène-pour-gène (Collinge *et al.*, 2001). H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène, HR : Réponse Hypersensible, SAR : Réponse Systémique Acquise, AOS : formes actives de l'oxygène, protéines PR : protéines en relation avec la pathogénicité, LAR : Réponse Locale.

Les gènes de résistance ne sont pas directement responsables de la résistance, mais ils tiennent une fonction déterminante dans la reconnaissance spécifique en agissant comme les initiateurs de la défense (De Wit, 1997).

III.2.2 La Réaction Hypersensible (HR)

- **Définition et intégration dans les mécanismes de défense**

L'hypersensibilité est une réaction caractérisée par une mort rapide et programmée des cellules de la plante infectée, adjacentes au parasite, en réponse à un pathogène. Elle est associée à l'expression simultanée ou parallèle d'autres mécanismes de défense : la production d'acides chlorogéniques qui affectent la coordination des nématodes, de phytoalexines, de subbérine et de protéines riches en hydroxyproline et en relation avec la pathogénicité (PR) qui s'associent au phénomène de la Résistance Systémique Acquise (SAR) (Ryals *et al.*, 1996). La HR produit une réaction de résistance directe en privant le pathogène de tissus vivants et de nutriments mais aussi indirecte par l'accumulation de composés toxiques qui tuent simultanément le pathogène et les cellules hôtes (Heath, 2000).

La HR est précédée par une explosion oxydative qui libère des formes réactives de l'oxygène (AOS) comme l'ion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Levine *et al.*, 1994). Les superoxydes sont extrêmement toxiques et peuvent être éliminés par l'action de la Superoxyde Dismutase (SOD). Zacheo *et al.* (1983) ont étudié la variation de l'activité de la SOD durant l'infection par *M. incognita* dans des plants de tomate sensibles et résistants.

- **Durée d'apparition après inoculation**

La HR induite par les nématodes peut cependant se différencier de celle induite par les autres organismes phytopathogènes. De part leur nature endoparasite, le temps nécessaire à l'initiation de la HR est variable (Trudgill, 1991). Cette réaction peut être précoce, et survenir lors de la pénétration du nématode dans la racine, ou tardive, après la fixation sur le site nourricier, pour empêcher le développement et la multiplication du parasite (Pontier *et al.*, 1999).

Avec *Tylenchulus semipenetrans* la mort cellulaire apparaît deux semaines après inoculation dans le citronnier (Kaplan, 1981). Elle est visible avant deux jours chez des plants de tomate résistants à *Meloidogyne* (Paulson et Webster, 1972) et après huit jours chez *C. arabica* suite à une infestation par *M. exigua* (Cristina *et al.*, 2000). L'intervalle de temps entre la pénétration du nématode et l'initiation de la HR n'est pas déterminé.

Il semblerait que ce processus débute lorsque le nématode a atteint son site nourricier. L'expression d'une réponse est détectée d'abord à l'intérieur du cytoplasme, au niveau du site nourricier initial, immédiatement après l'invasion par le nématode, puis pour empêcher l'établissement de sites nourriciers en nécrosant les cellules alentours. Il en résulte que la croissance de la plante est peu influencée et que la reproduction du nématode est impossible (Cristina *et al.*, 2000).

- **Ultra-structure de la HR**

Des études en microscopie électronique ont montré que les cellules nécrosées étaient localisées autour du nématode (Paulson et Webster, 1972). Plusieurs travaux ont été réalisés dans le but de caractériser histologiquement la HR dans différents systèmes hôtes / nématodes : pomme de terre / *Globodera rostochiensis* (Bleve-Zacheo *et al.*, 1990 ; Rice *et al.*, 1985 ; Forrest *et al.*, 1986), soja / *M. incognita* (Kaplan *et al.*, 1980 ; Dropkin et Nelson, 1960), tomate / *M. incognita* (Paulson et Webster, 1972 ; Dropkin, 1969) et caféier / *M. exigua* et *M. megadora* (Bertrand *et al.*, 1995 ; Cristina *et al.*, 2000).

La HR dans des racines de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) infectées par *M. incognita* a été décrite par Paulson et Webster (1972). Elle débute par une disparition des inclusions vacuolaires, la destruction des membranaires cellulaires et une augmentation rapide de la densité du cytoplasme (accroissement du nombre de ribosomes). Les organites attachés aux membranes disparaissent et le réticulum endoplasmique s'étend, ce qui suggère des changements dans la perméabilité de la paroi et de la membrane cellulaires et la synthèse d'enzymes qui provoquent une désorganisation générale.

Une étude microscopique électronique de racines de *C. arabica* cv. Catimor infectées par *M. exigua* et *M. megadora* montre une condensation de la chromatine, l'altération du métabolisme des carbohydrates, le développement de lysosomes et de vacuoles autophagiques. Cette réponse apparaît comme une réponse de type hypersensible qui conduit à la mort cellulaire (Cristina *et al.*, 2000).

- **Influence de l'âge de la plante sur la mise en place de la HR**

Dans la bibliographie, aucune étude ne traite directement de l'influence de l'âge de la plante hôte sur la mise en place de la HR. On note seulement que des réactions de type hypersensible ont été observées sur des tomates possédant une radicule de 1 cm (Paulson et Webster, 1972 ; Dropkin, 1969) ou se trouvant au stade physiologique 2-3 feuilles (Delroux, 1997) après une inoculation par *M. incognita*.

Bertrand *et al.* (1995) ont vu une réaction semblable chez des plants de café âgés de 6 ans et de 8 mois alors que Cristina *et al.* (2000) l'ont observée sur des plantules juste après apparition de la racine.

III.2.3 La production de phytoalexines

Les phytoalexines sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, possédant des propriétés antimicrobiennes (Paxton, 1981). Elles s'accumulent au niveau du site de pénétration du pathogène et des cellules adjacentes aux cellules subissant la HR. Leur production *de novo* est corrélée à l'induction de l'expression de gènes codant pour des enzymes intervenant dans leur voie de biosynthèse (CHI ou Chalcone Isomérase, CHS ou Chalcone synthase, PAL ou Phénylalanine Ammoniaque ligase) (Ordenana, 2002). Elles sont notamment impliquées dans la résistance du coton (gossypol) et du soja (glycéoline) à *M. incognita* (Trudgill, 1991 ; Kaplan *et al.*, 1980).

III.2.4 Le renforcement des barrières structurales

On observe une accumulation de lignine dans les tissus attaqués par un pathogène. Ce composé confère l'imperméabilité et la résistance mécanique (résistance à la dégradation produite par de nombreux microorganismes) (Nicholson et Hammerschmidt, 1992). Mis à part le processus de lignification, les plantes produisent d'autres composés qui préviennent l'avancée des pathogènes. On peut mentionner les protéines riches en hydroxyproline (HRGP) qui s'accumulent autour des sites d'attaque du parasite évitant sa pénétration (Benhamou *et al.*, 1990) ou la formation de papilles (callose) qui évitent la pénétration des champignons (Skalamera *et al.*, 1997).

III.2.5 L'accumulation des protéines en relation avec la pathogénicité PR

Les protéines s'accumulent dans les plantes pendant et après l'infection par un pathogène. Elles se caractérisent par leur faible poids moléculaire, leur résistance aux protéases et aux valeurs extrêmes de pH, et leur localisation extracellulaire (Van Loon et Van Kammen, 1970). Certaines possèdent des activités bien définies, comme les glucanases ou les quitinases. Cependant, le rôle tenu par la plupart d'entre elles dans la défense contre les pathogènes reste méconnu (Ordenana, 2002).

III.2.6 La Résistance Systémique Acquise (SAR)

La résistance systémique acquise se manifeste dans le cadre d'une réaction incompatible à la suite de l'induction de lésions locales hypersensibles qui constituent une résistance locale (LAR). C'est une réponse de défense active, systémique et qui s'associe à une forte expression des gènes PR (Hammerschmidt, 1999). Dans la majorité des cas, elle est également effective contre les champignons, les bactéries, les virus et les nématodes, indépendamment de l'organisme inducteur (Ryals *et al.*, 1996). L'acide salicylique est le composé permettant de transmettre le signal aux différentes cellules.

L'induction de la SAR se corrèle donc à une accumulation d'acide salicylique, tant locale que systémique (Lawton *et al.*, 1995).

IV. LES METHODES DE LUTTE CONTRE LES NEMATODES PARASITES DU CAFEIER

Comme pour tous les nématodes phytoparasites dont une partie du cycle se déroule dans le sol, il est pratiquement impossible d'éliminer complètement les parasites qui infestent un champ, dans un contexte de caféiculture durable et de respect de l'environnement. Les méthodes de lutte auront donc pour but de maintenir la population en dessous du seuil économique de nocivité.

IV.1 Le contrôle biologique

Le contrôle biologique *sensu stricto*, c'est à dire l'utilisation d'agents biologiques antagonistes, est une pratique marginale en caféiculture. Il existe de nombreuses formulations commerciales de divers champignons mais l'intérêt de leur utilisation sur le caféier reste à démontrer. On trouve aussi sur le marché quelques « nématocides » biologiques fabriqués à partir de chitine. A moyen ou long terme, le contrôle biologique pourra constituer une composante non négligeable de la lutte intégrée contre les nématodes (Villain *et al.*, 1999).

IV.2 Le contrôle cultural

- **La greffe**

Cette pratique est effectuée au Guatemala avec l'utilisation de porte greffe de *C. canephora*, sélectionné pour sa résistance ou sa tolérance aux nématodes, le greffon étant une variété de *C. arabica*. Cette technique a été récemment introduite au Salvador où les producteurs de café sont confrontés à un parasitisme important. En dehors d'Amérique centrale, cette pratique culturale est également courante au Brésil ou elle est systématiquement utilisée dans les zones affectées par les nématodes (Villain *et al.*, 1999).

- **La gestion de la fertilisation**

Toute pratique culturale améliorant la nutrition ou diminuant le stress des caféiers permet de réduire l'impact des nématodes. Les amendements organiques jouent un rôle important dans l'amélioration de la structure et de la fertilité et dans la régulation de la balance hydrique du sol. Ils favorisent également le développement de microorganismes antagonistes des nématodes.

Cette fertilisation est très importante en Amérique latine car les caféiers sont fréquemment cultivés sur des sols d'origine volcanique, pauvres en matière organique. La gestion de la fertilisation minérale comme la correction des pH bas, en particulier dans les sols d'origine volcanique acides ou acidifiés par les apports fréquents et localisés d'azote, tendent à améliorer la nutrition des caféiers.

L'utilisation de l'ombrage permet de diminuer les stress hydriques et nutritionnels par son action régulatrice de différents paramètres agroclimatiques (lumière, température, Humidité Relative), et, par conséquent, de réduire l'impact des nématodes, en particulier dans les zones où la saison sèche est très marquée. L'ombrage permet également un apport continu de matière organique.

- **Les plantes antagonistes**

Il existe une grande diversité de plantes dont l'action nématocide est bien connue. Cet antagonisme peut intervenir de manière directe, par l'élaboration de toxines ou de composés chimiques qui inhibent le déroulement du cycle biologique des nématodes. Il peut aussi intervenir de manière indirecte par l'induction au niveau de la rhizosphère d'une flore bactérienne antagoniste de certaines populations de nématodes comme par exemple le « frijol terciopelo » (Kloepper *et al.*, 1996).

Les études sur ce thème, appliquées à la caféiculture, sont rares et l'intérêt de telles plantes reste à démontrer. Leur utilisation comme plante de couverture paraît difficile à instaurer (du moins pendant la phase de production), du fait des fréquents passages humains entre les rangs. On peut imaginer que, dans le cas de parcelles fortement infestées, un assainissement des sols par une pré culture de plantes nématocides (avant la replantation de caféiers) permettrait d'éviter d'exposer les jeunes plants à des pressions parasitaires trop importantes (Villain *et al.*, 1999).

- **Les mycorhizes**

Cette pratique est à ce jour peu exploitée dans la culture du café. Les mycorhizes, après avoir colonisé les racines de jeunes plants, peuvent avoir une action antagoniste (concurrence de l'espace) sur l'infestation des racines par les nématodes. De plus, elles permettent d'améliorer la nutrition des caféiers de part leur action symbiotique, en particulier dans des conditions de faible fertilité (Villain *et al.*, 1999).

IV.3 Le contrôle chimique

Dans les plantations de caféiers adultes, le contrôle chimique contre les nématodes présente plusieurs limites : une efficacité limitée, parfois quasi nulle autant contre *Pratylenchus* spp. (Villain *et al.*, 1996) que contre *M. exigua* spp. (Bertrand *et al.*, 1998), un coût élevé, un grand impact sur l'environnement et la santé humaine. Il est préférable d'appliquer les traitements chimiques de manière préventive pour compléter les méthodes prophylactiques dans le but de ne pas disséminer les nématodes. L'application de nématicides au champ, sur des jeunes plants, permet de baisser l'inoculum du sol et de protéger la plante pendant sa phase de croissance avant qu'elle entre en production.

Les modalités d'application (doses, époques et méthodes) des nématicides doivent être optimisées. Différents facteurs doivent être pris en compte, comme les espèces de nématodes présentes et les caractéristiques écologiques de la zone : distribution des pluies, compositions physiques et chimiques du sol, ...

Des études sur les fluctuations saisonnières des populations de *Pratylenchus* (Villain *et al.*, 1999) réalisées au Guatemala montrent un niveau élevé durant la période sèche. Cette période est déterminante car elle correspond à une croissance racinaire importante. Il paraît alors essentiel de protéger les racines des plants en réalisant une application de nématicides en fin de période pluvieuse, quand le sol présente une humidité suffisante pour que le produit, généralement formulé en granulés, puisse agir. La première moitié de la saison des pluies correspond aussi à un pic de population. Il convient donc de réaliser une autre application, le plus tôt possible, dès que l'humidité du sol le permet.

IV.4 Le contrôle génétique

La recherche de variétés résistantes aux nématodes est un des principaux critères de sélection du programme régional d'amélioration du café en Amérique centrale. Cette approche doit être accompagnée d'un certain nombre d'interventions raisonnées qui permettent de diminuer la pression parasitaire afin de protéger et de conserver les résistances sélectionnées.

IV.4.1 La résistance aux *Meloidogyne*

De nombreux travaux ont été menés depuis 1970. Le tableau 3 résume la plus grande partie de l'information disponible en Amérique latine. Les méthodologies utilisées diffèrent peu chez les différents auteurs. Notamment les échelles de notation (indices de galles), toutes dérivées de celle établie par Taylor et Sasser (1978), sont proches et permettent de faire des comparaisons entre résultats obtenus dans les différentes expérimentations.

Tableau 3 : Synthèse des résultats des principales évaluations de la base génétique *C. arabica*, *C. canephora* disponible en Amérique Latine, vis-à-vis des principales espèces de *Meloïdogyne*. HP= plante-hôte sensible ; R= Existence de plante-hôte résistante et fréquence relative lorsqu'elle a pu être estimée, ? = pas d'estimation de la fréquence (Bertrand, 2002).

Espèces	Groupes de caféiers	<i>M. exigua</i>	<i>Meloïdogyne</i> spp. (isolats du Guate mala et du Brésil)	<i>M. incognita</i> Race I (Brésil)	<i>M. incognita</i> Race II (Brésil)	<i>M. incognita</i> Race III (Brésil)	<i>M. arenaria</i> (Salvador)	<i>M. arabica</i>	<i>Meloïdogyne. sp.</i> (isolat du Salvador)
<i>C. arabica</i>	Caturra,	S	S	S	S	S	S	S	S
	Catuai								
	Génotypes sauvages	S	S (70%)	HP ?	Résistance partielle ?	S	S	R ?	S *
	d'Ethiopie								
<i>C. canephora</i>	Lignées dérivées	R (60%)	R ?	Résistance partielle ?	R ?	R ?	-	R ?	S *
	HdT								
	Robusta	R (100%)	R (35%)	R (75%)	R ?	R (35%)	-	R (80%)	R (75%)
	Références	Silvarolla et al. 1998 ; Gonçalves et Pereira 2001 ; 1998 ; Curi et al. 1970 ; Morera et López 1987 ; Bertrand et al., 2001b.	Anzueto, 1993 ; Anzueto et al., 2000a.	Gonçalves et al., 1996	Gonçalves et al., 1996	Gonçalves et Ferraz, 1987 ; Gonçalves et al., 1996	Gonçalves et al., 1988 ; Gonçalves et al., 1996	Hernández (1997) ; Bertrand et al., (2002)	Hernández (1997) ; Bertrand et al., (2002)

A la lecture du tableau 3 on constate que l'exploration de la base génétique pour leur résistance vis-à-vis des principales espèces de *Meloidogyne* est encore insuffisante. Par exemple, le statut d'hôte chez *Coffea* spp. pour *M. paranaensis* n'a pas été évalué. Les évaluations vis-à-vis des espèces *M. incognita*, *M. arabicida*, *M. arenaria* sont insuffisantes car elles ne permettent pas d'évaluer la fréquence des gènes de résistance au sein de l'espèce *C. arabica* (Bertrand, 2002). Seule la résistance vis-à-vis de l'espèce *M. exigua* est bien connue. C'est pourquoi l'équipe « Physiologie et Génétique de la résistance des plantes tropicales aux parasites » a choisi le couple *M. exigua* / caféier pour développer une stratégie de sélection de variétés résistantes.

IV.4.2 Exploration des ressources génétiques du café pour la résistance à *M. exigua*

Tous les génotypes de *C. arabica* sont sensibles à *M. exigua* (Anthony *et al.*, 2002) alors que des résistants ont été découverts dans l'espèce *C. canephora* (Curi *et al.*, 1970 ; Morera et Lopez., 1987 ; Chaverri, 1987). Plusieurs lignées dérivées de l'Hybride de Timor présentent une résistance à *M. exigua* similaire à celle observée chez *C. canephora*. Le transfert de la résistance de l'Hybride de Timor à *C. arabica* a fait l'objet de nombreux travaux.

Le croisement de lignées dérivées de cet hybride avec des variétés commerciales Caturra ou Villa-Sarchi a produit les variétés Catimor et Sarchimor présentant une résistance similaire à celle de *C. canephora*. Comme les parents Caturra ou Villa-Sarchi sont sensibles à *M. exigua*, Gonçalves *et al.* (1998) et Silvarolla *et al.* (1998) ont suggéré que l'origine des gènes de résistance était *C. canephora*. Bertrand *et al.* (2001) ont confirmé cette hypothèse à la suite d'une étude moléculaire utilisant des marqueurs d'introgession de gènes de *C. canephora*.

IV.4.3 Etude de la transmission des caractères de résistance et identification de marqueurs moléculaires de la résistance

Les études génétiques sur les relations hôtes / *M. exigua* des plantes cultivées révèlent l'action d'un nombre limité de gènes (Sidhu et Webster, 1981) et plus récemment Roberts *et al.* (1996), sur *Vigna unguiculata*, Wang et Goldman (1996), sur la carotte ou Cap *et al.* (1993), sur la tomate.

Concernant le café, Anzueto *et al.* (2001), suggèrent l'existence de deux gènes complémentaires pour la résistance à *M. incognita* au Guatemala.

L'étude de l'héritabilité de populations ségrégeantes F2 dérivant de croisements entre des lignées introgressées résistantes et des accessions sensibles a permis de déterminer le mode d'héritabilité de la résistance à *M. exigua*. Les ségrégations observées en F1 et en F2 montrent l'existence d'au moins un gène de résistance dominant (Bertrand *et al.*, 2001). Noir *et al.* (2002) montrent que la résistance à *M. exigua* est contrôlée par un gène majeur désigné le locus *Mex-1*. La distribution des populations F2 selon leur Indice de Galle (IG) suggère une dominance incomplète lors de l'expression de *Mex-1*. Ce gène est le premier gène de résistance aux nématodes identifié sur le café.

Quinze marqueurs AFLP étroitement liés au gène *Mex-1* ont été identifiés. Ce type de marqueurs permettra à l'avenir une meilleure compréhension de l'expression des gènes de résistance afin de créer des variétés multirésistantes (Lashermes *et al.*, 2001). Après la localisation du gène, il est possible d'envisager un clonage du gène de résistance et d'étudier son expression chez d'autres plantes voire une introgression par transgénèse aux variétés sensibles. Dans ce cas on aura recours à l'ensemble du complexe d'espèces de *Coffea* comme source de gènes de résistance à transférer à l'Arabica (Fernandez *et al.*, 2001 ; Lashermes *et al.*, 2001).

IV 4.4 Les méthodes conventionnelles de l'amélioration génétique du caféier

Les différentes stratégies de création de variétés résistantes à *M. exigua* permettent d'obtenir deux types de variétés ; « franc de pied » ou porte-greffes.

La contrainte majeure de la création variétale de porte-greffe est le coût. Dans le cas de l'arabica, la technique de greffe hypocotylédonaire permet d'obtenir des plantules greffées à un coût très faible (0.02 USD). Cette contrainte écarte définitivement les systèmes basés sur des greffages tardifs de matériels végétal du genre bouture, ou le greffage d'embryons somatiques (Bertrand, 2002).

- **La sélection de variétés « franc de pied »**

Dans le cas de peuplements mono-spécifiques, les variétés mono-résistantes sont adaptées.

Parmi les lignées dérivées de l'Hybride de Tymor, il y en a peu qui peuvent être retenues comme variétés. Parmi les plus intéressantes à cet égard, figurent la variété IAPAR59 ou la lignée en voie de sélection T5296. S'il l'on ne peut pas utiliser directement une lignée résistante dérivée de l'HdT, il suffit de croiser une lignée de Catimor résistante avec un géniteur sensible ou résistant.

Au niveau F1, on obtient, en fonction des géniteurs résistants, soit des descendances immunes, soit des descendances qui présentent des résistances intermédiaires (Bertrand, 2002).

La création de variétés multirésistantes se justifie lorsqu'il existe des peuplements polyspécifiques de *Meloidogyne* ou bien pour des raisons économiques, afin d'éviter de gérer un catalogue de variétés trop important. Pour une multirésistance à *M. exigua* et à *M. incognita* du Guatemala, les gènes de résistance sont apportés de façon complémentaire par les deux populations de Catimors et d'Ethiopiens. Il est ainsi possible de créer des hybrides F1 qui présentent les deux types de résistance. Il sera sans doute difficile de trouver des lignées dérivées de l'HdT qui présenteront en même temps de bonnes caractéristiques agronomiques (et sensorielles) et des multirésistances. Les meilleures lignées sont au mieux résistantes à un seul nématode (c'est le cas de T5296 ou de IAPAR59) qui sont résistantes à *M. exigua* mais sensibles à *M. incognita* ou à *M. arabicida* (Bertrand, 2002).

- **La sélection de variétés porte-greffes**

Utilisation de lignées dérivées de l'Hybride de Timor

De la même façon que précédemment, il y a lieu de distinguer la création des variétés monorésistantes de celle des variétés multirésistantes. On peut envisager un schéma de sélection généalogique qui aboutit à la création de lignées porte-greffe. S'agissant d'une sélection pour le système racinaire, on doit pouvoir assurer des sorties variétales dès la fixation des gènes de résistance (en pratique en génération F3 ou F4). Outre le critère de résistance aux nématodes, il est possible de sélectionner également pour la résistance à d'autres parasites telluriques comme les cochenilles (Garcia, 1991), mais aussi pour la vigueur et pour l'adaptation aux conditions agro-écologiques des zones de production de *C. arabica*.

*Utilisation de *C. canephora* ou d'espèces proches du complexe d'espèces*

Cette stratégie fait appel aux espèces voisines de *C. arabica* et de leur utilisation directe comme porte-greffe ou après sélection. Au Guatemala, le greffage sur porte-greffe de Robusta est très efficace au champ vis-à-vis de *Pratylenchus* puisque la productivité des plants greffés est multipliée par 4 en moyenne par rapport à celle du plant non greffé (Villain *et al.*, 2000).

Concernant la résistance à *M. exigua*, il est possible d'utiliser théoriquement n'importe quel individu de *C. canephora*. Concernant *M. arabicida*, cette même espèce est également résistante.

Cependant, afin de résoudre globalement les principaux problèmes liés aux nématodes *Meloidogyne* en Amérique Centrale, une variété multirésistante a été développée. Il s'agit de la variété 'Nemaya' qui est résistante à *M. incognita* du Guatemala et à *M. sp* du Salvador (Bertrand *et al.*, 2000a ; Anzueto *et al.*, 2001). Elle présente également un bon niveau de résistance aux nématodes *Pratylenchus* (Villain, 2000).

IV.4.5 Les marqueurs moléculaires, un nouvel outil pour l'amélioration génétique du café

Les marqueurs moléculaires permettent de contourner les limites des méthodes conventionnelles de l'amélioration génétique du café (Lashermes P. *et al.*, 2000). La sélection se base sur la présence de marqueurs étroitement liés aux gènes d'intérêts. Cette méthode de sélection présente plusieurs avantages, en particulier la possibilité de faire une sélection précoce *in vivo* sur un grand nombre de plantes, de réduire le nombre de cycles de sélection nécessaires pour restaurer la qualité du café et de sélectionner plusieurs caractères en une seule étape. Ce type de marqueurs permettra à l'avenir une meilleure compréhension de l'expression des gènes de résistance et par conséquent, des mécanismes de résistance intervenants dans le cadre d'une interaction caféier/*M. exigua*.

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal étudié appartient aux espèces *Coffea arabica* et *C. canephora*.

Pour *C. arabica*, il s'agit de deux variétés qui ont été préalablement caractérisées pour leur résistance à *M. exigua*, cv. Caturra (sensible) et cv. IAPAR59 (résistant) et de cinq populations F2 (cv. IAPAR x sauvages sensibles).

Les plantes sont disposées en chambre de culture et/ou en serre :

- Chambre de culture : contrôle de la température 25°C, HR 75 %, photopériode 18 h de jour et 6 h de nuit, éclairage 1900 lux, arrosage et fertilisation manuels (respectivement 3 fois/semaine et 5ml de solution Hoagland, Annexe 5, 1 fois/semaine).

- Serre : arrosage automatique 5 mn de nébulisation/jour, fertilisant foliaire.

II. METHODES UTILISEES

II.1 Préparation de l'inoculum de *Meloidogyne exigua* et inoculation des caféiers

L'inoculum utilisé, de *M. exigua*, provient d'une population pure obtenue à partir d'une masse d'œufs et contrôlée par étude du profil estérasique. Il est maintenu sur culture de cv. Caturra en serre (arrosage automatique 5 mn de nébulisation/jour, fertilisant foliaire) dans des pots plastiques de 350 ml.

Les larves de deuxième stade sont extraites des racines selon les méthodes de nébulisation (voir chapitre II.3.1) et/ou de « Macération-Filtration » (Annexe 6).

Afin de calibrer la taille de l'inoculum, cinq aliquots de 5 ml sont déposés sur une plaque de comptage (modèle IRD, récipient en plexiglas translucide de 5 ml, divisé en 450 cellules) et comptés. La concentration est ajustée par dilutions successives.

L'inoculation est réalisée soit directement en pots (en trois points) soit sur des racines à découverts (en dix points d'inoculation).

II.2 Evaluation de la résistance par l'Indice de Galle (IG)

Cette évaluation s'effectue trois mois après l'inoculation des caféiers. Les plantes sont divisées en 6 classes selon le nombre de galles de leur système racinaire (Tableau 4) (Anthony *et al.*, 2002).

Tableau 4 : Correspondances entre le nombre de galles d'un système racinaire et son IG (Anthony *et al.*, 2002).

Nombre de galles	Indice de Galle (IG)
0	0
1-2	1
3 à 10	2
11 à 30	3
31 à 100	4
>100	5

II.3 Méthodes d'extraction des nématodes

II.3.1 Extraction des nématodes par nébulisation (Seinhorst, 1950)

Le système racinaire de chaque plante est lavé à l'eau courante, puis découpé en morceaux de 2 cm environ et placé sur un tamis (maille 2 mm). Celui-ci est déposé sur un entonnoir qui débouche sur un flacon. L'ensemble est disposé dans une chambre d'asperseur, dans laquelle un brouillard continu se dépose sur les racines, se condense en gouttes qui entraînent les nématodes au fond du flacon (Figures 9). Les dénombrements s'effectuent à 7 et 14 jours. L'eau recueillie du flacon est passée sur un ensemble de 4 tamis : 1 de 250 μm (élimination des débris végétaux) et 3 de 53 μm . Les nématodes sont récupérés dans un tube à essai après rinçage des 3 tamis de 53 μm .

Cette méthode permet d'extraire les larves vivantes au stade juvénile J2. Elle est utilisée pour la préparation d'inoculum et pour déterminer la quantité de nématodes extraits d'un système racinaire.

II.3.2 Extraction des nématodes à l'hypochlorite (Hussey et Barker, 1973)

Les racines des plantes sont lavées à l'eau courante puis coupées en morceaux d'environ 2 cm. Afin de détacher les œufs situés à l'intérieur des galles, les racines sont déposées dans un erlenmeyer, recouvertes d'une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium (à 1.5 %), et agitées pendant 4 min. Puis, le contenu de l'erlenmeyer est versé sur trois tamis successifs de mailles décroissantes (250, 45 et 32 μm) et rincé abondamment à l'eau.

Les œufs sont retenus sur le dernier tamis et transférés avec de l'eau distillée dans un tube à essai.

Après 24 h de décantation, le volume des tubes est ajusté par aspiration du surnageant. Les œufs sont alors colorés par l'addition de 2 gouttes de fuschine acide puis portés à ébullition.

L'extraction à l'hypochlorite est utilisée pour calculer la quantité de nématodes extraits d'un système racinaire.

II.3.3 Comptage des nématodes

Après l'extraction, les systèmes racinaires des caféiers sont recueillis, séchés dans une étuve à 40°C pendant 48 heures et pesés.

La quantité de nématodes extrait est évaluée sur une plaque de comptage (voir chapitre II.1) à partir d'un aliquot de 5 ml. Les analyses statistiques sont réalisées sur deux variables ; le nombre de nématodes (nombre de nématodes/g de Matière sèche) et/ou le taux de multiplication (Taux de multiplication = quantité extraite/quantité inoculée).

II.4 Coloration d'échantillons racinaires par la fuschine acide

Les fragments racinaires sont déposés dans un Becher, recouverts de 70 ml d'hypochlorite de sodium (1,5 % NaCl) et agités pendant 4 min afin de déstructurer la membrane pectocellulosique et faciliter la pénétration du colorant. Après trois rinçages, ils sont placés dans un Becher rempli d'eau distillée pendant 15 min. Ensuite les fragments sont transférés dans un Becher contenant 20 ml d'eau distillée et 1 ml de colorant (3,5 g fuschine acide, 250 ml acide acétique, 750 ml eau distillée), le tout est porté à ébullition pendant 30 secondes. Après refroidissement à température ambiante, l'excès de colorant est éliminé par rinçage à l'eau.

Le matériel racinaire est fixé dans 30 ml de glycérol, acidifié par quelques gouttes d'acide chlorhydrique 5N, porté à ébullition et refroidi. Les fragments racinaires sont alors étalés et observés au stéréomicroscope entre lame et lamelle.

Par cette coloration, les nématodes apparaissent en rose, le tissu végétal demeure incolore (Byrd *et al.*, 1983).

II.5 Analyses statistiques des données

On vérifie l'homogénéité des variances des différentes variables qui seront analysées par un test de Leven. Pour le taux de multiplication et le nombre de nématodes on a du réaliser une transformation ($\log(x+1)$) afin de rendre les variances homogènes.

Les effets entre les facteurs (substrat utilisé, IG, méthode d'extraction) et les variables (taux de multiplication, % de plantules à un stade physiologique donné) sont mis en évidence par des analyses de variance à un ou deux facteurs selon le dispositif.

La comparaison des moyennes (taux de germination, nombre de nématodes extraits) par le test de Newman et Keuls permet de définir des groupes de moyennes statistiquement homogènes.

Les relations entre variables sont étudiées par leur corrélation. L'intérêt de ces relations pour prédire une variable est précisé par la méthode de la régression linéaire (NG/IG, R1/R1+R2, NG/R1).

Par convention, les résultats des analyses de variance et des corrélations sont notés :

- significatifs : * $p < 0.05$,
- hautement significatifs : ** $p < 0.01$
- très hautement significatifs : *** ($p < 0.001$),
- non significatifs : ns.

III. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

Compte tenu de la durée de germination et de développement des caféiers (passage du stade graine au stade deux paires de feuilles en deux mois) on travaille sur du matériel préalablement semé. Le choix de plantes d'âge différent est réalisé en fonction des objectifs de l'essai. Ces considérations ainsi que la disponibilité limitée de la salle climatique expliquent que les données recueillies proviennent de plusieurs essais.

Le niveau d'inoculation des plantes est ajusté en fonction des objectifs de l'essai, de la technique d'inoculation et de la quantité de nématodes disponibles. En effet, les extractions sont réalisées sur des plantes préalablement inocuées (gestion du stock de ces plantes « réservoir ») et les méthodes utilisées ne permettent pas de prévoir précisément la quantité de *M. exigua* qui pourra être recueillie.

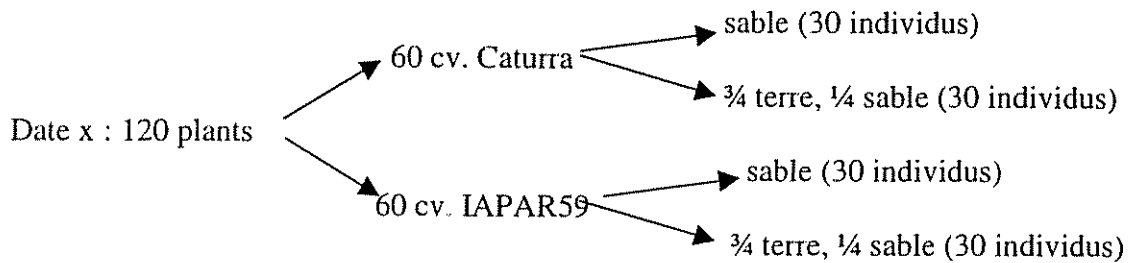
III.1 Essai 1

Cet essai regroupe plusieurs objectifs :

- la mise en évidence de l'influence du substrat de culture des caféiers sur leur développement,
- l'observation de la physiologie du développement de *M. exigua* chez des plantes résistantes (cv. IAPAR59) et sensibles (cv. Caturra),
- l'influence du développement des caféiers sur l'expression de la résistance (physiologie du développement du nématode, nombre de galles, nombre de nématodes des racines et apparition de zones nécrosées).

- **Présentation du matériel végétal**

Deux cultivars de *C. arabica*, cv. Caturra et cv. IAPAR59, sont utilisés pour cet essai. 120 graines de *C. arabica* sont semées (en chambre de culture) à cinq dates différentes (17/01/02, 27/01/02, 4/02/02, 14/02/02 et 25/02/02) dans deux milieux de culture.



- **Sélection du matériel à inoculer et inoculation**

On remarque une forte hétérogénéité dans le développement des plantules d'une même date de semis. Il est donc décidé de regrouper les caféiers selon leur stade physiologique avant inoculation (cotylédons ouverts, 1^e paire de feuilles étalées, 2^e paire de feuilles étalées et 3^e paire de feuilles étalées).

Les plantes en pots sont inoculées directement en trois points d'inoculation à raison de 3000 juvéniles/plante.

- **Méthodes d'observation**

Suivi de la germination et de la croissance

L'évolution de la germination des graines et de la croissance des plantules est observée à trois dates : 18/04/02, 15/05/02 et 11/06/02.

Les caféiers sont répartis en 8 classes selon leur développement :

- apparition de la radicelle,
- cotylédons collés ou stade « petit soldat »,
- cotylédons ouverts,
- 1^e paire de feuilles collées,
- 1^e paire de feuilles étalées,
- 2^e paire de feuilles collées,
- 2^e paire de feuilles étalées,
- 3^e paire de feuilles étalées.

Observations histologiques

Elles consistent à prélever les extrémités racinaires (2/3 mm) qui sont susceptibles de contenir des nématodes. Les prélèvements sont plus ciblés lorsque un renflement est visible à l'apex. Les plantes sont dépotées soigneusement et les racines sont lavées doucement à l'eau courante par trempage. Une fois le prélèvement effectué, elles sont rempotées.

Quatre extrémités racinaires pour le stade cotylédons ouverts et huit autres pour les stades restants sont colorées à la fuschine entre T+3 et T+32 (10 prélèvements).

Evaluation après extraction par nébulisation

Cinq semaines après inoculation, on compte le nombre de galles et on estime le nombre de juvéniles extrait.

III.2 Essai 2

Cet essai est effectué dans le but de comparer deux méthodes d'extraction des nématodes ; la nébulisation et l'hypochlorite.

Il est réalisé sur des caféiers (cultivés en serre) se trouvant au même stade physiologique (deux paires de feuilles) mais possédant des IG différents : 14 plantes d'IG 2 (cv. IAPAR59), 14 plantes d'IG 3 (cv. Caturra) et 14 plantes d'IG 5 (populations F2 de *C. arabica*).

Les plantes sont inoculées directement en pots avec 860 juvéniles/plants (en trois points d'inoculation).

Cinq semaines après inoculation les systèmes racinaires des plantes sont prélevés, lavés à l'eau courante, pesés et divisés en 2 partie égale. Les 2 moitiés sont alors soumises à 2 méthodes différentes d'extraction, par hypochlorite et par nébulisation.

III.3 Essai 3

Cet essai, dont le but est de caractériser les relations entre l'IG, le nombre de galles et le nombre de nématodes, est effectué sur 108 plantes F2 se trouvant au stade physiologique deux paires de feuilles et cultivées en serre.

Les plantes sont inoculées directement en pots avec 860 juvéniles/plants (en trois points d'inoculation).

L'évaluation du matériel végétal est effectuée trois mois après inoculation. Les plantes sont divisées en fonction de leur IG. Les systèmes racinaires de 30 plantes / IG (pour les IG 2, 3 et 4) et de 18 autres d'IG 5 sont alors prélevés, lavés à l'eau courante et soumis à la méthode d'extraction par nébulisation.

III.4 Essai 4

L'essai 4 a pour objectif d'étudier le comportement du nématode sur des caféiers résistants et sensibles tant au niveau de la physiologie de leur développement que de leur capacité à engendrer des zones nécrosées.

Les racines sont lavées à l'eau courante puis chaque plante est posée à plat sur un plateau couvert de papier filtre humide de manière à ce que son système racinaire soit bien étalé pour faciliter l'inoculation et le prélèvement. Afin de limiter leur dessèchement, les racines sont alors recouvertes de papier filtre humide.

Dix points d'inoculation sont repérés au moyen de photographies des systèmes racinaires (Figure 10). Chaque point d'inoculation reçoit 100 J2 soit un total d'environ 1000 juvéniles/plante. Trois extrémités racinaires (fragments de 3 mm) sont prélevées entre 5 et 23 jours après inoculation, colorées à la fuschine acide et observées sous stereomicroscope.

III.5 Essai 5

L'essai 5 présente le même objectif que l'essai 4.

Cet essai utilise 15 plantes de cv. Caturra et 15 plantes de cv. IAPAR59 se trouvant au stade 2 paires de feuilles et cultivées en chambre de culture. Les caféiers en pots sont inoculés directement à raison d'environ 6000 juvéniles/plante.

Trois extrémités racinaires (fragments de 3 mm), susceptibles d'être infestées par les nématodes, sont prélevées entre 3 et 53 jours après inoculation. Lorsque les renflements et les galles sont visibles, ils permettent un prélèvement plus ciblé. Les plantes sont dépotées soigneusement et les racines sont lavées doucement à l'eau courante par trempage avant prélèvement puis elles sont repotées. Les fragments sont colorés à la fuschine acide et observés sous stereomicroscope.

III. 6 Essai 6

L'essai 6 présente le même objectif que l'essai 4.

15 plantes de cv. Caturra et 15 de cv. IAPAR59, au stade 2/3 paires de feuilles (cultivées en chambre de culture) sont inoculées directement en pots à raison de 4000 juvéniles/plante environ.

L'observation du matériel végétal est similaire à celle réalisée pour l'essai 5.

III.7 Essai 7

L'essai 7 présente le même objectif que l'essai 4.

50 plantes de *C. canephora* se situant au stade 3 paires de feuilles (disposées en serre) sont inoculées directement en pots avec environ 5700 juvéniles/plante. L'observation du matériel végétal est similaire à celle réalisée pour l'essai 5.



Figure 9 a : La chambre d'asperseur utilisée pour l'extraction par nébulisation. Dépôt d'un brouillard continu sur les racines

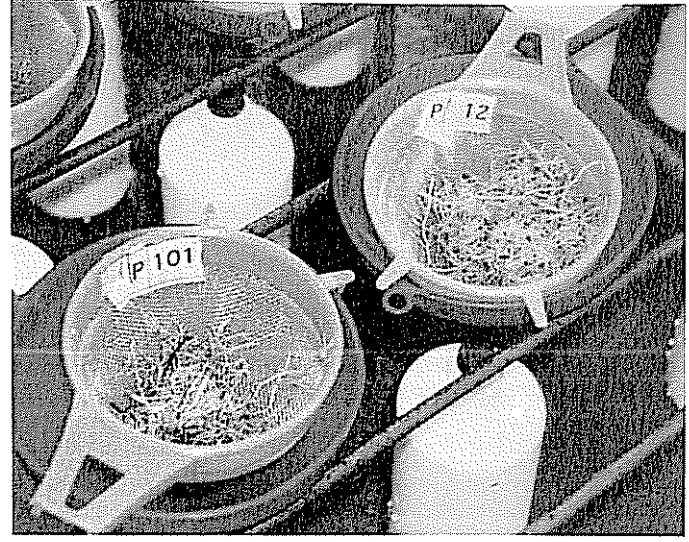


Figure 9 b : La méthode d'extraction par nébulisation. Le système racinaire découpé est placé sur un tamis, lui-même déposé sur un entonnoir qui débouche sur un flacon

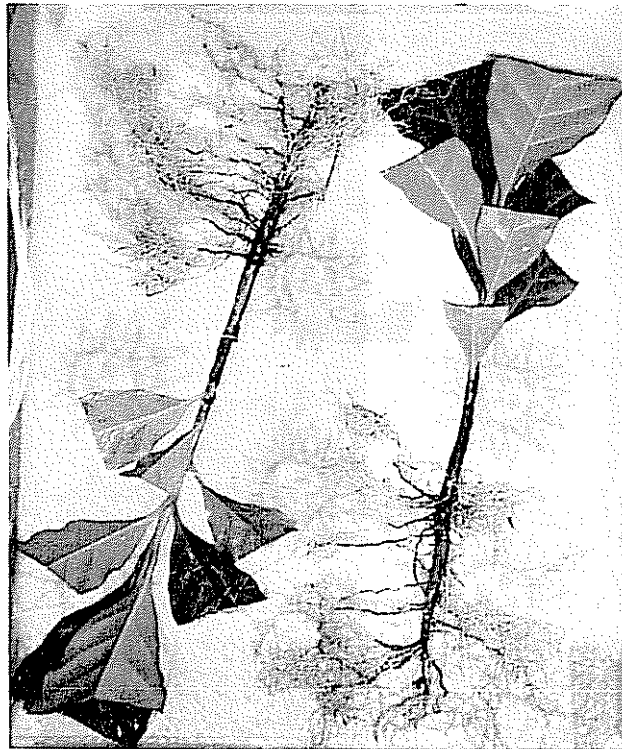


Figure 10 : Préparation des plantes pour l'essai 4.

PARTIE III : RESULTATS

Les résultats ont été groupés en cinq activités principales de recherche pour leur présentation. La première activité concerne la germination et la croissance de caféiers sur deux substrats de culture. La deuxième activité est une comparaison de deux méthodes d'extraction des nématodes, couramment employées en Nématologie. Les deux dernières activités traitent des différences de comportement du nématode sur des caféiers résistants et sensibles, puis chez de jeunes caféiers.

I. INFLUENCE DU SUBSTRAT DE CULTURE SUR LE DEVELOPPEMENT DES CAFEIERS

Les analyses de variance réalisées pour chacune des trois dates d'évaluation espacées d'un mois ne montrent pas d'effet significatif du substrat et de la variété sur les taux de germination. De même, aucune interaction n'est trouvée entre ces deux facteurs. On note juste un effet de la date de semis sur la germination (Tableau 5). Les graines semées le 17/01 ont un taux de germination significativement plus faible (0,17) que celles semées les 27/01, 02/02, 14/02 et 25/02 (environ 0,70). Les données brutes (Annexe 7) montrent que la mauvaise germination du 17/01 est due aux graines de cv. Caturra dont aucune n'a germé. Les données de cette date de semis ne seront donc pas prises en compte dans les analyses statistiques ultérieures sur la croissance et le développement des plantes.

Tableau 5 : Effet de la date de semis sur le taux de germination des graines (essai 1). Les lettres « a » et « b » accolées aux taux de germination font référence aux groupes de moyennes déterminés par le test de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Dates de semis	Taux germination
17/01/02	0,17 a
27/01/02	0,71 b
02/02/02	0,68 b
14/02/02	0,67 b
25/02/02	0,67 b

Les données de croissance et de développement, recueillies lors de la dernière évaluation (11/06), révèlent des différences significatives entre variétés et hautement significatives entre substrats (Tableau 6). Aucune interaction n'est observée entre ces deux facteurs.

Tableau 6 : Analyse de la variance du pourcentage de plantules ayant de une à trois paires de feuilles (stades 5, 6, 7 et 8 de développement) le 11/06/02 (essai 1).

Sources de variation	Degrés de liberté	F	Niveau de signification
Variétés	1	13,84	*
Substrats	1	19,24	**
Variétés x Substrats	1	0,003	ns

A la dernière date d'évaluation, les plantules ayant de une à trois paires de feuilles sont deux fois plus nombreuses chez cv. Caturra (62%) que chez cv. IAPAR59 (34%) (Figure 11).

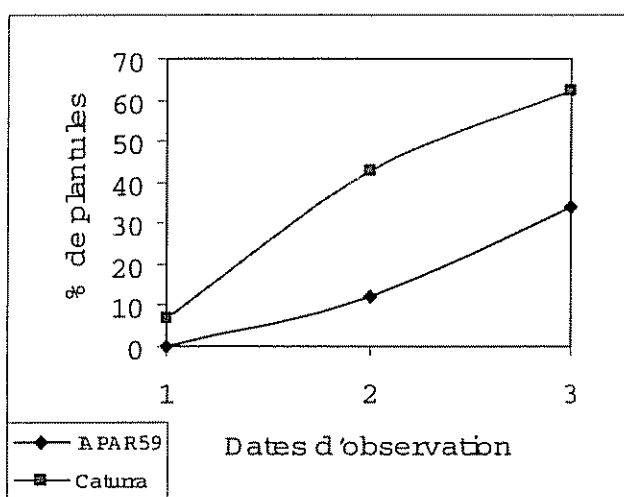


Figure 11 : Pourcentage de plantules de cv. IAPAR59 et de cv. Caturra présentant de une à trois paires de feuilles (stades physiologiques 5, 6, 7, 8) à trois dates d'évaluation (essai 1). Date 1 : 18/04/02, date 2 : 15/05/02, date 3 : 11/06/02

Les caféiers cultivés sur le substrat $\frac{3}{4}$ terre et $\frac{1}{4}$ sable se développent plus vite que sur sable seul (Figure 12). Lors de la dernière évaluation (11/06), ils étaient deux fois plus nombreux à posséder au moins une paire de feuilles sur le mélange $\frac{3}{4}$ terre et $\frac{1}{4}$ sable (64%) que sur le sable (32%) Le sable semble affecter négativement le développement des caféiers à partir de la 2^e date d'évaluation (15/05).

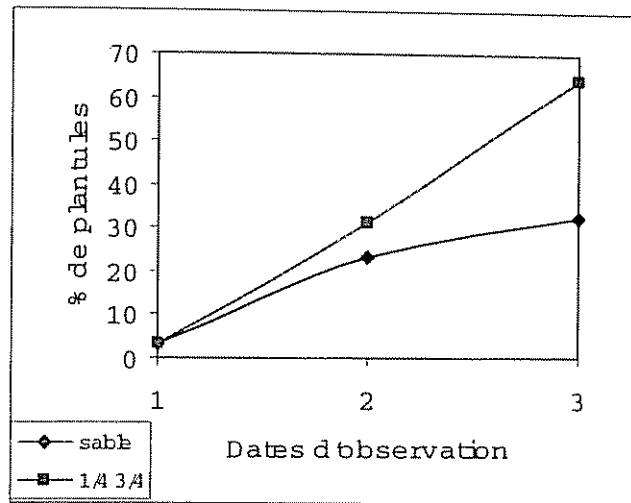


Figure 12 : Pourcentage de plantules de cv. IAPAR59 et de cv. Caturra présentant de une à trois paires de feuilles (stades physiologiques 5, 6, 7, 8) à trois dates d'évaluation (essai 1). Date 1 : 18/04/02, date 2 : 15/05/02, date 3 : 11/06/02.

II. COMPARAISON DE DEUX METHODES D'EXTRACTION DES NEMATODES

Le taux de multiplication des nématodes diffère significativement selon l'indice de galles et la méthode d'extraction comme le montre l'analyse de la variance réalisée avec deux critères de classification (Tableau 7). Une interaction significative est également mise en évidence entre l'indice de galles et la méthode d'extraction utilisée, c'est-à-dire que l'efficacité d'une méthode d'extraction varie selon l'indice de galles pour lequel elle est appliquée.

Tableau 7 : Analyse de la variance du taux de multiplication en fonction de l'indice de galles (IG 2, 3 et 5) et de la méthode d'extraction (hypochlorite ou nébulisation) (essai 2). La variable « taux de multiplication » a été préalablement transformée en $\text{Log}(x+1)$ pour homogénéiser les variances.

Sources de variation	Degrés de liberté	F	Niveau de signification
IG	2	36,35	*
Méthodes	1	89,73	*
IG x Méthodes	2	26,56	*

Après une extraction par nébulisation, le nombre de nématodes extraits chez les plantes d'IG 3 et 5 est respectivement cinq et six fois supérieurs à celui des plantes d'IG 2 (Figure 13).

Après une extraction par hypochlorite, les écarts sont encore plus grands, avec 14 et 150 fois plus de nématodes chez les plantes d'IG 3 et 5 que chez les plantes d'IG 2. Il est important de noter que, pour chaque indice de galles étudié, les extractions par nébulisation permettent une meilleure extraction des nématodes que par l'hypochlorite.

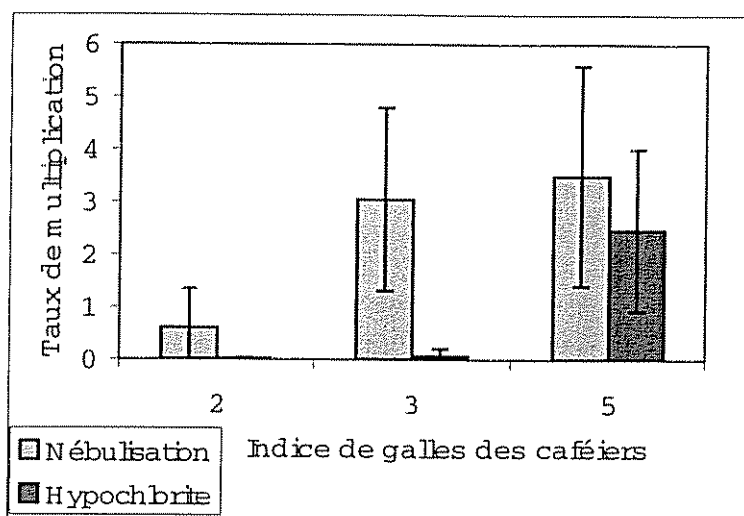


Figure 13 : Taux de multiplication des nématodes sur des caféiers d'indice de galles 2, 3 et 5, calculés après une extraction par nébulisation et par hypochlorite (essai 2). Les barres verticales visualisent l'écart type.

Les données brutes (Annexe 8) permettent de préciser l'interaction entre l'indice de galles et la méthode d'extraction, mise en évidence par l'analyse de la variance à deux critères de classification (Tableau 7). La nébulisation permet des extractions 30 et 44 fois plus élevées que l'hypochlorite pour des plantes d'IG 2 et 3 respectivement, alors quelle est seulement 1,4 fois supérieure pour des caféiers d'IG 5.

Enfin, deux analyses de la variance sont effectuées pour étudier les variations du taux de multiplication des nématodes chez des caféiers d'indice de galles 2 et 3. Les données sont transformées en $\text{Log}(x+1)$ afin d'homogénéiser les variances. Les différences sont très hautement significatives ($F = 36,07$, ***) entre les taux de multiplication calculés pour les plantes d'IG 2 et 3 après une extraction par nébulisation. En revanche, aucune différence significative n'est trouvée après une extraction par hypochlorite ($F = 2,20$, ns).

III. RELATIONS ENTRE L'INDICE DE GALLES, LE NOMBRE DE GALLES ET LE NOMBRE DE NEMATODES

Des corrélations significatives sont trouvées entre l'indice de galles, le nombre de galles et les nombres de nématodes extraits après une et deux semaines de nébulisation (Tableau 8 et Annexe 9).

Les corrélations sont très hautement significatives entre le nombre de galles et l'indice de galles ($r = 0,87$), et entre le nombre de nématodes extraits au bout de 7 ou 14 jours et le nombre total de nématodes extraits. Les corrélations sont moins fortes entre le nombre de nématodes extraits au bout d'une semaine (R1) et l'indice de galles ou le nombre de galles, respectivement 0,45 et 0,38.

Tableau 8 : Corrélations entre l'indice de galles, le nombre de galles, le nombre de nématodes extraits au bout de 7 jours de nébulisation (R1) et de 14 jours (R2), et le nombre total de nématodes extraits (R1+R2) (N = 90) (essai 3).

	Indice de galles	Nombre galles	R1	R2	R1+R2
Indice de galles	1	0,87 ***	0,45 *	0,31 *	0,40 *
Nombre galles		1	0,38 *	0,27 *	0,35 *
R1			1	0,83 ***	0,96 ***
R2				1	0,95 ***
R1+R2					1

Une régression linéaire indique que le nombre de nématodes comptés au bout d'une semaine de nébulisation permet une très bonne estimation du nombre total de nématodes extraits (R^2 ajusté = 0,98) (Figure 14).

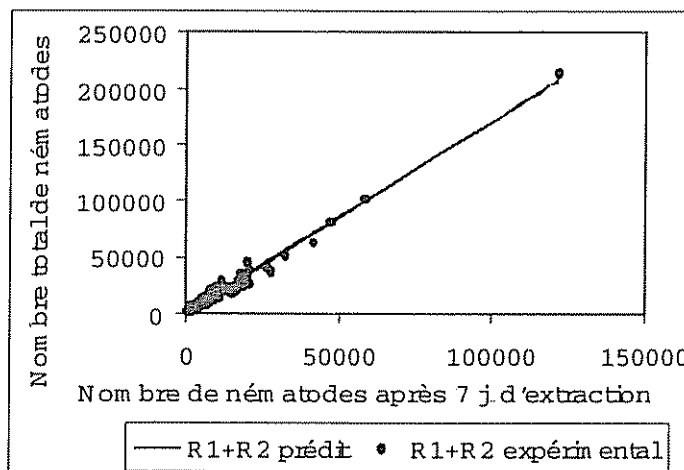


Figure 14 : Régression linéaire du nombre de nématodes extraits au bout de 7 et 14 jours de nébulisation (R1+R2) en fonction du nombre de nématodes extraits au bout de 7 jours R1 (essai 3). Les nombres de nématodes sont rapportés par gramme de matière sèche du système racinaire.

La prédiction du nombre de nématodes extraits après 7 jours de nébulisation par le nombre de galles est nettement moins bonne que pour le couple de variables précédent (R^2 ajusté = 0,52) (Figure 15).

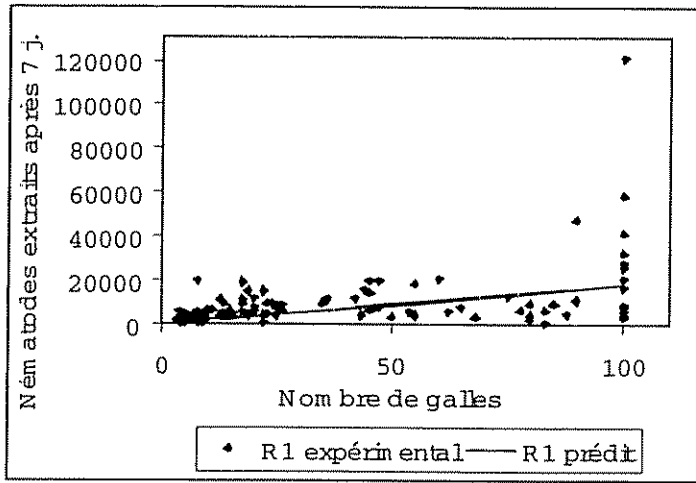


Figure 15 : Régression linéaire du nombre de nématodes extraits après 7 jours de nébulisation (R1) en fonction du nombre de galles (essai 3). Le nombre de nématodes est exprimé par gramme de matière sèche du système racinaire.

Le nombre total de nématodes extraits par nébulisation augmente logiquement en fonction de l'indice de galles des caféiers considérés (Figure 16). Il est 1,1, 2,6 et 8 fois plus important pour les plantes d'IG 2, 3 et 4 que pour celles d'IG 1.

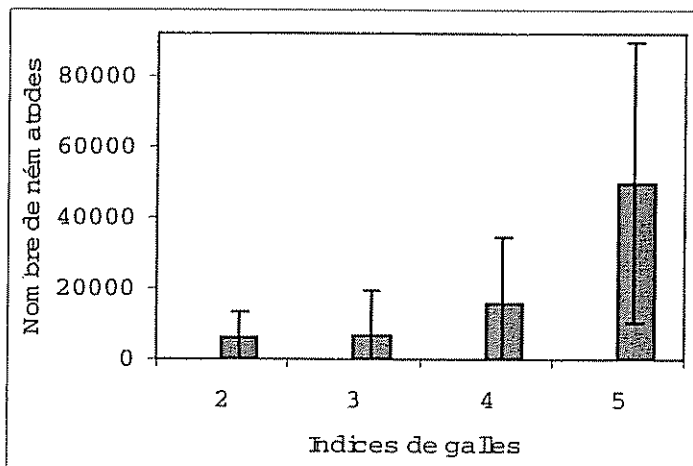


Figure 16 : Nombre total de nématodes extraits en fonction de l'indice de galles, exprimé par gramme de matière sèche du système racinaire (essai 3). Les barres verticales visualisent l'écart type.

Le nombre de nématodes extraits est significativement différent selon les indices de galles ($F = 17,52, *$). Cependant, la comparaison des moyennes ne permet pas de distinguer les nombres de nématodes extraits chez les plantes d'IG 3 et 4 (Tableau 9).

Tableau 9 : Nombre moyen de nématodes extraits en fonction de l'indice de galles, exprimé en gramme de matière sèche du système racinaire (essai 3). La variable est transformée en $\text{Log}(x+1)$ pour la comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Indice de galles	Nombre de nématodes	Variable transformée
2	7.014	a
3	12.766	b
4	18.275	b
5	39.641	c

IV. COMPORTEMENT DU NEMATODE SUR DES CAFEIERS RESISTANTS ET SENSIBLES

Les données sur le comportement du nématode sur plantes résistantes et sensibles sont recueillies dans quatre essais qui présentent des protocoles et des dispositifs différents. Il n'est donc pas possible de comparer les résultats des essais entre eux (Annexe 10). En revanche, il est possible de les utiliser pour préciser la cinétique de la pénétration et du développement du nématode ainsi que pour mettre en évidence des différences de comportement du nématode sur plantes résistantes et sensibles.

IV.1 Comportement de *M. exigua* chez *C. arabica* cv. IAPAR59 et cv. Caturra

Des juvéniles sont observés rapidement dans les racines de cv. Caturra et cv. IAPAR59, dès le 3^e jour après inoculation (Tableau 10). Dans les quatre essais considérés, le pourcentage de pénétration des juvéniles est toujours plus élevé chez cv. Caturra que chez cv. IAPAR59 (Figure 17). Il est 8 fois plus important pour l'essai 1, 3,7 fois pour l'essai 4, 5,8 fois pour l'essai 5 et 2,7 fois pour l'essai 6.

Des galles sont observées dès le 3^e jour après inoculation chez cv. Caturra et après le 6^e jour chez cv. IAPAR59 (Tableau 10). Les galles rencontrées chez cv. IAPAR59 sont toujours plus petites et moins nombreuses que chez cv. Caturra.

L'apparition de femelles est synchrone chez cv. Caturra et cv. IAPAR59, 10 jours après inoculation, (Tableau 10). Leur nombre est beaucoup plus faible chez cv. IAPAR59 (≤ 3) que chez cv. Caturra (≥ 13).

Tableau 10 : Cinétique de la pénétration et du développement de *M. exigua* dans les racines de cv. IAPAR59 et cv. Caturra dans quatre essais. Les dates sont données en nombre de jours après l'inoculation (T).

Essai	Cultivar	Observation de juvéniles	Observation de renflements	Observation de femelles
1	Caturra	T+3	T+3	T+10
	IAPAR59	T+3	T+6	T+11
4	Caturra	T+5	T+15	T+15
	IAPAR59	T+7		
5	Caturra	T+5	T+11	T+10
	IAPAR59	T+5	T+13	T+14
6	Caturra	T+4	T+7	T+21
	IAPAR59	T+4	T+10	T+17

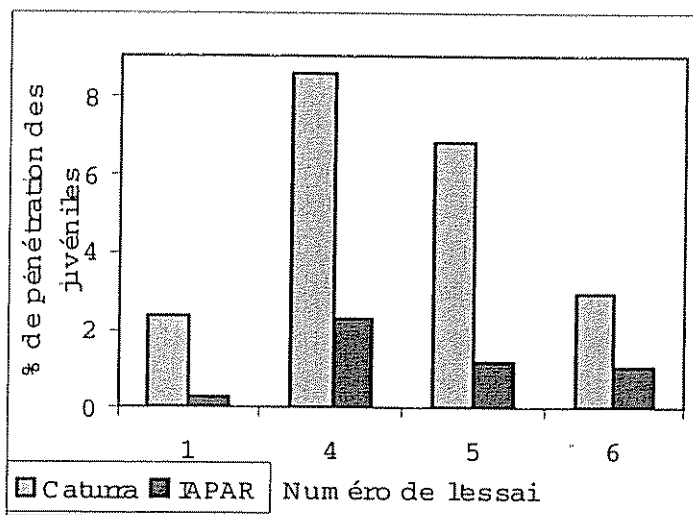


Figure 17 : Pourcentage de pénétration des juvéniles chez cv. Caturra et cv. IAPAR dans les essais 1, 4, 5 et 6.

IV.2 Comportement de *M. exigua* chez des caféiers *C. canephora* résistants

Des juvéniles sont observés dans les racines de *C. canephora* trois jours après inoculation, comme chez *C. arabica* cv. Caturra et cv. IAPAR59. Des renflements sont visibles au 7^e jour. Des femelles ont été vues au 32^e jour.

IV.3 Observation cytologique de la réaction de résistance et durée de son expression

Les colorations à la fuschine acide sur les racines de caféiers des essais 4, 5 et 6 permettent de mettre en évidence une différence histologique entre cv. Caturra et cv. IAPAR59 après la pénétration des nématodes. Des zones foncées s'apparentant à des cellules nécrosées sont observées autour des juvéniles situés au niveau du cortex racinaire de cv. IAPAR59 alors qu'elles sont absentes chez cv. Caturra (Figures 18 a et b). Ces zones foncées autour des juvéniles ayant pénétré les racines de cv. IAPAR59 sont visibles entre le 5^e et le 24^e jour après inoculation.

IV.4 Caractérisation du phénotype de la résistance

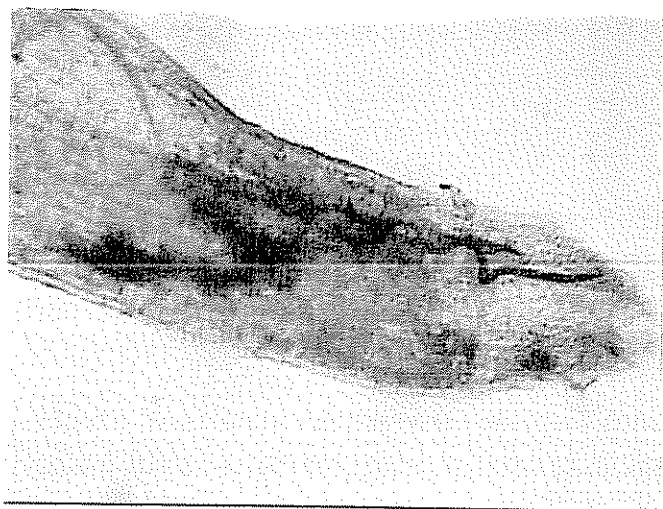
Des extrémités racinaires (3 fragments de 3 mm) sont prélevées, fixées (glutaraldéhyde à 2,5 % dans tampon cacodylate à 0,1 M, pH 7,2) et envoyées à Montpellier afin d'étudier le phénotype de la résistance. Les résultats des observations au microscope électronique seront connus au début de l'année prochaine.

Les fixations sont effectuées entre T+4 et T+19 (9 dates de prélèvements) pour les essais 5 et 6.

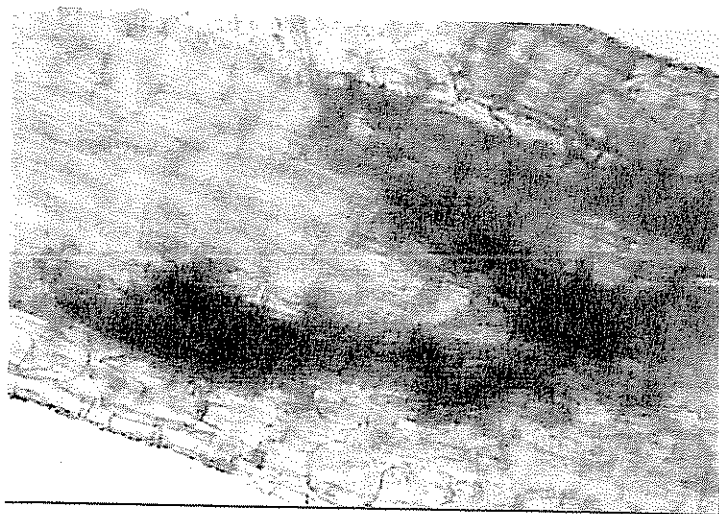
V. INFLUENCE DU DEVELOPPEMENT DES CAFEIERS SUR LE COMPORTEMENT DU NEMATODE

V.1 Comportement du nématode aux stades précoces de développement des caféiers

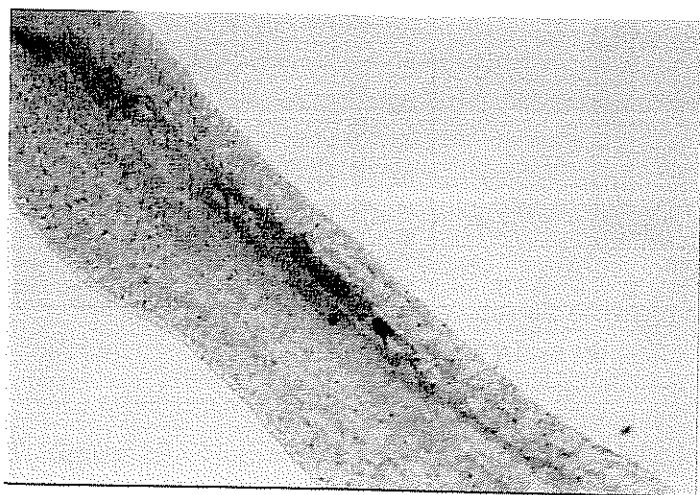
Chez cv. Caturra, un nombre élevé de juvéniles est observé dans les racines des plantes qui possèdent de une à trois paires de feuilles alors qu'il est beaucoup plus faible chez les plantes au stade cotylédonnaire (Figure 19 et Annexe 11). Aucun nématode n'est trouvé chez cv. IAPAR59 avec les cotylédons étalés. Le nombre de juvéniles est nettement plus faible chez cv. IAPAR59 que chez cv. Caturra. Le nombre maximum de juvéniles est observé chez cv. Caturra avec la première paire de feuilles étalée (96 juvéniles) et chez cv. IAPAR59 avec trois paires de feuilles étalées (12).



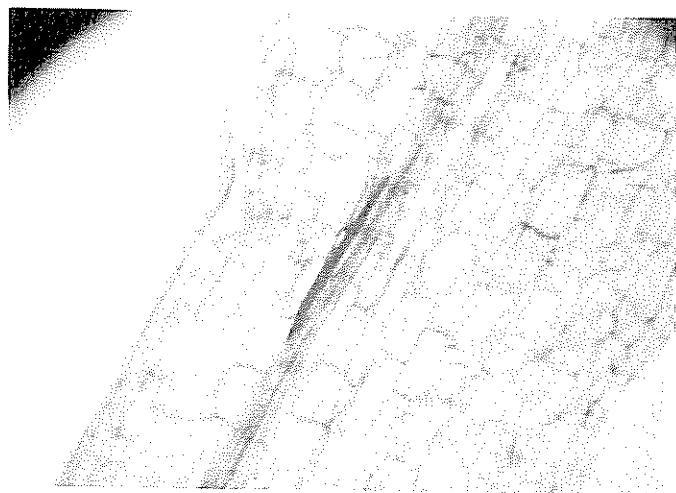
a · Zones nécrosées autour de plusieurs juvéniles, 5 jours après inoculation chez cv. IAPAR59 (essai 5). G · x 50



b · Zones nécrosées autour de plusieurs juvéniles, 5 jours après inoculation chez cv. IAPAR59 (essai 5) G · x 125



c · Zones nécrosées autour d'un juvénile, 6 jours après inoculation chez cv. IAPAR59, une paire de feuilles (essai 1). G · x 50



d · Juvénile proche du cylindre central, 12 jours après inoculation chez cv. Caturra G · x 125

Figures 18 : Observations histologiques de racines de cv. IAPAR et de cv. Caturra inoculées par *M. exigua* (coloration à la fuschine acide)

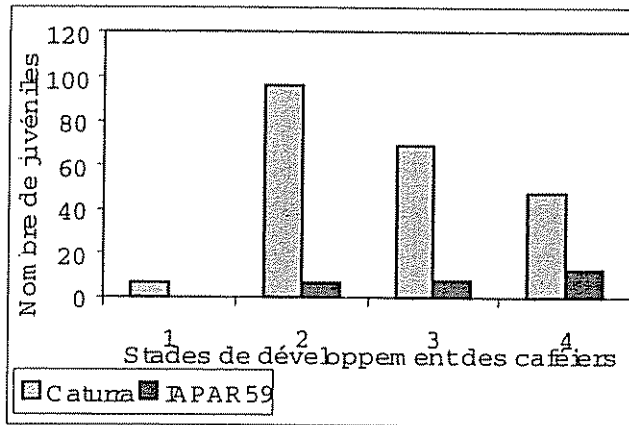


Figure 19 : Nombre de juvéniles observés dans les racines de cv. Caturra et cv. IAPAR59 à quatre stades de développement (essai 1). Stade 1 : cotylédons étalés, stade 2 : une paire de feuilles étalée, stade 3 : deux paires de feuilles étalées, stade 4 : trois paires de feuilles étalées.

Aucune femelle n'a été rencontrée chez les caféiers au stade cotylédonaire. Le nombre de femelles est maximum chez cv. Caturra à une paire de feuilles étalée (33 femelles observées) et chez cv. IAPAR59 à deux paires de feuilles étalées (10) (Figure 20).

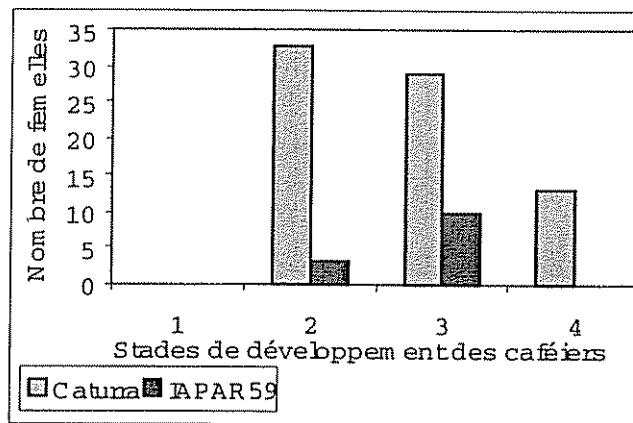


Figure 20 : Nombre de femelles observées dans les racines de cv. Caturra et cv. IAPAR59 à quatre stades de développement (essai 1). Stade 1 : cotylédons étalés, stade 2 : une paire de feuilles étalée, stade 3 : deux paires de feuilles étalées, stade 4 : trois paires de feuilles étalées.

V.2 Estimation du nombre de galles et de nématodes aux stades précoces de développement des caféiers

Les analyses de la variance du nombre de galles et du nombre de nématodes extraits par nébulisation ne révèlent pas de différence significative entre cv. Caturra (respectivement $F = 1,5$ et $1,1$) et cv. IAPAR59 (respectivement $F = 0,7$ et $0,8$) avec une, deux ou trois paires de feuilles (Annexe 12).

V.3 Observations cytologiques aux stades précoces de développement des caféiers

Des zones foncées sont observées chez cv. IAPAR59 à une paire de feuilles étalée, six jours après inoculation. Elles sont aussi présentes aux stades suivants de développement, à deux et trois paires de feuilles (Figure 18 c).

PARTIE IV : DISCUSSION

I. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'EVALUATION DE LA RESISTANCE DU CAFEIER A *MELOIDOGYNE EXIGUA*

I.1 Choix du substrat de culture des caféiers

Les deux substrats utilisés dans cette étude n'ont pas d'influence sur le taux de germination des graines de cv. IAPAR59 et cv. Caturra alors qu'ils interviennent sur la croissance des plantules des deux cultivars. Les caféiers se développent plus rapidement sur un substrat constitué de $\frac{3}{4}$ de terre et d' $\frac{1}{4}$ de sable que sur du sable pur. La présence de terre dans le substrat favorise donc la croissance du caféier aux premiers stades de développement. Cependant, le sable facilite les opérations de dépotage, lavage minutieux des racines et repotage, qui sont employées pour compter le nombre de galles et extraire les nématodes, ainsi que pour réaliser des prélèvements pour les observations histologiques. Il faut donc trouver un compromis qui permette un bon développement et une manipulation optimale des systèmes racinaires. Il serait intéressant d'essayer un substrat constitué pour moitié de terre et sable, voire $\frac{3}{4}$ sable et $\frac{1}{4}$ terre.

Les données de l'étude ont également mis en évidence une différence de vitesse de croissance entre cv. Caturra et cv. IAPAR59, les plantules de cv. Caturra se développant plus vite que celles de cv. IAPAR59. Pour pouvoir réaliser des expérimentations avec des plantules de ces cultivars aux mêmes stades de développement, il est nécessaire de semer les graines de cv. IAPAR59 un mois avant celles de cv. Caturra.

I.2 Analyse critique des évaluations basées sur l'indice de galles (IG)

L'indice de galles, qui comprend six classes, est défini à partir du comptage du nombre de galles présentes sur le système racinaire des caféiers, trois mois après leur inoculation. Ce critère d'évaluation est facile d'utilisation car il est visuel et ne nécessite pas d'équipements particuliers pour son observation. Il permet d'évaluer rapidement un grand nombre de plantes. Bertrand *et al.* (2001) considèrent que les plantes d'IG 0, 1 et 2 (≤ 10 galles) sont résistantes tandis que celles d'IG 3, 4 et 5 sont sensibles (> 10 galles). Mais l'analyse d'une population ségrégeante F2 a montré que des marqueurs moléculaires liés au gène de résistance Mex-1, identifiés par Noir *et al.* (2002), sont présents chez des caféiers d'IG 3 (Anthony, communication personnelle). La détermination des plantes résistantes sur le seul critère de posséder 10 galles au maximum apparaît donc arbitraire.

Nos résultats confirment cette critique. L'indice de galles est certes fortement corrélé au nombre de galles ($r = 0,87$) mais il ne l'est que faiblement avec le nombre de nématodes extraits après une semaine de nébulisation ($r = 0,45$).

La valeur de ce comptage est d'ailleurs peu fiable pour prédire l'indice de galles. En particulier, il n'est pas possible de distinguer statistiquement les nombres moyens de nématodes extraits chez les plantes d'IG 3 et 4. Il n'est donc pas possible de distinguer les plantes de ces deux indices de galles par le nombre de nématodes. La faible relation entre l'indice de galles et le nombre de nématodes peut s'expliquer par la présence de grosses galles chez les plantes d'IG 3, 4 et 5, susceptibles de renfermer les masses d'œufs de plusieurs femelles. Il faudrait donc tenir compte de la taille des galles, en plus de leur nombre, pour améliorer l'intérêt de l'indice de galles comme critère d'évaluation de la résistance.

I.3 Choix de la méthode d'extraction des nématodes

La nébulisation permet une extraction de *M. exigua* significativement plus élevée que l'hypochlorite pour tous les indices de galles testés. L'hypochlorite est inefficace pour extraire les plantes qui présentent peu de galles ($IG \leq 2$). De plus, cette méthode d'extraction ne permet pas de distinguer les caféiers résistants ($IG \leq 2$) des sensibles ($IG \geq 3$). Les mauvais résultats des extractions par hypochlorite peuvent s'expliquer par le développement de *M. exigua* à l'intérieur des racines de caféier alors que les autres espèces de nématodes du genre *Meloidogyne* se développent à un niveau plus externe.

Le nombre de nématodes comptés après sept jours de nébulisation est très fortement corrélé au nombre total extrait après 14 jours ($r = 0,96$). De plus, les valeurs du comptage à sept jours permettent une bonne prédiction du nombre total de nématodes présents dans les racines de la plante hôte (R^2 ajusté = 0,98). Seinhorst (1950) préconise deux dénombrements après 7 et 14 jours de nébulisation. Pour le couple caféier / *M. exigua*, un seul comptage à 7 jours est suffisant.

I.4 Préparation des plantes en vue d'observations cytologiques

Les plantes utilisées pour le prélèvement d'échantillons racinaires sont inoculées selon deux protocoles : directement en pots (essais 5, 6 et 7) ou sur des racines découvertes, maintenues humides sur papier filtre (essai 4). Sur racines nues, il est facile de repérer les points d'inoculation et les prélèvements sont rapides. Mais la méthode présente plusieurs inconvénients majeurs comme une longue et minutieuse préparation des plantes, la difficulté de maintenir constante l'humidité au niveau des racines, la sensibilité des racines découvertes aux rayonnements UV et un stress pour la plante.

L'inoculation de plantes en pot résout une partie des problèmes posés par l'inoculation de racines découvertes mais en pose d'autres. Cette fois, les caféiers sont dans des conditions optimales de croissance et n'ont pas besoin d'être manipulés avant d'être inoculés. Mais l'inoculum se dilue dans le substrat et les prélèvements doivent être faits au hasard.

Ceux-ci sont plus longs et délicats que pour caféiers à racines nues car il faut dépoter les plantes, laver les systèmes racinaires puis procéder au rempotage si l'on souhaite conserver la plante.

En conclusion, il est recommandé de réaliser des inoculations en pot dans le cas d'essais avec de jeunes caféiers, au maximum trois paires de feuilles, et pour évaluer de grands effectifs. L'inoculation sur racines nues doit être réservée à des caféiers plus âgés et à des essais qui nécessitent un repérage des inoculations. Afin d'éviter le dessèchement des racines, il est envisageable de disposer les plantes verticalement de manière à ce que leurs racines puissent tremper dans une solution qui contient l'inoculum.

II. CARACTERISATION DE LA REACTION DE RESISTANCE DES CAFEIERS A *MELOIDOGYNE EXIGUA*

En rassemblant les données de plusieurs essais, il est possible d'établir la chronologie des principales étapes d'infestation des caféiers par les nématodes. Trois jours après inoculation, des juvéniles sont observés dans les racines des caféiers résistants et sensibles. Des renflements sur la paroi des racines ont été vus aussi à cette date (T+3) chez les caféiers sensibles et six jours après inoculation chez les caféiers résistants. Il est probable que la pénétration des nématodes a lieu avant le troisième jour après inoculation puisque la formation des galles a déjà commencé. La recherche de juvéniles devrait donc être entreprise dès les premières heures après inoculation. La différence de trois jours constatée dans l'apparition des renflements chez les caféiers sensibles et résistants peut s'expliquer par la difficulté de rencontrer des nématodes dans les tissus racinaires, en particulier chez les plantes résistantes. Pour leur part, les femelles apparaissent au dixième jour chez les caféiers qu'ils soient sensibles ou résistants. Les deux types de caféiers ne peuvent donc pas être distingués par la cinétique de pénétration et de développement des nématodes mais par des différences quantitatives sur les niveaux d'infestation. Ce mécanisme a aussi été observé chez les caféiers résistants de *C. canephora*.

Les observations cytologiques ont révélé la présence de zones foncées autour des juvéniles qui ont pénétré dans les racines des caféiers résistants. Les microscopes utilisés ne sont pas suffisamment précis pour pouvoir affirmer qu'il s'agit de cellules nécrosées, caractéristiques d'une réaction HR. Les préparations cytologiques envoyées à Montpellier permettront de préciser prochainement le phénotype de la réaction de résistance à *M. exigua* chez le caféier. Chez *C. arabica* cv. Catimor, Cristina *et al.* (2000) ont observé une réaction de type HR six jours après inoculation par *M. exigua*. Dans notre étude, les zones foncées entourant les nématodes ont été vues à partir du cinquième jour. Il est possible qu'elles apparaissent encore plus rapidement.

De part la nature endoparasite des nématodes, le temps nécessaire à l'initiation de la HR varie selon les plantes (Trudgill, 1991). Cette réaction peut être précoce et survenir lors de la pénétration du parasite ou tardive, après sa fixation sur le site nourricier (Pontier *et al.*, 1999). Chez les caféiers, nos travaux ont mis en évidence deux niveaux d'expression de la résistance à *M. exigua* : pour limiter la pénétration des nématodes et freiner ensuite leur multiplication à l'intérieur des racines. Ces deux niveaux sont-ils contrôlés par le même gène Mex-1 identifié par Noir *et al.* (2002), ou bien existe-t-il un ou plusieurs autres facteurs géniques qui limitent la pénétration des juvéniles avant que le gène Mex-1, identifié par Noir *et al.* (2002), n'induit une réaction de type HR ? Pour répondre à cette interrogation, il est nécessaire d'étudier la pénétration des juvéniles chez des caféiers introgressés comme cv. IAPAR59, qui possèdent et ne possèdent pas le gène Mex-1.

Nos résultats s'opposent aux conclusions de l'étude rapportée par Cristina *et al.* (2000), à savoir que la mise en place d'une HR dans les caféiers résistants rend impossible la reproduction du nématode. En effet, des femelles ont été observées dans les racines de cv. IAPAR59. En définitive, comme l'ont suggéré Bertrand *et al.* (1995), la résistance des caféiers à *M. exigua* et *M. arabicida* peut être due à plusieurs mécanismes :

- un mécanisme de résistance post infection qui empêche une pénétration en profondeur des nématodes. Bloqués avant d'avoir atteint leur site nutritionnel, ils ne peuvent pas effectuer un cycle normal de développement ;
- une réaction hypersensible qui se traduit par des nécroses dans le périderme ;
- un développement normal des nématodes mais avec un nombre réduit de femelles comme dans le cas d'une résistance partielle ;
- un développement anormal des nématodes, dû à la présence de cellules géantes déformées ;
- un développement interrompu, dû à un échec dans la formation des cellules géantes.

Les plantes de *C. canephora* réagissent à une infestation par *M. exigua* comme cv. IAPAR59. Peu de juvéniles parviennent à pénétrer dans les racines, les galls sont petites et en nombre réduit. Aucune femelle n'a été observée chez *C. canephora*. Ayant effectué des observations sur des caféiers âgés (5-6 paires de feuilles), il serait intéressant de les répéter avec des caféiers plus jeunes (1-2 paires de feuilles).

III. AGE D'EXPRESSION DE LA RESISTANCE CHEZ LES CAFEIERS

Des réactions hypersensibles ont été rapportées chez différents végétaux dès l'apparition de la radicle (Paulson et Webster, 1972 ; Dropkin, 1969 ; Cristina *et al.*, 2000). Les mécanismes de défense intervenant dans le cas d'une réaction incompatible se mettraient en place dès la germination des graines.

Dans notre étude chez le caféier, aucune femelle n'a été trouvée chez les plantes au stade cotylédonaire. Seuls quelques juvéniles ont été observés chez cv. Caturra. De leur côté, Cristina *et al.* (2000) ont mis en évidence une HR chez des plantules de caféier avant l'apparition des cotylédons, juste après la formation de la racine. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'un caféier au stade cotylédonaire possède un système racinaire très réduit, constitué d'une relativement grosse racine pivotante et de quelques fines et courtes racines secondaires. Par conséquent, pour une même quantité d'inoculum et un même volume de substrat, les juvéniles ont une probabilité plus faible de rencontrer une racine que chez un caféier plus âgé. Il serait donc intéressant de réaliser un essai où l'inoculation se ferait non plus en pots mais sur des racines nues dès l'apparition de la radicule.

Une fois le stade cotylédonaire passé, les pénétrations de juvéniles deviennent plus nombreuses. Aucune différence n'a été trouvée entre caféiers à une, deux et trois paires de feuilles dans leur réaction à *M. exigua*. Les évaluations actuellement effectuées sur des caféiers avec deux paires de feuilles pourraient être réalisées un mois plus tôt, lorsque apparaît la première paire de feuilles.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons mis au point un protocole d'évaluation de la résistance des caféiers à *M. exigua*, rapide, fiable et qui se rapproche de l'expression du gène en se plaçant après un cycle de multiplication du nématode (un mois) et non après trois mois. Il se base principalement sur un Indice de Galles prenant en compte le nombre et la taille des galles et sur l'extraction des nématodes par sept jours de nébulisation.

Pour la première fois, la cinétique de pénétration et de développement de *M. exigua* a été observée sur des racines de caféiers résistants et sensibles, en incluant l'espèce *C. canephora*. Elle semble être la même entre les plantes résistantes et sensibles alors que les niveaux d'infestation sont différents. On peut distinguer les caféiers résistants et sensibles par le nombre de juvéniles et de femelles des racines ainsi que par la taille et la quantité des galles formées. Toutefois, nous avons commencé les observations trois jours après inoculation et il est probable que les mécanismes cellulaires soient activés dès le premier jour. Il serait donc intéressant de voir si la cinétique de pénétration des nématodes est la même chez des caféiers résistants et sensibles entre un et trois jours après inoculation. Je recommande donc d'effectuer des observations histologiques dès le premier jour après inoculation des juvéniles.

Les moyens techniques disponibles au CATIE ne m'ont pas permis de caractériser complètement le phénotype de la résistance. Nous avons observé des zones foncées qui peuvent s'apparenter aux zones nécrosées caractéristiques d'une Réaction Hypersensible. Cet aspect sera précisé à partir des coupes histologiques réalisées à l'IRD.

Le comportement du nématode ne diffère pas entre les plantes à une, deux et trois paires de feuilles. Par contre, au stade cotylédonnaire, il semble que les juvéniles ont des difficultés à rencontrer les racines. Il faudrait donc réaliser un essai où l'inoculation des jeunes plantules se ferait sur des racines nues. Cependant, il est essentiel d'éviter le dessèchement des racines.

Le substrat de culture influe sur la croissance des caféiers. La terre favorise leur développement mais complique leur dépotage alors que le sable présente des effets contraires. Un semis sur ½ de sable et ½ de terre voire même sur ¾ sable et ¼ terre paraît intéressant à expérimenter.

D'un point de vue personnel, j'aurai appris à travailler et à m'adapter dans un environnement qui m'avait été jusque-là inconnu.

Les circonstances d'encadrement à distance ont certainement contribué de manière appréciable au développement de mon autonomie de travail.

Je considère cette expérience comme un enrichissement professionnel et personnel très important, me permettant de prendre un certain recul par rapport à la gestion des relations humaines et fondements culturels associés. Je suis heureuse d'avoir pu contribuer à l'évolution des connaissances et au développement d'outils agronomiques permettant à terme, je l'espère, de combattre les nuisances dues aux nématodes dans un contexte caféier difficile pour les producteurs, tant du point de vue phytosanitaire que du point de vue économique.

BIBLIOGRAPHIE

Aguilar G., Bertrand B. et Anthony F., 1997. Comportamiento agronomico y resistencia a las principales plagas de diferentes variedades, derivadas del Híbrido de Timor (Première et deuxième partie). *Noticiero del café*, **94** et **95** : 1-4.

Alvarado J., 1997. Diagnostico sobre el parasitismo de los nematodos y cochinillas de la raíz en la zona cafetalera del Suroccidente de Guatemala. *Tesis de ingeniero agronomo*. Centro Universitario de Occidente, Quetzaltenango, Universidad de San Carlos, Guatemala, 60p.

Anthony F., Berthaud J., Guillaumet J.L. et Lourd M., 1987. Collecting wild *Coffea* species in Kenya and Tanzania. *Plant Genetic Resources Newsletter*, **69** : 23-29.

Anthony F., Astorga C. et Berthaud J., 1999. Los recursos geneticos : las bases de una solucion genetica a los problemas de la caficultura latinoamericana. *In* : «Desafios de la caficultura centroamericana», Bertrand B. et Rapidel B. (Eds). IICA/PROMECAFE-CIRAD-IRD-CCCR/Francia, San José, 369-406.

Anthony F., Bertrand B., Quiros O., Wilches A., Lashermes P., Berthaud J. et Charrier A., 2001a. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica*, **118** : 53-65.

Anthony F., Combes M.C., Astorga C., Bertrand B., Graziosi G. et Lashermes P., 2001b. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* (à paraître).

Anthony F., Topart P., Anzueto F., Astorga C. et Bertrand B., 2002. La resistencia genetica del café (*Coffea* spp.) a los nematodos (*Meloidogyne* spp.): identification y utilizacion para la caficultura latinoamericana. *Manejo Integrado de Plagas*, in press.

Anzueto F., Eskes A.B., Sarah J.L. et Decazy B., 1993. Résistance de quelques descendances de *Coffea arabica* et *C. canephora* vis-à-vis de deux populations de *Meloidogyne* spp originaires du Guatemala et du Brésil. *Proceedings 15th International Scientific Colloquium on Coffee*, Montpellier, Paris, ASIC, 338-348.

Anzueto F., Bertrand B., Sarah J.L., Eskes A.B. et Decazy B., 2001. Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* origins : detection and study of resistance transmission. *Euphytica*, **118** : 1-8.

Benhamou N., Mazau D. et Esquerre-Tugaye M.T., 1990. Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich glycoproteins in tomato root-cells infected by *Fusarium oxysporum* f sp *radicis-lycopersici* study of a compatible interaction. *Phytopathology*, **80** : 163-173.

- Bertrand B., 2002. Utilisation de l'hétérosis dans le programme d'amélioration de *Coffea arabica*. Thèse de Doctorat, ENSAM, 274 p.
- Bertrand B., Vasquez N. et Decazy B., 1995. Nature of coffee resistance to two costa rican *Meloidogyne* populations. *ASIC, 16e colloque, Kyoto*, 910-916.
- Bertrand B., Anzueto F., Pena M., Anthony F., Eskes A.B., Aguilar G., Bompard E. et Rafinon A., 1997. Comportement agronomique et résistance aux principaux déprédateurs des lignées de Sarchimor et Catimors au Costa Rica. *Plantations Recherche Développement*, 4 : 312-321.
- Bertrand B., Borbon O. et Aguilar G., 1998. Situacion nematologica en un cafetal de la meseta central de Costa Rica y posibilidades de control. In : Memoria del III seminario resultados y avances de investigacion 1997. ICAFE, San José, C.R. ISBN 9977-55-020-4. p15-28.
- Bertrand B., Aguilar G., Santacreo R. et Anzueto F., 1999. El mejoramiento genetico en América Central. In : « Desafios de la caficultura centroamericana ». Bertrand B. et Rapidel B. (Eds). IICA/PROMECAFE-CIRAD-IRD-CCCR/Francia, San José, 405-456.
- Bertrand B., Pena Duran M.X., Anzueto F., Cilas C., Etienne H., Anthony F. et Eskes A.B., 2000a. Genetic study of *Coffea canephora* tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp. nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. *Euphytica*, 113 : 79-86.
- Bertrand B., Nunez C. et Sarah J.L., 2000b. Disease complex in coffee involving *Meloidogyne arabicida* et *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 49 : 383-389.
- Bertrand B., Anthony F. et Lashermes P., 2001. Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* of *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. *Plant Pathology*, 50 : 1-8.
- Bertrand B., Ramirez G., Etienne H., Topart P. et Anthony F., 2002. Resistance of cultivated coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) to the corky-root caused by *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*, under controlled and field conditions. *Crop protection* (soumis).
- Bettencourt A., 1973. Considerações gerais sobre o « Híbrido de Timor ». Instituto Agronomico de Campinas, circular n°31, Campinas, Brazil.
- Bird A.F., 1959. Development of the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* Treub and *M. hapla* Chitwood in the tomato. *Nematologica*, 4 : 31-42.
- Bird A.F., 1962. The inducement of giant cells by *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, 8 : 1-10.

Bleve-Zacheo T., Melillo M.T. et Zacheo G., 1990. Ultrastructural response of potato root resistant to cyst nematode *Globodera rostochiensis* pathotype Rol. *Rev. Nematol.*, 13 : 29-36.

Byrd D.W., Kirkpatrick T. et Barker K.R., 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *J. Nematol.* 15, 142-143.

Cai D., Kleine M., Harloff H.J., Sandal N.N., Marcker K.A., Klein-Lankhorst R.M., Salentijn E.M.J., Lange W., Wyss U., Grundler F.M.W. et Jung C., 1997. Positional cloning of gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, 273: 832-834.

Campos V.P., Srivapalan P. et Gnanapragasam N.C., 1990. Nematode parasites in coffee, cocoa and tea. In : « Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture ». Luc M., Sikora R.A. et Bridge J. (Eds.). *CAB International Publishers*, Wallington (Royaumes Unis), p 387-430.

Cap G.B., Roberts P.A. et Thomason I.J., 1993. Inheritance of heat-stable resistance to *Meloidogyne incognita* in *Lycopersicon peruvianum* and its relationship to the Mi gene. *Theoretical and applied genetics*, 85 : 777-783.

Carneiro R.M.D.G., Carneiro R.G., Abrantes I.M.O. et Almeda M.S.N.A., 1996. *Meloidogyne paranaensis* sp. A root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *J. of Nematology*, 28 : 177-189.

Carneiro R.M.D.G., Almeida M.R.A. et Quénéhervé P., 2000. Enzymes phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology*, 2 : 645-654.

Carvalho A., 1946. Distribuicao geografica e classificacao botanica do genero *Coffea* com referencia especial a especie Arabica. *Boletim da Superintendencia dos Servicos do Café*, 21(229) : 174-180.

Carvalho A., 1988. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors : *Coffea arabica*. In : Coffee : R.J. Clarke et R. Madrae (Eds), *Elsevier applied science*, vol 4 Agronomy, p 334.

Carvalho A., Ferwerda F.P., Frahm-Leliveld J.A., Medina P.M., Mendes A.J.T. et Monaco L.C., 1969. Coffee. In : Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Ed por F.P. Ferwerda et F. Wit Wageningen, Pays bas, Veenman et Zonen NV., p 189-241.

CEPAL, 2002. Centroamerica : el impacto de la caida de los precios del café en 2001. *LC/MEX/R.833*.

Charrier A., 1978. Etude de la structure et de la variabilité génétique des caféiers. *Bulletin IFCC*, n°14, 100 p.

- Charrier A. et Berthaud J., 1988. Principles and methods in coffee plant breeding : *Coffea canephora* Pierre. In Coffee, volume 4 Agronomy. Ed. par Clarke R.J. et Macrae R. Londres, Royaumes Unis, Elsevier *Applied Science*, 167-197.
- Chaverri L.F.A., 1987. Evaluacion de la resistencia de cinco clones de *Coffea canephora* cv. *Robusta* al ataque de dos poblaciones de *Meloidogyne exigua* Goeldi. *Costa Rica, Heredia, Tesis de Licenciado de la Escuela de Ciencias agrarias, Universidad Nacional*, 61.
- Chevalier A., 1929. La culture du caféier dans les colonies françaises par les européens et par les indigènes. Communications et actes de l'académie des Sciences coloniales. Paris, France, p 17.
- Chevalier A., 1947. Les caféiers du globe. III) Systématique des caféiers et faux caféiers. Maladies et insectes nuisibles. *Encyclopédie biologique*, n°28(3), Paris, France, P. Lechevalier, p 356.
- Chevalier A. et Dragon M., 1928. Recherches historiques sur les débuts de la culture du caféier en Amérique. *Comunicaciones y Actas de la Academia de las Ciencias Coloniales*. Paris, Francia, 38p.
- Christie J.R., 1936. The development of root-knot nematode galls. *Phytopathology*, **26** : 1-22.
- Collinge D.B., Gregersen P. et Thordal-Christensen H., 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In : « Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches. *Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker*, 391-433. »
- Collinge D.B., Borch J., Madriz-Ordenana K. et Newman M-A., 2001. The responses of plants to pathogens. In : « Hawkesford M.J., Buchner P., Molecular analysis of plant adaptation to the environment. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers. »
- Cristine A.C.F. de O., Abrantes I.M. de O., Melillo M.T. et Bleve-Zacheo T., 2000. Ultrastructural response of coffee roots to root-knot nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M. megadora*. *Nematropica*, **30** : 201-210.
- Curi S.M., Carvalho A., Moraes F.P., Monaco L.C. et Arruda H.V., 1970. Novas fontes de resistencia genetica de *Coffea* no controle de nematoide do cafeeiro, *M. exigua*. *Biologico*, **36** : 293-295.
- De Guiran G. et Netscher C., 1970. Les nématodes du genre *Meloidogyne* parasites des cultures tropicales. *Cah. ORSTOM, Sér. Biol.*, **11** : 151-185.

- Delroux K., 1997. Incidence de la température sur l'inactivation du gène de résistance à *Meloidogyne* spp. chez des variétés de tomates adaptées et non adaptées à la chaleur. *Mémoire de stage, DEA parasitologie, Université Montpellier II*.
- De Wit P.J.G.M., 1997. Pathogen avirulence and plant resistance : a key role for recognition. *Trends in Plant Science*, **2** : 452-458.
- Dropkin V.H., 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne* : reversal by temperature. *Phytopathology*, **59** : 1632-1637.
- Dropkin V.H. et Nelson P.E., 1960. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology*, **50** : 442-447.
- Eisenback J.D., Bernard E.C. et Schmitt D.P., 1994. Description of the Kona coffee root-knot nematode, *Meloidogyne konaensis* sp. *J. Nematology*, **26** : 363-374.
- Esbenshade P.R. et Triantaphyllou A.C., 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, vol **17**, n°1, 6-20.
- Fallis A.M., 1943. Use of the Waring blender to separate small parasites from tissue. *Can. J. Publ. Hlth.* **34**, 44.
- FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation), 1968. FAO coffee mission to Ethiopia 1964-1965. *Informe de recoleccion*. Roma, Italia, FAO, 200p.
- Fernandez D., Noir S., Bon M.C., Combes M.C., Silva M.C., Guerra-Guimaraes L., Anthony F., Bertrand B. et Lashermes P., 2001. Molecular physiology and genetics of coffee resistance to parasites. 19th international conference on coffee science, Trieste. ASIC, Paris, CD-ROM ref. B207.
- Flor H.H., 1955. Host-parasite interaction in flax rust : its genetics and other implications. *Phytopathology*, **45** : 680-685.
- Flor H.H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Rev. Phytopathol.*, **9** : 275-296.
- Flore L. et Lopez R., 1989. Caracterizacion morfologica del nematodo del cafeto *Meloidogyne exigua* (Nemata : Heteroderidae). Hembras y huevos. *Turrialba*, **39** : 352-360.
- Forrest J.M.S., Trudgill D.L. et Cotes L.M., 1986. The fate of juveniles of *Globodera rostochiensis* pathotype Rol in roots of susceptible and resistant potato cultivars with gene H1. *Nematologica*, **32** : 106-114.

Gabriel D.W., 1999. Why do pathogens carry avirulence genes ?. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55** : 205-214.

Garcia A., 1991. Les Pseudococcidae déprédatrices du caféier (*Coffea arabica*) au Guatemala : cas particulier de *Dysmicoccus cryptus* (Hempel, 1918). *Thèse de doctorat*. Toulouse, France, Univ. Paul Sabatier, 122 p.

Gheysen, 1998. Chemical signals in the plant-nematode interaction. In : « Romeo *et al.*, Phytochemical signals and Plant-Microbe interactions. *Plenum Press, New York*, 95-117. »

Gil S., 1988. Recherches sur la résistance à *Hemileia vastatrix* Berk et Br. De géotypes de *Coffea arabica* L. d'origines éthiopiennes. *Thèse de Docteur-Ingénieur*, ENSA, Montpellier, France, 124 p.

Gonçalves, W. et L.C.B. Ferraz, 1987. Resistência do cafeeiro a nematóides. II testes de progênies e híbridos para *Meloidogyne incognita* Raça 3. *Nemat. Brasileira*, **11**: 125-142.

Gonçalves, W., M.M.A. de Lima & L.C. Fazuoli, 1988. Resistência do cafeeiro a nematóides: III- Avaliação da resistência de espécies de *Coffea* e de híbridos inter-específicos a *Meloidogyne incognita* raça 3. *Nematod. Brasileira*, **12**:47-54.

Gonçalves, W., L.C.B. Ferraz, M.M.A de Lima & M.B. Silvarolla, 1996. Reações de cafeeiros às raças 1, 2 e 3 de *Meloidogyne incognita*. *Summa Phytopathologica*, **22**: 2, 172-177.

Gonçalves J.L. et Pereira A., 1998. Resistência do Cafeeiro a Nematoides IV- Reação de Cafeeiros Derivados do Híbrido de Timor a *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*, **22** : 39-50.

Grassias M., 1980. Etude de la fertilité et du comportement méiotique des hybrides interspécifiques Arabusta *C. arabica* x *C. canephora* (Thèse de doctorat), Orsay, Univ. Paris XI, France, 235 p.

Guillaumet J.L. et Halle F., 1978. Echantillonnage du matériel récolté en Ethiopie. *Bulletin F.C.C.*, **14** : 13-18.

Hammerschmidt R., 1999. Induced disease resistance : how do induced plants stop pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55** : 77-84.

Heath M.C., 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, **44** : 321-334.

Hernandez A., 1997. Etude de la variabilité intra et interspécifique des nématodes du genre *Meloidogyne* parasites des caféiers en Amérique Centrale. *Thèse de doctorat*, Univ. Montpellier II, 101 p.

Holguin F., 1993. Contribution à la recherche d'une résistance durable du caféier (*Coffea* spp.) à la rouille orangée *Hemilea vastatrix* Berk et Br., étude de la variabilité naturelle du pathogène. *Thèse de Doctorat*, USTL, Montpellier II, France, 172 p.

Hussey R.S. et Barker K.R., 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Pl. Dis. Repr.* **57**, 1025-1028.

IFAS, 1989. Florida Nematode Control guide. University of Florida, Gainesville, p 138.

Kaplan D.T., Keen N.T. et Thomason I.J., 1980. Association of glyceollin with the incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita*. *Physiol. Plant Pathol.*, **16** : 309-318.

Kloepper J.W., Rodriguez-Kaban R. et Kokalis-Burelle N., 1996. A review of antagonistic plants as modifiers of rhizosphere bacteria. Proceedings of third International Nematology Congress. Gosier, Guadeloupe, 7-12 juillet. *Nematropica*, **26** (3) : 211.

Krug C.A., Mendes J.E.T. et Carvalho A., 1939. Taxonomia de *Coffea arabica* L. : descricao das variedades e formas encontradas no Estado de Sao Paulo. *Boletim Tecnic. Sao Paulo, Brasil, Instituto Agronomico do Estado em Campinas*, **62** : 55p.+ anexos.

Lashermes P., Cros J., Marmey P. et Charrier A., 1996. Use of random amplified DNA markers to analyse genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Genet. Resources Crop Evol.* **40** : 91-99.

Lashermes P., Combes M.C., Robert J., Trouslot P., D'Hont A., Anthony F. et Charrier A., 1999. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol. Gen. Genet.*, **261** : 259-266.

Lashermes P., Combes M.C., Topart P., Graziosi G., Bertrand B. et Anthony F., 2000. Molecular breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). In : « Coffee biotechnology and quality ». Sera T., Soccol C.R., Pandey A. et Roussos S. (Eds). *Kluwer Academic Publisher, Dordrecht*, 134-136.

Lashermes P., Combes M.C., Herrera J.C., Noir S., Prakash N.S., Topart P. et Anthony F., 2001. Analyse moléculaire du génome du caféier Arabica – Relations avec la valorisation des ressources génétiques. In : « Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes ». S Hamon Ed. Collection Colloques et séminaires, IRD Editions, 95-110.

- Lawton K., Weymann K., Friedrich L., Vernooij B., Uknes S. et Ryals J., 1995. Systemic acquired resistance in Arabidopsis required salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **8** : 863-870.
- Leroy J.F., 1980. Evolution et taxogénèse chez les caféiers (*Coffea* L., *Psilanthus* Hook.f. et *Nostolachma* Durand). Hypothèse sur leur origine. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, **291** : 593-596.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R.A. et Lamb C., 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79** : 583-593.
- Linford M.B., 1937. The feeding of the root-knot nematode in root tissue and in nutrient solution. *Phytopathology*, **27** : 824-835.
- Linford M.B., 1942. The transient feeding of root-knot nematode larvae. *Phytopathology*, **32** : 580-589.
- Lopez R. et Salazar L., 1989. *Meloidogyne arabicida* sp. Nativo de Costa Rica : un nuevo y severo patogeno del cafeto. *Turrialba*, **39** : 313-323.
- Lordello L.G.E., 1972. Nematodes pests of coffee. In : Economic Nematology, Webster J.M. (Ed), Academic press, London and New York, 268-284.
- Luc M. et Reversat G., 1985. Possibilités et limites des solutions génétiques aux affections provoquées par les nématodes sur les cultures tropicales. In : C.R. Acad. Agri. De France, **71**, n°7 : 781-791, séance du 15 mai 1985.
- Moreno Ruiz G., 1989. Etude du polymorphisme de l'Hybride de Timor en vue de l'amélioration du caféier Arabica. *Thèse de doctorat*, ENSAM, 153 p.
- Morera G.N. et Lopez R., 1987. Respuesta de seis lineas experimentales de *Coffea* spp. a la inoculacion con *M. exigua*. *Nematropica*, **17** : 103-109.
- Negron J.A. et Acosta N., 1989. The fusarium oxysporum f. sp. *Coffea-Meloidogyne incognita* complex in Bourbon coffea. *Nematropica*, vol **19**, n°2, 161-169.
- Nicholson R.L. et Hammerschmidt R., 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **30** : 369-389.
- Noir S., Anthony F., Bertrand B., Combes M.C. et Lashermes P., 2002. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in coffee. Soumis à *Theoretical and applied genetics*.

- Ordenana K.M., 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patogeno. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, **63** : 22-32.
- Paulson R.E. et Webster J.M., 1970. Giant cell formation in tomato roots caused by *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* (Nematoda) infection. A light and electron microscope study. *Canadian Journal of Botany*, **48** : 271-276.
- Paulson R.E. et Webster J.M., 1972. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiol. Plant Pathol.*, **2** : 227-234.
- Paxton J.D., 1981. Phytoalexins : a working redefinition. *Phytopathology Z.*, **101** : 106-109.
- Perrard O., 1993. Graine sans frontières. *Géo*, **176** : 140-143.
- Person C., 1959. Gene-for-gene relationship in host-parasite systems. *Can. J. Bot.*, **37** : 1101-1130.
- Pontier D., Gan S.S., Amasino R.M., Roby D. et Lam E., 1999. Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol. Biol.*, **39** : 1243-1255.
- Powell N.T., 1971. Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. *Annual Review of Phytopathology*, **9** : 253-274.
- Rice S.L., Leadbeater B.S. et Stone A.R., 1985. Changes in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst-nematodes. Potatoes with resistance gene H1 derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Physiol. Plant Pathol.*, **27** : 219-234.
- Roberts P.A., Matthews W.C. et Ehlers J.D., 1996. New resistance to virulent root-knot nematodes linked to the Rk locus of cowpea. *Crop Science*, **36** : 889-894.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H-Y. et Hunt M.D., 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, **8** : 1009-1819.
- Skalamera D., Jibodh S. et Heath M.C., 1997. Callose deposition during the interaction between cowpea (*Vigna unguiculata*) and the monokaryotic stage of the cowpea rust fungus (*Uromyces vignae*). *New Phytologist*, **136** : 511-524.
- Seinhorst J.W., 1950. De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev). *Tijdschr. PlZiekt.* **56**, 289-348.

Sidhu G.S. et Webster J.M., 1981. The Genetics of Plant-Nematode Parasitic Systems. *The Botanical Review*, **47** : 387-419.

Silvarolla M.B., Gonçalves W. et Lima M.M.A., 1998. Resistencia do cafeeiro a nematoides. V. Reproducao de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros derivados da hibridacao de *Coffea arabica* com *C. canephora*. *Nematologia Brasileira*, **22** : 51-59.

Stemerding S., 1964. Een mixer-wattenfilter methode om vrijbeweeglijke endoparasitaire nematoden uit wortels te verzamelen. *Versl. Meded. plziektenk. Dienst Wageningen* **141**, 170-175.

Takken F.L.W. et Joosten M.H.A.J., 2000. Plant resistance genes : their structure, function and evolution. *European Journal of Plant Pathology*, **106** : 699-713.

Taylor A.L. et Sasser J.N., 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes. NSCU et USAID, *Coop. Publ.*, Raleigh, USA, 111 p.

Thomas A.S., 1942. The wild arabica *Coffea* in the Boma Plateau, Anglo-Egyptian Sudan. *Empire J. Exper. Agric.* Vol **10**, n°**40**, 207-212.

Trudgill D.L., 1991. Resistance and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Ann Rev Phytopathol*, **29** : 167-192.

Van Loon L.C. et Van Kammen R.T., 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var « Samsun NN ». Changes in proteins constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, **40** : 199-211.

Villain L., Sarah J.L., Decazy A., Molina A. et Sierra S., 1996. Evaluation of grafting on *Coffea canephora* var. Robusta, and chemical treatment for control of *Pratylenchus* sp. in *C. arabica* cropping systems. Proceedings of third International Nematology Congress. Gosier, Guadeloupe, 7-12 juillet.

Villain L., Anzueto F., Hernandez A. et Sarah J.L., 1999. Los nematodos parasitos del cafeto. In : «Desafios de la caficultura centroamericana». Bertrand B. et Rapidel B. (Eds). IICA/PROMECAFE-CIRAD-IRD-CCCR/Francia, San José, 405-456.

Villain L., Molina A., Sierra S., Decazy B. et Sarah J.L., 2000. Effect of grafting and nematicide treatments on damage by root-lesions nematodes (*Pratylenchus* spp.) to *Coffea arabica* L. in Guatemala. *Nematropica*, **30** : 87-100.

Wang M. et Goldman I.L., 1996. Resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne hapla* Chitwood) in carrot is controlled by two recessive genes. *The Journal of Heredity*, **87** : 119-123.

Whitehead A.G., 1998. Plant Nematode Control. *CAB international*, 215-225.

Zacheo G., Arrigoni-Liso R., Bleve-Zacheo T., Lamberti F. et Arrigoni O., 1983. Mitochondrial peroxidase and superoxide dismutase activities during the infection by *Meloidogyne incognita* of susceptible and resistant tomato plants. *Nematol. Mediterr.*, **11** : 107-114.

ANNEXES

Annexe 1 : Le Centre Agronomique Tropical de Recherche et d'Enseignement (CATIE).

Annexe 2 : Généalogie des principales variétés dérivées de l'Hybride de Timor.

Annexe 3 : Principales espèces de nématodes à galles observées sur racines de *C. arabica* en Amérique Latine.

Annexe 4 : *Meloidogyne* sp.

Annexe 5 : Solution nutritive HOAGLAND.

Annexe 6 : Extraction des nématodes des racines par la méthode « Macération-Filtration ».

Annexe 7 : Données de l'évaluation de la germination et du développement des plantules (8 stades) de cv. IAPAR59 et cv. Caturra, pour 5 dates de semis et 2 milieux de culture (essai I).

Annexe 8 : Comparaison des méthodes d'extraction des nématodes.

Annexe 9 : Relations entre l'Indice de galles, le nombre de galles et le nombre de nématodes.

Annexe 10 : Comportement du nématode sur des caféiers résistants et sensibles.

Annexe 11 : Influence de l'âge des plants sur le développement de *M. exigua*.

Annexe 12 : Influence de l'âge des plants sur l'expression de la résistance.

Annexe 1 : Le Centre Agronomique Tropical de Recherche et d'Enseignement (CATIE)

• Présentation générale

Le CATIE est situé à 3 km du centre de la ville de Turrialba et à 64 km à l'est de San José, capitale du Costa Rica. C'est une association civile à but non lucratif, d'actions régionales, de caractère international et ayant des fonctions de recherche et d'enseignement. La mission du CATIE est d'améliorer le bien être de l'humanité au moyen de la recherche scientifique et de l'enseignement de « postgrado » (3^e cycle) appliqués au développement, à la conservation et à l'usage durable des ressources naturelles. Sa philosophie est de « produire en conservant et conserver en produisant », c'est à dire trouver un équilibre entre produire en respectant l'environnement et produire des biens et services qui amélioreront la qualité de vie des hommes.

• Historique

En mai 1940, au cours du VIII Congrès Scientifique Américain à Washington DC, est proposée la création d'une institution interaméricaine pour l'agriculture tropicale afin d'aider les pays à travers des recherches agronomiques et la formation de personnel national. C'est ainsi que fut créé, en décembre 1942, l'Institut Interaméricain des Sciences Agricoles (IICA) établi au Costa Rica.

En juillet 1973, un accord entre l'IICA et le gouvernement du Costa Rica a entraîné la création du CATIE dont les membres réguliers sont l'IICA, le Belize, la Bolivie, la Colombie, le Costa Rica, le Salvador, le Guatemala, l'Honduras, le Mexique, le Nicaragua, le Panama, la République Dominicaine et le Venezuela.

• Organisation

Le CATIE est dirigé par un Directeur Général désigné par le Comité Directeur et ratifié par le Conseil Supérieur, pour une période de 4 ans, renouvelable une fois. Il est responsable de la direction et de l'administration de l'institution tout en étant supervisé par le Comité Directeur. Le Directeur Général actuel est Monsieur Pedro Ferreira Rossi, de nationalité uruguayenne, nommé en 1999. Le Conseil Supérieur est composé des vices ministres de l'Agriculture des 12 pays adhérents ainsi que d'un représentant de l'IICA.

Le porte feuille thématique du CATIE est ajusté périodiquement afin de répondre aux priorités de ses pays membres. Afin d'agir de manière rapide et efficace, les efforts sont regroupés en trois piliers fondamentaux :

- L'éducation, par la formation de cadres impliqués dans la conservation et la protection des ressources naturelles en Amérique latine. Créée en 1942, l'école de « Posgrado » fut la première en Amérique latine. Elle regroupe cinq « Maestria » (équivalent à la Maîtrise) et trois doctorats.

Les formations proposées par l'école de « Posgrado » du CATIE

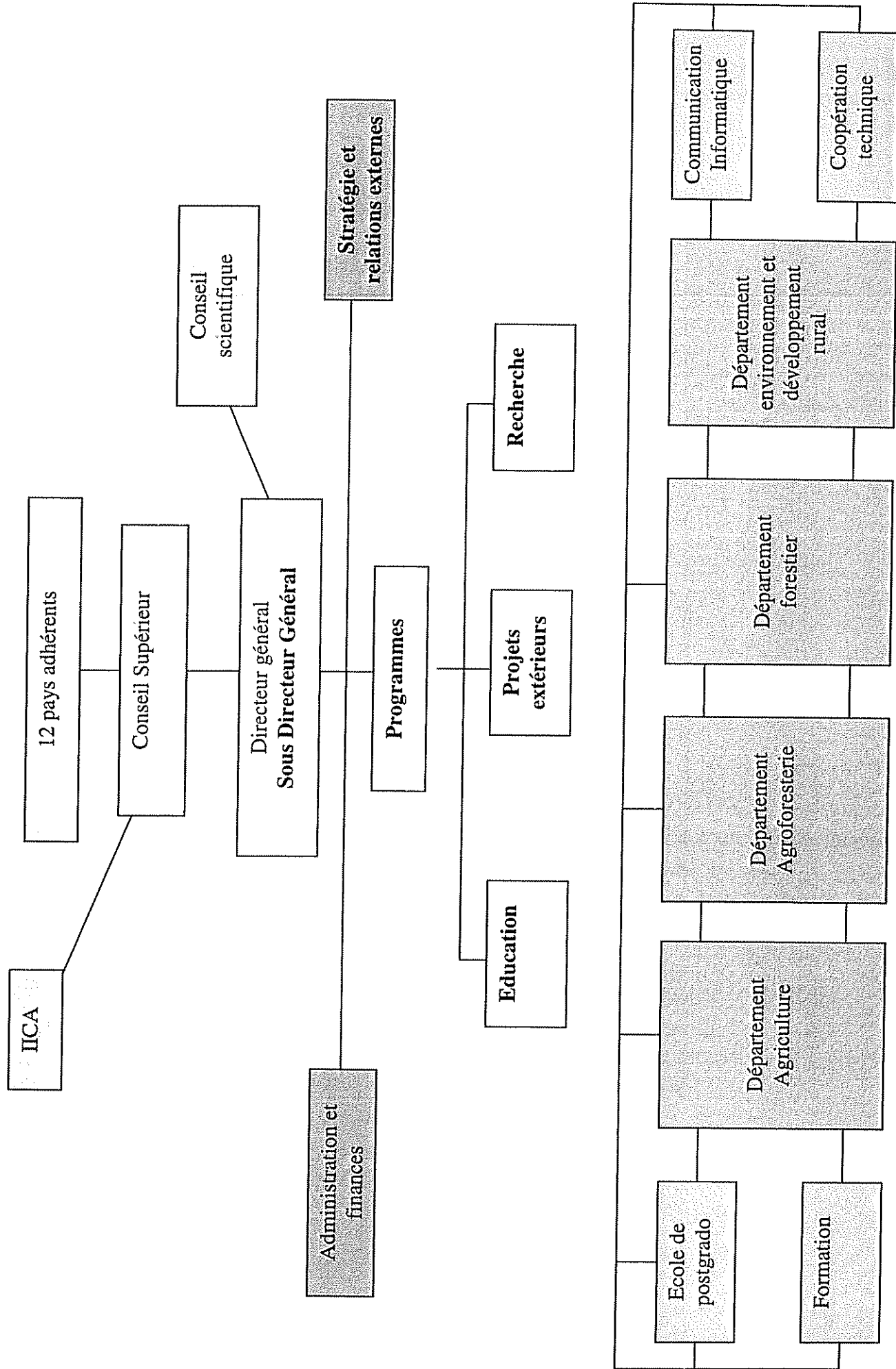
- Maîtrise et doctorat en Agroforesterie Tropicale.
- Maîtrise en Gestion Intégrée de l'Eau.
- Maîtrise et doctorat en Gestion des Forêts et Biodiversité.
- Maîtrise et doctorat en Agriculture Tropicale.
- Maîtrise en Environnement.

- La recherche, avec 50 professionnels titulaires d'un doctorat et 90 autres d'une « Maestria », spécialisés en divers domaines : ressources génétiques, agriculture tropicale, environnement, ressources naturelles, agroforesterie et forêts.
- Les projets de développement, afin d'agir directement (sur le terrain) dans les différents pays. Ces projets constituent une grande opportunité pour le transfert de technologies et bénéficient de l'appui des organisations nationales et locales.

Administrativement, les activités de recherche, formation et valorisation sont réalisées au sein de quatre départements :

- Agriculture Tropicale,
- Agroforesterie,
- Forêts,
- Environnement et Développement rural.

Organigramme du CATIE



- **Thèmes de recherche**

L'objectif du programme de recherche du CATIE est de contribuer au bien être de la société, en générant et en validant des pratiques technologiques favorables à la production agricole et à la préservation des ressources naturelles. De plus, ces pratiques doivent être économiquement viables, culturellement et socialement acceptables et durables.

- Amélioration et Conservation du patrimoine génétique de cultures agricoles et d'espèces forestières.
- Lutte intégrée contre les maladies en agroforesterie et en foresterie.
- Systèmes agroforestiers.
- Développement de technologies pour la conduite durable des forêts.
- Valorisation et analyse socio-économique de systèmes de culture et d'écosystèmes tropicaux.
- Développement d'une méthode de sélection du caféier, assistée par des marqueurs moléculaires.

- **Laboratoires de recherche**

- Systèmes d'Information Géographique (CATIESIG).
- Phytoprotection
- Analyse de sols, tissus végétaux et eau.
- Nutrition Animale.
- Collections variétales et banque de graines forestières.
- Biotechnologies.

- **Présentation du laboratoire de Biotechnologie**

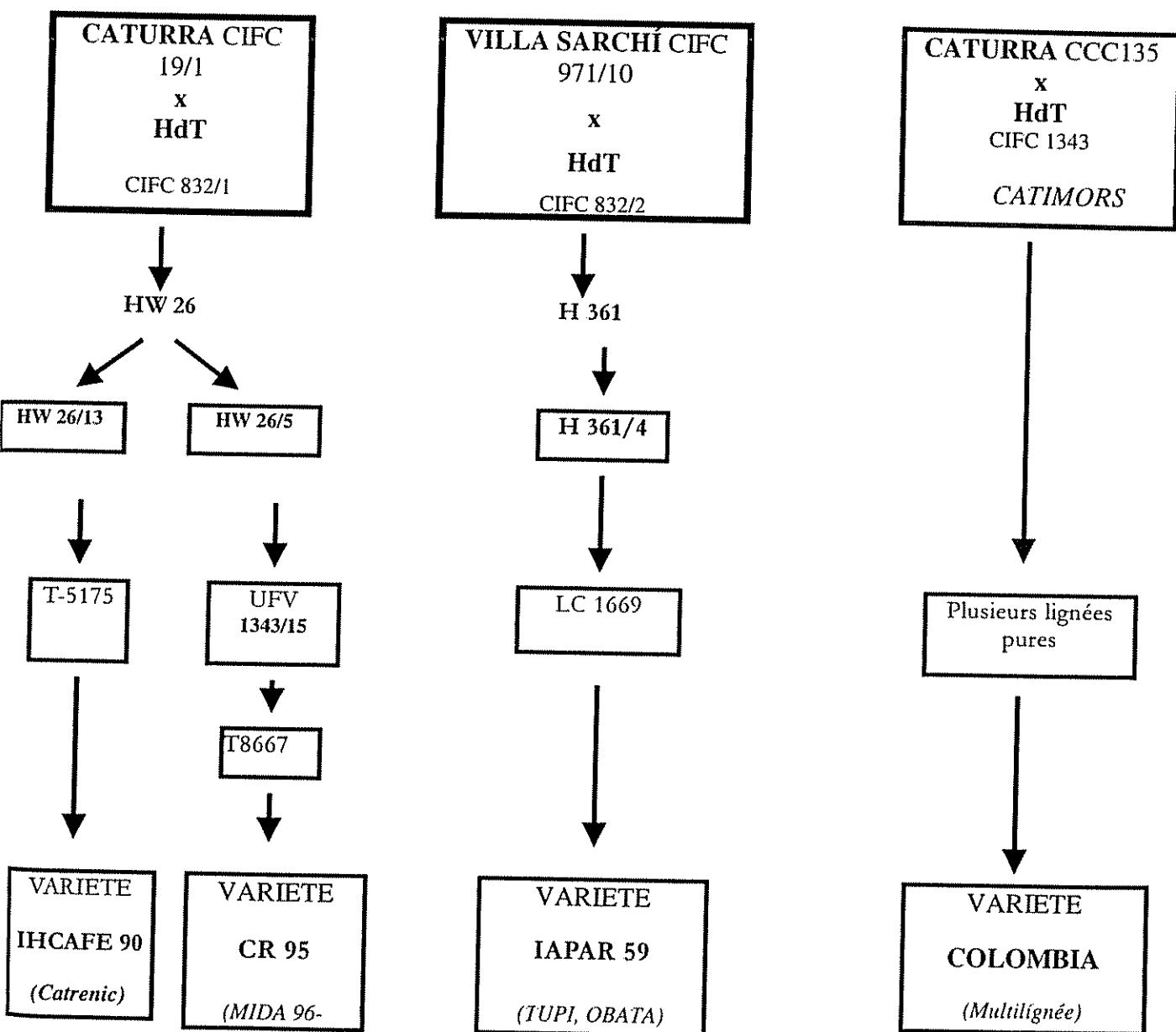
Le laboratoire de biotechnologie emploie 7 chercheurs, 15 assistants et 4 à 6 étudiants de « Maestria » en Agriculture Tropicale. Les recherches sont organisées autour de trois thèmes principaux :

- la caractérisation : des ressources génétiques de caféier et leur valorisation dans le programme régional d'amélioration, et de l'acajou (*Swietenia spp*) pour sa conservation et son amélioration.
- la propagation : micro propagation massale de géotypes élites de caféier et développement de systèmes de régénération cellulaire de l'acajou).
- l'amélioration génétique : amélioration de la banane et banane plantin, et développement d'une méthode de sélection assistée par des marqueurs moléculaires sur le café.

Le laboratoire de biotechnologie est divisé en quatre unités :

- Biologie moléculaire : utilisation des marqueurs moléculaires (RAPD, AFLP, SSR),
- Culture *in vitro* : micro-propagation, cryoconservation et transformation génétique,
- Histologie et morphologie,
- Nématologie.

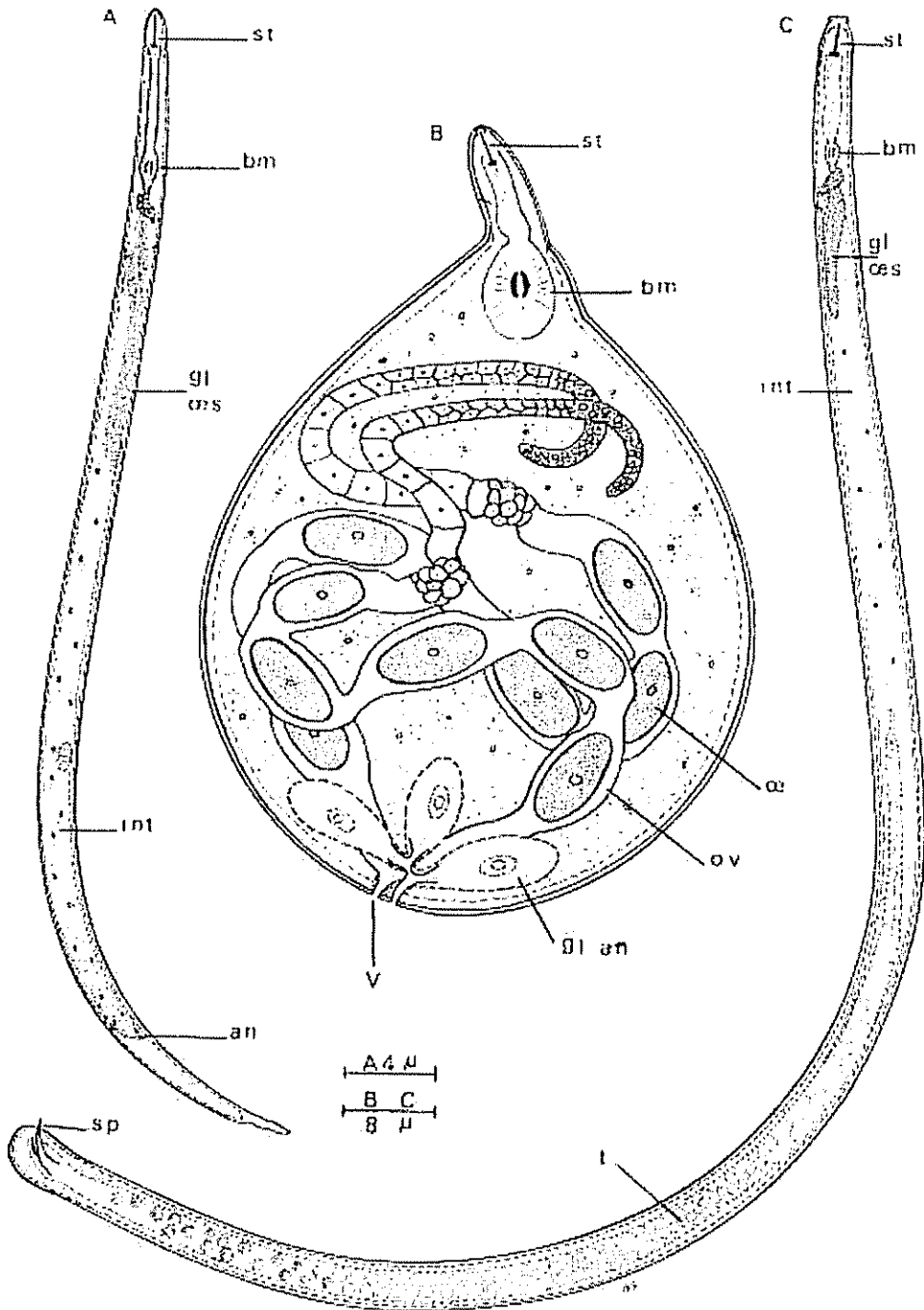
Annexe 2 : Généalogie des principales variétés dérivées de l'Hybride de Timor (Bertrand, 2002)



Annexe 3 : Principales espèces de nématodes à galles observées sur racines de *C. arabica* en Amérique Latine (Bertrand, 2002). La nature des symptômes et la sévérité des dégâts qu'ils occasionnent sont indiquées selon une échelle de 1 à 4 : 1 = présence de galles et baisse de production de 0-15 % ; 2 = présence de galles, nécrose et affaiblissement généralisé de l'arbre avec cas de mortalité; 3 = nécroses, mortalité de l'arbre ; 4 = présence de galles + racines liégeuses (corchosis), affaiblissement généralisé de l'arbre avec cas de mortalité.

Espèces de Meloidogyne	Pays	Types de symptômes	Présence de pathogènes associés aux symptômes	Références
<i>M. exigua</i>	Costa-Rica, Nicaragua, Honduras, Colombie, Venezuela, Brésil	1	<i>Rhizoctonia solanii</i>	Hernández (1997), Lordello (1972), Flores et López (1989), Esbenshade et Triantaphyllou (1985)
<i>M. incognita</i>	Brésil, Salvador, Puerto Rico	2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Negron et Acosta (1989), Esbenshade et Triantaphyllou (1985), Hernández (1997)
<i>M. arenaria</i>	Salvador	2		Hernandez (1997)
<i>Meloidogyne spp.</i>	Brésil, Guatemala, Salvador	2		Hernandez (1997), Esbenshade et Triantaphyllou (1985), Anzueto (1993)
<i>M. coffeicola</i>	Brésil	3		Lordello (1972)
<i>M. konanensis</i>	Hawaï	4	Suspectée	Eisenback <i>et al.</i> (1994)
<i>M. arabicida</i>	Costa Rica	4	<i>Fusarium oxysporum</i>	Bertrand <i>et al.</i> (2000), López & Salazar (1989), Hernández (1997)
<i>M. paranaensis</i>	Brésil	4	Suspectée	Carneiro (1996)

Annexe 4 : Morphologie des nématodes du genre *Meloidogyne* sp. (De Guiran et Netscher, 1970)



A : larve de deuxième stade (stade libre) ; B : femelle adulte ; C : mâle adulte. an. anus, bm. bulbe médian de l'œsophage, gl.an. glandes anales, gl.oes. glande basale de l'œsophage, int. intestin, oe. œuf, ov. ovaire, sp. spicules sopolateurs, st. stylet, t. testicules, v. vulve.

Les **larves de deuxième stade** sont vermiformes, pointues à l'extrémité postérieure, d'une longueur variant de 0.3 à 0.5 mm et d'environ 10 μ de diamètre. Leur cavité générale est occupée presque totalement par le système digestif qui comprend la bouche, s'ouvrant à l'extrémité antérieure, l'œsophage occupant environ le 1/3 antérieur du corps, puis l'intestin débouchant dans le rectum qui s'ouvre à l'extérieur par l'anus, situé à peu de distance de l'extrémité postérieure. La bouche contient un stylet creux protractile qui sert à percer les cellules végétales. L'œsophage est traversé par un canal relié en avant au stylet et débouchant en arrière dans l'intestin. Il comprend d'avant en arrière : un bulbe médian muscularisé et muni d'une valve, et une partie basale glandulaire. Cette dernière renferme trois glandes : une glande dorsale débouchant en arrière du stylet et deux glandes subventrales débouchant derrière la valve du bulbe médian. Aux deux tiers de la longueur se trouve un primordium génital composé de deux cellules.

Les **femelles** sont pyriformes à sphériques, longues de 500 à 1200 μ et larges de 300 à 600 μ (sauf *M. brevicauda* qui dépasse largement ces dimensions). La plus grande partie du corps est occupée par les deux ovaires qui débouchent dans le vagin. Dans la partie postérieure six glandes se sont développées qui débouchent dans le rectum. Ces glandes produisent la substance gélatineuse dans laquelle les œufs sont englobés et qui est émise par l'anus.

Les **males** sont vermiformes, longs de 0.8 à 2 mm, avec une queue arrondie. Ils renferment un ou deux testicules débouchant avec l'intestin dans un cloaque ou se trouvent deux spicules, organes copulateurs qui font saillie à l'extérieur. Ils possèdent un stylet mais il est probable qu'il ne soit pas fonctionnel et que les males ne se nourrissent pas, mais vivent sur les réserves contenues dans la paroi de leur intestin.

Annexe 5 : Solution nutritive HOAGLAND

Solutions mères (pour 1 litre de solution) :

H1 : $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$ ou $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}, 4 \text{H}_2\text{O}$: (590 g)	grammes 410 qsp 1000 ml H_2O
H2 : KNO_3	252,50 qsp 1000 ml H_2O
H3 : Mg SO_4 ou $\text{Mg SO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$: (246 g)	120 qsp 1000 ml H_2O
H4 : KH_2PO_4	68 qsp 1000 ml H_2O
	pH 5.8

Prendre 20 ml de ces solutions pour 10 litres de solution nutritive prête à l'emploi.

Annexe 6 : Extraction des nématodes des racines par la méthode de « Macération-Filtration » (Fallis, 1943 ; Stemerding, 1964)

Les racines des plantes sont lavées à l'eau courante, coupées (1 ou 2 cm) puis broyées dans un mixeur (10 s) avec 150 ml d'eau.

La mixture est déposée sur un ensemble comprenant 2 kleenex humides posés sur un filtre, le tout contenu dans une cuvette. Les nématodes migrent des racines vers l'eau contenue au fond de la cuvette.

Deux à dix jours après, l'eau recueillie est passée sur un ensemble de 4 tamis : 1 de 250 μm (élimination de la terre et des débris végétaux) et 3 de 53 μm . Les nématodes sont récupérés après rinçage des 3 tamis de 53 μm .

Cette méthode est utilisée uniquement pour la préparation d'inoculum de *M. exigua*.

Annexe 7 : Données de l'évaluation de la germination et du développement des plantules (8 stades) de cv. IAPAR et cv. Caturra, pour 5 dates de semis et 2 milieux de culture (essai 1)

a : Evaluation du 18/04/02

Date semi	Variétés	Substrats	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	Tx germ
17/01/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	9	6	4	2	0	0	0	21	0,70
17/01/2002	IAPAR	SABLE	0	5	1	0	0	0	0	0	6	0,20
17/01/2002	CATURA	3/4 1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
17/01/2002	CATURA	SABLE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
27/01/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	8	14	0	0	0	0	0	22	0,73
27/01/2002	IAPAR	SABLE	0	18	2	0	0	0	0	0	20	0,67
27/01/2002	CATURA	3/4 1/4	0	2	8	12	8	0	0	0	30	1,00
27/01/2002	CATURA	SABLE	0	11	5	2	8	0	0	0	26	0,87
02/04/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	12	3	0	0	0	0	0	15	0,50
02/04/2002	IAPAR	SABLE	0	16	1	0	0	0	0	0	17	0,57
02/04/2002	CATURA	3/4 1/4	0	3	18	6	0	0	0	0	27	0,90
02/04/2002	CATURA	SABLE	0	3	22	3	0	0	0	0	28	0,93
14/02/2002	IAPAR	3/4 1/4	2	18	0	0	0	0	0	0	20	0,67
14/02/2002	IAPAR	SABLE	5	10	0	0	0	0	0	0	15	0,50
14/02/2002	CATURA	3/4 1/4	2	23	1	0	0	0	0	0	26	0,87
14/02/2002	CATURA	SABLE	0	16	9	0	0	0	0	0	25	0,83
25/02/2002	IAPAR	3/4 1/4	2	6	0	0	0	0	0	0	8	0,27
25/02/2002	IAPAR	SABLE	2	9	0	0	0	0	0	0	11	0,37
25/02/2002	CATURA	3/4 1/4	4	20	0	0	0	0	0	0	24	0,80
25/02/2002	CATURA	SABLE	6	18	0	0	0	0	0	0	24	0,80

b : Evaluation du 15/05/2002

Date semi	Variétés	Substrats	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	Tx germ
17/01/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	1	6	0	2	5	8	0	22	0,73
17/01/2002	IAPAR	SABLE	0	2	2	0	0	0	0	0	4	0,13
17/01/2002	CATURA	3/4 1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
17/01/2002	CATURA	SABLE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
27/01/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	0	2	1	9	3	2	0	17	0,57
27/01/2002	IAPAR	SABLE	0	3	14	1	2	0	0	0	20	0,67
27/01/2002	CATURA	3/4 1/4	0	0	9	0	11	0	3	0	23	0,77
27/01/2002	CATURA	SABLE	0	1	0	0	1	0	28	0	30	1,00
02/04/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	4	2	1	7	2	0	0	16	0,53
02/04/2002	IAPAR	SABLE	0	8	13	0	1	0	0	0	22	0,73
02/04/2002	CATURA	3/4 1/4	0	0	0	2	4	2	20	0	28	0,93
02/04/2002	CATURA	SABLE	0	2	6	0	13	0	0	0	21	0,70
14/02/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	6	7	0	3	0	0	0	16	0,53
14/02/2002	IAPAR	SABLE	0	7	9	1	0	0	0	0	17	0,57
14/02/2002	CATURA	3/4 1/4	0	4	6	1	8	1	1	0	21	0,70
14/02/2002	CATURA	SABLE	0	1	8	2	12	0	0	0	23	0,77
25/02/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	6	8	0	0	0	0	0	14	0,47
25/02/2002	IAPAR	SABLE	0	8	8	0	0	0	0	0	16	0,53
25/02/2002	CATURA	3/4 1/4	2	5	11	7	0	0	0	0	25	0,83
25/02/2002	CATURA	SABLE	0	0	23	0	0	0	0	0	23	0,77

c : Evaluation du 11/06/02

Date semi	Variétés	Substrats	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	Tx germ
17/01/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	1	0	0	0	0	13	3	17	0,57
17/01/2002	IAPAR	SABLE	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0,10
17/01/2002	CATURA	3/4 1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
17/01/2002	CATURA	SABLE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
27/01/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	0	0	0	0	3	20	0	23	0,77
27/01/2002	IAPAR	SABLE	0	4	5	0	6	0	0	0	15	0,50
27/01/2002	CATURA	3/4 1/4	0	0	0	0	0	0	6	23	29	0,97
27/01/2002	CATURA	SABLE	0	0	5	0	8	5	0	0	18	0,60
02/04/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	0	0	0	1	3	11	0	15	0,50
02/04/2002	IAPAR	SABLE	0	8	7	0	4	0	0	0	19	0,63
02/04/2002	CATURA	3/4 1/4	0	0	0	0	0	0	13	15	28	0,93
02/04/2002	CATURA	SABLE	0	1	5	0	10	0	3	0	19	0,63
14/02/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	3	2	0	2	2	8	0	17	0,57
14/02/2002	IAPAR	SABLE	0	3	5	0	7	2	0	0	17	0,57
14/02/2002	CATURA	3/4 1/4	0	0	3	0	2	4	12	0	21	0,70
14/02/2002	CATURA	SABLE	0	1	6	0	6	3	9	0	25	0,83
25/02/2002	IAPAR	3/4 1/4	0	5	0	0	5	5	1	0	16	0,53
25/02/2002	IAPAR	SABLE	0	5	8	1	2	0	0	0	16	0,53
25/02/2002	CATURA	3/4 1/4	1	5	0	0	4	3	12	0	25	0,83
25/02/2002	CATURA	SABLE	0	1	11	0	11	0	0	0	23	0,77

Annexe 8 : Comparaison des méthodes d'extraction des nématodes (essai 2)

a: Plantes de IAPAR59 possédant un IG 1 ou 2

plantes	nem/g MS nébu.	Taux mult. nébu	nem/g MS hypo.	Taux mult. hypo
I1	640	000	333	0,05
I2	1419	000	114	0,02
I3	3229	0 01	167	0,02
I4	1175	000	20	0,00
I5	3650	000	120	0,01
I6	6680	0 01	67	0,01
I7	5440	0 01	36	0,01
I8	543	000	80	0,02
I9	3800	0 01	60	0,01
I10	1382	000	43	0,01
I11	320	000	133	0,02
I12	80	000	80	0,01
I13	8529	0 03	53	0,02
I14	4250	0 01	0	0,00

b : Plantes de Caturra possédant un IG 3

plantes	nem/g MS nébu.	Taux mult. nébu	nem/g MS hypo.	Taux mult. hypo
C1	15583	0 01	133	0,010
C2	37538	0 06	67	0,014
C3	18000	0 02	57	0,010
C4	41348	0 05	425	0,081
C5	5824	0 01	73	0,019
C6	28000	0 03	160	0,038
C7	54250	0 04	200	0,019
C8	58851	0 07	29	0,005
C9	12622	0 01	100	0,014
C10	13560	0 03	133	0,038
C11	20031	0 03	3286	0,548
C12	3831	0 01	329	0,110
C13	24069	0 03	229	0,038
C14	7964	0 02	80	0,029

c : Plantes F2 possédant un IG 5

plantes	nem/g MS nebu	Taux mult. nébu	nem/g MS hypo	Taux mult. hypo
1	17750	0 03	3200	1,51
4	28144	0 06	5171	3,20
19	38565	0 07	4377	1,42
22	41850	0 05	19102	6,61
32	30357	0 05	8429	2,78
45	11907	0 01	8027	2,83
46	25979	0 06	3621	1,62
57	17903	0 03	5320	2,58
58	46895	0 02	15263	1,36
64	15020	0 02	5901	2,80
68	17534	0 01	2674	1,21
72	17867	0 01	3644	0,77
73	23016	0 03	14571	4,32
76	29736	0 04	2890	1,54

Annexe 9 : Relations entre IG, NG et nombre de nématodes (essai 3)

plantes	IG	nb galles	R1 nem/g MS	R2 nem/g MS	R1+R2 nem/g MS
5	2	8	2884	2132	5016
6	2	5	736	712	1448
7	2	9	1283	2353	3636
16	2	4	2971	4914	7886
23	2	8	5506	5118	10624
30	2	10	4859	2600	7459
32	2	4	1217	2203	3420
33	2	8	933	2124	3057
40	2	4	560	3416	3975
48	2	9	2203	3919	6122
53	2	9	5000	8000	13000
54	2	10	6708	7584	14292
58	2	8	1199	1222	2421
59	2	6	1799	2138	3937
66	2	7	4086	2800	6886
84	2	4	5371	2829	8200
87	2	8	1580	2605	4185
98	2	8	19867	15600	35467
108	2	3	1708	1969	3677
109	2	9	1091	1974	3065
110	2	5	4165	1651	5817
28	2	5	1458	4955	6413
40	2	5	4933	6044	10978
70	2	10	4552	1848	6400
174	2	5	683	1600	2283
175	2	8	560	1980	2540
87	2	5	1946	3211	5156
111	2	8	3255	3503	6759
118	2	10	2155	6097	8252
177	2	8	3284	4776	8060
1	3	26	6680	1117	7797
12	3	22	3576	1697	5273
18	3	15	4513	2625	7138
21	3	14	9785	10800	20585
26	3	25	4085	2255	6340
31	3	13	3575	2388	5963
38	3	16	4780	3729	8508
43	3	15	6388	5600	11988
44	3	20	5656	5188	10844
46	3	13	11280	17520	28800
51	3	26	8524	5021	13545
55	3	11	6032	2168	8200
61	3	23	9791	6391	16183
62	3	18	9343	3486	12829
65	3	25	8354	3108	11462
68	3	22	15211	3447	18658
73	3	18	18913	5757	24670
74	3	18	10969	2938	13907
79	3	20	7900	3975	11875
83	3	23	4961	6047	11008

plantes	IG	nb galles	R1 nem/g MS	R2 nem/g MS	R1+R2 nem/g MS
85	3	19	15172	7172	22345
97	3	24	9727	7519	17246
100	3	19	3750	6518	10268
101	3	18	5789	2674	8463
103	3	25	7490	2148	9638
104	3	14	4033	2350	6383
105	3	15	3812	4424	8235
106	3	20	11571	15771	27343
111	3	14	9467	6920	16387
3	3	22	640	449	1088
4	4	54	5473	3570	9042
5	4	44	16175	4069	20244
8	4	46	8009	6614	14623
13	4	68	3396	2596	5992
14	4	35	9809	12817	22626
16	4	55	18373	17360	35733
17	4	83	5956	9911	15867
20	4	43	4357	3308	7665
22	4	83	1000	1145	2145
23	4	60	20350	18200	38550
24	4	45	14127	9591	23718
25	4	80	9640	4547	14187
27	4	90	10980	9100	20080
28	4	65	8250	5846	14096
30	4	88	5105	2526	7632
31	4	80	2369	1252	3621
32	4	90	47176	34235	81412
33	4	42	11832	8484	20316
34	4	62	5653	4800	10453
35	4	47	20000	11093	31093
37	4	45	20133	25760	45893
38	4	55	4142	1688	5831
39	4	47	7629	4166	11794
42	4	50	3540	2604	6145
44	4	36	12181	7916	20096
45	4	78	6170	3491	9661
46	4	85	9531	5456	14988
50	4	80	4185	1733	5919
75	4	45	6508	2673	9181
112	4	75	12813	6838	19650
13	5	>100	7893	13814	21707
17	5	>100	20514	4682	25196
30	5	>100	121377	93623	215000
50	5	>100	32315	19630	51944
59	5	>100	58791	44186	102977
63	5	>100	16709	6245	22954
95	5	>100	41258	22390	63648
121	5	>100	8800	6240	15040
166	5	>100	16787	12911	29697
176	5	>100	5788	5030	10818
2	5	>100	3426	3061	6487
10	5	>100	8829	4639	13468
15	5	>100	27756	9974	37731
19	5	>100	7545	2927	10473
21	5	>100	9096	10231	19327

plantes	IG	nb galls	R1 nem/g MS	R2 nem/g MS	R1+R2 nem/g MS
29	5	>100	8106	6723	14830
40	5	>100	4231	6985	11215
49	5	>100	26500	14533	41033

Annexe 10 : Comportement du nématode sur des caféiers résistants et sensibles

Date = nombre de jours après inoculation, Nombre de juvéniles = nombre total observé.

- Essai 4

Date d'inoculation : 1/05/02, Données résultants de l'observation de 3 apex racinaires.

Plantes cv. IAPAR

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+5	absence	0	0	absence
T+7	absence	6 dans cortex racinaire	0	absence
T+8	absence	1 dans cortex racinaire	0	absence
T+9	absence	0	0	absence
T+12	absence	4 dans pivot central	0	absence
T+15	absence	12 dans cortex racinaire	0	absence
T+22	absence	0	0	absence
T+23	absence	0	0	absence

Plantes cv. CATURRA

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+5	absence	13 dans cortex racinaire	0	absence
T+7	absence	1 dans cortex racinaire	0	absence
T+8	absence	27 au niveau du cortex d'un apex racinaire	0	absence
T+9	absence	6 au niveau du cortex d'un apex racinaire	0	absence
T+12	absence	35 au niveau du cortex d'un apex racinaire, 3 pivot central	0	absence
T+15	présence	4 au niveau du cortex d'un apex racinaire	9 au niveau galles	absence
T+22	présence	0	10 au niveau galles	absence
T+23	présence	0	3 au niveau galles	absence

Date d'inoculation : 10/05/02

Données résultants de l'observation de 3 apex racinaires.

Plantes cv. IAPAR

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées	Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+5	absence	environ 20 juvéniles au niveau de chaque apex	0	présence	T+17	début de renflement	0	0	absence
T+6	absence	1 avec la tete dans le cylindre central	0	présence	T+19	petites galles	0	0	absence
T+10	absence	2 au niveau apex	0	présence	T+24	petites galles	0	0	présence
T+11	absence	0	0	absence	T+32	petites galles	5	0	absence
T+12	absence	0	0	absence	T+53	petites galles	0	0	absence
T+13	début de renflement	2 au niveau des renflements	0	présence					
T+14	début de renflement	0	1 stade renflé	absence					

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées	Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+5	absence	environ 30 par apex	0	absence	T+17	présence	0	1 bien gonflée	absence
T+6	absence	environ 15 par apex	0	absence	T+19	présence	1 dans cylindre central	0	absence
T+10	absence	environ 50 par apex	5 femelles (début grossissement)	absence	T+24	présence	5 dans cylindre central 8 dans cortex	5 en grossissement	absence
T+11	présence	8 dans 1 galle	0	absence	T+32	présence	0	excroissance en périphérie des galles ou masse d'œufs ?	absence
T+12	présence	environ 30 par galle	0	absence	T+53	présence	10	plusieurs femelles et masses d'œufs	absence
T+13	présence	0	environ 10 par galle	absence					
T+14	présence	0	plusieurs femelles au stade renflé, 20/galles	absence					

Fixation de 3 apex racinaires aux dates suivantes : T+5, +6, +10, +11, +12, +13, +14, +17, +19.

Date d'inoculation : 17/05/02

Données résultants de l'observation de 3 apex racinaires.

Plantes cv. IAPAR

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées	Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+4	absence	2 dans 1 apex	0	absence	T+17	présence	5 dans apex 5 dans cortex	2	présence
T+5	absence	environ 10 par apex	0	absence	T+21	petites galles	0	0	absence
T+6	absence	0	0	absence	T+24	petites galles	1 apex	0	présence
T+7	absence	0	0	absence	T+25	petites galles	0	0	absence
T+10	début de renflement	3	0	présence	T+46	petites galles	0	1	absence
T+12	présence	0	0	absence					
T+13	présence	0		absence					

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées	Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+4	absence	3	0	absence	T+17	présence	2 cylindre central 2 cortex	0	absence
T+5	absence	10/apex	0	absence	T+21	présence	30 dans apex	2	absence
T+6	absence	0	0	absence	T+24	présence	0	1	absence
T+7	présence	0	0	absence	T+25	présence	0	17 femelles	absence
T+10	présence	15/apex	0	absence	T+46	présence	0	plusieurs femelles et masses d'œufs	absence
T+12	présence	0	0	absence					
T+13	présence	5	0	absence					

Fixation de trois apex racinaires aux dates suivantes : T+4, +5, +6, +7, +10, +12, +13, +14.

- Essai 7

Date d'inoculation : 31/05/02

Données résultants de l'observation de 3 apex racinaires.

Coffea canephora

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+3	absence	6 dans tissu cortical	0	absence
T+4	absence	1 dans tissu cortical 1 dans cylindre central	0	absence
T+7	début renflement	3 dans apex	0	absence
T+10	début renflement	0	0	absence
T+11	début renflement	1	0	absence
T+32	petites galles	0	5 femelles renflées	absence

Fixation de 3 apex racinaires à T+5.

Annexe 11 : Influence de l'âge des plants sur le développement de *M. exigua*

Observations cytologiques suite à une coloration à la fuschine acide (essai 1)

Date d'inoculation : 17/06/02

cv. IAPAR, Stade cotylédonaire (1)

Données résultants de l'observation de 5 apex racinaires.

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+3	absence	0	0	absence
T+5	absence	0	0	absence
T+6	absence	0	0	absence
T+7	début renflement	0	0	absence
T+10	absence	0	0	absence
T+11	absence	0	0	absence
T+14	absence	0	0	absence
T+18	absence	0	0	absence
T+25	absence	0	0	absence
T+29	absence	0	0	absence

cv. IAPAR, 1 paire de feuilles (2)

Données résultants de l'observation de 8 apex racinaires.

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+3	absence	2 dans cortex	0	absence
T+5	absence	0	0	absence
T+6	petites galles	3 dans apex	0	présence
T+7	petites galles	0	0	absence
T+10	absence	0	0	absence
T+11	petites galles	1	0	absence
T+14	présence	0	0	absence
T+18	petites galles	0	0	absence
T+25	petites galles	0	0	absence
T+29	petites galles	0	3 (masses œufs)	absence

Date d'inoculation : 17/06/02

cv. IAPAR, 2 paires feuilles (3)

Données résultants de l'observation de 8 apex racinaires.

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+3	absence	2 dans cortex	0	absence
T+5	absence	0	0	absence
T+6	absence	0	0	absence
T+7	début renflement	0	0	absence
T+10	absence	0	0	absence
T+11	petites galles	1 dans apex	1	absence
T+14	petites galles	0	0	absence
T+18	petites galles	5 dans cortex	0	présence
T+25	petites galles	0	1	présence
T+29	petites galles	0	8	absence

cv. IAPAR, 3 paires feuilles (4)

Données résultants de l'observation de 8 apex racinaires

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+3	absence	0	0	absence
T+5	absence	0	0	absence
T+6	absence	0	0	absence
T+7	début renflement	0	0	absence
T+10	petites galles	11 dans apex	0	présence
T+11	présence	1 dans apex	0	absence
T+14	absence	0	0	absence
T+18	petites galles	0	0	absence
T+25	petites galles	0	0	absence
T+29	petites galles	0	0	absence

Date d'inoculation : 17/06/02

cv. CATURRA, Stade cotylédonaire (1)

Données résultants de l'observation de 5 apex racinaires.

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+3	absence	1 cylindre central	0	absence
T+5	présence	2 cylindre central	0	absence
T+6	absence	0	0	absence
T+7	petites galles	0	0	absence
T+10	absence	1 dans cortex	0	absence
T+11	absence	0	0	absence
T+14	absence	0	0	absence
T+18	absence	2 dans cortex	0	absence
T+25	absence	0	0	absence
T+29	absence	1	0	absence

cv. CATURRA, 1 paire de feuilles (2)

Données résultants de l'observation de 8 apex racinaires.

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+3	absence	0	0	absence
T+5	présence	0	0	absence
T+6	présence	8 dans apex	0	absence
T+7	présence	36 dans apex	0	absence
T+10	présence	13 dans apex	1	absence
T+11	présence	12	1	absence
T+14	présence	15	24 + œufs	absence
T+18	présence	2 dans cortex	2	absence
T+25	présence	7	0	absence
T+29	présence	3	5 (masses œufs)	absence

Date d'inoculation : 17/06/02

cv. CATURRA, 2 paires feuilles (3)

Données résultants de l'observation de 8 apex racinaires.

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+3	petites galles	9 dans apex	0	absence
T+5	présence	1 dans cortex	0	absence
T+6	présence	1 dans apex	0	absence
T+7	présence	27 dans apex	0	absence
T+10	présence	13 dans apex	0	absence
T+11	présence	7 dans apex	0	absence
T+14	présence	10	10	absence
T+18	présence	0	2	absence
T+25	présence	1	2	absence
T+29	présence	0	15 (masses œufs)	absence

cv. CATURRA, 3 paires feuilles (4)

Données résultants de l'observation de 8 apex racinaires

Dates	Présence ou absence de galles	Nb juvéniles et situation	Nb de femelles et stade éventuel	Présence ou absence de zones nécrosées
T+3	petites galles	4	0	absence
T+5	petites galles	8 dans apex	0	absence
T+6	présence	3 dans apex	0	absence
T+7	présence	7 dans apex	0	absence
T+10	présence	12 dans apex	0	absence
T+11	présence	3 dans apex	3	absence
T+14	présence	5	3	absence
T+18	présence	5	7	absence
T+25	présence	0	0	absence
T+29	absence	0	0	absence

Annexe 12 : Influence de l'âge des plants sur l'IG et le nombre de nématodes

(essai 1)

numero	type plants	stade physio	nb galles	R2/5 ml	R2/10 ml	MS (g)	nem/g MS
1	I	1	0	0	0	0,02	0
2	I	2	1	44	88	0,06	1467
3	I	2	0	2	4	0,04	100
4	I	2	0	1	2	0,05	40
5	I	2	1	21	42	0,048	875
6	I	2	1	28	56	0,09	622
7	I	2	0	0	0	0,006	0
8	I	2	1	0	0	0,03	0
9	I	2	0	22	44	0,076	579
10	C	2	16	128	256	0,035	7314
11	C	2	6	102	204	0,025	8160
12	C	2	3	5	10	0,02	500
13	C	2	0	16	32	0,02	1600
14	C	2	22	508	1016	0,02	50800
15	C	2	32	1086	2172	0,058	37448
16	C	2	14	502	1004	0,043	23349
17	C	2	0	13	26	0,007	3714
18	I	3	0	3	6	0,031	194
19	I	3	0	66	132	0,04	3300
20	I	3	5	102	204	0,023	8870
21	I	3	0	30	60	0,051	1176
22	I	3	0	3	6	0,037	162
23	I	3	0	0	0	0,02	0
24	I	3	0	94	188	0,048	3917
25	I	3	1	2	4	0,033	121
26	I	3	4	94	188	0,024	7833
27	C	3	12	3	6	0,05	120
28	C	3	12	426	852	0,037	23027
29	C	3	25	436	872	0,031	28129
30	C	3	1	32	64	0,031	2065
31	C	3	24	126	252	0,03	8400
32	C	3	18	66	132	0,063	2095
33	C	3	30	76	152	0,034	4471
34	C	3	28	22	44	0,044	1000

numero	type plants	stade physio	nb galles	R2/5 ml	R2/10 ml	MS (g)	nem/g MS
35	C	3	32	1006	2012	0,05	40240
36	I	4	0	0	0	0,05	0
37	I	4	0	0	0	0,039	0
38	I	4	0	25	50	0,034	1471
39	I	4	0	18	36	0,059	610
40	I	4	7	222	444	0,15	2960
41	I	4	3	76	152	0,11	1382
42	I	4	3	42	84	0,077	1091
43	I	4	0	120	240	0,12	2000
44	C	4	32	214	428	0,15	2853
45	C	4	18	40	80	0,079	1013
46	C	4	10	2	4	0,11	36
47	C	4	6	170	340	0,08	4250
48	C	4	16	158	316	0,1	3160
49	C	4	21	42	84	0,06	1400
50	C	4	4	85	170	0,05	3400
51	C	4	26	1852	3704	0,08	46300
52	C	4	10	135	270	0,087	3103
53	C	4	9	98	196	0,075	2613