

Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* MORELET sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture *in vitro*.

X. MOURICHON, D. PETER et Marie-Françoise ZAPATER*

EXPERIMENTAL INOCULATION OF YOUNG *IN VITRO* CULTURE BANANA PLANTLETS WITH *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*.

X. MOURICHON, D. PETER and Marie-Françoise ZAPATER.

Fruits, April 1987, vol. 42, n° 4, p. 195-198.

A technique for controlled inoculation of banana plantlets, produced by *in vitro* culture, with *M. fijiensis* is described. Cultivars with different degrees of susceptibility to this parasite in the field, have the same differential reactions in these early tests.

This type of host-parasite relationship shows how useful *in vitro* plantlets are for selecting resistant varieties within the framework of a breeding programme.

INOCULATION EXPERIMENTALE DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET SUR DE JEUNES PLANTULES DE BANANIERIS ISSUES DE CULTURE *IN VITRO*.

X. MOURICHON, D. PETER et Marie-Françoise ZAPATER.

Fruits, Avril 1987, vol. 42, n° 4, p. 195-198.

RESUME - Une technique d'inoculation contrôlée de plantules de bananiers, issues de vitro-culture, par *M. fijiensis*, est décrite. Des cultivars de sensibilité différente à ce parasite au champ, présentent les mêmes réactions différentielles dans ces tests précoces.

Ce type de relation hôte-parasite montre l'intérêt des vitroplants pour la sélection de variétés résistantes dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique.

La maladie des raies noires (black leaf streak) causée par *Mycosphaerella fijiensis* est considérée aujourd'hui comme l'un des principaux facteurs limitant pour la culture des bananiers, plantains et autres bananes à cuire. Ce parasite se distingue de l'autre espèce *M. musicola* par son activité pathogène très supérieure et par le fait qu'il peut s'attaquer avec succès à un spectre plus large d'hôtes. *M. fijiensis*, présent déjà dans de nombreuses zones géographiques, est une menace permanente pour les cultures traditionnelles (cultures vivrières de plantains), lesquelles ne peuvent, au même titre que les cultures industrielles de bananiers, bénéficier d'une lutte chimique efficace. Cette maladie est à l'origine, pour une grande part, d'un important programme d'amélioration génétique, lequel nécessite la mise au point de méthodes permettant d'évaluer de façon précoce les niveaux de sensibilité de nouvelles productions végétales issues des différentes techniques de cultures *in vitro*. Des inoculations expérimentales avec *M. musicola* ont déjà été décrites mais uniquement sur des plants adultes en conditions naturelles (SIMMONDS, 1939 ; PONT, 1960 ; FROSSARD, 1964) ou sur de jeunes plants

(rejets) en serres (STAHEL, 1937 ; CALPOUZOS et CORKE, 1962 ; GOOS et TSCHIRCH, 1963).

L'objet de ce travail est de décrire le comportement de vitroplants inoculés par *M. fijiensis*. Nous avons également abordé l'aspect de la sensibilité variétale afin de voir dans quelles mesures les résultats obtenus dans nos conditions expérimentales sont conformes au test de comportement réalisé en plein champ (FOURE, 1985).

MATERIEL ET METHODE

Cultivars hôte utilisés.

Toutes les inoculations portent sur de jeunes plantules âgées de 6 à 8 semaines. Elles sont issues de vitroplants, lesquels ont été obtenus par cultures de méristèmes, multipliés sur un milieu de prolifération, et transférés en tubes sur un milieu de croissance. Le sevrage est réalisé en serre sur terreau. Trois cultivars ont été retenus : Grande Naine (AAA), Fougamou (ABB) et Yangambi (AAA).

* - Laboratoire Phytopathologie IRFA/CIRAD - B.P. 5035 34032 MONTPELLIER CEDEX France.

Préparation des inoculums.

La souche de *M. fijiensis* retenue pour cette étude a été isolée à partir de plantain (Nigéria) puis clonée (monosporée). Les cultures présentent une bonne aptitude à la sporulation conidienne sur milieu V8 modifié (pour 1 litre de milieu : 100 ml de V8 juice, 0,2 g de CaCO₃, 20 g d'Agar, pH 6), sous lumière continue et à 25°C. Les suspensions conidiennes sont obtenues à partir de cultures âgées de 10 jours environ. Des inoculations sont également effectuées avec des broyats mycéliens (0,3 g de poids frais/ml) préalablement filtrés. Dans tous les cas les suspensions conidiennes et mycéliennes sont réalisées en milieu aqueux gélatiné à 1 p. 100.

Inoculation.

Toutes les inoculations sont réalisées par étalement, au pinceau, des suspensions conidiennes et mycéliennes sur les faces inférieures des dernières feuilles formées. Elles peuvent être réalisées sur l'ensemble de la surface foliaire, sur un demi-limbe uniquement, ou ne toucher que des secteurs bien délimités. Les plantules inoculées sont soumises à une humidité saturante pendant 72 h (maintien d'un film d'eau sur les faces inférieures des feuilles) à 25°C, puis disposées dans des chambres de cultures dans lesquelles on procède à des alternances d'hygrométrie : 50-70 p. 100 HR pour 9 h de jour - 100 p. 100 HR pour 15 h de nuit.

Observations.

L'évolution de la maladie est caractérisée par des stades distincts dont les descriptions reposent en partie sur celles de FOURE (1982) et sur des plants adultes, et en plein champ.

Stade 1 - Ponctuation très petite d'un diamètre inférieur à 0,5 mm, juste visible à l'oeil nu.

Stade 2 - Tiret brun rouille d'une largeur inférieure à 4 mm.

Stade 3 - Tiret allongé et élargi.

Stade 4 - Tache brun-noir elliptique.

Stade 5 - Tache brun-noir entourée d'une zone chlorotique jaune et dont le centre est bien desséché.

Des plages nécrotiques intéressant l'ensemble de la surface foliaire, liées à une coalescence des tirets (dans le cas de fortes densités), peuvent apparaître précocement.

RESULTATS

Toutes les inoculations effectuées, soit avec des conidies, soit avec du mycélium, conduisent dans tous les cas à

l'apparition de symptômes sur les surfaces foliaires inoculées. Toutefois, avec des suspensions conidiennes, les tentatives d'inoculation de feuilles entières ou de zones foliaires montrent une plus grande régularité dans l'expression des symptômes et conduisent toujours à des stades de la maladie plus avancés (tableau 1).

TABLEAU 1 - Stades d'évolution des symptômes 40 jours après l'inoculation des variétés Grande Naine (GN) et Fougamou (F) avec des suspensions conidiennes et mycéliennes (5 plantules sont inoculées dans chaque cas).

conidies 1,5 10 ⁵ c/ml	GN F	plage nécrotique stades 2 - 3
mycélium	GN F	stades 2 - 3 stades 1

Nous avons suivi de façon précise l'évolution des symptômes sur les trois variétés (Grande Naine, Fougamou et Yangambi) inoculées avec une suspension conidienne titrant 4 10⁴ conidies/ml (photos 1a, b, c). Les résultats sont exprimés dans le tableau 2. Si pour les 3 variétés testées, les premiers symptômes apparaissent 19 jours environ après l'inoculation, la vitesse d'évolution diffère par contre très nettement dans chaque cas. Les premières nécroses sont observées chez la Grande Naine 35 jours après l'inoculation. Comparativement, l'évolution des tirets en taches sur la variété Fougamou est extrêmement lente, seuls des stades 3 sont observables en fin d'expérimentation (38 jours après l'inoculation). Chez la variété Yangambi, l'évolution de la maladie est bien caractéristique avec un blocage naturel dans l'évolution des tirets. Cet arrêt irréversible fait suite à une évolution très lente des premiers symptômes des stades 1 à 2 entre 20 et 30 jours, environ, après l'inoculation.

Pour chaque série d'inoculation, des disques foliaires ont été prélevés, éclaircis au lactophenol, colorés au bleu coton (0,05 p. 100) et observés. Aucune différence sur le comportement du parasite n'a pu être mise en évidence entre les trois variétés testées, au cours de la phase précédant l'infection. La pénétration est strictement stomatique avec orientation des hyphes vers l'ostiole et formation d'un appressorium (photo 2). La pénétration conduit dans tous les cas à un brunissement des cellules voisines (photo 3) à peine visible à l'oeil nu, puis à une ponctuation brune décrite précédemment comme le stade 1 de la maladie.

TABLEAU 2 - Evolution comparée des symptômes après inoculation des 3 variétés Grande Naine (GN), Fougamou (F) et Yangambi (Y) par une suspension conidienne de *M. fijiensis*.

	Nombre de jours après l'inoculation				
	J + 19	J + 28	J + 31	J + 35	J + 38
. GN	stades 1-2	stades 2	stades 4	stades 5	stades 5
. F	stades 1-2	stades 2	stades 2-3	stades 3	stades 3
. Y	stades 1-2	stades 2	stades 2 : blocage de l'infection au stade tirets		

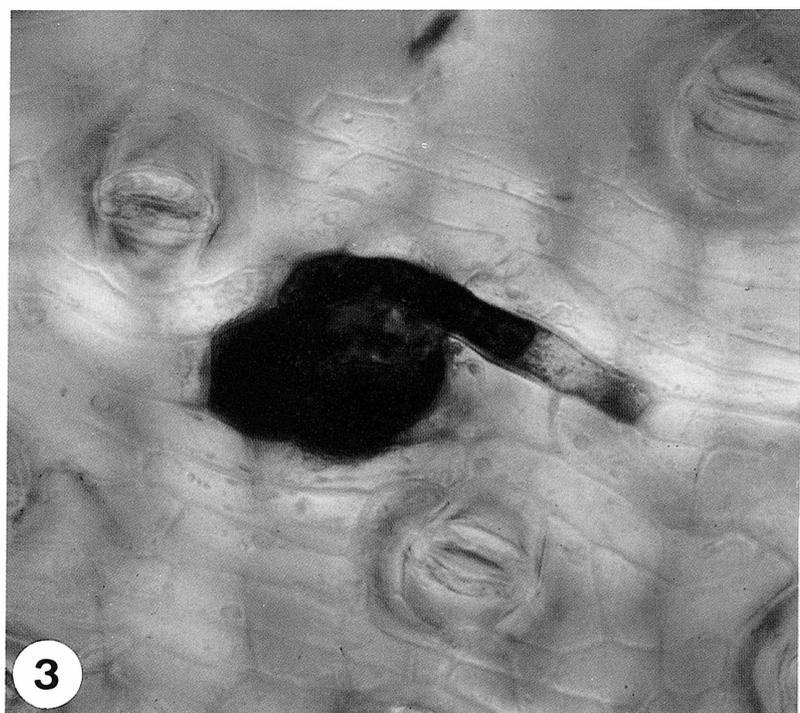
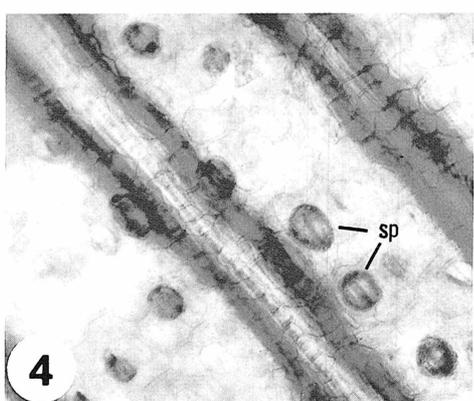
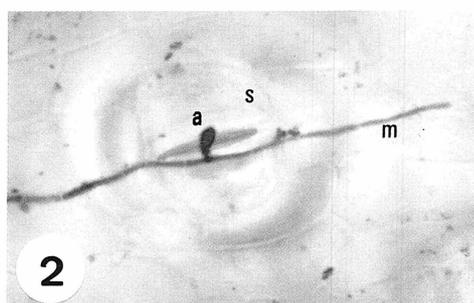
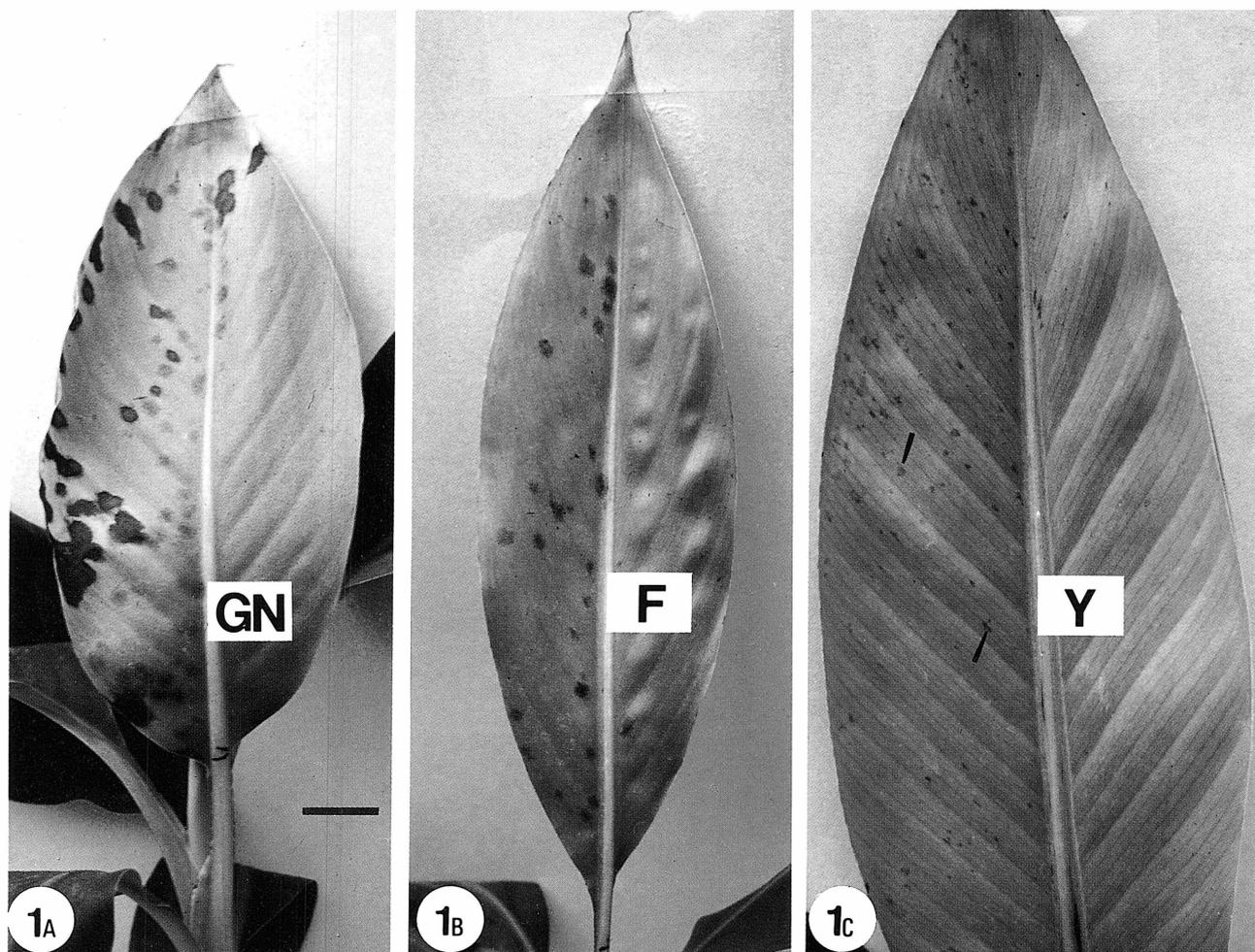


Photo 1 - Stades d'évolution de la maladie sur les trois cultivars Grande Naine (GN), Fougamou (F) et Yangambi (Y), 40 jours après inoculation, par *M. fijiensis*, du demi-limbe gauche de la dernière feuille formée. On note chez le cultivar Yangambi un blocage de la maladie dès les premiers stades 1-2 (flèches). Echelle de grandeur 1,4 cm.

Photo 2 - Pénétration stomatique du champignon avec développement d'un appressorium (a), Mycélium (m), stomate (s) (x 600).

Photo 3 - Ponctuation nécrotique centrée sur un stomate chez le cultivar Grande Naine (x 600).

Photo 4 - Présence de très nombreuses spermatogonies observées sur les nécroses, stade 5 de la maladie, 45 jours après l'inoculation du c.v. Grande Naine (x 210).

Des prélèvements ont également été effectués à différents stades d'évolution des symptômes jusqu'à la nécrose afin de mettre en évidence une éventuelle sporulation de *M. fijiensis*. Aucun conidiophore, ni même d'ébauches conidiennes n'ont pu être observés dans nos conditions d'expérimentation. Par contre, nous observons de très nombreuses spermogonies dont la morphologie est bien caractéristique (photo 4). Aucun périthèce n'est observé, ce qui confirme, ainsi, l'aspect hétérothallique de ce parasite, déjà décrit chez l'espèce *M. musicola* (STOVER, 1963).

COMMENTAIRES

Les résultats apparaissent très encourageants quant à l'utilisation de plantules issues de culture *in vitro* comme matériel de sélection au *M. fijiensis*. En effet les résultats obtenus avec trois cultivars appartenant à des groupes génétiques différents sont conformes aux essais de comportement en plein champ déjà réalisés (FOURE, 1984). On observe ici les différentes étapes caractéristiques de la maladie :

- tropisme, vers les stomates, des tubes germinatifs et des hyphes mycéliens,
- pénétration par les stomates exclusivement,
- périodes d'incubation et vitesses d'évolution des symptômes très proches de ceux décrits sur plants adultes (FOURE, 1985).

La relation étroite entre sensibilité et vitesse d'évolution de la maladie (stade 1 à 5) et la réaction caractéristique de la variété Yangambi avec blocage des tirets au stade 1 sont deux éléments qui confirment bien une mise en place des réactions de défense après la phase de pénétration, dès les premières étapes de l'infection. Signalons que BRUN dès 1963 note l'absence de toute relation entre le degré de sensibilité au *M. musicola* et l'aptitude du mycélium à

pénétrer et se développer dans la chambre sous-stomatique.

La réussite des infestations artificielles dépendent essentiellement des conditions d'incubation des plantules après inoculation. Les trois jours en humidité saturante sont indispensables à la germination et à la croissance des hyphes à la surface des feuilles et les alternances d'hygrométrie qui suivent cette période favorisent, grâce à une régulation stomatique adéquate, la pénétration du parasite (GOOS et TSCHIRCH, 1963 ; BRUN, 1963).

Les conidies constituent, grâce aux possibilités de calibrage, la meilleure source d'inoculum. Toutefois, cette capacité à la sporulation est rare en culture et le caractère «hautement sporulant» est très fluctuant au cours des repiquages successifs et peut même dans certains cas disparaître.

C'est pourquoi des études sont actuellement orientées vers la recherche des facteurs les plus favorables à la production conidienne *in vitro*. Il est intéressant de noter que des broyats mycéliens peuvent également constituer une source d'inoculum, mais les aspects qualitatifs et quantitatifs de ce matériel méritent d'être étudiés plus précisément.

Ce travail doit être considéré comme une approche vers une meilleure maîtrise des conditions favorables aux infestations expérimentales précoces afin de pouvoir étudier de façon contrôlée

- certains aspects des relations hôte-parasite (à l'échelle cellulaire par exemple),
- la variabilité des populations pathogènes,
- le comportement de nouvelles productions végétales issues de différentes vitro-méthodes telles que, par exemple, la callogenèse et les cultures de cellules avec ou sans pression de sélection,
- l'efficacité de différentes matières actives sur le développement du parasite.

BIBLIOGRAPHIE

- BRUN (J.). 1963.
La cercosporiose du bananier en Guinée.
Etude de la phase ascosporee du *Mycosphaerella musicola* LEACH.
Thèse Fac. Sci. Univ. Paris Sud-Orsay, 190 p.
- CALPOUZOS (L.) et CORKE (A.T.K.). 1962.
Variable resistance to Sigatoka leaf spot of banana.
Rep. Agric. Hort. Res. Stn. Univ. Bristol, 106-110.
- FOURE (E.). 1982.
Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* au Gabon (I.).
Fruits, 37 (12), 759-770.
- FOURE (E.). 1985.
Les Cercosporioses du bananier et leurs traitements.
Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* MORELET au Gabon (III.).
Fruits, 40 (6), 393-399.
- FROSSARD (P.). 1964.
Influence de la quantité d'inoculum sur la durée de l'incubation et de l'évolution de *Mycosphaerella musicola*.
IRFA - R.A. 64, Doc. 77.
- GOOS (R.D.) et TSCHIRCH (M.). 1963.
Greenhouse studies on the *Cercospora* leaf spot of bananas.
Trans. Dr. Mycol. Soc., 46 (3), 321-330.
- PONT (W.). 1960.
Epidemiology and control of banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola* LEACH) in North Queensland.
Qud. J. Agric. Sic., 17, 211-272.
- SIMMONDS (J.H.). 1939.
Influence of seasonal conditions on the development of *Cercospora* leaf spot of the banana, with special reference to the control programme.
Qud. Agric. J., 52, 633-647.
- STAHEL (G.). 1937.
Notes on *Cercospora* leaf spot of bananas (*Cercospora musea*).
Trop. Agric. Trin., 14, 257-264.
- STOVER (R.H.). 1963.
Sexuality and heterothallism in *Mycosphaerella musicola*.
Canadian Journal of Botany, (41), 1531-1532.

