

**FUSARIUM MONILIFORME DU MAÏS EN NOUVELLE-CALÉDONIE :
RELATIONS HÔTE-PARASITE ⁽¹⁾**

F. PELLEGRIN* (*), F. KOHLER (*), D. LAURENT (*), B. BOCCAS (**)

**FUSARIUM MONILIFORME ON CORN IN NEW-CALEDONIA :
HOST-PARASIT RELATIONSHIP**

Summary

The tracks used by *Fusarium moniliforme* to contaminate corn grains have been studied in two stages:

- The dynamism of contamination of corn seedling all along its growth has been analyzed in the first time.
- Then, after marking with a radioactive precursor, it has been possible to determine the position as well as the progression of the parasite in the host tissues at the various vegetative stages.

Results thus obtained show that corn fusariosis is due to a telluric contamination of seedlings and to a systemic infection characterized by a progressive ascending invasion among the supporting tissues of the stem.

KEY-WORDS: *Fusarium moniliforme* - Corn - Infection - Historadiography.

INTRODUCTION

Fusarium moniliforme est un des contaminants majeurs du maïs récolté en Nouvelle-Calédonie. Après avoir analysé le potentiel toxigène des souches isolées sur les principales zones céréalières du Territoire (10), nous nous sommes interrogés sur les voies empruntées par le parasite pour parvenir jusqu'au grain. Les études ont comporté deux étapes: la première a consisté à analyser la dynamique de l'infection d'un plant de maïs au cours de sa croissance - la seconde a permis de visualiser le parasite, préalablement marqué à l'aide d'un précurseur radioactif, dans les tissus de la plante à différents stades végétatifs.

1 - ETUDE DYNAMIQUE DE L'INFECTION DU SEMIS A LA RECOLTE

Une enquête sur le terrain a mis en évidence qu'en Nouvelle-Calédonie, *Fusarium moniliforme* se comporte en parasite faible ne provoquant que quelques rares lésions superficielles.

(1) Communication présentée aux Vèmes Journées d'Etudes de l'Association A. Tessier, Paris, 25-27 Novembre 1987.

(*) Laboratoire de Phytopathologie, ORSTOM, BP A5, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

(**) ORSTOM, 213, Rue Lafayette, 75480 Paris Cedex 10, France.

154 Les analyses des récoltes montrent que près de 100 % des grains produits sont contaminés. Des isollements systématiques en cours de végétation ont semblé montrer que le parasite progresse dans les plants en partant des racines pour atteindre l'épi, puis le grain (3, 7). Afin de mieux contrôler les facteurs de l'environnement, les études se sont poursuivies en serre.

Matériel et Méthodes

Les plants de maïs sont cultivés en pots, selon le système mis au point par la section d'agronomie de l'ORSTOM. Chaque pot contient 5 kg de terre légère, tamisée. L'alimentation hydrique et nutritive est assurée tout au long du cycle par apport de solutions minérales équilibrées dans la cuvette supérieure et le recyclage régulier des percolats récupérés par la cuvette inférieure ; ce système mettant les plants dans les meilleures conditions d'alimentation hydrique et nutritive.

Pour les besoins de l'expérience, les semences ont été désinfectées par un traitement au formol et la terre stérilisée par autoclavage (6).

L'ensemencement se fait par apport de 10 ml d'un broyat mycélien d'une culture sur milieu liquide de *F. moniliforme*.

A intervalles réguliers, des plants sont sacrifiés et le parasite est recherché dans les tissus internes au niveau de la couronne et de chaque noeud. On procède de la façon suivante : — Le plant est débarrassé de ses feuilles, seuls la tige et les épis sont conservés — La tige est superficiellement désinfectée à l'alcool — Au niveau de chaque noeud, deux tranches d'environ 2 mm d'épaisseur sont découpées, puis déposées dans une boîte de Petri, sur un milieu PDA additionné de pénicilline et de colimycine (100ppm). Ne sont comptabilisés que les noeuds présentant des spots mycéliens symétriques sur les deux tranches — Dans les épis, la recherche du parasite porte sur les tissus internes du rachis et les grains.

Résultats et Discussion

L'ensemble des résultats de cette étude dynamique réalisée en conditions naturelles, ou en serre, après inoculation avec plusieurs souches de *Fusarium* provenant de différentes zones céréalières, permet de proposer une représentation schématique du développement de la fusariose pendant le cycle cultural de la plante (Fig. 1).

Au cours des sept ou huit premières semaines, période pendant laquelle s'effectue l'essentiel du développement végétatif, le parasite n'est isolé qu'au niveau des racines et de la couronne. A partir de la septième ou huitième semaine, période qui correspond en général à la floraison mâle, le parasite est isolé de plus en plus haut dans la tige.

Cette progression s'accomplit en quelques semaines et, semble-t-il, en deux phases :
- Une première phase rapide, de la huitième à la douzième semaine environ, au cours de laquelle le champignon atteint en moyenne le huitième noeud.
- Une seconde phase plus lente, de la douzième semaine à la fin du cycle, pendant laquelle le *Fusarium* est progressivement isolé dans les tissus nodaux de plus en plus proches de l'apex.

Ces travaux tendent à montrer que la voie systémique joue un rôle prédominant comme mode d'infection.

Afin de confirmer ces résultats et de caractériser la présence de *F. moniliforme* dans les tissus du maïs, nous avons utilisé une technique de marquage du parasite pour détecter sa présence dans l'hôte et suivre sa progression.

2 - HISTOLOGIE DE L'INFECTION

Une première tentative de marquage de *F. moniliforme* à l'aide d'un marqueur fluorescent s'est soldée par un échec.

Le champignon en cours de croissance dans un milieu de culture absorbe bien le mar-

queur fluorescent ; après rinçage du mycélium et transfert sur un milieu non marqué, on constate que le marqueur ne migre pas dans les segments mycéliens néoformés.

Une deuxième technique a donc été expérimentée en utilisant un précurseur spécifique marqué au ^{14}C : la thymine. Cette base pyrimidique ne se trouve que dans l'ADN nucléaire, ce qui devrait éviter les diffusions intempestives par l'intermédiaire des ARN ribosomiques, de transferts ou messagers (1, 2, 4, 5, 8).

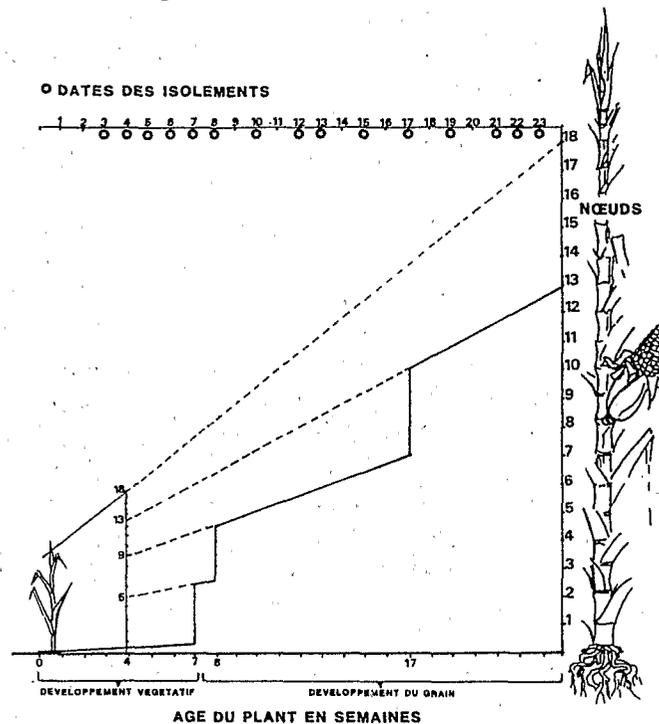


Figure 1 - Dynamique de la colonisation d'un plant de maïs par *F. moniliforme*

Matériel et Méthodes

Différents essais ont montré que la composition du milieu de culture est déterminante pour l'absorption du précurseur radioactif. Le milieu le plus efficace est composé de 10 g de glucose, 0,5 g de sulfate de magnésium, 0,2 g de phosphate monopotassique, 0,1 g de nitrate d'ammonium, pour un litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,9 avec de l'ammoniaque.

Après 10 jours de croissance, *F. moniliforme* incorpore 10 à 20 % de la radioactivité présente dans le milieu.

Les plants de maïs sont cultivés en pots comme précédemment décrit, chaque plant est inoculé à la levée avec un broyat de *Fusarium* contenant 0,25 microcuries sous la forme d'un anneau mycélien cerclant la plantule. Périodiquement, six plants sont sacrifiés :

- Deux sont consacrés à la recherche du parasite sur milieu sélectif Potato - Dextrose - Agar complétement en antibiotiques.
- Deux sont fragmentés noeud par noeud et la recherche de radioactivité est faite sur les aliquotes broyées finement, immergées dans de l'Aquasol II et comptées en scintillation.
- Les deux derniers sont analysés par autoradiographie.

Les fragments de plants (noeuds, tissus du rachis) sont fixés dans du F.A.A. Après rinçage abondant (24 h à l'eau courante), les coupes sont pratiquées et pelliculées sur lame de microscope. Le film radiosensible utilisé est du Kodak AR10, le temps d'exposition en chambre noire est de deux mois avant révélation, fixation et examen au microscope.

Résultats et Discussion

Prélèvement 1: 42 jours de croissance

- Isolements: positifs jusqu'au noeud 3.
- Scintillation: radioactivité supérieure au bruit de fond jusqu'au noeud 4.
- Historadiographie: on observe les traces de radioactivité dans la lumière des vaisseaux du xylème du plateau au noeud 2.

Prélèvement 2: 57 jours de croissance

- Isolements: positifs jusqu'au noeud 6.
- Scintillation: radioactivité supérieure au bruit de fond jusqu'au noeud 5.
- Historadiographie: on obtient des traces radioactives dans le sclérenchyme et le parenchyme du noeud 4.

Prélèvement 3: 77 jours de croissance

- Isolements: positifs jusqu'au noeud 9.
- Scintillation: radioactivité supérieure au bruit de fond jusqu'au noeud 9.
- Historadiographie: on observe la présence de radioactivité dans le plateau ainsi que dans le sclérenchyme et les vaisseaux du xylème du noeud 7.

Prélèvement 4: 140 jours de croissance, ce qui correspond à la maturité des plants.

- Isolements: 3 épis positifs sur 6 prélevés.
- Scintillation: aucun résultat significatif n'a pu être obtenu car le rachis des épis, très lignifié, se prête mal au broyage et entraîne un quenching très important.
- Historadiographie: On descelle de la radioactivité dans le noeud d'attache de l'épi et dans le rachis de l'épi.

Ces résultats montrent une bonne correspondance entre les différentes techniques de mise en évidence de *Fusarium* dans la plante.

Les "traces" de *Fusarium* en historadiographie sont rares, environ 400 coupes ont été observées et nous n'avons décelé la présence de traces radioactives que sur une vingtaine d'entre elles (Figs. 2, 3), toutes cantonnées dans certains tissus de soutien comme le sclérenchyme ou dans un tissu conducteur: le xylème (9).

Cette présence quasi-saprophytique de *F. moniliforme* justifie l'absence de symptômes chez la plante mais suffit à expliquer la colonisation des grains puisque, à maturité, des traces de radioactivité se retrouvent dans les épis.

CONCLUSION

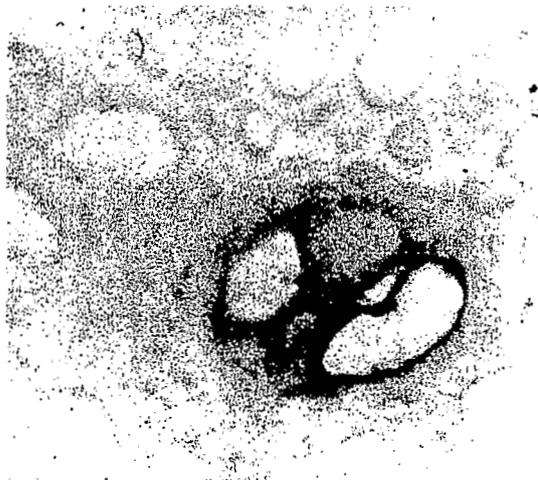
La dynamique d'invasion des plants de maïs par *F. moniliforme*, confirmée par l'étude de l'histologie de l'infection, qui révèle la progression du parasite dans son hôte pendant le cycle végétatif au travers des tissus de soutien jusqu'à l'épi, semble prouver que la fusariose du maïs relève d'une contamination tellurique des plantules et d'une infection systémique classique caractérisée par une invasion progressive et ascendante des tissus de la tige.

En zone subtropicale, le taux d'humidité des grains à la récolte est rarement inférieur à 16-18%. Il est évident que de pareilles conditions ne peuvent que favoriser le développement du parasite sur les récoltes stockées en silo et, par voie de conséquence, la production de toxines.

Différentes méthodes de prévention sont envisageables comme le séchage des récoltes à des taux d'humidité inférieurs à 14 % ou le stockage en silo sous atmosphère inerte ou contrôlée; mais ces méthodes sont onéreuses et les recherches doivent s'orienter vers la sélection de variétés de maïs résistantes ou tolérantes empêchant la contamination des grains avant la récolte.



2



3

Figures 2 et 3 - Historadiographie de coupes transversales de plants de maïs contaminés par *F.moniliforme* marqué au ^{14}C
Fig. 2 : grossissement 420 \times — Fig. 3 : grossissement 840 \times

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ANGELIER N., BOUTEILLE M., CHARRET R., CURGY J.J., DELAIN E., FAKAN S., GEUSKEN M., GUELIN M., LACROIX J.C., LAVAL M., STEINER G., VAN ASSEL S. - Detection of nucleic acid by means of ultrastructural autoradiography. *J. Microscopie Bio. Cell.*, 1976, **27**, 215-230.
- (2) BERNIER G., BRONCHART R. - Application de la technique d'historadiographie à l'étude de l'incorporation de thymidine tritiée dans les méristèmes caulinaires. *Bull. Soc. Royale Sciences Liège*, 1963, **32** (3-4), 269-283.
- (3) BOLKAN H.A., DIANESE J.C., CUPERTINO F.P. - Survival and colonisation potential of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in soil. *Phytopathology*, 1979, **69** (12), 1298-1301.
- (4) BOYD G.A. - Autoradiography in biology and medicine, Academic Press Inc. Publ., New-York, 1955.
- (5) CALAS A - La radiographie et ses applications en biologie, Rapport CNRS, 1978.
- (6) DANIEL B.A. - Elimination of *F. moniliforme* from corn seed. *Plant Disease*, 1983, **67** (6), 609-611.
- (7) FOLEY D.C. - Systemic infection of corn by *F. moniliforme*. *Phytopathology*, 1962, **52**, 970-872.
- (8) KULIGOWSKI-ANDRES J., TOURTE Y. - Première étude, par autoradiographie, de la fécondation chez une Ptéridophyte. *Biol. Cellulaire*, 1978, **31** (1), 101-108.
- (9) LAWRENCE E.B., NELSON P.E., AYERS J.E. - Histopathology of sweet corn seed and plants infected with *F. moniliforme* and *F. oxysporum*. *Phytopathology*, 1981, **71** (4), 379-385.
- (10) PELLEGRIN F., LAURENT D., KOHLER F., HAMEURT J., BOCCAS B. - Potentiel toxicogène des souches de *F. moniliforme* parasitant le maïs en Nouvelle-Calédonie. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 1986, **4**, 157-161.