

AMELIORATION DES PLANTES

option PHYTOPATHOLOGIE

Etudes sur le pouvoir pathogène du

Colletotrichum lagenarium

P L A N

INTRODUCTION

1ère Partie: COMPORTEMENT DU COLLETOTRICHUM LAGENARIUM ET DU GLOMERELLA CINGULATA IN VITRO

I- DESCRIPTION DES SOUCHES DE CHAMPIGNONS UTILISEES.

- A - Le Colletotrichum lagenarium.
- B - Le Glomerella cingulata.
- C - Réflexion sur certains mutants.

II- CARACTERES CULTURAUX DU COLLETOTRICHUM ET DU GLOMERELLA

- A - Milieus de culture utilisés.
- B - Mode de culture.
- C - Etude de la croissance.

2ème Partie: COMPORTEMENT DU COLLETOTRICHUM LAGENARIUM SUR SON HOTE, LE MELON

I- GENERALITES SUR LA MALADIE.

- A - Les symptomes.
- B - Cycle du parasite.

II- ETUDES EXPERIMENTALES DU POUVOIR PATHOGENE DU COLLETOTRICHUM SUR DES PLANTULES DE MELON.

- A - Variétés de Melon utilisées.
- B - Test de pathogénie sur plantules cultivées en tube.
 - 1°- Mode opératoire.
 - 2°- Résultats.
- C - Test de pathogénie sur plantules cultivées en serre.
 - 1°- Mode opératoire.
 - 2°- Résultats
- D - Discussions et conclusion.

III- RECHERCHE D'UNE ECHELLE FINE.

- A - Description de l'échelle.
- B - Expérimentation et résultats.
- C - Discussion.

I- DEFINITIONS.

II- RESISTANCE ET SENSIBILITE DU COLLETOTRICHUM ET DU GLOMERELLA
AUX INHIBITEURS DE CROISSANCE ET AUX FONGICIDES.

III- REALISATION DE MUTANTS AUXOTROPHES CHEZ COLLETOTRICHUM LAGENARIUM.

- A - Technique de mutagenèse.
- B - Résultats obtenus.
- C - Détermination des substances exigées par les mutants auxotrophes.
 - 1°- Besoins en amino-acides.
 - 2°- Méthode HOLLIDAY
- D - Etude du pouvoir pathogène des mutants C₄(309) et C₈(14).

IV- ESSAI DE MISE EN HETEROCARYOSE DE DEUX MUTANTS AUXOTROPHES DE COLLETOTRICHUM.

- A - Première méthode: Méthode des fils.
- B - Deuxième méthode avec le couple C₈(14) / C₄(309).

CONCLUSION GENERALE

INTRODUCTION

Le Colletotrichum lagenarium (Pass.) Ell. et Halst., responsable de l'Anthracnose des Cucurbitacées, est classé parmi les Imparfaits. Dans ce vaste groupe de Champignons, certains ont été rattachés à des Ascomycètes ou, plus rarement, à des Basidiomycètes, au fur et à mesure que l'on découvrait leur appartenance au cycle biologique d'espèces ou de genres de l'une ou l'autre de ces deux classes.

C'est ainsi qu'au Glomerella cingulata (Ston.) Sp. et Schr., Ascomycète de l'ordre des Sphaeriales, on rattache des espèces conidiennes appartenant aux genres Colletotrichum et Gloeosporium; seules de faibles différences morphologiques, rarement stables du reste, séparent ces deux champignons. Aussi, de nombreux auteurs ont-ils mis en doute leur valeur générique (23).

De la même manière, la valeur spécifique de nombreuses espèces a été mise en doute, notamment lorsque la phase de reproduction sexuée n'existait pas ou n'était pas encore découverte et qu'il n'existait pas d'organes sexuels distincts ; dans ces cas en effet, la classification basée uniquement ou sur des critères morphologiques ou sur des critères pathologiques s'écarte de l'idée d'unité biologique que comporte la notion d'espèce. Ainsi, bien souvent, des populations d'une même espèce se sont-elles trouvées rangées dans des espèces différentes ; SMALL cité par ROGER (22) considère qu'une grande partie des espèces décrites ne sont en réalité que des races biologiques ou des formes de celles-ci.

En plus du problème posé quant à la validité de la valeur générique et spécifique de Colletotrichum lagenarium, l'absence de reproduction sexuelle rend particulièrement difficile l'étude des bases génétiques de son pouvoir pathogène. En effet, les recombinaisons méiotiques n'existant pas, le caractère étudié (le pouvoir pathogène) ne pourra pas ségréger avec une fréquence suffisamment grande pour qu'on puisse correctement l'observer. Il serait donc intéressant de disposer d'une souche à la fois sexuée et pathogène, en tentant de réunir dans un même cytoplasme des noyaux de la forme sexuée (et non pathogène) et ceux de la forme asexuée (et pathogène), en espérant, par l'accomplissement du cycle parasexuel, obtenir une souche à la fois sexuée et pathogène.

En outre, cette recherche avec le couple Colletotrichum lagenarium et Glomerella cingulata pourrait permettre de disposer, grâce à l'aptitude à former des hétérocaryons puis des recombinaisons de facteurs, d'un argument en faveur d'une parenté biologique entre les deux champignons. Un certain nombre de faits guident le choix de ce couple :

1° - La forme parfaite du Colletotrichum lagenarium, c'est-à-dire le Glomerella lagenarium n'a pu être obtenu qu'artificiellement par STEVENS cité par ROGER (22). Beaucoup d'auteurs rattachent cette forme à celle du Glomerella cingulata.

2° - Au laboratoire on a déjà obtenu par mutagénèse, une souche de Colletotrichum musae (forme conidienne rattachée au Glomerella cingulata) morphologiquement identique au Colletotrichum lagenarium. Il se pourrait qu'il y ait une certaine parenté entre ces deux Colletotrichum puisque les bananes inoculées par ces deux champignons présentent des symptômes nécrotiques dans les deux cas. Par contre, seule le Colletotrichum lagenarium est capable d'attaquer les plantules de Melon (12).

3° - D'autre part, il a été possible, temporairement, de réunir le caractère pathogène du Colletotrichum musae et l'aptitude à la reproduction sexuelle du Glomerella cingulata dans le même individu (11).

4° - Il a été montré aussi l'existence d'anastomoses entre des tubes germinatifs de conidies appartenant à la fois au Glomerella cingulata et au Colletotrichum lagenarium (28). On peut ainsi espérer obtenir des hétérocaryons, voire des recombinaisons mitotiques entre ces deux champignons ; par la même occasion, on posséderait un argument en faveur de la réunion dans une même unité biologique spécifique non seulement du Colletotrichum lagenarium et du Glomerella cingulata mais aussi des formes conidiennes (notamment le Colletotrichum musae) qui se rattachent à cet Ascomycète.

Cependant, il faut signaler que ce programme, aussi audacieux que vaste, nécessite beaucoup de temps dont nous n'avons pas pu bénéficier. Aussi, nous sommes nous attachés à étudier un certain nombre d'aspects de la biologie des deux champignons, plus particulièrement du Colletotrichum lagenarium, aspects pouvant servir ultérieurement à la poursuite du travail dans l'optique ainsi définie.

PREMIERE PARTIE

COMPORTEMENT DU COLLETOTRICHUM LAGENARIUM ET DU GLOMERELLA CINGULATA IN VITRO

I - DESCRIPTION DES SOUCHES DE CHAMPIGNONS UTILISEES.

A - Le Colletotrichum lagenarium.

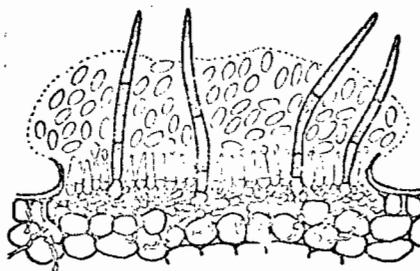
Il appartient à l'ordre des Mélanconiales. La souche sauvage (+) dont nous disposons est utilisée au laboratoire depuis plusieurs années et a été souvent "repassée" sur l'hôte, le Melon (28). En culture in vitro (milieu avoine, 26°C et 60 à 70% d'humidité) cette souche se présente sous forme de mycélium ras, vert foncé à noir, se couvrant au bout de 4 à 5 jours de fructifications orangées, les acervules. Ce sont des amas de conidies agglutinées les unes aux autres par du mucus (pl. 1, 1). L'observation microscopique de ces conidies montre qu'elles sont hyalines, oblongues, de taille variable (4 à 5 μ de large ; 12 à 15 μ de long) unicellulaires et dans la majorité des cas uninucléées (pl. 1).

B - Le Glomerella cingulata.

Il a été décrit pour la première fois par STONEMAN (1898) sur Ligustrum vulgare sous le nom de Gnomoniopsis cingulata, puis par VON SCHRENK et SPAULDING (1933) sous son nom actuel. La souche sauvage (+) que nous utilisons a été isolée sur banane et est conservée depuis plus de 4 ans au laboratoire. Elle se présente sous deux formes :

1 - La forme dite "PLUS" : elle est caractérisée in vitro (milieu avoine, 26°C et 60 à 70% d'humidité) par un mycélium gris feutré, se couvrant d'acervules orangés au bout de 5 à 6 jours puis d'amas de périthèces sous forme de glomérules noirs (pl. 1 - 2). Une préparation microscopique d'un glomérule écrasé entre lame et lamelle permet d'observer des bouquets d'asques contenant des ascospores (pl. 3).

2 - La forme dite "MINUS" : les 8 ascospores d'un asque formé sur une souche de type "PLUS" donnent rarement 8 souches identiques à la souche de départ, mais le plus souvent 4 souches de type "PLUS" et 4 souches de type "MINUS". Ces derniers se présentent in vitro (milieu avoine, 26°C, 60 à 70% d'humidité) sous forme d'un mycélium ras, de couleur noire. Les conidies se



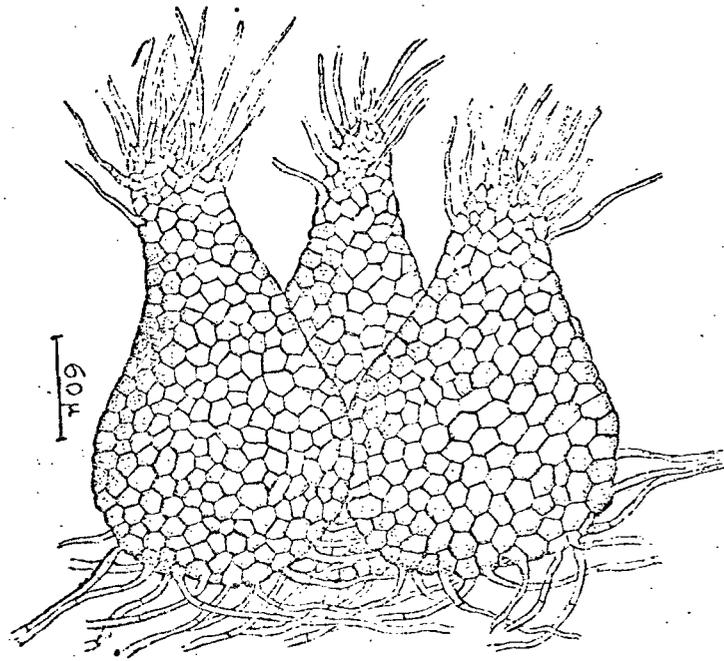
Coupe d'un acervule de Colletotrichum.

(MESSIAEN et LAFON)(17)

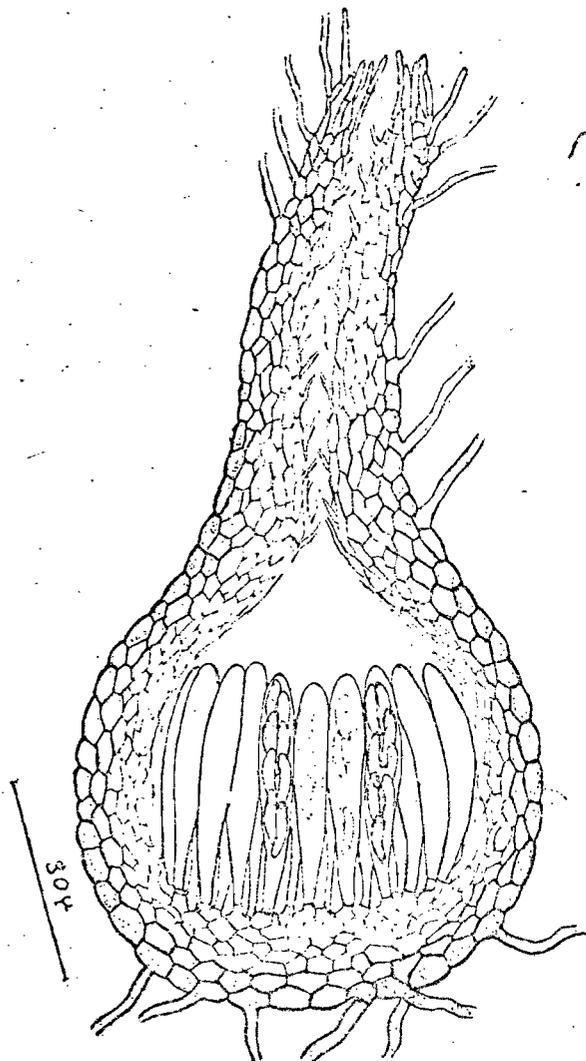
Conidies de Colletotrichum.

Aspect morphologique de thalles sur milieu avoine
à l'issue de 8 jours de culture à 26° C et
60 - 70 % d'humidité relative.

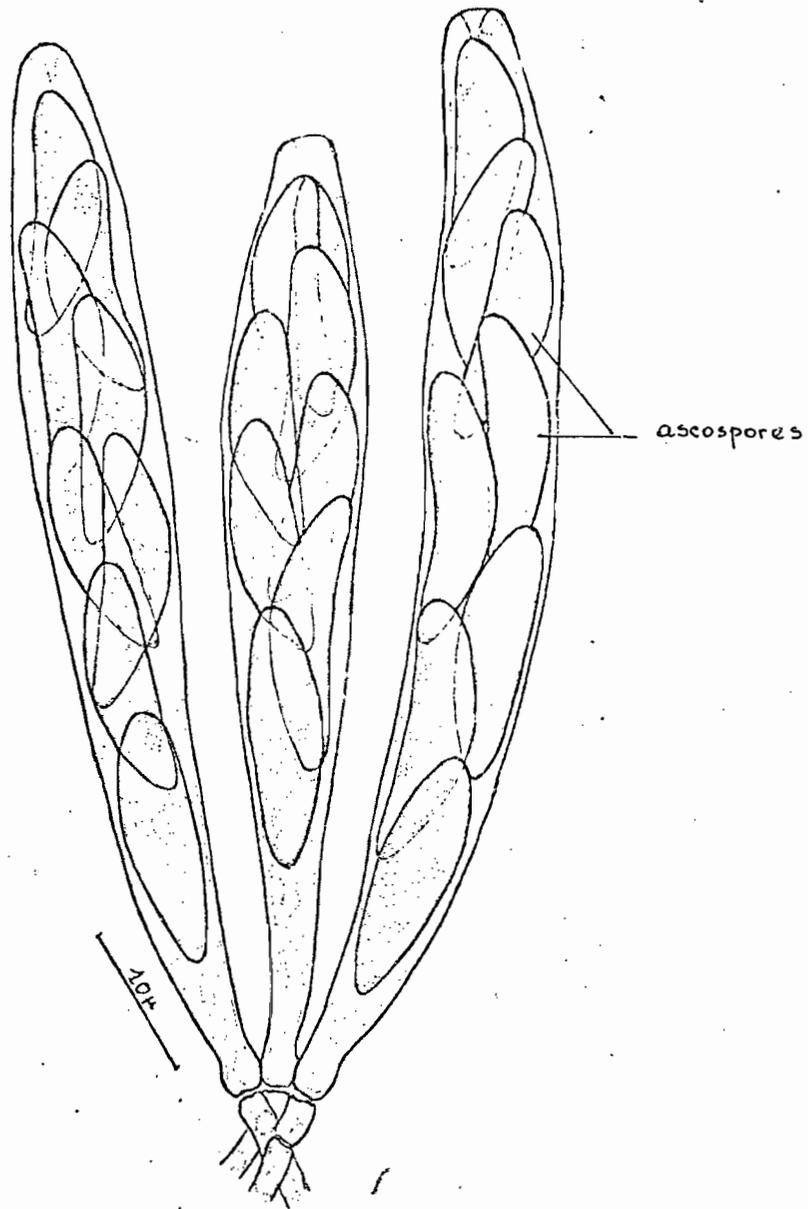
- 1 = Colletotrichum lagenarium
2 = Glomerella cingulata
-



Groupe de périthèces de Glomerella cingulata
(SACCAS et CHARPENTIER)(23).

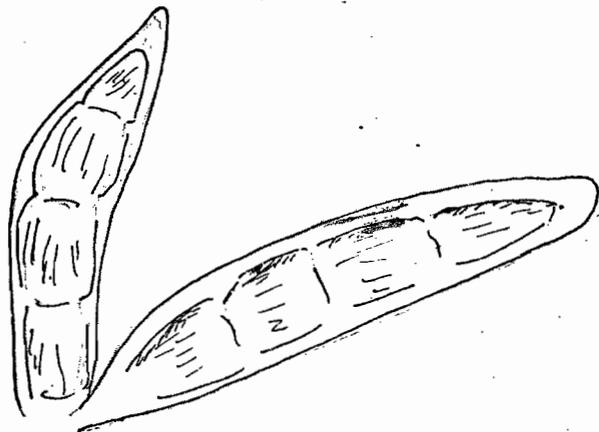


Coupe d'un périthèce de
Glomerella cingulata.
(SACCAS et CHARPENTIER)(23)



Asque de Glomerella cingulata.

(SACCAS et CHARPENTIER)(23).



Jeunes asques de Glomerella cingulata.

(Observés dans une préparation microscopique de glomérules prélevés sur une culture de 12 jours sur milieu avoine à 25°C.)

distinguent mal sur la surface du thalle. Les périthèces sont isolés mais denses ; la plupart sont vides d'asques et d'ascospores. Des clonages monospores (par les ascospores comme par les conidies) ou des repiquages de souches "MINUS" ne donnent que du MINUS. Toutefois WEELEER a observé l'apparition d'un secteur "PLUS" chez une souche "MINUS".

Cette morphologie caractéristique et stable des deux formes est le critère le plus rapide et le plus sûr pour les distinguer.

C - Réflexion sur certains mutants.

Nous disposons en outre d'un certain nombre de mutants obtenus par l'action d'une solution de N-méthyl-N' nitro-N nitrosoguanidine (NG) sur une suspension de conidies de type sauvage (28). Ce sont :

- Pour le Colletotrichum lagenarium

T₁87, T₁98, T₁128, T₁195, T₁258 (50 γ de NG)
T₂58 (80 γ de NG)

- Pour le Glomerella cingulata

T₁93, T₁154, T₁257 (40 γ de NG)
T₄171 (70 γ de NG)

Les mutants Colletotrichum ont un aspect mycélien voisin de celui de la souche sauvage, mais leurs thalles, dans les mêmes conditions, ont des diamètres différents. D'autre part, certains ne produisaient pas d'acervules sur les milieux utilisés ; mais le plus souvent, des clonages monospores ou des chocs physiques (changement de température ou de degré d'hygrométrie, scarifications à la surface du thalle) permettent de rétablir cette propriété. La souche T₁258 n'a cependant jamais produit d'acervules. Tous ces mutants, initialement auxotrophes (28) ont recouvré leur prototrophie.

Les mutants Glomerella ont une morphologie voisine de la souche sauvage ; le T₁257 a une croissance nettement inférieure à celle des autres. Là aussi, si on effectue des scarifications, on peut provoquer l'apparition d'acervules même chez les souches qui avaient perdu cette faculté après des bouturages successifs. Seules les souches T₁93 et T₁171 sont demeurées auxotrophes.

Comme nous avons pu le constater lors de la réalisation de nouveaux mutants auxotrophes, un certain nombre de souches retenues pour leurs inaptitudes à pousser sur milieu minimum vont acquérir progressivement cette aptitude, surtout les premiers mois qui suivent la mutagenèse. Est-ce le fait

des mutations réverses, d'adaptation ou d'autres phénomènes ? Il est difficile d'y répondre avec certitude. Toutefois, étant donné la fréquence faible des mutations spontanées, étant donné la généralité de ces retours vers la prototrophie, il s'agirait surtout d'adaptation ; en effet, puisque plusieurs voies de synthèse peuvent conduire à une même substance, le blocage d'une seule voie peut être relayé par une autre ; la souche se serait alors adaptée à une situation nouvelle grâce aux possibilités que lui offrait son génotype.

Par contre, dans le cas des mutants ci-dessus conservés longtemps au froid sur milieu maltéa, sans écarter les possibilités d'adaptation, il est fort probable que d'autres phénomènes aient pu intervenir : des mutations réverses ou partiellement réverses, des mutations à d'autres locus réprimant le mutant auxotrophe tel qu'il est signalé chez Aspergillus nidulans (15) et Coprinus lagopus (13). La longue conservation des souches fait que la moindre mutation vers la prototrophie a le temps de s'étendre et de masquer le mutant auxotrophe.

D'une manière générale, on peut distinguer les 7 souches de Colletotrichum des 5 souches de Glomerella rien qu'en observant leur morphologie sur milieu avoine : mycélium aérien abondant sous forme d'un feutrage gris à gris verdâtre pour les Glomerella, mycélium ras, brun plus ou moins foncé pour les Colletotrichum. Mais à l'intérieur de chacun de ces deux groupes la distinction entre les souches utilisées est moins évidente. Dans la recherche de critères nous permettant de les caractériser, nous avons étudié le taux de germination des conidies sur milieu maltéa ; ils varient de façon importante d'une expérience à l'autre pour une même souche. Nous avons tenté de mesurer la longueur des tubes germinatifs des conidies en suspension dans de l'eau. Là aussi, on observe des variations importantes pour une même souche. Quant aux conidies, elles ont des tailles voisines.

Nous nous sommes donc contentés du seul critère qui était apparu à l'observation macroscopique : le diamètre des thalles. Pour cela, sur 8 boîtes de chaque souche on prélève des conidies qu'on étale sur milieu maltéa. On prélève au hasard les conidies germées qu'on dépose sur maltéa et sur amidon. Au bout de 6 jours d'incubation à 26°C, 60 à 70% d'humidité, la mesure des diamètres des thalles donne le résultat consigné dans le tableau 1.

Milieux de culture	N° des clones	Souches de <u>Colletotrichum</u>					
		(+)	T ₁ ⁹⁸	T ₁ ¹²⁸	T ₁ ⁸⁷	T ₁ ⁵⁸	T ₁ ¹⁹⁵
Maltéa	1	32	32	27	23	22	19
	2	34	33	26	22	20	21
	3	33	32	26	25	20	17
	4	34	31	25	26	19	19
	5	31	32	24	21	17	19
	6	35	30	24	22	18	17
	7	32	33	25	23	22	18
	8	34	32	27	22	20	17
Amidon	1	26	27	23	20	24	22
	2	28	25	25	24	22	21
	3	30	29	23	24	20	18
	4	28	29	21	24	23	17
	5	29	27	21	22	22	16
	6	26	30	23	24	21	19
	7	31	28	22	23	23	19
	8	31	28	23	23	20	18

Tableau I - Diamètre (en mm) des thalles des souches de Colletotrichum, au bout de 6 jours d'incubation à 26°C 60 à 70% d'humidité.

Nous avons essayé de déterminer les zones de variation des diamètres de chaque souche en calculant l'intervalle de confiance au coefficient de sécurité de 95% par la formule (7) :

$$M \pm (t_{0,05} \times S_m)$$

Nous obtenons les résultats mentionnés dans le tableau 2 et illustrés par le graphique 1.

Souches	Milieu Maltéa	Milieu Amidon
(+)	33,12 ± 1,21	28,62 ± 1,79
T ₁ 98	31,87 ± 0,80	27,87 ± 1,39
T ₁ 128	25,5 ± 1,00	22,62 ± 1,16
T ₁ 87	23,00 ± 1,50	23,00 ± 1,26
T ₂ 58	19,75 ± 1,57	21,87 ± 1,30
T ₁ 195	18,37 ± 1,26	18,75 ± 1,77

Tableau 2

Nous avons en outre essayé de voir si les différences de tailles observées étaient significatives au moyen de l'analyse de variance. Les variances sont homogènes car le rapport $F = S_{max}/S_{min} = 4,6$ est inférieur au F théorique.

Origine de la variation	d.d.l.	S.C.E.	CM	F calculé	F théorique	Conclusion
Totale	95	2327,9				
Effet souche	5	1933	386,6	171,06	2,37	S
Effet milieu	1	52,5	52,5	23,23	4	S
Effet clones	7	24,16	3,45	1,52	2,09	NS
Interaction S x M	5	144,28	28,96	12,81	2,37	S
Résiduelle	77	173,96	2,26			

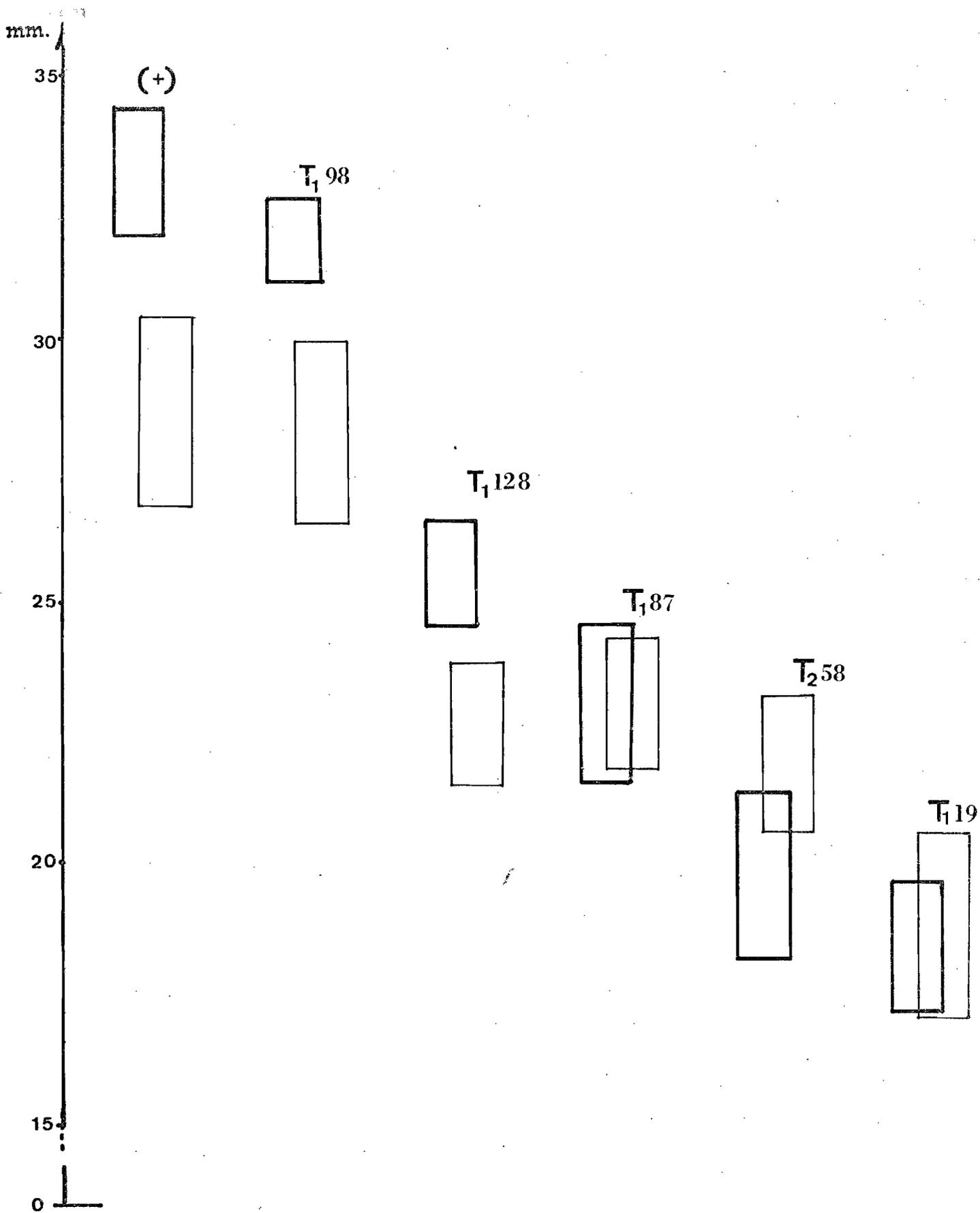
Tableau 3

On en déduit :

1° - Les différences entre les diamètres de thalle à l'intérieur d'une même souche ne sont pas significatives.

2° - Les souches, sur les deux milieux, sont significativement différentes.

3° - Les souches se comportent différemment selon les milieux.



Graphique 1 : Amplitude des variations dans le diamètre des clones chez les souches de Colletotrichum

- . sur maltia ———
- . sur amidon - - - -

Par conséquent, les diamètres des thalles des souches peuvent bien servir à les différencier. Nous les avons classés au moyen du test de TUCKEY, ce qui permet de les regrouper :

- sur milieu Maltéa : $((+) = T_{1,98}) > T_{1,128} > T_{1,87} > (T_{2,58} = T_{1,195})$
- sur milieu Amidon : $((+) = T_{1,98}) > (T_{1,128} = T_{1,87} = T_{2,58}) > T_{1,195}$

II - CARACTERES CULTURAUX DU COLLETOTRICHUM ET DU GLOMERELLA.

A - Milieux de culture utilisés.

- MALT GELOSE ("Maltéa" dit "N").

20 g de Maltéa "Moser"

20 g d'Agar ordinaire

Eau q.s.p. 1 litre

Le mélange est mis à autoclaver à 120°C pendant 40 mn (pour 1 litre de milieu) ou 50 mn (2 litres) ou 60 mn (4 litres).

- AVOINE GELOSE

200 g d'Avoine

112 g d'Agar ordinaire

8 litres d'eau (+ 0,4 l pour compenser l'évaporation)

Le mélange est porté à ébullition pendant 10 mn, sans cesser de remuer, puis filtré au "chinois". Il est réparti dans 3 erlens avant de l'autoclaver à 120°C pendant 40 mn.

- AMIDON GELOSE

10 g d'Amidon soluble, 2 g Extrait de Levure

20 g d'Agar ordinaire

Eau q.s.p. 1 litre

A ces produits, on peut éventuellement ajouter 1 g d'hydrolysate de caséine.

Le mélange est autoclavé à 120°C pendant 40 mn, ou 50 mn ou 60 mn.

- MILIEU MINIMUM (MM)

Il nous sert à déterminer les auxotrophes, car il ne contient comme source nutritionnelle que des sels minéraux et du glucose.

Dans deux litres d'eau bidistillée on met les produits dans l'ordre ci-dessous, en prenant soin de bien les dissoudre à chaque fois

avant d'ajouter le produit suivant :

- 4 g de KH_2PO_4
- 2 g de $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 2 g de KCl
- 4 cc de solution (à 1 g/100 cc) de $\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 8 g de Na NO_3
- 80 g de glucose
- 100 g d'Agar noble

On ajuste ensuite à 4 l (+ 0,2 l) avec de l'eau bidistillée et on porte le tout à l'autoclave 110°C - 60 mn.

B - Mode de culture.

On peut procéder par repiquage de fragments de mycélium, mais ceci présente certains inconvénients dans bien des cas (souches hétérogènes par exemple) ; il est préférable d'effectuer des clonages ; en outre, ces clonages permettent souvent de rétablir la faculté de produire des acervules chez les souches qui ont perdu cette aptitude du fait de repiquages successifs par bouturage.

La conservation des souches se fait par repiquage de fragments de mycélium (ou par clonage) dans des tubes à essai contenant du N_1 . Lorsque le champignon a envahi la surface du milieu, on le porte en chambre froide (0°C) pour éviter un dessèchement du milieu et un vieillissement trop rapide de la culture.

C - Etude de la croissance.

Nous avons étudié la vitesse de croissance des souches sauvages de Colletotrichum et de Glomerella sur des milieux et à des températures différentes. Les résultats obtenus (voir tableau 4) sont illustrés par les graphiques 2, 3 et 4.

C'est sur milieu avoine que la morphologie des 2 types de champignon est la plus caractéristique. En outre c'est lui qui convient le mieux à l'étude de la sexualité du Glomerella car la production d'organes sexuels, dans les conditions de culture utilisées, est rare voire absente sur les autres milieux.

Température	Temps (en j.)	Colletotrichum lagenarium			Glomerella cingulata		
		sur MM	sur N ₁	sur Avoine	sur MM	sur N ₁	sur Avoine
20°	2	0	0	0	7 \pm 0,1	6,7 \pm 0,6	5 \pm 0,1
	4	5,1 \pm 0,7	10,4 \pm 1	9,4 \pm 1,1	26,2 \pm 1,2	23,6 \pm 0,4	19,2 \pm 0,7
	6	10,0 \pm 0,8	20,5 \pm 1,2	19,0 \pm 1,2*	45,1 \pm 1,0	40,1 \pm 1,0	30 \pm 1
	8	19,1 \pm 1,4	31,6 \pm 1,5*	27,5 \pm 1,1	63,9 \pm 1,1	57,3 \pm 1,8*	42,4 \pm 1,0
	12	36 \pm 1,4*	54,0 \pm 1,9	46,1 \pm 2	-	-	66,8 \pm 1,8
25°	2	ξ	3,1 \pm 0,6	2,7 \pm 0,6	16,8 \pm 1,2	15,2 \pm 0,7	11,2 \pm 1,5
	4	6,5 \pm 1,8	17,4 \pm 1,1	17 \pm 0,4*	46,9 \pm 1,2	41,7 \pm 1,4	30,2 \pm 1,3
	6	19,2 \pm 1,1*	31,5 \pm 1,5*	26,5 \pm 1,1	75,0 \pm 0,7	68,1 \pm 1,7*	47,6 \pm 1,7
	8	28,7 \pm 1,2	45,5 \pm 0,9	39,0 \pm 0,8	- *	-	68,8 \pm 1,8
	12	48,1 \pm 1,4	73,7 \pm 1,2	59,3 \pm 1,0	-	-	-
30°	2	0	0	0	6,4 \pm 1	7,3 \pm 0,8	7 \pm 1,0
	4	0	0	0	16,2 \pm 0,3	11,8 \pm 0,6	11,0 \pm 0,7
	6	4,0 \pm 0,9	ξ	ξ	30,5 \pm 0,7	25,0 \pm 0,5	26,7 \pm 1,8
	8	7,2 \pm 0,9	1,6 \pm 0,9	3,7 \pm 1,2	42,6 \pm 0,7	32,7 \pm 1,0	38,5 \pm 1,8
	12	13,3 \pm 0,8	2,5 \pm 1,6	8,0 \pm 2,0	61,8 \pm 1	40,0 \pm 1	56,4 \pm 2

Tableau 4 - Croissance diamétrale du Colletotrichum lagenarium et du Glomerella cingulata en fonction de la température des milieux et du temps.

ξ = croissance limitée au semis

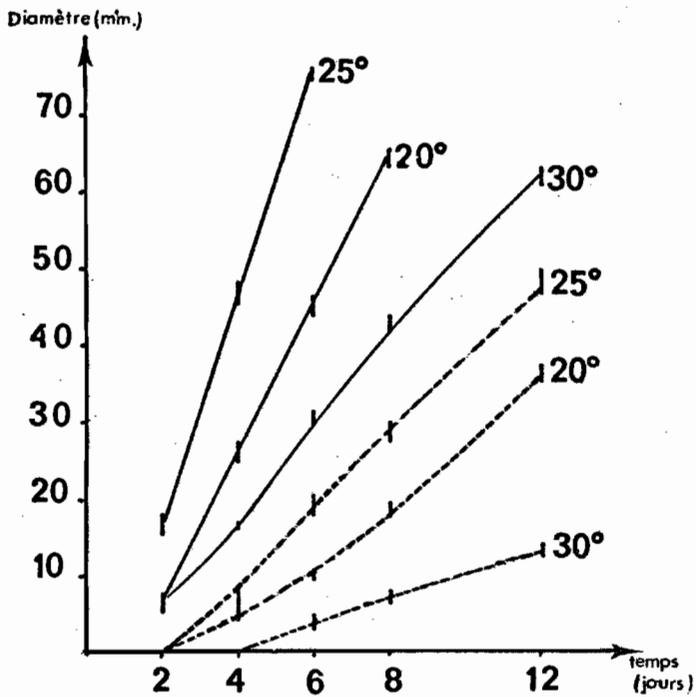
- = boîte remplie

* = début d'apparition d'acervules

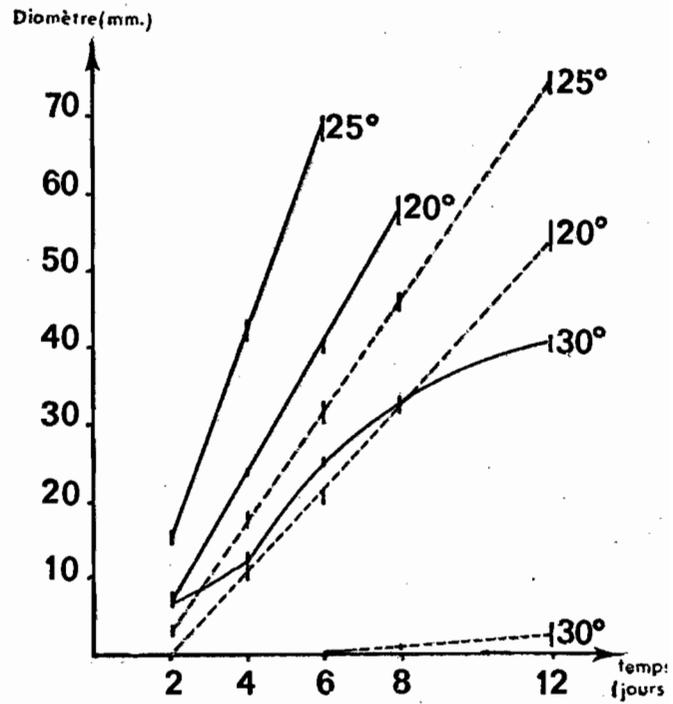
Les valeurs consignées sont les moyennes de 7 à 10 thalles provenant de clonage.

CROISSANCE DIAMETRALE DU COLLETOTRICHUM ET DU GLOMERELLA

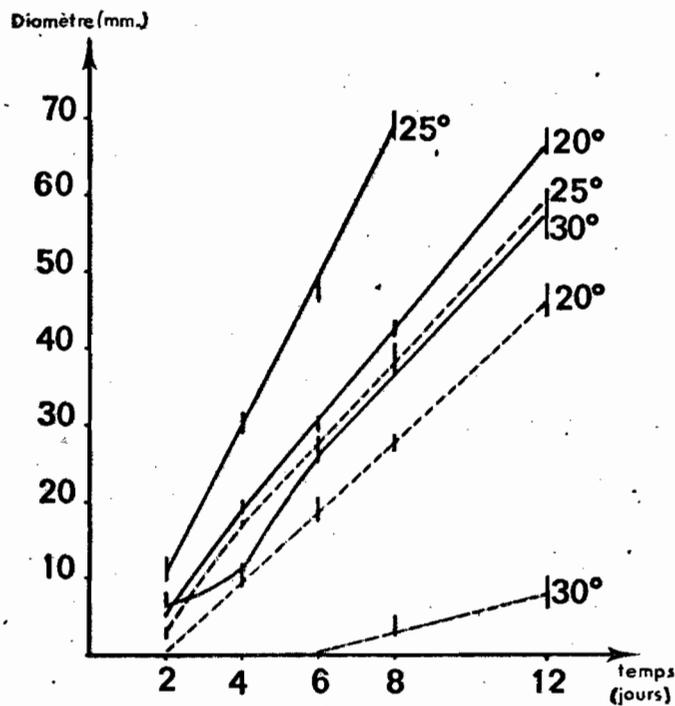
----- COLLETOTRICHUM ; ——— GLOMERELLA



Graphique 2: Sur MILIEU MINIMUM



Graphique 3: Sur MALTEA



Graphique 4: Sur AVOINE

Sur avoine, à 25°C et au bout de 12 jours, on pouvait apercevoir quelques glomérules ; une préparation microscopique d'une glomérule écrasée entre lame et lamelle montre surtout de jeunes asques qui semblent contenir 4 cellules (Planche 3).

D'une manière générale, la production d'acervules est plus abondante chez Colletotrichum que chez Glomerella. Là encore, c'est sur avoine qu'on pouvait observer le plus d'acervules, cependant, chez Colletotrichum, la production des acervules est abondante aussi sur amidon, et surtout sur amidon + hydrolysats de caséine.

Cette première partie rassemble quelques données sur les deux types de champignon et nous a permis de nous familiariser avec le matériel. Il est bon de voir à présent comment le champignon pathogène se comporte sur son hôte, le Melon.

DEUXIEME PARTIE

COMPORTEMENT DU COLLETOTRICHUM LAGENARIUM SUR SON HOTE : LE MELON

I - GENERALITES SUR LA MALADIE.

A - Les symptômes.

Le Colletotrichum lagenarium infecte tous les organes aériens (feuilles, tiges et éventuellement fruits) des Cucurbitacées en général (Pastèque, Concombre, Melon). Les fortes attaques du champignon peuvent conduire à la destruction totale du feuillage, surtout lorsqu'elles surviennent au moment où la plante est à un stade jeune de son développement. Des infections en cours de végétation peuvent perturber la production des Melons, car si les jeunes fruits sont atteints, ils présentent une croissance anormale. Sur les fruits, l'Anthracnose se caractérise par des taches rondes, creuses, brunâtres puis noires, se couvrant de petits points orangés, les acervules (1) (22). L'importance de la maladie tient surtout au fait que les fruits infectés peuvent être sujets à des attaques secondaires de diverses espèces de Pythium provoquant la décomposition des pulpes (le "blossom end rot") (22) et de Rhizopus causant des pourritures.

B - Cycle du parasite.

Les spores germent à des températures optimales de 22 à 27°C. Elles émettent des filaments germinatifs qui forment des appressoria à parois épaisses pénétrant directement l'épiderme des feuilles ou la peau des fruits pour se développer en un mycélium intracellulaire.

D'une manière générale, les fructifications (acervules) du champignon apparaissent surtout par temps pluvieux sur les organes atteints (22). Les spores sont produites dans une substance gélatineuse qui se racornit par temps sec. La progression de l'Anthracnose se fait donc lentement à partir de foyers initiaux à la faveur de la pluie (17) ou par les insectes.

On ne sait pas encore exactement s'il y a perpétuation d'une année à l'autre principalement par les résidus de culture, ou si la transmission par les semences joue le rôle prédominant (17).

II - ETUDES EXPERIMENTALES DU POUVOIR PATHOGENE DU COLLETOTRICHUM SUR DES PLANTULES DE MELON.

A - Variétés de Melon utilisées.

Quatre variétés de Melon nous ont servi à tester le pouvoir pathogène des différentes souches de Colletotrichum. Ce sont :

1° - CANTALOUPE CHARENTAIS, de la Société de production grainière de Lyon-Villeurbanne ; cette variété prédomine sur le marché actuel du Melon en France (80%) car c'est elle qui offre le maximum d'avantages au consommateur (donc au producteur) du point de vue du goût, du parfum et de l'aspect du fruit. Du fait de l'allogamie du Melon, les marchands grainiers présentent sous ce nom une population plus ou moins homogène.

2° - DOUBLON (obtention INRA) ; caractérisée par sa précocité, c'est une des sélections de la variété Cantaloupe Charentais pour de petites productions de serre.

3° - CM 17187 de la station d'Amélioration des Plantes maraîchères de Montfavet (Vaucluse) ; c'est une variété souvent utilisée comme géniteur dans la recherche de résistance au Fusarium oxysporum f. sp. melonis.

4° - CHARENTAIS sensible à la race 1 du Fusarium oxysporum f. sp. melonis.

Deux techniques expérimentales ont été utilisées selon que nous travaillions sur des plantules cultivées soit en serre, soit sur milieu synthétique gélosé.

B - Test de pathogénie sur plantules cultivées en tube.

1° - Mode opératoire.

Les graines de Melon sont désinfectées pendant une demi-heure dans une solution de chlorure mercurique à 1‰ puis abondamment rincées à l'eau stérile. Elles sont mises à prégermer en boîte de Petri sur coton imbibé d'eau stérile et recouvert de papier Joseph. Le repiquage dans les tubes

(25 cm de long et 2,5 cm de diamètre) contenant du milieu synthétique gélosé s'effectue lorsque la radicule a atteint une longueur de 1 à 2 cm. Le temps de prégermination varie entre 2 et 3 jours selon l'origine et l'âge des graines.

- Préparation du milieu synthétique gélosé. (8)

Un mélange des sels minéraux suivants est finement broyé et homogénéisé.

- Phosphate de Potassium KH_2PO_4	1 g
- Chlorure de Potassium KCl	7 g
- Sulfate de Calcium Ca SO_4	2,5 g
- Sulfate de Magnésium hydraté $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
- Sulfate ferrique $\text{Fe}_2 (\text{SO}_4)_3$	0,5 g
- Nitrate de Potassium KNO_3	2 g

1,5 g de ce mélange est dissout dans un litre d'eau distillée auquel on ajoute 12 g d'Agar ordinaire. Le tout est porté à ébullition avant d'être réparti dans les tubes à essai qui sont portés à l'autoclave à 120°C pendant 40 mn.

Lorsque les plantules ainsi obtenues atteignent le stade une feuille ou deux feuilles étalées au-dessus des cotylédons, on étale sur tous les organes aériens une suspension de spores de $15 \cdot 10^6$ conidies par ml. Les tubes, bouchés par du coton, sont en outre fermés hermétiquement avec du parafilm pendant les deux premiers jours après l'inoculation afin d'y entretenir un microclimat à humidité saturante favorable au développement du champignon. Ils sont placés en chambre de culture à 26°C et 60 à 70% d'humidité.

2° - Résultats.

Les symptômes, notés au bout d'une puis deux semaines sont caractérisés par des tâches plus ou moins brunes sur les cotylédons, les feuilles et les tiges. Ces taches se limitent aux organes infectés où elles peuvent s'étendre et provoquer une fanaison ou un dessèchement.

Une première observation de plantules de Cantaloup Charentais inoculées avec une suspension de spores de la souche sauvage nous a permis d'établir l'échelle suivante :

- (-) aucun symptômes
- (+) quelques petites taches brunes surtout sur les cotylédons

(++) taches nécrotiques brunes, plus ou moins nombreuses sur les organes aériens (feuille et cotylédons principalement)

(+++) fanaison ou dessèchement - Mort des plantules

Ces degrés d'attaques pourraient correspondre respectivement aux degrés 0, 4, 6 et 8 de l'échelle établie par l'équipe de Toulouse (27).

Cette étude expérimentale du pouvoir pathogène des 6 souches de Colletotrichum sur les 4 variétés de Melon conduit aux résultats du tableau 5.

Variétés de Melon	Nbre de jours après l'inoculation	Souches de <u>Colletotrichum</u>						Témoin 1 (+)	Témoin 2
		T ₁ ⁹⁸	T ₁ ¹²⁸	T ₁ ⁸⁷	T ₁ ¹⁹⁵	T ₂ ⁵⁸			
Doublon	8	+++	++	+	+	++	+++	-	
	15	+++	+++	++	+	+++	+++	-	
CM 17187	8	++	++	+	+	+	++	-	
	15	++	++	++	+	++	+++	-	
Cantaloup Charentais	8	+++	++	+	-	++	+++	-	
	15	+++	++	++	+	+++	+++	-	
Charentais "S"	8	+++	++	+	-	++	+++	-	
	15	+++	++	++	+	+++	+++	-	

Tableau 5 - Premier passage des souches sur des plantules cultivées sur milieu synthétique gélosé.

Témoin 1 = souche sauvage

Témoin 2 = Eau sans conidie

Taux d'inoculum: 12 à $15 \cdot 10^6$ conidie/ml, (0,5 ml par plantules).

Tout au long de l'expérimentation, nous n'avons pas observé (du moins à l'oeil nu) de productions d'acervules sur la plante entière. Cependant, en fin d'expérience, des fragments d'organes nécrosés (feuilles ou pétioles) déposés sur papier filtre humide et mis à incuber à 26°C ont produit des acervules. Des conidies sont prélevées de ces fructifications et étalées sur

N₁ avec une goutte de solution d'antibiotique composée de :

- 1 g de Dihydrostreptomycine à l'état de sulfate (Didromycine)
- 100 000 UI de Benzylpenicilline de sodium cristallisé
- 500 cc d'eau stérile.

On peut ainsi procéder à des clonages monospores 24 h après l'étalement.

En outre il est possible de repiquer des extrémités d'hyphe provenant d'organes nécrosés déposés sur milieu Martin composé de :

- KH₂PO₄ 1 g
- Mg SO₄ 7H₂O 0,5 g
- Peptone 5 g
- Glucose 100 g
- Rose bengal 1 pincée
- Agar ordinaire 20 g
- Eau q.s.p. 1 litre

Les souches réisolées et entretenues sur milieux Avoine et Amidon seront utilisées pour le test où les symptômes ont été quantifiés (voir plus loin).

C - Test de pathogénie sur plantules cultivées en serre.

1° - Mode opératoire.

Les graines, semées dans des pots, donnent des plantules plus grandes que celles obtenues précédemment en tube. L'inoculation se fait au stade une feuille étalée au-dessus des cotylédons en étalant sur tous les organes aériens une suspension de conidies de $3 \cdot 10^6$ spores par ml. Les plantules inoculées sont maintenues sous une cage en plastique dans laquelle on pulvérise de l'eau pendant les 3 premiers jours afin d'y entretenir une atmosphère d'humidité saturante.

Les plantules atteintes présentent des taches nécrotiques plus ou moins brunes surtout sur les cotylédons, mais aussi parfois sur les feuilles et les tiges (Planche 5). Ces taches varient en taille, en fréquence et se situent le plus souvent le long des nervures.

Plantules de Melon cultivées en serre (température non contrôlée)
et en chambre de culture sur milieu synthétique gélosé (26 °C)

1 = Plantules au stade une feuille
2 = Plantules au stade deux feuilles

Symptomes d'Anthracnose sur des plantules de Melon.

Les photographies ont été effectuées 8 jours après l'inoculation de plantules de "Cantaloup Charentais"

- 1 = Plantule témoin saine (utilisation de l'eau en guise d'inoculum)
- 2 = Plantule attaquée par la souche sauvage (notation ++)
- 3 = Plantule attaquée par la souche T₁87 (notation +)
- 4 = Plantule saine inoculée par la souche T₁195

Observation de la pénétration d'un filament de
Colletotrichum lagenarium.

2° - Résultats.

Sur la base de l'échelle précédemment définie, les symptômes sont notés au bout d'une et deux semaines (voir tableau 6).

Variétés de Melon	Nbre de jours après l'inoculation	Souches de <i>Colletotrichum</i>						Témoin 1 (+)	Témoin 2
		T ₁ 98	T ₁ 128	T ₁ 87	T ₁ 195	T ₂ 58			
Doublon	8	++	++	+	-	++	+++	-	
	15	+++	++	++	-	+++	+++	-	
CM 17187	8	++	+	-	-	+	++	-	
	15	++	++	+	-	++	+++	-	
Cantaloup Charentais	8	++	++	+	-	++	++	-	
	15	+++	++	+	-	++	+++	-	
Charentais "S"	8	++	++	+	-	++	+++	-	
	15	++	++	+	-	++	+++	-	

Tableau 6 - Premier passage des souches sur des plantules cultivées en serre.

Témoin 1 = suspension de conidies de type sauvage

Témoin 2 = Eau sans conidies

Taux d'inoculum: $3 \cdot 10^6$ conidies/ml ; (environ 2ml par plantules)

Dans les conditions expérimentales, nous n'avons observé d'apparition d'acervules qu'en déposant des organes sur papier filtre humide et en les mettant à incuber 24 ou 48 h à 26°C, 60 - 70% d'humidité.

Nous avons tenté d'observer la pénétration des filaments en déposant une suspension de conidies sur une feuille de Cantaloup Charentais et en observant au microscope après 24 ou 48 h d'incubation à 26°C. La pénétration se fait directement par l'épiderme des feuilles.

D - Discussion et conclusion5.

Bien que nous n'ayons pas utilisé, après chaque réisolement, le critère de croissance qui permet de différencier les souches, une étude des diamètres des thalles de chaque souche réisolée et entretenue sur avoine et amidon a donné des résultats tout à fait compatibles avec ceux de la page 7 .

Ceci nous a conduit à admettre l'identité des souches inoculées et réisolées. De même on peut admettre que les symptômes observés sont bien dus à ces souches.

De ces deux premiers tests de pathogénie, nous pouvons tirer les remarques générales suivantes :

1° - Toutes les souches possèdent, à des degrés divers, un pouvoir pathogène vis-à-vis du Melon ; les mutants obtenus antérieurement (26) ont subi des modifications non seulement dans leur croissance, mais aussi dans leur pouvoir pathogène. Le mutant T₁195 a provoqué des symptômes lors d'un second passage sur Cantaloup Charentais en serre, lorsque nous avons utilisé comme inoculum des conidies provenant des réisolements à partir des nécroses qu'il avait provoquées sur les plantules cultivées en tube. L'absence de symptôme lors de sa première utilisation (voir tableau 6) ne serait-elle pas due au fait que son pouvoir pathogène, déjà faible, a été réduit par son entretien prolongé au laboratoire ?

2° - Les variétés Doublon, Cantaloup Charentais et Charentais sensible au Fusarium oxysporum f. sp. melonis semblent plus sensibles que la variété CM 17187. Nous avons noté un comportement analogue du Cantaloup Charentais et Charentais Sensible, vis-à-vis des souches, en serre comme en tube.

3° - D'une manière générale, les souches ayant le plus fort pouvoir pathogène sont celles qui croissent le plus in vitro (exception faite pour la souche T₂58).

4° - Les différentes souches semblent se classer dans le même ordre selon leur degré de pathogénie sur chacune des variétés de l'hôte.

5° - Quelle que soit la méthode utilisée (inoculation de plantules en serre ou en tube à essai), les résultats obtenus vont dans le même sens. Toutefois, les symptômes apparaissent plus amplifiés dans le cas des inoculations en tube : ainsi, lors d'un premier passage sur l'hôte, la souche T₁195 provoquait de faibles taches sur les plantules cultivées en tube, alors qu'elle n'en provoquait pas sur les plantules cultivées en serre. Cette amplification des symptômes pourrait provenir du fait que les plantules sont dans de moins bonnes conditions en tube (elles s'y développent moins bien)* et que le parasite s'y trouve dans de meilleures conditions qu'en serre. Il serait donc hasardeux

d'affirmer que les résultats obtenus sur des plantules en tube rendent bien compte de la valeur réelle du pouvoir pathogène du Colletotrichum. Tout au plus, étant donné que les deux tests ne semblent pas introduire de différences notables dans le comportement des différentes souches vis-à-vis des différentes variétés, on peut penser que cette méthode puisse servir à comparer le pouvoir pathogène des différents mutants et les degrés de sensibilité des différentes variétés. Peut-être aurait-il été intéressant d'effectuer une comparaison statistique entre les deux méthodes par une étude corrélative de l'évolution de la maladie sur des plantules en serre et sur des plantules en tube.

Malgré cette réserve nous nous sommes limités par la suite, pour des raisons de commodité, aux essais en tube qui offraient un certain nombre d'avantages :

- meilleure lecture du fait de l'amplification des symptômes et évolution rapide ;
- meilleur contrôle des conditions expérimentales ;
- sécurité dans l'expérimentation du fait des conditions de stérilité dans lesquelles on travaille.

A travers ces deux tests de pathogénie, il nous semble n'avoir mis en évidence que de l'agressivité (3) (29) chez les souches de Colletotrichum et des différences de niveau de résistance horizontale chez les variétés. En effet :

- les différences entre les souches sont de nature quantitative sur chaque variété et elles se classent à peu près selon le même ordre sur chaque variété, des plus pathogènes aux moins pathogènes ;
- les plus fortes croissances semblent liées au plus fort pouvoir pathogène ;
- les conditions extérieures (température, humidité, nutrition de la plante) influent sur l'évolution de la maladie.

L'échelle que nous avons utilisée dans ces deux tests ne rend pas suffisamment compte des différences de pouvoir pathogène entre les souches. Il apparaît donc nécessaire de mettre au point une méthode fine pour caractériser l'Anthraxose sur les plantules de Melon afin de mieux cerner les variations dans le degré de pathogénie des différentes souches de Colletotrichum lagenarium.

II - RECHERCHE D'UNE ECHELLE FINE.

A - Description de l'échelle.

Les premières observations sur l'évolution des symptômes de l'Anthracnose nous avaient permis de constater que sur chaque organe attaqué, la maladie est plus ou moins importante selon que la proportion de surface atteinte est plus ou moins grande. Aussi nous avons quantifié les symptômes de la manière suivante :

Proportion de surface atteinte	Degré d'atteinte
aucun symptômes	0
moins d'un quart	1
1/4	2
1/2	3
3/4	4
4/4	5

Tableau 7 - Quantification des symptômes selon la proportion de surface d'organe atteinte.

Au niveau de la plante entière, la maladie est plus ou moins importante selon qu'il y a plus ou moins d'organes atteints, à des degrés plus ou moins élevés. Il peut arriver que la plantule survive malgré la destruction des cotylédons et qu'elle forme de nouvelles feuilles saines ; le degré d'atteinte précédemment défini ne suffirait pas, dans ce cas, à rendre compte de l'état pathologique de la plante. C'est pourquoi nous avons pensé pondérer ce degré d'atteinte par le nombre total d'organes développés au moment de la lecture ; nous définissons ainsi un indice d'agressivité :

$$I = \frac{\text{Somme des degrés d'atteinte}}{\text{Nombre total d'organes}}$$

Nous considérons par exemple qu'une plante au stade une feuille étalée possède 5 organes : 1 Apex, 1 Feuille, 2 cotylédons, 1 tige.

B - Expérimentation et résultats.

Nous avons effectué un test de pathogénie sur des plantules cultivées en tube, sur milieu synthétique gélosé. Les résultats consignés dans le tableau 8 expriment la moyenne des indices d'agressivité sur 4 à 6 plantules selon les cas. Ces moyennes sont affectées de la zone de variation de l'indice d'agressivité au coefficient de sécurité de 95%.

Variété de Melon	Nbre de jours après l'inoculation	Souches de <u>Colletotrichum</u>						Témoin 2
		T ₁ 98	T ₁ 128	T ₁ 87	T ₁ 195	T ₂ 58	Témoin 1 (+)	
Doublon	4	0,93 \pm 0,43	0,73 \pm 0,23	0,03 \pm 0,07	0	0,63 \pm 0,15	1,29 \pm 0,18	0
	8	2,08 \pm 0,66	2,04 \pm 0,43	0,09 \pm 0,1	0	2 \pm 0,66	2,51 \pm 0,6	0
	12	4,54 \pm 0,91	4,03 \pm 0,84	0,27 \pm 0,07	0,02 \pm 0,07	4,35 \pm 0,44	5	0
CM 17187	4	0,95 \pm 0,23	0,56 \pm 0,46	0	0	0,52 \pm 0,46	1 \pm 0,28	0
	8	2,16 \pm 0,90	1,80 \pm 0,77	0,20 \pm 0,10	0,19 \pm 0,20	2,16 \pm 0,59	2,02 \pm 0,74	0
	12	3,65 \pm 0,90	3,17 \pm 0,92	1,38 \pm 0,64	0,55 \pm 0,56	4,4 \pm 0,66	4,55 \pm 0,48	0
Cantaloup Charentais	4	2,4 \pm 0,53	1,1 \pm 0,77	0	0	1 \pm 0,48	2,2 \pm 0,74	0
	8	3,7 \pm 0,44	2,06 \pm 0,46	0,29 \pm 0,28	0,08 \pm 0,10	2,4 \pm 0,75	3,69 \pm 0,48	0
	12	4,25 \pm 0,44	2,73 \pm 0,46	0,69 \pm 0,36	0,45 \pm 0,53	3,76 \pm 0,44	4,83 \pm 0,46	0

Tableau 8

Témoin 1 = Suspension de conidies de type sauvage.

Témoin 2 = Eau sans conidies.

Taux d'inoculum : environ 10^6 conidies/ml; (1ml par plantules.)

N.B.- Toutes les souches avaient été repassées sur l'hôte deux fois.

Ces résultats sont illustrés par les graphiques 5 et 6

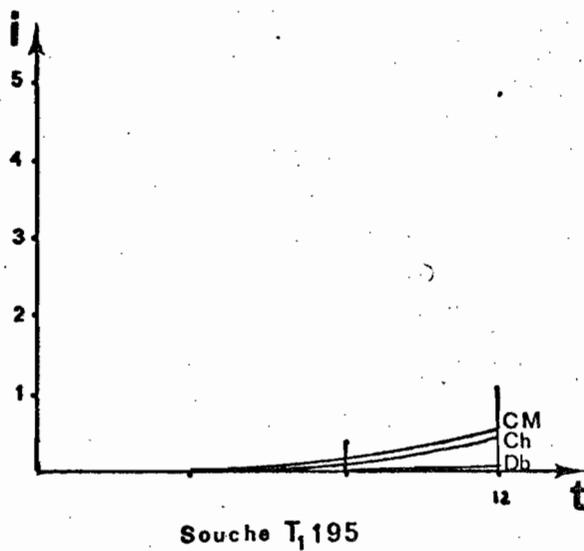
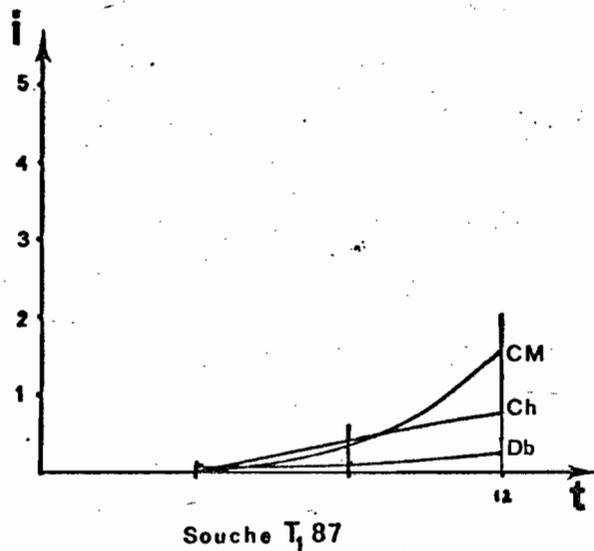
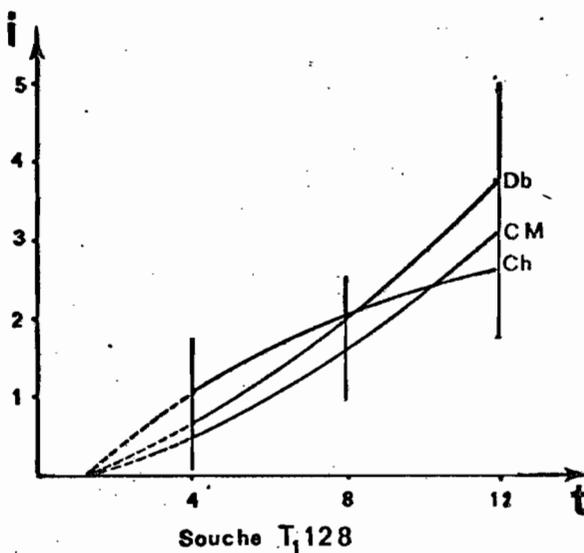
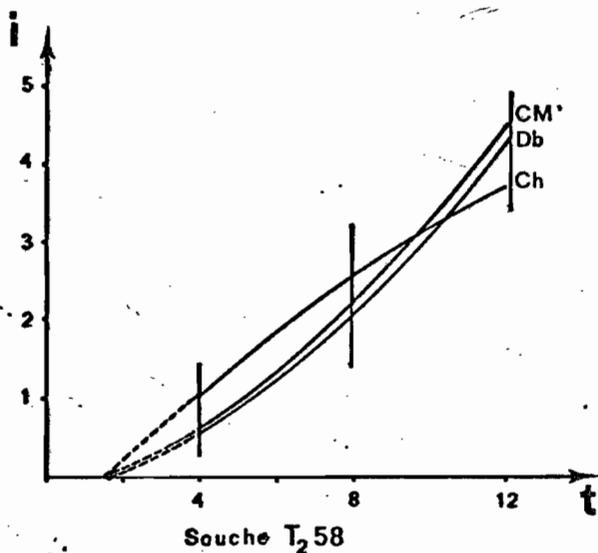
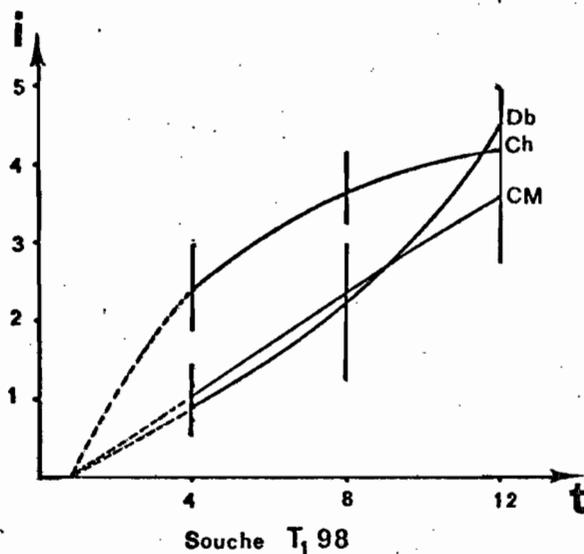
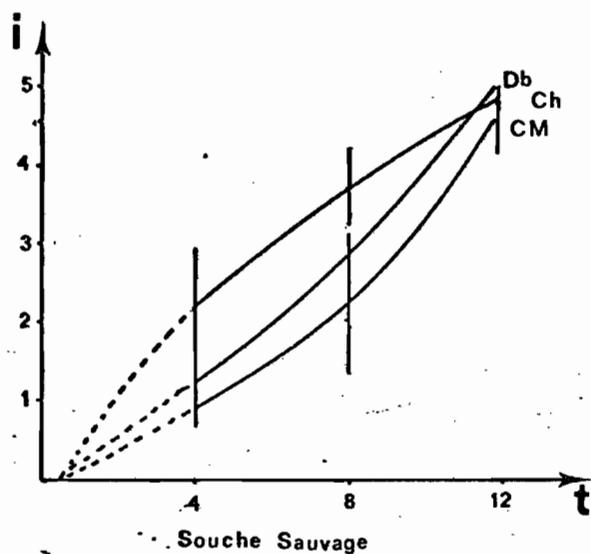
C - Discussion.

Ce qui nous avait surtout guidé dans cette expérimentation c'était de montrer la finesse de l'échelle que nous avons mise au point, par rapport à celle utilisée dans les précédents tests. En effet, si on se réfère aux seules moyennes d'indice d'agressivité, les différences entre les souches paraissent plus nettes.

GRAPHIQUE 5 : COMPORTEMENT DE CHAQUE SOUCHE DE COLLETOTRICHUM
SUR TROIS VARIETES DE MELON

i = Indice d'agressivité.
 t = Nombre de jours après l'inoculation.

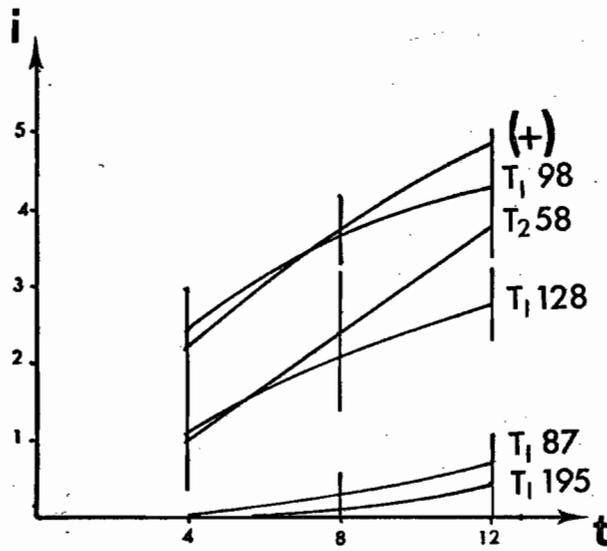
Ch = Cantaloup Charentais.
CM = CM 17187.
Db = Doublon.



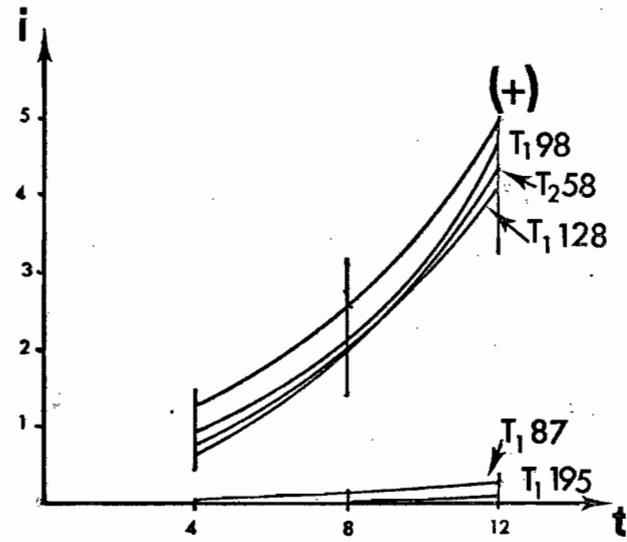
GRAPHIQUE 6 : COMPORTEMENT DE CHAQUE VARIETE VIS-A-VIS DES SOUCHES DE COLLETOTRICHUM

i = Indice d'agressivité .

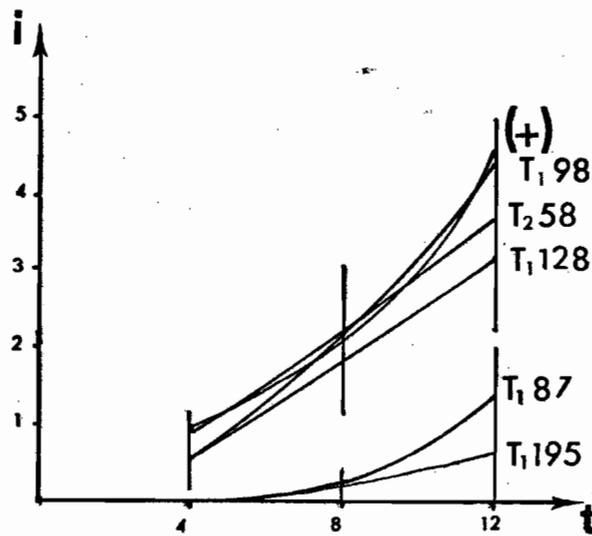
t = Nombre de jours après l'inoculation .



Variété CANTALOUPE CHARENTAIS



Variété DOUBLON



Variété CM 17187

En outre, les observations de l'évolution de ces indices d'agressivité dans le temps, montrent que la maladie semble débiter à la même date pour les trois variétés attaquées par une même souche (Graphique 5). L'évolution ultérieure des symptômes semble introduire des différences : d'une manière générale, sur les variétés CM 17187 et Doublon, les symptômes, faibles au début, augmentent rapidement au cours de la deuxième semaine qui suit l'inoculation. Par contre, sur Cantaloup Charentais, les symptômes sont forts au début et semblent se ralentir au cours de la deuxième semaine après l'inoculation (Graphiques 5 et 6). Une étude sur l'évolution de la maladie tous les jours après l'inoculation aurait pu apporter des précisions sur l'apparition des symptômes.

Cependant, les données fournies par l'étude de l'intervalle attribuée à la variation de l'indice d'agressivité montrent que du point de vue statistique, il est souvent difficile de distinguer les trois variétés les unes des autres. De plus ces mêmes données montrent que les souches peuvent être réunies en deux groupes quelle que soit la variété utilisée (Graphiques 6)

- Groupe 1 : (+), T_1 (98), T_2 (58), T_1 (128)
- Groupe 2 : T_1 (87) et T_1 (195)

Ces observations statistiques méritent toutefois d'être vérifiées par une expérimentation plus élaborée. Ainsi, nous pensons que des répétitions de test, l'usage d'un plus grand nombre de plantules pour chaque essai, permettraient de préciser avec plus de rigueur et peut-être de réduire l'amplitude des variations dues aux conditions expérimentales. De plus, une telle expérimentation permettrait de disposer avec précision, au moyen de l'analyse de variance, de renseignements sur le degré de signification des différences observées entre les variétés, entre les souches, et de l'existence ou non d'interaction différentielle entre souches de champignon et variétés de l'hôte. Autrement dit cela permettra de voir si la virulence chez les souches n'intervient pas dans la manifestation de l'Anthraxose. En effet, il n'est pas exclu, par exemple, que les souches testées aient pu surmonter une éventuelle résistance verticale de l'hôte grâce à leur virulence, mais qu'elles disposent de niveaux d'agressivité différents.

Un tel travail pour voir si des gènes de virulence sont présents chez le parasite étudié peut s'avérer utile par la suite, dans la recherche d'une souche sexuée et pathogène, étant donné que les systèmes polygéniques (agressivité) et oligogéniques (virulence) ne sont pas transmis héréditairement de la même manière. Dans un cas d'agressivité les différences transmises peuvent passer inaperçues (29)

Toutefois, l'indice d'agressivité que nous avons mise au point nous semble assez fin pour déceler les moindres variations de l'agressivité. Par conséquent nous pouvons tenter une étude préliminaire sur la parasexualité et voir quelques conditions requises pour avancer dans la recherche d'une souche réunissant les caractères sexués de Glomerella et le pouvoir pathogène de Colletotrichum.

TROISIEME PARTIE

ETUDE PRELIMINAIRE SUR LA PARASEXUALITE

I - DEFINITIONS.

BURGEFF (1912), HANSON et SMITH (1932) BEADLE et CONRAD (1944) ont montré que chez un champignon filamenteux, des noyaux haploïdes génétiquement différents peuvent être associés dans un même cytoplasme pour constituer un hétérocaryon, ce dernier pouvant être mieux adapté à son environnement que chacun des deux constituants parentaux (24).

De ce mélange peut résulter un noyau diploïde hétérozygote. Durant la multiplication de celui-ci, des crossing-over mitotiques peuvent se produire, suivis d'haploïdisations, ce qui conduit à de nouveaux types nucléaires haploïdes remaniés. Il s'agit donc d'une recombinaison génétique résultant d'un cycle (le cycle parasexuel) où n'interviennent pas de phénomènes sexuels. Une étude détaillée chez Aspergillus nidulans a permis de définir les différentes étapes du cycle ; l'existence de cycle sexuel chez cette espèce, permet un contrôle minutieux de chaque étape au moyen des techniques habituelles de la génétique classique (20).

Ces étapes seraient les suivantes:

- Formation d'hétérocaryons notamment par fusion de deux hyphes apportant des noyaux génétiquement différents.
- Fusion des deux types de noyaux.
- Multiplication des noyaux hétérozygotes diploïdes qui en résultent, au milieu d'autres noyaux demeurés haploïdes, et, éventuellement, individualisation de lignées diploïdes avec production de conidies diploïdes.
- Crossing-over mitotiques dans les noyaux diploïdes en cours de multiplication végétative.
- Enfin, haploïdisation végétative rétablissant l'état nucléaire primitif mais avec souvent de nouvelles combinaisons génétiques. (2) (14) (20)

En tant que source possible de variation, la parasexualité peut contribuer à la formation de nouvelles races chez les champignons. Il est permis de penser que son importance sera d'autant plus grande chez les Imparfais que ceux-ci ne présentent pas de reproduction sexuée. Mise en

évidence chez un grand nombre de champignons (3), elle a été utilisée pour la cartographie des chromosomes (14) (15) (19) (21) et pour l'analyse des facteurs génétiques de la virulence (10).

Au cours d'études sur la parasexualité chez Colletotrichum lagenarium DUTTA et GARBBER rapportent l'existence d'hétérocaryoses entre lignées différentes par leurs exigences nutritionnelles (5) ou par leur résistance à des fongicides (4). Toutefois, PARMETER et coll. (18) font valoir que cette existence n'avait pas été rigoureusement démontrée, étant donné que l'on ne pouvait écarter complètement ni les possibilités de complémentations nutritionnelles réciproques, ni celles de mutations ou d'adaptations.

Nous avons déjà signalé que nous attendions du cycle parasexuel, la possibilité de disposer d'une souche à la fois sexuée et pathogène. Une telle souche devrait faciliter l'analyse des bases génétiques du pouvoir pathogène de l'agent de l'Anthracnose et permettrait des progrès certains dans la connaissance de la maladie et par conséquent, à moyen terme, la mise au point de stratégie rationnelle de lutte. Nous avons noté en outre qu'on pourrait disposer d'un argument en faveur de la réunion du Colletotrichum lagenarium et du Glomerella cingulata et des espèces rattachées à cette dernière dans une même unité spécifique. Cependant, il est évident que la non existence du phénomène parasexuel entre ces deux champignons, ou même de l'hétérocaryose ne signifierait nullement qu'on se trouve forcément en présence de deux espèces distinctes; en effet les cas d'incompatibilité entre souches de même espèce sont connus et les travaux sur ce point sont assez avancés, notamment chez Neurospora crassa (30)(31) où est rapportée l'intervention de protéines cytoplasmiques dans la réaction d'incompatibilité.

La démonstration de la parasexualité nous conduit à passer par les étapes suivantes :

- démonstration de l'hétérocaryose ;
- isolement de spores diploïdes hétérozygotes ou mise en évidence indirecte de leurs formations ;
- détection des haploïdes de types nucléaires remaniés.

Il faut disposer de marqueurs géniques permettant de suivre le sort des différentes parties du génome au cours du cycle parasexuel. Les méthodes généralement employées consistent, soit à rechercher dans les populations naturelles des caractéristiques stables, soit à les induire par mutagenèse.

Plus les souches diffèrent par un grand nombre de marqueurs, plus on a de chance de pouvoir mettre en évidence des recombinaisons.

Dans le cas du couple que nous étudions, nous avons déjà vu leurs caractéristiques morphologiques. Il apparaît nécessaire de se pencher sur les critères biochimiques comme la résistance et la sensibilité à des inhibiteurs de croissance et à des fongicides, et comme les exigences nutritionnelles.

II - RESISTANCE ET SENSIBILITE DU COLLETOTRICHUM ET DU GLOMERELLA AUX INHIBITEURS DE CROISSANCE ET AUX FONGICIDES.

Nous avons recherché si certains mutants étudiés précédemment étaient marqués sélectivement vis-à-vis de certains inhibiteurs de croissance et fongicides. Nous nous sommes limités aux souches intéressantes par :

- leur pathogénie (Colletotrichum (+), T₁98, T₁128, T₂58) ;
- leur bon comportement morphologique (Glomerella (+), T₄171, T₁154)
- leur auxotrophie (Glomerella T₄171, T₁93).

Des repiquages effectués sur milieu Maltéa auquel ont été ajoutées des quantités connues de différentes substances donnent les résultats présentés dans le tableau 9.

Fongicides et inhibiteurs	<u>Colletotrichum lagenarium</u>				<u>Glomerella cingulata</u>			
	(+)	T ₁ 98	T ₁ 128	T ₂ 58	(+)	T ₄ 171	T ₁ 93	T ₁ 154
Benomyl 2 ppm	-	-	-	-	-	-	-	-
A.U. 1500 ppm	+	-	-	-	-	-	+	-
O.F.Phe 200 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+
PCNB 3200 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+
D Na 400 ppm	-	-	-	-	-	-	-	-
Griseo 1500 ppm	-	-	-	-	+	+	+	+
Maltéa (Témoin)	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 7 - Résistance et sensibilité des souches de C. lagenarium et G. cingulata à des inhibiteurs de croissance et fongicides.

- : pas de croissance ; + légère croissance ; + : croissance nette.

AU : Aza Uracile ; O.F.Phe : Ortho Fluoro Phenylalanine ; PCNB : Para Chloro Nitro Benzène ; D Na : Dehydro acétate de Sodium ; Griseo : griseofulvine.

Au vu de ces premiers résultats on constate que certains couples peuvent être constitués :

- Sur Aza Uracile : Colletotrichum (+)^R/Glomerella (+), T₄171, T₁154^S
les Colletotrichum mutant^S/Glomerella T₁93^R
- Sur Griseofulvine : Colletotrichum (+) et mutants^S/Glomerella (+) et mutants^R

Afin de voir si les différences entre les couples sont nettes et peuvent servir utilement dans notre travail, il est nécessaire de déterminer les seuils de sensibilité vis-à-vis des différents inhibiteurs :

- soit en augmentant la dose dans les cas de résistance,
- soit en la diminuant dans les cas de sensibilité.

Ceci nous permet d'établir le tableau 10.

Inhibiteurs et fongicides	Concentration en ppm	Colletotrichum				Glomerella			
		(+)	T ₁ 98	T ₁ 128	T ₂ 58	(+)	T ₄ 171	T ₁ 93	T ₁ 154
Benomyl	0,5	+	+	+	±	+	+	+	+
	1	+	+	+	±	+	+	-	+
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Aza Uracile	100	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	±	+	±
	500	+	+	+	+	-	-	+	±
	1000	+	-	±	-	-	-	+	-
	1500	+	-	-	-	-	-	±	-
O.F.Phe	200	+	+	+	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	+	+	+
	500	+	+	+	+	+	+	+	+
D. de Na	50	+	+	+	+	+	+	+	±
	100	+	+	+	+	+	+	+	±
	200	-	-	-	-	-	-	+	±
	300	-	-	-	-	-	-	±	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-
Griseofulvine	100	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	-	+	+	+	+
	500	+	+	±	-	+	+	+	+
	1000	+	±	±	-	+	+	+	+
	1500	-	-	-	-	+	+	±	±
Maltéa (Témoin)		+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 10 - Détermination des seuils de sensibilités à certains inhibiteurs et fongicides.

- : pas de croissance ; ± légère croissance ; + : croissance nette.

Les seuils de sensibilité au PCNB n'ont pas été déterminés car il aurait fallu utiliser des quantités trop importantes de produit, le fongicide étant présenté sous forme d'une poudre à 30% de matière active.

Conclusion et discussion.

Ces premières investigations nous conduisent à retenir comme marqueurs sélectifs la sensibilité ou la résistance à l'Aza Uracile, au Déshydroacétate de Sodium, et à la Griseofulvine.

Inhibiteurs et fongicides	<u>Colletotrichum</u>				<u>Glomerella</u>			
	(+)	T ₁ 98	T ₁ 128	T ₂ 58	(+)	T ₄ 171	T ₁ 93	T ₁ 154
Aza Uracile (1500 ppm)	R	S	S	S	S	S	R	S
Deshydroacétate de Na (300 ppm)	S	S	S	S			R	
Griseofulvine (1500 ppm)				S	R	R	R	R

Tableau 11 - Caractéristiques des souches utilisées vis-à-vis des inhibiteurs choisis.

R = Résistant ; S : Sensible

Nous n'avons considéré que les cas où la différence entre les seuils de sensibilité et les limites de résistance était suffisamment grande pour empêcher toute interférence ; en effet, certains tests montrent qu'une croissance peut être observée au bout d'une incubation prolongée ; ce fut le cas par exemple du Colletotrichum sauvage sur Griseofulvine.

Notre but étant de pouvoir différencier deux souches de champignon appartenant l'une au Colletotrichum l'autre au Glomerella, nous n'avons pas cru bon d'étudier plus à fond l'effet des fongicides et inhibiteurs sur la biologie des souches utilisées. Il aurait été intéressant d'étudier leurs effets sur la germination et la survie des conidies. Pour une même dose d'inhibiteur, les réponses sont souvent apparues différentes selon que l'on testait une suspension de conidies, des conidies germées ou des boutures mycéliennes d'une même souche. Le Déshydroacétate de Sodium par exemple ne s'oppose pas à la germination des conidies, mais seulement à la croissance du mycélium.

Nous pouvons retenir, à l'issue de ces tests le Glomerella T₄171 qui, en plus de son bon comportement morphologique (bonne croissance, morphologie stable, bonne production de glomerules et d'acervules), est auxotrophe. Il suffira d'induire une résistance par exemple au Bénomyl ou/et au Deshydroacétate de Sodium pour disposer d'un couple convenablement marqué pour 2 ou 3 inhibiteurs, à savoir :

$$\left(\begin{array}{l} \text{Colletotrichum lagenarium sauvage } AU^R B^S \text{ ou/et } D.Na^S \\ \text{Glomerella cingulata } T_4171 \text{ } AU^S B^R \text{ ou/et } D.Na^R \end{array} \right)$$

En outre, l'induction d'une auxotrophie convenable chez le Colletotrichum permettra de disposer d'un marquage vis-à-vis des exigences nutritionnelles.

Nous sommes passés à cette dernière phase, ce qui nous permettrait peut-être d'étudier certains rapports qui peuvent exister entre la pathogénie et les besoins nutritionnels de Colletotrichum lagenarium.

III - REALISATION DE MUTANTS AUXOTROPHES CHEZ COLLETOTRICHUM LAGENARIUM.

A - Technique de mutagenèse.

L'agent mutagène utilisé est la N-méthyl-N'nitro-Nitrosoguanidine (NG) qui agirait comme agent méthylant (6) et provoquerai des erreurs dans la replication du matériel génétique. Nous nous sommes inspirés de la technique couramment utilisée dans le laboratoire (11) (28).

On mélange volume à volume une solution de NG (à 40 γ , 80 γ et 160 γ et une suspension conidienne dense. On obtient ainsi 10 ml de suspension de conidies mises en présence de l'agent mutagène à des doses finales de 20 γ (C₂ 40 γ (C₄), 80 γ (C₈). Le tout est mis en agitation à 30° au bain-marie et à l'obscurité, car la Nitrosoguanidine perd son efficacité à la lumière. Pour le témoin(Co), 5 ml de suspension conidienne sont mélangés à 5 ml d'eau stéril et mis dans les mêmes conditions que les autres essais. L'action de l'agent mutagène est arrêtée, après 2 heures d'incubation, par centrifugations et rinçages successifs du culot.

On dispose ainsi d'un mélange :

- de conidies tuées ;
- de conidies vivantes ayant subi l'action de l'agent mutagène ;
- et peut-être de conidies vivantes au génome intact.

Il s'agira alors de sélectionner dans cet ensemble les conidies auxotrophes. La méthode couramment utilisée au laboratoire est basée sur l'élimination des prototrophes par la Nystatine, antibiotique antifongique extrait de Streptomyces noursei (26). Elle tue les cellules du champignon en se liant à un stérol de la membrane cellulaire (LAMPEN cité par Mc.DONALD (16)) ; elle nuit au transport des petites molécules de sorte que l'organisme est incapable de synthétiser les métabolites essentiels (16). Les hyphes en croissance y sont plus sensibles que les articles âgés ou que les conidies. Donc, en principe, si on met la nystatine au contact des conidies traitées et préalablement mises à incuber sur milieu minimum (MM), les prototrophes qui commencent à croître devraient être tués. Toutefois, en pratique, un certain nombre de prototrophes subsistent car :

- la Nystatine, à la dose utilisée, n'est pas efficace à 100% ;
- les prototrophes qui connaissent un retard à la germination échappent à l'action de l'antibiotique.

Par conséquent, par son action sur certains prototrophes, la Nystatine réduit le travail qu'on accomplirait par la méthode d'isolement total

Nous inspirant des méthodes exposées par différents auteurs (25) (16) (11), nous avons utilisé 3 méthodes d'élimination des prototrophes.

- 1ère méthode :

Les conidies sont étalées sur MM et on laisse germer les prototrophe pendant 24 heures à 26°C et 60-70% d'humidité. On coule ensuite, à l'obscurité une mince couche d'eau gélosée contenant 80 UI/ml de Nystatine. 48 heures après, l'action de l'antibiotique est stoppée par exposition des préparations à la lumière. Du milieu Maltéa (N₁) est alors coulé sur les boîtes d'étalement pour permettre le développement des survivants dont on teste l'auxotrophie.

- 2ème méthode :

Une suspension des conidies traitées est mise à incuber à 26°C pendant 17 heures environ ; au bout de ce laps de temps, nous avons déterminé, à l'hématimètre le taux de germination qui était de :

- 6,5% pour C₈
- 9,3% pour C₄
- 9,3% pour C₂
- 56,4% pour C₀

Les suspensions de conidies traitées sont étalées sur Avoine et, parmi les colonies qui se développent, on sélectionne alors celles qui ne poussent pas sur MM.

- 3ème méthode :

Une partie de ces suspensions a été soumise, à l'obscurité, à l'action de la Nystatine à raison de 80 UI/ml, avant d'être étalée sur Maltéa. Les conidies germées au bout de 24 heures ou 48 heures, sont repiquées et les clones qu'elles donnent sont testés.

Nous pensions ainsi accroître l'activité de la Nystatine car, selon STEWART (cité par STANLEY et ENGLISH, (26)) cet antibiotique est plus actif en milieu liquide qu'en milieu solide dans le cas de la Levure.

B - Résultats obtenus.

Nous avons pu, avec ces trois méthodes, sélectionner une première fois 26 souches qui ne poussaient pas sur milieu minimum (voir tableau 12).

Technique utilisée	Dose de NG	Dénomination des souches retenues
1ère Méthode	80 γ	C ₈ (198)
	40 γ	C ₄ (423) - C ₄ (309)
	20 γ	C ₂ (406) - C ₂ (409) - C ₂ (408) - C ₂ (274)
2ème Méthode	80 γ	C ₈ (4)-C ₈ (16)-C ₈ (19)-C ₈ (133)-C ₈ (30)-C ₈ (14)-C ₈ (26)
	40 γ	C ₄ (67)-C ₄ (82)-C ₄ (85)-C ₄ (74)-C ₄ (81)-C ₄ (73)-C ₄ (45)-C ₄ (47) C ₄ (66)
	20 γ	C ₂ (129)
3ème Méthode	80 γ	
	40 γ	C ₄ (308)
	20 γ	C ₂ (183)

Tableau 12 - Premières souches retenues pour leur inaptitude à croître sur MM.

Nous ne pouvons pas tirer de ces résultats de conclusions comparatives solides entre les trois méthodes, les expériences n'ayant pas été conduites dans cette optique. Cependant, nous pouvons faire les remarques suivantes :

- Des trois doses utilisées, celles de 40 γ et 80 γ sont les plus efficaces ; trop de prototrophes subsistent à 20 γ .

- Dans la deuxième méthode de sélection des auxotrophes, il aurait été préférable de ne pas utiliser le milieu avoine. En effet, si sur ce milieu, la morphologie du Colletotrichum est bien reconnaissable, les mutants déficients en méthionine ne s'y développent généralement pas.

- Il semblerait que l'action de la nystatine soit moins efficace en milieu liquide qu'en milieu gélosé, compte tenu du très faible nombre de clones auxotrophes obtenus par l'utilisation de la 3ème méthode. Cette méthode est à déconseiller car nous avons remarqué que certains auxotrophes manifestent un début de germination dans l'eau ; ils pourraient être tués peut-être par la nystatine.

Les souches obtenues ont été clonées soit à partir de conidies germées soit par repiquage d'extrémités d'hyphes pour les souches dont nous ne pouvions obtenir de fructification. Les différents clones ont été testés sur MM et on n'a retenu que ceux qui étaient auxotrophes.

C - Détermination des substances exigées par les mutants auxotrophes.

1 - Besoins en amino-acides.

Les besoins en amino-acides des mutants ont été déterminés à l'aide de 6 milieux. La composition de ces milieux (MM complétés par 6 amino-acides) est donnée dans le tableau 13 : les souches qui ne poussent que sur un milieu sont exigeantes pour la substance spécifique à ce milieu. Celles qui poussent sur deux (ou plusieurs) milieux sont exigeantes pour le (ou les) amino-acide(s) commun(s) à ces milieux.

Les résultats de ce premier test sont consignés dans le tableau 14.

M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆
1 Ala (0,28)	1 Try (0,63)	1 Cyst (0,42)	1 Pro (0,34)	1 Tyr (0,55)	dl Val (0,35)
1 AspN(0,22)	1 AspN(0,22)				
1 Lys (0,22)		1 Lys (0,22)			
1 Asp (0,40)			1 Asp (0,40)		
1 GLN (0,22)				1 GLN (0,22)	
dl Met (0,44)					dl Met (0,44)
	dl Phe (0,50)	dl Phe (0,50)			
	dl Hist(0,46)		dl Hist(0,46)		
	dl Ileu(0,40)			dl Ileu(0,40)	
	1 Arg (0,13)				1 Arg (0,13)
		1 Gly (0,23)	1 Gly (0,23)		
		1 Glu (0,46)		1 Glu (0,46)	
		dl Norleu(0,39)			dl Norleu(0,39)
			1 OH-Pro(0,39)	1 OH-Pro(0,39)	
			dl Thr (0,35)		dl Thr (0,35)
				dl Ser(0,31)	dl Ser (0,31)

Tableau 13 - Milieux minimums complétés avec différents amino acide.

La quantité d' amino-acide en gramme pour un litre de MM est indiquée entre parenthèse.

Souches testées	N ₁ (Témoin)	MM	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	Conclusion : substances exigées	
C ₈	4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Glutamine	
	16	+++	---	++	---	++	---	---		
	19	+++	-+	+++	+++	+++	+++	+++		
	133	+++	-+	+++	+++	+++	+++	+++		
	30	+++	---	+++	++	---	-+	++	Methionine	
	14	+++	---	---	++	-+	-+	---		
	26	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++		
C ₄	45	+++	+++	+++	-+	+++	+++	+++	Tyrosine (?)	
	47	+++	---	---	---	-+	+++	---		
	66	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	67	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	Tous les amino-acides	
	73	+++	---	+++	++	+++	+++	+++		
	74	+++	---	-+	++	---	---	---	+++	Arginine
	81	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Hydroxy Proline	
	82	+++	---	---	---	---	+++	+++		-+
	85	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-+	
	308	+++	---	-+	---	---	+++	-+	---	Proline
	309	+++	---	-+	++	++	---	---	-+	
423	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++		
C ₂	129	+++	---	+++	-+	---	+++	+++	(Aspartique, Glutamine ou Hydroxy Proline Methionine)	
	183	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	406	+++	---	+++	---	---	---	---		+++
	274	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++

Tableau 14 - Détermination des besoins en amino-acide.

Légende : - = pas de croissance ; ± = très légère poussée aux abords du semis ; + = croissance nette.

- Les trois résultats consignés à chaque fois correspondent aux observations faites après 3, 7 et 10 jours de mise en culture.
- Les tests ont été réalisés par repiquage de fragments mycéliens d'un même clone.

A l'issue de ce test, seules 11 souches ne se développent pas sur MM au bout de 10 jours. Au point de vue morphologique, on pouvait distinguer les types suivants :

- Certaines ont une morphologie semblable à celle du témoin, mais avec des vitesses de croissance le plus souvent inférieures.

- D'autres semblent marquées morphologiquement ; en effet leur thalle se présente :

- soit sous forme d'un mycélium diffus ;
- soit sous un aspect rabougris et recroquevillé avec des contours irréguliers.

La complexité du métabolisme et les connections possibles entre diverses voies pourraient nous fournir une explication satisfaisante aux petits développements (+) parfois observés. Prenons l'exemple de la souche C₈ (16) : son développement nul sur MM et important sur M₁ et M₅ indique un besoin en glutamine, amide de l'acide glutamique. Or, une voie de dégradation métabolique possible de lysine peut être une source d'acide glutamique (et donc de glutamine). Une accélération de la dégradation de la lysine peut donc permettre de suppléer à une déficience de la chaîne de synthèse de la glutamine. Le faible développement sur le milieu 3 (M₃) met en évidence la possibilité de synthèse de la glutamine à partir d'acide glutamique (M₃ M₅) mais aussi celle de formation de glutamine par une accélération de dégradation de lysine par l'apport de celle-ci (M₁ M₃).

Des considérations analogues pourraient être faites au sujet de la souche C₈ (30) ; auxotrophe pour la méthionine, elle pousse néanmoins sur les milieux avoine, M₂, M₄ et M₅ ; il est vraisemblable que la voie normale de synthèse de la méthionine est partiellement relayée par d'autres voies métaboliques.

La souche C₄ (73) qui croît sur tous les milieux serait peut-être déficiente en nitrate réductase, le milieu minimum utilisé ne contenant comme source d'azote que du Nitrate de Sodium (NaNO₃). Elle ne produit ni acervules ni même de conidies, et nous ne l'avons donc pas retenue, car elle présente, de ce fait, peu d'intérêt pour notre travail.

A l'issue de ce premier test qui a permis de déterminer l'exigence de certains mutants pour certains acides aminés (voir tableau 14) nous en avons retenu pour un test ultérieur un certain nombre.

- C₈ (14) : son auxotrophie n'a pu être déterminée. Du fait des faibles développements sur M₂ M₃ M₄ M₅, il est possible qu'elle soit exigeante vis-à-vis d'une substance dont seuls les précurseurs seraient présents dans ces milieux, ou qu'elle soit un double mutant ; ce furent du moins les hypothèses que nous avons émises à ce stade du travail.

- Il en est de même de la C₄ (309).

- C₄(47) : ce mutant ne pousse bien que sur M₅, mais pousse mal sur milieu minimum additionné de Tyrosine.

- C₂(406) : présente une réponse nette à la méthionine, et ne pousse sur avoine que si ce milieu est complété par de la méthionine. Nous pensions être ainsi en présence d'une souche ne pouvant pas disposer facilement de système de relais pour synthétiser la méthionine, donc probablement stable.

- C₄(82) : elle pousse plus ou moins bien sur milieu minimum complété par l'Hydroxyproline seule.

2 - Méthode HOLLIDAY.

Mise au point par HOLLIDAY (9) cette méthode permet de déterminer les exigences nutritionnelles vis-à-vis d'acides-amino, de bases azotées, de vitamines au moyen de 12 milieux complétés chacun par 6 substances différentes (voir tableau 15). Une substance étant commune à deux milieux, on s'attend à ce qu'un mutant exigeant/vis-à-vis de cette substance pousse sur les deux milieux.

Lors d'une recherche de la déficience du Glomerella cingulata T₄171, nous avons préparé les 12 milieux en étalant sur milieu minimum deux gouttes de solution de chaque substance aux concentrations indiquées dans le tableau 16. Il ne poussait que sur les milieux 3 et 12 ce qui signifiait qu'il exigeait de l'acide nicotinique ; effectivement il pousse sur MM + acide nicotinique.

Une telle méthode de réalisation des 12 milieux s'avérerait longue dans le cas présent, étant donné le nombre de mutants Colletotrichum que nous devons tester. Nous avons préféré incorporer les substances au milieu minimum avant de le couler en boîte de pétri.

	1	2	3	4	5	6
7	Adénine	Biotine	Phenyl Ala	Alanine	Arginine	<u>Serine</u>
8	Hydroxan- tine	Ac.folique	<u>Leucine</u>	Cystéine	<u>Citruline</u>	Glycine
9	Cystosine	Ac.Pantho- tenique	Tryptophane	Thréomine	Aspartate	Isoleucine
10	Guanine	Pyridorine	Tyrosine	<u>Ornithine</u>	Proline	Histidine
11	Thymine	Thiamine	Ac.para amino Benz. PAB	Methionine	Glutamate	Lysine
12	Uracile	Riboflavine	Ac.Nicoti- nique	Choline	Inositol	Valine

Tableau 15

N.B.- Dans la méthode rapportée par HOLLIDAY (9) :

- la Serine est commune aux milieux 3 et 8
- l'Ornithine aux 5 et 8 à la place de la Citruline
- le Thiosulfate aux 4 et 10
- la Leucine aux 6 et 7

Substances utilisées	Concentrations des solutions utilisées en étalements	Quantité (en mg) à incorporer à 1 l de MM
Bases azotées	5 mg/ml	17
Biotine-Pyridoxal-Thiamine	10^{-3} mg/ml	$35 \cdot 10^{-2}$
Acide folique-Acide Panthoté- nique-Acide Nicotinique-PAB	$5 \cdot 10^{-2}$ mg/ml	$17 \cdot 10^{-2}$
Riboflavine	$25 \cdot 10^{-2}$ mg/ml	$85 \cdot 10^{-2}$
Inositol	0,5 mg/ml	$17 \cdot 10^{-2}$
Choline	1 mg/ml	
Acides aminés L	10 mg/ml	40
Acides aminés D	20 mg/ml	80

Tableau 16 - Quantités de produits utilisés.

La riboflavine se dégradant à la lumière, les milieux 2 et 12 doivent être maintenus autant que possible à l'obscurité. Nous obtenons les résultats mentionnés dans le tableau 17 avec des repiquages de conidies germées ou d'extrémités d'hyphes.

	N ₁	MM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
C ₂ (406)	+	ε	±	-	±	+	±	-	±	-	±	-	±	-	Méthionine ?
C ₄ (47)	+	-	+	+	-	-	±	±	-	±	-	+	-	±	Guanine Pyridoxal
C ₄ (82)	+	ε	-	-	±	+	-	-	±	±	±	+	+		Ornithine Méthionine
C ₄ (309)	+	-	+	±	±	-	±	±	-	±	+	-	±	+	Cytosine Uracile
C ₈ (14)	+	-	+	±	±	-	±	±	+	+	±	-	-	±	Adénine Hypoxanthine

Tableau 17 - Détermination de l'autotrophie par la méthode HOLLIDAY
(lecture effectuée au bout d'une semaine)

± : faible croissance ; ε : très faible croissance de certains repiquages ;
- : aucune croissance ; + : développement normal ou presque normal.

Cette méthode de part le nombre des milieux et la diversité des substances, est certainement plus avantageuse que la précédente. Cependant, les concentrations et les dispositions des substances seraient à revoir ; ainsi, la souche C₂ (406) dont on a vu précédemment qu'elle était exigeante vis-à-vis de méthionine ne pousse cependant pas bien sur le milieu 11 ; ne serait-elle pas inhibée par une substance de ce milieu ? La souche C₄ (82) déficiente en hydroxyproline d'après le test précédent pousse sur des milieux caractérisés par l'ornithine et la méthionine. Cette disparité des résultats des deux tests semble due, comme l'a prouvé ultérieurement le retour vers la prototrophie de cette souche, à une instabilité du mutant C₄ (82).

Quant au mutant C₄ (47), il nous a été impossible de caractériser son exigence. Sur milieu minimum complété soit par la guanine soit par le pyridoxal soit par la tyrosine, il ne pousse pas. Ne serait-ce par un double-mutant ?

Finalement, après avoir progressivement éliminé les mutants instables, il ne nous restait plus que les souches $C_4(309)$, $C_4(47)$, $C_8(14)$, dont les caractéristiques apparemment stables sont résumées dans le tableau 18.

Nous avons aussi tenté de préciser la nature de l'auxotrophie des mutants $C_4(309)$ et $C_8(14)$ en les testant sur milieu minimum complétement par certaines substances qui étaient à notre disposition et qui sont susceptibles d'appartenir aux voies de synthèse de bases pyrimidiques et puriques.

Mutants	Substances complé- mentant le MM	Croissance
$C_8(14)$	AICAR	-
	Inosine	+
	Adénine	+
	Hypoxanthine	+
	Guanine	-
$C_4(309)$	Cytosine	+
	Uracile	+
	Thymine	-
	Ac. orotique	+

AICAR: 4 amino-5 imidazol carboxamide
+ = croissance ; - = pas de croissance.

Il semblerait donc que le mutant $C_8(14)$ ne possède pas l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse de l'inosine à partir de 4-amino-5 imidazole carboxamide mais possède celui nécessaire à la synthèse des autres bases à partir soit de l'inosine, soit de l'adénine soit de l'hypoxanthine. L'absence de croissance sur guanine supposerait que le mutant ne peut pas synthétiser les autres bases à partir de guanine.

Une situation analogue apparaît chez le mutant $C_4(309)$ qui peut synthétiser toutes les bases pyrimidiques à partir soit de l'acide orotique, soit de la cytosine soit de l'uracile, mais elle ne peut le faire à partir de la thymine.

Il est difficile, au vue des résultats de ces tests, de situer avec précision le niveau d'action du mutagène, dans la chaîne de synthèse de bases purique et pyrimidique.

Nous avons cependant pu mettre en évidence un certain nombre de substances qui peuvent provoquer la croissance des mutants auxotrophes.

Mutants	Morphologie du thalle sur Avoine	Diamètre du thalle	Sporulation	Croissance sur MM complétementé
C ₄ (309)	[+]	< [+]	Présence d'acervules sur Avoine, Amidon, Maltéa	MM + Cystosine ⊕ MM + Uracile ⊕ MM + Ac. orotique ⊕ MM + Thymine ⊖
C ₈ (14)	‡ [+] = Thalle rabougri, recroquevillé, à contour irrégulier	< [+] < [309]	Présence d'acervules sur Avoine, Amidon, Maltéa	MM + Adénine ⊕ MM + Hypoxanthine ⊕ MM + Inosine ⊕ MM + AICAR ⊖
C ₄ (47)	- = Mycélium aérien gris feutré Rebord régulier	≈ [14]	Faible production d'acervules	?

Tableau 18 - Caractères apparemment stables des mutants auxotrophes.

Légende : [+] = phénotype de la souche sauvage
 [309] = phénotype du mutant C₄(309)
 [14] = phénotype du mutant C₈(14)
 ⊕ = croissance
 ⊖ = pas de croissance

Les observations sont faites au bout de 7 jours d'incubation à 26°C 60-70% d'humidité.

D - Etude du pouvoir pathogène des mutants C₄(309) et C₈(14).

Nous avons étudié le pouvoir pathogène des souches C₄(309) et C₈(14) sur des plantules cultivées en tube. Les résultats obtenus en calculant la moyenne des indices d'agressivité sur 7 à 9 plantules de chaque essai sont consignées dans le tableau 19. Ces résultats sont illustrés par le graphique 7.

		+		309		14		14 + 309		Témoin	
		E	N ₁	E	N ₁	E	N ₁	E	N ₁	E	N ₁
CM17187	4j.	1,3 ±0,5	3,4 ±0,4	0	0,5 ±0,2	0	0,32±0,12	0	0,29±0,15	0	0
	6j.	2,3 ±0,6	4,6 ±0,6	0	0,5 ±0,3	0	0,46±0,28	0,01±0,04	0,42±0,21	0	0
	8j.	3 ±0,8	4,9 ±0	0	0,45±0,2	0	0,81±0,34	0,02±0,04	0,94±0,32	0	0
	12j.	4,2 ±0,6	5 ±0	0	0,5 ±0,3	0	0,89±0,41	0,14±0,11	1,17±0,32	0	0
Doublon	4j.	2,34±0,4	3,9 ±0,4	0,01±0,04	0,24±0,14	0,03±0,05	0,33±0,20	0	0,19±0,11	0	0
	6j.	4,23±0,6	4,94±0,09	0,01±0,04	0,25±0,17	0,04±0,05	0,31±0,20	0	0,29±0,11	0	0
	8j.	5	5	0,04±0,10	0,3 ±0,3	0,05±0,05	0,50±0,36	0,02±0,04	0,29±0,10	0	0
	12j.	5	5	0,11±0,16	0,27±0,3	0,04±0,05	0,65±0,51	0,14±0,11	0,69±0,21	0	0

Tableau 19 - Test de pathogénie : évolution des symptômes au cours du temps.

. Inoculum de chaque essai $\approx 10^6$ conidies/ml

. + = souche sauvage

. 309 = mutant auxotrophe C₄309

. 14 = mutant auxotrophe C₈14

. 309+14 = mélange en parties égales des 2 mutants

. E = suspension de conidies dans l'eau

. N₁ = suspension de conidies du milieu N₁ (Maltéa liquide)

N.B.- Il n'existe aucune différence observable entre les plantules témoins d'une même variété sur lesquelles ont été étalés du Maltéa liquide ou de l'eau.

Nous avons en outre étudié en parallèle la croissance des différentes souches de Colletotrichum. Les conidies ayant servi d'inoculum sont étalées sur Maltéa et, au bout de 24 heures, on effectue des clonages monospores sur Maltéa. La mesure des diamètres de 8 à 10 thalles donne les résultats réunis dans le tableau 20, illustrés par le graphique (8).

Temps (jours)	Souches de <u>Colletotrichum</u>		
	(+)	C ₄ (309)	C ₈ (14)
2	8,4 ± 0,6	0	2,5 ± 0,0
4	23,7 ± 1,0	5 ± 0,5	7 ± 0,7
6	33,8 ± 1,2	14,2 ± 0,9	10,3 ± 0,7
8	48 ± 2	26,2 ± 0,5	14,7 ± 1,2
13	82 ± 0,6	53 ± 0,7	24 ± 1,0

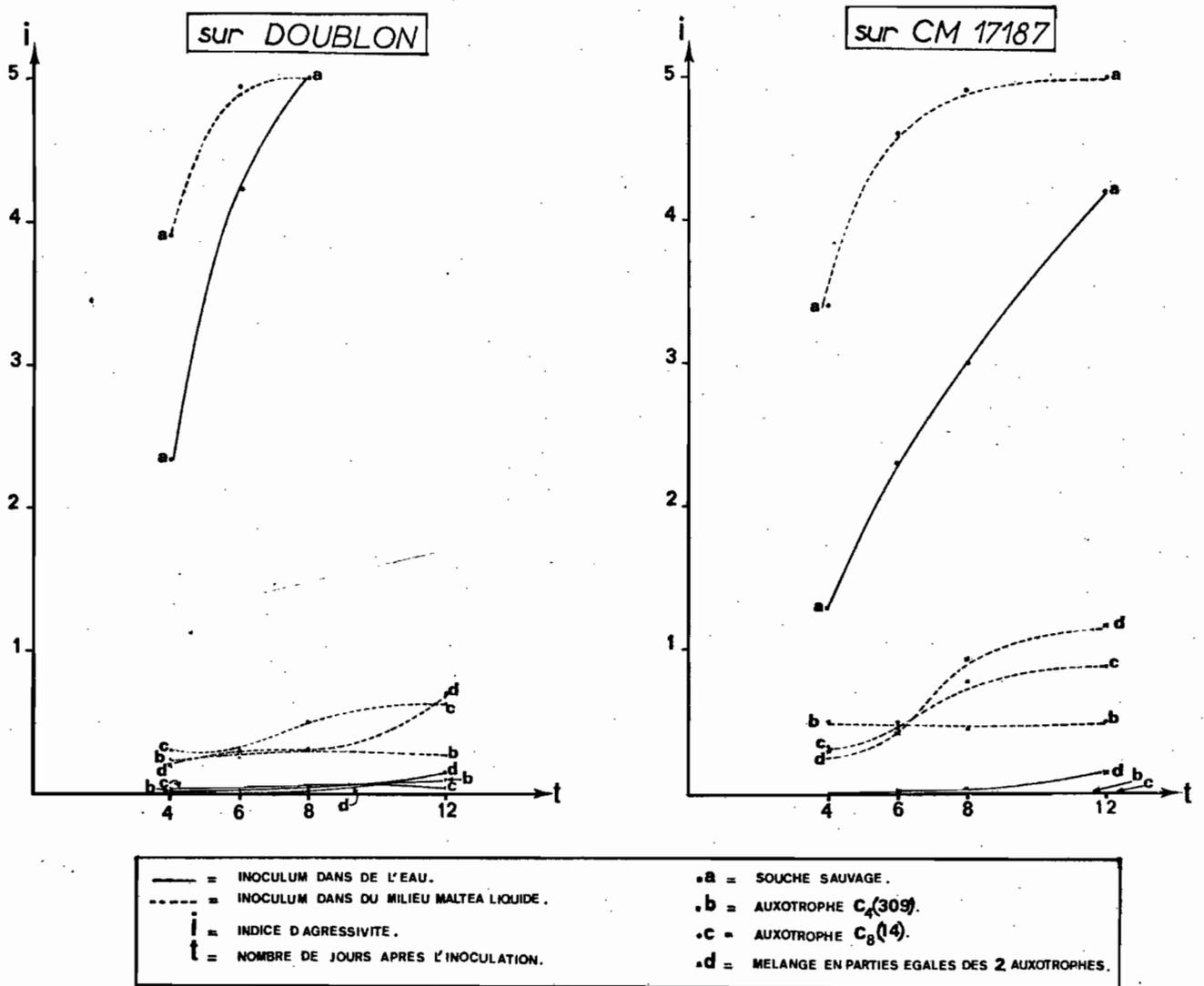
Tableau 20 - ~~croissance diamétrale~~ des souches de Colletotrichum sur milieu Maltéa (N₁) en fonction du temps.

Discussion des résultats.

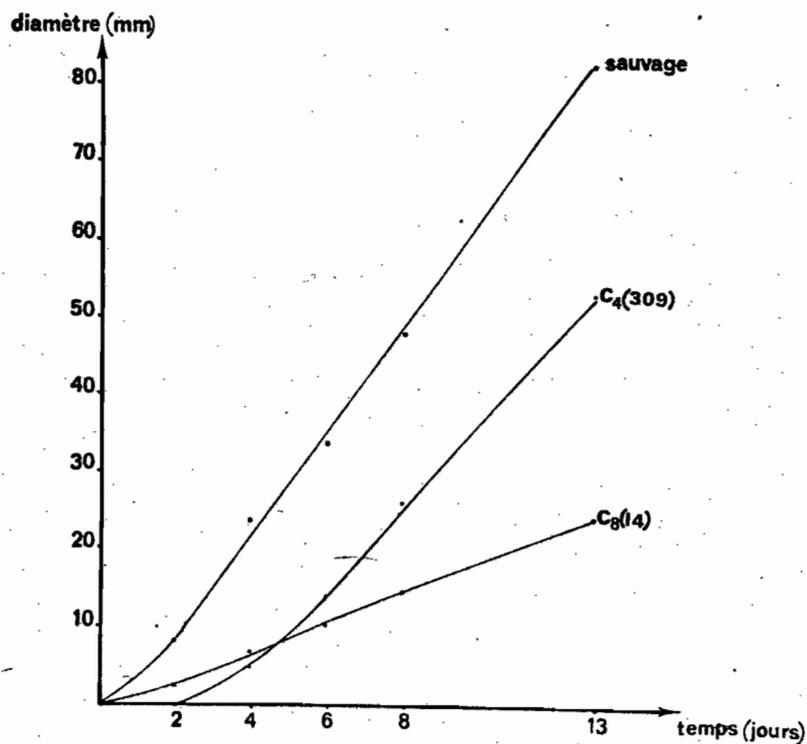
Les mutants auxotrophes C₄(309), C₈(14) ne sont donc pas pathogènes vis-à-vis de la variété de Melon CM 17187. Sur Doublon, de rares petites taches brunes apparaissent sur quelques plantules. On peut penser, évidemment, que les mutants ne disposant pas sur l'hôte des substances qu'ils exigent en quantité suffisante (ou de précurseurs métabolisables de ces substances), ils ne peuvent s'y développer et donc ne peuvent y provoquer de maladie. Cependant cela ne semble pas la seule raison de la baisse de leur pouvoir pathogène, puisque celui-ci n'est pas rétabli totalement (jusqu'au niveau de l'agressivité du sauvage) malgré un apport de milieu Maltéa liquide.

Cet apport de Maltéa liquide semble introduire des modifications dans le comportement des variétés vis-à-vis des souches (graphique 7) ; il augmente l'indice d'agressivité dans le même sens mais pas dans les mêmes proportions. Le parasite serait-il donc favorisé par l'apport de Maltéa ? Mais alors d'où vient-il que cette faveur soit plus importante sur CM 17187 que sur Doublon ? N'y aurait-il pas une base nutritionnelle à la différence de niveau de résistance horizontale des 2 variétés de Melon au Colletotrichum lagenarium ?

Graphique 7: Evolution des symptomes dûs à des Colletotrichum auxotrophes ($C_4(309)$: $C_8(14)$) et au sauvage sur les variétés de Melon Doublon et CM.17187



Graphique 8: Croissance diamétrale sur milieu maltéa des Colletotrichum auxotrophes et du sauvage



On constate que la souche C₈ (14) qui a un thalle rabougri et plus petit que la C₄ (309), possède cependant une plus forte agressivité. Mais l'étude de la vitesse de croissance montre que C₈ (14) croît plus vite au début (les 4 premiers jours). Cet avantage initial pourrait justifier son plus fort pouvoir pathogène .

Le mélange des conidies des deux types de mutants dans l'eau manifeste un faible pouvoir pathogène sur CM 17187 ; nous n'avons cependant pas pu réisoler de souches prototrophes dont l'origine pourrait être liée soit à un retour vers la prototrophie, soit à une hétérocaryose entre tubes germinatifs. Sans écarter totalement ces possibilités, il semble probable qu'il y ait simplement complémentation nutritionnelle entre les deux souches, ou que la différence observée (entre le mélange des deux mutants et chacun d'eux pris séparément) n'est pas significative.

Nous émettons les mêmes réserves quant au degré de signification qu'on peut accorder aux différences observées dans ce test, comme à ceux observés lors des autres tests de pathogénie. Il aurait fallu une expérimentation plus élaborée. Mais l'essentiel que nous pouvons en tirer pour la suite c'est que les mutants auxotrophes obtenus ne manifestent pas ou manifestent faiblement un pouvoir pathogène sur le Melon.

IV - ESSAI DE MISE EN HETEROCARYOSE DE DEUX MUTANTS AUXOTROPHES DE COLLETOTRICHUM.

Les hétérocaryons peuvent être réalisés expérimentalement en provoquant des anastomoses entre des hyphes appartenant à deux souches différentes. Plutôt que de tenter d'obtenir directement des phénomènes d'hétérocaryose entre Colletotrichum lagenarium et Glomerella cingulata, nous avons d'abord cherché à provoquer ces phénomènes entre deux mutants auxotrophes de Colletotrichum lagenarium. En effet, des anastomoses entre filaments germinatifs appartenant au même type de champignon ont été observées plus facilement (28). Dans un premier temps nous nous attachons à réunir le maximum d'information afin de pouvoir réaliser la formation d'hétérocaryons dans les meilleures conditions expérimentales possibles. Cette première étape facilitera sans doute une recherche ultérieure d'hétérocaryons entre Colletotrichum lagenarium et Glomerella cingulata.

A - Première méthode : Méthode des fils. (11) (28)

Nous avons choisi deux souches de morphologie et d'exigence nutritionnelle différentes, $C_4(47)$ et $C_8(14)$. Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau 18 .

Des fils stériles de 6 cm de long sont imbibés de suspensions conidiennes réalisées soit dans l'eau, soit dans du milieu Maltéa liquide (N_1 liquide). On dépose ensuite deux fils (portant chacun des conidies d'un type de mutant) dans des boîtes de Petri contenant soit du milieu minimum, soit du milieu Maltéa gélosé (N_1), de telle sorte qu'il existe une zone de contact sur 3 cm. On espère ainsi que des tubes germinatifs des deux mutants auxotrophes s'anastomosent et que, s'il se forme des hétérocaryons viables, ceux-ci se développeront sur milieu minimum au niveau de la zone de contact. Les témoins sont constitués par un seul fil imprégné de conidies d'un seul mutant et déposé sur MM ou N_1 .

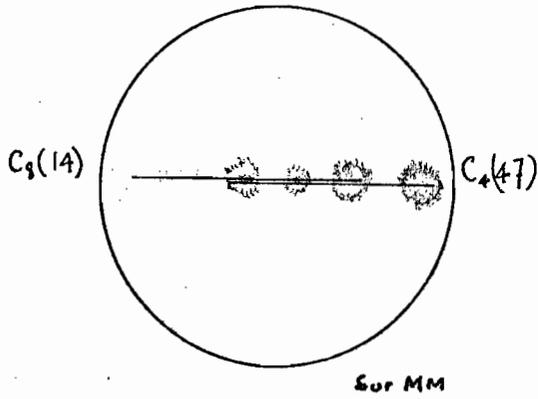
Les observations, faites au bout de 15 jours, sont consignées dans le tableau 21 et illustrées par les schémas des planches 6 et 7.

Mutants	Suspension	Milieux de dépôt des fils	Résultats	Conclusion
$C_4(47)$	N_1 liquide	N_1 liquide	+	Recouvrement de la prototrophie (Voir planche 7)
		MM	±	
	Eau	N_1 gélosé	+	
		MM	±	
$C_8(14)$	N_1 liquide	N_1 gélosé	+	Auxotrophe (Voir planche 7)
		MM	-	
	Eau	N_1 gélosé	+	
		MM	-	
$C_8(14)$ et $C_4(47)$	N_1 liquide	N_1 gélosé	+	Interprétation difficile du fait du recouvrement de la prototrophie (Voir planche 6)
		MM	±	
	Eau	N_1 gélosé	+	
		MM	±	

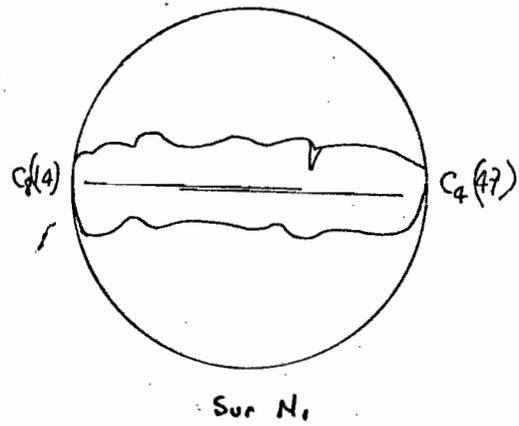
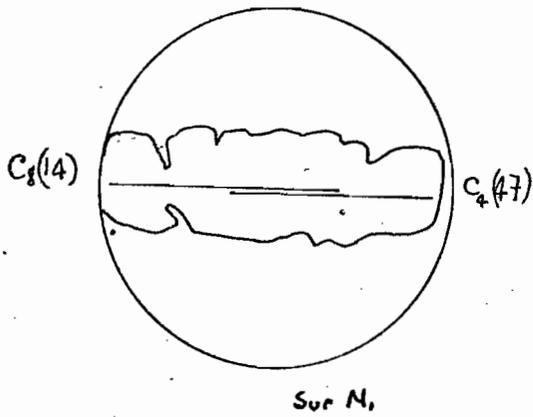
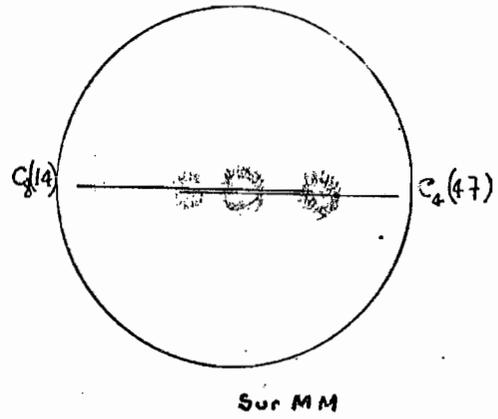
Tableau 21 - Résultat des essais de mise en hétérocaryose par la méthode des fils.

± = développement de quelques thalles ; - = pas de thalle ; + = développement tout le long du fil.

Suspensions conidiennes
dans l'eau



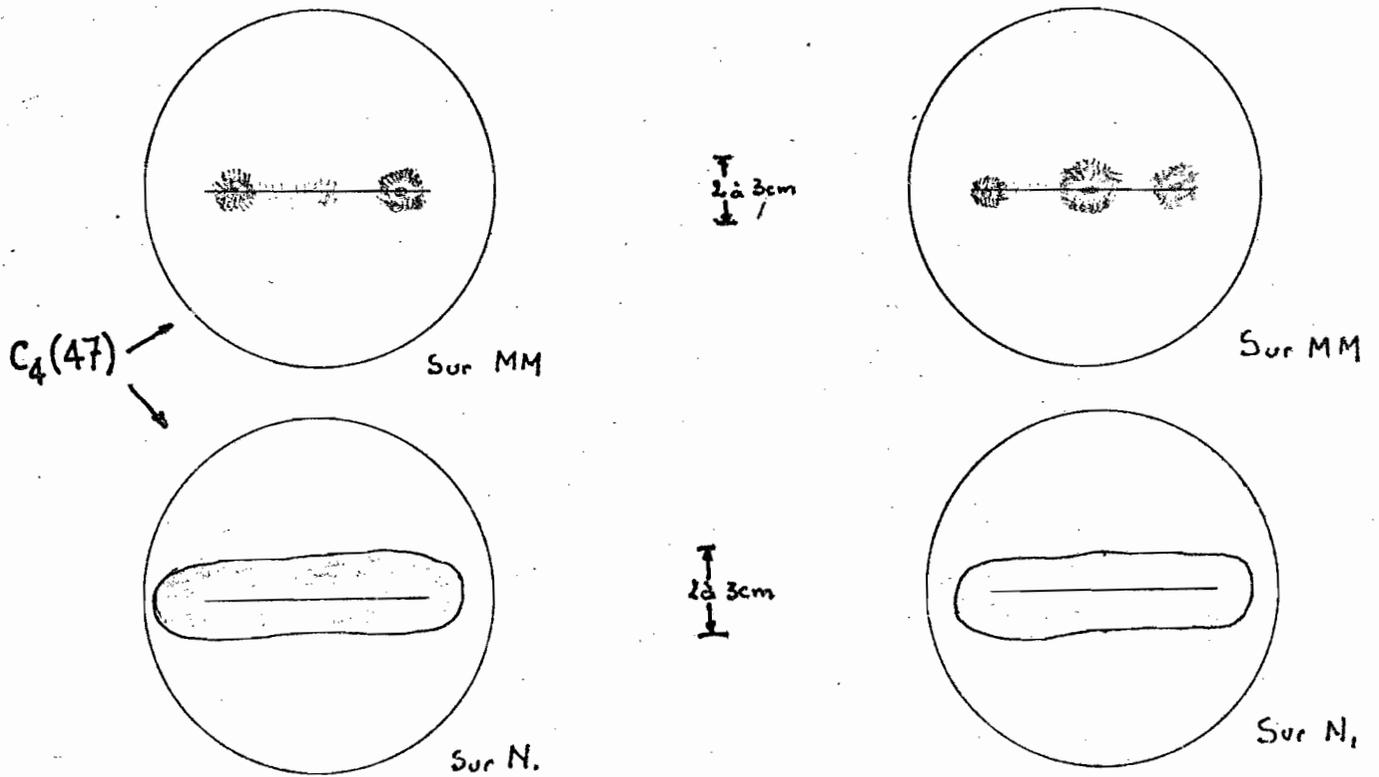
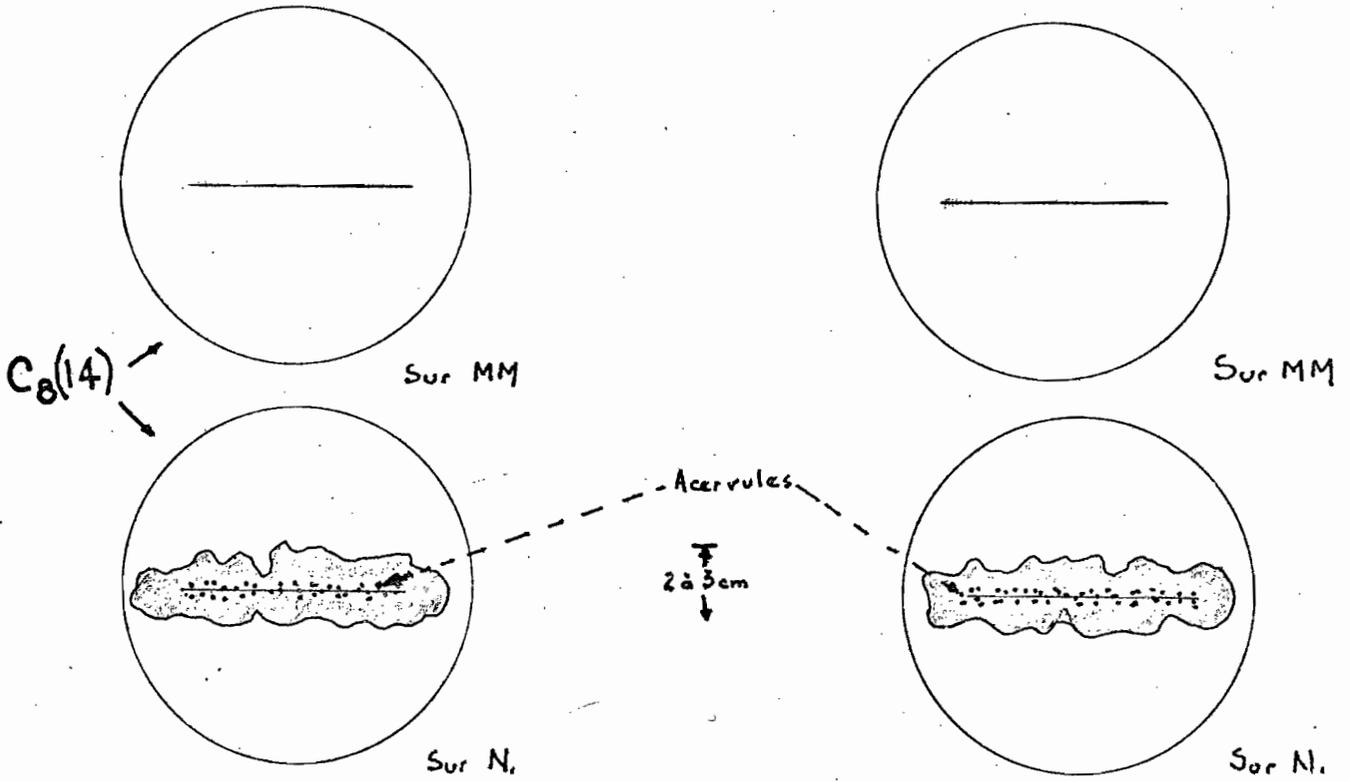
Suspensions conidiennes
dans la Maltée



Essai de mise en hétérocaryose
-Observation de l'association des deux souches.

Suspensions conidiennes
dans l'eau

Suspensions conidiennes
dans la Maltea



Essai de mise en hétérocaryose
-Observation des témoins.

Le recouvrement de la prototrophie du mutant $C_4(47)$ rend difficile la détection d'hétérocaryons éventuels, nous avons donc arrêté cette expérimentation.

B - Deuxième méthode avec le couple $C_8(14)/C_4(309)$.

Il s'agit d'une méthode inspirée de la technique des gouttes pendantes, utilisée au laboratoire pour le couple Glomerella cingulata / Colletotrichum musae (communication orale de Mme LE GRAND-PERNOT).

Deux conidies germées de chaque souche sont déposées de part et d'autre d'un carré de cellophane mis à la face inférieure d'une lamelle reposant sur une cellule formée d'un anneau de plastique adhérant à la lame et à la lamelle par une graisse aux silicones. Une goutte d'eau déposée au fond de l'anneau maintient une humidité constante. (Planche 8). On peut ainsi suivre au microscope le cheminement des filaments mycéliens de chaque souche et repérer, dans certains cas, les anastomoses.

Nous avons pu observer des anastomoses entre filaments mycéliens des mutants $C_8(14)$ et $C_4(309)$.

Il semblerait qu'après ces unions de filaments, les cellules au voisinage de l'anse d'anastomose se vident de leur contenu. (Planche 9)

Nous avons alors essayé de voir si ces anastomoses n'étaient pas à l'origine de la formation d'hétérocaryons viables, en déposant sur MM les zones de cellophane où elles avaient été observées. Dans certains cas on observe une croissance mycélienne qui conduit à l'obtention d'un thalle. Dans les mêmes conditions, les zones d'anastomoses formées entre couples d'un même mutant ne produisaient pas de thalle. Toutefois, cette expérimentation ayant été menée à faible échelle, on ne peut pas tirer de conclusions définitives. Le développement de mycélium sur MM pourrait provenir :

- soit de retour vers la prototrophie d'un des parents (ou des deux).

Il semble que cette hypothèse soit à rejeter dans la mesure où les témoins d'expérience n'ont pas poussé.

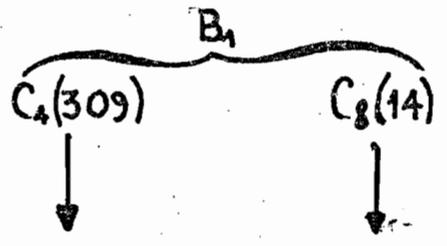
- soit de complémententation nutritionnelle réciproque entre les deux parents auxotrophes.

- soit d'hétérocaryose.

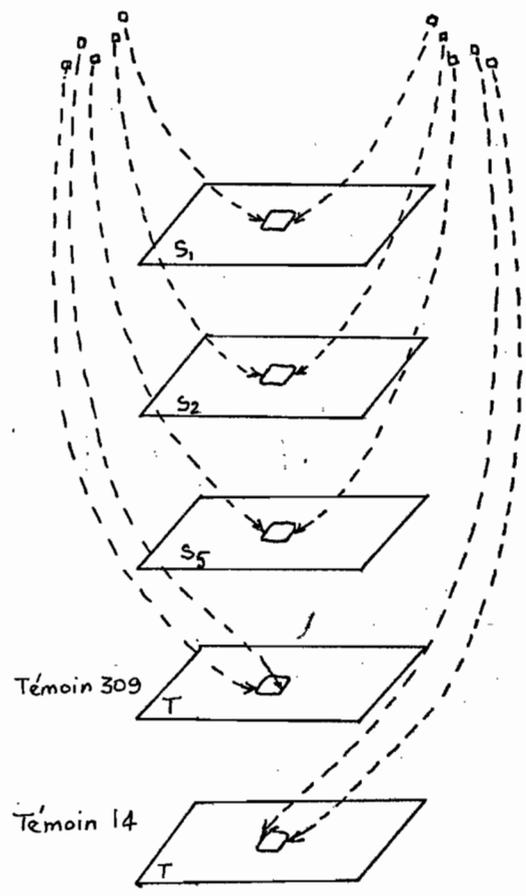
Clones

B₂

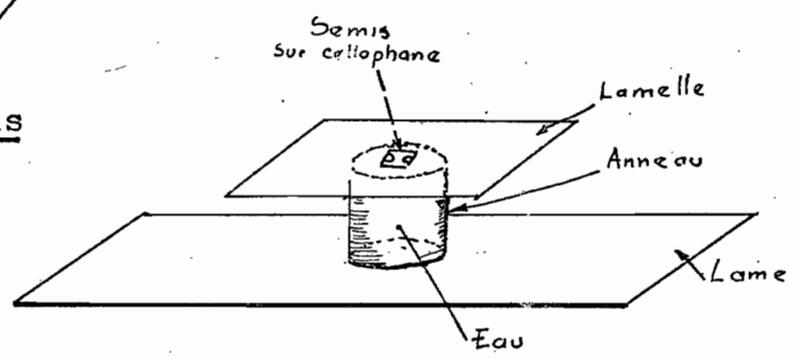
Étalements considérés



Repiquages

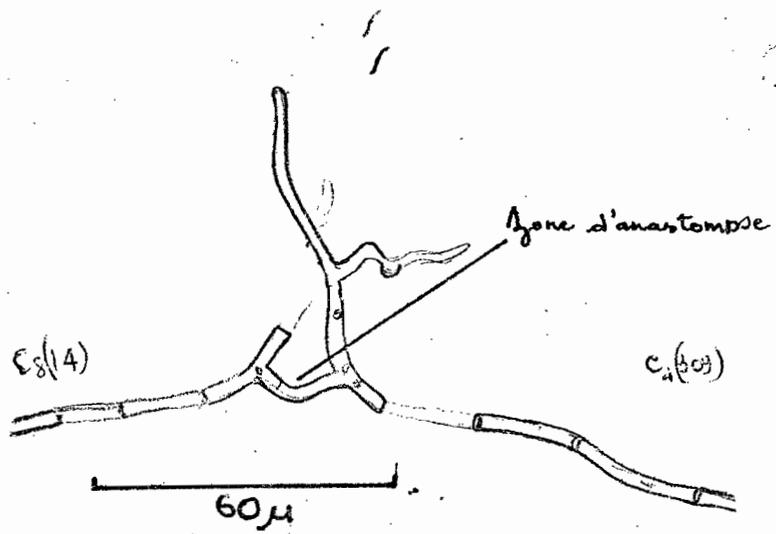


Mise en place des semis



Dispositif final

Dispositif expérimentale en vue d'obtenir des anastomoses.



Figures d'anastomose

Colletotrichum sauvage et mutants auxotrophes sur milieu "maltéa"
à l'issue de 8 jours de culture à 26° C et 60-70 % d'humidité

- 1 = Souche sauvage
- 2 = Mutant C₄(309)
- 3 = Mutant C₈(14)

Des extrémités d'hyphes sont isolées alors sous loupe binoculaire puis repiquées sur avoine. Elles produisent au bout de 8 jours l'un ou l'autre des trois types morphologiques suivants :

- soit le type C_8 (14).

- soit le type C_4 (309).

- soit le type exprimant successivement (dans l'espace) les deux potentialités morphologiques précédentes. Le mutant C_4 (309) dont la croissance radiale est plus importante se trouverait dans la zone périphérique alors que le mutant C_8 (14) à croissance plus faible se localiserait au centre. Il pourrait s'agir soit d'un hétérocaryon instable qui se serait dissocié sur milieu complet, soit d'un mélange de deux souches dû au fait que lors des repiquages on avait prélevé par mégarde les deux types de mutants. Un test d'auxotrophie nous a permis de constater que les souches de morphologie identique à celle des mutants C_8 (14) et C_4 (309) présentent aussi respectivement les exigences nutritionnelles de ces deux mutants. Quant aux thalles où les deux types morphologiques se manifestent, le test montre que la zone périphérique a effectivement l'exigence nutritionnelle du mutant C_4 (309), et que des boutures de la zone centrale sont auxotrophes, mais se développent sur des milieux minimums complétés par l'une ou l'autre des substances qu'exigent les deux mutants. Ceci peut s'expliquer par l'existence, à ce niveau, d'un mélange de filaments des deux types ; en effet des clonages effectués à partir de conidies prélevées dans cette zone se sont montrés auxotrophes, les uns de morphologie C_4 (309) se développant sur milieu minimum (MM) complété par la cytosine ou l'uracile ou l'acide orotique, les autres, de morphologie C_8 (14), se développant sur MM complété par l'adénine, l'hypoxanthine ou l'inosine.

Les semis centraux sont déposés sur une fine couche de N_1 étalée sur lame. La faible épaisseur de milieu limite le risque de prélever des filaments superposés et permet donc d'isoler une seule extrémité d'hyphe. Sur 410 prélèvements, seulement 20 ont démarré sur milieu complet. Nous avons effectué de la même manière une série de prélèvements d'extrémités d'hyphes provenant de semis de la souche sauvage (+) et des mutants C_4 (309) et C_8 (14). Là aussi, on remarque un pourcentage analogue de démarrage (5 à 10%). Il est possible que certaines extrémités d'hyphes ne contenaient pas de noyaux ou avaient été tuées.

Le développement des 20 extrémités d'hyphes prélevées à partir des semis centraux donne trois types morphologiques :

- 6 ressemblent au mutant C_4 (309).
- 12 au mutant C_8 (14).
- 2 (B_5S_{4-3} et B_5S_{1-1}) présentent un thalle particulier, caractérisé par des développements sectoriels à croissance plus forte. Nous sommes donc peut-être en présence de deux souches intéressantes, dont il aurait fallu étudier en détail le devenir par des isolements monospores ou des repiquages d'extrémités d'hyphes. Ne disposant plus du temps nécessaire à cela, nous nous sommes contentés d'en étudier certaines caractéristiques au début de leur développement.

Ainsi, des repiquages de fragments de mycélium du thalle B_5S_{4-3} ne poussent sur MM que si on y ajoute les substances exigées par le mutant C_4 (309), tandis que ceux de la souche B_5S_{1-1} poussent sur MM. Seule cette souche B_5S_{1-1} présentait des acervules sur avoine. Nous avons donc tenté d'en étudier quelques isolements monospores par repiquages de conidies germées sur Maltéa ; on constate un certain nombre de faits qui n'apparaissent pas chez les témoins C_4 (309) et C_8 (14) (et qui ne sont jamais apparus tout au long des études faites sur ces deux mutants depuis leur obtention) :

- il y a un faible démarrage des repiquages sur Avoine (10% environ) des conidies germées sur Maltéa ;
- des phénotypes nouveaux apparaissent, avec des croissances différentes de celles des deux mutants ;
- des repiquages sur milieu minimum permettent de constater que certains clones sont auxotrophes et d'autres prototrophes.

Même si ces observations, faites en début de croissance et à une échelle relativement faible, ne permettent pas de préciser la nature profonde des phénomènes ayant pu intervenir, elles suscitent un certain nombre de questions :

- Les morphologies observées sont-elles stables ?
- La prédominance d'un type de noyau sur l'autre ou des interactions entre cytoplasmes et noyaux d'origine différente ne pourraient-elles pas, au sein d'un hétérocaryon, expliquer nos observations ?
- Les prototrophes sont-ils des hétérocaryons ou des diploïdes ?
- Prototrophes et phénotypes nouveaux ne pourraient-ils pas provenir de recombinaisons mitotiques ?

Etudier minutieusement la production conidiale ou les isolements d'extrémités d'hyphes de chacune de ces deux souches pourrait apporter de précieux éléments de réponse permettant de cerner l'origine des modifications observées.

La preuve de l'hétérocaryose n'est donc pas établie avec certitude ici puisque cette étude de toute la production conidiale n'a pas été faite pour voir si on peut trouver les deux types de mutants chez ces souches B_5S_{1-1} et B_5S_{4-3} et des types de recombines. Cependant, un des buts poursuivis serait atteint si un certain nombre de remarques déduites de ce travail pouvait réduire la complexité du phénomène.

Ainsi :

1° - Une expérience menée à une plus grande échelle, surtout pour les témoins (essai entre mutants identiques) et l'utilisation de mutants dont la stabilité a été éprouvée, atténueraient (ou supprimeraient) certains doutes sur les possibilités d'intervention d'adaptation, de réversions ou de mutations spontanées.

2° - Des corrections dans certaines démarches expérimentales réduiraient les hypothèses et les manipulations, donc permettraient de mieux cerner certains problèmes ; ainsi par exemple, nous aurions dû dès le début du développement, nous assurer du réisolement d'extrémités d'hyphes, en déposant les zones d'anastomoses sur lame recouverte d'une fine couche de MM. Dans la méthode utilisée, nous pouvions prélever sur la Maltéa des hétérocaryon mais aussi les types parentaux, ce qui réduisait pour des raisons biologiques (instabilité éventuelle de l'hétérocaryon) et expérimentales, nos chances d'isoler et mettre en évidence des hétérocaryons.

3° - L'usage d'un grand nombre de marqueurs, en particulier de la résistance à certaines substances avait permis de s'assurer certaines hypothèses. Cependant, les rapports de dominance existant entre gènes conférant résistance ou sensibilité aux inhibiteurs de croissance ou fongicides sont encore mal connus. Par conséquent, l'usage de ce type de marqueur ne servirait qu'à la détection d'éventuels recombines.

4° - L'instabilité possible des hétérocaryons incite à les sélectionner sur milieu minimum plutôt que sur milieu complet où ils peuvent se dissocier en chacun des constituants auxotrophes.

CONCLUSION GENERALE

Afin d'envisager une étude approfondie des bases génétiques du pouvoir pathogène chez Colletotrichum lagenarium, agent d'antracnose du Melon, nous avons orienté nos recherches dans deux voies complémentaires: d'une part les relations hôte-parasite, et d'autre part les possibilités de mise en hétérocaryose de deux mutants auxotrophes du champignon.

Des tests sur plantule de Melon nous ont permis d'analyser le pouvoir pathogène des souches mises à notre disposition (souche sauvage et mutants obtenus par action de la nitrosoguanidine). L'échelle couramment utilisée ne rend pas compte, avec suffisamment de précision, de l'importance et de la localisation des symptômes. Une méthode plus fine a été mise au point, elle nous a permis non seulement de confirmer nos premiers résultats, mais aussi de mieux évaluer les différences d'agressivité sur le nombre réduit de variétés disponibles. La nature de la résistance a pu être précisée en modifiant les conditions d'inoculation. En effet, sans apport nutritif artificiel les souches auxotrophes ont un pouvoir pathogène très réduit ou même nul. Sur la variété Doublon et plus encore sur CM, l'addition de milieu complet lors de l'inoculation provoque rapidement une nette augmentation des symptômes pour toutes les souches utilisées, par la suite l'évolution de la maladie causée par une souche donnée est à peu près la même sur les deux variétés. Ces faits sont en faveur de la théorie nutritionnelle de la résistance, tout au moins en ce qui concerne les premiers stades de l'attaque parasitaire.

Dans l'avenir notre échelle pourrait sans doute être utilisée, principalement pour l'étude des variations d'agressivité, dans le cas de toute maladie fongique qui se manifeste par l'apparition de taches nécrotiques sur les organes aériens. Cependant, il faut noter que cette échelle amplifie les variations d'indice d'agressivité dues à l'expérimentation, et par conséquent il serait nécessaire d'effectuer une analyse statistique précise portant sur les résultats de plusieurs tests réalisés en conditions bien contrôlées. Les variations propres aux variétés et aux souches, le degré de signification des différences observées seraient ainsi mieux cernés.

Le matériel dont nous disposions ne nous a pas permis de mettre en évidence de la virulence. Une étude de la nature du pouvoir pathogène de nombreux isolats de Colletotrichum lagenarium devrait être menée sur une gamme étendue de variétés de Melon, afin de savoir si nous ne pouvons compter que sur les systèmes polygéniques gouvernant l'agressivité, ou bien s'il serait possible de mettre en évidence un système oligogénique gouvernant la virulence. Cette connaissance serait très utile pour la mise au point de stratégies de lutte, mais aussi pour marquer plus facilement les souches que l'on pourrait obtenir par recombinaisons mitotiques.

La recherche d'hétérocaryons entre deux mutants auxotrophes de Colletotrichum lagenarium nous a conduit aux remarques suivantes :

1 - On peut effectivement provoquer des anastomoses entre filaments appartenant à deux mutants auxotrophes de ce champignon pathogène ; la question est de savoir si ces anastomoses conduisent à la formation d'hétérocaryons, et si ceux-ci sont viables.

2 - Après isolement des zones d'anastomoses, des modifications peuvent apparaître (faible pouvoir germinatif des conidies, phénotypes nouveaux), mais leur origine n'a pu être déterminée précisément.

Ces observations, jointes aux études faites par ailleurs avec le couple Glomerella cingulata/Colletotrichum lagenarium (28) nous font entrevoir deux voies d'étude des bases génétiques du pouvoir pathogène de l'agent d'Anthracnose du Melon :

- la première voie, qui est peut être la plus laborieuse mais certainement la plus édifiante, serait de tenter de réunir les caractères sexué et pathogène dans un même individu ;

- la seconde pourrait consister à analyser les supports génétiques de cette pathogénie au moyen de la parasexualité entre deux souches différentes convenablement marquées, de Colletotrichum lagenarium.

Les résultats obtenus dans nos essais d'hétérocaryose chez Colletotrichum lagenarium et les questions qu'ils soulèvent constituent autant de curiosités qui nous incitent à poursuivre la recherche dans l'une ou l'autre des deux voies.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- A.C.T.A. (Association de Coordination Technique Agricole)(1972)-
Guide pratique de défense des cultures: 185
- 2- BRADLEY S.G. (1962) - Parasexual phenomena in microorganisms
Ann. Rev. Microbiol. 16:36-46.
- 3- CHEVAUGEON J. (1973) - Aspects génétiques du parasitisme fongique-
Cours A.E.A. Amélioration des plantes; option Phytopathologie
ORSAY.
- 4- DUTTA S.K. and E.D. GARBER (1962) - Fungicide resistance in Colletotrichum
lagenarium.
Phytopathology 52:35-38.
- 5 - DUTTA S.K. and E.D. GARBER (1960) - Genetics of phytopathogenic Fungi-
III- An attempt to demonstrate the parasexual cycle in
Colletotrichum lagenarium.
Bot. Gaz. 122:118-121.
- 6- FINCHAM J.R. and P.R. DAY (1963)¹ - Fungal genetics-
III- Isolation and characterisation of mutants.
Botanical Monography 4:45-77.
Blackwell scientific publication (OXFORD).
- 7- GELLER S. (1974) - Abrégé de statistique à l'usage des étudiants en
médecine et biologie.
Masson et C^{ie}
- 8- GIRARD J.C. (1970) - L'antracnose des plantules de cotonier-
D.E.A. ORSAY.
- 9- HOLLIDAY R. (1956) - A new method for identification of biochemical
mutants of microorganisms.
Nature 178:987.

- 10- HOLLIDAY R. (1961) - The genetics of Ustilago maydis.
Genet. Res., Camb. 2:204-230.
- 11- LE GRAND-PERNOT Françoise (1973) - Création de lignées pathogènes et sexuées par recombinaison mitotique entre Glomerella cingulata et Colletotrichum musae.
Thèse III^e cycle ORSAY
- 12- LE GRAND-PERNOT Françoise et Martine TROCME (1974) - Note sur la comparaison du pouvoir pathogène entre un Colletotrichum musae (CKE. et MASSEE) et un Colletotrichum lagenarium (PASS.) ELL. et HAST sur deux hôtes différents, des plantules de Melon et des Bananes.
Fruits 29:127-129.
- 13- LEWIS D. (1961) - Genetical analysis of methionin suppressor in Coprinus.
Genet. Res., Camb. 2:141-145.
- 14- LHOAS P. (1967) - Genetic analysis by means of the parasexual cycle in Aspergillus niger.
Genet. Res., Camb. 10:45-61.
- 15- LUIG N.H. (1962) - Recessive suppressors in Aspergillus nidulans closely linked to an auxotrophic mutant which they suppress.
Genet. Res., Camb. 3:331-332.
- 16- MAC DONALD K.D. (1968) - The selection of auxotrophs of Penicillium chrisogenum with Nystatin.
Genet. Res., Camb. 11:327-330.
- 17- MESSIAEN C.M. et R. LAFON (1963) - Les maladies des plantes maraîchères.
I.N.R.A.
- 18- PARMETER J.R., W.C. SNYDER and R.E. REICHLER (1963) - Heterocaryosis and variability in plant-pathogenic fungi.
Ann. Rev. Phytopath. 1:51-78.

- 19- PONTECORVO G. (1953) - The genetics of Aspergillus nidulans.
Adv. in Genetics 5:141-235.
- 20- PONTECORVO G. (1956) - The parasexual cycle in Fungi.
Ann. Rev. Microbiol. 10:393-400.
- 21- PONTECORVO G. and E. KAUFER (1958) - Genetic analysis based on mitotic recombination.
Adv. in Genetics 9:71-103.
- 22- ROGER L. (1953) - Phytopathologie des pays chauds.
II Paul LECHEVALIER Paris.
- 23- SACCAS A.M. et J. CHARPENTIER (1969) - L'antracnose des Caféiers Robusta et Excelsa due à Colletotrichum coffeanum (NOACK) en R.C.A.
I.F.C.C. 9:36-41.
- 24- SANDERSON K.E. and A.M. SRB (1965) - Heterocaryosis and parasexuality in the fungus Ascochyta imperfecta.
Amer. J. Bot. 52:72-81.
- 25- SNOW R. (1966) - Enrichissement method for auxotrophics Yeast mutants using the antibiotic "Nystatin".
Nature 211:206-207.
- 26- STANLEY Valery and Mary P. ENGLISH (1965) - Some effects of Nystatin on the growth of four Aspergillus species.
J. Gen. Microbiol. 40:107-118.
- 27- TATAREAU J.C. et P. AURIOL (1972) - Corrélations entre la virulence de Colletotrichum lagenarium et son aptitude à dégrader les polysides des parois cellulaires d'un hôte sensible.
C.R.A.S. 274: 1304 - 1306
- 28- TROCME Martine (1973) - Etude des bases génétiques du pouvoir pathogène de l'agent de l'antracnose du Melon, Colletotrichum lagenarium.
D.E.A. ORSAY

- 29- VAN DER PLANK J.E. (1968) - Disease resistance in Plants.
Academic Press Inc.
- 30- WILSON J.F. and Laura GARNJOBST (1966) - A new incompatibility locus
in Neurospora crassa.
Genetics 53:621-631.
- 31- WILSON J.F., Laura GARNJOBST and E.L. TATUM (1961) - Heterocaryon
incompatibility in Neurospora crassa - Micro injection studies.
Amer. J. Bot. 48:299-305.