

Obtention *in vitro* du stade *Mycosphaerella fijiensis*, forme parfaite de *Cercospora fijiensis*.

X. MOURICHON et Marie Françoise ZAPATER*

**IN VITRO PRODUCTION OF MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS
ASCOMATA, PERFECT STAGE OF CERCOSPORA FIJIENSIS.**

X. MOURICHON and Marie Françoise ZAPATER.

Fruits, Nov.-Dec. 1990, vol. 45, n° 6, p. 553-557.

ABSTRACT - The results indicate a method allowing to obtain, *in vitro*, *Mycosphaerella fijiensis*, perfect stage of the anamorphe *Cercospora fijiensis*. Perithecia were produced by crossing of mating types. It is showed the functional male cell character of spermatia, and high levels of fertility were obtained under artificially controlled spermatization.

La maladie des raies noires (black leaf streak disease) causée par *Mycosphaerella fijiensis* (forme parfaite de *Cercospora fijiensis*) est considérée aujourd'hui comme l'un des principaux facteurs limitants pour la culture des bananiers, plantains et autres bananes à cuire. Ce parasite se distingue de l'autre espèce *M. musicola* (*Cercospora musae*) 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 (MOURICHON et FULLERTON, 1990), 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.

Ces maladies sont à l'origine, pour une grande part, d'un important programme d'amélioration génétique (BAKRY *et al.*, 1990) dont l'un des objectifs recherchés est l'obtention de nouveaux cultivars présentant, en priorité, un bon comportement vis-à-vis de la maladie des raies noires.

**OBTENTION IN VITRO DU STADE MYCOSPHAERELLA
FIJIENSIS, FORME PARFAITE DE CERCOSPORA FIJIENSIS.**

X. MOURICHON et Marie Françoise ZAPATER.

Fruits, Nov.-Dec. 1990, vol. 45, n° 6, p. 553-557.

RESUME - Les résultats présentés ici montrent qu'il est possible d'obtenir, *in vitro*, la forme *Mycosphaerella fijiensis*, stade parfait de l'espèce hétérothallique *Cercospora fijiensis*. Des périthèces sont obtenus après croisement de souches sexuellement compatibles. Le caractère de cellules mâle fonctionnelles des spermaties est bien démontré et les meilleurs niveaux de fertilité sont obtenus après spermatization contrôlée.

Mais tous les spécialistes s'accordent à reconnaître le peu de données relatives à la structure des populations pathogènes.

Des recherches récentes (CARLIER *et al.*, 1990) ont permis de montrer l'existence d'un polymorphisme important au niveau de l'ADNr entre isolats de *M. fijiensis* d'origines géographiques différentes (Afrique, Amérique latine, Sud-Est asiatique, Pacifique) mais également entre isolats d'une même région.

Cette diversité génétique est sans doute, pour une grande part le résultat d'une sexualité importante observée dans la nature. A ce sujet rappelons le caractère hétérothallique démontré à la fois chez l'espèce *M. musicola* (STOVER, 1963) et chez *M. fijiensis* (MOURICHON *et al.*, 1987). Il est également souvent évoqué l'idée selon laquelle des informations génétiques pourraient être échangées entre ces deux espèces lors d'une coévolution sur un même hôte. Des hétérocaryons ont été déjà obtenus au laboratoire entre ces deux espèces après anastomose (MONNIER, 1986), mais ceux-ci se sont révélés instables sans doute par manque de recombinaisons mitotiques stables.

* - Laboratoire de Phytopathologie - IRFA/CIRAD - B.P. 5035
34032 MONTPELLIER CEDEX 01.

L'objectif fixé dans ce travail est d'indiquer certaines modalités permettant d'obtenir *in vitro* le stade parfait *Mycosphaerella*, étape essentielle pour réaliser des études de génétique de populations en conditions contrôlées.

Une analyse du genre *Mycosphaerella* a déjà été réalisée en partie pour les espèces *M. tocomae* (*S. sordida*) (WOLF, 1943), *M. ascophylli* (WEBBER, 1967), et l'observation de certains stades conduisant à la formation de périthèces a été réalisée, en conditions contrôlées, chez *M. tassiana* et *M. typhae* (BARR, 1958). A notre connaissance, ce n'est que chez *M. populorum*, que la forme parfaite a jusqu'à présent été produite *in vitro*. Mais le document publié (LULEY *et al.*, 1987) donne peu d'indications sur les méthodes expérimentales utilisées.

TECHNIQUES

Clonage de souches et réalisation d'une collection de travail.

Tous les isolats utilisés dans ce travail ont été clonés dès leur isolement monoascospore, après éclatement de périthèces produits sur feuille en condition naturelle. Les premiers travaux ont utilisé une série d'isolats du Cameroun, issus d'un même périthèce.

Inoculation de plantules.

Les inoculum sont constitués soit de broyats mycéliens soit de suspensions conidiennes. Les techniques d'inoculation ont déjà été décrites précédemment (MOURICHON *et al.*, 1987). Dans le cas d'une co-inoculation, les deux inoculum sont calibrés et soigneusement mélangés. Après 5 semaines d'incubation, des échantillons foliaires sont décolorés et totalement éclaircis au lactophénol puis observés, après coloration au bleu coton 0.5 p. 100, au microscope pour diagnostiquer la présence ou l'absence de périthèces (observation des asques et ascospores).

Etudes *in vitro*.

• Conditions de cultures.

Plusieurs milieux solides naturels ou synthétiques ont été utilisés en boîtes de Pétri de 55 mm. Parmi ceux-ci, seul le milieu V8 modifié a été, compte tenu des résultats, retenu (pour 1 l : 100 ml V8 juice, 0.2 g Ca CO₃, 20 g agar, pH 6).

Dans tous les cas les isolats, seuls ou en mélange, ont été, dans un premier temps, ensemencés par étalement direct sur les milieux de culture (méthode 1).

Conditions d'incubation testées :

températures 18, 20 et 25°C
lumière/obscurité.

Utilisation de disques foliaires ou de cellophane :

Dans un deuxième temps plusieurs dispositifs de culture ont été testés. Des disques foliaires autoclavés sont disposés soit entre le milieu et la suspension mycélienne, méthode 2, soit au-dessus de cette dernière en y adhérant intimement, méthode 3. Des disques de cellophane ont été également utilisés mais uniquement selon la méthode 3.

• Production de périthèces par confrontation mycélienne de deux souches compatibles.

Des broyats mycéliens sont réalisés à partir de cultures âgées de 15 jours à raison de 1 g de poids frais/10 ml (broyage modéré avec un homogénéisateur à couteau). Le mélange des deux souches est réalisé à volume égal (0.25 ml par souche) avant étalement sur milieu V8. Les cultures sont alors mises en incubation avec ou sans support (méthodes 1, 2 et 3).

• Production de spermogonies et évaluation du nombre de spermaties.

Des cultures de différents isolats sont réalisées sur milieu V8 sous lumière continue à 20°C. Le mycélium produit est récupéré après différentes périodes d'incubation : 8, 11, 13, 15 et 19 jours. Ce mycélium est mis en suspension dans de l'eau stérile pendant une heure sous agitation modérée. La solution obtenue est ensuite filtrée sur disque Millipore 5µ et la concentration en spermaties est évaluée.

• Technique de confrontation utilisant des spermaties.

Des cultures sont réalisées comme précédemment avec cellophane selon la méthode 3. Après 5, 7, 9, 12, 14, 16 et 19 jours d'incubation, 0.4 ml d'une suspension de spermaties titrant environ 3.10⁷ sp/ml sont introduits sous la cellophane. Le dénombrement de périthèces est réalisé entre 7 et 10 jours après la confrontation.

• Observation et dénombrement des périthèces.

L'observation des périthèces se fait dans tous les cas de figure sous microscope après coloration au bleu coton.

- culture sans disque ou avec cellophane, méthode 3 : des prélèvements mycéliens sont réalisés à la surface du milieu

- dans le cas de disques foliaires les périthèces sont observés selon la méthode décrite précédemment (voir inoculation de plantules).

L'évaluation du nombre de périthèces obtenus sur le milieu et sur disque est réalisée à partir de prélèvements calibrés à l'emporte-pièce.

• Isolement de la descendance d'un croisement fertile.

Les cultures ainsi que les disques de cellophane sur lesquels peuvent se fixer un nombre important de pyrénosphères sont observées en condition stérile sous stéréomicroscope muni d'un éclairage à lumière réfléchi. Ces derniers sont percés à l'aide d'une aiguille afin de discerner rapidement les spermogonies parmi les périthèces (libération rapide des spermaties facilement observable). Les périthèces sont transférées sur un milieu agar 40 g/l puis déplacés à la surface du milieu à l'aide d'une aiguille de verre facilitant ainsi la dispersion des ascospores. Après 24 h d'incubation à 25°C les ascospores germées sont repiquées sur un nouveau milieu.

RESULTATS

Recherche *in vivo* de souches de compatibilité sexuelle.

Après des inoculations croisées, réalisées sur plantules avec des isolats du Cameroun, des périthèces ont été obtenus dans les deux croisements suivants : 85 x 86 et 86 x 89.

Le temps nécessaire aux différentes étapes conduisant à la formation de périthèces, soit 5 semaines environ, est semblable à celui observé en général dans la nature. A l'issue de cette période les ascospores peuvent être aisément isolées.

Ces deux croisements compatibles ont été par la suite utilisés dans les confrontations *in vitro*.

Confrontation *in vitro*.

Des périthèces ont été observés (tableau 1), après confrontation directe de mycélium, dans les deux croisements compatibles et dans les conditions d'incubation qui se sont révélées les plus favorables, à savoir : milieu V8 modifié, 20°C, lumière continue. Toutefois les résultats diffèrent selon la méthode utilisée. Les meilleurs résultats sont, dans tous les cas, obtenus lors de l'utilisation de disques de cellophane disposés, dès le début de l'incubation, à la surface des mélanges mycéliens.

Le temps d'incubation nécessaire à l'obtention de périthèces normalement constitués (asques et ascospores) est de 20 jours environ. Au-delà de 30 jours on assiste à la germination des ascospores à l'intérieur des périthèces conduisant à la dégénérescence de ces derniers.

Tentatives de typage de souches.

Des confrontations ont été réalisées entre des isolats de différentes origines géographiques et les trois testeurs dont les types de compatibilité ont été démontrés, 85(a), 86(A) et 89(a). Les résultats sont indiqués dans le tableau 2.

Le caractère hétérothallique, mis à part deux croisements a85 x 133 et A86 x 118, est vérifié. Il permet ainsi de typer pour la compatibilité différents isolats, A138, a139, a118, A133. Nous discuterons plus loin les raisons pouvant expliquer l'absence de fertilité dans les croisements théoriquement compatibles (*).

Vérification du caractère fécondant des spermaties.

● Production *in vitro* des spermogonies/spermaties.

Le nombre de spermaties, titrables en suspension aqueuse, augmente régulièrement au cours des deux premières semaines pour atteindre un optimum aux alentours des 14-15e jour après ensemencement (figure 1).

● Confrontation.

Plusieurs croisements utilisant des spermaties, purifiées de toute trace de mycélium, ont été réalisés entre différents isolats dont la compatibilité avait été vérifiée préalablement.

Ces confrontations ont été réalisées entre des suspensions de spermaties (♂) et des cultures réceptrices (♀) de différents âges. Les résultats sont indiqués dans le tableau 3. On constate que l'efficacité des croisements, caractérisée par le nombre de périthèces formés, est étroitement liée

TABLEAU 1 - Nombre de périthèces obtenu par cm², après 20 jours d'incubation. Moyenne sur trois prélèvements (un comptage par culture).
A : 85 x 86 B : 86 x 89.

	Méthode 1		Méthode 2		Méthode 3	
	A	B	A	B	A	B
sans disque	2,8	3,4				
avec disque						
- feuille			6,0	9,1	-	17,0
- cellophane					27,5	40,6

TABLEAU 2 - Recherches d'une fertilité dans différents croisements. Présence (+) ou absence (-) de périthèces après 20 jours d'incubation.

	a85	A86	a89	Colombie		Australie	Samoa
				138	139	118	133
a85		+	-	+	-	-	-*
A86			+	-	+	-*	-
a89				+	-	-	+
138					+		
139						-	+
118							+
133							

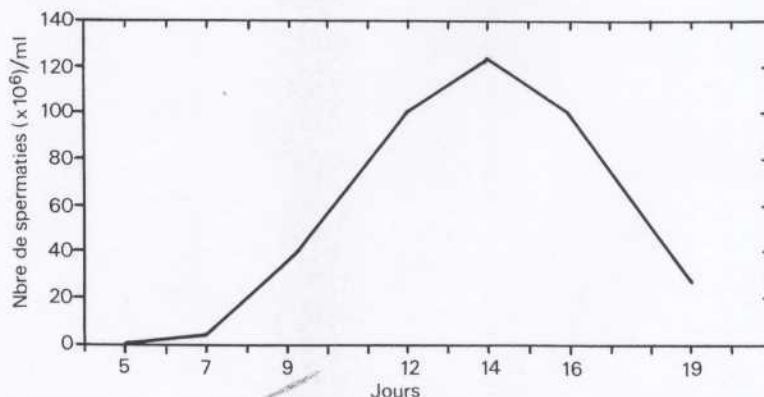


Figure 1 • CONCENTRATIONS DE SPERMATIES OBTENUES *in vitro* AU COURS DES TROIS PREMIERES SEMAINES DE CULTURE (ISOLAT 86).

à l'âge des cultures. Le meilleur résultat est obtenu, dans le cas des trois couples compatibles retenus ♂A86 x ♀a85, ♂a89 x ♀A86 et ♂A86 x ♀a89, pour des cultures réceptrices âgées d'environ 10 jours. Ce résultat est vraisemblablement lié au temps nécessaire à la sporogénèse femelle (production et maturation des ascogones). On constate également des différences importantes dans les niveaux de fertilité inter-croisement.

TABLEAU 3 - Nombre de périthèces obtenus par cm² (moyennes sur trois prélèvements) dans différents croisements

- suspensions de spermatis : A86, a89
- cultures réceptrices : a85, A86, a89.

croisements	Age des cultures réceptrices (jours)			
	6	11	14	18
♂A86 x ♀a85	26	7	0	0
♂a89 x ♀A86	45	135	24	4
♂A86 x ♀a89	13	8	0	2

CONCLUSION - DISCUSSION

La production *in vitro* de périthèces chez *Mycosphaerella fijiensis* peut être obtenue sans trop de difficulté. Le caractère hétérothallique bien démontré ici, nécessite l'utilisation dans les croisements de souches sexuellement compatibles.

Le dispositif *in vitro* utilisant un film de cellophane à la surface des mélanges permet, très nettement, d'augmenter les niveaux de fertilité des croisements. On constate avec ce

dispositif que le développement mycélien «sous cellophane» est extrêmement limité. Il est vraisemblable que cette inhibition de croissance, dans ces conditions, favorise la gamétogénèse mâle et femelle.

Chez les *Mycosphaerella* inféodés aux bananiers (*M. fijiensis* et *M. musicola*) tant les pyrénosphères femelles que mâles (spermogonies) sont aisément observés dans la nature. L'obtention, ici, d'une sporogénèse par utilisation dans les croisements de spermatis confirme leur caractère de cellules mâle fonctionnelles. Cette propriété très souvent supposée n'avait jusqu'à présent été montrée que chez *M. tulipiferae* (HIGGINS, 1936).

Un caractère important qu'il nous paraît utile de signaler concerne le déphasage observé dans la période nécessaire à la production et la maturation, d'une part, des spermogonies et, d'autre part, compte tenu des niveaux de fertilité obtenus, des organes femelles ou ascocarpes non observés mais supposés. Ce phénomène est de nature sans doute à expliquer les résultats médiocres et parfois non répétitifs obtenus lors des confrontations directes de mycélium.

La spermatisation de cultures se révèle être la meilleure méthode pour obtenir de façon plus régulière une production sexuée importante *in vitro*. Des suspensions de spermatis sont facilement réalisables (un minimum de précautions doivent être prises pour éviter toute contamination).

Les résultats présentés ici montrent qu'il est possible d'obtenir la forme parfaite *Mycosphaerella fijiensis*, *in vitro*, en utilisant des techniques relativement simples. Des travaux se poursuivent afin d'améliorer la fertilité des croisements en recherchant en particulier les meilleures conditions de culture : conditions trophiques et thermiques, photodépendance.

BIBLIOGRAPHIE

BAKRY (F.), HORRY (J.P.), TEISSON (C.), TEZENAS DU MONTCEL (H.) et GANRY (J.).
L'amélioration génétique des Bananiers à l'IRFA/CIRAD.
Fruits, Numéro Spécial Bananes, 1990, 130 p.

BARR (M.E.). 1958.
Life history studies of *Mycosphaerella tassiana* and *M. typhae*.
Mycologia, 50, 501-513.

- CARRIER (J.), MOURICHON (X.) et LANAUD (Claire). 1990.
Etude du polymorphisme de fragments de restriction (RFLP) chez les *Mycosphaerella* spp. pathogènes des bananiers plantains.
2e Congrès de la Société française de Phytopathologie, Montpellier
28-30 novembre 1990.
- HIGGINS (B.B.). 1936.
Morphology and life history of some ascomycetes with special reference to the presence and function of spermatia. III.
Am. J. Bot., 23, 598-602.
- LULEY (C.J.), TIFFANY (L.H.) and McNABB (H.S.). 1987.
In vitro production of *Mycosphaerella populorum* ascomata.
Mycologia, 79, 4, 654-658.
- MONNIER (E.). 1986.
Variabilité génétique des *Mycosphaerella* inféodés au genre *Musa*.
Essai de mise en évidence d'échanges d'informations par fusion de cellules végétatives.
Fruits, 41 (1), 15-23.
- MOURICHON (X.), PETER (D.) et ZAPATER (Marie Françoise).
Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* MORELET
sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture *in vitro*.
Fruits, 42 (4), 195-198.
- MOURICHON (X.) and FULLERTON (R.A.). 1990.
Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease and black leaf streak disease in Bananas and Plantains.
Fruits, 45 (3), 213-218.
- STOVER (R.H.). 1963.
Sexuality and heterothallism in *Mycosphaerella musicola*.
Can. J. Bot., 41, 1531-1532.
- WEBBER (F.C.). 1967.
Observation on the structure, life history and biology of *Mycosphaerella ascophylli*.
Trans. Br. Myc. Soc., 50 (4), 583-601.
- WOLF (F.A.). 1943.
The perfect stage of *Cercospora sordida*.
Mycologia, 35, 503-509.

OBTENCION *IN VITRO* DEL ESTADIO MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS, FORMA PERFECTA DE CERCOSPORA FIJIENSIS.

X. MOURICHON y Marie Françoise ZAPATER.

Fruits, Nov.-Dec. 1990, vol. 45, n° 6, p. 553-557.

RESUMEN - Los resultados presentados aquí muestran que es posible obtener, *in vitro*, la forma *Mycosphaerella fijiensis* estadio perfecto de la especie heterotalica *Cercospora fijiensis*. Se han obtenido peritecios después de cruzamientos de poblaciones sexualmente compatibles. El carácter de células macho funcionales de las espermatias está bien demostrado y los mejores niveles de fertilidad se obtienen después de espermatización controlada.



ERRATUM

Fruits, Juillet-août 1990

Article : Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *Mycosphaerella fijiensis* MORELET au Cameroun.

E. FOURE, A. MOULIOM PEFOURA et X. MOURICHON.

à la page 342, 4e paragraphe, colonne de gauche, il faut lire :

«M 53 est un des produits du programme d'amélioration conduit dans le passé en Jamaïque».