

LISTES DES ABREVIATIONS

C.M.I : Commonwealth Mycological Institute

CNRA-BAMBEY : Centre National de Recherches Agronomiques de Bambey

EG : Eau Gélifiée

FAO : Food and Agriculture Organisation

FS10 : Filtrat de la souche S10

ICRISAT: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics

PD: Potato Dextrose

PDA: Potato Dextrose Agar

ROCAFREMI: Réseau Ouest et Centre Africain de Recherche sur le mil

MAAARO : Ministère de L'Agriculture, de L'alimentation et des Affaires Rurales d'Ontario.

UCAD : Université Cheikh Anta Diop de Dakar

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principaux pays producteurs du mil.....	4
Figure 2 : Carte de répartition des cultures céréalières au Sénégal.....	5
Figure 3 : Schéma des phases phénologiques principales.....	7
Figure 4 : Distribution géographique du charbon du mil (<i>M. pénicillariae</i>).....	14
Figure 5 : Cycle d'infection de <i>Moesziomyces pénicillariae</i>	19
Figure 6: Clé de détermination de la sévérité du charbon du mil.....	26
Figure 7 : Inoculation des épis de mil.....	28
Figure 8 : Epi recouvert de sachet en plastique.....	28
Figure 9 : Epi recouvert par du papier Craft.....	28
Figure 10 : Essai d'inoculation du mil par la racine.....	29
Figure 11 : Portion de balles de spores et quelques spores isolées.....	30
Figure 12 : Amas de spores avec une spore en germination.....	31
Figure 13 : Sores formés au niveau des épis de mil.....	33
Figure 14 : Aspects des grains de mil après inoculation de 20 jours.....	35
Figure 15 : Pénétration du champignon dans la racine.....	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Durée des différentes phases de développement de deux variétés de mil pénicillaire	7
Tableau 2 : Résultats des inoculations Test.....	32
Tableau 3 : Résultat des inoculations simples.....	34
Tableau 4 : Résultats des inoculations combinées.....	36

SOMMAIRE

PAGES

Introduction.....	1
I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1. Matériel végétal.....	3
1.1 Historique et distribution géographique.....	3
1.2 Description.....	5
1.2.1 Les tiges.....	8
1.2.2 Les talles.....	8
1.2.3 Les racines.....	8
1.2.4 Les feuilles.....	9
1.2.5 Les épis.....	9
1.2.6 Les graines.....	9
1.3 Ecologie	10
1.4 Utilisation.....	11
1.5 Taxonomie.....	12
2. Matériel fongique.....	13
2.1 Historique et distribution géographique.....	13
2.2 Description.....	15
2.2.1 Les sores.....	15

2.2.2 Les balles de spores.....	16
2.2.3 Les spores.....	16
2.2.4 Les cellules stériles	16
2.2.5 Les sporidies.....	17
2.3 Cycle et mode d'infection.....	17
2.4 Symptômes et dégâts	19
2.5 Méthodes de lutte.....	20
2.6 Taxonomie.....	21
II. MATERIEL ET METHODES.....	23
1. Matériels.....	23
1.1 Matériel végétal.....	23
1.2 Matériel fongique	23
1.3 Milieux de cultures.....	23
2. Méthode.....	24
2.1 Cultures sur lames et germination des spores	24
2.2 Isolement des souches	24
2.3 Essais de conjugaison des souches de <i>M. pénicillariæ</i> en boîte de Pétri.....	25
2.4 Méthodes d'inoculation des épis de mil	25
2.4.1 Test d'agressivités des souches isolées.....	27
2.4.2 Inoculation simple de l'épi à partir des souches choisies.....	27
2.4.3 Inoculation simple de l'épi à partir d'un filtrat de souches de l'inoculum S10.....	27
2.4.4 Inoculation d'épis avec combinaison de souches.....	27
2.5 Méthode d'inoculation par les racines.....	29

III. RESULTATS.....	30
1. Cultures sur lames.....	30
2. Isolement des souches	31
3. Souches compatibles.....	31
4. Résultats des inoculations.....	31
4.1. Agressivité des souches isolées.....	31
4.2. Inoculations simples d'épis à partir des souches choisies.....	34
4.3. Inoculation simple à partir de filtrat de la souche S10.....	34
4.4. Inoculation d'épis avec des combinaisons de souches	36
4.5. Inoculations par les racines.....	37
IV. DISCUSSION.....	38
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	41
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE.....	43

INTRODUCTION

Le mil occupe une place non négligeable dans les cultures céréalières. Les principaux pays producteurs sont l'Inde, le Nigeria, Le Mali, le Burkina Faso, le Sénégal (FAO, 1995 ; 1997).

Au Sénégal, le mil à chandelle est produit dans presque toutes les régions du pays surtout dans le bassin arachidiers (Broutin C. *et al*, 2000). Il est essentiellement cultivé pour l'alimentation mais également peut servir de fourrage, de clôture aussi bien au Sénégal que dans les autres pays du tiers monde. Cependant dans les pays développés, le mil est surtout utilisé pour la nourriture des animaux (FAO, 1997). Et pourtant le grain de mil a une valeur nutritive supérieure à celle du maïs et du sorgho. IL est considéré comme la céréale d'excellence des intellectuels (Lathan M.C., 2001).

Les productions globalement faibles pourraient être plus importantes si le mil n'était pas confronté à un certain nombre de problèmes d'ordre biotique et abiotique.

Parmi les problèmes biotiques, il y'a l'action des ravageurs tels que les insectes mais également à un certain nombres de maladies notamment fongiques comme le mildiou, l'ergot et le charbon du mil, *Moesziomyces penicillarae* initialement *Tolyposporium penicillarae*. Ce charbon est un Basidiomycète de l'ordre des Ustilaginales.

Ce pathogène attaque les ovaires du mil qu'il transforme en sore remplis de spores noirs d'où le nom de charbon du mil attribué à cette maladie. Cette pathologie provoque des baisses assez importantes de rendement. Les baisses ont été estimées à 6.057t en 1986 soit 423.940 millions CFA de pertes chiffrées (CNRA de Bambey, 1986).

Plusieurs études ont été faites sur la morphologie, la biologie, sur les méthodes de lutte... etc. Pour apporter notre contribution à une meilleure connaissance de ce pathogène, nous nous sommes fixés comme objectif l'étude

du mode d'action du champignon. Pour ce faire plusieurs études ont été menées au laboratoire et en serre pour :

- ✓ Isoler des souches monoclonales.
- ✓ Evaluer leur pathogénicité.
- ✓ Faire des inoculations simples et combinées à partir de souches choisies selon leur virulence pour déterminer d'une part la virulence de ces clones en saison pluvieuse et d'autre part l'existence de facteurs additifs ou non additifs du pouvoir pathogène.
- ✓ Faire des inoculations à partir d'un filtrat de souche monoclonale.
- ✓ Mettre en évidence les possibilités d'infection par les racines de *M. pénicillariæ*.

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Matériel végétal

1.1 Historique et distribution géographique

Le mil perlé (*Pennisetum glaucum* L.) a été probablement découvert dans le sud Sahara, il y a près de 3000 à 5000 ans. IL a été ensuite transportée en Afrique orientale et centrale et en Inde en raison de son excellente tolérance à la sécheresse, il y'a près de 2000 ans (FAO, 1995).

Le terme « mil » regroupe un ensemble de graminées alimentaires annuelles qui ont pour caractéristique commune la petitesse de leur grain. Les espèces les plus importantes sont le mil pénicillaire ou mil perlé ou encore mil en chandelle, l'éleusine, le millet commun et le millet des oiseaux. Le mil pénicillaire compte pour près de la moitié de la production mondiale du mil (FAO, 1997). C'est donc le plus important des espèces de mil cultivées à travers le monde avec un total de 40 millions d'hectares cultivés (FAO, 1996) et 26 millions de terres emblavées en Afrique sud-saharien et dans le sub-continent indien.

Le mil perlé est une culture traditionnelle en Afrique occidentale, surtout au sahel, en Afrique centrale, orientale et australe. En Asie, il est cultivé en Inde, au Pakistan et le long de la côte sud de la Péninsule Arabique. Il a été récemment introduit dans les plaines côtières du sud-est des Etats-Unis, où il est utilisé comme fourrage d'été (FAO, 1997).

En Afrique, 80% de la production provient de l'ouest du continent et les principaux producteurs sont le Nigeria, le Niger, le Burkina Faso, le Mali, la Mauritanie et le Sénégal. Le Nigeria compte à lui seul 40% de la production régionale suivi du Niger avec 20%. La production africaine de mil pénicillaire est estimée en 1992-1994 à 11,36 millions de tonnes sur une superficie d'environ 18,5 millions d'hectares avec un rendement moyen de 0,61tonne/hectare. Ces moyennes cachent cependant des écarts régionaux très importants. Les

rendements sont en général très faibles et très variables d'une campagne à une autre (ROCAFREMI, 2002).

La répartition de la culture du mil, dans le monde, en fonction des terres cultivées est représentée par la carte suivante (FAO, 1997) :

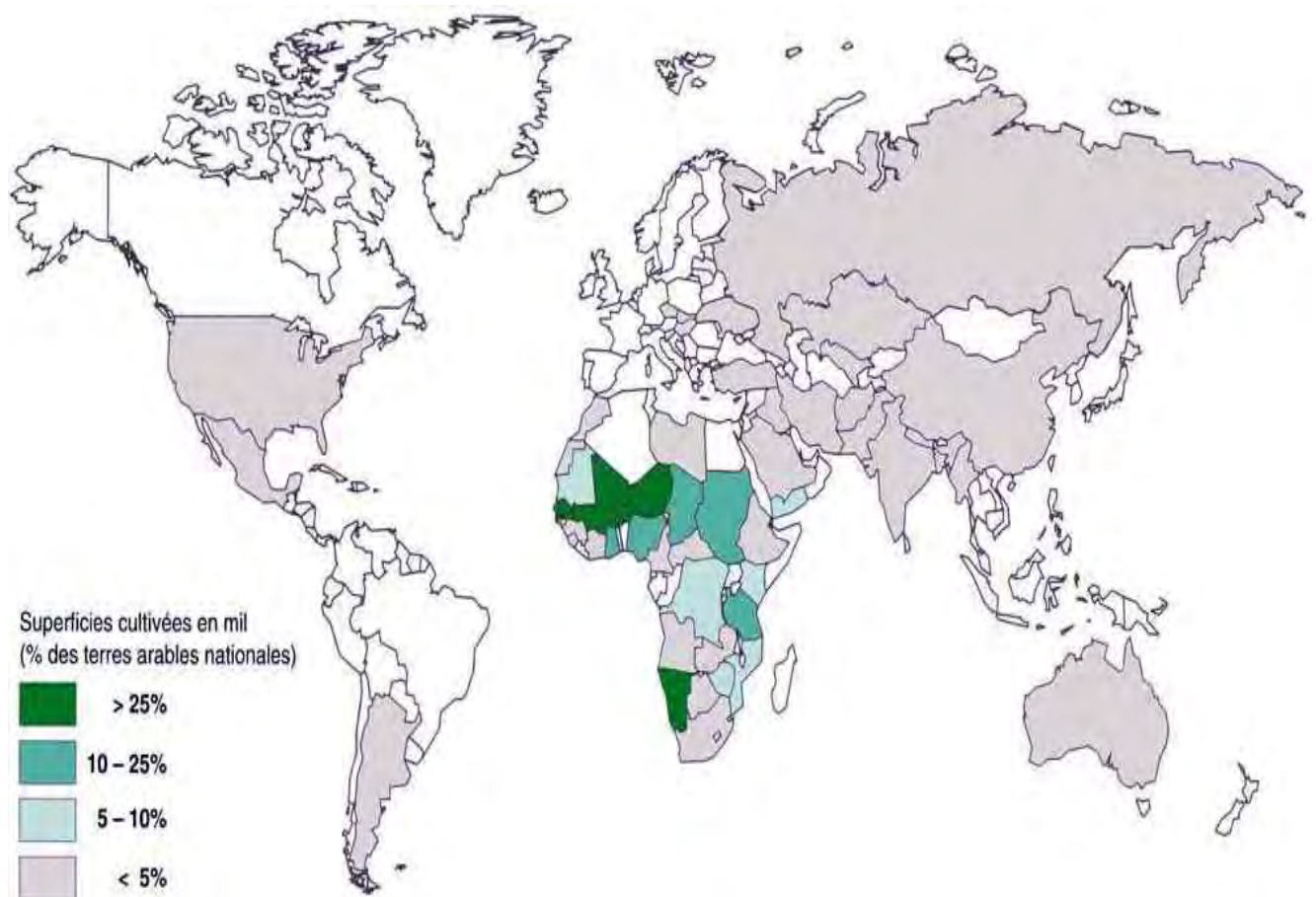


Figure 1: Principaux pays producteurs de mil (FAO, 1997)

Au Sénégal notamment, la production céréalière totale se situe entre 800.000 et 1.000.000 de tonnes par an dont 70% à 80% pour le mil en chandelle. Déjà dans les années 60, la production céréalière (mil & sorgho) tournait autours de 450.000 tonnes (Charrier A. *et al*, 1997) soit une hausse de près de 50%.

La culture du mil est pratiquée presque dans toutes les régions du pays essentiellement dans le bassin arachidier (Thiès, Diourbel, Kaolack, Fatick) mais également dans la région de Tambacounda (Broutin C. *et al*, 2000).

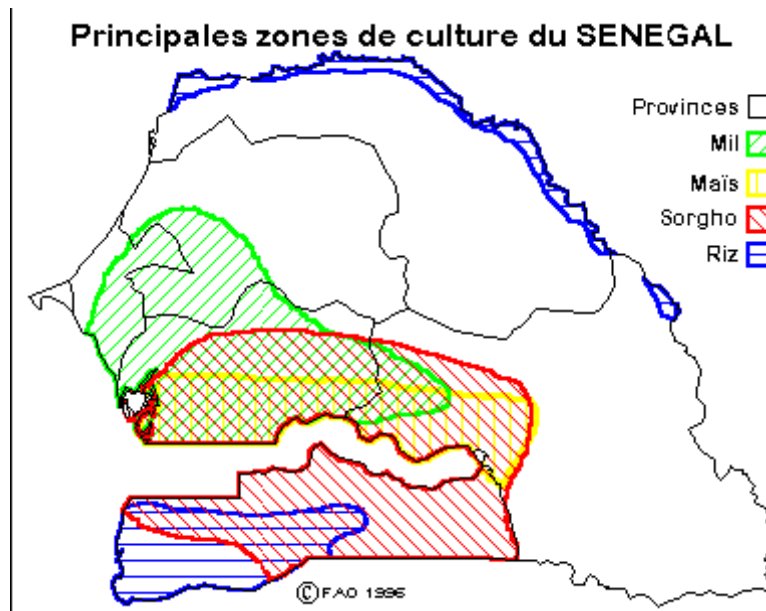


Figure 2: carte de la répartition des cultures céréalières au Sénégal (Broutin C. *et al*, 2000)

1.2 Description

Le mil pénicillaire est une espèce annuelle de la famille des Graminées et de la tribu des Panicées. Elle est diploïde ($2n=14$), sexuée, hermaphrodite et préférentiellement allogame avec une protogynie bien marquée. Sa pollinisation est anémophile. C'est une céréale à cycle rapide de grande taille, robuste et vigoureuse à port érigé pouvant atteindre 2 mètres de hauteur (White R. O. *et al*, 1959).

La longueur du cycle de culture, du semis à la récolte, peut varier de 60 jours, pour les variétés plus précoces, à 180 jours pour les variétés les plus tardives. Les variétés semi tardives et tardives encore appelées « Sanio » restent les plus nombreuses dans la zone soudano-sahélienne alors que les formes précoces prédominent dans la zone climatique typiquement sahélienne et sont appelées « Souna » (<http://www.icrisat.org>).

Quelque soit la durée du cycle, le développement du mil comprend trois phases essentielles :

✓ Phase végétative, GS1 : qui est la phase de germination et de croissance de la plante (<http://www.icrisat.org>). Elle débute avec la levée des plantules et continue jusqu'au moment de l'induction florale (Boulama M. *et al*, 1993).

✓ Phase de développement de l'épi, GS2 qui correspond au développement des feuilles, à la floraison et l'émergence de l'épi (<http://www.icrisat.org>). Pendant cette phase, toutes les feuilles s'étendent, tandis que celles qui se trouvent à la base de la tige, se dessèchent. A la montaison, les entre-nœuds apparaissent et se rallongent à partir de la base. Les talles plus en retard, suivent les mêmes phases de développement que la tige. L'accumulation de la biomasse concerne, en ce moment là, les racines les feuilles et les tiges (Boulama M. *et al*, 1993).

✓ Phase de remplissage du grain, GS3 qui est la phase de formation et de maturation des gains (<http://www.icrisat.org>). Elle débute avec la fécondation des fleurs femelles de l'inflorescence et se poursuit jusqu'à la maturité des grains (Boulama M. *et al*, 1993).

La durée de chacune de ces phases précitées en fonction des variétés et les phases phénologiques principales sont consignées dans le tableau et le schéma suivants de Boulama M. *et al* (1993).

Tableau 1: durée des différentes phases de développement de deux variétés de mil pénicillaire de mil (Boulama M. *et al*, 1993).

Phases phénologiques		Variétés précoces (jours)	Variétés tardives (jours)
GS1	Levée	10-15	10-15
	Tallage	20	20
GS2	Montaison	20	45
	Floraison	10-15	15
GS3	Maturation	20	50-55

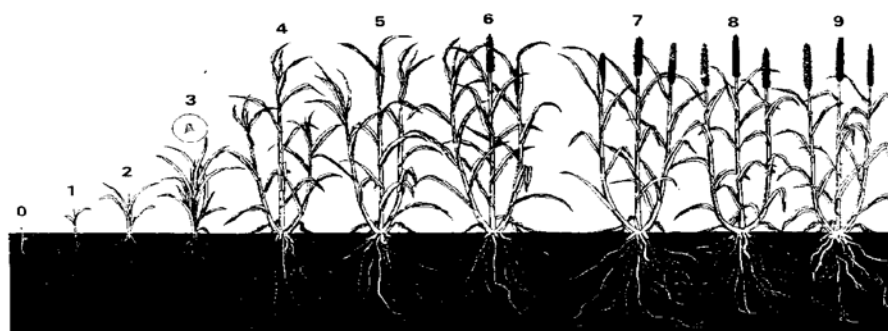


Tableau 2. Description des phases phénologiques (65)

Phase phénologique	Description
(GS1) 0.	Coleoptile visible en surface
1.	Troisième feuille
2.	Cinquième feuille
(GS2) 3.	Induction paniculaire
4.	Dernière feuille
5.	Epiaison/apparition de la panicule
6.	Floraison (apparition de 50% des stigmates)
(GS3) 7.	Maturation lateuse
8.	Maturation cireuse
9.	Formation de la ligne noire

Figure 3 : Schéma des phases phénologiques principales (Boulama M. *et al*, 1993).

Le grain est exceptionnel et le fourrage présente une grande potentialité. IL est considéré à l'image du maïs et du sorgho comme des céréales grossières.

Le mil perlé présente un nombre variable de talles, la longueur de l'épi, les dimensions et la couleur des grains sont également variables. Il en est de même pour la hauteur de la plante. Cependant tous ces facteurs dépendent des cultivars et des conditions environnementales (<http://www.icrisat.org>).

1.2.1 Les tiges :

Les tiges sont solides, compactes, arrondies et pleines contrairement à d'autres céréales qui présentent des tiges vides à l'intérieur. Elles sont également tallées et sont composées d'entrenœuds bien distincts, séparés par des nœuds qui portent des feuilles alternées. Leur diamètre varie entre 1 et 2 cm (Westphal E., 1985).

Quelques fois des talles secondaires et mêmes tertiaires surviennent de ces nœuds. Le nombre de talles par pieds de mil peut varier entre 6 et 10 talles voire même 40, lorsque les conditions d'humidités et températures sont favorables (Kevin K. Sedivec, 1991). Cependant 1 à 7 seulement arrive à produire des grains (Boulama M. *et al*, 1993).

1.2.2 Les talles :

La tige principale engendre des talles secondaires. Toutes les talles sont capables de produire des épis et constituent un facteur de survie dans le temps contre la compétition. Cependant la taille moyenne d'un épi varie selon que la talle est primaire, secondaire ou tertiaire (<http://www.icrisat.org>).

1.2.3 Les racines

Le système racinaire est de type fasciculé avec une racine séminale suivie de plusieurs racines adventives qui naissent à la base de la tige et des talles. IL existe enfin des racines de soutènement qui naissent des nœuds les plus proches du terrain. Les racines peuvent atteindre des profondeurs pouvant aller jusqu'à 3.6m et explorer les couches les plus profondes du sol en cas de stress hydrique (Boulama M. *et al*, 1993).

1.2.4 Les feuilles :

Les feuilles sont longues et sveltes avec une surface lisse ou velue présentant également des ligules velues. Elles se composent d'une gaine et d'un limbe à nervures parallèles (Westphall E. *et al*, 1985). Les feuilles mesurent 90-100cm de long sur 5-8cm de large. Elles peuvent être proéminentes, droites ou s'abaisser. Les stomates se retrouvent sur les deux surfaces de la feuille à nombre égal (50-80).les feuilles peuvent être de couleur claire à pourpre (<http://www.icrisat.org>).

1.2.5 L'épi :

Les épis ont généralement les mêmes dimensions et la même forme pour un génotype donné. Ils sont raides, compacts, cylindriques, coniques ou sous forme de fuseau de 2-3 cm de diamètre. Les épis ont habituellement 15-45 cm de long bien que quelques variétés puissent atteindre 150cm de long. Il occupe toute la longueur du fourreau en s'effilant de la base au sommet. Il est couvert de courte et douce poile.

Les stigmates commencent à se former trois à cinq jours après l'apparition de l'épi. Trois (3) jours après, la première anthère se forme près du sommet de l'épi. Ce décalage dans le temps en ce qui concerne l'apparition des organes reproducteurs chez le mil favorise la pollinisation croisée qui est la règle chez cette espèce (Maiti R.K. *et al*, 1981). Les épis produisent en moyenne 870 à 3000 graines par plante (Kevin K. Sedivec *et al*, 1991).

1.2.6 La graine :

Les graines ou caryopses du mil perlé sont hautement variable du point de vu poids (3 à 15g pour 1000 grains). Les grains sont petits, globulaires à subcylindriques ou encore coniques (www.icrisat.org). La surface de la graine peut montrer des striations ou des protubérances microscopiques selon les génotypes. La couleur de la graine peut être blanche, grise, marron ou même jaunâtre ou bleue. Quelque fois l'embryon à une teinte rougeâtre (Boulama M. *et al*, 1993).

Le grain du mil à chandelle aurait même une valeur nutritionnelle supérieure à celle du riz et du blé (Charrier A. *et al*, 1997), et sa composition serait la suivante selon Boulama M. (1993): protéine 12.1%, lipide 5.0%, carbohydre 69.4%, fibre 2.4% et cendre 2.3

1.3 Ecologie :

Le mil pénicillaire ou encore mil à chandelle est une espèce xérophile considérée comme la céréale la plus effective pour l'utilisation de l'humidité du sol et présentant un niveau de tolérance à la chaleur plus élevé que le sorgho et le maïs (White R. O. *et al*, 1959). C'est une graminée très adaptée aux milieux secs, à pluviométries faibles comme le sahélien. Cette aptitude se caractérise par la mise en place de mécanismes physiologiques qui lui permettent de tolérer la sécheresse. Il s'agit notamment du ralentissement des pertes en eau au niveau des parties aériennes, ce qui favorise le maintien d'un niveau hydrique favorable au remplissage des grains.

Il est généralement cultivé sur des sols sableux à texture fine où la plante se contente de 300 mm d'eau pour parvenir à maturité mais se plaît aussi dans les argiles noires des zones à pluviométrie plus abondante (White R. O. *et al*, 1959). Les graminées en général à l'image du mil perlé présentent des racines qui retiennent le sol et participe à l'amélioration de sa structure (MAAARO, 2002).

Globalement l'environnement agro-écologique de la culture du mil n'est pas favorable à une bonne production qu'il s'agisse de l'Inde ou de l'Afrique. Ceci serait dû à plusieurs facteurs dont la rareté et l'instabilité des pluies, l'appauvrissement des sols, le manque de fertilisation et enfin les méthodes de culture du mil dans ces régions sont encore artisanales.

1.4 Utilisation :

En Afrique et en Asie, le mil est utilisé essentiellement pour l'alimentation humaine. Cependant la consommation du mil est plus importante en Afrique où le mil constitue une denrée de base essentielle dans les régions les plus sèches. En Asie, L'utilisation du mil dans l'alimentation humaine est importante dans certaines régions de l'Inde, de la Chine et du Myanmar. Cette consommation est négligeable en Amérique latine et dans les pays développés à l'exception de l'ex-URSS jusqu'à la fin des années 1980 (FAO, 1997).

Au Sénégal, le mil demeure la principale céréale transformée par de petites sous unités semi-industrielles (80 à 85% de la production en 1998). Son utilisation se fait sous forme de bouillies liquides ou pâteuses, de galettes et surtout sous forme de couscous. Il est utilisé également dans la fabrication du pain en mélange avec le blé. Depuis quelques années, une biscuiterie industrielle propose des biscuits à base de mil soit une consommation annuelle de 120 tonnes de farine de mil par an (Broutin C. *et al*, 2000).

Le mil peut aussi servir de fourrage, de clôture aussi bien au Sénégal que dans les autres pays du tiers monde. Cependant dans les pays développés, le mil est surtout utilisé pour la nourriture des oiseaux et du bétail notamment en Europe et au sud des Etats Unis. En Afrique du Sud, il est utilisé pour la fenaison et l'ensilage. Il peut également entrer dans la fabrication de boissons alcoolisées comme la bière du mil. Et pourtant le mil est un aliment très énergétique, nutritif, particulièrement recommandé pour les enfants et les personnes âgées ou en convalescence (FAO, 1997).

Dans les pays en voie de développement, le mil est essentiellement destiné à la consommation locale et le commerce intérieur de cette céréale reste encore faible. En effet, selon la FAO (1997), seulement 15-20 % du mil pénicillaire produit en Inde, et peut-être 5-10 % en Afrique, entreraient dans les systèmes de commercialisation. Le commerce international du mil se situe entre 200 000 et 300 000 tonnes, soit environ 0.1% du commerce mondial des céréales ou 1% de la production mondiale (FAO, 1997).

1.5 Taxonomie :

La famille des Graminées ou Poacées referme quelques 620 genres et 10.000 espèces. Cette subdivision est basée sur le caractère de l'inflorescence (épillets) et la nature de la réduction florale (Westphal E. et *al*, 1985).

Le genre *Pennisetum* contient une soixantaine d'espèces et la section pénicillaire se caractérise par la présence d'une touffe de poils appelés pénicille sur l'apex des étamines et par un rachis cylindrique de la chandelle (Powell D. et *al*, 1980).

Van Der Zon, en 1992, subdivise l'espèce *P. glaucum* en trois (3) sous-espèces que sont :

- ✓ *P. glaucum subsp glaucum* (variété cultivées)
- ✓ *P. glaucum subsp violaceum* (variété sauvage)
- ✓ *P. glaucum subsp sieberianum* (variété intermédiaire)

La classification systématique:

Super classe : Spermaphytes

Classe : Monocotylédone

Ordre : Cypéales

Famille : Poacées (graminées)

Genres : *Pennisetum*

Espèces : *glaucum*

Synonymes :

- ✓ *Panicum americanum* L.
- ✓ *Pennisetum americanum* (L.) Leake
- ✓ *Pennisetum typhoides* (Burm)

(<http://www.csd1.tamu.edu/FLORA/taes/tracy/610/pennisetum.html>).

Les noms usuels du mil selon les localités sont : pearl millet, bulrush, cattail, ou spiked millet en anglais, bajra en Hindi, kamba en Tamil, dukhn en arabe, mil pénicillaire ou mil en chandelle en français (Boulama *et al*, 1993).

2 Matériel fongique :

2.1 Historique et Distribution géographique :

Les Ustilaginales sont caractérisées par un nombre de chromosomes très réduits et une longévité assez remarquable de 18 ans voire même 22 ans pour certaines espèces (Zambettakis Ch. ,1978).

Généralement leur nomenclature évolue beaucoup avec le temps et selon les auteurs et *Tolyposporium penicillariae* n'échappe pas à cette règle.

En 1940, Mudkur rencontre dans la région de Poona en Inde des champignons dont le genre *Tolyposporium*.

En 1954, les espèces *Tolyposporium senegalensis*, *Tolyposporium bullatum* et *Sorosporium bullatum* ont été découvertes pour la première fois en Afrique par Corbetta. Pendant la même période, Corbetta conclue que *T. bullatum*, *Sorosporium destruens* et *Sorosporium panici-miliacei* devrait être nommée *Sorosporium bullatum*. Mais, il faut noter que ni le mil perlé, ni son association avec l'agent ou les agents pathogènes n'ont été mentionnés dans ses écrits.

En 1955, Hirschorn suggère que *T. senegalensis* et *T. bullatum* sont des synonymes. Il regroupe ces espèces sur la base de similitudes morphologiques mais les croisements effectués entre les deux se révèlent sans succès. Il attribue cela à des différences physiologiques bien que des ressemblances uniquement morphologiques puissent suffire pour inclure des champignons dans le même genre. Hirschorn pensent cependant qu'il faudrait une compatibilité des ces deux souches pour conclure qu'elles appartiennent à la même espèce car ces dernières présentent des spécificités d'hôtes.

Vánky, en 1977, crée le genre *Moesziomyces* et y inclus plusieurs espèces du genre *Tolyposporium*. Après examen de plusieurs spécimens, il conclue que

T. penicillariae et *T. bullatum* sont la même espèce et qu'elles sont différentes de *M. bullatum*.

Selon Mordue (1995), ces deux espèces sont morphologiquement similaires même si elles paraissent différentes dans la spécificité d'hôte et les modes de germination (<http://www.ars.usda.gov/IS/np/pearlmillet/qs.htm>).

Enfin 2004 Vánky conclue finalement que *M. penicillariae* et *M. bullatum* sont des synonymes et constituent alors la même et seule espèce. (<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=317784>)

Le genre *Tolyposporium* actuellement appelé *Moesziomyces* parasite du mil pénicillaire se rencontre très communément en Inde et en Afrique occidentale et équatoriale (Roger L., 1951). De nombreux spécimens ont été observés au Sénégal et en Guinée où les cultures sont attaquées en permanence tous les ans (Roger L., 1951).

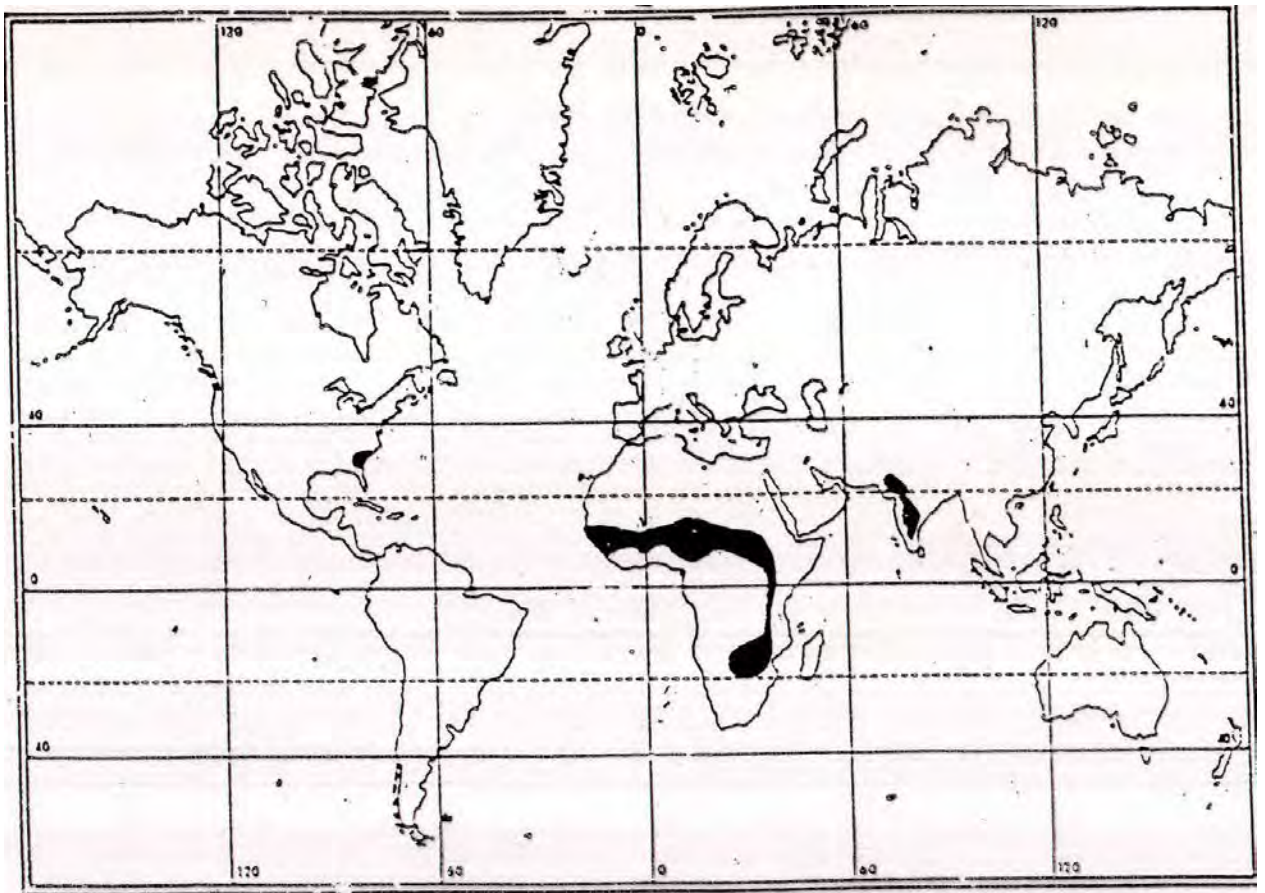


Figure 4 : Distribution géographique du charbon du mil (*M. penicillariae*) (Thakur R.P et al, 1988).

2.2 Description

Les Ustilaginales se caractérisent par la présence de probasides internes qui constituent, à maturité, des masses de spores compactes ou poudreuses, seules parties visibles de ces champignons. Elles représentent l'ordre le plus inférieur de la classe des Basidiomycètes parmi les lignées adaptées au parasitisme obligatoire (Zambettakis Ch., 1970). Chez ces Ustilaginées, interviennent d'une part des facteurs d'incompatibilité, d'auto-inhibition et d'autre part par les facteurs morbides, d'albinisme et d'hybridation (Zambettakis Ch., 1977).

Les espèces du genre *Tolyposporium* devenues actuellement *Moesziomyces* se caractérisent elles par des spores ou téliospores groupées d'une façon permanente en masse de formes et de dimensions variables. Les spores germent pour donner un promycélium septé ou baside, portant des sporidies ou basidiospores à la fois latérales et terminales. Ce sont en général des parasites de Graminées ou Poacées. Cependant on peut les cultiver dans des milieux synthétiques (Roger L., 1951).

Zambettakis Ch. (1979) précise que la paroi des spores de *T. penicillariae* est légèrement verruqueuse. Ces spores sont contenues dans des sores renflés et disséminés sur l'épi contrairement à d'autres espèces qui présentent des spores libres à la surface des organes de leurs hôtes. A maturité les enveloppes des sores se déchirent irrégulièrement pour libérer les spores.

Selon Vánky (1986), les balles de spores de *T. penicillariae* qu'il rebaptise *Moesziomyces penicillariae* sont constituées de spores mais également de cellules stériles. La présence de ces cellules serait l'une des principales caractéristiques de cette espèce.

2.2.1 Les sores :

Les sores sont en forme de massues et se distinguent des grains non infectés par leur grande taille. Leur diamètre est compris entre 2 et 4mm (Piepenbring M., 2003). Les jeunes sores verdâtres deviennent marron à noir à maturité et sont formés par hypertrophie des ovaires infectés (Lèye G.D, 1993).

2.2.2 Les balles de spores :

Ces balles de spores ont des formes et des dimensions variables. Elles peuvent avoir une forme globulaire, ovoïde, allongé ou encore polyédrique et mesurent de 42-325 μm à 50-175 μm de long. Leurs couleurs varient de marron à noire et elles sont composées de plusieurs centaines de spores et de cellules stériles (Vánky K., 1986). Le nombre de spores par balles varie de 200 à 14000 spores (Subba Roa K.V. *et al*, 1983).

2.2.3 Les spores :

Ce sont des Téliospores. Elles sont uniformément jaunes, brunâtres, globulaires à subglobulaires, ovoïdes et mesurent 7 à 12.5 μm de diamètre. Ces spores présentent une surface verruqueuse du côté externe des balles de spores tandis qu'elles sont habituellement lisses à l'intérieur des balles. Elles peuvent être libres ou accompagnées de cellules stériles avec lesquelles elles sont liées par des protubérances (Piepenbring M. *et al*, 1998).

La germination des spores engendre un promycélium septé ou baside dont le nombre d'article est variable. Cette germination peut être obtenue aussi bien dans l'eau ou dans l'agar (Wilson J.P. *et al*, 1990). Les températures optimales de germination des spores sont comprises entre 25°C et 35°C. Cependant les températures relativement basses (12°C) ont action inhibitrice réversible sur la multiplication des sporidies, alors que les températures supérieures à 35°C ont une action inhibitrice irréversible (LEYE G. D., 1993).

Les pH optimaux sont comprises entre 4.0 et 8.5 et le maximum de développement est obtenu pour un pH de 7.5 (Pathak V.N., 1980).

2.2.4 Les cellules stériles :

Ces cellules ont une paroi mince et leur rupture est à l'origine de l'ornementation réticulée des spores (Piepenbring M. 2003).

2.2.5 Les sporidies :

Les sporidies sont hyalines et sont formées d'une seule cellule allongée ou fusiforme. Elles sont latérales et terminales et fréquemment disposées en bouquet en un seul point. Leur longueur varie de 8 à 25 µm (Subba Roa K.V. *et al*, 1983).

2.3 Cycle et Mode d'infection

Le charbon du mil se perpétue d'une saison à une autre à travers les spores déposées dans le sol lors des précédentes cultures. Pour beaucoup d'auteurs durant cette période les spores subissent des conditions d'humidité et de température qui ne sont pas propices à leur développement. L'infection primaire se fait elle grâce aux spores qui ont pu résister à la saison sèche et qui à la saison pluvieuse sont transportées par le vent sur les épis en formation.

L'infection secondaire se fait à partir des spores produites par les plantes infectées précocement (Kousik C.S., 1988)). Elle est cependant moins importante du point de vue dégâts occasionnés car elle ne concerne que les épis des thalles secondaires voir même tertiaires.

Il faut également noter qu'en plus du vent il existe d'autres facteurs qui participent à la dispersion du champignon que sont : l'eau, les insectes, l'homme... (Piepenbring M. *et al*, 1998).

Selon Leye G.D. (1993), les sporidies libérées à la germination des spores seraient diploïdes et provoqueraient directement l'infection sans conjugaison préalable. Ceci rappelle la solopathogénécité décrite chez *Ustilago maydis* par Zambettakis en 1976. La conjugaison est une étape obligatoire dans le cycle des Ustilaginées. C'est la rencontre de sporidies compatibles qui produit le mycélium dicaryotique qui est l'élément pathogène. L'existence de sporidies diploïdes ou dicaryotiques réduit efficacement la durée du cycle de l'infection chez *M. penicillariæ*.

L'attaque du champignon se fait au niveau de quelques fleurs de la plante et cette dernière serait plus sensible avant l'apparition des stigmates de l'ovaire (C.M.I., 1965). Selon Chevaugéon, il existe deux voies de pénétration de l'ovaire, l'une se

faisant au niveau du réceptacle par les hyphes mycéliens. C'est la voie la plus privilégiée. Il existe une deuxième voie qui se ferait toujours grâce aux hyphes mycéliens mais cette fois ci la pénétration se ferait par l'intermédiaire des parois latérales de l'ovaire (Chevaugnon J., 1952).

Bhatt (1946) notent que le maximum d'infection est obtenu pendant les périodes de fortes humidités. D'après les travaux de Sushil S. (1999), les infections seraient plus importantes lorsque les semis sont effectués dans la troisième semaine du mois de Juillet.

Thakur R. P. *et al* (1983) notent enfin que l'infection par *Moesziomyces penicillariae* est plus importante lorsque qu'elle se fait avant la pollinisation car il y aurait compétition entre le grain de pollen et le champignon. Cela est confirmé par Wells H.D. *et al* (1987) qui démontre que le principal facteur inhibant le développement du champignon est la pollinisation.

Des modes d'infection par les racines ont été observés chez certaines espèces d'Ustilaginales telles que *Sporisorium relianum zae* sur le maïs qui ne pénètrent que par cette voie (Martinez C. *et al*, 2000). La possibilité de pénétration au niveau des racines du mil pénicillaire par *M. penicillariae* a été mise en évidence par Lèye G.D. (2005) mais aucun sore n'a été observé sur les épis à maturité au cours de ces tests.

Les différentes phases du cycle d'infection de *M. penicillariae* sont résumées dans le schéma suivant :

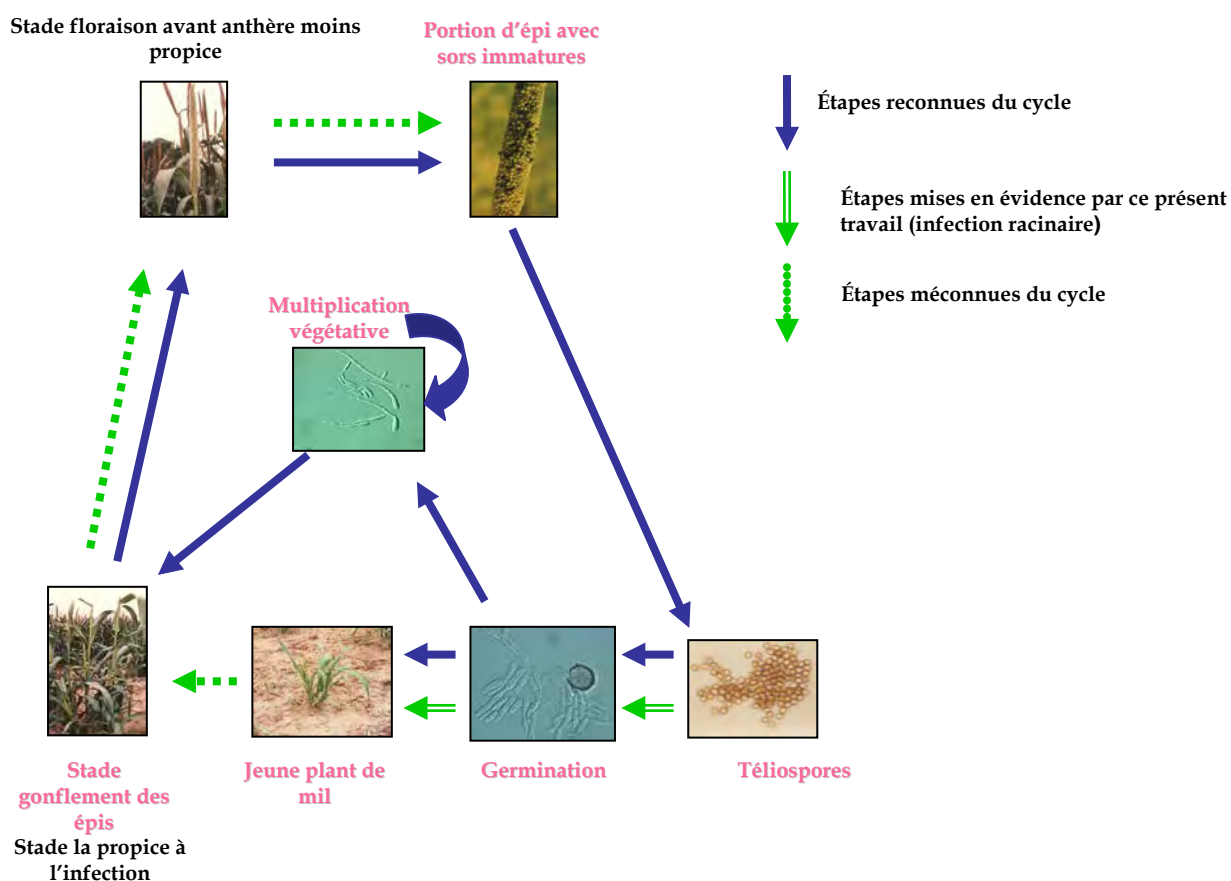


Figure 5 : Cycle d'infection de *Moesziomyces penicillariae* (Lèye G.D., 2005).

2.4 Symptômes et dégâts

Les ovaires attaqués sont transformés, au bout de 15 jours, en gros sacs dodus appelés sors contenant une poudre brune à noire d'où le nom de la maladie charbon du mil.

Selon (Mbaye D. F. (1993), le charbon occupe la deuxième place après le mildiou dans le sahel. Cependant, son impact sur les rendements est variable d'une zone à une autre, d'une année à une autre. D'après cet auteur au Sénégal, les pertes ont variées de 1% à 20% durant l'hivernage 1985 et de 1% à 4% pendant l'hivernage 1986 selon toujours. Les mêmes tendances ont été globalement observées dans les autres pays de la sous région. Il existe

cependant des variations assez importantes de l'impact de ce champignon suivant les pays. La sévérité des dégâts a été estimée à 19% au Tchad, 4% en Mauritanie et au Mali toujours au cours des années 85 et 86

Selon Wilson J.P *et al* (1990), les pertes occasionnées par ce charbon peuvent entraîner des baisses de rendement de l'ordre de 23% à 30% (

2.5 Méthodes de lutte

Les moyens de lutte pour les charbons en général consistent principalement à une rotation des cultures et la désinfection préventive des semences ; désinfection qui a donné des résultats satisfaisants en Inde avec l'Agrosan et le Ceresan (Chevaugeron J., 1952). Les désinfections peuvent aussi se faire avec l'eau chaude (60°C pendant 10mn) ou encore avec des vapeurs chaudes de formol (20s à 98°C) (Roger L., 1951). Il faut cependant noter, d'après cet auteur, que ces traitements entraînent une légère baisse de la faculté germinative.

Wells H.D. (1967) a également montré la grande efficacité du 2,3-dihydro-5carboxalinido-6-méthyl-1,4-oxathiin (DCMO) et du 2,3-dihydro-5carboxalinido-6-méthyl-1,4-oxathiin-4,4dioxide (DCMOD) pour la réduction de l'incidence de *T. penicillariae* sur le mil pénicillaire lorsque ces derniers sont pulvérisés sur l'épi et les feuilles de la plante.

La sélection et la destruction des épis infectés sont également suggérés pour éviter une contamination des épis sains par ces derniers ; destruction se faisant par enfouissage ou brûlure des épis infectés (http://tchad.ipm-info.org/guide/mil_penicillaire.htm#charbon).

L'utilisation de variété résistante a été également préconisée par certains auteurs dont Chavan S.B. *et al* (1988) qui a montré l'existence de variétés hautement résistantes avec des taux de sévérité tournant autour de 0.0 et 0.9% et que le croisement de ces variétés résistantes donnent des hybrides encore plus résistantes au charbon (sévérité de 0.0 à 0.3%). Ce qui lui a permis de conclure au passage que ces variétés présenteraient des gènes de résistance complémentaires. IL a enfin montré que le croisement de variétés résistances

avec des variétés sensibles donnait des hybrides assez résistants à l'attaque charbonneuse.

La sélection variétale serait donc la méthode la plus indiquée pour lutter contre les maladies charbonneuses particulièrement contre le charbon du mil car selon toujours Chavan S.B. *et al* (1998), le développement de variété résistante est plus efficace et plus économique pour contrôler la maladie.

2.6 Taxonomie :

La systématique des ustilaginales repose sur : l'aspect des sores, des téliospores, des caractères anatomiques (couleur, dimension et ornementation sporale), des caractères biologiques (germination, parasitisme, formes imparfaites et la sexualité), les réactions de l'hôte envahi (nanisme, castration, formation des tumeurs ou de galles...). Enfin sur les caractéristique génomique (Zambettakis Ch., 1979).

Chez les Ustilaginales , les espèces d'un même genre sont différenciées par un certain nombre de caractères que sont les caractères micrométriques mais également la couleur, l'épaisseur et l'ornementation de la membrane sporale. Cette ornementation est assez variable chez les Ustilaginales mais serait fixe pour chaque espèce. Elle est légèrement verruqueuse chez *Tolyposporium penicillariae* (Zambettakis Ch. 1970). Selon Zambettakis Ch. (1977), la sexualité des Ustilaginales est strictement liée à la notion d'espèces. L'identification des Ustilaginales reste souvent impossible si l'on ne dispose d'aucun renseignement sur l'identité de l'hôte (Zambettakis Ch., 1970).

Ainsi il existe des Ustilaginales qui attaquent tous les tissus de l'hôte de la racine jusqu'à l'inflorescence comme *Ustilago maydis* mais la règle est que l'ustilaginale n'attaque qu'une partie bien déterminée de l'hôte (Zambettakis Ch., 1979), c'est le cas pour *Moesziomyces penicillariae* qui attaque les ovaires.

La classification de ce champignon :

(<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=317784>)

Embranchement : Eumycète

Sous-embranchement : Basidiomycètes

Classe : Téliomycida

Ordre : Ustilaginales

Genre : *Moesziomyces*

Espèce : *penicillariae*

Les synonymes de *Moesziomyces penicillariae* sont :

Sorosporium senegalense (Speg.) Thirum. & Neerg.

Tolyposporidium penicillariae (Bref.) Thirum. & Neerg.

Tolyposporium penicillariae Bref.,

Tolyposporium senegalense Speg.

Moesziomyces bullatus (J. Schröt), Vánky

II. MATERIELS ET METHODES

1. Matériels :

1.1 Matériel végétal :

Des grains de mil à chandelle de la variété **GB 8735** ont été utilisés pour faire les semis sous abri mais également pour des cultures dans des tubes à essai au laboratoire.

C'est une variété à cycle précoce, réputée rustique et peu conditionnée par l'environnement. Elle est également réputée résistante aux maladies surtout au mildiou, de bonne plasticité et de bon rendement (centre d'échange d'information sur la diversité biologique au Tchad, 2004).

1.2 Matériel fongique

Des sores de *Moesziomyces penicillariae* prélevés sur des épis de Souna III infecté naturellement ont été utilisés comme source fongique. Ces épis ont été récoltés dans la localité de Bambey sérère après l'hivernage 2005.

1.3 Milieux de cultures :

Les milieux utilisés sont :

- ✓ Extrait de pomme de terre additionné d'agar et de glucose à 2% (**PDA**)
- ✓ Extrait de pomme de terre additionné à du glucose à 2% (**PD**)
- ✓ Eau distillée additionnée d'agar à 2% (**EG**)
- ✓ Milieu de Bécard et Fortin (1988) (voire annexe)

Le milieu pomme de terre-dextrose (PD) est obtenu en faisant bouillir de la pomme de terre (200g/l) pendant 15mn dans de l'eau distillée. Pour le milieu pomme de terre-dextrose-agar (PDA), de l'agar et du dextrose sont ajoutés à l'extrait de pomme de terre à raison de 20g/l.

Ces milieux PD et PDA sont répartis dans des erlenmeyers puis stérilisés à 120°C pendant 20mn. Après stérilisation le PDA est réparti dans des boîtes de Pétri (diamètre 90cm) sous la hotte à flux laminaire et dans les conditions aseptiques.

Le milieu de Bécard et Fortin (1988) est réparti dans des tubes à essai puis stérilisé à 121°C pendant 20mn, il a été utilisé pour les essais d'inoculations par les racines.

Les différents milieux de culture sont utilisés pour effectuer les différentes cultures de spores, de sporidies et pour les tests de germination du mil.

2. Méthodes :

2.1 Cultures sur lames et germination des spores

Du milieu PDA ou du EG est étalé sur des lames porte-objets stériles. Chaque lame est déposée sur un tube en U contenu dans des boîtes de pétri en verre préalablement stérilisées à l'autoclave (120°C) pendant 20mn. Quelques spores de *Moesziomyces pénicillariæ* provenant de sores stérilisés sont déposées sur ces lames. Toutes ces opérations sont réalisées sous la hotte en conditions aseptiques. De l'eau distillée stérile est versée au fond des boîtes de Pétri pour maintenir une certaine humidité favorable à la germination et à la multiplication des sporidies.

Les boîtes de Pétri sont ensuite portées à l'étuve à une température de 30°C. Après trois (3) jours d'incubation, les cultures sont fixées avec de l'éthanol 95%. Les lames sont mises à sécher quelques minutes à l'air libre puis colorées au bleu coton acétique. Les cultures sont observées dans une goutte de glycérie entre lame et lamelle au microscope optique.

2.2 Isolement des souches

Les isollements sont effectués par la méthode de dilution-étalement. Des sores à enveloppe intacte sont prélevés sous la loupe puis stérilisés dans de l'eau de javel (10%) pendant 10mn en présence d'une goutte de Tween 80. Après rinçage à l'eau distillée stérile, l'enveloppe du sore est cassée sous la hotte dans une boîte de pétri stérile.

Des spores et des balles de spores ainsi libérées sont prélevées et ensemencées sur du PDA. Les boîtes sont mises à incuber à l'étuve à 30°C. Au bout de 72 heures, les cultures recueillies sont cultivées à nouveau dans des

erlenmeyers contenant le milieu liquide (PD). Ces cultures sont également portées à l'étuve à une température de 30°C.

Au bout de trois jours, un 1 ml de cette culture pluriclonale est dilué dans un erlenmeyers contenant 9 ml d'eau distillée stérile. Un 1 ml du récipient précédent est à nouveau dilué dans 9ml d'eau distillée stérile. Cette opération est répétée au cours d'une série de dix (10) dilutions successives

Trois gouttes de chaque dilution sont étalées dans une boîte de Pétri contenant du PDA et les cultures sont ensuite mises à incuber à l'étuve à 30°C

A bout de trois jours d'incubation, dans les boîtes à faible concentration, des colonies isolées apparaissent et sont considérées comme des clones. Ces souches isolées sont prélevées et cultivées séparément dans des boîtes de Pétri contenant le milieu (PDA). Onze (11) souches monoclonales de *M. pénicillariæ* sont ainsi obtenues à partir de cultures pluriclonales ou plurisporidiales.

2.3 Essais de conjugaison des souches de *M. pénicillariæ* en boîte de Pétri :

Pour déterminer une compatibilité éventuelle des souches, 56 combinaisons ont été faites à partir des onze (11) souches isolées. Pour se faire, les différentes souches ont été cultivées dans des milieux liquides (PD). Au bout de 72 heures de culture, une goutte de chaque souche est prélevée et combinée sur PDA aux autres souches pour déterminer les clones compatibles.

Des observations régulières sont effectuées pour la détection de structures de conjugaisons matérialisées par la formation de filaments mycéliens dicaryotiques au point de contact des souches compatibles.

2.4 Méthodes d'inoculation des épis de mil :

Avant inoculation, des grains de mil de la variété GB 8735 sont cultivés dans des sachets en plastique contenant du sable riche en humus prélevé dans le jardin botanique auquel de l'engrais (NPK) est ajouté. Ce substrat est réparti dans des sachets en raison de 250g environ par sachet. La germination de ces grains et la croissance des plantes sont suivies régulièrement.

Des inocula de cinq (5) jours de cultures sont utilisés pour les inoculations. En effet les épis doivent être inoculés avec des cultures vieilles de cinq (5) à quinze (15) jours (Pathak V.N. and Shekhawat B.S. ,1980).

Au moment de l'inoculation des épis, 1ml de la culture du champignon est prélevé et mis en suspension dans 5 ml de l'eau distillée stérile. Après agitation, 2ml de cette suspension sont prélevés à l'aide d'une seringue stérile et vont permettre d'inoculer les épis en serre.

Les inoculations sont faites par injection de suspension de cultures, de filtrat ou d'eau distillée stérile dans les épis au stade gonflement, ou au niveau des racines.

Les épis inoculés sont d'abord recouverts par des sachets en plastique pour maintenir une certaine humidité favorable au bon développement du champignon jusqu'au début de l'anthèse puis par du papier Craft pour éviter une contamination extérieure éventuelle de la part d'autres champignons mais également pour empêcher les attaques des oiseaux et des insectes.

Nous n'avons pas tenu compte de la densité sporidiale car d'après les travaux de Takhur R.P. et *al* (1983), la concentration sporidiale influe très peu sur l'intensité de l'attaque surtout en serre.

Les lectures de sévérité sont faites grâce à la clé de détermination de la sévérité du charbon du mil de l'ICRISAT représentée ci-dessous :

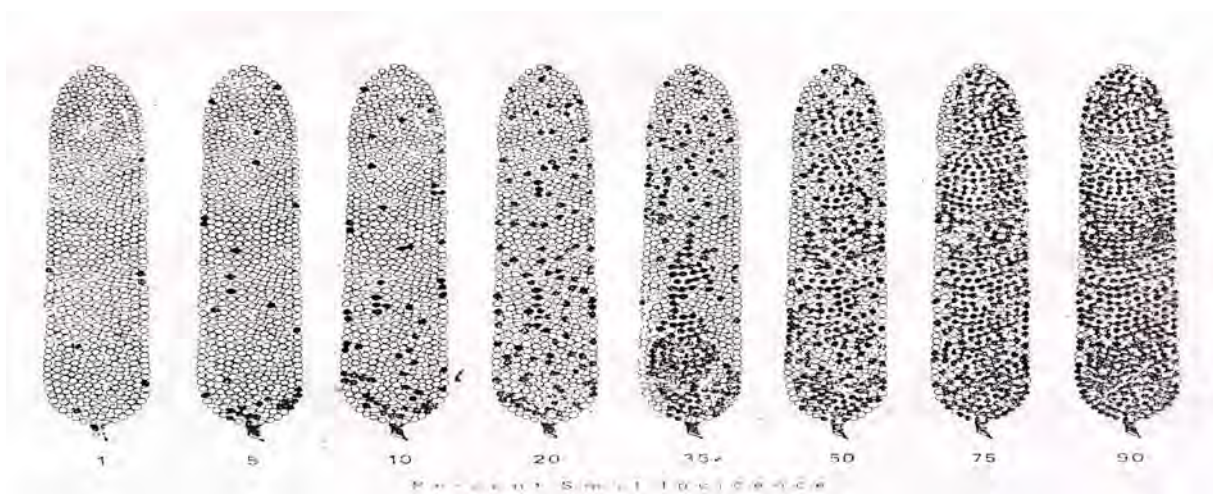


Figure 6: Clé de détermination de la sévérité du charbon du mil (Thakur R.P. *et al*, 1988)

2.4.1 Tests d'agressivité des souches isolées :

Les souches isolées par dilution-étalement ont été utilisées pour inoculer les épis de mil cultivés sous abri au cours de la période allant de Mars à début Juin, afin de déterminer leur pathogénicité éventuelle. Nous avons appelé cette phase, phase test. Nous avons ensuite choisis les deux souches les plus virulentes et les deux les moins virulentes pour la suite de nos travaux sous abri et au laboratoire.

2.4.2 Inoculation simple de l'épi à partir des souches choisies :

Les inoculations sont faites pendant la saison des pluies avec quatre souches dont deux virulentes (S1 et S10) et deux autres non virulentes S8 et S9. Quatre répétitions sont réalisées pour l'ensemble des inoculations.

2.4.3 Inoculation simple de l'épi à partir de filtrat de l'inoculum S10:

Pour ces tests nous avons choisi la souche la plus virulente pendant les phase tests c'est-à-dire la souche S10. Une culture de cette souche est réalisée en milieu liquide (PD) pendant 72 heures. Cette culture est d'abords filtrée avec un papier filtre et ensuite avec un filtre millipore stérile de porosité 0,2 µm.

Le filtrat (2 ml environ) est recueilli dans une boîte de pétri stérile et mis en suspension dans 5 ml d'eau distillée stérile. À l'aide d'une seringue stérile, 2 ml de cette dilution sont injectés dans les inflorescences du mil au stade gonflement. Quatre répétitions sont réalisées.

2.4.4 Inoculation d'épis avec des combinaisons de souches :

Pour ces tests, les différentes souches (S1, S7, S8 et S10) sont cultivées séparément en milieu liquide (PD) pendant cinq (5) jours. 1 ml de chaque culture est prélevé et mis en suspension dans 5ml d'eau distillée stérile. 2 ml de ce mélange sont prélevés à l'aide d'une seringue puis injectés dans les épis au stade gonflement.



Figure 7: inoculation des épis de mil



Figure 8 : Epi recouvert de sachet en plastique.



Figure 9 : Epi recouvert de papier Craft

2.5 Méthode d'inoculation par les racines :

Ces tests ont été réalisés sur le milieu M de Bécard et Fortin (1988) réparti dans des tubes à essai. La stérilisation a été faite à l'autoclave (121°C pendant 20mn). La souche monosporidiale (S10) cultivée dans un milieu liquide (PD) est utilisée comme inoculum pour les essais d'infection par les racines.

Des grains de mil préalablement stérilisés à l'eau de javel (10%) et rincés à l'eau distillée stérile sont mis à germer dans des boîtes de Pétri contenant du PDA.

Environ 0.1ml d'inoculum de la souche S10 est injecté à l'aide d'une pipette stérile au centre de tubes à essais contenant le milieu M. Les grains en germination sans contaminant sont ensemencés radicules en avant, dans les trous contenant l'inoculum. Au bout de 38 jours de croissance, les racines des jeunes plants au stade F4 sont prélevées pour observations aux microscopes à balayage (JEOL JMS-840A).

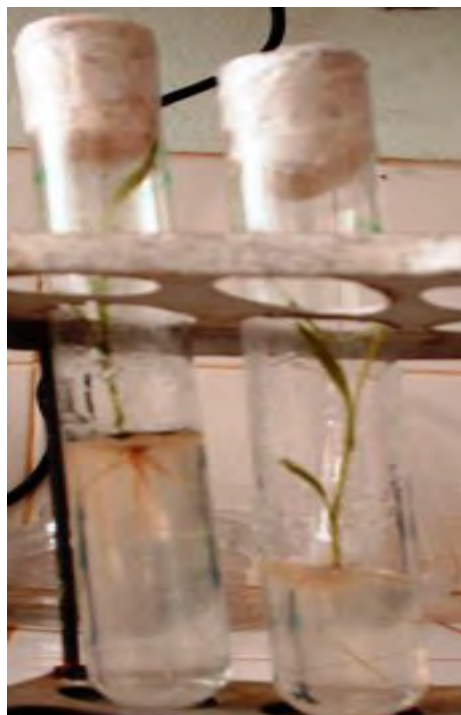


Figure 10: Essai d'inoculation du mil par la racine

III. RESULTATS

1. CULTURES SUR LAMES

Ces cultures ont permis d'observer les différents stades de développement du champignon. Ainsi nous avons pu observer des balles de spores de forme ovoïde, globulaire ou encore polyédrique. De ces balles se détachent parfois des spores qui apparaissent également globulaire à subglobulaire ou ovoïdes.

Certaines spores en germination présentent des filaments en formation qui correspondent au promycélium.

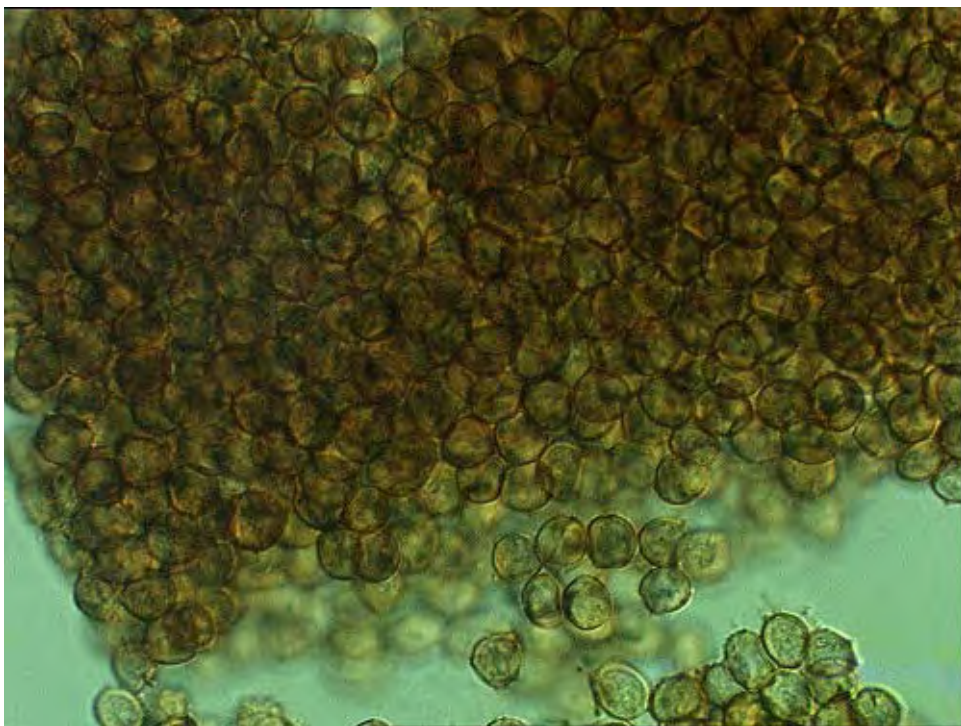


Figure 11 : Portion de balles de spores et quelques spores isolées

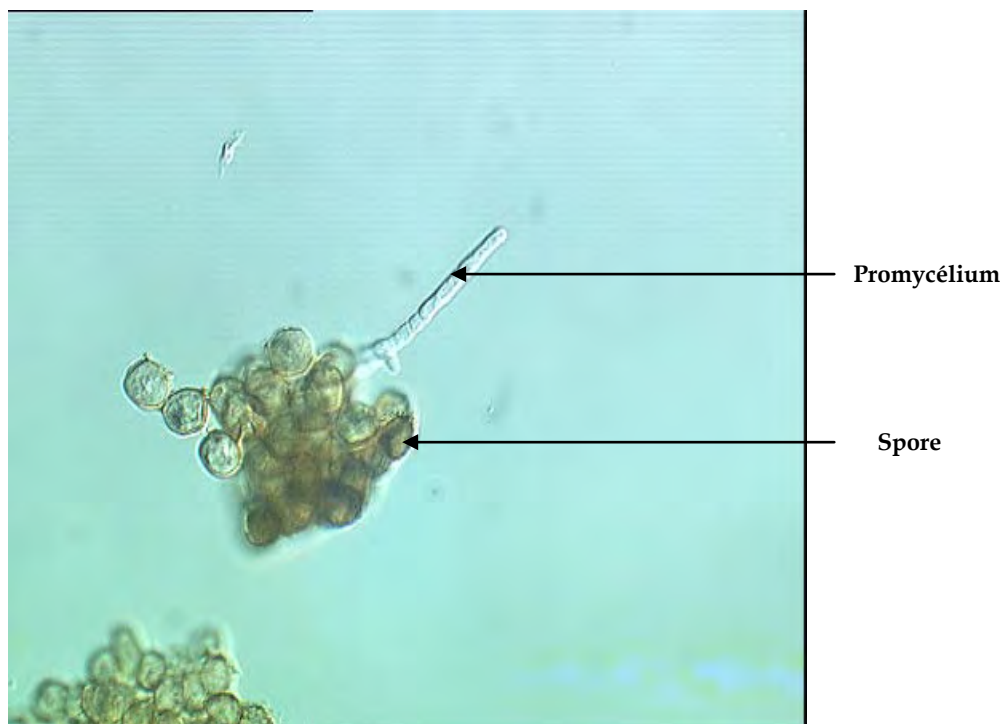


Figure 12 : Amas de spores avec une spore en germination

2. ISOLEMENT DES SOUCHES

Grâce à la méthode de dilution- étalement, onze (11) souches ont été isolées en se basant essentiellement sur leur aspect morphologique bien que les morphologies soient parfois très proches. Chacune de ces souches isolées est cultivée dans une boîte de pétri. Les souches sont dénommées S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10 et S11.

3. SOUCHES COMPATIBLES

Après suivi quotidien des cultures, nous n'avons pas pu observer de figures de conjugaison dans aucune des combinaisons même après une dizaine de jours d'incubation à l'étuve.

4. RESULTATS DES INOCULATIONS :

4.1 Agressivités des souches isolées :

Les inoculations faites à partir des différentes souches isolées, de la période allant du mois de Mai au mois de Juin, ont permis d'obtenir le tableau ci-dessous grâce à l'utilisation de l'échelle standard d'évaluation de la sévérité du

charbon du mil de l' ICRISAT. La lecture est faite pour chaque épi entre le quinzième (15) et le vingtième (20) jours à partir de la date d'inoculation. Pour chacune des souches, une seule répétition a été réalisée. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Résultats des inoculations Test

INOCULATIONS	SEVERITE (%)
souche (S1)	35
souche (S2)	20
souche (S3)	0
souche (S4)	0
souche (S5)	10
souche (S6)	0
souche (S7)	0
souche (S8)	1
souche (S9)	1
souche (S10)	50
souche (S11)	0

L'épi inoculé avec la souche S10 a été sévèrement attaqué avec 50% des grains potentiels transformés en sores.

Les souches S1, S2 et S5 se sont révélées assez virulentes avec des sévérités respectives d'attaque de 35%, 20% et 10%. Par contre les épis inoculés avec les souches S8 et S9 ont donné très peu de sores (1%) par conséquent ces souches se sont montrées nettement moins virulentes que les précédentes. Enfin les épis inoculés avec souches S3, S4, S6 et S7 n'ont présenté aucun sore.

Bien qu'ayant une morphologie très différente des souches précédentes, l'inoculation avec la souche S11 a été faite et aucun sore n'a été observé au niveau l'épi de mil au même titre que les souches S3, S4, S6 et S7.



Figure 13 : Sores (S) formés au niveau des épis de mil après 20 jours d'inoculation

4.2 Inoculations simples d'épis à partir des souches choisies:

Les inoculations simples ont permis d'avoir des résultats qui ont été consignés dans le tableau ci-dessous :

Tableau N°3 : Résultats des inoculations simples

EPIS INOCULATIONS	EPI 1	EPI 2	EPI 3	EPI 4
TEMOIN	0	0	0	<1
S1	0	<1	0	0
S10	20	90	75	90
S7	0	0	0	0
S8	0	0	0	<1

Les épis témoins n'ont pas présentés d'attaque sauf l'épi 4 avec moins de 1% de sévérité d'attaque.

Les inoculations faites avec la souche S7 ont été inefficaces sur l'ensemble des épis inoculés qui n'ont présenté aucun symptôme de la maladie. Un seul épi inoculé avec la souche S8 a présenté les symptômes de la maladie (<1%), les autres épis ne sont pas attaqués par le champignon.

La souche S1, agressive au cours de la phase test avec un pourcentage de sévérité d'attaque de 35%, s'est révélée particulière inefficace avec un seul épi attaqué avec moins de 1% de grains sont transformés en sores. Contrairement à la souche S1, tous les épis inoculés avec la souche 10 (souche la plus virulente pendant la phase test) ont présentés des sévérités respectives d'attaques de 20%, 90%, 75% et 90% pour les épis 1, 2, 3 et 4 selon toujours l'échelle de l'ICRISAT.

4.3 Inoculations simples à partir de filtrat de la souche S10 :

Les plantes inoculées avec le filtrat FS10 n'ont pas montrées la présence de sores. Cependant les grains de ces plantes se sont montrés nettement plus gros

en comparaison avec ceux des épis témoins. Les grains des épis inoculés avec les différentes souches ont présenté des tailles plus importantes que ceux des témoins.



Figure 13: Aspects des grains mil après une inoculation de 20 jours (témoin à droite)

4.4 Inoculation d'épis avec des combinaisons de souches :

Ces inoculations ont donné le tableau suivant :

Tableau 4 : Résultats des inoculations combinées

EPIS INOCULATIONS	EPI 1	EPI 2	EPI 3	EPI 4
TEMOIN	0	0	0	<1
S1-S10	10	10	10	20
S7-S8	0	0	0	0
S1-S7	<1	0	0	0
S1-S8	1	0	0	<1
S10-S7	5	10	<1	<1
S10-S8	90	60	20	–

La combinaison des souches S7 et S8 n'a donné aucun épi infecté. Il en est de même pour les inoculations combinées des souches S1 et S7 sauf pour l'épi 1 dont le pourcentage d'infection est en dessous de 1%. On observe cependant pour les inoculations combinées de la souche S1 et de la souche S8 un épi infecté à 1% et un autre à moins de 1% alors que les deux autres épis ne présentent aucun symptôme de maladie.

Les combinaisons entre la souche S10 et les autres souches ont été les plus agressives. Ainsi les sévérités d'attaque ont pu atteindre 90% notamment pour les combinaisons entre la souche S10 et de la souche S8. Les attaques sont plus faibles pour la combinaison entre S10 et S7 avec des pourcentages respectives de 5%, 10%, 10% et moins de 1% pour les épis 1, 2, 3 et 4.

La combinaison des souches virulentes S10 et S1 s'est montrée moins agressive que la combinaison d'une souche virulente (S10) et d'une souche non virulente (S8). Ainsi les épis 1, 2 et 3 ont présenté, selon toujours l'échelle de

sévérité d'attaque de l'ICRISAT, un pourcentage d'attaque de 10%. Cependant l'épi 4 a été attaqué avec 20% de sores présents sur l'épi.

Les résultats les plus significatifs ont été obtenus avec les inoculations combinées des souches S10 et S8 avec 90% de sévérité d'attaque pour l'épi 1, 60% pour l'épi 2, 20% pour l'épi 3 et l'épi 4 n'a pas présenté de symptômes.

Il faut noter que la souche S10 inoculée seule a été plus agressive que les combinaisons réalisées avec cette souche sauf pour la combinaison S10-S8.

4.5 Inoculations par les racines :

Cette inoculation a permis de mettre en évidence la possibilité de pénétration du champignon par les racines. L'observation au microscope optique nous permet de voir que le champignon forme (surtout à la base) un manchon au tour des racines. Les observations en microscopie électronique à balayage ont montré la présence de filaments mycéliens à l'intérieur des cellules de la racine.

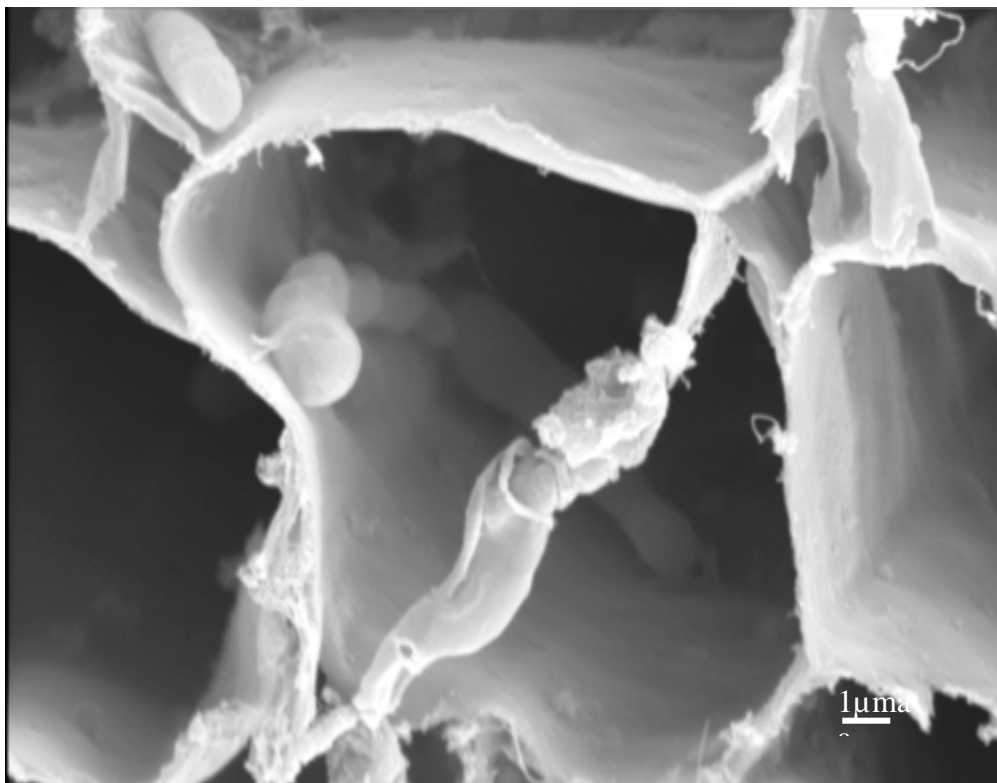


Figure 14: Pénétration du champignon dans la racine.

IV. DISCUSSION

La forme arrondie, ovoïde ou polyédrique des balles de spores décrites par Vánky K. (1986) a été confirmée par nos travaux sur la morphologie des balles de spores. Les cultures sur lames ont montré que les spores sont de formes globulaires ou ovoïdes et de couleur jaunâtre. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Piepenbring M. (1998) sur la morphologie des spores de *M. penicillariae*.

Certaines spores en germination ont présenté un promycélium. Ce promycélium est décrit par plusieurs auteurs dont Subba Rao and Thakur (1983) mais aussi par Wilson J.P. et al (1990). L'absence de promycélium pour la plupart des spores en germination pourrait s'expliquer par leur détérioration au cours des manipulations car ce sont des filaments très fragiles.

L'isolement des onze (11) souches a été réalisé en nous basant essentiellement sur des critères morphologiques. Bien qu'en mycologie, ces critères soient importants dans l'identification des souches, ils ne nous permettent plus à eux seuls d'affirmer avec certitude que nous sommes en présence de souches différentes. Selon Zambéttakis Ch. (1970), ces critères devraient être associés à des critères biologiques qui auraient une valeur appréciable. Cependant l'application de cette méthode nous a permis d'écarter la souche S11 de notre collection qui a présenté une morphologie très différente de celle des autres clones.

Sur les différentes combinaisons effectuées, aucune figure de conjugaison n'a été observée. Ce qui nous fait penser à une absence de compatibilité entre les différentes souches ; incompatibilité rencontrée chez la plupart des Ustilaginales dont *Ustilago maydis* d'après Snetselaar M. K. (1993)

Cependant cette absence de figure de conjugaison pourrait être corrélée à l'inadéquation du PDA pour ce type de culture et non à une incompatibilité entre souches qui est cependant un critère à ne pas écarter.

L'inoculation test faite au cours des mois de Mai et Juin a révélé essentiellement trois groupes de souches. Les clones (S1, S2, S5, S10) étant virulentes malgré une humidité faible peuvent être considérée comme des souches pathogènes surtout pour la souche S10.

Les souches (S8 et S9) bien que peu virulentes sont également des clones pathogènes. Enfin les souches (S3, S4, S6, S7) pas virulentes pourraient être considérées comme non pathogènes. Cette absence de pathogénécité peut s'expliquer par le fait que les conditions externes notamment d'humidité ne sont pas remplies pour une bonne expression des ces souches. Cependant certaines souches se sont montrées assez virulentes durant cette même période et dans les mêmes conditions.

Selon Zambéttakis Ch. (1978), cette absence de virulence peut être due soit à une auto-inhibition entre certains éléments du champignon (spores, promycélium, sporidies), soit à la production de facteur morbide entre lignées de la même espèce. La production chez une même lignée de sporidies haploïdes de même signe ou de même polarité peut être également à l'origine de l'absence de pathogénécité de certaines souches. Selon Zambéttakis Ch., le pouvoir pathogène devrait résulter en principe de l'accouplement de sporidies haploïdes de signes contraires et compatibles.

Nous pouvons ainsi considérer comme Wilson J.P. *et al* (1990) que les souches S3, S4, S6 et S7 sont tout simplement des souches non pathogènes du moins dans nos conditions expérimentales.

Ces inoculations nous ont permis également de montrer que nous sommes effectivement en présence de souches différentes en ce qui concerne le pouvoir pathogène même si de ce point de vu les souches S3, S4, S6 et S7 d'une part et les souches S8 et S9 d'autre part semblent présenter des similitudes.

Les inoculations simples faites, pendant l'hivernage, avec les quatre souches choisies (S1, S10, S7 et S8) ont montré une nette augmentation de la virulence de la souche S10. Ceci étant probablement dû à une augmentation de l'humidité au cours de l'hivernage car l'humidité, selon Bhatt, est un facteur favorisant le

développement du champignon. Par contre les souches (S7 et S8) ont présenté une virulence similaire à celle obtenue pendant la phase test.

La souche S1 a présenté une baisse importante de sa pathogénicité ; baisse probablement due à une perte d'agressivité au cours du temps ou des différents repiquages effectués lors de ces inoculations. Ces phénomènes sont observables chez beaucoup d'*Ustilaginales*.

L'augmentation importante de la taille des grains des épis inoculés avec les filtrats de cultures de la souche S10 par rapport aux grains des témoins pourrait s'expliquer par la production par le champignon de substance qui entraînerait une hypertrophie des grains ; hypertrophie des tissus infectés de l'hôte mise en évidence par Léye D. G. (1993).

Les résultats de nos travaux, en ce qui concerne les inoculations combinées, ont montré une compatibilité entre certaines souches (S10-S8) que Worrall J. J. (1997) nomme compatibilité sexuelle ou interfertilité. Cela s'est traduit pour cette combinaison par des attaques pouvant aller jusqu'à 90% de grains transformés en sores. Ceci confirme les travaux de Wilson J.P. *et al* (1990) sur l'existence de facteurs additifs du pouvoir pathogène chez *M. penicillariae*. Cependant la souche S10 a présenté à elle seule des pourcentages similaires.

Pour les combinaisons suivantes S1-S10 et S10-S7, nous pouvons penser qu'il y 'a eu des phénomènes d'incompatibilités sexuelles ou interstériles entre souches mis en évidence par les travaux de Worrall J. J. (1997) ; incompatibilité parce que la souche S10 est plus efficace lorsque elle est inoculée seule qu'en combinaison avec les clones S1 et S7. On pourrait également penser que les souches S7 et S1 ont une action inhibitrice sur la souche S10 car entraînant une baisse de son agressivité contrairement à l'association S10 et S8.

Nous avons mis en évidence la possibilité de pénétration du charbon du mil (*M. pénicillariae*) par les racines. Ces résultats sont en accord avec ceux de Léye G.D. (2005).

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les différentes cultures effectuées sur lames, nous ont permis de voir que les balles de spores ainsi que les téliospores sont de formes ovoïdes arrondies ou polyédriques.

Les téliospores en germination présentent des filaments qui correspondraient au promycélium ou baside.

Les combinaisons effectuées n'ont pas permis d'observer des figures de conjugaisons entre souches compatibles. Ceci serait-il dû à une inadéquation des milieux utilisés pour ces combinaisons ?

La méthode dilution-étalement a permis d'isoler onze (11) souches suivant leur aspect morphologique. Les inoculations test effectuées avec ces différentes souches ont permis de confirmer que ces souches présentent des différences notamment du point de vue de la pathogénicité même si certaines souches semblent identiques comme les souches S3, S4, S6 et S7 et les souches S8 et S9.

Les différentes inoculations réalisées hors saison et pendant l'hivernage avec les quatre souches sélectionnées ont permis de dégager trois (3) groupes de souches :

- ✓ La souche S1 qui a perdu sa virulence entre la phase test (Mai à Juin) et les inoculations réalisées pendant l'hivernage (Août).
- ✓ La souche S10 dont la virulence a globalement augmenté grâce probablement à l'humidité.
- ✓ Les souches S7 et S8 qui n'ont pas été agressives au cours des différentes inoculations sont considérées comme des souches non pathogènes.

De tout ceci, nous pouvons retenir qu'un même sore peut libérer plusieurs clones différents.

Nous n'avons pas observé de sores lors de l'inoculation des épis avec le filtrat de culture de la souche S10 mais cela a permis de voir que les grains

issus de cette inoculation sont effectivement de tailles plus importantes que les grains des épis témoins.

On note enfin une possibilité de pénétration du champignon dans les tissus des racines de l'hôte.

Pour la réalisation des différentes combinaisons, il serait intéressant de voir quels sont les types de milieu qui favoriseraient ces combinaisons mais également les conditions de la mise en place de ce type de manipulation.

Il serait utile de déterminer les facteurs qui sont à l'origine de la compatibilité ou non des souches de *M. pénicillariæ*.

Il serait également intéressant d'isoler et de déterminer les produits ou facteurs qui seraient à l'origine de l'hypertrophie des ovaires attaqués par le champignon.

Nous préconisons la détermination et l'utilisation des facteurs d'auto-inhibition et de morbidité chez les Ustilaginales pour limiter les incidences de la maladie en les utilisant comme antifongique. Cependant il faudrait s'assurer de la non toxicité de ces produits pour l'environnement, les hommes et les animaux.

L'amélioration de la production du mil et la limitation de l'action de ces ennemis passeront par l'utilisation des champignons mychoriziens car pour beaucoup d'auteurs l'association mycorhizienne peut entraîner une stimulation du système de défense des plantes (Dehne et Schönbeck, 1979).

La pénétration du champignon dans les racines des pieds de mil étant effective, il serait intéressant de suivre leur évolution jusqu'à la formation de l'épi et voir s'il y'aura formation de sores.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bécard G. & Fortin J.A., (1988).** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108. 211-218.
- Bhatt R.S. (1946).** Studies in the Ustilaginales. I .The mode of infection of the bajra plant (*Pennisetum thyphoides* Stap. and Hubbard), by the smut *Tolyposporium penicillariae* Bref. *J. Indian Bot. Soc.* 25. 163-186.
- Boulama M., Daouda M., Labo M., (1993).** Agrométéorologie du mil. *Rapport CMag. Organisation mondiale météorologique.* 04-09.
- Broutin C., Sokona K., Tandia A. (2000).** Aperçu de la filière céréale au Sénégal. *GRET-Enda graf.* P 1-19.
- Centre d'échange sur la diversité biologique du Tchad.** 1999-2004
- Charrier A., Jacquot M., Hamon S., Nicolas D. (1997).** L'amélioration des plantes tropicales. *Editeurs scientifiques.* P 457-482
- Chavan S.B., Thakur R.P., Roa K.P. (1988).** Inheritance of smut resistance in Pearl Millet. *Pl. Dis. Res.* 192-197
- Chevaugéon J. (1952).** Maladies des plantes cultivées en moyenne-casamance et dans le delta central nigérien. *Pathologie végétale et d'entomologie agricole de France.* T.XXXI N°1.
- C.M.I (1965).** *Tolyposporium penicillariae. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria N°77.* 01-02
- CNRA (Centre National de Recherches Agronomiques) de Bambey (1986).** Evaluation de l'impact des principales maladies du mil pendant l'hivernage 1986. 57-64
- Dehne H.W. et Schöbeck F. (1979).** The influence of endotropic mycorrhiza on plant diseases. II. Phenol metabolism and lignification. *Phytopathol. Z.* 95. 210-2116
- FAO (1997).** L'économie mondiale du sorgho et du mil : Faits, tendances et perspectives. P31-53.
- FAO (1996).** Annuaire de production, 1995. Rome. Italie.

FAO (1995). Le mil et le sorgho dans l'alimentation humaine. *Collection alimentation et Nutrition* N°27.01-07

[Http://www.ars.usda.gov/IS/np/pearlmillet/qs.htm](http://www.ars.usda.gov/IS/np/pearlmillet/qs.htm)

<http://www.cSDL.tamu.edu/FLORA/taes/tracy/610/pennisetum.html>

<http://www.icrisat.org/>

<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecords.asp?RecordID=324645>

<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=317784>

Http://tchad.ipm-info.org/guide/mil_penicillaire.htm#charbon.

Kevin K. Sedivec and Blaine G. Schatz (1991). Pearl Millet Forage Production in North Dakota.

Kousik C.S., Thakur R.P., Subbaroa K.V. (1988). Influence of environmental factors on production and dispersal of *Tolyposporium pénicillariae* sporidia. *ICRISAT*. 85-91

Lathan M.C. (2001). La nutrition dans les pays en développement. *FAO*. 12-14

Lèye Gnagna Diagne (2005). La pathologie du charbon du mil [*Pennisetum glaucum* (L.) R. BR.]- *Moesziomyces penicillariae* (Brefield) Vánky : Phylogénie, Biocycle, Variabilité génomique de l'agent pathogène et Relation hôte-parasite. *Thèse d'état*. 52-54

Lèye Gnagna Diagne (1993). Etude de quelques aspects de la biologie et de la physiologie des relations parasitaires du charbon du mil (*Tolyposporium penicillariae* Bref). *Thèse troisième cycle*. 01-102

MAAARO (2002). Gestion du sol et des fertilisants : culture couvre-sol. *Guide agronomique de grandes cultures*.

Martinez C., Jauneau A., Roux C., Savy C., Dargent R. (2000). Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f.sp *zeae*. *Protoplasma* 213. 83-92

Mbaye D.F. (1993). Contraintes phytosanitaires du mil dans le sahel : Etat des connaissances et perspectives. *ISRA/CNRA*. 179-180

Maiti R.K. and Bidinger F.R. (1981). Growth and development of the Pearl Millet Plant. *ICRISAT*, bulletin n°6. 02-13

- Pathak V.N. and Shekhawat B.S. (1980).** Physiological studies on *Tolyposporium penicillariae*. 208-211.
- Piepenbring M. (2003).** Smut Fungi (Ustilaginomycetes P.P and Microbotryales, Basidiomycota). *Flora Entropic*. 76-78.
- Piepenbring M., Bauer R., Oberwinkler F. (1998).** Teliospores walls and the development of ornamentation studied by electron microscopy. *Protoplasma*.188-189.
- Piepenbring M., Hagedorn G., Oberwinkler F. (1998).** Spore liberation and dispersal in Smut Fungi. *Botanica Acta*. 445-458
- Roger L. (1951).** Phytopathologie des pays chauds. *Edition le chevalier*. Tome1. 775-777.
- ROCAFREMI (2002).** Tendances et contraintes à la production du Mil dans les pays membres du Réseau Ouest et Centre Africain de la Recherche sur le Mil. 4-5.
- Sharma Sushil (1999).** Status of pearl millet smut in relation to time of sowing south-western Haryana.
- Snetselaar K.M. (1993).** Microscopic Observation of *Ustilago Maydis* Mating Interactions. *Experimental Mycology* 17.345-355.
- Subba Rao K.V., Thakur R.P. (1983).** *Tolyposporium penicillariae*, the causal agent of pearl millet smut. 597-603
- Thakur R.P., King S.B. (1988).** Smut disease of Pearl millet. *ICRISAT. Information bulletin N°25*.05-15
- Thakur R.P., Subba Rao K.V., Williams R.J (1983).** Effects of pollination on smut development in pearl millet. 141-144.
- Thakur R.P., Subba Rao K.V., Williams R.J (1983),** Evaluation of a new field screening technique for smut resistance in Pearl Millet. Vol 73 N° 9. 1255-1258.
- Van Der Zon A.P.M. (1992).** Graminées du Cameroun.2.Flore. Wageningen Pays Bas, Wageningen Agricultural University Papers n°92-1.557
- Ványk Kálman (2002).** Illustrated Genera of Smut Fungi. Second edition.102-104.
- Ványk Kálman (1986).** *Moesziomyces*. *Bot.* 102-105

- Ványi Kálman (1977).** *Moesziomyces*, a new genre of Ustilaginales. *Bot. Notiser.* 130-131.
- Wells H.D. (1967).** Effectiveness of two 1, 4-oxathiin derivatives for control of *Tolyposporium penicillariae* smut of pearl millet. *Plant Disease Reporter.* Vol51. 468-469.
- Wells H.D., Burton G.W., Ourecky D.K. (1963).** Tolyposporium smut, a new disease on pearl millet, *Pennisetum glaucum*, in the United States. *Plant Disease Reporter.* Vol 47(1).
- Wells H.D., Hanna W.W., Burton G.W. (1987).** Effect of Inoculation and Pollination on Smut Development in Near-Isogenic Lines of Pearl Millet. *Phytopathology* 77; 293-296.
- Westphal E., Ferwerda J.D., Van Gils-Meeus H.A.E., Mutsaers, Westphal-Stevels J.M.C. (1985).** Cultures vivrières tropicales avec référence spéciale au Cameroun. *Pudoc Wageningen.* P 52-104.
- White R.O., Moir T.R.G., Cooper J.P. (1959).** Graminée en agriculture. *FAO.*
- Wilson J.P., Bondari K. (1990).** Quantitative Genetic Analysis of Pathogenicity and Virulence of *Moesziomyces penicillariae*. *Phytopathology* 80; 1173-1176.
- Worrall J. J. (1997).** Somatic incompatibility in basidiomycetes. *Mycologia* 89, P 24-36.
- Zambettakis Ch. (1979).** Recherche sur les Ustilaginales (supplément sur les espèces africaines). *Extrait tome 95.* 393-397
- Zambettakis Ch. (1978).** La sexualité chez les Ustilaginales. *Revue mycologique.* Tome 42. 13-31
- Zambettakis Ch. (1977).** La sexualité chez les Ustilaginales. *Revue mycologique.* Tome 41. 469-488
- Zambettakis Ch. (1970).** Les caractères qui régissent la classification des Ustilaginales. *Tome XXXIV, Fasc.5.* 399-410

