

# **Isolement et identification par des méthodes culturales et moléculaires de souches d'*Armillaria mellea* (Vahl:Fr) Karst. dans les érables d'un parc public**

Autor(en): **Casali, Sabrina / Job, Daniel**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **127 (2004)**

PDF erstellt am: **13.06.2023**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-89619>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# ISOLEMENT ET IDENTIFICATION PAR DES MÉTHODES CULTURALES ET MOLÉCULAIRES DE SOUCHES D'*ARMILLARIA MELLEA* (VAHL:FR) KARST. DANS LES ÉRABLES D'UN PARC PUBLIC

SABRINA CASALI & DANIEL JOB

Laboratoire de Microbiologie, Université de Neuchâtel, Emile Argand 11, CP 2, 2007 Neuchâtel, Suisse.

*Mots-clés:* *Armillaria mellea*, *Acer platanoïdes*, PCR, RFLP, pourriture du tronc et des racines.

*Key-words:* *Armillaria mellea*, *Acer platanoïdes*, PCR, RFLP, roots and trunks rot.

## Résumé

Depuis quelques mois, des érables d'un parc public de Neuchâtel, âgés de 100 à 200 ans, présentaient des signes de dépérissement évident. Pour déterminer l'origine de la maladie, nous avons isolé et déterminé par des méthodes culturelles et moléculaires (analyse de la région IGS1) les mycéliums fongiques obtenus des racines et troncs des arbres affectés. Autant les critères culturels que les résultats de la RFLP et le séquençage nous ont confirmé la présence d'au moins deux individus différents d'*Armillaria mellea* répandus sur plusieurs dizaines de mètres.

**Abstract:** *Isolation and determination using cultural and molecular techniques of Armillaria mellea strains on maple trees in a public garden.*

Several months since, in a public garden in Neuchâtel, 100 to 200 years old maple trees have showed evident signs of decay. In order to identify the source of the disease, we used cultural and molecular (IGS1) techniques to isolated and determined the living mycelia present in the infected roots and trunks. Both cultural and RFLP analyses indicated that at least two strains of *Armillaria mellea* were the causal pathogen agent.

## INTRODUCTION

Le Jardin du Prince, d'une surface d'environ 4600 m<sup>2</sup>, est un très ancien parc public datant du début du XIX<sup>ème</sup> siècle et situé en plein cœur de la Ville de Neuchâtel, en Suisse romande (carte 1:25000, n° 1164 Neuchâtel, 204 625/560 875).

A l'intérieur de ce parc, le Service des Parcs et Promenades de la Ville a pu constater que, depuis quelques mois, certains érables planes (*Acer platanoïdes* L.) âgés d'environ 70, 130, 140, 160, 170 et 200 ans, ainsi qu'un érable sycomore (*Acer pseudoplatanus* L.) âgé de 140 ans environ, présentaient des signes évidents de dépérissement.

Le problème des arbres malades dans les parcs et jardins est fréquent. Il existe par ailleurs une abondante bibliographie traitant de nombreuses maladies fongiques dont certaines peuvent causer des dégâts importants aux plantes et même provoquer leur mort en peu de temps (NIENHAUS *et al.*, 1999). Ainsi un arbre malade et dépérissant doit être abattu pour des raisons évidentes de sécurité dans un lieu public. Cependant, l'abattage d'arbres représente un coût important en temps, en argent et en personnel et de plus, l'impact esthétique n'est pas négligeable, surtout lorsqu'il s'agit d'arbres d'âge respectable. Dès lors, il paraît évident de tout mettre en œuvre afin de limiter au strictement nécessaire le nombre d'abattages.

Avant d'entreprendre des travaux de réaménagement dans le Jardin du Prince et afin de ne pas compromettre la survie de nouvelles plantations, le Service des Parcs et Promenades de la Ville de Neuchâtel a souhaité connaître avec certitude la cause du déclin de ces arbres. Une collaboration scientifique a donc été établie pour tenter de trouver, isoler et déterminer l'agent pathogène responsable du dépérissement de ces érables.

Dans la présente étude, nous avons entrepris d'identifier la maladie en fonction des signes et symptômes, d'isoler et d'identifier l'agent causal de la maladie à partir des arbres malades grâce à l'utilisation de techniques culturales et de la biologie moléculaire et d'établir la présence d'un ou de plusieurs individus pathogènes agissant simultanément.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

La mise en évidence de la présence de champignons pathogènes dans les érables du Jardin du Prince a nécessité :

##### ***Un travail sur le terrain :***

- *Visite des lieux et inventaire des signes et symptômes*

Au début du mois de septembre 2002, nous nous sommes rendus au Jardin du Prince en compagnie de collaborateurs du Service des Parcs et Promenades. Grâce à leurs connaissances et après avoir attentivement observé les érables malades répertoriés, nous avons établi une liste des symptômes. Nous avons également cherché d'éventuels signes traduisant la présence d'un champignon pathogène.

##### • *Echantillonnage*

Nous avons prélevé des échantillons d'écorce et/ou de racine sur les arbres malades. Nous avons aussi prélevé des échantillons d'écorce et de racine sur un tilleul sain, afin d'avoir un témoin négatif.

Dans la mesure du possible, nous avons prélevé des morceaux d'écorce contenant, sur leur face intérieure, du mycélium. Pour des raisons d'hygiène, ils ont été prélevés à environ 1 m du sol, zone difficilement accessible aux chiens.

En ce qui concerne les échantillons de racine, ils ont été prélevés sur des racines ayant une consistance spongieuse. Nous avons veillé à les prendre à l'intérieur de la racine afin d'éviter des contaminations avec des particules de terre.

Les échantillons ont été emballés individuellement dans des sachets comportant la date et le lieu de prélèvement ainsi que le n° de l'arbre et la partie prélevée (écorce ou racine).

##### • *Collecte des carpophores*

De nombreuses touffes de carpophores étant apparues dans le Jardin du Prince, nous en avons profité pour en prélever un par touffe, d'âge peu avancé.

##### ***Un travail en laboratoire :***

##### • *Méthodes culturales*

Les milieux complexes sur gélose suivants ont été utilisés pour la mise en culture des échantillons et des carpophores

ainsi que pour l'isolement et le repiquage de mycéliums:

- milieu au benomyl (milieu anti-moisissures)
- milieu à la streptomycine (milieu anti-bactérien)
- milieu malt-agar.

Ils ont été préparés selon PRINCE-SIGRIEST & JOB, 1996.

Toutes les manipulations d'isolement et de repiquage se sont déroulées de manière stérile, sous hotte et flux laminaire, dans le but de minimiser les risques de contamination.

Après avoir brisé les échantillons d'écorce, de racine et les carpophores, de manière à accéder à leurs parties non exposées, nous en avons prélevé de tout petits fragments (maximum 2 mm x 5 mm) à l'aide de brucelles. Nous avons ensuite déposé ces fragments sur les milieux solides en les enfonçant légèrement.

Pour isoler et purifier les mycéliums obtenus, nous avons repiqué, dans un milieu malt-agar, la partie du mycélium la plus éloignée issue des fragments d'échantillons. Nous avons répété l'opération jusqu'à l'obtention d'une culture axénique.

Pour déterminer, par le biais des méthodes culturales, le nombre de pathogènes impliqués, nous avons procédé à des tests de confrontation somatique (compatibilité somatique) selon la méthode de RAYNER & BODDY, 1986.

#### • Méthodes moléculaires

##### PCR avec extraction préalable de l'ADN

Cette technique de réaction en chaîne de la polymérase (ou Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier des millions de fois, en quelques heures, des fragments d'ADN *in vitro*. La PCR est l'étape indispensable afin de produire une quantité suffisante du fragment d'ADN étudié et pour pouvoir ensuite utiliser les autres techniques (RFLP, Séquençage). Dans le cadre de notre recherche, nous avons étudié l'IGS 1 (Intergenic Spacer, ou espace intergénique), une des régions de l'ADN ribosomique. Chez

les champignons supérieurs, l'IGS1 présente de telles variations de longueur et de séquence à l'intérieur d'une même espèce qu'il est possible de les utiliser pour déterminer la variabilité des souches d'Armillaires (WHITE *et al.*, 1998). Avant de procéder à la PCR, nous avons préalablement extrait l'ADN fongique de nos cultures pures en milieu solide.

##### RFLP

Le principe de base de cette technique de polymorphisme de taille des fragments de restriction (ou Restriction Fragment Length Polymorphism) consiste à découper la molécule d'ADN grâce à des endonucléases de restriction. Ces enzymes de restriction sont capables de reconnaître de courtes séquences nucléotidiques spécifiques dans les molécules d'ADN et d'effectuer une coupure à des points précis de ces séquences.

Les fragments d'ADN obtenus après la restriction fournissent, par électrophorèse, un profil caractéristique (RFLP).

##### Séquençage

Le séquençage est une méthode qui permet de déterminer l'enchaînement des nucléotides composant les molécules d'ADN pour pouvoir les comparer et dénombrer les souches présentes parmi les échantillons.

Une fois les séquences déterminées, nous avons utilisé le logiciel GeneBase (Comparison and Analysis of Nucleic Acid Sequences, Version 1.0, © 1998 by Applied Maths) afin d'aligner les séquences de nos échantillons et de les comparer entre elles.

## RÉSULTATS

### *Visite des lieux et inventaire des signes et symptômes*

Lors de notre visite des lieux nous avons constaté que la répartition des arbres malades s'étendait à l'ensemble du parc et non à

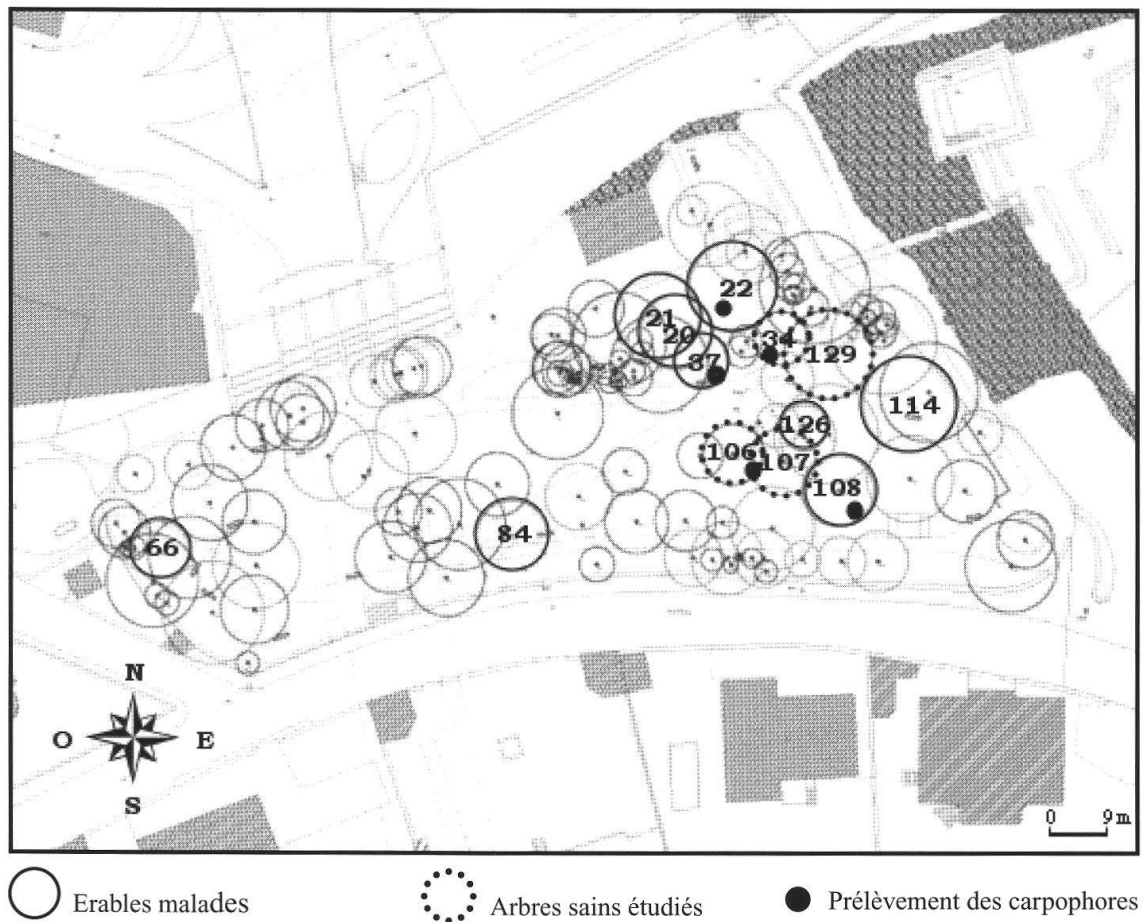


Figure 1: Répartition des arbres étudiés au Jardin du Prince.

une zone isolée de celui-ci. La répartition des arbres malades répertoriés ainsi que l'emplacement des arbres non malades pris en considération dans notre recherche sont indiqués dans la figure 1.

Le tableau 1 montre les différents signes et symptômes observés sur les arbres étudiés, y compris les carpophores apparus sur le sol après le prélèvement d'échantillons d'écorce et de racine. Pendant le déroulement de notre recherche, le Service des Parcs et Promenades de la Ville de Neuchâtel a procédé à l'abattage de plusieurs érables dans le Jardin du Prince. Ainsi, au mois de novembre 2002, l'arbre n° 37 a été abattu, et au mois de mars 2003, les arbres n° 66 et 84 ont subi le même sort. Leur abattage nous a permis

de constater qu'ils présentaient tous une pourriture du cœur.

Nous devons indiquer qu'aucun signe (manifestation visible du pathogène) n'a été observé sur les arbres n° 20, 21, 114 et 126 (fig. 1) bien que ceux-ci présentaient des symptômes (réponse morphologique ou physiologique du pathogène) de la maladie. De plus, des carpophores sont apparus au pied de l'arbre n° 34 et entre les arbres n° 106 et 107 alors que ceux-ci n'avaient pas été répertoriés comme étant malades.

#### *Isolement de l'agent pathogène par des méthodes culturales*

Les méthodes culturales se sont révélées être efficaces puisqu'elles nous ont permis de déceler la présence de champignons

N° DE L'ARBRE	SIGNES	LOCALISATION DES SIGNES	SYMPTÔMES
20	-	-	Branches mortes + Pourriture de l'écorce
21	-	-	Branches mortes + Ecorce fissurée
22	Carpophores	Au pied de l'arbre	1 + 3
34	Carpophores	Au pied de l'arbre	-
37	Quelques mycéliums couleur crème dont la texture rappelle fortement celle d'une « peau de chamois »	A l'intérieur de l'écorce et sur le tronc nu	1 + 3 + 5
	Carpophores	Sous l'écorce + Au pied de l'arbre et tout au long de nombreuses racines	
66	Carpophores	Au pied de l'arbre	1 + 3 + 4 + 5
84	Quelques mycéliums couleur crème dont la texture rappelle fortement celle d'une « peau de chamois »	A l'intérieur de l'écorce et sur le tronc nu	1 + 2 + 3 + 4 + 5
	Carpophores	Au pied de l'arbre	
106/107	Carpophores	Entre les deux arbres	-
108	Carpophores	Au pied de l'arbre	1 + 2 + 3
114	-	-	Branches mortes
126	-	-	Cime morte + Suspicion de tronc creux

**Tableau 1:** Inventaire des signes et symptômes

- 1 : Jaunissement et perte des feuilles prématurés  
 2 : Racines de consistance spongieuse  
 3 : Ecorce détériorée par endroits et s'enlevant facilement à la main  
 4 : Base du tronc laissant parfois apparaître un creux  
 5 : Pourriture du cœur  
 - : Absence de signes ou de symptômes

PÉRIODE	N° DE L'ARBRE	PARTIE DE L'ARBRE RÉCOLTÉE	MYCÉLIUMS APPARUS
Septembre 2002	37	Ecorce	Contaminants * + Mycéliums X
Septembre 2002	22	Racine	Aucun
	84	Racine	Contaminants * + Mycélium Y
	108	Racine	Aucun
Octobre 2002	84	Ecorce	Mycéliums Y
Novembre 2002	37	Ecorce	Contaminants *
	66	Ecorce	Contaminants * + Mycélium Z
		Racine	Aucun
	129	Ecorce	Contaminants *
		Racine	Contaminants *

**Tableau 2** : Mycéliums apparus suite à la mise en culture des échantillons

\* Les contaminants observés étaient principalement des moisissures du genre *Penicillium*, *Trichoderma* et des Mucorales *sensu lato* (Zygomycètes).

dans certains échantillons récoltés et mis en culture. Dans le tableau 2, nous montrons les différents mycéliums apparus suite à la mise en culture des échantillons.

Pour l'arbre n° 37 (échantillonnage de septembre), nous avons obtenu des mycéliums X, provenant de deux échantillons différents (16 A Ecorce et 18 A Ecorce), et dont la morphologie de la colonie et des hyphes présentait les mêmes caractéristiques.

Pour l'arbre n° 84, nous avons obtenu des mycéliums Y (échantillonnages de septembre et d'octobre), provenant de quatre échantillons différents (84 II Racine,

A 84 III Ecorce, B 84 III Ecorce et C 84 III Ecorce) parmi lesquels trois morceaux d'écorce distants de 30 cm les uns des autres. Ici aussi la morphologie présentait les mêmes caractéristiques et nous pouvons déduire que le même mycélium avait donc contaminé l'arbre n° 84, aussi bien au niveau des racines qu'au niveau de l'écorce et à différents endroits de celle-ci.

Après développement, le mycélium Z, obtenu à partir de l'écorce de l'arbre n° 66, s'est révélé être vraisemblablement celui de *Morchella esculenta*, selon ses caractéristiques morphologiques et la formation des sclérotés (STAMETS, 1993).

Plusieurs échantillons d'écorce et/ou de racine ont été prélevés sur les arbres n° 22, 66 et 108, mais leur mise en culture n'a pas développé de mycélium, bien que des carpophores aient été observés au pied de ces arbres.

La mise en culture d'échantillons prélevés sur un tilleul sain (arbre n° 129, le témoin négatif) n'a pas non plus développé de mycéliums. Cependant, la réserve reste de mise étant donné que des arbres malades n'ont pas permis d'obtenir de mycélium de champignon supérieur (Basidiomycètes, Ascomycètes).

#### *Caractéristiques morphologiques des cultures pures*

Après isolement et plusieurs repiquages des mycéliums X et Y, nous avons obtenu une culture pure pour chacun d'entre eux. Les cultures obtenues présentaient des morphologies différentes au niveau de la colonie, bien que leurs hyphes étaient identiques au niveau microscopique.

Les cultures pures obtenues à partir d'échantillons d'écorce récoltés sur l'arbre n° 37 possédaient un mycélium duveteux, circulaire, blanc au début puis devenant brun-rose. Ces cultures pures produisaient des rhizomorphes bruns foncés à noirs dont la vitesse de croissance était supérieure à celle du mycélium. La croûte de ces cultures pures était découpée, de type lachnoïde.

Les cultures pures obtenues à partir d'échantillons d'écorce et de racine récoltés sur l'arbre n° 84 possédaient un mycélium duveteux, blanc au début puis devenant brun-rose et formant des cercles concentriques bien visibles. Ces cultures pures ne produisaient pas de rhizomorphes et leur croûte était clairement de type discoïde.

Les caractéristiques culturelles du mycélium isolé à partir de l'arbre n° 37 correspondaient bien à celles obtenues par différents auteurs lors de la culture *in vitro* des espèces du genre *Armillaria* (RISBETH, 1986; FOX & SANSON, 1996; MANSILLA VAZQUEZ *et al.*; 2000).

D'ailleurs, MARXMÜLLER (1994), qui a décrit en détail la morphologie et le mode de développement des mycéliums secondaires en culture chez les 5 espèces européennes du genre *Armillaria* (*A. borealis*, *A. ostoyae*, *A. gallica*, *A. cepistipes*, *A. mellea*), a remarqué que la morphologie des différents types mycéliens des Armillaires dépendait en grande partie des rhizomorphes. Lorsque les rhizomorphes étaient absents, il y avait formation, sous le mycélium de surface, d'un tissu plectenchymatique ressemblant à une croûte dite discoïde, tandis que lorsque les rhizomorphes proliféraient, il y avait formation d'une croûte découpée.

De ce fait, il peut arriver que deux espèces différentes d'Armillaire aient les mêmes caractéristiques culturelles ou qu'une même espèce se développe de plusieurs manières différentes.

Cette particularité ne nous a donc pas permis de déterminer de manière sûre l'espèce d'Armillaire présente dans les érables du Jardin du Prince, nos cultures pures ayant des morphologies différentes. Nous pouvions quand même supposer que nous étions en présence de deux cultures pures différentes appartenant au genre *Armillaria*.

#### *Carpophores*

Les carpophores apparus dans le Jardin du Prince à l'automne 2002 ont été déterminées comme appartenant au genre *Armillaria*.

Dans les guides de détermination (BON, 1988; BREITENBACH & KRÄNZLIN, 1991; COURTECUISSÉ, 2000) l'espèce présentant les caractéristiques morphologiques les plus proches des exemplaires que nous avons récoltés était *Armillaria mellea*. Cependant, il est mentionné pour cette espèce la présence de squamules sur le chapeau et sur le pied, éléments que nous n'avons pas observés sur les carpophores trouvés. Cette absence de squamules ne nous a pas permis de confirmer de manière sûre l'espèce de nos Armillaires.

*Mise en culture des carpophores*

La figure 1 montre l'emplacement des carpophores prélevés pour leur mise en culture, ceci dans le but de comparer leurs cultures pures avec celles obtenues à partir d'échantillons d'écorce et de racine.

Nous avons donc mis en culture des carpophores provenant d'une seule touffe (au pied de l'arbre n° 22 et entre les arbres n° 106 et 107), de deux touffes différentes (au pied des arbres n° 34 et 108) et de trois touffes différentes (au pied de l'arbre n° 37).

Malheureusement, les carpophores apparus au pied des arbres n° 66 et 84 n'ont pas pu être mis en culture car les uns ont été détruits et les autres étaient trop âgés.

Nous avons réussi à obtenir une culture axénique pour chacune des touffes de carpophores, soit au total 9 cultures pures.

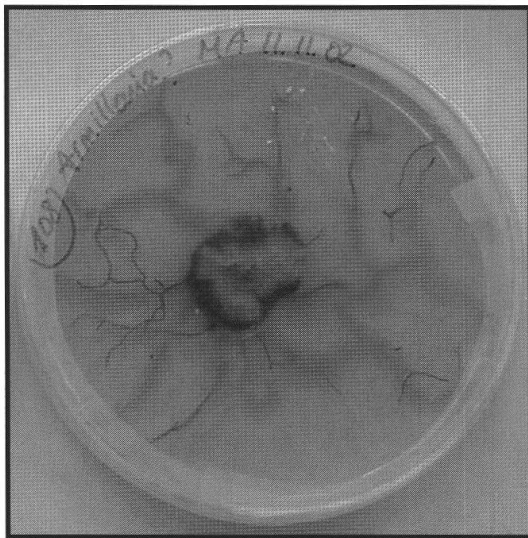
Nous avons observé que les 9 cultures pures obtenues à partir des carpophores présentaient les mêmes caractéristiques morphologiques, au niveau de la colonie et des hyphes, que les cultures pures obtenues à partir d'échantillons d'écorce de l'arbre n° 37 (figs. 2 et 3).

*Confrontations somatiques*

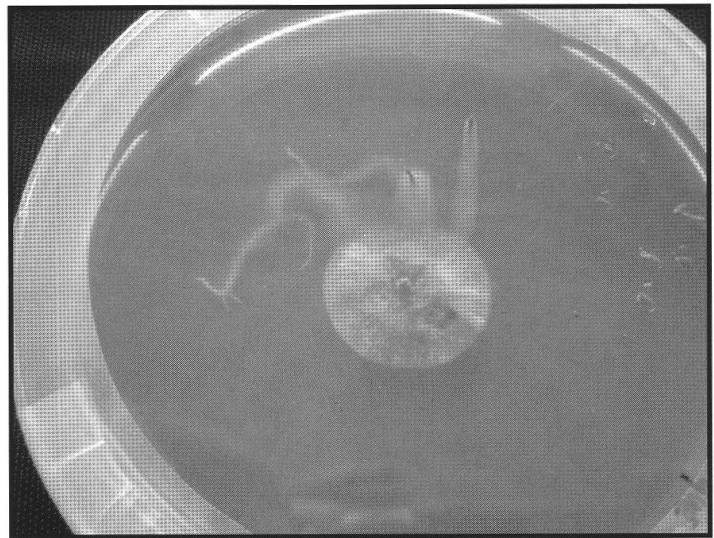
Aux fins d'analyser si ces cultures étaient compatibles entre elles, donc provenant d'un seul individu, nous avons effectué huit tests de confrontation somatique avec les cultures pures obtenues à partir des carpophores et des échantillons d'écorce et de racine.

Nous avons observé que les mycéliums des différentes cultures pures ne formaient ni barrière physique, ni barrière chimique bien distinctes entre elles. Cependant, nous n'avons pas non plus observé de mélange homogène et régulier des mycéliums. Certains mycéliums sont clairement entrés en contact avec d'autres mais sur une petite surface uniquement; la croissance de ces mycéliums étant restée très limitée dans la zone centrale, entre les différentes cultures pures.

De plus, même deux mycéliums provenant d'un échantillon identique ne se sont pas clairement mélangés. Au vu de ces résultats, nous n'avons pas pu déterminer de manière sûre, avec ce test cultural de confrontation somatique, si nos cultures pures appartenaient à une ou plusieurs souches différentes.



**Figure 2:** Culture pure obtenue à partir d'une fructification apparue au pied de l'arbre n° 108.



**Figure 3:** Culture pure obtenue à partir de l'écorce de l'arbre n°37.

### Méthodes moléculaires

Les méthodes culturales ne nous ayant permis ni de déterminer avec certitude l'espèce du champignon isolé, ni de connaître le nombre de souches d'Armillaire isolées dans les érables du Jardin du Prince, nous nous sommes alors dirigés vers différentes méthodes moléculaires afin de remplir ces lacunes.

#### PCR avec extraction préalable de l'ADN fongique

Nous avons procédé à l'extraction de l'ADN fongique pour chacune des cultures pures indiquées dans le tableau 3.

Les éluats d'ADN ainsi obtenus ont pu être utilisés pour l'amplification par PCR dont les résultats nous ont permis de définir, pour chaque échantillon, la longueur de l'IGS 1 en nombre de paires de bases (pb).

Dans le cas présent, l'IGS 1 de tous les échantillons présentait la même longueur, à savoir environ 872 pb. Cette valeur était très proche des 875 pb mesurées par certains auteurs pour *Armillaria mellea* (MANSILLA VAZQUEZ *et al.*, 2000; PROSPERO *et al.*, 1998; HARRINGTON & WINGFIELD, 1995).

D'autres auteurs ont obtenu une valeur de 872 pb pour *Armillaria borealis*, *A. cepistipes*, *A. gallica* et *A. ostoyae* (CHILLALI *et al.*, 1998) alors que pour *A. mellea* ils ont obtenu 835 pb.

Afin de connaître de manière sûre l'espèce du champignon présent dans les érables du Jardin du Prince, nous avons procédé à une digestion enzymatique des produits PCR au moyen de la RFLP.

L'analyse visuelle des fragments obtenus grâce à la digestion enzymatique des échantillons a permis de confirmer la présence d'*Armillaria mellea* dans les érables du Jardin du Prince.

Pour déterminer la longueur des fragments de restriction de chaque échantillon, nous avons pris en considération les 2<sup>èmes</sup> et 3<sup>èmes</sup> bandes, les 1<sup>ères</sup> étant moins nettes. Nous avons ensuite déterminé leur longueur

N° DE L'ÉCHANTILLON	NOM DE LA CULTURE PURE
1	37 <sub>1</sub> Armillaria
2	37 <sub>2</sub> Armillaria
3	37 <sub>3</sub> Armillaria
4	22 Armillaria
5	108 Armillaria
6	108 <sub>x</sub> Armillaria
7	106 <sub>x</sub> 107 Armillaria
8	A <sub>x</sub> 34 Armillaria
9	B <sub>x</sub> 34 Armillaria
10	16 A 37 I Ecorce
11	18 A 37 I Ecorce
12	84 II Racine
13	A 2a 84 III Ecorce
14	B 2a 84 III Ecorce
15	C 2a 84 III Ecorce

**Tableau 3:** Liste des cultures pures utilisées pour l'extraction d'ADN.

en comparant leur distance de migration avec celle des bandes de référence (fig. 4).

Les fragments de restriction mesurent environ 320 et 155 paires de bases pour tous les échantillons. Ces valeurs correspondent à celles obtenues par différents auteurs pour *Armillaria mellea* (AGUIN *et al.*, 2001; MANSILLA VAZQUEZ *et al.*, 2000; PEREZ SIERRA *et al.*, 1999; PROSPERO *et al.*, 1998; HARRINGTON & WINGFIELD, 1995).

## Séquençage

Parmi toutes les cultures pures que nous avons obtenues, nous en avons sélectionné quelques-unes pour le séquençage (tab. 4).

Le choix des cultures pures a été fait en fonction de :

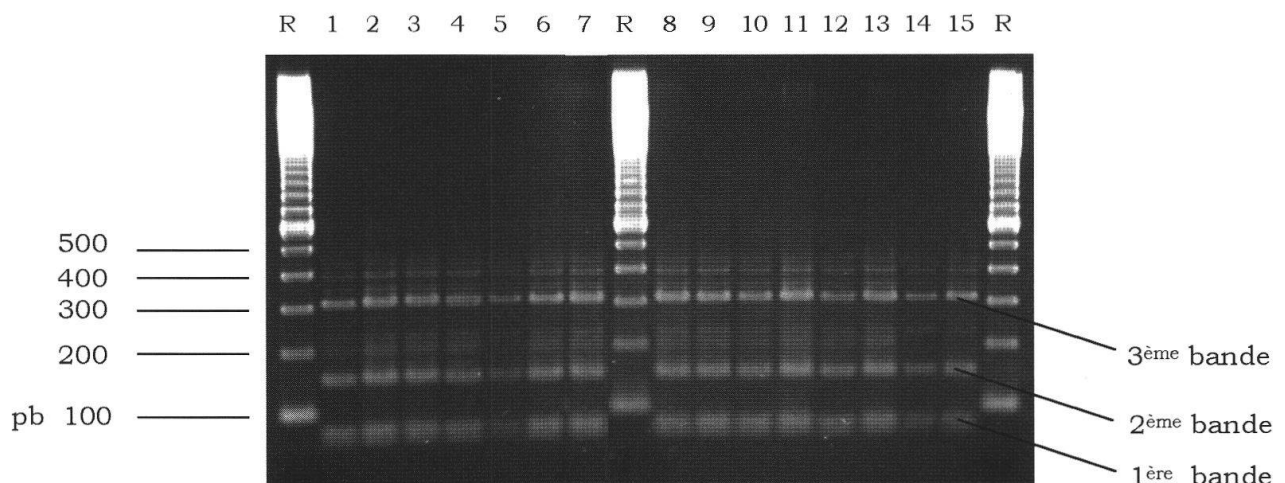
- la distance séparant les arbres les uns des autres afin de connaître la répartition de la ou des souches
- la nature de l'échantillon à l'origine de la culture pure (écorce, racine, carpophore) pour savoir si la ou les souches étai(ent) présente(s) dans différentes parties de l'arbre atteint et si elle(s) fructifia(i)ent).

Sur les 875 paires de bases que comptait l'IGS, environ 780 paires ont été séquencées pour chaque échantillon, ce qui a permis de faire une bonne comparaison. Le pourcentage de similarité entre les différentes séquences montre que les 7 échantillons analysés appartiennent à 3 souches différentes (tab. 5). Dans la figure 5, l'échelle représente le nombre de substitutions par site. Les valeurs de 833 et 982 correspondent au nombre de fois que ces embranchements ont été réalisés sur 1000 essais d'arbres. Nous pouvons constater qu'il y a très peu de variantes possibles.

La figure 6 montre la distribution spatiale de ces trois groupes de souches dans le Jardin du Prince. Le groupe 1 et le groupe 2 ne diffèrent que par 3 nucléotides et sont donc extrêmement proches. Le groupe 3 étant très éloigné des groupes 1 et 2, nous nous sommes demandé s'il n'y avait pas eu d'erreur dans la détermination de l'espèce de l'échantillon n°4. Pour en être sûrs, nous avons introduit sa séquence dans une banque de données internationale (NCBI); l'échantillon n°4 provenait bel et bien d'*Armillaria mellea*. Cette confirmation nous a permis de confronter nos séquences entre elles avec le programme Clustal X afin d'obtenir une vision globale, sous forme d'arbre, des liens de parenté des différents échantillons.

## DISCUSSION

Dans le présent travail nous avons réussi à isoler et purifier, par des méthodes culturales, *Armillaria mellea*, pathogène s'étant attaqué aux érables d'un parc public de Neuchâtel. Cependant, avec ces méthodes, nous n'avons pu déterminer de manière sûre ni l'espèce ni le nombre d'individus présents. C'est l'utilisation de la RFLP et du séquençage qui nous aura apporté les réponses de ces deux questions.



**Figure 4:** Longueur des fragments de restriction des échantillons 1-15. R : échelle de référence (100 pb).

En regardant la distribution spatiale des différents échantillons séquencés et leur provenance, nous pouvons penser que l'arbre n° 37 a été contaminé par une souche d'*Armillaria mellea*, puis que le champignon pathogène s'est répandu le long d'une racine principale sur une dizaine de mètres avant d'atteindre l'arbre n° 34. Par ailleurs, des carpophores appartenant à la même souche sont apparues au milieu de l'herbe (entre les arbres n° 106 et 107) à une quinzaine de mètres de l'arbre n° 37. Cela prouve que les rhizomorphes du champignon se sont propagés sur une assez grande surface en ayant l'arbre n° 37 comme garde-manger.

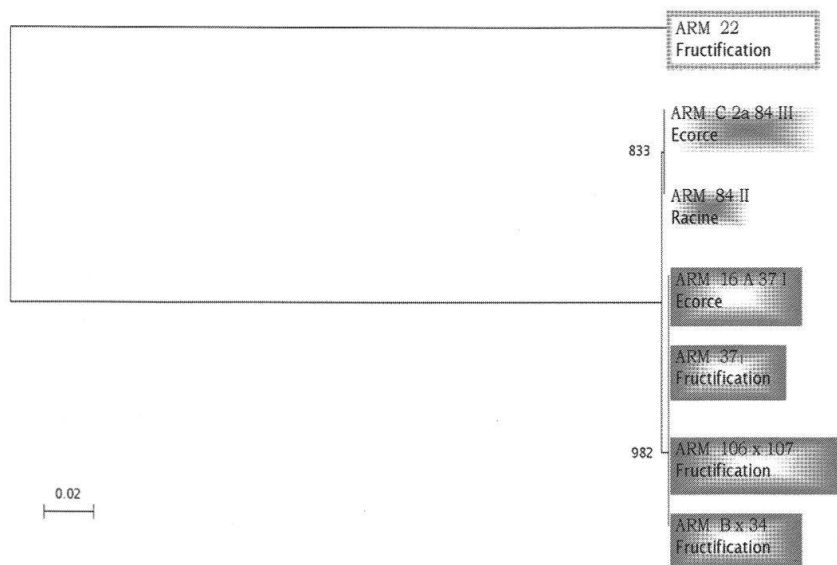
L'échantillon n° 4, provenant d'un carpophore prélevé au pied de l'arbre n° 22, appartient à une souche relativement différente des autres. Etant donné l'emplacement de l'arbre n° 22 par rapport à l'arbre n° 37, on aurait pu s'attendre à ce que l'échantillon n° 4 appartienne à la souche du groupe 1.

En ce qui concerne les échantillons du groupe 2, nous pouvons constater que les mycéliums secondaires isolés à partir de fragments d'écorce et de racine de l'arbre n° 84 appartenaient au même individu.

Au vu des résultats obtenus, nous pouvons penser que les érables du Jardin du Prince ont été contaminés par plusieurs souches, car ils étaient affaiblis.

N° DE L'ÉCHANTILLON	NOM DE LA CULTURE PURE
1	37 <sub>1</sub> Armillaria
4	22 Armillaria
7	106 <sub>x</sub> 107 Armillaria
9	B <sub>x</sub> 34 Armillaria
10	16 A 37 I Ecorce
12	84 II Racine
15	C 2a 84 III Ecorce

**Tableau 4:** Liste des cultures pures utilisées pour le séquençage.



**Figure 5:** Représentation du lien de parenté entre les différentes souches (voir texte).

N° DES ECHANTILLONS	1	4	7	9	10	12	15
1							
4	54.5						
7	100	54.5					
9	100	54.5	100				
10	100	54.5	100	100			
12	99.6	54	99.6	99.6	99.6		
15	99.6	54	99.6	99.6	99.6	100	

**Tableau 5:** Pourcentage de similarité entre les différentes séquences. Ces résultats montrent que les 7 échantillons analysés appartiennent à 3 souches différentes et sont ainsi classés:

- Groupe 1 : - échantillons n° 1 (carpophore, arbre n° 37)  
n° 7 (carpophore, entre les arbres n° 106 et 107)  
n° 9 (carpophore, arbre n°34)  
n°10 (échantillon d'écorce, arbre n° 37)
- Groupe 2 : - échantillons n°12 (échantillon de racine, arbre n° 84)  
n°15 (échantillon d'écorce, arbre n° 84)
- Groupe 3 : - échantillon n° 4 (carpophore, arbre n° 22).



- Erables malades      ○ Arbres non malades étudiés      ● Souche isolée à partir d'échantillons d'écorce et de racine
- Groupe 1      ■ Groupe 2      // Groupe 3      ● Souche isolée à partir d'échantillons d'écorce
- // Souche isolée à partir de carpophores

**Figure 6:** Distribution spatiale des 3 souches d'*Armillaria mellea* isolées au Jardin du Prince.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur Le Professeur Michel Aragno pour nous avoir permis de réaliser ce travail. Nous remercions également Le Service des Parcs et Promenades de La Ville de Neuchâtel pour avoir financé cette étude et pour sa collaboration tout au long de notre recherche. Nous remercions enfin Madame Nathalie Fromin, pour la correction de la partie de biologie moléculaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- AGUÍN, O.; SABARIS, M.; ABELLEIRA, A.; PINTOS, C. & MANSILLA J.P. 2001. Especies de *Armillaria* detectadas en masas forestales de Galicia. Estación Fitopatológica «Do Areeiro», Subida a la Robleda s/n, 36153 Pontevedra. *Boletín de Sumarios* 61.
- BON, M. 1988. Champignons d'Europe occidentale. *Arthaud. Espagne*.
- BREITENBACH, J. & KRÄNZLIN, F. 1991. Champignons de Suisse. Tome 3. Bolets et champignons à lame, 1<sup>ère</sup> partie. *Mykologia Luzern*.
- CHILLALI, M.; IDDER-IGHILI, H.; GUILLAUMIN, J.J.; MOHAMMED, C.; LUNG ESCARMANT, B. & BUTTON, B. 1998. Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. *Mycological Research* 102 (5): 533-540.
- COURTECUISSÉ, R. 2000. Photo-guide des Champignons d'Europe. *Delachaux et Niestlé. Lausanne*.
- FOX, R.T.V. & SANSON, S. 1996. Lethal effects of an electrical field on *Armillaria mellea* in culture. *Mycological Research* 100 (3): 318-320.
- HARRINGTON, T.C. & WINGFIELD, B.D. 1995. A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia* 87 (2): 280-288.
- MANSILLA VAZQUEZ, P.; AGUÍN CASAL, O.; ABELLEIRA ARGIBAY, A. & JESÚS SAINZ OSÉS, M. 2000. Adaptación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de especies *Armillaria* en Galicia. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 26: 79-88.
- MARXMÜLLER, H. 1994. Sur la morphologie en culture du mycélium secondaire chez les Armillaires annelées. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France*, 110 (2): 43-80.
- NIENHAUS, F., HEINZ, B. & BÖHMER, B. 1999. Maladies et ravageurs des arbres et arbustes d'ornement. *E. Ulmer. Paris*.
- PÉREZ SIERRA, A., WHITEHEAD D.S. & WHITEHEAD M.P. 1999. Investigation of a PCR-based method for the routine identification of British *Armillaria* species. *Mycological Research* 103 (12): 1631-1636.
- PRINCE-SIGRIEST, M.-H. & JOB, D. 1996. Etude mycologique, entomologique et physico-chimique de troncs de *Betula pendula* Roth en voie de dégradation. Partie 1 : répartition spatiale de l'état physico-chimique et de la mycoflore des troncs. *Canadian Journal of Botany* 74: 1657-1664.
- PROSPERO, S.; RIGLING, D.; GIUDICI, F. & JERMINI, M. 1998. Détermination des espèces d'Armillaire responsables du pourridié-agaric de la vigne au Tessin. *Revue suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture* 30 (5): 315-319.
- RAYNER, A. D. M. & BODDY, L. 1988. Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology. *John Wiley & Sons Ltd. New York*.

- RISHBETH, J. 1986. Some characteristics of English *Armillaria* species in culture. *Transactions of the British Mycological Society* 86: 213-218.
- STAMETS, P. 1993. Growing gourmets and medicinal mushrooms. *Ted Speen Press. Hong Kong.*
- WHITE, E. E.; DUBETZ, C. P.; CRUICKSHANK, M. G. & MORRISON, D. J. 1998. DNA diagnostic for *Armillaria mellea* species in British Columbia: within and between species variation in the IGS-1 and IGS-2 regions. *Mycologia* 90 (1): 125-131.
-