

RÔLE DE QUELQUES FACTEURS DANS LA FORMATION ET LA GERMINATION DES OOSPORES CHEZ LE *PHYTOPHTHORA PALMIVORA* BUTL.

B. HUGUENIN et B. BOCCAS
avec la collaboration technique de P. DIOULOU

Laboratoire de Phytopathologie,
Centre de Brazzaville
Office de la Recherche scientifique et technique outre-mer

RÉSUMÉ

Chez le *Phytophthora palmivora*, plusieurs facteurs physiques ou physico-chimiques sont susceptibles d'influencer la reproduction sexuée. Dans les conditions optimales de température et de pH, déterminées pour les isolats utilisés à 22-26° et pH 5,5-6,0, l'influence de la lumière se traduit par une régression du taux de reproduction en fonction de l'intensité, les radiations de courte longueur d'onde étant les plus actives dans cette inhibition. L'existence d'une réciprocity dose-réaction suggère l'intervention d'une substance photolabile dans la réalisation de la phase sexuée du cycle. La lumière permet également de lever la dormance des oospores, les radiations bleu-violet étant ici encore les plus actives, et une méthode est proposée, pour le *Phytophthora palmivora*, permettant d'obtenir des taux de germination utilisables pour des analyses génétiques.

INTRODUCTION

La reproduction sexuée est, pour les Pythiacées hétérothalliques, et en particulier le *Phytophthora palmivora*, la source essentielle de variabilité et, en théorie, la principale occasion qui leur est offerte de développer de nouvelles aptitudes par recombinaison des caractères pathogènes. Le polyphytisme du *Phytophthora palmivora*, recensé jusqu'à présent sur 136 hôtes différents (CHEE, 1969), l'existence probable chez cette espèce de races à caractères pathogènes plus ou moins différenciés, les possibilités théoriques de rencontre entre souches compatibles dans la nature, indiquent que la réalisation éventuelle de la phase sexuée du cycle doit avoir une incidence sur l'évolution des capacités parasitaires de l'espèce.

La tendance actuelle, en matière de lutte phytosanitaire contre le *Phytophthora palmivora*, est d'opposer à son action, dans les domaines où elle est la plus préjudiciable, un matériel végétal tolérant, voire résistant. C'est en particulier le cas en culture cacaoyère. Mais, dans cette perspective, il devient indispensable de pouvoir évaluer les risques de variation du parasite et, en conséquence, d'estimer l'éventualité de sa reproduction sexuée dans la nature. Pour pouvoir définir avec exactitude les conditions naturelles favorisant, une fois le contact entre souches compatibles établi, la reproduction sexuée, y compris son terme ultime la germination des oospores, il était nécessaire de bien connaître les conditions physiques de l'accomplissement de cette phase du cycle en culture artificielle.

La présente étude, entreprise dans le cadre des recherches menées à Brazzaville sur la génétique et la biologie du *Phytophthora palmivora*, s'intéresse à deux facteurs physiques susceptibles de jouer un rôle dans la réalisation de la reproduction sexuée, la température et la lumière, ainsi qu'à un facteur physico-chimique, le pH.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les souches utilisées dans ce travail sont intermédiaires par leurs caractères entre le *Phytophthora palmivora* BUTL. et le *Phytophthora parasitica* DASTUR. Bien que la discussion soit ouverte quant à leur appartenance systématique exacte, leur interfertilité, la possibilité de croisements très fertiles et à descendance viable avec des souches typiques du *Phytophthora palmivora*, nous ont amenés à les rattacher à cette dernière espèce.

Ces souches sont les suivantes :

Souches	Hôte	Origine	Signe de compatibilité
K	<i>Citrus</i> sp. (Oranger)	Côte-d'Ivoire	A ₁
570	<i>Citrus</i> sp. (Rough Lemon)	Congo-Brazzaville	A ₁
L	<i>Solanum melongena</i> (Aubergine)	Côte d'Ivoire	A ₂
FO	<i>Hibiscus sabdariffa</i> (Roselle)	République Centre-Africaine	A ₂

Avant toute utilisation chaque souche a subi un clonage monoospore et toutes les études ont porté sur des cultures du même clone. Ces cultures sont conservées au laboratoire à 20° sur milieu PDA.

Deux types de milieu de culture ont été utilisés au cours des études, un milieu naturel à base de petits pois et un milieu artificiel.

Milieu pois : une décoction de pois est préparée par broyage de 100 g de petits pois extra-fins, le broyat étant épuisé par l'eau à une température proche de l'ébullition puis filtré sur mousseline. Le filtrat final est ajusté à un litre et utilisé tel quel (milieu PL) ou gélosé à 20 g/l (milieu PG). Pour les études de pH le milieu PG a été tamponné au mélange de McIlvaine (acide citrique 0,001 M, phosphate disodique 0,002 M).

Milieu artificiel : la composition de ce milieu est la suivante :

K ₂ HPO ₄	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,8 g
K ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,2 g

KNO ₃	1,0 g
D-Glucose	10,0 g (soit un C/N. de 29)
Thiamine (chlorhydrate)	2 mg
Solution oligo-dynamique	2 ml
β -sitostérol	20 mg
Eau désionisée	1 000 ml
Agar-agar	20 g

Le stérol est apporté au milieu avant autoclavage sous la forme d'une solution étherée de trioléine : (β -sitostérol 80 mg, trioléine 10 ml, éther 100 ml). Cet apport est fait à raison de 0,5 ml par culot de 20 cm³ et une émulsion est réalisée, avant le coulage en boîtes, par homogénéisation au vibro-mixeur. HARNISH (1968) a montré que, sous cette forme, l'efficacité de l'apport de stérol est fortement augmentée. On obtient en effet une suspension de très fines gouttelettes huileuses, véhiculant en solution le stérol, et qui sont colonisées préférentiellement par le champignon. L'utilisation est, dans ces conditions, excellente et le taux de reproduction observé est comparable à celui des meilleurs milieux naturels.

La solution oligo-dynamique apporte, par litre de milieu : FeSO₄, 7 H₂O : 0,5 mg ; ZnSO₄, 7 H₂O : 0,5 mg ; CuSO₄, 5 H₂O : 0,02 mg ; MnCl₂, 7 H₂O : 0,02 mg ; TiSO₄, 5 H₂O : 0,02 mg ; Mo7(NH₄)₆, 4 H₂O : 0,02 mg.

Après autoclavage à 115° pendant 15 minutes, le pH de ce milieu se situe entre 5,5 et 5,8.

Les milieux gélosés, en boîtes de Pétri de 10 cm, sont inoculés soit par étalement à la surface d'un broyat mycélien des deux souches confrontées, soit par mise en place de deux implants cylindriques à 2 cm l'un de l'autre, les milieux liquides par 1 cm³ d'un broyat mycélien mixte.

Dans tous les cas, les mesures du nombre d'oospores ont été faites par comptage à l'hématimètre sur un broyat de la totalité de la culture, ou d'un volume aliquot dans le cas des cultures gélosées. Une étude préalable a montré que l'erreur systématique faite en ne prélevant, toujours dans les mêmes conditions, qu'une partie de la culture n'atteignait que 1,6 p. 100 du nombre d'organes comptés. Les résultats de ces comptages sont ramenés, compte tenu de la dilution, au nombre par mm³ de milieu.

Cette méthode de mesure nous a semblé préférable à celle de la plupart des auteurs anglo-saxons qui consiste à estimer directement dans un champ microscopique, le nombre d'oospores dans le milieu. La méthode ne permet en effet d'appréhender que les seuls organes formés au fond de la couche de milieu, donc en conditions de semi-anaérobiose plutôt défavorisantes.

L'influence de la température sur les phénomènes étudiés a été testée dans une batterie d'étuves maintenues à température constante à 0,5° près. L'étude de celle de la lumière a nécessité, en revanche, une installation particulière pour obtenir des conditions d'éclairage aussi standardisées que possible.

Les cultures, en boîte de Pétri pyrex de 10 cm de diamètre, sont exposées à la lumière à travers le fond de la boîte et le milieu. La source de rayonnement est constituée par des batteries de tubes fluorescents Mazdafluor type Lumière du jour (tubes TF20) disposés dans des placards ventilés maintenus dans une enceinte climatisée à 26°. Dans ces conditions, la température au niveau des boîtes est de l'ordre de 28°, à 0,5° près. Certaines cultures ont été exposées à la lumière d'un tube TF40 Lumière du jour. La distance entre les boîtes et la source lumineuse est, dans tous les cas, de 30 cm.

Les mesures d'intensité lumineuse ont été faites avec un luxmètre équilibré pour l'ensemble du spectre (Chauvin-Arnoux type 94) et celles de flux énergétique à l'aide d'une thermopile reliée à un microvoltmètre. Le taux de réflexion de l'énergie incidente sur les boîtes de Pétri a été mesuré avec un bilanmètre type CSIRO et le coefficient d'absorption du milieu au spectrophotomètre (Beckman DBG). Les résultats de ces mesures sont les suivants :

Énergie incidente	0,30 μ W/cm ² par lux mesuré
Énergie réfléchie	22 p. 100 de l'énergie incidente
Absorption du milieu	75 p. 100 sous 1 cm d'épaisseur

L'épaisseur du milieu étant en moyenne de 0,6 cm, on est conduit à adopter, selon les calculs de MOROWITZ (SMITH et HANAWALT, 1969), un facteur de correction de dose de 0,55. Dans ces conditions, l'énergie disponible au niveau des hyphes mycéliennes peut se calculer à partir de la formule : E utile = E incidente \times 0,78 \times 0,55. On obtient ainsi, pour les tubes Lumière du jour et par lux mesuré, une énergie utilisable de 0,13 μ W/cm².

Les études sur l'influence de la qualité de la lumière ont été faites dans les mêmes conditions par exposition en enceintes closes ventilées au rayonnement de tubes fluorescents Mazdafluor TF40 colorés. Les caractéristiques de ces tubes sont les suivantes :

Tube bleu : émission de 400 à 660 nm avec maximum à 440 nm ; énergie utilisable (calculée comme précédemment) 1,28 μ W/cm² par lux mesuré.

Tube vert : émission de 400 à 670 nm avec maximum à 530 nm ; énergie utilisable : 0,18 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ par lux mesuré

Tube jaune : émission de 440 à 720 nm avec maximum à 580 nm ; énergie utilisable : 0,25 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ par lux mesuré.

Tube rouge : émission de 600 à 700 nm avec maximum à 660 nm ; énergie utilisable 2,36 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ par lux mesuré.

Tous ces tubes rayonnent également dans l'infrarouge. Dans tous les cas les expositions ont été faites sur une base équidénergétique de 540 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ pour pouvoir comparer entre elles les différentes actions.

RÉSULTATS

I. — Formation des organes sexués à l'obscurité

Il était nécessaire, pour pouvoir juger de l'influence des divers facteurs étudiés, de connaître les modalités de formation, à l'obscurité, des organes de reproduction sexuée du *Phytophthora palmivora*. Sur milieu PL, le croisement 570 \times FO, maintenu à 26° et à l'obscurité, atteint sa production maximale d'organes sexués en 17 jours dans les conditions expérimentales pratiquées (20 ml de milieu dans un Erlenmeyer de 250 ml). La phase exponentielle de production débute dès le cinquième jour et se poursuit jusqu'au douzième, moment où débute le palier terminal (fig. 5, courbe T). Les chiffres relatifs à cette courbe (tabl. I) permettent de constater qu'en 7 jours, plus de la moitié du nombre total d'oospores est déjà formée. La courbe J/T de la même figure, qui représente l'évolution journalière du rapport du nombre de jeunes oogones au nombre total d'organes, montre que la différenciation des oospores est continue durant toute la période de production. De plus, la comparaison de ces deux courbes permet d'estimer à moins de 48 heures le temps nécessaire à une oospore pour se différencier à partir d'un jeune oogone.

TABLEAU I

Formation des organes sexués à l'obscurité

Croisement : 570 \times FO

Milieu Pois liquide

26°C. Obscurité

Nombre de jours de culture	Nombre d'organes en % du nombre à 17 jours	Pourcentage d'oogones jeunes par rapport au nombre total d'organes formés
4	0,15	100
5	6,7	94,3
7	50,0	48,1
8	55,4	34,1
9	56,7	28,1
10	68,4	19,8
11	80,8	—
12	—	15,3
16	89,9	6,8
17	100	7,0

Note : Le nombre d'oospores formées au bout de 17 jours atteint 131,3 par mm^3 de milieu.

Cette différenciation traduisant la fin des événements nucléaires intervenant dans l'oogone et la réalisation de la plasmogamie, l'estimation précédente ne fait que confirmer les résultats similaires obtenus lors de l'étude cytologique des jeunes oogones (HUGUENIN et BOCCAS, 1970).

2. — Influence de la température sur la reproduction sexuée

Il apparaît, d'après les travaux de divers auteurs, que la température optimale pour la reproduction sexuée des *Phytophthora* est sensiblement inférieure à l'optimum thermique de croissance. RONCADORI (1965) a situé ce dernier, pour de nombreuses espèces, entre 25 et 30°. En ce qui concerne plus particulièrement le *Phytophthora palmivora*, BRASIER (1969) donne comme température favorisant le développement du thalle, 27-30°, alors que la reproduction sexuée est fortement stimulée par des températures plus basses, de l'ordre de 20°. Ces résultats sont confirmés par ceux de KOFFI-DONGO (1971), pour d'autres isolats de la même espèce, qui présentent une croissance maximale entre 26 et 31° et une production abondante d'oospores entre 20 et 26°.

Les quatre souches clonales utilisées dans ce travail présentent le même phénomène. La température optimale pour la croissance végétative, estimée d'après le diamètre atteint par le thalle en sept jours sur milieu PG, se situe pour ces quatre isolats vers 28-30°. Les courbes des figures 3 et 4 montrent que les optimums thermiques pour la reproduction sexuée diffèrent de ces températures et peuvent varier d'un croisement à l'autre. Les confrontations 570 × L, et K × L, présentent un maximum de production à 22° avec une zone optimale allant de 20 à 26° pour 570 × L, et de 18 à 26° pour K × L. Le croisement 570 × FO atteint son maximum à 26° avec une zone de production s'étalant entre 22 et 28°.

Il apparaît donc nettement que la réalisation de la phase sexuée du cycle nécessite des températures plus basses que celles exigées pour une croissance végétative maximale, la différence pouvant être de 4 à 8° selon les souches testées. Ces résultats nous ont permis d'adopter par la suite un compromis de température, toutes les confrontations, sauf exception signalée, ayant été faites à 26°.

3. — Influence du pH du milieu sur la formation des organes sexués

Cette influence semble avoir été négligée par la plupart des auteurs. Ce facteur est cependant susceptible de jouer son rôle, en particulier dans la nature où le pH des substrats intervient certainement dans la réalisation de la phase sexuée du cycle. Chez les trois croisements testés (K × L, 570 × L, 570 × FO) sur milieu PG tamponné au mélange de McIlvaine, l'optimum s'est manifesté soit à pH 5,5 (K × L, et 570 × L) soit à pH 6,0 (570 × FO). Les courbes des figures 1 et 2, représentatives des résultats obtenus, permettent de fixer le pH optimal vers 5,5-6,0 avec cependant possibilités de réalisation de la reproduction sexuée dans de bonnes conditions entre pH 4,5 et pH 6,5.

4. — *Influence des rayonnements lumineux sur la réalisation de la reproduction sexuée*

Cette influence apparaît comme complexe et d'analyse délicate. La plupart des études menées jusqu'à présent sur ce sujet se sont surtout attachées à décrire le phénomène d'inhibition mis en évidence pour la première fois, chez le *Phytophthora infestans*, par ROMERO et GALLEGLY (1963). Ces auteurs ont observé qu'un éclairage continu inhibait totalement, chez cette espèce, la cystogamie alors que les croisements étaient normalement fertiles à l'obscurité ou en condition d'alternance 12/12. Par la suite d'autres auteurs (HARNISH, 1965 ; MERZ, 1965 ; LEAL, 1965) se sont intéressés au même problème, chez d'autres espèces, et BRASIER (1969) a confirmé cette inhibition dans le cas du *Phytophthora palmivora*. Cependant rares sont les auteurs qui ont essayé de doser quantitativement les réactions du champignon à la lumière (HARNISH, 1965 ; MERZ, 1965). Nos résultats, bien qu'encore fragmentaires, permettent cependant une approche quantitative des phénomènes.

TABLEAU 2

Influence de la lumière blanche sur la formation des organes de reproduction sexuée

Croisement : 570 × L

Milieu MTS

28°. Exposition à la lumière de tubes fluorescents, lumière du jour

Intensité lumineuse I. lux	1/I. 10 ³	Nombre d'œufs en % du témoin obscurité		
		Éclairage permanent		Éclairage 12 h/jour
		117 h	240 h	
0		100	100	100
140	6,6	9,8	21,5	47,0
320	3,3	7,0	13,4	24,3
550	1,8	4,3	7,3	15,7
750	1,3	2,5	4,3	12,0
1 100	0,9	2,1	1,5	7,2
1 600	0,6	1,0	1,0	5,1
2 000	0,5	0,7	0,6	4,8

Note : La moyenne des mesures faites à l'obscurité s'établit à 240 heures de culture, à 211 œufs par mm³ de milieu.

Une première série d'expériences a permis d'estimer la dépendance vis-à-vis de la lumière de la reproduction sexuée. Les courbes de la figure 6 établies à 117 heures et 240 heures de culture, en fonction de l'inverse de l'intensité lumineuse en lux, montrent, qu'après 10 jours de culture, soit en fin de période exponentielle de production (cf. fig. 5), l'inhibition est déjà considérable à partir de 140 lux, ce qui correspond à une énergie utile de 18 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Les chiffres du tableau 2 et la courbe établie à 240 heures de culture permettent également d'estimer les énergies néces-

saires pour abaisser le taux de reproduction sexuée à 10 p. 100 ($50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) et 1 p. 100 ($200 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) du nombre d'oospores formé à l'obscurité.

En soumettant les cultures à une alternance de 12 heures de lumière-12 heures d'obscurité, la réponse à 10 jours (fig. 7) permet de constater que, au moins pour les intensités inférieures à 1 000 lux, le phénomène d'inhibition obéit apparemment à la loi de Bunsen-Roscoe de réciprocité dose-réponse. En effet le seuil de 10 p. 100 n'est atteint, dans cette alternance, que pour une énergie de $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, donc double de celle nécessaire en éclairage permanent. Il est cependant encore difficile de tirer de ces résultats une explication logique de l'action de la lumière. Mais le fait que le phénomène obéisse, en première approximation et pour des éclairages modérés, à la loi de réciprocité permet de penser que les réactions photochimiques en cause sont probablement peu nombreuses. S'agit-il de la destruction d'une substance photolabile, d'une inhibition de synthèse ou, au contraire, d'un phénomène de toute autre nature, la question reste posée. La courbe de la figure 8 permet cependant de constater, à l'appui des résultats de MERZ (1965), que ce sont les rayonnements les plus actiniques qui sont les plus efficaces dans cette inhibition.

5. — La germination des oospores de *Phytophthora palmivora*

C'est BLACKWELL (1943) qui a montré que les oospores des *Phytophthora* devaient nécessairement traverser une période de dormance avant de pouvoir germer. Cette dormance débute dès la différenciation des membranes de l'oospore, mettant ainsi fin aux possibilités de germination précoce des organes sexués (ROMERO et GALLAGLY, 1963 ; BOCCAS, 1970). Ces germinations oogoniales ne constituent, en fait, qu'un simple bouturage du parent femelle et ne se produisent d'ailleurs que si l'on interrompt l'évolution physiologique normale de la spore sexuelle en la séparant de ses filaments porteurs. De nombreuses recherches ont, ces dernières années, conduit différents auteurs à mettre au point des techniques permettant de lever la dormance des oospores. Toutes les méthodes (GALINDO et ZENTMYER, 1967 ; SATOUR et BUTLER, 1967 ; TIMMER *et al.*, 1970) font intervenir l'action de la lumière dont l'influence sur la germination des oospores fut mise en évidence par LEAL (1965) puis LEAL et GOMEZ-MIRANDA (1965). Les résultats obtenus par ces auteurs tendent à montrer que, pour chaque espèce testée, les exigences requises pour la levée de dormance, diffèrent sensiblement. Nous avons donc tenté de développer une technique adaptée au *Phytophthora palmivora*.

Nous avons d'abord essayé de définir les taux de germination intervenant normalement dans les cultures, en l'absence de tout traitement visant à lever la dormance des oospores. Les chiffres du tableau 3 et les courbes des figures 9 et 10, relatifs aux trois croisements étudiés, permettent tout d'abord de constater que les germinations oogoniales, très nombreuses dans les premiers jours suivant la cystogamie, tombent à peu près à zéro vers le 10 ou 12^e jour de culture. La production d'organes sexués est alors en fin de phase exponentielle (fig. 5) et se ralentit sensiblement. Mais, à partir de ce moment, on observe dans les cultures un pourcentage de germination constant, de l'ordre de 4 à 5 p. 100, indépendant de toute levée de dormance et qui se maintient pendant toute la durée de vie de la culture. L'existence de ce « bruit de fond », dans nos conditions expérimentales, pose un problème. Une première hypothèse pourrait l'expliquer par la présence, dans nos croisements, d'un certain

nombre d'oospores capables, pour une raison indéterminée, de germer sans entrer en dormance. Toutefois le pourcentage observé apparaît comme trop élevé par rapport à ce qui a pu être signalé par d'autres auteurs. Une seconde explication ressort de l'examen de la courbe J/T de la figure 5. Cette courbe atteint un palier, après environ 12 jours, pour un pourcentage des organes jeunes oscillant autour de 7 p. 100 du total. Ce palier correspond donc à une formation ralentie, mais continue, d'organes sexués dans la culture, organes sexués susceptibles d'entrer comme c'est le cas pour les premiers formés, en germination précoce.

TABLEAU 3

Germination des oospores maintenues à l'obscurité
Milieu de germination : Pois gélosé 23°, lumière diffuse
Milieu de culture : Pois gélosé 26°, obscurité

Age de la culture (jours)	Pourcentage de germination à 24 heures		
	K × L	570 × FO	570 × L
4	31	—	—
5	23	—	44,5
6	13,4	20	18,5
7	6	11	9,2
8	4,9	—	2,9
9	3,6	3	—
10	—	5	2,5
11	0	6	—
12	—	—	—
13	—	4	—
14	—	—	0,7
21	—	—	4,6
28	—	—	5,3
42	—	—	5,4

L'examen de la figure 10 et les chiffres du tableau 4 permettent encore de préciser ce point. La courbe (2) y correspond à des cultures exposées à la lumière à partir du 7^e jour, donc en plein milieu de la phase exponentielle de production. Cette exposition ayant pratiquement bloqué les néoformations d'organes sexués, ceux déjà formés ont continué leur évolution, sont entrés en dormance, amenant de ce fait le pourcentage de germination près de zéro. Par la suite ce taux faible s'est maintenu pendant le temps nécessaire à la levée de dormance puis s'est élevé régulièrement jusqu'à un palier correspondant à environ 12 p. 100 de germination. Dans la courbe (3) de la même figure, qui correspond à une mise en lumière au 28^e jour de culture, le même phénomène se retrouve mais l'intervention des germinations oogoniales des derniers organes formés au cours de la période d'obscurité relève le point de départ de la courbe.

La comparaison des courbes (2) et (3) de la figure 10 montre également que l'on parvient à des taux de germination similaires après 17 ou 35 jours de lumière. Le même phénomène s'observe pour le croisement 570 × FO (fig. 9) où la mise en lumière à 19 ou 26 jours aboutit au même pourcentage de germination après

un laps de temps à peu près identique. Il en est de même pour la confrontation K × L (tabl. 4). Il semble donc, qu'indépendamment de l'action de la lumière, les oospores aient besoin d'un certain délai (entre 40 et 60 jours) pour parvenir à maturité.

Toutes nos expositions ont été faites sous lumière permanente d'intensité moyenne 700 lux, alors que la plupart des auteurs ayant utilisé la lumière pour la levée de dormance soumettent leurs cultures à des alternances lumière-obscurité. Dans nos conditions expérimentales, ces alternances nous sont apparues sans effet net sur la levée de dormance (fig. 13). Il est possible qu'il faille faire intervenir des intensités beaucoup plus fortes pour que des alternances puissent marquer.

TABLEAU 4

Influence du temps d'exposition à la lumière sur la germination des oospores

Milieu de germination : Pois gélosé 23°, lumière diffuse

Milieu de culture : Pois gélosé 26° (obscurité) puis 28° (lumière)

Nbre jours obscurité	Nbre jours lumière	Nbre jours de culture	% de germination à 24 heures		
			570 × FO	570 × L	K × L
7	7	14		1,1	
	21	28		1,2	
	28	35		4,2	
	35	42		11,8	
	51	58		11,8	
12	8	20			4
15	42	57			15
19	14	33	3,4		
	21	40	4,4		
	28	47	12,9		
	42	61	16,0		
21	13	34			4
	21	42			17
26	7	33	3,8		
	14	40	3,8		
	21	47	9,8		
	35	61	12,1		
28	7	35		5,5	
	14	42		10,8	
	21	49		11,0	
	28	56		10,6	

Les lampes fluorescentes utilisées dans ces expériences ont une répartition spectrale type Lumière du jour. Il était donc intéressant de rechercher la région du spectre la plus active dans cette levée de dormance. Nos résultats sont encore fragmentaires sur ce point mais rejoignent ceux obtenus par divers auteurs (ROMERO et GALLEGLY, 1963 ; LEAL et GOMEZ-MIRANDA, 1965) chez d'autres espèces. En conditions d'éclairage équidénergétique (540 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) les radiations bleu-violet sont les plus actives, suivies par les radiations rouges.

Deux autres facteurs susceptibles d'influencer le taux de germination ont également été étudiés : le pH du milieu de germination et le temps de prétrempage

des oospores dans l'eau avant l'étalement. Les meilleurs taux de germination ont été obtenus après 24 à 48 heures de trempage (fig. 11) et à un optimum de pH de 5,0-5,5 (fig. 12).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nos résultats confirment que la reproduction sexuée du *Phytophthora palmivora* peut s'effectuer dans de bonnes conditions, entre 20 et 26°, et à des valeurs de pH s'échelonnant entre 4,5 et 6,5. Ils démontrent également que la lumière est préjudiciable à cette phase du cycle, ce qui, par ailleurs, confirme les données de la littérature. Ils apportent enfin, sur l'intensité et la progressivité de la réaction d'inhibition, quelques informations quantitatives. Ces résultats, qui ne diffèrent pas sensiblement de ceux des autres auteurs ayant abordé l'étude de ces phénomènes, permettent cependant de se poser la question des modalités d'action de la lumière. Dans la mesure où les processus de reproduction sexuée sont, chez les *Phytophthora*, sous la dépendance d'un système de type hormonal, on peut envisager deux hypothèses : la lumière inhibe les chaînes métaboliques aboutissant à ce système hormonal, ou elle inactive une substance morphogénétique, à synthèse non photodépendante et présente dans le milieu. Ce n'est que dans ce cas que l'on peut s'attendre à une réponse immédiate, quantitative en fonction de l'énergie mise en jeu, ce qui permet d'expliquer le phénomène de réciprocity dose-réaction mis en évidence.

Il apparaît donc que, ni la température, ni le pH, ne peuvent constituer, en ambiance tropicale, des facteurs limitants la reproduction sexuée du parasite. En effet, sa tolérance thermique et la gamme étendue de pH dont il s'accommode en font un organisme assez plastique pour se reproduire par voie sexuée dans des substrats aussi divers que les sols, les tissus végétaux parasités ou les débris de culture en voie de décomposition.

En revanche, le caractère inhibiteur de la lumière incite à penser que la production d'oospores, lorsqu'elle se réalise dans la nature, se localise certainement à l'intérieur des tissus ou des sols colonisés et non à leur surface où s'observent généralement les sporulations asexuelles. Cette localisation hypothétique des oospores conduit d'ailleurs à s'interroger sur la façon dont elles germent dans la nature. Il semble en effet, peu probable que la lumière, efficace *in vitro*, puisse aisément atteindre les spores sexuelles à l'abri dans le sol ou les tissus végétaux et il reste donc vraisemblable que d'autres facteurs contribuent, dans les conditions naturelles, à lever la dormance des oospores.

La faiblesse relative des taux de germination obtenus après des périodes d'irradiation assez longues, tendent également à prouver que la lumière, tout au moins dans les conditions où nous l'utilisons, n'est pas un inducteur totalement efficace. A moins que le faible nombre d'oospores entrant en germination ne soit déterminé par des raisons d'ordre génétique. Il faut noter, en effet, que les souches que nous avons utilisées proviennent d'hôtes différents et de régions géographiques éloignées ; leurs génomes sont donc certainement fort dissemblables et il est tout à fait possible que seul un petit nombre de combinaisons géniques, consécutives à la caryogamie, soit viable ; ce qui expliquerait les faibles taux de germination observés.

Pour éclairer ce point des essais sont actuellement en cours ; ils concernent des souches compatibles de *Phytophthora palmivora* de même origine parasitaire et géographique, donc vraisemblablement isogénisées.

Malgré les inconvénients qu'elle comporte, notre méthode permet cependant d'obtenir la levée de dormance des oospores du *Phytophthora palmivora* suivant des pourcentages utilisables pour entreprendre une étude génétique des descendants. Cette technique est la suivante :

- culture à 26° et à l'obscurité des deux confrontants sur milieu Pois gélosé durant 15 jours ;
- exposition des cultures, par le fond de la boîte, au rayonnement d'un tube fluorescent lumière du jour durant 3 semaines, le flux énergétique incident étant de l'ordre de 450 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (environ 1 500 lux) ;
- broyage des cultures, filtration des broyats à 120 puis à 50 μ . Repos des broyats pendant 24 à 48 heures ;
- prélèvement des oospores dans les filtrats sous microscope stéréoscopique à la micropipette et dépôt sur milieu Pois gélosé, avec ou sans 50 p.p.m. de pimafucine selon les risques d'infection ;
- après 24 à 48 heures, les germinations sont prélevées, vérifiées éventuellement sous le microscope et repiquées en tubes ou en boîtes de Petri.

Reçu pour publication en août 1971.

SUMMARY

INFLUENCE OF SOME FACTORS ON THE FORMATION AND GERMINATION OF OOSPORES IN STRAINS OF *PHYTOPHTHORA PALMIVORA* BUTL.

Several physical or physico-chemical factors influence the rate of sexual reproduction in interfertile strains of *Phytophthora palmivora*. Optimal conditions of temperature and medium pH are, for these strains, 22-26°C and pH 5,5-6,0. When light is provided to the cultures, under controlled conditions of energetic flow, the rate of sexual reproduction lessens as a function of the intensity. Short waves radiations are more able to induce this inhibition than long waves ones. As the Bunsen-Roscoe law of reciprocity seems to be relevant, it is possible that sexual reproduction will be under the dependency of a photolabile substance.

Light allows also to break the dormancy in oospores of *Phytophthora palmivora*. Short waves radiations are the most active in this phenomenon. The authors propose a method providing germination rates high enough for genetical studies of *Phytophthora palmivora* or, perhaps, other species.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLACKWELL Elizabeth, 1943. On germinating the oospore of *Phytophthora cactorum*. *Trans. brit. mycol. Soc.*, **26**, 93-103.
- BOCCAS B., 1970. Germination oogonale précoce chez le *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL. *C. R. Acad. Sci. Sér. D*, Paris, **270**, 55-58.
- BRASIER C. M., 1969. The effect of light and temperature on reproduction of two tropical species of *Phytophthora*. *Trans. brit. mycol. Soc.*, **52**, 105-113.
- CHEE K. H., 1969. Hosts of *Phytophthora palmivora*. *Rev. appl. Mycol.*, **48**, 337-344.

- GALINDO A. J., ZENTMYER G. A., 1967. Genetical and cytological studies of *Phytophthora* strains pathogenic to pepper plants. *Phytopathology*, **57**, 1300-1304.
- HARNISH W. N., 1965. Effect of light on production of oospores and sporangia in species of *Phytophthora*. *Mycologia*, **57**, 85-90.
- HARNISH W. N., 1968. Effects of sterols on sexual reproduction of *Phytophthora cactorum*. *Proc. West Va. Acad. Sci.*, **40**, 99-104.
- HUGUENIN B., BOCCAS B., 1970. Étude de la caryocinèse chez le *Phytophthora parasitica* DASTUR. *C. R. Acad. Sci. Sér. D, Paris*, **271**, 660-663.
- KOFFI DONGO, 1971. Étude des interactions entre le *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL. et ses plantes hôtes. Thèse 3^e cycle, Fac. Sci. Orsay, 85 p.
- LEAL J. A., 1965. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*, *Pythium* and *Saprolegnia*. Ph. D. Thesis, Hull Univ., 116 p.
- LEAL J. A., GOMEZ MIRANDA B., 1965. The effect of light and darkness on the germination of the oospores of certain species of *Phytophthora* on some synthetic media. *Trans. brit. mycol. Soc.*, **48**, 491-494.
- MERZ W. G. 1965. Effect of light on species of *Phytophthora* M. S. Thesis, West Va. Univ.
- ROMERO S., GALLEGLY M. E., 1963. Oogonium germination in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **53**, 899-903.
- RONCADORI R. W., 1965. A nutritional comparison of some species of *Phytophthora*. *Phytopathology*, **55**, 595-599.
- SATOUR M. M., BUTLER E. E., 1967. Germination of oospores of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, **57**, 101.
- SMITH K. C., HANAWALT P. C., 1969. Molecular Photobiology. Inactivation and recovery. Academic Press, N. Y., 230 p.
- TIMMER L. W., CASTRO J., ERWIN D. C., BELSER W. L., ZENTMYER G. A., 1970. Genetic evidence for zygotic meiosis in *Phytophthora capsici*. *Amer. J. Bot.*, **57**, 1211-1218.

PLANCHE I

FIG. 1 et 2.

Influence du pH du milieu de culture sur la réalisation de la reproduction sexuée.

Résultats exprimés en pourcentage du nombre d'oospores formées à l'optimum.

FIG. 3 et 4.

Influence de la température sur la reproduction sexuée en milieu PG.

Résultats exprimés en nombre d'oospores par mm³ de milieu.

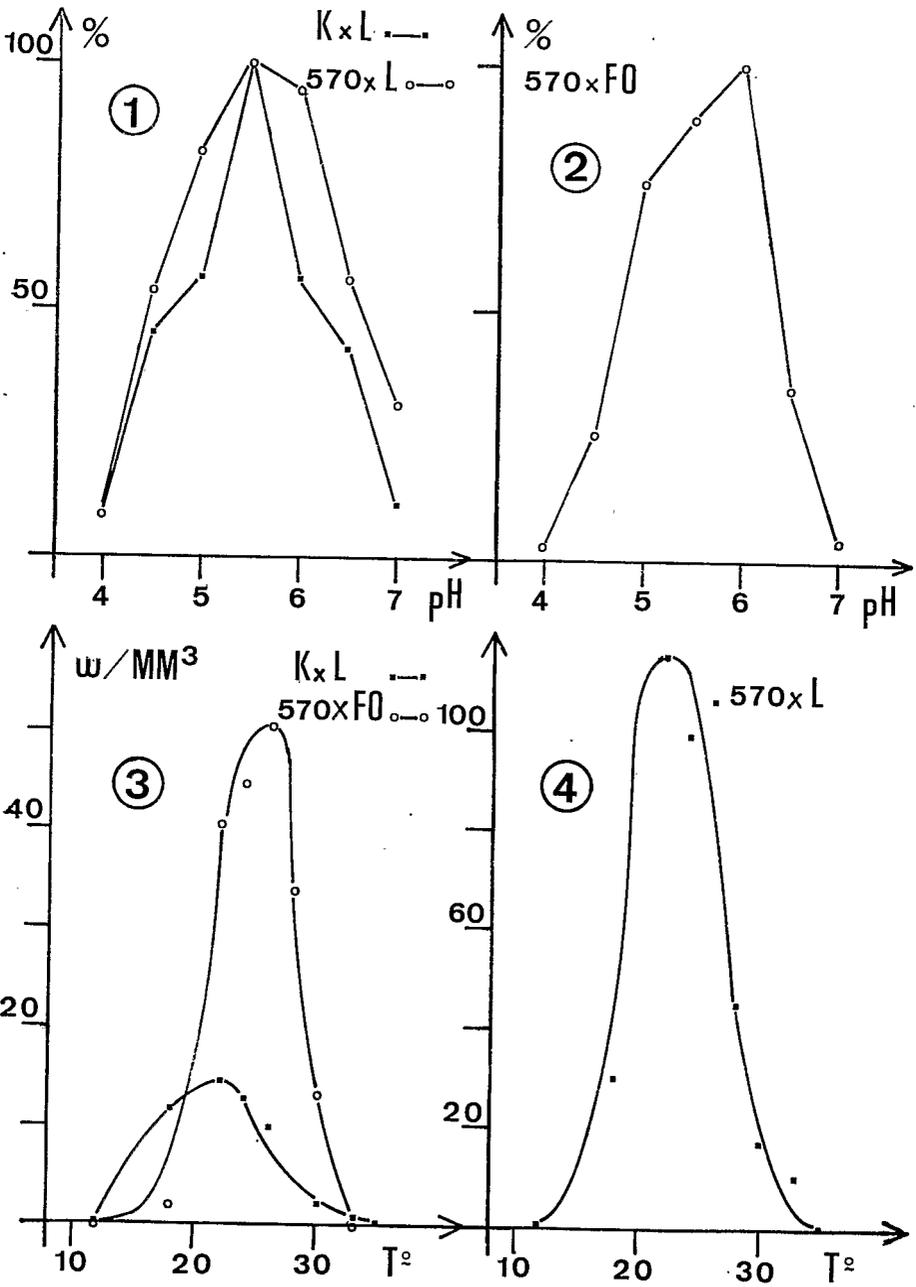


PLANCHE II

FIG. 5.

Formation des organes de reproduction sexuée en milieu pois liquide à l'obscurité.

Courbe T : nombre total d'oospores formées en pourcentage du nombre mesuré à 17 jours.

Courbe J/T : rapport pourcentuel du nombre d'oogones à oospore non différenciée au nombre total d'organes.

FIG. 6.

Formation des organes de reproduction sexuée en milieu gélifié et en fonction de l'irradiation.

Résultats exprimés en pourcentage du nombre d'oospores formées à l'obscurité en fonction de l'inverse de l'intensité lumineuse exprimée en lux. Réponse après 117 et 240 heures de culture.

FIG. 7.

Influence des alternances lumineuses sur la reproduction sexuée.

Résultats exprimés comme pour la figure 6.

FIG. 8.

Influence des rayonnements chromatiques sur la reproduction sexuée.

Résultats exprimés en pourcentage du nombre d'oospores formées à l'obscurité en fonction de la longueur d'onde dominante du rayonnement (exprimée en nanomètre).

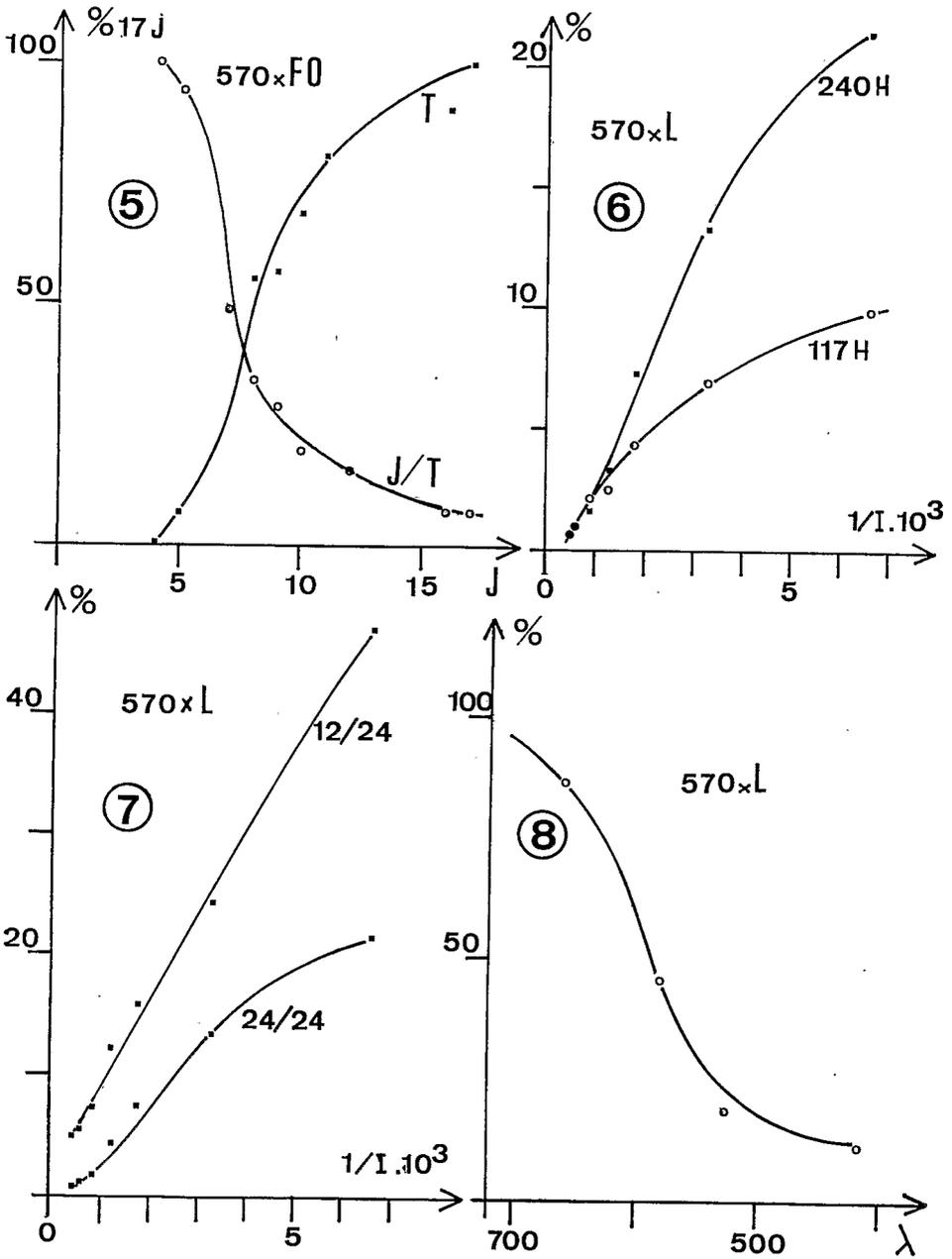


PLANCHE III

FIG. 9.

Germinations sur milieu Pois gélosé.

- Courbe 1 : germinations oogoniales.
Courbe 2 : germinations après exposition à la lumière à 19 jours.
Courbe 3 : germinations après exposition à la lumière à partir du 26^e jour.

FIG. 10.

Germinations sur milieu Pois gélosé.

- Courbe 1 : germinations oogoniales et germinations des oospores maintenues à l'obscurité.
Courbe 2 : germinations des oospores mises en lumière à partir du 7^e jour.
Courbe 3 : germinations des oospores mises en lumière à partir du 28^e jour.

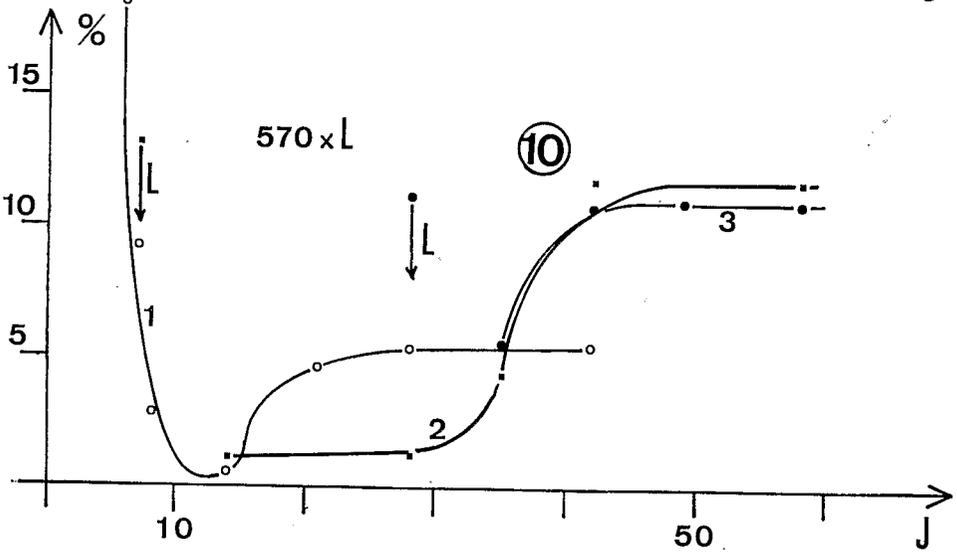
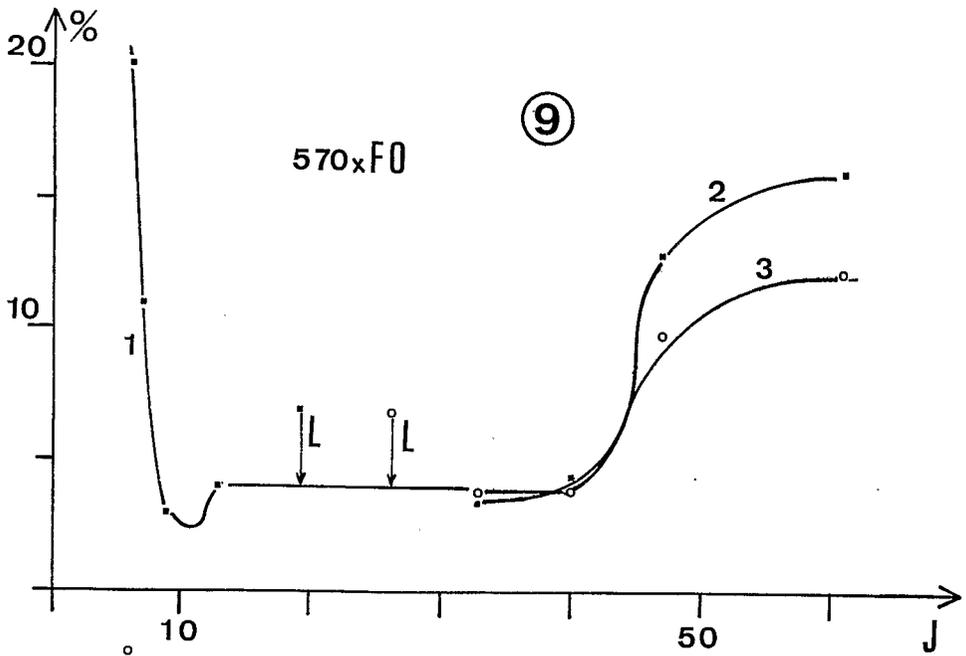


PLANCHE IV

FIG. 11.

Influence sur le taux de germination du temps de prétrempage des oospores.

FIG. 12.

Influence du pH du milieu de germination sur la germination des oospores.

FIG. 13.

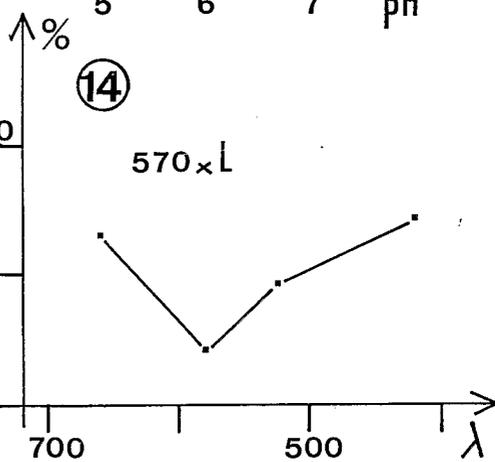
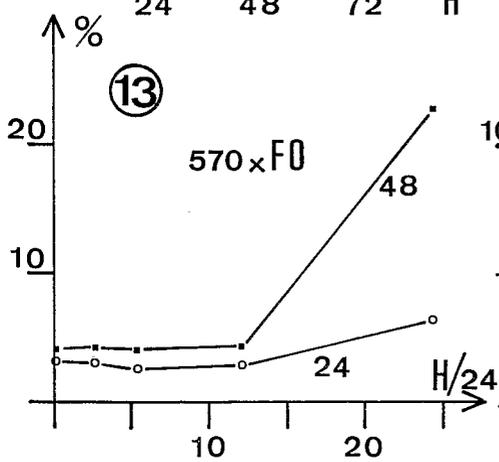
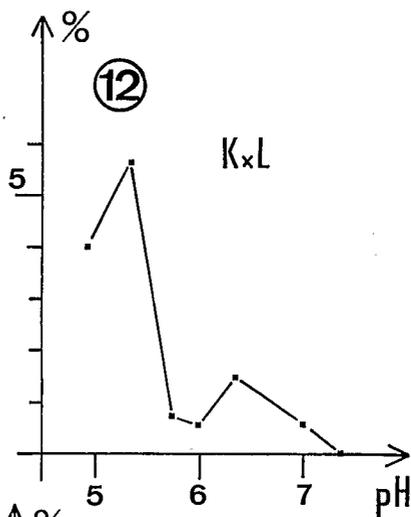
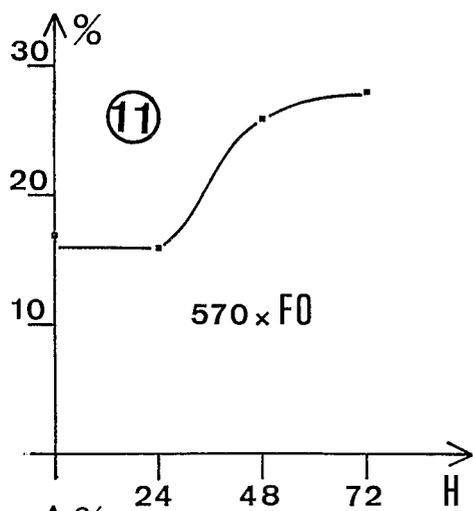
Influence des alternances lumineuses sur la maturation des oospores.

Résultats en pourcentage de germination à 24 et 48 heures en fonction du nombre d'heures de lumière par jour (15 jours obscurité, 4 semaines de lumière 750 lux).

FIG. 14.

Influence de la longueur d'onde sur la maturation des oospores.

Pourcentages de germination en fonction de la longueur d'onde dominante (en nm) du rayonnement utilisé (3 semaines obscurité 10 jours de lumière).



**RÔLE DE QUELQUES FACTEURS DANS LA FORMATION
ET LA GERMINATION DES OOSPORES
CHEZ LE *PHYTOPHTHORA PALMIVORA* BUTL.**

B. HUGUENIN et B. BOCCAS
avec la collaboration technique de P. DIHOULOU

*Laboratoire de Phytopathologie,
Centre de Brazzaville
Office de la Recherche scientifique et technique outre-mer*

Annales de Phytopathologie
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris-7^e

12 MAI 1972

O. R. S. T. O. M.

Collection de Références

n° 5431 Phyto