

panlu ds HZ

NATURE DU CYCLE VÉGÉTATIF
DES *PHYTOPHTHORA PARASITICA* DASTUR
ET *PALMIVORA* (BUTLER) BUTLER

Françoise LE GRAND-PERNOT et F/PELLEGRIN *
avec la collaboration technique de Léontine DUTFOY et Françoise GRISOLLET

*Laboratoire de Cryptogamie, Bâtiment 402, Université de Paris-Sud,
91405 Orsay. Associé au C. N. R. S.-L. A. 115*

* Centre O. R. S. T. O. M. de Brazzaville,
B.P. 181, République populaire du Congo

RÉSUMÉ

Le degré de ploïdie des noyaux végétatifs, non clairement déterminé jusqu'à présent chez tous les *Phytophthora*, est recherché plus particulièrement chez *P. palmivora* et *P. parasitica*. L'action des rayonnements γ sur les zoospores, et la mesure, par microspectrophotométrie, de l'ADN nucléaire de ces mêmes spores et des noyaux mycéliens, sont les deux voies expérimentales utilisées. Les résultats sont discutés, la nature diploïde du cycle est démontrée.

INTRODUCTION

Chez les champignons appartenant au genre *Phytophthora*, le degré de ploïdie des noyaux végétatifs n'a pas toujours été clairement démontré à la suite d'études cytologiques ou génétiques. SANSOME et HARRIS (1962) chez *P. cactorum*, GALINDO et ZENTMEYER (1967) chez *P. drechsleri*, HUGUENIN et BOCCAS (1970) chez *P. parasitica*, SANSOME et BRASIER (1973) chez *P. infestans*, BRASIER et SANSOME 1975 chez *P. cinnamomi*, *P. infestans*, *P. drechsleri*, MAIA et al. (1976) chez *P. capsici* ont apporté des preuves cytologiques convaincantes en faveur d'un cycle diploïde. Ils ont reconnu formellement des associations chromosomiques typiquement méiotiques dans les oogones et les anthéridies ; seul le nombre des bivalents reste incertain.

Des approches génétiques chez les espèces homothaliques telles que *P. cactorum* (BUDDENHAGEN, 1958; ELLIOT et MAC INTYRE, 1973) et *P. seringae* (BOCCAS, 1972) corroborent cette hypothèse. Chez les espèces hétérothaliques, l'interprétation des résultats génétiques reste délicate; en effet, la nature génétique des marqueurs

Fonds Documentaire IRD



010024306

Fonds Documentaire IRD

Cote: Bx 24306 Ex: Unique

utilisés n'est pas toujours certaine ; de plus, la distinction entre les produits d'auto-fécondations et d'hybridations n'est pas toujours possible. Le cycle serait diploïde chez *P. drechsleri* selon SHAW et KHAKI (1971), SHAW *et al.* (1973), et chez *P. palmivora* selon BOCCAS (1971). Chez *P. infestans* (LAVIOLA, 1969 ; GALLEGLY, 1970) et chez *P. capsici* (TIMMER *et al.*, 1970) la phase haploïde serait au contraire prépondérante.

P. parasitica DASTUR et *P. palmivora* (BUTLER) BUTLER sont deux espèces parasites de nombreuses plantes cultivées en zones tropicales. La mise au point de stratégies de lutte génétique contre ces agents pathogènes est liée à une connaissance précise de leur biologie, et en particulier de leur cycle.

Deux études complémentaires ont été entreprises afin d'y parvenir. La première utilise l'effet biologique des rayonnements γ sur les zoospores : on l'exprime par l'établissement d'une courbe de survie des spores irradiées en fonction des doses reçues. Il a été démontré (KORODIN, 1958 ; KORODIN et LUCNICK, 1960 ; MARCOVICH, 1963) que la nature de cette courbe dépend de l'état nucléaire des cellules traitées. On obtient une exponentielle lorsqu'un seul lot chromosomique non répliqué est présent, et une sigmoïde dans les cas contraires, c'est-à-dire, soit après la duplication du génome haploïde (phase G₂), soit lorsque la cellule possède un niveau de ploïdie supérieur à un.

La seconde permet de préciser à quel moment intervient la duplication de l'ADN des noyaux dans les zoospores. Une quantité moyenne d'ADN par noyau des zoospores et du mycélium est évaluée. Ces mesures font appel à des techniques cytophotométriques couramment employées chez les végétaux chlorophylliens (HALLET, 1972 ; LE COQ, 1972 ; LANDRE, 1976), mais d'adaptation délicate chez les champignons ; elles n'ont été utilisées jusqu'à présent que chez *Saprolegnia terrestris* (BRYANT et HOWARD, 1969) et chez *Apodachlya brachynema* (HOWARD et BRYANT, 1971) ; leur application chez *P. parasitica* et *P. palmivora* doit permettre de compléter les informations obtenues par l'action des rayons γ sur les zoospores.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Obtention de zoospores

Les souches utilisées ici proviennent de la mycothèque de l'O.R.S.T.O.M. à Brazzaville (Rép. pop. Congo). Il s'agit chez *Phytophthora palmivora* de la souche 570, isolée de l'Oranger au Congo et appartenant au groupe de compatibilité A 1, et de la souche L, isolée de l'Aubergine en Côte d'Ivoire et appartenant au groupe de compatibilité A 2. Chez *Phytophthora parasitica*, il s'agit de la souche AN 458, isolée de l'Ananas et semblant appartenir au groupe de compatibilité A 2.

Les champignons sont cultivés une dizaine de jours en fiole de Roux sur décoction de pois, à raison de 100 g/l de broyat de petits pois (en boîte), dans une chambre obscure réglée à 26°C et 60 p. 100 d'humidité relative. Après cette incubation, et pour induire la formation des sporocystes, le mycélium est rincé deux fois dans l'eau stérile, essoré, réhumecté en boîte de Petri et enfin exposé 48 heures à la lumière émise par des tubes fluorescents du type « lumière du jour », dans les conditions normales de culture. Les zoospores se différencient après immersion totale du mycélium sous eau stérile pendant 30 min à 2°C ; leur libération est provoquée après un retour accéléré à température ambiante, grâce à une exposition des baffes 30 min sous éclairage violent.

pagne d'une augmentation proportionnelle de l'effet biologique, qui se traduit par une diminution du taux de survie des cellules traitées.

Si les noyaux possèdent un seul lot d'ADN, un événement unique suffit pour provoquer la mort d'une cellule ; la courbe obtenue est exponentielle. En revanche, si les noyaux contiennent plus d'un lot d'ADN, plusieurs cibles doivent être détruites pour entraîner la mort d'une cellule ; la courbe obtenue présente alors un plateau aux faibles doses, c'est une sigmoïde.

Technique :

Pour chacune des trois souches L, AN 458, 570, on recueille une suspension de zoospores ; on vérifie au microscope en contraste de phase leur état uninucléé ainsi que leur non agrégation entre elles. De nombreux exemples dans la littérature (CASTRO, 1963, GRAHAM, 1954, Mac KEE, 1963 et MARKS, 1965) confirment l'état uninucléé des zoospores de *Phytophthora*. La suspension mère, dont le contenu en zoospores est évalué à la cellule de Thoma, est diluée en tube à essai dans du milieu pois, pour obtenir une gamme de concentration dont chacun des éléments recevra une dose d'irradiation déterminée. Cette expérience débute quelques minutes après la libération des zoospores et dure au maximum deux heures.

Afin de dénombrer facilement les spores irradiées survivantes, nous avons recherché un milieu de culture favorisant la formation de thalles compacts dès la germination des spores. Ceci nous a conduit à utiliser le milieu de BOCCAS modifié (5 fois moins de glucose et absence de stérols).

Technique de mesure de l'ADN nucléaire des noyaux végétatifs

Les noyaux sont colorés par la méthode de Feulgen ; l'intensité de la coloration, proportionnelle à la quantité d'ADN, est mesurée *in situ* par cytophotométrie. Les mesures sont effectuées

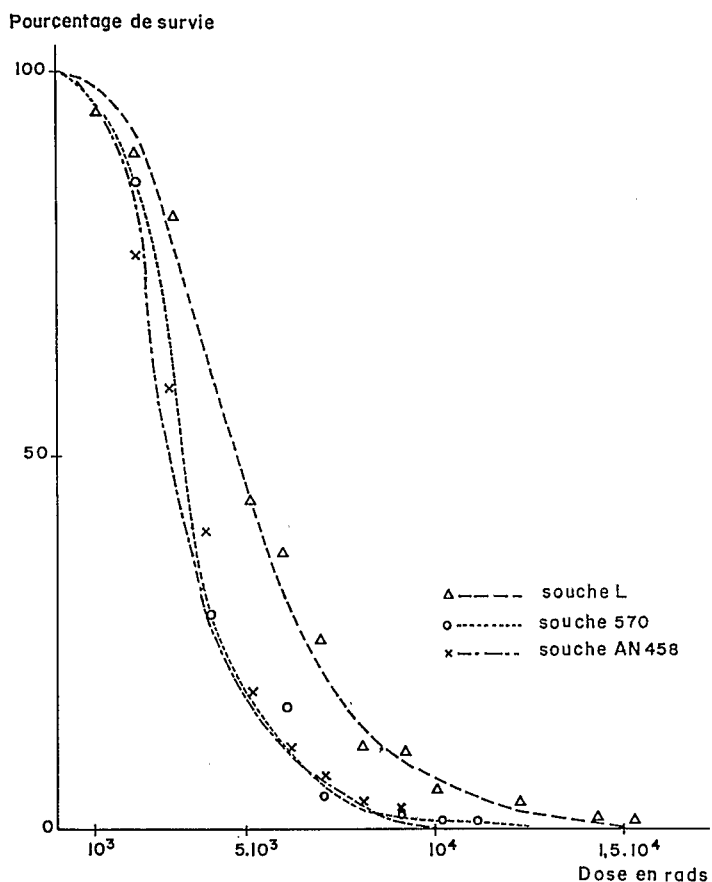


FIG. 1. — Courbes de survie des zoospores, en fonction de la dose de rayons γ reçue chez trois souches de *Phytophthora* (représentation en coordonnées normales)

*Survival curves of zoospores, according to the dose of γ rays received by three strains of *Phytophthora* (normal coordinate representation)*

L'analyse de variance, test de l'hétérogénéité des moyennes, montre que celles-ci sont différentes d'une façon très hautement significative. Le test « F maximum » d'homogénéité des variances montre que celles-ci sont homogènes au seuil de 1 p. 100 ce qui prouve que si l'irradiation modifie la valeur des moyennes, elle ne modifie pas leur variabilité.

Pour démontrer la nature sigmoïde de la courbe de survie (souche L), on compare par l'intermédiaire du test « t » modifié, le nombre moyen de spores vivantes chez le témoin et chez les deux premiers échantillons (c'est-à-dire lorsque les zoospores ont reçu 1 000 et 2 000 rads). Si la différence entre les deux moyennes extrêmes (témoin et échantillon 2) est inférieure à une valeur, seuil D, calculée à partir de la formule (1), il n'y a pas de différence significative entre ces moyennes.

Formule (1) :

$$D = t_{n, k'}^{(1 \text{ p. } 100)} \cdot \frac{\text{Variance résiduelle}}{\bar{x}}$$

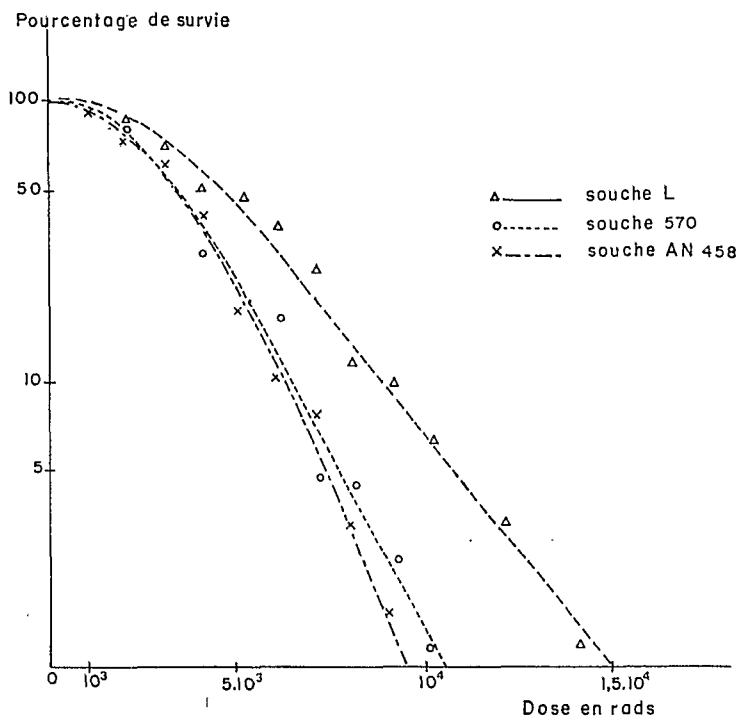


FIG. 2. — Courbes de survie des zoospores, en fonction de la dose de rayons γ reçue, chez trois souches de *Phytophthora* (représentation en coordonnées semi-logarithmiques)
*Survival curves of zoospores, according to the dose of γ rays received by three strains of *Phytophthora* (half-logarithmic coordinate representation)*

Avec :

n = d.d.l. de la variance résiduelle.

k' = Nombre de moyennes séparant les 2 moyennes que l'on compare, augmenté de 2 unités.

x = Nombre d'étalements pour chaque échantillon.

Pour la souche L, la différence des moyennes extrêmes est inférieure à la valeur seuil D (7,31). Puisque les trois premiers points de la courbe ne sont pas significativement différents, la courbe de survie des zoospores possède un plateau supérieur, c'est donc bien une sigmoïde. Par conséquent plusieurs événements sont nécessaires pour entraîner la mort d'une cellule (MARCOVICH, 1963). Ces zoospores ne sont donc pas des cellules haploïdes dont l'ADN n'est pas encore dupliqué.

Mesures au microspectrophotomètre

Les études ont été principalement menées chez la souche AN 458. Les mesures des noyaux végétatifs de zoospores et du mycélium, faites au microspectrophotomètre, sont rassemblées dans les histogrammes (fig. 3 A, 3 B, 3 C, 3 D). Lorsque les zoospores sont traitées juste après leur libération des sporocystes, les valeurs en

unités arbitraires d'ADN des 59 noyaux mesurés (fig. 3 A) sont peu dispersées autour de la moyenne calculée (451 uA-d'ADN). Cette courbe est bien unimodale : on est en présence d'un seul type nucléaire. Si l'on compare ces résultats à ceux de la figure 3 B, où les noyaux mesurés proviennent de zoospores traitées 2 heures après leur libération, la courbe est toujours unimodale, mais elle est très légèrement décalée et étalée vers les valeurs supérieures ; néanmoins, la valeur moyenne de 467 uA-d'ADN, calculée sur 75 noyaux, n'est pas significativement différente de la précédente. Ces très légères modifications sont vraisemblablement dues à quelques noyaux qui ont déjà pu se dupliquer. La confirmation nous en est apportée, lorsque nous étudions la figure 3 C qui regroupe les mesures de noyaux de zoospores traitées 4 heures après leur libération des sporocystes. Cette fois-ci, la courbe est totalement étalée et plurimodale, et il est vain, dans ces conditions, de calculer une valeur moyenne. Alors que chez certains noyaux la quantité d'ADN est restée la même (noyaux en phase G 1), pour d'autres, il apparaît que la duplication de leur ADN est terminée (noyaux en phase G 2).

A l'aide des mesures au spectrophotomètre et des observations microscopiques, nous pouvons conclure que des noyaux ont déjà, au bout de 4 heures, terminé un cycle de division. En effet, certaines zoospores germées possèdent un noyau dans la zoospore même et l'autre à l'extrémité de l'hyphe germinative. La valeur moyenne d'uA-d'ADN de ces noyaux est de 440 ; ils sont ainsi revenus à un taux simple d'ADN : le noyau originel s'est donc bien divisé. Nous avons pu constater dans 2 cas sur 78, que le noyau situé encore dans la zoospore en germination contenait une quantité double d'ADN (920 et 890 uA-d'ADN) par rapport à celle du noyau engagé dans le tube germinatif : un deuxième cycle de division a donc débuté. De la même façon, chez *Phytophthora capsici* (MAIA, 1976), le noyau originel de la zoospore se divise deux fois, et un seul noyau fils s'engage dans le tube germinatif, à la suite de la première division.

En résumé, les zoospores restées, après leur libération, 4 heures en suspension dans l'eau stérile et à température ambiante, se retrouvent en majorité en phase G 1 ou G 2 de première division, mais un petit nombre est déjà en phase G 2 de deuxième division. Cette hétérogénéité explique facilement l'étalement de la courbe (fig. 3 C).

Le dernier histogramme (fig. 3 D) rassemble les mesures faites sur les noyaux mycéliens. Alors que les noyaux des zoospores sont de taille voisine et de forme régulière, ceux du mycélium sont, le plus souvent, de forme et de taille variées ; ils rendent les mesures plus difficiles, ce qui explique notamment le décalage de la courbe vers des valeurs inférieures à celles trouvées chez les zoospores (fig. 3 A et 3 B).

La comparaison des histogrammes des figures 3 A et 3 D montre que l'ensemble des noyaux des zoospores à « l'émission » se comporte comme la majorité des noyaux mycéliens. Les quelques noyaux mycéliens échappant à cette courbe sont des noyaux contenant une quantité double d'ADN. Chez *Saprolegnia terrestris*, BRYANT et HOWARD (1969) ont observé qu'environ 10 p. 100 des noyaux mycéliens sont en phase G 2 ; ce sont à peu près les mêmes proportions que nous retrouvons ici.

La majorité des noyaux mycéliens se trouvent dans le même état nucléaire que les noyaux des zoospores juste après leur libération des sporocystes. Comme nous avons pu démontrer que les noyaux des zoospores dupliquent leur quantité d'ADN

FIG. 3 A

*Zoospores fixées et colorées
dès leur libération des sporocystes*

A ce stade, l'ensemble des zoospores est uninucléé et
n'a pas encore émis de tube germinatif

*Zoospores fixed and stained
just after their liberation to the sporangia*

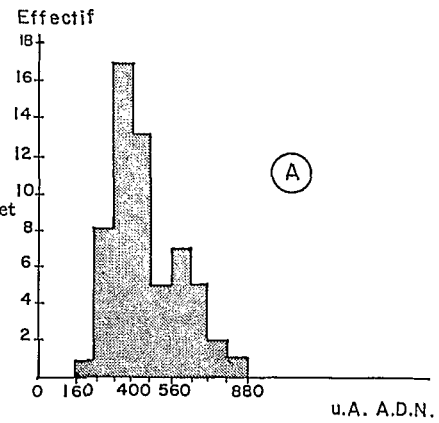


FIG. 3 B

*Zoospores fixées et colorées
deux heures après leur libération des sporocystes*

Un examen cytologique rapide permet d'observer les
zoospores non germées qui possèdent un seul noyau

*Zoospores fixed and stained
two hours after their liberation from sporangia*

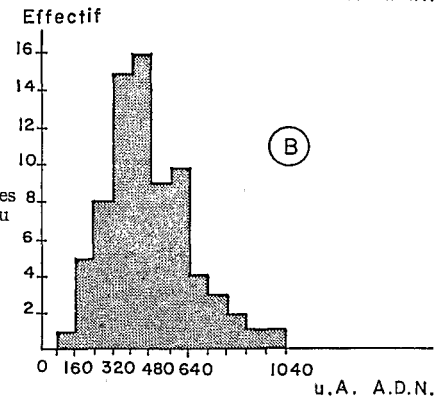


FIG. 3 C

*Zoospores fixées et colorées
quatre heures après leur libération des sporocystes*

La majorité des zoospores ($>3/4$) sont uninucléées :
soit parce qu'elles n'ont pas débuté leur germination,
soit parce qu'elles ont déjà émis une « pustule »
germinatrice; d'autres zoospores ($<1/4$) ont émis un
tube germinatif et présentent deux noyaux.

*Zoospores fixed and stained
four hours after their liberation from sporangia*

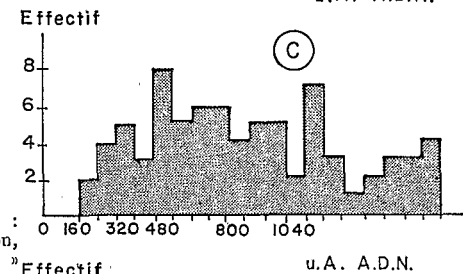
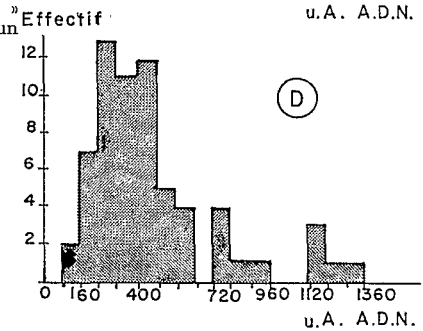


FIG. 3 D

*Noyaux mycéliens
Nuclei in hyphae*



*Histogramme de la quantité arbitraire d'ADN des noyaux végétatifs
(zoospores et mycelium) de la souche AN 458 de Phytophthora parasitica*
Histogram of DNA content (in arbitrary units) in nuclei

au moins deux heures après leur émission, nous pouvons conclure que la plupart des noyaux mycéliens, qui ne sont pas en phase duplicative, ont le même degré de ploïdie que les zoospores à « l'émission ». A l'aide de l'interprétation des courbes de survie des zoospores traitées aux rayons γ juste après leur émission, c'est-à-dire en phase non duplicative, nous pouvons identifier la nature du cycle biologique chez les *Phytophthora* étudiés.

Pour les souches 570 et I, une dizaine des noyaux de zoospores ont été mesurés de façon identique. Les résultats sont les mêmes que ceux obtenus pour la souche AN 458.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La courbe de survie des zoospores irradiées quelques minutes à 2 heures après leur libération étant de nature sigmoïde, elle nous permet d'établir que les noyaux de ces zoospores possèdent plus d'un lot d'ADN. Ces résultats conduisent à deux hypothèses: soit une duplication précoce du matériel nucléaire intervient lors de la formation ou de la libération des zoospores, soit une duplication tardive s'effectue dans les zoospores encystées âgées d'au moins 2 heures. Dans ce dernier cas, elles sont forcément diploïdes. Les études faites en microspectrophotométrie nous montrent que les zoospores se dupliquent tardivement; elles sont donc obligatoirement en phase G 1 tout au long du traitement par les rayons γ . La courbe sigmoïde alors obtenue, courbe dite à 2 coups, est due à l'état diploïde des zoospores. L'identité des noyaux des zoospores et du mycélium, reconnue par la dernière expérience, permet d'établir avec certitude la nature diploïde du cycle végétatif chez *Phytophthora palmivora* et *P. parasitica*. La phase haploïde est courte et se trouve localisée au sein des oogones et des anthéridies: la notion de méiose zygotique est donc à rejeter chez ces espèces.

Reçu pour publication en novembre 1976.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Messieurs LE COQ et GUERVIN qui nous ont initiés avec patience et efficacité au maniement du microspectrophotomètre.

SUMMARY

NATURE OF VEGETATIVE CYCLE IN *PHYTOPHTHORA PARASITICA* DASTUR AND *PALMIVORA* (BUTLER) BUTLER

Up to now, neither cytological nor genetical studies have clearly demonstrated the « ploidy » degree of somatic nuclei in different species of *Phytophthora*. Two complementary studies, using biological effect of γ rays upon zoospores, and microspectrophotometric techniques measuring relative amount of DNA by nucleus in zoospores or in hyphae, allowed to demonstrate diploid nature of the vegetative phase in *P. palmivora* (BUTLER) BUTLER and *P. parasitica* DASTUR cycles.

Zoospores of three different strains, are irradiated at different doses of γ rays immediately after their discharge from sporangia. All the irradiations are performed in less than up to two hours and it is possible to draw a survival curve of the irradiated zoospores. This curve in normal

coordinates is a sigmoid (fig. 1); its representation in semi-logarithmic coordinates (fig. 2) exhibits an upper plateau which is statistically significant. With this first results we can exclude the occurrence of truly haploid nuclei in which DNA is not duplicated yet. But two hypothesis are still possible: either zoospores before their irradiation have haploid nuclei in which DNA is duplicated, or zoospores are diploid. In order to know when this DNA duplication begins in zoospores, we used spectrophotometric techniques. Zoospores taken a few minutes, two hours and four hours after their discharge from sporangia and hyphal fragments are gathered upon « polyvic » Millipore filter. The nuclei are fixed twenty minutes in Farmer's fixative, hydrolysed for twenty minutes in 5N HCl at room temperature, and stained two hours in Schiff's base. The intensity of the stain, proportional to the quantity of DNA is measured by microspectrometry. Each nucleus is characterised by a number of arbitrary units of DNA. The measurements for zoospore and hyphal nuclei are shown in histograms (fig. 3 A, 3 B, 3 C, 3 D). The comparison of the three first histograms (3 A, 3 B, 3 C) indicates that the nuclear DNA of zoospores duplicates at least two hours after spore discharge from sporangia. Zoospore nuclei « at discharge » (fig. 3 A) behave like most of the hyphal nuclei (fig. 3 D). Therefore, the former — not being duplicating their genetic material — have the same « ploidy » level as the latter.

If we consider: 1) the sigmoid shape of the survival curve of zoospores irradiated between a few minutes and up to two hours after discharge; 2) the late duplication of DNA in zoospore nuclei, then the zoospore nucleus must be diploid.

The fact that nuclei in zoospores at discharge and in vegetative hyphae are identical,

- LE COQ Cl., 1972. La mégasporogénèse chez l'*Iris pseudacorus* L. II. Étude cytologique quantitative. *Rev. Cytol. Biol. veg.*, 33, 303-330.
- MC KEE, 1963. 54^e Annual report John Innes Institutes.
- MAIA Nicole, VENARD P., LAVRUT Françoise, 1976. Études des divisions mitotiques et méiotiques du cycle de *Phytophthora capsici*. *Ann. Phytopathol.*, 8 (2), 141-146.
- MARCOVICH H., 1963. Aspects quantitatifs de l'action biologique des radiations ionisantes. Techniques de laboratoire. Masson et Cie. Tome II, 532-544.
- MARKS G. E., 1965. The cytology of *P. infestans*. *Chromosoma*, 16, 681-692.
- MENDELSON M. L., 1966. Introduction to quantitative cytochemistry. 201-214, Wied' G.'L. Academic Press. New York.
- SANSOME E., 1961. Meiosis in the oogonium and antheridium of *Pythium debaryanum* HERSE. *Nature*, 191, 827.
- SANSOME E., HARRIS B. J., 1962. Use of Camphor-induced polyploidy to determine the place of Meiosis in fungi. *Nature*, 196, 291-292.
- SANSOME E., 1965. Meiosis in diploid and polyploid sex organs of *Phytophthora* and *Achlya*. *Cytologia*, 30, 103-117.
- SANSOME E., BRASIER C. M., 1973. Diploidy and chromosomal structural humidity in *Phytophthora infestans*. *Nature*, 241, 344-345.
- SMITH D. S., KILBY I. A., 1977. Genetical evidence for diploidy in *Phytophthora*. *Genet. Res.*