

# Obtention *in vitro* de souches résistantes au Bénomyl chez le *Cercospora musae* ZIMM.

I. FOURCADE et E. LAVILLE\*

## INTRODUCTION

Dès son apparition, le «méthyl-1-butylcarbamoyle-2 benzimidazole carbamate acid» ou benomyl, a été expérimenté pour lutter contre la maladie de Sigatoka du bananier (Ph. MELIN, 1970).

Son emploi a permis des améliorations très sensibles dans la fréquence des traitements et jusqu'à maintenant son efficacité vis-à-vis des différentes souches de *Cercospora musae* ZIMM., ou de leurs formes parfaites *Mycosphaerella musicola* LEACH, a persisté.

Cependant les exemples d'apparition de nouvelles races de champignons parasites résistantes aux fongicides ne sont pas rares, qu'elles soient obtenues *in vitro* ou en plein champ (S.G. GEORGOPOULOS, 1969). En ce qui concerne le benomyl, plusieurs cas ont été déjà signalés (W.T. SCHROEDER et R. PROVIDENTI, 1969). C'est pourquoi il nous est apparu intéressant de vérifier si ce phénomène était susceptible de se produire chez le *Cercospora musae*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé une souche de *Cercospora musae* produisant abondamment des spores dès le quatrième jour de culture sur milieu P.D.A. à 25°C, sa croissance est en revanche très lente, les thalles issus de monospores mesurent environ 15 mm de diamètre après 21 jours et sont de couleur vert olive foncé presque noir.

Nous avons employé le BENLATE, formulation commerciale titrant 50 p. cent de m.a. benomyl. Le site d'action de ce fongicide est en partie connu, ce produit agit en effet sur la synthèse des acides nucléiques (H.S. SISLER, 1969), (G.P. CLEMONDS, 1970) et joue le rôle d'antimétabolite de la phénylalanine (HASTIE, 1970).

*In vitro*, en incorporation dans le milieu gélosé, le benomyl présente une activité fongistatique à la concentration de 0,2 ppm, en arrêtant toute croissance mycélienne de cette souche sauvage de *Cercospora musae*. Il devient réellement fongicide, dans les mêmes conditions, à partir de 1 ppm.

En revanche, la germination des conidies reste possible en présence de 1000 ppm de benomyl.

Nous avons utilisé deux méthodes d'obtention de mutants :

- la première consiste à repiquer, dans le temps et dans l'espace, un grand nombre de conidies directement sur des milieux contenant diverses doses de benomyl, pour voir apparaître des mutants naturels (cette méthode nous sert de témoin pour la seconde) ;
- la deuxième consiste à induire l'apparition de mutants résistants par action d'un agent mutagène, la nitrosoguanidine.

La nitrosoguanidine ou N-méthyl-N<sub>4</sub>-nitro-N-nitrosoguanidine, a été choisie pour sa facilité d'emploi (A. EISENSKARK et col., 1965). Il semble qu'elle agisse au niveau de l'ADN préférentiellement au point de replication du chromosomé en provoquant des transversions.

Des suspensions très concentrées de conidies ont été placées dans un bain-marie à 30°C durant 30 minutes en présence de solutions de concentrations variables de nitrosoguanidine (tableau 1).

Les conidies sont ensuite centrifugées à 3000 g durant 30 minutes. Les surnageants sont éliminés et les culots de spores lavés par remise en suspension dans des volumes équivalents d'eau stérile. Il est nécessaire de faire une deuxième centrifugation de 30 minutes, puis un second lavage afin de bien éliminer la nitrosoguanidine. Les suspensions finales, convenablement diluées, sont alors étalées sur milieu gélosé P.D.A.

\* - Melle Isabelle FOURCADE a effectué ce travail dans le cadre du D.E.A. d'amélioration des plantes. Faculté des Sciences, Université de Paris Sud, Centre d'Orsay.

\*\* - Phytopathologiste à l'Institut français de Recherches fruitières Outre-Mer, 6, rue du Général Clergerie - 75116 PARIS.

TABLEAU 1 - Concentrations des solutions de nitrosoguanidine.

Concentrations de nitrosoguanidine en $\mu\text{g/ml}$	Solution mère de nitrosoguanidine à 1000 $\mu\text{g/ml}$ en cc	Suspensions de conidies eau stérile en cc
300	3	7
150	1,5	8,5
100	1	9
50	0,5	9,5
10	0,1	9,9
0 (témoin)	0	10

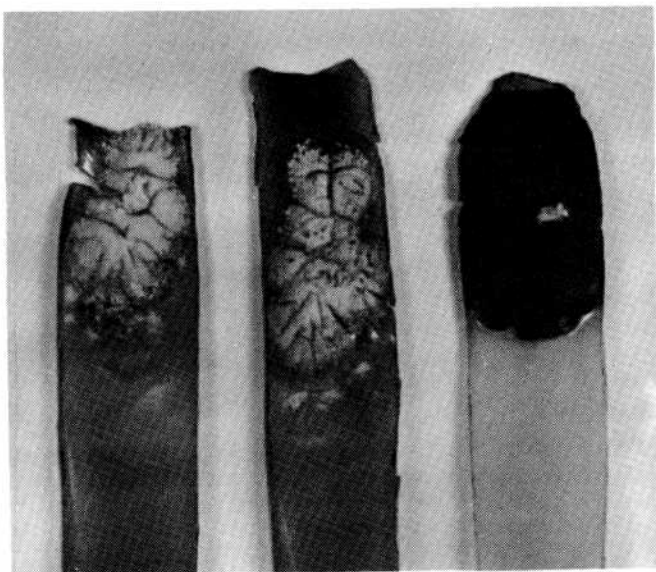
additionné de 100 ppm de bénomyl, coulé en boîte de Pétri. Les boîtes sont placées à 25°C durant 8 à 10 jours avant lecture des résultats.

### RÉSULTATS

A l'aide d'un hématimètre, nous avons évalué le nombre de conidies à  $10^6$  par centimètre cube des suspensions traitées. Environ 5 cc ont été étalés pour chaque dose de nitrosoguanidine et nous avons obtenu les résultats inscrits au tableau 2.

TABLEAU 2 - Taux de souches mutantes résistantes obtenues en fonction de la concentration en agent mutagène.

Dose de nitrosoguanidine en $\mu\text{g/ml}$	Nombre de souches mutantes résistantes observées	Taux de mutation
témoin 0	46	$9,2 \cdot 10^{-6}$
10	44	$8,8 \cdot 10^{-6}$
50	18	$3,5 \cdot 10^{-6}$
100	3	$0,6 \cdot 10^{-6}$



- 1 - *Cercospora musae* souche sauvage.
- 2 - *Cercospora musae* souche mutante.
- 3 - *Cercospora musae* souche résistante au bénomyl.

Aux concentrations de 50 et de 1000  $\mu\text{g/ml}$  de mutagène, le pourcentage de mortalité est très élevé.

Tous les mutants obtenus, quelle que soit la concentration de nitrosoguanidine utilisée, sont phénotypiquement identiques et de couleur blanc jaune. Les contours de leurs thalles sont réguliers et leurs croissances lentes. Au bout de 28 jours, ils atteignent sur le milieu sélectif (PDA additionné de 100 ppm de bénomyl) un diamètre maximum d'environ 15 mm. Tous ces thalles produisent un grand nombre de spores, de taille plus réduite et de morphologie différente de celles produites par la souche sauvage originelle.

Nous avons voulu savoir si ces mutants de phénotypes identiques avaient ou non la même réaction en présence de doses différentes de bénomyl. Pour ce faire, les souches les plus vigoureuses ont été repiquées sur les milieux suivants : PDA seul, PDA additionné de bénomyl aux concentrations croissantes de 0,1 ppm, 1 ppm, 100 ppm et 1000 ppm.

Les observations effectuées une semaine puis trois semaines après repiquage ont donné des résultats, identiques pour toutes les souches mutantes choisies, indiqués dans le tableau 3.

On remarque que, quelle que soit la concentration en bénomyl contenue dans le milieu, les croissances des souches mutées résistantes sont limitées après 21 jours, mais qu'elles sont, sur milieu PDA seul, plus rapides que celle de la souche sauvage originelle.

**TABLEAU 3 - Développement des souches mutantes à différentes concentrations de bénomyl. Diamètres moyens des thalles en mm.**

milieux	après 7 jours	après 21 jours
PDA seul	15	30-35
PDA+0,1 ppm bénomyl	15	30-35
PDA+1 ppm	15	30-35
PDA+100 ppm	3 à 5	10-15
PDA+1000 ppm	3 à 5	10-15

## DISCUSSION

On remarque tout d'abord qu'il a été obtenu sensiblement autant de mutants résistants par la méthode d'étalement direct sur milieu contenant du bénomyl à la concentration de 100 ppm ( $9,2 \cdot 10^{-6}$ ) qu'après action de la nitrosoguanidine à la concentration de  $10 \mu\text{g/ml}$  ( $8,8 \cdot 10^{-6}$ ).

Il est possible que le bénomyl à cette concentration (100 ppm) ait eu sur les conidies de la souche sauvage de *Cercospora musae* une action mutagène tout à fait comparable à une dose de nitrosoguanidine de  $10 \mu\text{g/ml}$  ; mais d'autres expériences seraient nécessaires pour le confirmer.

Cependant, pour appuyer cette hypothèse on peut rappeler que le bénomyl interfère dans la synthèse de l'ADN et qu'HASTIE (1970) l'utilise pour dédiploïdiser des souches d'*Aspergillus*.

On remarque en second lieu que toutes les souches mutantes obtenues, soit naturellement, soit par action de la nitrosoguanidine, sont phénotypiquement identiques. Ceci laisse supposer qu'il existe chez la souche sauvage de *Cercospora musae* une fonction sensible, facilement touchée, la même pour toutes les souches mutantes résistances apparues et sous la dépendance d'un très petit nombre de gènes ou même d'un seul gène. Cette situation a été rencontrée par J.R. WARR et J.A. ROPER (1965) qui, au cours d'une étude sur les souches d'*Aspergillus nidulans* résistantes à divers inhibiteurs, ont constaté après une analyse génétique, qu'à chaque substance inhibitrice correspondait une seule mutation de résistance sous la dépendance d'un seul gène.

La probabilité de voir apparaître en plein champ de telles souches résistances n'est certainement pas déductible de ce que nous avons observé *in vitro*, car d'une part, la concentration de fongicide utilisée est beaucoup plus faible et par conséquent la pression de sélection exercée doit être plus basse, et d'autre part, divers facteurs écologiques peu connus sont susceptibles d'intervenir, mais il est nécessaire de rester vigilant.

## BIBLIOGRAPHIE

- BRUN (J.). 1963.  
La cercosporiose du bananier en Guinée. Étude de la phase ascosporee du *Mycosphaerella musicola* LEACH.  
Thèse, IFAC, Paris.
- CLEMONDS (G.P.) 1970.  
Localisation of the site of action of a fungitoxic benomyl derivative.  
Thesis. College Park Univ. of Maryland. Maryland, USA.
- EISENSKARK (A.), EISENSKARK (R.) et Van SICKLE (R.). 1965.  
Mutation of *Salmonella typhimurium* by nitrosoguanidine.  
*Mutation Res.*, 2, p. 1.
- GEORGOPOULOS (S.G.). 1969.  
The probleme of fungicide resistance.  
*Bio-Science*, vol. 19, n°11, p. 971-973.
- HASTIE (A.C.). 1970.  
Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids.  
*Nature*, 226, may 23, p. 771.
- MELIN (Ph.). 1970.  
Nouvelles perspectives de lutte contre la Cercosporiose du bananier.  
*Fruits*, vol. 25, n°3, p. 141-145.
- SCHROEDER (W.T.) et PROVIDENTI (R.) 1969.  
Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits.  
*Plant disease Reporter*, vol. 53, 4, 271-275.
- SISLER (H.D.). 1969.  
Effect of fungicides on protein and nucleic acid synthesis.  
*Annual Review of Phytopathology*, 7, p. 311.
- WARR (J.R.) et ROPER (J.A.). 1965.  
Resistance to various inhibitors in *Aspergillus nidulans*.  
*J. Gen. microbiol.*, 40, p. 273-281.