

Application de la technique du marquage fluorescent à la détermination du comportement sexuel du *Phytophthora palmivora*

Bernard HUGUENIN

Centre ORSTOM de Brazzaville
Laboratoire de Phytopathologie

Un des aspects encore peu explorés du comportement sexuel des *Phytophthora* hétérothalliques concerne la part respective tenue par les deux confrontants dans la construction des organes sexuels. On soupçonne en effet, chez ces espèces, l'existence d'un système de sexualité relative analogue à celui connu chez les *Achlya*, associé au système d'incompatibilité A_1A_2 . Les diverses souches d'une même espèce constitueraient ainsi deux séries parallèles présentant des individus à prédominance femelle ou mâle aux deux extrémités de la série, encadrant des individus à tendance hermaphrodite, GALINDO et GALLEGLY (1960) ont pu classer ainsi en deux séries douze souches de *Phytophthora infestans*, mais ces études sont restées fragmentaires en raison des difficultés pratiques. Par ailleurs, les résultats des analyses génétiques des descendances d'oospores montrent qu'il n'est pas exclu qu'un certain taux d'autofécondation intervienne dans les cultures, expliquant en partie les déviations observées par rapport aux répartitions théoriques attendues (BOCCAS 1973, SANSOME 1970). La preuve de la possibilité de ces autofécondations a d'ailleurs été apportée par BRASIER (1972).

Les premiers essais de détermination du comportement sexuel de souches de *Phytophthora* hétérothalliques ont fait appel à des techniques laborieuses consistant à remonter de la structure observée à l'origine des hyphes lui ayant donné naissance. Cette technique, utilisée par GALINDO et GALLEGLY, a également été employée par BOCCAS chez certaines souches étudiées à Brazzaville, conjointement avec l'analyse des descendants de germination oogoniales qui permet une bonne approximation du phénomène. Toutefois, cette technique présente de nombreuses limitations et tous les traçages faits ne portent en tout que sur quelques dizaines d'oospores. GALINDO et GALLEGLY ont ainsi établi leurs séries sur une moyenne de six oospores par croisement (184 oospores issues de 27 croisements de 12 souches différentes). Il est évident que, dans de telles conditions, les traçages faits n'ont qu'une chance assez faible de refléter exactement la réalité des faits. En particulier, les autofécondations, qui sont probablement plus tardives dans leur réalisation que les croisements réels, ne peuvent que difficilement être mis en évidence par cette méthode.

Il était donc nécessaire de pouvoir disposer d'une

technique permettant de reconnaître spécifiquement un des deux confrontants et de déterminer ainsi son rôle dans la construction de l'organe sexuel. Cette technique a pu être mise au point au laboratoire de Brazzaville en utilisant un marquage fluorescent vital par un fluorochrome. Cette technique avait déjà été utilisée par TSAO (1970) pour marquer des propagules du *Phytophthora parasitica*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le fluorochrome employé est commercialisé par l'American Cyanamid Co. sous le nom de « Calcofluor White ». Il est utilisé, comme d'autres produits de la même famille, comme agent de blanchiment optique dans l'industrie des détergents ménagers. Du point de vue chimique c'est un dérivé complexe de l'acide stilbène disulfonique et il présente, en illumination UV, une fluorescence blanche.

Le fluorochrome est incorporé au milieu de culture, sous forme de solution aqueuse à la dose de 300 ppm de produit actif. Le milieu de culture est de type minéral et la solution de marquage est apportée à l'aide d'une seringue à répartition automatique qui assure également sa stérilisation par filtration sur Millipore 0,22 μ . Après inoculation la culture est incubée à l'obscurité et à 26° pendant 8 jours. Parallèlement des cultures sur milieu non marqué sont conduites dans les mêmes conditions. Aux doses utilisées le fluorochrome est sans effet sur la croissance et le développement du champignon et est incorporé par celui-ci, donnant une fluorescence blanche au cytoplasme et surtout aux membranes.

Les confrontations sont faites en culture cellulaire sur lamelle gélosée (le milieu de culture étant du Lima Bean Agar Difco), une souche marquée étant confrontée à une souche non marquée. L'inoculation est faite par des fragments mycéliens prélevés sur les colonies après lavage à l'eau stérile par centrifugation. Dans ces conditions, il n'y a pas de diffusion de fluorochrome dans le milieu gélosé, ni risque de marquage intempêtif de la seconde souche. Après trois à quatre jours de culture, les organes sexués se sont formés en nombre suffisant pour permettre un comptage représentatif, chaque lamelle portant entre 150 et 250

organes de reproduction sexuée, dans le cas d'une confrontation bien fertile.

Les observations sont conduites en microscopie de fluorescence UV avec un appareillage Zeiss équipé d'une lampe à vapeur de mercure HBO200. Le rayonnement d'excitation est sélectionné par un filtre UGI à transmission maximum vers 350 nm. Dans ces conditions les organes sexués présentent une fluorescence blanche permettant de les repérer et de les compter. Les comptages ont porté sur le nombre de structures présentant une fluorescence de l'oogone ou de l'anthéridie et correspondant donc à des croisements entre les deux souches, ou des deux composants, ce qui est interprété comme des cas d'autofécondation de la souche marquée. Des observations préalables ayant montré que, si le marquage est correctement fait,

toutes les structures reproductrices présentaient une fluorescence importante, les organes sexués non fluorescents sont interprétés comme des autofécondations de la souche non marquée.

Ces premières études ont été faites sur des souches couramment utilisées au laboratoire, soit 570, K et 26 du signe A_1 et L et 36 du signe A_2 .

RÉSULTATS

Les résultats des comptages sont donnés, selon le signe de compatibilité de la souche marquée, dans les tableaux I et II, ces chiffres étant la moyenne de plusieurs séries expérimentales.

TABLEAU I
MARQUAGE DE LA SOUCHE A_2

Croisement	Nombre total observé	% autofécondation		Nombre croisements	% oogone A_2	% anthéridie A_2
		A_1	A_2			
570 × L°	1 118	6,7	33,2	672	71,5	28,5
570 × 36°	219	0,9	48,5	111	73,0	27,0
K × L°	531	1,3	28,6	372	36,8	63,2
K × 36°	200	0	33,3	150	100	0
26 × L°	98	1,0	33,0	64	3,1	96,9
26 × 36°	328	2,7	59,0	126	62,0	38,0

TABLEAU II
MARQUAGE DE LA SOUCHE A_1

Croisement	Nombre total observé	% autofécondation		Nombre croisements	% oogone A_2	% anthéridie A_2
		A_1	A_2			
570 × L	387	13,1	18,4	250	58,0	42,0
K° × L	201	12,0	4,5	168	45,0	55,0

Ces chiffres appellent, préalablement à leur interprétation, quelques remarques. En premier lieu, l'incorporation du fluorochrome par la souche testée, si elle ne modifie sensiblement pas le type de réactivité sexuelle, semble en revanche avoir une activité nette sur le taux d'autofécondation des souches, dans le sens d'une augmentation de ce taux. Les souches 570 et K, confrontées avec L (signe A_2) présentent, non marquées, des taux d'autofécondation faibles, voire nuls, mais, après incorporation du fluorochrome ma-

nifestent une élévation substantielle de ces taux. La situation est d'ailleurs la même en ce qui concerne la souche L. Quoi qu'il en soit, ces chiffres permettent de confirmer l'existence dans ces croisements de *Phytophthora palmivora*, d'un certain nombre d'organes sexuels provenant d'autofécondations, essentiellement données par la souche A_2 .

Une deuxième remarque concerne les variations relatives de réactivité sexuelle des souches A_1 mises en présence de diverses souches A_2 . La souche 570

par exemple, se comporte de manière identique vis-à-vis de L ou de 36. La souche K en revanche apparaît comme fortement mâle vis-à-vis de 36 et légèrement femelle vis-à-vis de L. Ce déséquilibre, enfin, apparaît, mais en sens inverse, pour la souche 26. Si, à partir de ces chiffres, on essaye un classement relatif des trois souches A₁ par rapport à chacune des souches A₂, on se rend compte que 570 et K dans un cas se classent dans l'ordre K-570 (dans le sens des potentialités mâles augmentant), dans l'autre cas dans l'ordre 570-K. Si on tient compte du fait que, lors du marquage des souches A₁, les pourcentages relatifs observés d'organes mâles et femelles fournis par chaque souche, manifestent la même tendance que celle observée lors des marquages de souche A₂ (tendance mâle de 570 et femelle de K, en présence de la souche L), il est permis de penser que cette variation de la réactivité sexuelle des souches, si elle n'est pas tout simplement liée au fluorochrome employé, dénote un système sexuel plus complexe que celui fourni par le schéma des *Achlya*. Une telle situation, compte tenu de la présence des facteurs d'incompatibilité, n'aurait rien de surprenant.

Compte tenu de ces remarques, il est cependant possible de classer ces souches en deux séries parallèles, ce classement demandant toutefois à être encore confirmé. Il s'établirait ainsi, de la souche à tendance femelle forte vers la souche à tendance mâle dominante :

Signe A₁ : 26-K-570 par rapport à L
 26-570-K par rapport à 36

Signe A₂ : 36-L par rapport aux trois confrontants (graphique 1)

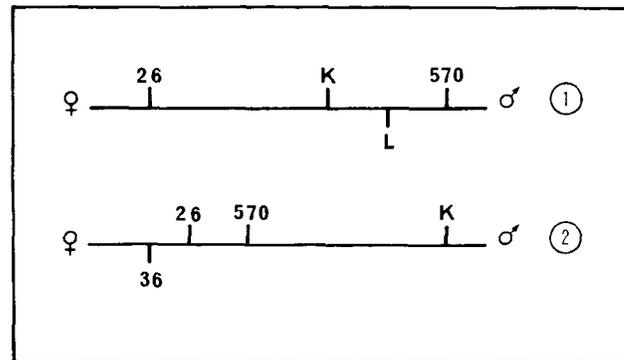
CONCLUSIONS

Ces résultats encore partiels demandent à être confirmés en faisant intervenir le plus grand nombre

possible de souches des deux signes. Ils ont permis cependant de vérifier la réalité de l'hypothèse des autofécondations possibles et surtout, ce qui présente un grand intérêt pour les études génétiques d'en estimer le taux pour chaque souche.

Sur le plan fondamental ils permettent également d'affirmer la présence, chez le *Phytophthora palmivora*, des phénomènes de sexualité relative qui étaient soupçonnés mais ceux-ci apparaissent comme plus complexes que prévu.

La technique du marquage fluorescent, déjà utilisée dans des études d'écologie, présente donc un intérêt certain pour la définition des aptitudes sexuelles des souches de *Phytophthora* hétérothalliques. Le fluorochrome utilisé ici était de type A (marqueur cytoplasmique) mais l'utilisation possible de fluorochrome de type N (marqueur nucléaire) permet d'envisager l'étude du comportement des noyaux eux-mêmes au cours de la reproduction sexuée et en particulier à l'intérieur même de l'oospore où ils restent rebelles à l'observation cytologique classique.



Graphique 1.