

RAPPORT DE STAGE 1959

ETUDE DE LA CERCOSPORIOSE DE L'ARACHIDE

La cercosporiose de l'Arachide est provoquée par deux champignons : Cercospora personata (Berk. et Curt.) Ellis et Everhart et Cercospora arachidicola Hori.

De nombreux travaux ont été effectués sur ces deux parasites mais l'examen de la littérature permet de relever un certain nombre de contradictions et laisse des points non étudiés.

Plusieurs questions seront abordées dans ce rapport qui portera surtout sur Cercospora arachidicola.

- A - La culture du champignon en milieu synthétique.
- B - L'étude de différents isoléments monospores.
- C - Essais d'infection à partir d'une culture pure.
- D - L'action des facteurs de croissance sur le développement du champignon.
- E - La germination des spores.
- F - La modification de la composition de la feuille sous l'action du parasite.
- G - Essais d'obtention de cultures de tissus d'Arachide.

A - LE CHAMPIGNON EN CULTURE PURE

La question de la culture des 2 espèces de Cercospora de l'Arachide en milieu synthétique a donné lieu à des travaux contradictoires, certains auteurs comme Jenkins (1) et Miller (2) ayant obtenu des résultats positifs, alors que Roldan et Querijero (5) avaient des résultats négatifs.

I - Isolement du matériel

Des arachides présentant des taches foliaires dues à Cercospora arachidicola ont été récoltées en plusieurs points : Grand Bassam, Assinié, Eboinda, tous ces emplacements étant situés sur le cordon littoral où l'arachide est cultivée par les Africains sur de petites surfaces.

Les feuilles atteintes ont été mises en chambre humide, le pétiole plongeant dans un tube contenant une solution de Knop pour maintenir la survie le plus longtemps possible.

Des conidies se sont développées sur un certain nombre de lésions. Prélevées sous la loupe binoculaire, elles ont été ensemencées en tube contenant un milieu à base de papaye gélosée. Au bout de 5 à 6 jours des colonies sont apparues sous forme de petits points noirs de la taille d'un tête d'épingle.

Ces cultures primaires après plusieurs repiquages ont donné une quantité suffisante de matériel pour permettre une étude morphologique du parasite en culture pure.

2 - Etude du développement des colonies en culture

La croissance du champignon a été suivie sur lames de verre. Sur celles-ci a été déposée une goutte de milieu gélosé à la papaye. Les lames sont placées en boîtes de Petri ; l'humidité est assurée par un coton imbibé d'eau stérile. L'ensemencement est assuré par une goutte de suspension de spores ; les lames sont

examinées au microscope à intervalles réguliers.

- Après 24 heures

Les conidies ont germé et les tubes germinatifs peuvent dépasser la longueur de la spore. La majorité d'entre eux se développe à partir des cellules basale et apicale, plus rarement à partir des cellules du centre de la conidie.

- Après 48 heures

Les tubes germinatifs se sont allongés. Certains commencent à pénétrer à l'intérieur de la gélose. D'autres tubes se sont formés à partir des cellules centrales de la conidie (figure 1).

- Après 3 jours

Les colonies commencent à être visibles à l'oeil nu ; la croissance qui jusqu'ici avait été superficielle, se fait aussi en épaisseur. La figure 2 montre l'aspect du mycélium de la jeune colonie.

- Après 4 jours

La colonie est bien développée et les premières conidies sont visibles.

3 - Milieux de culture utilisés

Des essais de mise en culture ont été réalisés avec un certain nombre de milieux gélosés : riz, pomme de terre, maïs, papaye, Sabouraud, Maltea.

Sur tous ces milieux, la culture s'est avérée possible. Les colonies provenant d'un ensemencement réalisé à partir d'un frottis sont visibles à partir de 2 à 3 jours.

Un essai a été réalisé à partir d'un milieu de Czapeck gélosé. La culture a pu être réalisée ; cependant la croissance est beaucoup plus lente que dans les essais précédents. Les colonies ne sont visibles que 5 à 6 jours après l'ensemencement.

Pour des raisons de commodité toutes les souches utilisées ont été entretenues sur milieu de papaye gélosée.

Figure 1

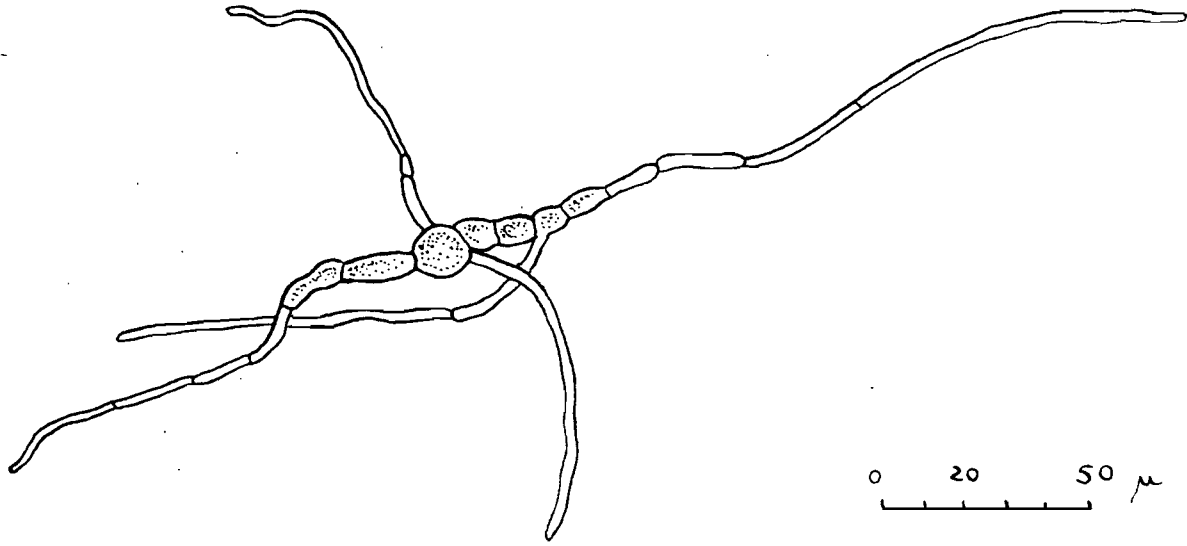
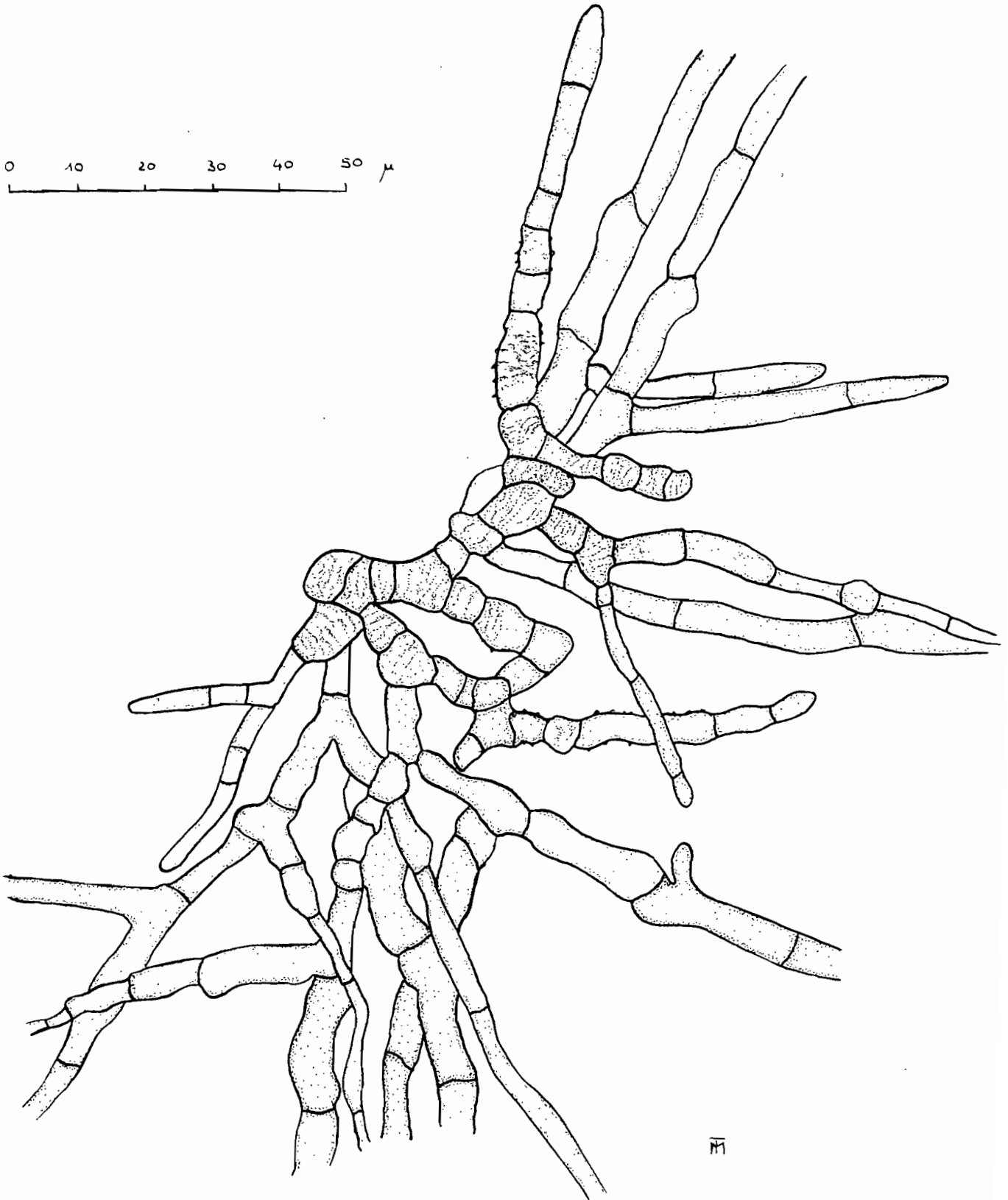


Figure 2



4 - Aspect des colonies adultes

Macroscopiquement elles présentent l'aspect de petites sphères pouvant atteindre plusieurs millimètres de diamètre ; elles sont à demi immergées dans le milieu de culture ; elles sont hérissées de filaments mycéliens dressés (photo 1 colonie jeune, photo 2 colonies âgées de 12 jours).

Une coupe dans ces colonies permet de distinguer 3 zones principales : (figure 3)

- une zone interne formée de filaments bruns qui se développent à l'intérieur de la gélose et peuvent être assimilés à des filaments nourriciers.

- une zone moyenne se développant à l'extérieur de la gélose et formée par un mycélium brun d'aspect plus ou moins moniliforme (figure 4).

- une zone externe formée de filaments dressés de couleur plus claire (hyalins à subhyalins). C'est la zone fertile. Parmi ces filaments érigés, certains vont jouer le rôle de conidiophores bien qu'ils ne soient pas différents des autres filaments et vont porter les conidies (photo 3).

5 - Essais d'amélioration de la croissance du champignon en culture

Nous voyons que la croissance de Cercospora arachidicola reste limitée, un ensemencement réalisé par point ne couvrira pas la surface du milieu fourni. Pour essayer d'améliorer cette croissance, plusieurs essais ont été faits.

a) enrichissement du milieu

Cet essai a été réalisé en ajoutant au milieu à base de papaye soit un mélange de facteurs de croissance (thiamine 10^{-7} - riboflavine 5.10^{-8} - pyridoxine 10^{-7} - biotine 5.10^{-9} - acide panthoténique 5.10^{-7} - inositol 5.10^{-7}), soit du lait de coco à 20 %. L'ensemencement a été réalisé par une suspension spores + fragments de mycélium.

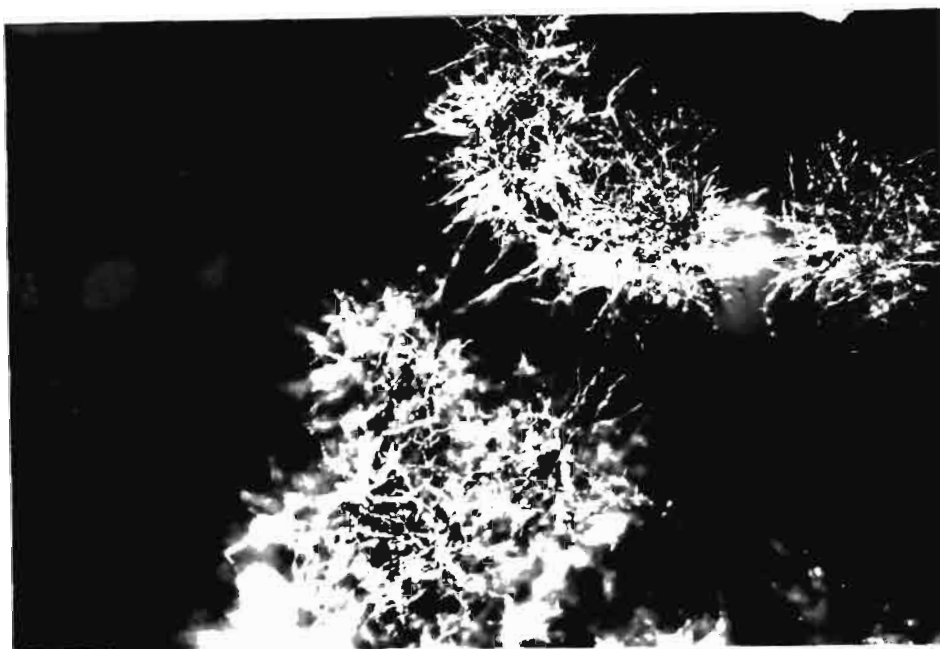


Photo n: 1

0,25 mm



Photo n: 2

1 mm

Figure 3

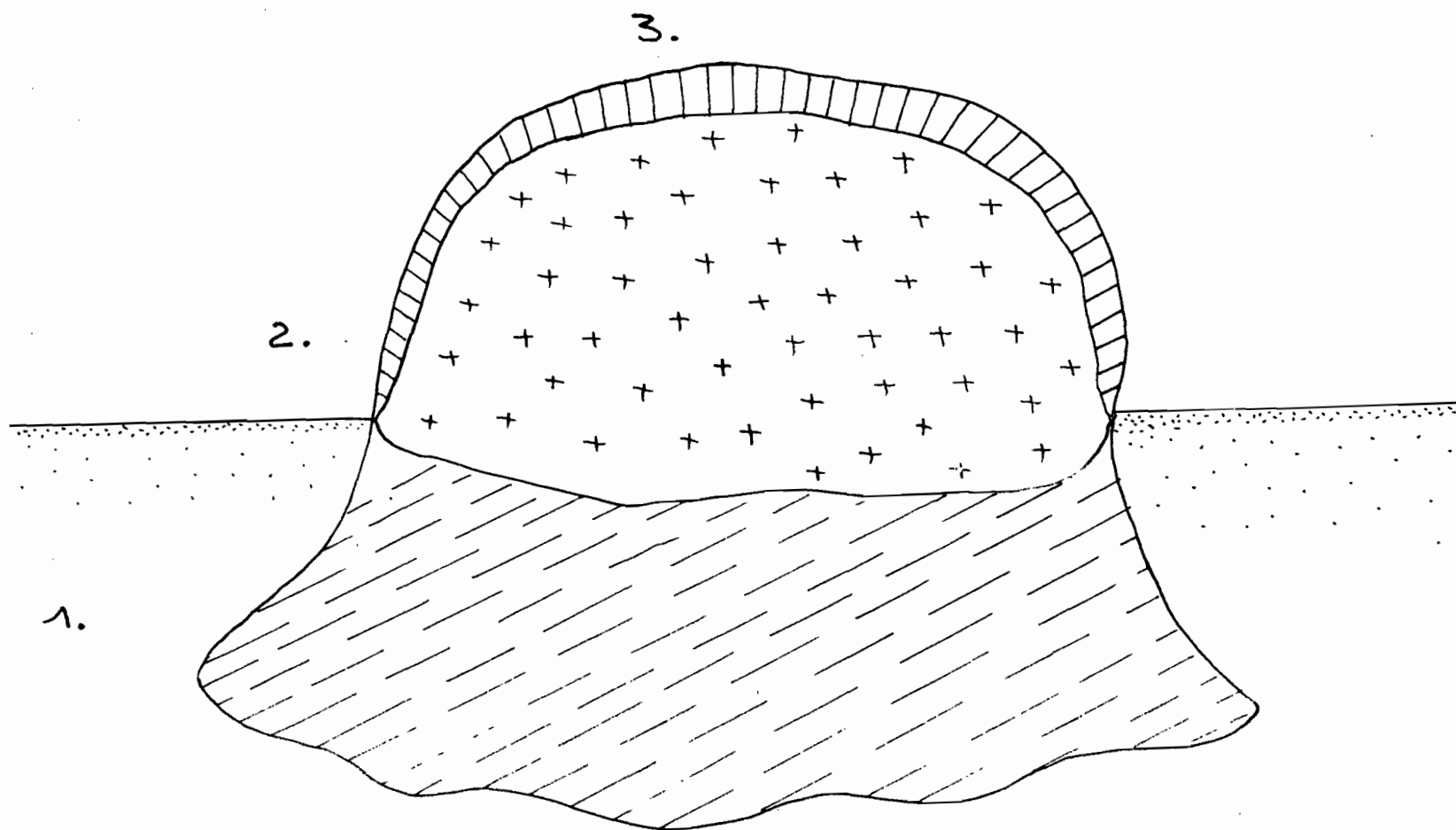
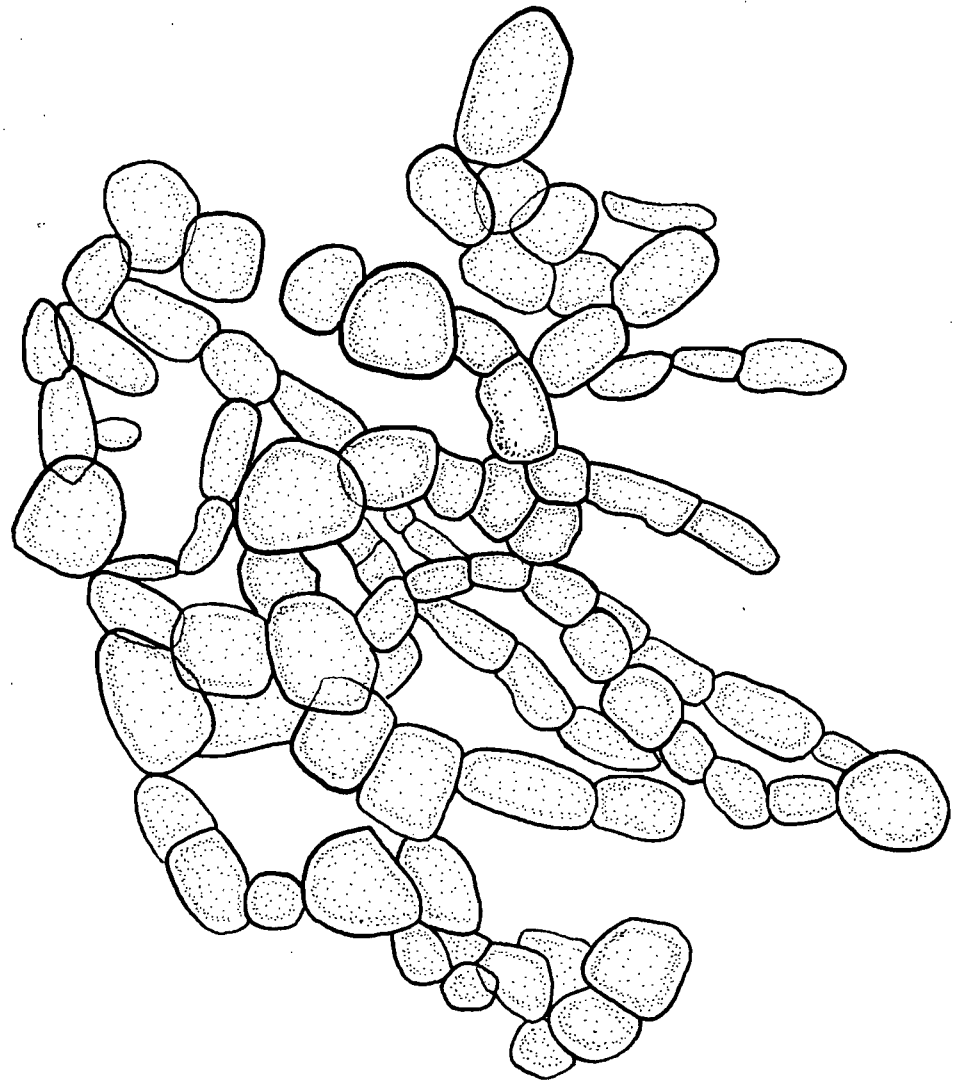


Figure 4



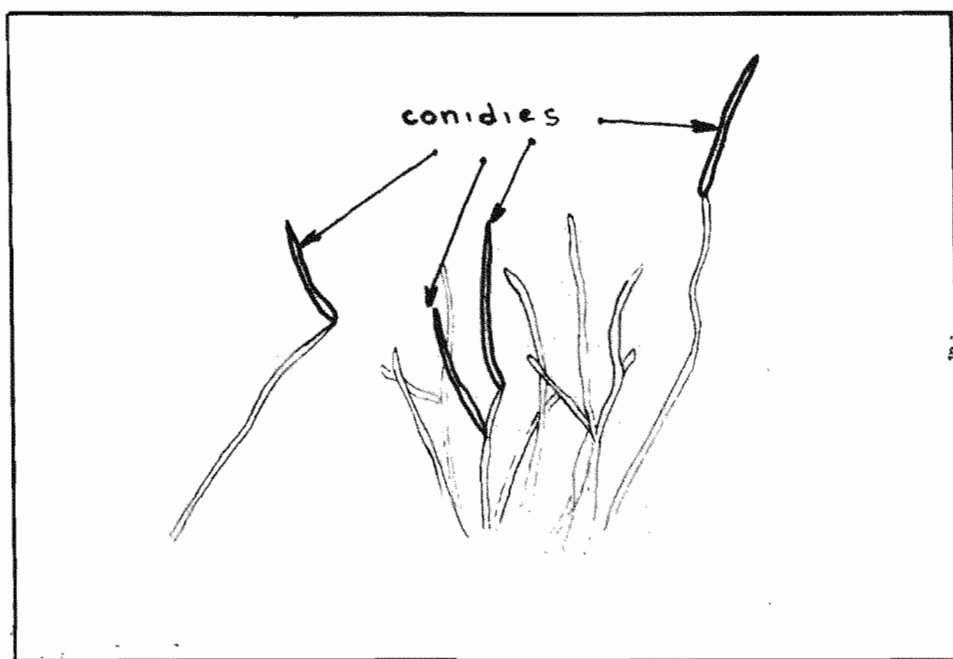
0 10 20 30 μ

M



Photo nº 3

0 50 μ



Nous n'avons pas constaté d'accroissement dans la croissance des colonies celles-ci restant toujours isolées.

b) essai portant sur la dureté du milieu

Cet essai a été réalisé sur milieu à base de papaye auquel ont été ajoutés des doses croissantes de gélose 5, 10, 15, 20, 25 grammes/litre.

Aucune différence n'est apparue dans la taille des colonies.

Action sur la fertilité des cultures

Plusieurs auteurs dont Nagel (4) et Ryker (6) ont signalé pour d'autres espèces de Cercospora la production fréquente en culture de colonies stériles. Nos cultures de Cercospora arachidicola étant fertiles, certains traitements ont été essayés pour voir si cette fertilité était un facteur constant.

a) Repiquage à partir de mycélium

Les repiquages effectués se faisant par frottis utilisent surtout la partie superficielle des colonies ; nous avons voulu voir si l'on obtiendrait pas des colonies stériles ou du moins d'aspect différent en partant du mycélium interne.

Les essais ont été réalisés sur la souche G B I (voir chapitre B) cultivée sur papaye gélosée. La culture est retournée sur une boîte de Petri stérile, les colonies étant en contact avec le verre.

Un fragment de gélose est découpé avec une aiguille lancéolée et déposé en tube. Les nouvelles colonies formées étaient fertiles. L'essai a été poursuivi pendant 4 repiquages successifs : la fertilité est restée constante. Il ne semble donc pas que la nature du fragment servant au repiquage intervienne.

b) repiquage à partir de colonies âgées

Des essais ont été effectués en repiquant à partir de cultures âgées de 1 à 2 mois. La croissance des nouvelles colonies est beaucoup plus lente : elles ne sont visibles qu'après 5 à 6 jours.

Mais dans tous les cas aucune action n'a été observée sur la fertilité : il y a toujours production de conidies.

c) repiquages successifs sur un même milieu

Toutes les souches isolées ont été repiquées uniquement sur milieu à base de papaye gélosée pendant un an sans qu'aucune action ne soit notée sur la fertilité des colonies.

B - ETUDE DE DIFFERENTS ISOLEMENTS

1) Obtention de souches issues d'un même tube germinatif

Pour éliminer l'action possible d'une population hétérogène dans les expériences réalisées et pour séparer des races différentes si elles existent, on a essayé d'obtenir des souches issues d'un même noyau.

La conidie de Cercospora arachidicola est pluricellulaire. Il faut donc, ou observer le début de la formation de la spore et savoir si elle est issue d'une cellule mononuclée, ou observer la conidie elle-même. La dernière méthode est plus simple. Cependant la coloration des noyaux de la spore s'est avérée difficile à obtenir. Plusieurs essais ont été effectués avec des techniques différentes :

- coloration au Feulgen
 - coloration à l'hématoxyline avec différenciation à l'alun de fer
 - coloration au carmin acétique après fixation à l'alcool acétique.
- } fixation 24
} heures au Brazil

Aucune de ces techniques n'a donné de résultats.

On a alors essayé la méthode utilisée par Calpouzos sur les spores de Cercospora musae. Un frottis de spores est monté entre lame et lamelle dans une solution d'hématoxyline additionnée de 1 % d'alun de fer. Après 3 jours, dans certaines cellules de conidies, des noyaux ont été observés, mais on n'a jamais pu avoir la coloration complète d'une conidie.

Dans tous les cas où une coloration a été obtenue, un seul noyau a été observé par cellule.

Obtention des lignées pures

Des cultures ont été réalisées à partir d'isolements de lésions venant de deux emplacements : Grand Bassam, Assinié, situés sur le cordon littoral.

Les conidies sont isolées à partir des lésions sous le

binoculaire et mises à germer en boîtes de Petri contenant de la gélose à 3 %. Au bout de 2 jours les tubes germinatifs se sont développés d'une façon suffisante pour pouvoir être coupés. L'opération est effectuée avec une aiguille de verre fine cassée à l'extrémité de façon à avoir une face coupante. On prélève alors le cube de gélose sur lequel se trouve le tube germinatif et le tout est placé en tube de papaye gélosée.

Après 10 jours la colonie obtenue a atteint une taille suffisante pour pouvoir être repiquée.

Les expériences ultérieures seront toutes faites à partir d'un des isollements venant de Grand Bassam et appelé GB 1.

2) Etude de la morphologie de la population conidienne en culture pure

Avant de procéder à des mensurations sur les différentes souches pour définir leurs caractéristiques, nous avons voulu voir si la population conidienne subissait des variations suivant l'âge des colonies.

Pour cela on a mesuré la longueur et le nombre de cloisons des conidies de la souche G B 1 sur des cultures âgées de 6 à 14 jours. (les mesures de la largeur des conidies n'a pas montré de différences, on obtient 3 à 5). 150 spores ont été mesurées pour chaque jour. Les deux tableaux suivants donnent les résultats de cet essai (n° 1 et 2). L'étude statistique montre qu'il existe des différences significatives entre ces mesures (les séries de mesures pour 10 et 11 jours sortant des limites).

Pour voir si ces différences étaient dues à l'âge de la culture ou se produisaient au hasard, une deuxième série de mesures a été faite sur des colonies âgées de 9 à 12 jours. Le tableau 3 donne les résultats.

L'analyse montre qu'il existe des différences significatives entre les mesures sur les spores du même jour pour les deux essais.

On ne peut donc se baser sur cette méthode pour établir les caractéristiques d'une souche. Les mensurations faites à partir de spores prélevées sur des lésions ont donné de meilleurs résultats comme nous allons le voir.

Tableau 1

Longueur des conidies (en μ)

Age de la culture en jours	Longueur en μ	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	$\bar{x}$
6		1	10	31	38	32	22	12	4	69,9
7		1	4	22	49	38	21	11	4	71,4
8		3	10	27	43	38	23	3	3	68,2
9		0	10	28	52	32	20	8	0	68,2
10		1	2	24	43	33	32	12	3	72,6
11		1	8	16	41	45	28	7	4	71,8
12		0	15	29	49	35	17	5	0	66,66
13		1	16	29	52	23	18	11	0	66,8
14		2	17	29	42	32	19	8	1	66,93

Tableau 2

Nombre de cloisons

Age de la culture en jours	Nombre de cloisons	0 - 1	2 - 3	4 - 5	6 - 7	8 - 9	10-11	12-13	$\bar{x}$
6		7	11	35	54	28	13	2	6,26
7		0	5	48	64	22	9	2	6,34
8		3	3	44	63	29	7	1	6,32
9		0	3	50	60	28	8	1	6,38
10		1	2	40	54	34	15	4	6,88
11		1	3	20	64	42	18	2	7,23
12		0	5	53	68	18	6	0	6,02
13		2	9	44	56	33	5	1	6,21
14		1	9	46	59	28	5	2	6,19

Nombre de cloisons

Age de la colonie en jours	Nombre de cloisons	0 - 1	2 - 3	4 - 5	6 - 7	8 - 9	10-11	12-13	$\bar{x}$
9		2	11	45	63	25	3	1	5,98
10		3	2	60	65	14	5	1	5,90
11		0	7	56	59	22	5	1	6,03
12		2	6	38	67	29	6	2	6,37

Longueur des spores

Age en jours	Longueur en μ	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	$\bar{x}$
9		5	14	37	46	26	20	2	0	64,46
10		1	13	32	64	27	11	2	0	
11		0	18	32	43	37	18	2	0	
12		3	22	32	44	25	18	4	2	

C - ESSAI D'INFECTION ET MENSURATION DES SPORES ISSUES DES LÉSIONS

1 - Méthode utilisée

Pour établir si la souche G B 1 cultivée en tubes avait conservé son pouvoir pathogène, un essai d'infection a été réalisé.

On a utilisé pour cela la variété d'arachide 28-29 sélectionnée à Bambey et cultivée en serre dans les cuves en ciment. Au moment de l'inoculation les plantes étaient âgées de 2 mois.

L'inoculum est constitué par une suspension de spores obtenue en immergeant la culture sur papaye gélosée dans un récipient contenant de l'eau bidistillée. La suspension est alors pulvérisée sur les feuilles. Pour maintenir une atmosphère humide pendant le temps nécessaire à la pénétration, les carrés ensemencés ont été recouverts de polyéthylène transparent, à l'intérieur duquel on a pulvérisé de l'eau.

La date exacte d'apparition des premières lésions est difficile à établir car les arachides cultivées en serre souffrent d'un défaut d'éclairage et le limbe n'était pas de couleur uniforme. Cette date se situe néanmoins entre 8 et 10 jours.

Ces taches ont donné des conidies à la surface supérieure des lésions.

2 - Définition de la souche G B 1

Des spores ont été prélevées sur des lésions. On a pris des taches où les conidies étaient bien formées et où l'on peut estimer la population conidienne comme adulte.

Des essais ont été effectués à des dates différentes pour voir s'il existait une variation des mesures dans le temps comme pour l'essai à partir de cultures pures : 500 spores ont été mesurées chaque fois.

Les deux tableaux suivants donnent le résultat des deux séries de mesures :

Longueur des spores

	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	109-119
Essai n° 1	10	37	98	106	99	65	66	15	4	0
Essai n° 2	1	16	92	125	93	89	58	33	7	1

Nombre de cloisons

	0-1	2-3	4-5	6-7	8-9	10-11	12-13
n° 1	31	80	118	135	102	32	2
n° 2	56	77	131	147	82	19	3

L'analyse statistique montre qu'il n'existe pas de différences significatives entre ces deux séries.

Il semblerait donc que le prélèvement de spores sur les lésions, pour une arachide de variété donnée, constitue la meilleure méthode de définition de la souche.

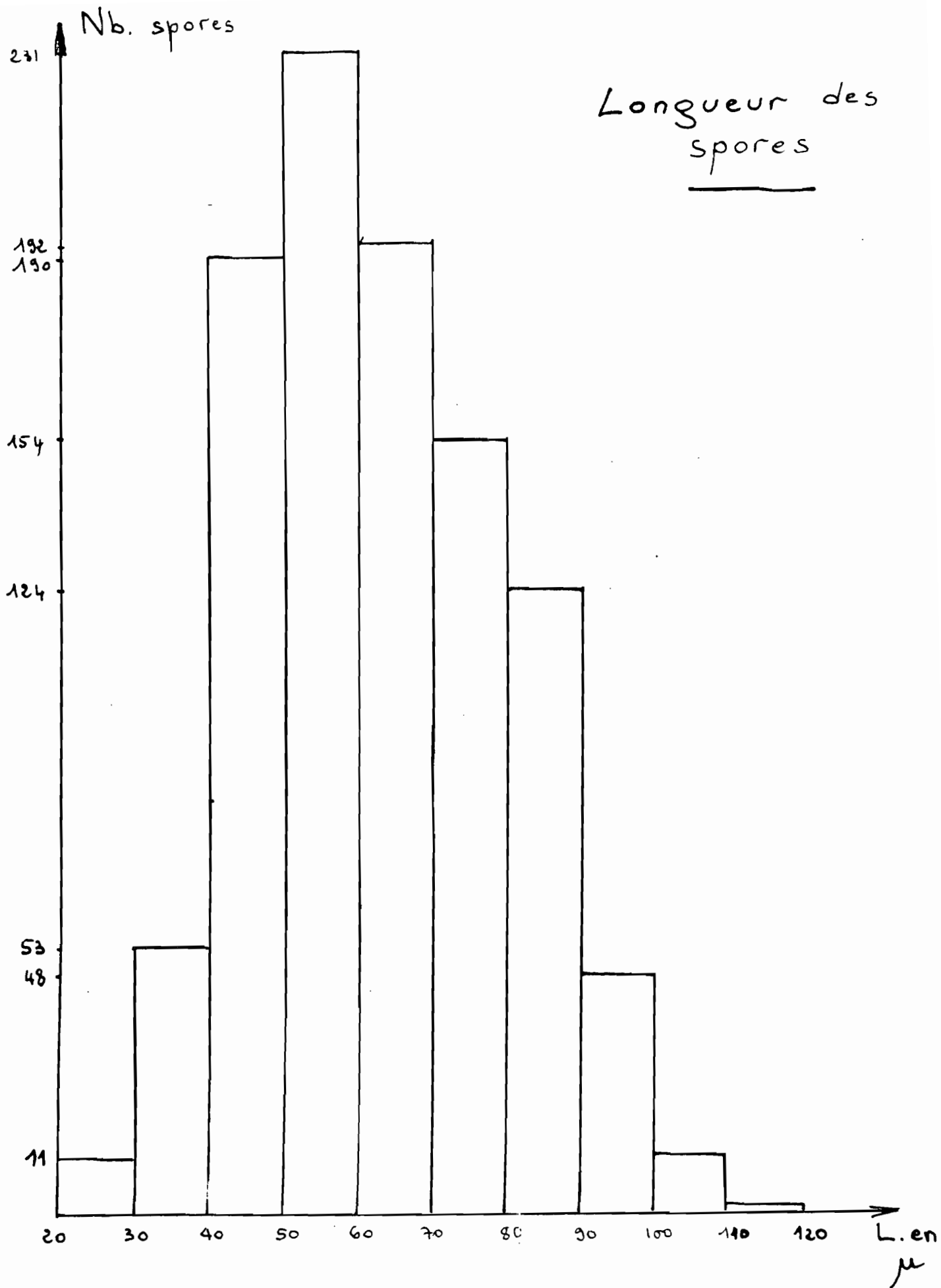
Ainsi pour G B 1, la somme des mesures des 2 essais permet d'en donner les caractéristiques :

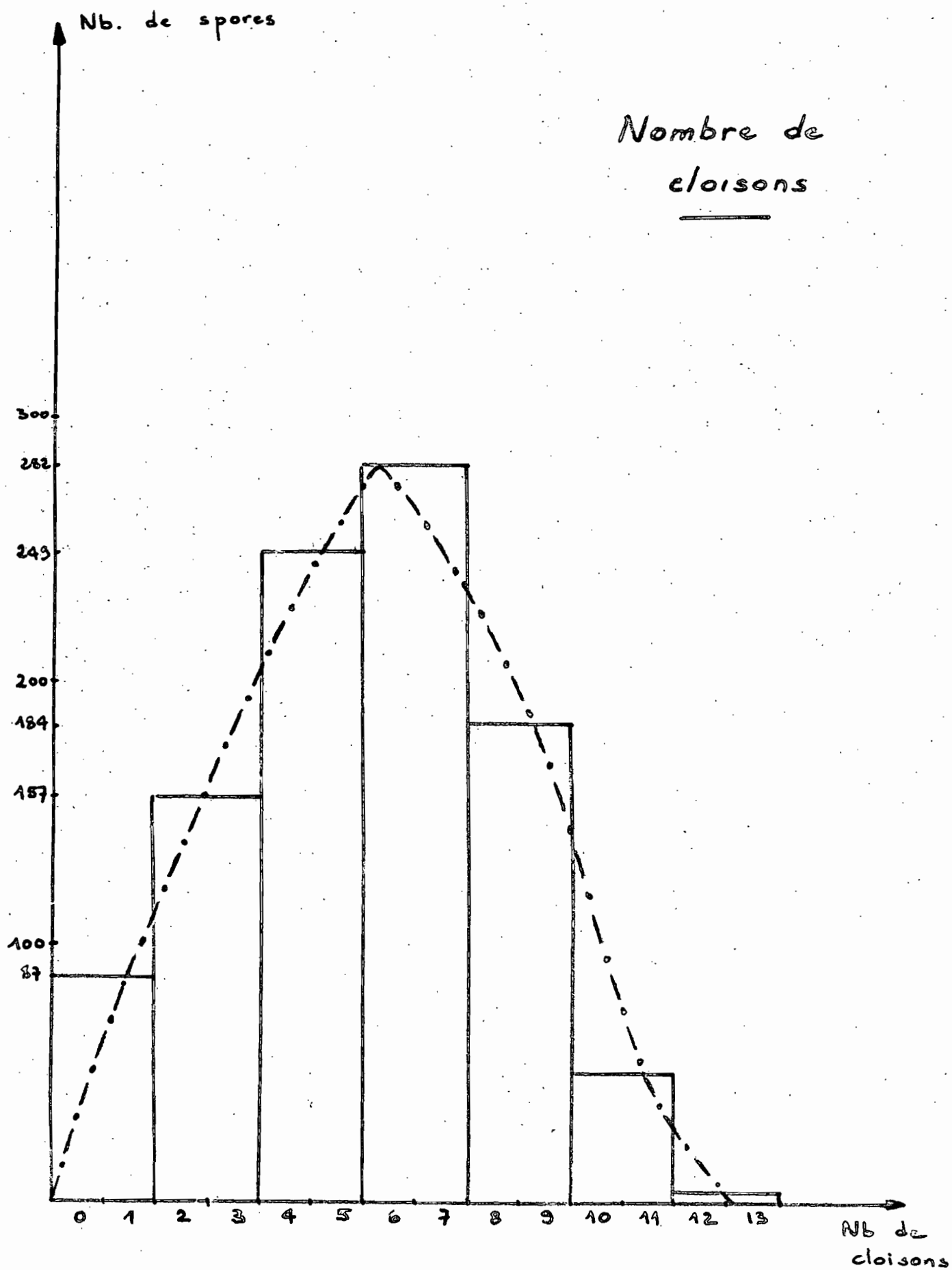
Moyenne des longueurs : 62,99 μ

Moyenne du nombre de cloisons : 5,55

Les deux courbes suivantes donnent la répartition des mesures.

Cette méthode devrait être essayée avec d'autres isollements mono - tube germinatif venant de Grand Bassam et d'Assinie.





Des différences dans l'aspect cultural peuvent déjà être notées sur papaye gélosée :

- G B 2 : colonies de couleur noire, gélose incolore ou à peine rose
- A 1 : colonies noires, gélose légèrement rose
- A 2 : colonies noires, gélose incolore
- A 3 : colonies brun roux, forte coloration en rose de la gélose
- A 4 : colonies brun clair, légère coloration rose

Pour chacune de ces souches devrait être également testé le pouvoir pathogène.

D - ESSAI DE L'ACTION DES FACTEURS DE CROISSANCE SUR CERCOSPORA ARACHIDICOLA

Pour expliquer les divergences relevées dans la littérature, et avant d'envisager une différence de races, il était intéressant de voir si la croissance du champignon n'était pas tributaire de la présence dans le milieu de certains facteurs de croissance.

Nous avons vu que le parasite a pu être cultivé sur milieu de Czapeck gélosé. Pour préciser ces résultats, nous avons étudié l'action d'un ensemble de facteurs de croissance sur Cercospora arachidicola. Cette étude a eu surtout pour but de mettre au point une méthode de mesure et non de tester les vitamines une à une.

1) Essai sur bande de papier en tube de Roux

L'essai de l'action des facteurs de croissance ne peut se faire valablement sur milieu gélosé puisque l'on ignore ce qu'apporte la gélose.

L'essai a été effectué en tubes de Roux. La partie inférieure du tube est remplie jusqu'à l'étranglement avec une solution liquide de Czapeck à laquelle ont été ajoutés des facteurs de croissance à la concentration suivante :

- Thiamine : 10^{-7}
- Riboflavine : 5.10^{-8}
- Pyridoxine H Cl : 10^{-7}
- Acide panthoténique : 5.10^{-7}
- Acide paraminobenzoïque : 5.10^{-8}
- Inositol : 5.10^{-7}
- Biotine : 5.10^{-9}

Le témoin est la solution de Czapeck seule.

Une bande de papier filtre de 5 à 6 cm de longueur et de 1 cm de largeur plonge pour 1/4 dans la solution et dépasse pour le reste à l'intérieur du tube. L'ensemencement est effectué sur cette

zone avec une goutte d'une suspension de spores et de fragments de mycélium.

Au bout de 8 jours les bandes de papier filtre sont sorties et montées entre lame et lamelle dans du lactophénol. La surface de la colonie est mesurée : on l'inclut dans un rectangle théorique dont la surface est calculée.

Les résultats suivants ont été obtenus : Czapecz + facteurs de croissance

Surface en $1/100 \text{ mm}^2$	Nombre de colonies
0 - 9	3
10 - 19	18
20 - 29	40
30 - 39	69
40 - 49	59
50 - 59	54
60 - 69	37
70 - 79	20
80 - 89	14
90 - 99	9
100 - 109	9
110 - 119	4
140 - 149	3
Moyenne des 339 mesures : 49 $1/100 \text{ mm}^2$	

Czapeck seul :

Surface en $1/100 \text{ mm}^2$	Nombre de colonies
0 - 9	2
10 - 19	78
20 - 29	99
30 - 39	62
40 - 49	22
50 - 59	22
60 - 69	10
70 - 79	6
80 - 89	6
90 - 99	9
100 - 109	3
110 - 119	1
120 - 129	1
130 - 139	1
180 - 189	1
Moyenne des 323 mesures : 34 $1/100 \text{ mm}^2$	

Nous voyons donc qu'il existe une différence entre la moyenne des deux mesures.

Cependant cette méthode n'a pu être retenue :

- si la série de mesures relatives à l'essai Czapeck + vitamines peut être ajustée à une loi normale, il n'en est pas de même pour la série Czapeck, ce qui rend l'interprétation statistique difficile.

- on ne peut pas tenir compte dans cet essai de la croissance en épaisseur de la colonie.

- enfin cet essai ayant été le premier effectué n'a pas été fait sur une souche venant d'un isolement monospore.

Une deuxième expérience a été effectuée en milieu liquide.

2) Essai en milieu liquide à partir de souches purifiées

L'essai a été effectué à partir de la souche G B 1 :

a) purification de la souche

Pour éliminer tout apport de facteurs de croissance par le champignon lui-même, 2 purifications ont été effectuées sur Czapeck.

La méthode utilisée est celle de l'expérience précédente: tubes de Roux contenant la solution à la partie inférieure dans laquelle plonge une lamelle de papier filtre.

Ces lamelles sont ensemencées par frottis à partir d'une culture sur papaye gélosée âgée de 8 jours.

Après 15 jours les colonies se sont développées sur les lamelles de papier d'une façon suffisante pour pouvoir être repiquées.

Le deuxième repiquage de purification a lieu de la même manière que précédemment.

b) Essai des facteurs de croissance

Deux lots de tubes de même diamètre sont préparés, l'un contenant la solution de Czapeck seule qui constituera le témoin, l'autre par la même solution à laquelle ont été ajoutés les facteurs de croissance à la même concentration que pour l'expérience précédente.

Chaque tube contient 5 cm³ de la solution nutritive.

Pour obtenir l'inoculum, les lamelles de papier filtre sont plongées dans un tube contenant de l'eau bidistillée stérile puis ressorties. Une goutte de cette suspension est introduite dans chaque tube au moyen d'une pipette Pasteur.

Les tubes ainsi ensemencés sont placés sur un appareil à agitation.

c) Résultats

La culture se présente sous l'aspect de petites masses globuleuses noirâtres pouvant atteindre 1 centimètre de diamètre pour la culture sur milieu avec facteurs de croissance. Pour les cultures sur Czapeck, la taille est de l'ordre du millimètre.

Au microscope, les cultures montrent un aspect rappelant celles effectuées sur milieu gélosé : enchevêtrement de filaments hyalins à subhyalins à la périphérie, formant une masse de teinte brune au centre de la colonie. Pour les cultures sur Czapeck seul, les filaments périphériques ont un aspect beaucoup plus grêle.

On a essayé de chiffrer ces résultats par la méthode suivante : la culture âgée de 18 jours est filtrée sur filtres sans cendres. Ces derniers ont été préalablement desséchés 24 heures à l'étuve à 80°, laissés refroidir 24 heures en excicateur, puis pesés.

Le mycélium recueilli sur l'entonnoir est passé à l'étuve 48 heures, laissé refroidir comme précédemment en excicateur, puis pesé.

Aucune différence n'a pu être mise en évidence par cette méthode. Les poids de matière sèche étant très faibles par suite du peu de concentration de l'inoculum après la deuxième purification.

3) Essai en milieu liquide sans purification préalable

Dans cet essai, l'apport de facteurs de croissance par le champignon lui-même a été négligé de façon à avoir un inoculum plus abondant. On a donc fait une suspension à partir de cultures sur papaye gélosée âgées de 8 jours. Même méthode que précédemment.

Après 15 jours une nette différence était visible : les cultures sur milieu Czapeck + vitamines montraient de nombreuses colonies ; le milieu liquide avait pris une coloration jaune. Sur Czapeck seul le liquide est resté incolore et les colonies sont peu développées. Après pesée les résultats suivants sont été obtenus (les poids sont exprimés en milligrammes) :

Nb de mesures	Poids									$\bar{x}$
	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49		
Czapeck + vitamines	0	1	0	8	16	16	3	1		32,8
Czapeck	1	7	8	11	6	6	5	2		28,7

L'analyse statistique montre qu'il existe une différence significative entre les deux séries de mesures.

Une étude complète devrait porter sur chaque facteur de croissance pris séparément puis par groupes. Il y aurait intérêt à travailler en Erlenmeyer en partant de plus grosses quantités d'inoculum (de l'ordre du cm^3) de façon à avoir des différences encore plus nettes.

E - ESSAIS DE GERMINATION DES CONIDIES

Des observations effectuées sur les plantations d'arachide situées aux environs de Grand Bassam sur le cordon littoral ont montré une différence dans la répartition de Cercospora personata et Cercospora arachidicola en cours d'année.

Décembre 1958 : Cercospora arachidicola est seul présent
 Mars 1959 : Cercospora personata est présent à 90 %
 Juin 1959 : Cercospora arachidicola est présent à 90 %
 Septembre 1959 : Cercospora personata est pratiquement seul présent.

Il semble donc exister un cycle dans la proportion relative des deux parasites. Une étude complète de ce problème devrait porter sur :

- les conditions de germination des spores : particulièrement température et humidité.
- les conditions de pénétration dans l'hôte.
- les facteurs régissant l'apparition des conidies sur les taches foliaires et ceci pour les deux parasites en cause.

Seul le premier point a été abordé dans cette étude.

1) Essais en partant de conidies recueillies sur feuilles

Les premiers essais de germination ont été effectués à partir de conidies recueillies directement à partir des lésions. Les feuilles étaient conservées dans du Knop. Les conidies sont prélevées avec un pinceau sous le binoculaire, mises en suspension dans de l'eau bidistillée et placées en goutte pendante en cellule de Van Tieghem. La concentration de la suspension variait de 10 à 30 spores au mm^3 .

- Une première série d'essais a donné les résultats suivants : (figure 5)

I - Essai à 28°Moyenne de deux essais

Temps en heures:	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	308	8	2
7	644	70	10
10	556	282	50
13	661	477	72
16	477	357	74
19	506	418	82

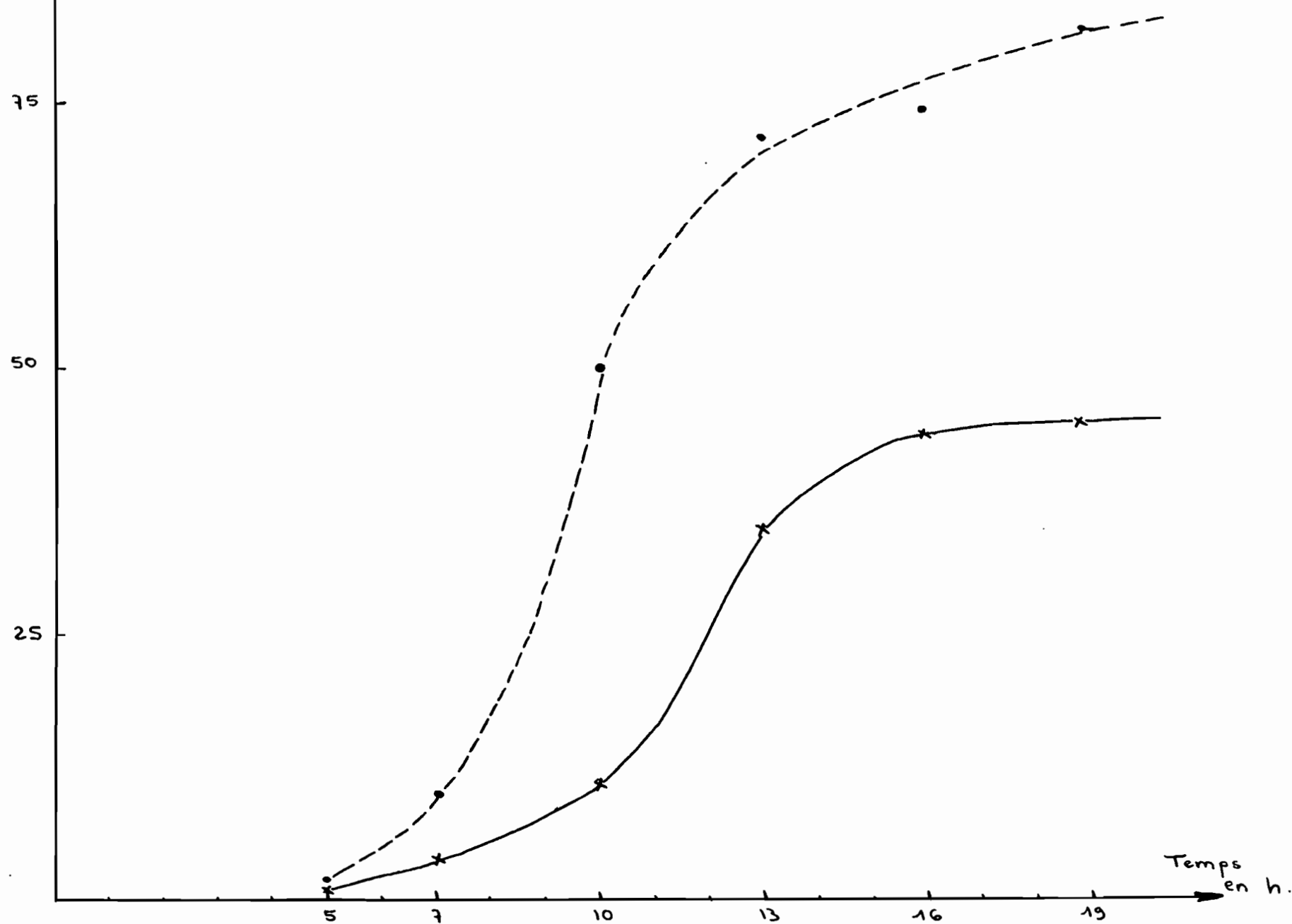
2 - Essai à 20°

Temps en heures:	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
9	162	77	47
10	243	146	60
13	369	270	73
16	324	255	78
19	437	356	81

-- un autre groupe d'essais à donné des résultats présentant de grandes variations par rapport à ce que l'on pouvait attendre.

%
germ.

2 essais à 28°



I - Essai à 28°

Temps en heures:	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	167	2	1
7	237	10	4
10	279	31	11
13	213	75	35
16	202	90	44
19	84	38	45

2 - Essai à 25°

Temps en heures:	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	102	3	3
7	182	7	4
10	208	17	8
13	122	30	24
16	149	42	28

Il y a donc pour des essais successifs même effectués à une même température des différences importantes qui ont fait abandonner cette méthode.

2) Essais en partant des cultures pures : méthode employée

La principale difficulté a été de prélever les conidies tout en ayant le moins possible de fragments de mycélium, car certains de ces fragments après émis des tubes germinatifs sont difficiles à distinguer de conidies ayant germé. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la méthode suivante : la gélose portant la culture est extraite du tube, découpée en fragments

d'environ un centimètre ; la face portant les colonies est passée à la surface de l'eau bidistillée contenue dans un verre de montre le plus doucement possible.

3) Action de l'âge de la culture sur la germination des conidies

Les résultats variables obtenus en partant de conidies prélevées sur les lésions pourraient s'expliquer par l'âge différent de la population conidienne entraînant un pouvoir germinatif différent. C'est ce que nous avons voulu vérifier.

Des suspensions de spores provenant de cultures ont été mises à germer en goutte pendante en cellule de Van Tieghem depuis 6 jours, date à laquelle les colonies sont bien formées, jusqu'à 14 jours.

Les résultats suivants ont été observés : (chaque tableau donne la moyenne de 3 essais)

Colonie de 6 jours

Temps en heures:	Nombre de spores: mesurées	Nombre de spores: germées	% de germination
5	491	9	2
7	518	61	11
10	522	205	39
13	532	296	55
16	523	324	61
19	489	360	73

Colonie de 7 jours

Temps en heures:	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	561	11	2
7	659	72	10
10	643	189	29
13	622	262	42
16	570	285	50
19	564	323	57

Colonie de 8 jours

Temps en heures:	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	504	13	2
7	577	75	12
10	557	238	42
13	423	252	59
16	349	228	65
19	261	185	70

Colonie de 9 jours

Temps en heures:	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	374	6	1
7	432	27	6
10	464	126	27
13	422	215	50
16	350	232	66
19	489	343	70

Colonie de 10 jours

Temps en heures	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	414	9	2
7	396	21	5
10	397	61	15
13	492	155	31
16	436	163	37
19	399	191	47

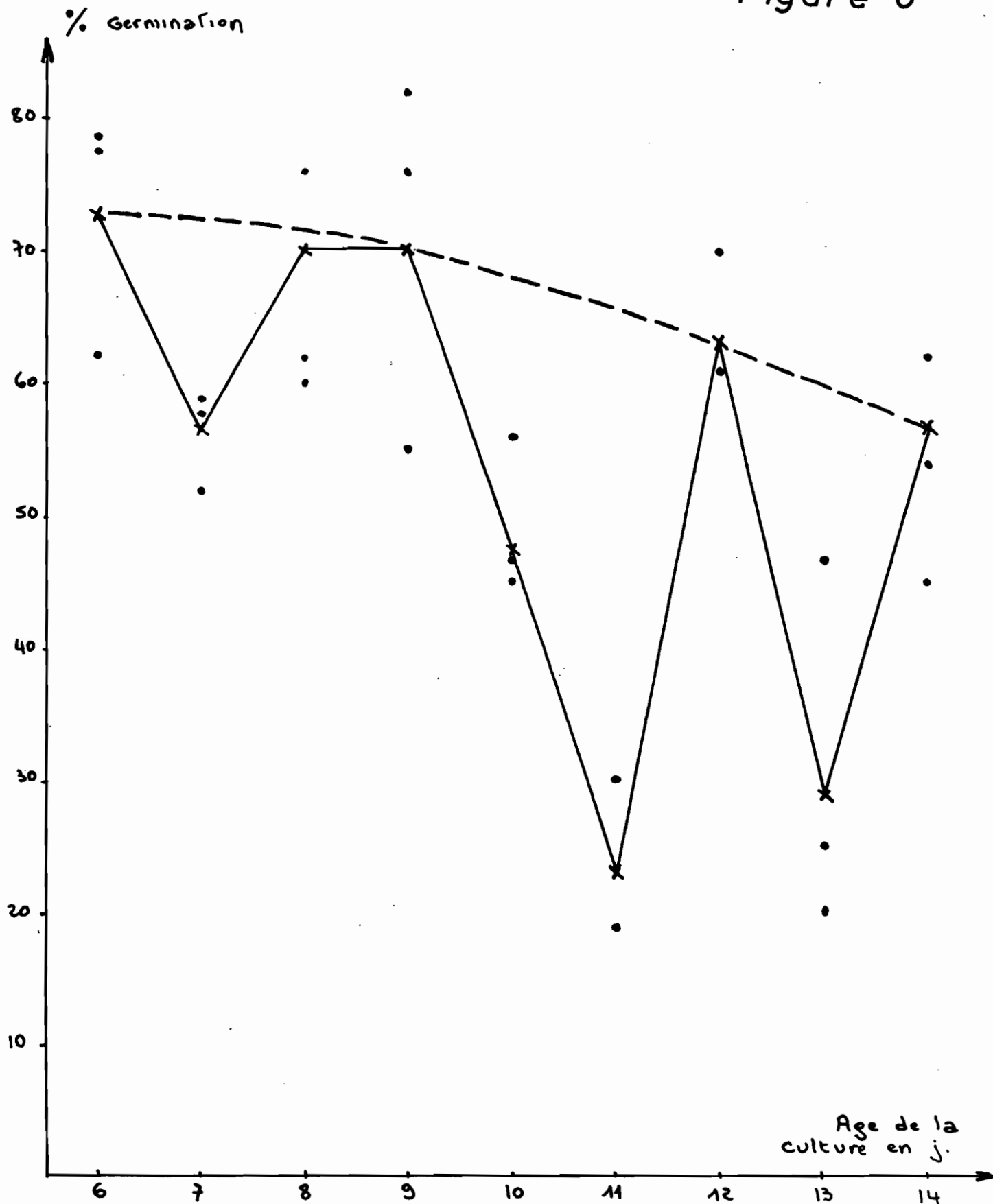
Colonie de 11 jours

Temps en heures	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	485	3	0
7	492	9	1
10	444	29	6
13	465	60	12
16	475	98	20
19	491	113	23

Colonie de 12 jours

Temps en heures	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	366	8	2
7	232	17	7
10	301	54	17
13	351	147	41
16	153	95	61
19	351	224	63

Figure 6



F - MODIFICATIONS CAUSEES PAR LE PARASITE DANS LA COMPOSITION DE LA PLANTE

Seule a été abordée la variation dans la teneur en glucides des feuilles d'arachide atteintes par Cercospora personata (qui se trouvait seul en grande quantité au moment de l'essai).

Deux essais ont été réalisés comprenant chacun un lot de feuilles saines et un lot de feuilles atteintes comportant en moyenne de 30 à 50 taches par folioles, certaines pouvant atteindre 3 mm de diamètre.

Extraction des glucides

Les folioles sont broyées et mises à bouillir dans l'alcool à 80° pour extraire les glucides.

L'alcool est ensuite éliminé par distillation sous vide, le résidu est déféqué à l'acétate de plomb à 10 %. Après précipitation du plomb en excès par le carbonate de soude et filtration, on obtient une solution aqueuse qui contient les glucides.

Au cours de cette filtration, nous avons noté une différence entre les 2 lots de feuilles. La solution aqueuse de feuilles saines présentait une coloration jaune qui a gardé sa couleur en milieu alcalin (au cours de l'apport du carbonate de soude).

Au contraire le lot de feuilles malades a donné un filtrat orangé qui est devenu de couleur madère au cours du passage en milieu alcalin. Sur le papier filtre, on a noté des halos de teinte rose. Il semblerait donc y avoir chez les feuilles atteintes la présence d'un colorant que l'on ne retrouve pas dans les lot sains.

Le dosage a été effectué par la méthode de Bertrand.

Les échantillons de feuilles à chaque essai étant environ de 10 grammes, la teneur en sucres était trop faible pour être lue dans les tables. Cependant, par comparaison des deux séries, nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les échan-

tillons de feuilles saines et de feuilles atteintes.

Une étude ultérieure devrait être faite avec des échantillons de feuilles fraîches de l'ordre de 100 grammes pour avoir une teneur en sucres suffisante.

Colonie de 13 jours

Temps en heures:	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	400	1	0
7	382	8	2
10	470	59	12
13	507	120	23
16	443	123	27
19	375	109	29

Colonie de 14 jours

Temps en heures:	Nombre de spores mesurées	Nombre de spores germées	% de germination
5	513	9	1
7	465	19	4
10	496	141	28
13	488	245	50
16	605	324	53
19	344	197	57

Le temps le plus intéressant est 19 heures puisque l'on atteint l'assymptote de la courbe de germination.

La courbe 6 donne les pourcentages de germination pour ce temps en fonction de l'âge de la culture. Nous obtenons une courbe en dents de scie avec chutes à 7, 11 et 13 jours. Il est difficile de conclure d'après ces résultats ; l'essai devrait être repris pour voir si les chutes du pouvoir germinatif sont aléatoires ou si on les retrouve régulièrement. On peut cependant noter que si l'on néglige ces écarts, on constate en joignant les sommets de la courbe une diminution lente du pourcentage de germination qui passe de 73 à 57 % entre 6 et 14 jours.

Nota : sur la courbe 6 les points représentent les essais partiels et les croix la moyenne de ces 3 essais.

G - ESSAI D'OBTENTION DE CULTURES DE TISSUS D'ARACHIDES

En vue d'essais ultérieurs d'infection des cals par Cercospora arachidicola, on a essayé d'obtenir une culture de tissus d'arachide.

1) Mise en germination des graines

L'essai de mise en culture a été effectué à partir de graines ce qui présente le minimum de risques d'infection. Les graines sont mises à germer en tubes contenant une solution de gélose à 10 g/l additionnée de 10 g/l de saccharose, ceci pour faciliter le développement des champignons qui auraient pu persister après la désinfection.

La désinfection des graines est faite par trempage dans une solution d'hypochlorite de calcium à 40 g/l pendant 45 minutes à 1 heure.

Le pourcentage de graines se développant sans infection atteint 10 à 20 %.

2) Obtention de cals primaires

Les essais ont été réalisés en partant de l'hypocotyle et de la tigelle. Le milieu utilisé était du Knop 1/2, 30 g/l de saccharose, 10 g/l de gélose, $5 \cdot 10^{-7}$ d'acide indole acétique et 20 % de lait de coco. La première série d'essais a été réalisée en plaçant le pôle foliaire en bas. Un examen après 15 jours montre un développement abondant de radicelles à partir du pôle radiculaire et même le long de la tigelle ou de l'hypocotyle.

Les figures 7 et 8 montrent la structure anatomique d'une radicelle à l'endroit où elle circule dans l'écorce de l'hypocotyle et n'a pas encore fait irruption à l'extérieur.

figure 7 : a : épiderme de l'hypocotyle
b : parenchyme de l'écorce
c : radicule avec son cylindre central d à structure
primaire.

figure 8 : étude de détail montrant en 1 les cellules de l'écorce
de l'hypocotyle, en 2 l'écorce de la radicule avec
cellules de petite taille à la périphérie et en 3 le
cylindre central avec les faisceaux du bois et du liber.

Sur la totalité des hypocotyles et sur 50 % des tigelles,
apparaissent du côté du pôle foliaire immergé dans la gélose des
proliférations de tissus.

Une coupe effectuée dans ces proliférations montre un
tissu formé de cellules ayant l'aspect de cellules du parenchyme.
On trouve disséminées à l'intérieur de ce tissu des cellules pré-
sentant des réticulations colorées en vert par le vert d'iode ;
ces cellules sont donc assimilables à des cellules du bois (figure 9).

Figure 7

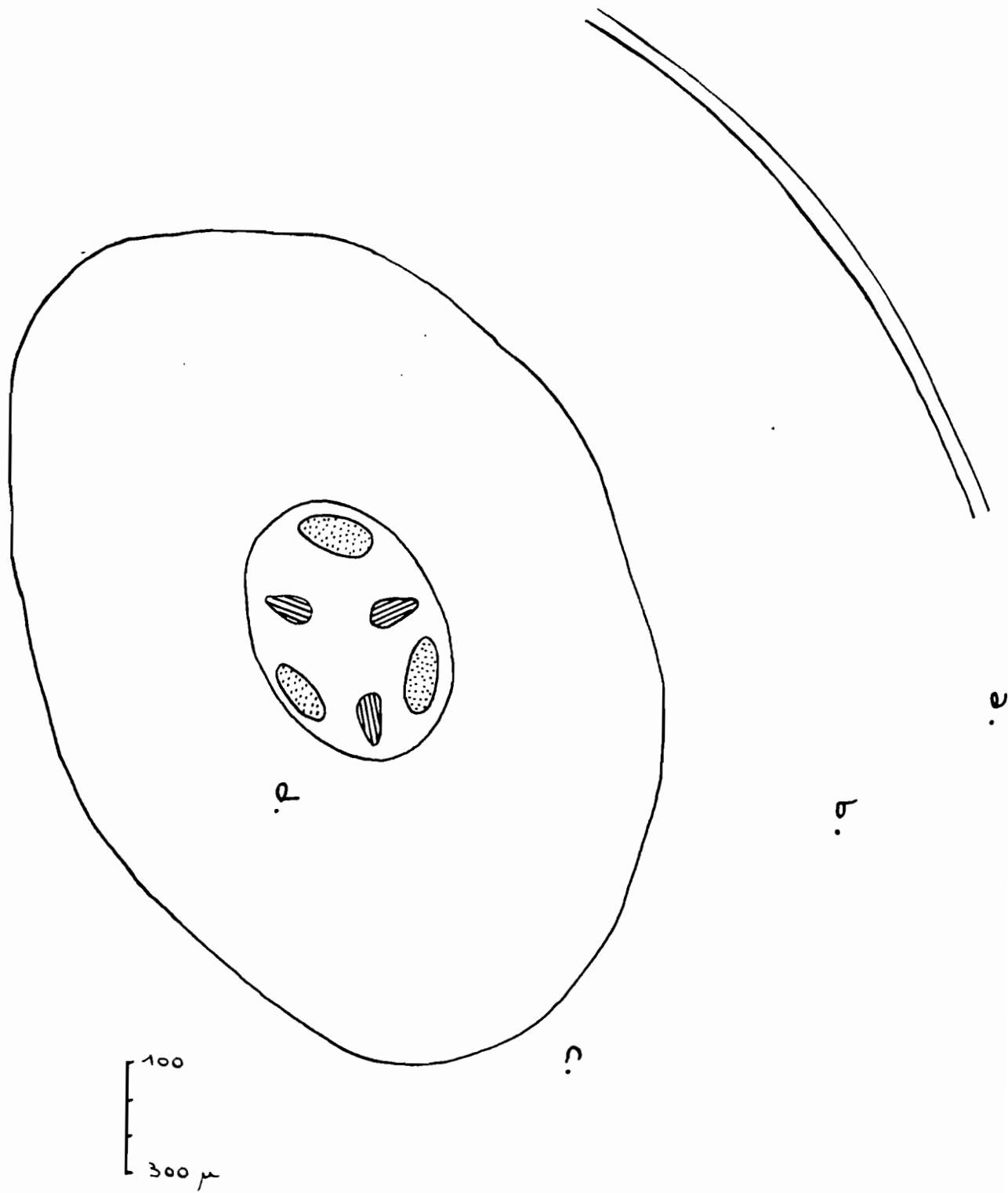


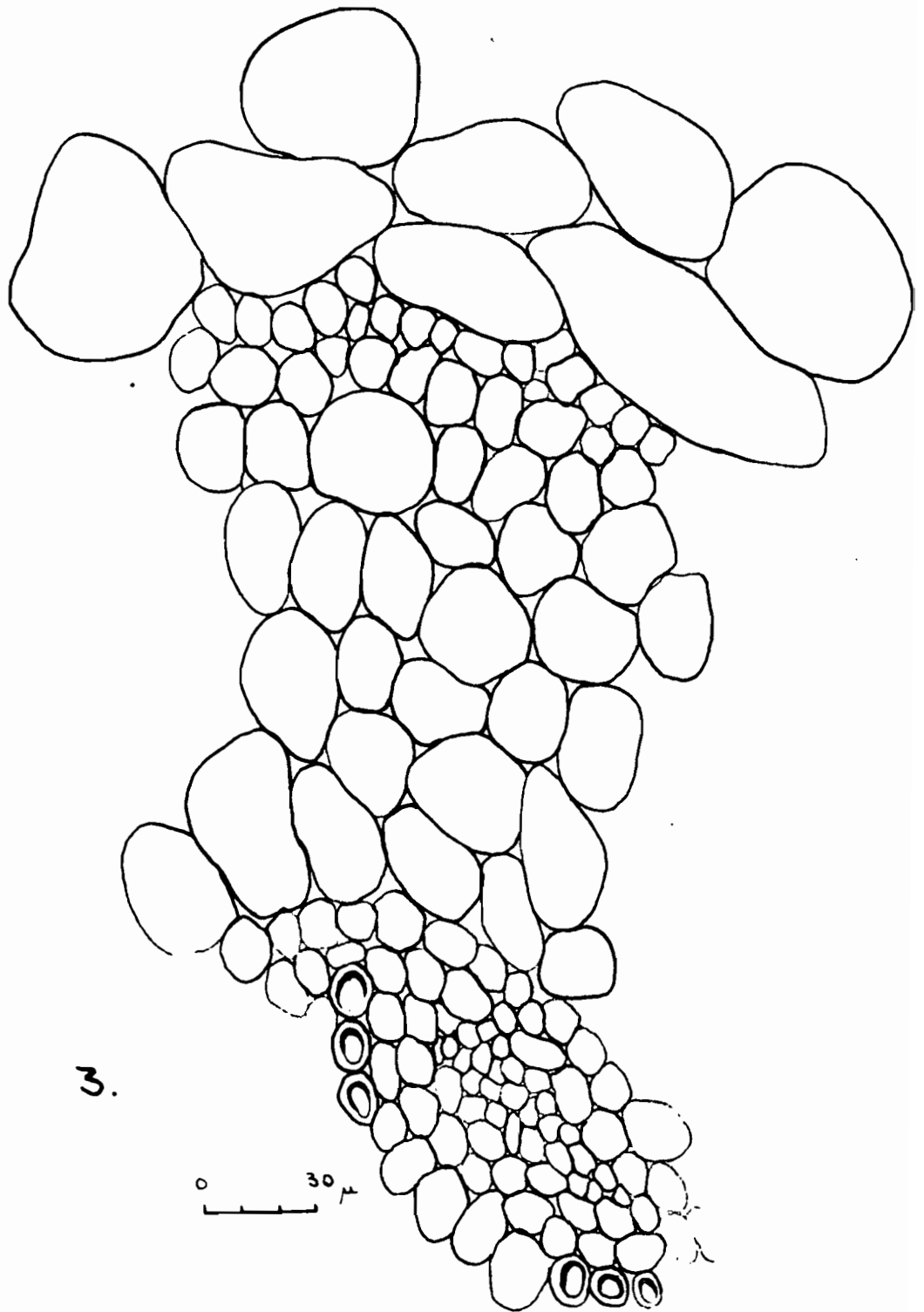
Figure 8

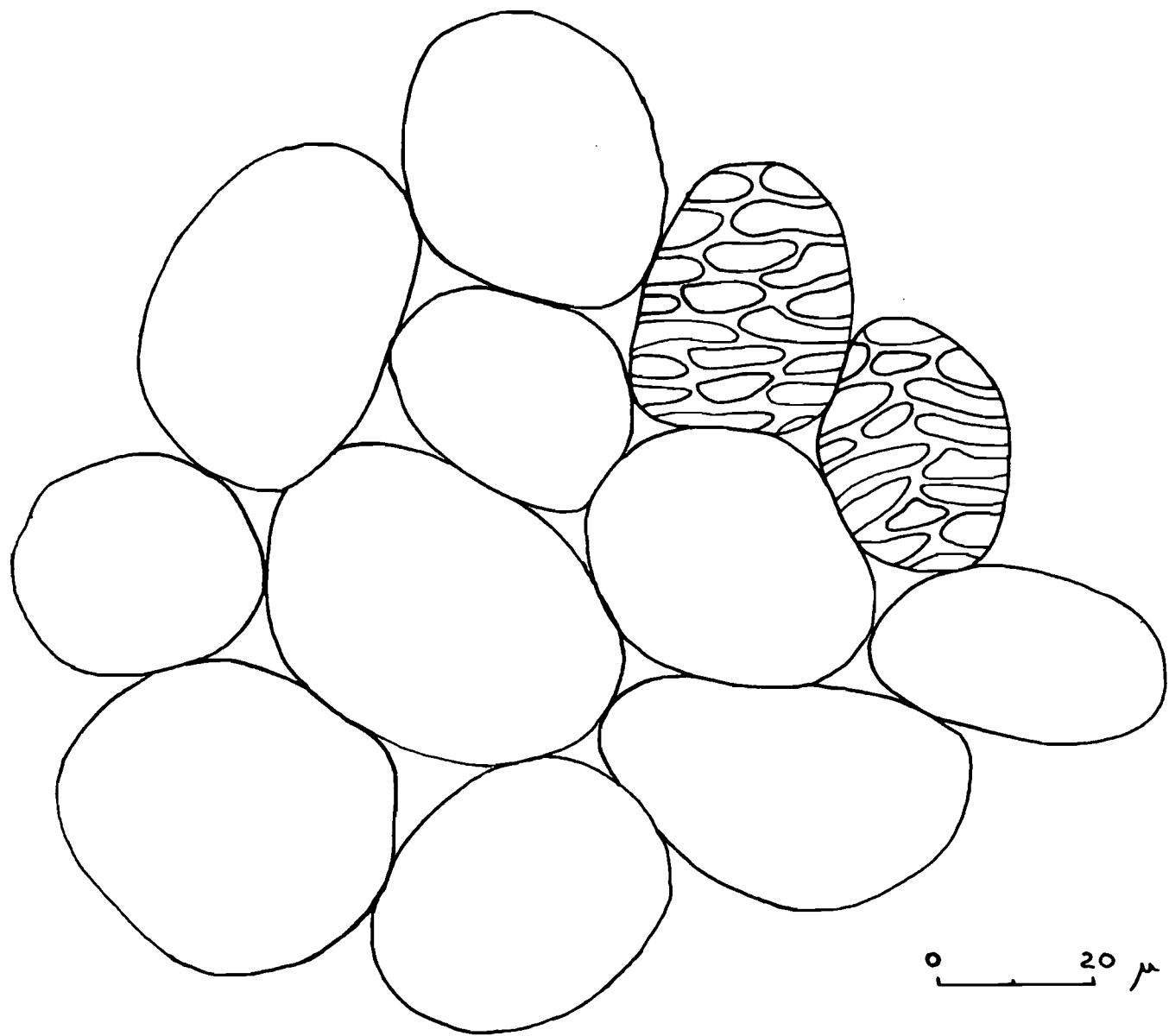
1.

2.

3.

0 30 μ





BIBLIOGRAPHIE

- I - JENKINS W.A. - Two fungi causing leaf spot of peanut
Jour. of Agric. Res. vol. LVI, n° 5, pp. 317-332, 1938
- 2 - MILLER L.I. - Studies of the parasitism of Cercospora arachidicola and Cercospora personata Diss. abstr. vol. XIII, n° 5, pp. 644-645, 1953.
- 3 - NAGEL C.M. - Conidial production of Cercospora in pure culture. vol. XXIV, n° 10, p. 1101-1110, 1934.
- 4 - NAGEL C.M. et LEONARD O.A. - The effect of Cercospora beticola on the chemical composition and carbon assimilation of Beta vulgaris. Phytopath. vol. XXX, n° 8, p. 659, 1940.
- 5 - ROLDAN E. F. et QUERIJERO A. F. - Black spot of peanut.
The Philippine agriculturist. vol. XXVII, n° 8, p. 669-679, 1939.
- 6 - RYKER T. C. - Loss of sporulation in Cercospora.
Abs. in Phytopathology vol. XXXII, n° I, p. 16, 1942.

Tarjot Michel

Etude de la cercosporiose de l'arachide : rapport de stage
1959.

sl : sn, 1959, 33 p. multigr.