

## Variabilité génétique des *Mycosphaerella* inféodés au genre *Musa*.

Essai de mise en évidence d'échanges d'informations par fusion de cellules végétatives.

E. MONNIER\*

VARIABILITE GENETIQUE DES *MYCOSPHAERELLA* INFEODES AU GENRE *MUSA*.

Essai de mise en évidence d'échanges d'informations par fusion de cellules végétatives.

E. MONNIER.

*Fruits*, Jan. 1986, vol. 41, n° 1, p. 15-23.

RESUME - Les mécanismes de la variabilité génétique observée au sein des espèces de *Mycosphaerella* inféodées aux bananiers et plantains est étudiée *in vitro* par les voies de l'anastomose et de l'hétérocaryose sur *M. musicola* et *M. fijiensis*. Après confrontation de deux souches mutantes, marquées, des hétérocaryons ont été obtenus, mais ceux-ci se sont révélés peu stables.

### INTRODUCTION

Les *Mycosphaerella* et leur variabilité génétique.

*Cercospora musae* ZIMM., dont les premières observations ont été faites à Java en 1902, est un ascomycète, parasite spécifique de la totalité des variétés de bananiers dits «desserts» couramment cultivés (LAVILLE, 1983). En présence d'une forte humidité relative et pour des températures comprises entre 22 et 28°C (MEREDITH, 1970), le champignon, par ses attaques répétées sur les feuilles de son hôte (BRUN, 1963), perturbe la physiologie et limite la récolte. Dans les cas les plus graves, il provoque la mort des plantes.

La phase conidienne, dite forme imparfaite, provoquait

(seule) cette maladie connue sous le nom de maladie de Sigatoka. Vers les années 1945-1950, par suite de modifications des pratiques culturales, la forme parfaite, *Mycosphaerella musicola* LEACH, est apparue. D'après STOVER (1963), cette forme est hétérothallique et la production d'ascospores est sous la dépendance d'un couple d'allèles.

Ce parasite, qui s'est rapidement étendu à toute la zone intertropicale, a entraîné de graves problèmes économiques (MEREDITH, 1970 ; WARDLAW, 1972) et, jusqu'à une dizaine d'années, *M. musicola* était le plus répandu et le plus redouté.

Or, depuis peu de temps, une nouvelle espèce de *Mycosphaerella* est apparue : *M. fijiensis*. Elle a été observée pour la première fois par RHODES en 1963 et décrite par LEACH en 1964. Ce champignon provoque la maladie dite des raies noires (black leaf streak) qui est voisine de la maladie de Sigatoka. *M. fijiensis* présente une morphologie et un spectre d'hôtes suffisamment différents de ceux de *M. musicola* pour qu'on la considère comme une nouvelle espèce. Mais d'après WARDLAW (1972), ce champignon pourrait être un mutant ou un variant de *M. musicola*, ou

\* - Ce travail a été réalisé en 1984 au Laboratoire de Phytopathologie du Département fruitier IRFA du CIRAD dans le cadre d'un Diplôme d'études approfondies (DEA) de Phytopathologie. Université Paris Orsay.

encore il pourrait s'agir de lignées parallèles ayant évolué à partir d'un ancêtre commun... La question qui se posait alors était la suivante : ces deux *Mycosphaerella musicola* et *fijiensis*, étaient-ils capables de s'hybrider ?

Puis STOVER a découvert au Honduras, il y a une dizaine d'années, *M. fijiensis* var. *difformis* qui présentait à la fois des caractères de *M. musicola* et de *M. fijiensis*. La question était alors de savoir s'il s'agissait réellement d'un hybride ou d'une nouvelle espèce. Actuellement, aucune preuve n'a été apportée en réponse à ces questions bien qu'on ait observé sur la même feuille la présence de *M. musicola* et de *M. fijiensis* (LAVILLE, 1983). De plus, les caractères communs à *M. fijiensis* var. *difformis* et à *M. musicola* étant de plus en plus difficiles à observer, il semblerait que cet «hybride» disparaisse au profit de *M. fijiensis*.

On assisterait donc, depuis peu, à une certaine variabilité génétique au sein des agents de Cercosporioses, qui se traduit par un élargissement du spectre d'hôtes et une activité pathogène plus intense, donc par une évolution plus rapide de la maladie. Ceci est extrêmement menaçant pour le genre *Musa*.

#### L'hôte : une base génétique réduite.

Etant parthénocarpiques et stériles, les bananiers cultivés ont une base génétique étroite. Ils ne constituent que quelques clones génétiquement proches les uns des autres. Ainsi, ces plantes présentent de faibles possibilités de varier génétiquement. En conséquence, devant la menace que présentent, entre autres, les agents de Cercosporioses, un programme de recherche visant à augmenter cette variabilité génétique a débuté. La création et la sélection précoce de nouveaux clones grâce à la culture *in vitro* devraient permettre d'obtenir des plantes plus résistantes.

#### Les échanges génétiques chez les *Mycosphaerella*.

D'après les travaux de QUIRON et MEREDITH (1978) sur la sporulation des *Mycosphaerella musicola* et *fijiensis*,

il ne semble pas possible d'obtenir des périthèces matures en culture pure. Par conséquent, l'étude de la phase sexuée paraît difficile. Or, d'après BRUN (1963), la reproduction sexuée pourrait être déclenchée à la suite de la fusion de deux hyphes issues de conidies différentes. Ainsi, le but de ce travail est de démontrer que les deux champignons *M. musicola* et *M. fijiensis* sont capables de varier génétiquement en échangeant des informations génétiques par la voie de l'anastomose végétative et par le processus d'hétérocaryose (coexistence de noyaux génétiquement différents au sein d'un cytoplasme qui se trouve en continuité avec un autre cytoplasme).

Il s'agit de démontrer que la fusion de cellules végétatives est possible :

- au sein d'un même isolat,
- entre deux isolats d'une même espèce et d'une même région géographique,
- entre deux isolats d'une même espèce géographiquement distants,
- entre espèces différentes.

Des renseignements sur l'aptitude de ces champignons à pouvoir réaliser des échanges génétiques sont d'une importance capitale, tant du point de vue taxonomique que du point de vue pathologique, ainsi que pour la sélection de variétés résistantes.

## MATERIEL ET METHODES

### *Mycosphaerella* spp.

- Les isolats.

Plusieurs isolats d'origines géographiques différentes de *M. musicola* et *M. fijiensis* ont été utilisés (tableau 1).

Ces isolats ont été repiqués directement à partir des tubes de collection maintenus au laboratoire, ou bien isolés à partir de morceaux de feuilles de bananiers qui avaient été expédiés. Ils ont été repiqués périodiquement tous les quinze jours et éventuellement repris à partir des tubes

TABLEAU 1 - Les isolats.

	Nature des isolats vis-à-vis du Bénomyl	Origines	
<i>Mycosphaerella musicola</i>	(1) sensible	Cameroun	MM S
	(1) résistant	Cameroun	MMB <sup>+</sup> C
	(1) résistant	Martinique	MMB <sup>+</sup> M
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	(2) sensibles	Gabon	MF 6 S et MF G 2.4 S
	(1) sensible	Cameroun	MF S C
<i>Mycosphaerella fijiensis</i> var. <i>difformis</i>	(1) sensible	Honduras	MF vd HS

ou des feuilles. Deux d'entre eux présentaient une résistance notable vis-à-vis d'un fongicide, le Benomyl, utilisé en zone tropicale pour la lutte contre les Cercosporioses du bananier.

- Isolement à partir des feuilles.

La technique consiste à faire éclater les périthèces en les humectant légèrement. Ceux-ci libèrent et projettent leurs ascospores à quelques dizaines de millimètres de distance.

Les morceaux de feuilles sont reçus secs entre deux feuilles de papier journal. Des fragments d'environ 2 cm de côté, contenant des périthèces, sont découpés et plongés dans de l'eau distillée pendant 20 à 30 minutes. Ils sont ensuite placés sur le couvercle d'une boîte de Pétri retournée, contenant de l'agar à 3 p. 100. 24 heures après, les ascospores adhèrent à l'agar et commencent à germer. Elles sont prélevées une à une sous une loupe binoculaire et placées sur milieu nutritif gélosé. Ces cultures sont mises à incuber à 25°C sous lumière alternée 12 h de jour/12 h de nuit.

- Le clonage.

Il a été réalisé suivant deux techniques.

- Première technique : les ascospores, qui sont bicellulaires, chaque cellule étant uninucléée, contiennent deux noyaux génétiquement identiques. Dans ce cas, le prélèvement précédent permet de cloner les isolats.

- Deuxième technique : les noyaux d'un hyphes sont génétiquement identiques. Dans ce second cas, un morceau d'hyphes en croissance a été prélevé à l'extrémité d'une colonie.

- Les milieux de culture.

Le P.D.A. (Potatoes Dextrose Agar) a été utilisé pour l'obtention de mutants résistants aux fongicides et les milieux Czapeck Dox et Czapeck Dox plus hydrolysats de caséine (3 g/l) pour la recherche de mutants auxotrophes.

- La croissance.

Ces champignons sont assez difficiles à manipuler *in vitro* car leur croissance est lente. Des essais comparatifs de croissance ont été réalisés sur les différents milieux cités ci-dessus.

- La sporulation.

Chez les *Mycosphaerella musicola* et *fijiensis*, elle est peu

abondante. QUIRON et MEREDITH (1978), qui conseillent le milieu V<sub>8</sub> Agar pour une bonne production de conidies, n'ont obtenu, avec différents isolats et dans les meilleures conditions, qu'un maximum de  $11 \times 10^3$  conidies au bout de 14 jours. Par conséquent, il a semblé préférable d'utiliser des broyages de mycélium pour réaliser les manipulations.

#### La recherche d'anastomoses.

- Technique de la goutte pendante (LANGERON, 1949 ; RAPILLY, 1968).

Cette technique facile à réaliser présente un inconvénient puisque les hyphes se retrouvent dans plusieurs plans qui rendent l'observation microscopique difficile.

- Observation directe.

Sur des boîtes de Pétri contenant de l'agar à 3 p. 100 ont été étalés des hyphes de différents isolats. Sur ce milieu, les hyphes s'étalent à la surface sans trop y pénétrer. Après 4 ou 5 jours de croissance, les boîtes sont observées au microscope.

Pour observer des anastomoses entre isolats différents, deux fils de coton, préalablement trempés dans des suspensions d'hyphes, sont étalés sur ce même milieu. Ces fils sont placés à deux millimètres l'un de l'autre.

#### Observation de noyaux.

Celle-ci ayant déjà été faite pour *M. musicola* par CALPOUZOS (1955), l'observation a été faite pour *M. fijiensis*.

- L'hématoxyline de Regaud.

Elle a été utilisée à la place de l'hématoxyline d'Ehrlich, conseillée par CALPOUZOS. Cette technique consiste à monter le matériel directement dans une goutte de colorant, obtenue en filtrant le mélange suivant :

- 10 ml d'hématoxyline de Regaud
- 0,1 ml d'alun de fer à 4 p. 100.

Le montage a reposé pendant une nuit avant d'être observé.

- L'orcéine acétique.

C'est un colorant utilisé en histologie végétale pour colorer les noyaux (LOCQUIN et LANGERON, 1978). Il permet de fixer et de colorer en même temps le matériel végétal. Une fois le montage réalisé, celui-ci est légèrement

chauffé jusqu'à l'émission de vapeur. Un passage au froid peut permettre une meilleure observation.

Les observations ont été faites à l'immersion au microscope à contraste de phase.

#### Obtention de lignées mutantes.

##### ● Choix des marqueurs.

Deux types de marqueurs ont été retenus :

- La résistance aux fongicides en partant de l'hypothèse que ces résistances sont dominantes. Des isolats de *M. musicola* étaient déjà résistants au Bénomyl (tableau 1). Plusieurs autres fongicides ont été essayés compte tenu de leurs spectres d'action, de la facilité d'obtention de mutants, et, dans la mesure du possible, du nombre de gènes impliqués dans ces résistances. Il s'agit du biphenyl, des dicarboximides tels que l'iprodione, la vinclozoline et la procymidone, et enfin un antibiotique : la cycloheximide.

- La résistance aux analogues structuraux d'acides aminés. Ceux-ci ont été très largement utilisés pour des études biochimiques et génétiques. Cette résistance est souvent liée à une auxotrophie pour l'acide aminé correspondant. De plus, un des principaux effets de ces analogues est une inhibition de croissance qui peut être compétitivement reversée en présence de l'acide aminé correspondant (SINGH M., ; SINHA U., 1979).

Un grand nombre de ces substances ont été utilisées sur divers microorganismes. Trois d'entre elles ont été essayées :

- la p. fluorophénylalanine (FPA)
- la cavananine (CAN)
- le méthyl mercure chloride (MMC).

Ces substances très toxiques ont été manipulées avec précaution.

##### ● Les étalements.

Ceux-ci ont été réalisés à partir de cultures âgées d'une semaine, développées sur une grande boîte de Pétri. Ces cultures ont été broyées et filtrées (filtre millipore n° 1) stérilement. La concentration de filaments par millilitre a été évaluée à l'hématimètre (cellule Thomas). Sur chaque grande boîte de Pétri  $9 \times 10^4$  filaments ont été étalés. Cette quantité ne donne qu'une idée du nombre de filaments par boîte. Elle est sous-estimée compte tenu du fait que beaucoup d'hyphes se présentaient sous forme d'agrégats. Toutefois, la longueur moyenne des hyphes correspondait à celle des conidies.

##### ● Les doses de sensibilité.

Elles vont permettre de définir la sensibilité des différents isolats aux différentes drogues. Pour celles qui inhibent la croissance, les gammes permettront d'identifier la dose bloquante non létale. Les étalements ont été faits sur de la cellophane à la surface du milieu de culture où les produits ont été incorporés à différentes concentrations. Sept jours après, cette cellophane est transférée sur milieu normal pour noter sept jours plus tard les reprises de croissance.

##### ● La mutagenèse physique aux U.V.

Le rayonnement U.V. d'une lampe Hanovia chromalite, dont 80 p. 100 de l'énergie lumineuse se situent à la longueur d'onde de 254 nm, a été utilisé pour réaliser la mutagenèse. La fenêtre d'émission se trouve à 9 cm au-dessus de la table où repose la boîte de Pétri. Les étalements d'hyphes sont exposés, après le broyage, pendant la durée choisie : 30 secondes, qui permet la reprise d'environ 6 p. 100 des hyphes.

##### ● La mutagenèse chimique à la nitrosoguanidine.

La nitrosoguanidine a été utilisée selon les techniques maintenant classiques (FOURCADE, 1973).

Sur une suspension d'hyphes, on a fait agir des solutions de nitrosoguanidine titrant 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml et 0,05 mg/ml.

##### ● La production d'hétérocaryons.

Comme nous avons obtenu des marqueurs utilisables sur deux isolats distincts, les confrontations ont été réalisées selon les méthodes décrites par CHEVAUGEON et MAKOUNZI (1979).

## LES RESULTATS

### L'état nucléaire des conidies et des cellules végétatives.

CALPOUZOS (1955) a étudié l'état nucléaire de *M. musicola* par la méthode de coloration à l'hématoxyline d'Ehrlich. Sur un minimum de 150 conidies, prélevées sur des feuilles malades ou obtenues à partir de deux souches pures sporulantes, il a observé sans exception, un noyau par article de chaque spore. En ce qui concerne le mycélium, aucune cellule végétative, jeune ou âgée, mises à part les extrémités, ne contient plus de deux noyaux.

Chez *M. fijiensis*, notre étude révèle que la plupart des articles mycéliens ne contiennent qu'un seul noyau. Cependant, certains articles semblent contenir plusieurs noyaux (3 à 4). Ceux-ci semblent correspondre aux extrémités des

hyphes. Ces articles paraissent plus longs et étroits vers l'apex et les noyaux apparaissent presque de la même largeur que ceux-ci. Toutefois, l'interprétation a été difficile car le montage réalisé entre lame et lamelle n'a pas permis d'observer de tels articles dans un même plan. Dans le cas des conidies, on peut penser que l'état nucléaire est le même que chez *M. musicola*. L'état prédominant semble donc uninucléé (tableau 2).

TABLEAU 2.

	Nombre de noyaux par cellule	
	Hyphes	Conidies
<i>M. musicola</i>	1 à 2 97 %-3 %	1
<i>M. fijiensis</i>	1 à 4	1

d'après CALPOUZOS, 1955.

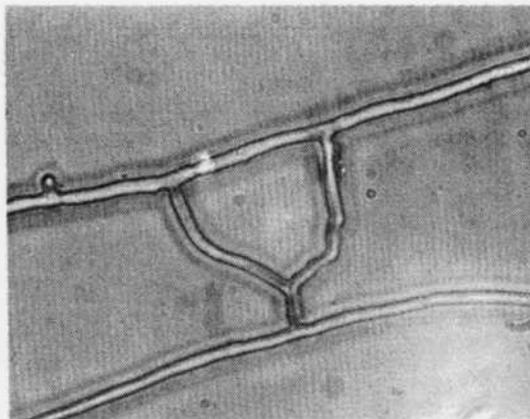


Photo 1 - Anastomoses au sein d'un isolat de *M. musicola* x 300. Observation directe sur agar à 30 g/l.

#### L'aptitude de l'anastomose.

QUIRON et MEREDITH (1978) ont observé des anastomoses entre conidies au sein d'isolats de *M. fijiensis*. D'après eux, celles-ci sont assez courantes : BRUN (1963) a observé des anastomoses entre filaments homologues de différentes souches de *M. musicola*.

Par la technique d'observation directe sur agar à 30 g/l des auto-anastomoses, assez fréquentes, ont été observées au sein de divers isolats (photo 1), (tableau 3). La technique de la goutte pendante a permis d'observer une seule fois de telles anastomoses au sein d'un isolat.

Ces relations se forment rarement à proximité des apex des filaments mycéliens les plus développés. Dans les parties un peu plus âgées, lorsque les filaments mycéliens sont amenés à se cotoyer, chacun d'eux émet, dans les cas les plus fréquents, une excroissance en direction de l'autre dans un même plan. Le parcours réalisé par chacune d'elles est variable. Il semble, dans certains cas, que l'un des rameaux télémorphiques induise sur un autre hyphes une excroissance avec laquelle il fusionne.

Entre isolats différents, il a été plus difficile d'observer des anastomoses, car on ne peut pratiquement pas les distinguer des précédentes. En effet, celles-ci interviennent après que les deux thalles se soient entremêlés. Néanmoins, à l'aide des fils de coton étalés sur agar à 30 g/l et en suivant la direction de croissance des hyphes, des anastomoses contractées entre un isolat de *M. fijiensis* du Gabon et un isolat de *M. musicola* du Cameroun ont été observées. Toutefois, une étude indirecte de ces anastomoses entre isolats différents est nécessaire pour mieux les mettre en évidence, ainsi que pour mieux rendre compte du phénomène d'hétérocaryose.

#### Les essais de croissance comparée.

Ils ont été faits dans le but de définir un milieu minimum simple. C'est pourquoi la croissance de trois isolats a été comparée sur un milieu permettant une bonne croissance, tel que le milieu PDA et sur un milieu essentiellement minéral tel que le milieu Czapeck-Dox (tableau 4). Quels que soient les isolats, la croissance est très lente puisque les colonies poussant sur PDA atteignent seulement un maximum de 4,5 cm de diamètre au bout de cinquante

TABLEAU 3.

Isolats	MF 6 S	MFG 24 S	MM S	MM B <sup>+</sup> M	MF vd H	MMB <sup>+</sup> C
MF 6 S	++	+	+			
MFG 24 S		++	+			
MM S			++			
MMB <sup>+</sup> M				++		
MF vd H					++	
MMB <sup>+</sup> C						++

++ anastomoses fréquentes

+ présence d'anastomoses.

TABLEAU 4 - Essais de croissance comparée.

Jours	Isolats Milieux	MM S			MF 6 S			MF vd HS		
		PDA	MC	MM	PDA	MC	MM	PDA	MC	MM
J+ 16		1,6	1,3	1,4	1,2	0,75	0,75	1,05	0,8	0,75
J+ 21		2	1,75	1,9	1,5	1,02	1,05	1,45	1,2	1,05
J+ 32		2,5	1,95	2,4	1,7	1,2	1,175	1,55	1,3	1,15
J+ 50		4,3	4,15	3,8	3,2	2,7	2,25	3,2	3	2,45

- Seule la croissance a été représentée (diamètre final - diamètre initial) en centimètres.
- 4 répétitions ont été faites pour calculer une croissance moyenne.
- MM S : *M. musicola* sensible Cameroun.
- MF 6 S : *M. fijiensis* 6 sensible Gabon.
- MF vd HS : *M. fijiensis* var. *difformis* Honduras sensible
- MC : milieu CzapeckDox plus hydrolysats de caséine.
- MM : milieu Czapeck Dox.

jours. Que ce soit sur PDA ou sur Czapeck, *M. musicola* a à peu près la même croissance. Elle est plus rapide que celle de *M. fijiensis* et de *M. fijiensis* var. *difformis*. Sur chacun des milieux, les comportements de *M. fijiensis* et *M. fijiensis* var. *difformis* sont presque identiques. Leur croissance est ralentie sur milieu Czapeck Dox plus hydrolysats de caséine et Czapeck Dox seul. Ce ralentissement ne paraît pas très important lorsque l'on compare les croissances sur milieu Czapeck et sur milieu PDA, du moins au cours des 16 premiers jours. Ainsi, le milieu Czapeck Dox a été choisi comme «milieu minimum» (MM). Pour faciliter notre étude, nous avons choisi de prendre comme «milieu complet» (MC) le milieu Czapeck Dox plus hydrolysats de caséine à 3 g/l. Il ne nous a pas paru nécessaire de rajouter des substances de croissance compte tenu de ces faibles différences de croissance.

#### Variabilité morphologique au sein des cultures.

Au cours de nos travaux et au cours de ces essais de croissance comparée, nous avons constaté que, dans nos cultures, au cours du temps, les différents isolats changeaient de phénotype. La variation la plus visible est celle de la couleur des thalles. Peu après le repiquage, tous les thalles, sur les différents milieux, avaient à peu près la couleur vert olive. Puis cette couleur changeait en passant par différents tons de vert, de gris, pour devenir ensuite blanc puis rose pâle. Cette dernière couleur est apparue plusieurs fois d'abord au centre du thalle avant de gagner sa surface. Ceci rappelle les observations faites par BRUN (1963), qui a défini chez *M. musicola* trois types principaux de phénotypes. Ces mêmes phénotypes peuvent être également observés chez *M. fijiensis*. BRUN a émis de nombreuses hypothèses pouvant expliquer ces variations.

#### Les doses de sensibilité.

##### • Aux fongicides.

Elles ont été recherchées principalement sur l'isolat sensible au Bénomyl de *M. musicola* du Cameroun puisque certains des autres isolats étaient déjà marqués pour ce fongicide.

Dans le cas du biphényl, il n'a pas été possible de trouver une dose de sensibilité, car ce produit agit en phase vapeur. En ce qui concerne les dicarboximides, aucune dose bloquante n'a pu être définie. Bien que d'après BEEVER et BYRDE (1982) ces produits affectent surtout la croissance mycélienne, ils ne semblent pas très actifs sur celle de *M. musicola*. Pour des doses très élevées (1 000 ppm), la croissance n'a pas pu être arrêtée malgré un certain ralentissement. Par contre, pour la cycloheximide et le benomyl, une dose bloquante a pu être déterminée. Dans les deux cas, cette dose se situe entre 0,5 et 2 ppm et après transfert sur milieu normal, une faible reprise de croissance est observée à 1 ppm. Les deux produits pour cette dose n'ont qu'une action fongistatique.

*M. fijiensis* - isolat MF 6 S se comporte vis-à-vis de la cycloheximide et du benomyl comme l'isolat *M. musicola* du Cameroun, sensible au benomyl (tableau 5).

##### • Aux analogues structuraux d'acides aminés.

Pour seulement un des trois analogues, une dose bloquante a pu être déterminée vis-à-vis du *M. fijiensis* sensible au benomyl, du Gabon. Il s'agit de la p.FPA pour laquelle celui-ci est sensible sur milieu minimum (MM) entre 1 et 3 ppm. En effet, après un transfert sur MM normal, une faible reprise de croissance a été observée à 2 ppm.

TABLEAU 5 - Doses de sensibilité des *Mycosphaerella* spp. aux fongicides sur milieu PDA.Dicarboximides (*M. musicola*).

ppm de fongicide	0	100	200	300	500	1 000
Croissance en présence de :						
. Vinchlozoline	+++++	+++	+++	+++	+++	++
. Procymidone	+++++	+++	+++	+++	+++	++
. Iprodione	+++++	+++	+++	++	++	+

deux répétitions pour chaque produit.

Antibiotique (*M. musicola* et *M. fijiensis*).

ppm de cycloheximide	0	0,5	1	2	3	4
Croissance en présence de cycloheximide	+++++	++	-	-	-	-
Transfert sur milieu normal	+++++	++++	++	-	-	-

deux répétitions

Benzimidazole (*M. musicola* et *M. fijiensis*)

ppm de bénomyl	0	0,5	1	2	3	4
Croissance en présence de bénomyl	+++++	++	-	-	-	-
Transfert sur milieu normal	+++++	+++	++	-	-	-

deux répétitions

- ↑
- +++++ bonne croissance (témoin) - thalles  $\geq 2$  mm  
 ++++ assez bonne croissance - taille des colonies  $< 2$  mm et  $\geq 1$  mm  
 +++ croissance moyenne - taille des colonies  $\approx < 1$  mm et  $\geq 0,5$  mm  
 ++ croissance faible - taille des thalles  $< 0,5$  mm - visibles à la loupe binoculaire  
 + croissance très faible - visible à la loupe binoculaire seulement  
 - absence de croissance.

Sur milieu complet (MC), un arrêt de croissance a été observé à 50 ppm pour la p. FPA et entre 0,025 ppm et 0,05 ppm pour le MMC.

Cette différence d'inhibition de la croissance entre le milieu MM et le MC est normale puisque l'apport d'acide aminé par l'hydrolysat de caséine entraîne une réversion de l'effet de l'analogue (MOPURGO, 1962 ; SINGH et SINHA, 1979).

Pour la canavanine, aucune dose bloquante n'a été déterminée et pour des doses assez élevées (200 et 500 ppm), la croissance, quoique ralentie, n'a pas été stoppée.

#### Les essais de mutagénèse.

Ils ont été faits sur milieu MC avec 60 ppm de p. FPA. Les étalements de *M. fijiensis* réalisés sur cellophane ont été, après 24 h de repos, passés aux U.V. et transférés sur le milieu contenant l'analogue. Sur deux répétitions de 40

boîtes aucun mutant n'a été obtenu.

Avec le biphényle, des mutants ont été obtenus, mais ils n'ont pu être utilisés car ils présentaient une différence de croissance sur milieu normal et sur milieu où le fongicide était présent.

Avec la cycloheximide, en utilisant l'isolat *M. fijiensis* MF 6 S, et en lui appliquant un premier traitement mutagène aux U.V. puis sur ces filaments traités, un deuxième traitement mutagène à la nitrosoguanidine nous avons obtenu un mutant résistant à la cycloheximide résistant à 5 ppm de cet antibiotique. Sa croissance était légèrement inférieure, sur milieu enrichi à la cycloheximide à celle de l'isolat sauvage origine sur milieu PDA. Ce mutant était donc résistant à la cycloheximide et sensible au bénomyl (M.F. B-C').

### Les essais d'hétérocaryose.

Ces essais ont été menés avec les deux isolats marqués pour leur résistance à un fongicide ou à un antibiotique.

L'isolat *M. musicola* (Cameroun) résistant au Bénomyl et sensible à la cycloheximide M.M. B<sup>+</sup> C<sup>-</sup>. L'isolat *M. fijiensis* (MF 6 S Gabon) muté et devenu résistant à la cycloheximide mais sensible au bénomyl MF B<sup>-</sup> C<sup>+</sup>. Ces deux mutants ont été confrontés selon les méthodes décrites antérieurement pour favoriser la formation d'anastomoses.

Étalés en mélange sur cellophane et milieu agar pur, ils ont été repris 72 heures plus tard et transférés sur milieu PDA enrichi de 2 ppm de bénomyl et de 5 ppm de cycloheximide (PDA B + C).

Trois jours après les rares colonies ayant poursuivi leur croissance ont été repiquées individuellement sur milieu PDA B + C.

Les comportements de tous ces isolats (origines, mutés et produits d'hétérocaryose) sur différents milieux sont présentés dans le tableau 6.

TABLEAU 6 - Croissance des isolats sur différents milieux.

isolats	milieux			
	PDA	PDA + bénomyl 2 ppm	PDA + cycloheximide 5 ppm	PDA + bénomyl 2 ppm + cycloheximide 5 ppm
<i>M. musicola</i> (sauvage)	+	-	-	-
<i>M. musicola</i> B <sup>+</sup> C <sup>-</sup>	+	+	-	-
<i>M. fijiensis</i> (sauvage)	+	-	-	-
<i>M. fijiensis</i> B <sup>-</sup> C <sup>+</sup>	+	-	+	-
Hétérocaryon B <sup>+</sup> C <sup>+</sup> (MM+MF)	+	+	+	+

Les mutations B<sup>+</sup> et C<sup>+</sup> seraient donc dominantes ou semi-dominantes. L'hypothèse concernant la résistance aux fongicides était donc bonne.

Les hétérocaryons B<sup>+</sup> C<sup>+</sup> ont été repris, broyés et étalés plusieurs fois sur les différents milieux en suivant séparément les lignées successives. Entre la troisième et la quatrième fois les hétérocaryons supposés B<sup>+</sup> C<sup>+</sup> ont perdu progressivement leur aptitude à croître sur milieu PDA + bénomyl + cycloheximide. On peut en conclure que vraisemblablement les hétérocaryons B<sup>+</sup> C<sup>+</sup> issus des confrontations MM B<sup>+</sup> C<sup>-</sup> x MF B<sup>-</sup> C<sup>+</sup> se sont désagrégés et que l'hétérocaryose n'a pas été suivie de recombinaisons mitotiques plus stables.

### DISCUSSION - CONCLUSION

#### Discussion.

Les *Mycosphaerella musicola* et *fijiensis* ne présentant

pas de reproduction sexuée *in vitro*, il nous a paru intéressant d'essayer d'étudier chez ces champignons les possibilités de variation par la voie des anastomoses et de l'hétérocaryose. Ces processus peuvent rendre compte d'une part du point de départ de la reproduction sexuée, et d'autre part d'une certaine variabilité au cours de la phase asexuée et très probablement haploïde du cycle (BRUN, 1963). Bien qu'ayant observé des conidies, nous n'en avons jamais obtenu en quantité suffisante pour pouvoir les utiliser chez les différents isolats. C'est pourquoi nous avons employé des fragments d'hyphes après broyage modéré de thalles pour réaliser nos manipulations.

L'état nucléaire chez ces champignons semble essentiellement uninucléé. Il est important de connaître cet état avant d'entreprendre une telle étude. En effet, le nombre de noyaux par article peut nous informer sur l'existence possible d'hétérocaryons ou l'expression de ceux-ci après leur formation (MAKOUNZI, 1975).

Les anastomoses que nous avons observées au sein de divers clones et entre clones d'espèces différentes peuvent être à l'origine de plusieurs phénomènes d'échanges d'information génétique. Il peut se produire un simple transfert de cytoplasme ou bien, dans le cas où les noyaux

migrent, donner naissance à un hétérocaryon. Le cycle parasexuel peut alors se déclencher si c'est la forme imparfaite du champignon qui est prédominante. Mais cela n'est pas obligatoire. En effet, si des hyphes sont capables de fusionner au niveau de leurs parois, rien n'empêche l'existence de système d'incompatibilité au niveau du cytoplasme et des noyaux (BURNETT J.H., 1975). Le fait que d'après STOVER les *Mycosphaerella musicola* et *fijiensis* soient hétérothalliques pour le signe n'interdit pas l'apparition d'hétérocaryons entre hyphes de même signe sexuel. En effet, chez *Neurospora crassa* ceux-ci peuvent se produire ainsi (SANSOME, 1946). D'autres facteurs doivent donc intervenir pour contrôler ces formations d'hétérocaryons chez cette espèce (WILSON et al., 1961). Ces anastomoses se sont produites, dans nos expériences, sur un milieu pauvre en éléments nutritifs ; si elles se produisent spontanément dans la nature, par exem-

ple à la surface des feuilles, celles-ci peuvent donc permettre des échanges d'informations et être à l'origine de l'apparition de nouveaux individus. Il semblerait que de telles anastomoses puissent se faire spontanément à la surface des feuilles (MEREDITH et LAWRENCE, 1969).

Malheureusement dans nos essais, les hétérocaryons obtenus entre espèces différentes *M. musicola* et *M. fi-*

*jiensis* se sont révélés instables, sans doute parce que cette première étape d'échange d'information n'a pas été suivie par des recombinaisons mitotiques stables.

Ceci n'exclut pas la possibilité d'hybridations vraies entre espèces différentes, réalisées en plein champ par la voie sexuelle, mais cela reste à démontrer.

### BIBLIOGRAPHIE

- BEEVER (R.F.) et BYRDE (R.J.W.). 1982.  
Resistance to the dicarboximide.  
In : *Fungicide resistance in crop protection*. Ed. Dekker J. and Georgopoulos, p. 101-117.
- BRUN (J.). 1963.  
La Cercosporiose du bananier en Guinée.  
Etude de la phase ascosporee du *Mycosphaerella musicola* LEACH.  
Thèse d'Etat, Faculté des Sciences de l'Université de Paris Sud, Centre Orsay, 196 p.
- BUREAU (E.) et al. 1982.  
Les Cercosporioses du bananier et leurs traitements.  
Evolution des populations pathogènes.  
*Fruits*, 37 (11), 665-672.
- BURNETT (J.H.). 1975.  
Mycogenetics.  
Ed. John Wiley and Sons, 374 p.
- CALPOUZOS (L.). 1955.  
Studies on the Sigatoka disease of bananas and its fungus pathogen.  
Ed. Atkins Garden and Research Laboratory, 70 p.
- CHEVAUGEON (J.) et MAKOUNZI (J.A.). 1979.  
Hétérocaryose et parasexualité chez *Pyricularia oryzae* BRIOSI et CAV.  
*Ann. Phytopathol.*, 11, 31-42.
- FROSSARD (P.). 1980.  
Apparition d'une nouvelle et grave maladie foliaire des bananiers et plantains au Gabon, la maladie des raies noires : *Mycosphaerella fijiensis* MORELET.  
*Fruits*, 35 (9), 519-527.
- KINSEY (J.A.) et STADLER (R.). 1969.  
Interaction between analogue resistance and amino acid auxotrophie in *Neurospora*.  
*Journal of Bacteriology*, mar. 1969, 1114-1117.
- LANGERON (M.). 1949.  
Précis de microscopie. Technique, expérimentation, diagnostic.  
Ed. Masson et Cie, 366-373 et 204-207.
- LAVILLE (E.). 1983 a.  
Les Cercosporioses du bananier et leurs traitements.  
Evolution des populations pathogènes.  
*Fruits*, 38 (2), 75-82.
- LAVILLE (E.). 1983 b.  
Les Cercosporioses du bananier et leurs traitements.  
Comportement des variétés.  
*Fruits*, 38 (3), 147-151.
- LOCQUIN (M.) et LANGERON (M.). 1978.  
Manuel de microscopie.  
Ed. Masson, 352 p.
- MAKOUNZI (J.A.). 1975.  
Contribution à l'étude de la variabilité de *Pyricularia oryzae*.  
Mesure de la force des gènes de virulence.  
DEA Faculté des Sciences de Paris Sud, Centre Orsay, 14 p.
- MEREDITH (D.S.) et LAWRENCE (J.S.). 1969.  
Black leaf streak disease of banana (*Mycosphaerella fijiensis*).  
Symptoms of the disease in Hawaii and notes on the conidial state of the causal fungus.  
*Trans. Br. Mycol. Soc.*, 52, 459-476.
- MEREDITH (D.S.). 1970.  
Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* LEACH.  
Ph. D. University of Hawaii, USA.
- MOPURGO (G.). 1962.  
Resistance to p.fluorophenylalanine - *Aspergillus*.  
*Newsletters*, 2 (11), 9.
- QUIRON (V.L.) et MEREDITH (D.S.). 1978.  
Sporulation of *Mycosphaerella* spp. pathogenic to bananas.  
Ph. D. Thesis, USA, 54-99.
- RAPILLY (F.). 1968.  
Les techniques de mycologie en pathologie végétale.  
*Annales des Epiphyties*, 19, 102 p.
- SANSOME (E.R.). 1946.  
Heterocaryosis, mating type factors and sexual reproduction in *Neurospora*.  
*Bull. Torrey Botan. Club*, 73, 397-799.
- SINGH (A.) et SHERMAN (F.). 1974.  
Characteristics and relationships of mercury.  
Resistant mutants and methionine auxotrophs of yeast.  
*Journal of Bacteriology*, Jun. 1974, 911-918.
- SINGH (M.) et SINHA (U.). 1979.  
Mode of action of p.fluorophenylalanine in *Aspergillus nidulans* : effect on the synthesis and activity of phosphatase isoenzymes.  
*Journal of General Microbiology*, 115, 101-110.
- SINHA (U.). 1967.  
Aromatic amino acid biosynthesis and para-fluorophenylalanine resistance in *Aspergillus nidulans*.  
*Genit. Res., Camb.*, 10, 261-272.
- STOVER (R.H.). 1963.  
Sexuality and heterothallism in *Mycosphaerella musicola*.  
*Canadian Journal of Botany*, 41, 1531-1532.
- WARDLAW (C.W.). 1972.  
Banana diseases including plantains and Abaca.  
Ed. Longmans, 878 p.
- WILSON (J.F.) et al., 1961.  
Heterocaryon incompatibility in *Neurospora crassa*.  
Micro injections studies.  
*Am. J. Botany*, 48, 299-305.
- WOLFINBARGER (L.) et DEBUSK GIB (A.). 1971.  
Molecular transport. *In vivo* studies of transport mutants of *Neurospora crassa* with altered amino acid competition patterns.  
*Archives of Biochemistry and Biophysics*, 144, 503-511.

