

BIOLOGIE CULTURALE ET DIFFERENCIATION DES PERITHECES IN VITRO CHEZ DIAPORTHE/PHOMOPSIS HELIANTHI Munt.Cvet.

P. Assémat et J. Fayret
Laboratoire de Cryptogamie, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne,
31062 Toulouse, France.

RESUME

Diaporthe/Phomopsis helianthi est actuellement, dans certaines régions de France, un grave parasite du Tournesol. Son cycle biologique a été réalisé en cultures in vitro. La différenciation des pycnides ne nécessite pas de milieu nutritif particulier. Elle est stimulée par la lumière et inhibée à 30°. On observe toujours la succession de conidies α peu abondantes, puis de très nombreuses conidies β . Le milieu plante-hôte et un milieu synthétique sont les plus favorables à la production des périthèces. Leur formation avec des isolats monospores met en évidence un homothallisme chez D. helianthi. La quantité de périthèces dans les cultures varie, selon les souches, avec la nature du milieu. Cette morphogenèse, optimale à 20°C, inhibée à 27°C, n'est pas dépendante d'une cryo-induction. Elle est photosensible et stimulée par la lumière blanche. Il est possible désormais de s'affranchir du cycle naturel pour obtenir des ascospores dont le rôle est essentiel dans l'épidémiologie de la maladie.

SUMMARY

Diaporthe/Phomopsis helianthi is now, in some parts of France, a dangerous parasite of Sunflower. Its full life-cycle has been obtained in vitro. The pycnidia are generated whatever the medium. Their development is inhibited at 30°C and stimulated by light. One can observe the appearance of conidia α always in limited quantities, then of conidia β in very large amounts. The perithecia mainly developed on "host-plant" medium and a synthetic medium but the amount of perithecia may vary according to the strains and the nature of the medium. The production of the perithecia from single ascospore isolates shows homothallism in this fungus. This morphogenesis is optimum at 20°C, inhibited at 27°C and does not require a cold period. The formation of the perithecia is stimulated by visible light. So it is thus possible to get away from the natural cycle in order to obtain ascospores whose role is essential in the epidemiology of the disease.

INTRODUCTION

La maladie du Tournesol causée par Diaporthe helianthi Munt.-Cvet., après avoir été décrite en Yougoslavie (Acimovic et Straser, 1982 ; Mihaljcevic et al., 1980), est apparue en France en 1984 (Lamarque et Perny, 1985). Elle s'est surtout développée dans la région du Lauragais en 1985 et représente depuis un grave danger. Bien que l'identité du parasite qui sévit en France ait été confirmée par l'étude comparée de 7 souches françaises et de 3 isolats yougoslaves et roumain (Assémat, 1986), il était nécessaire de mieux connaître sa biologie et surtout les conditions de formation des organes reproducteurs. Les études in vitro effectuées jusqu'à présent ont concerné le développement mycélien et la formation des pycnides (Acimovic et Straser, 1982 ; Muntanola-Cvetkovic et al., 1985 ; Herr et al., 1983 ; Yang et al., 1984). Nous présentons les résultats de nos recherches sur la production des pycnides et des périthèces de D. helianthi en cultures in vitro. Nous préciserons surtout les conditions de différenciation des périthèces qui n'ont jusqu'ici fait l'objet d'aucune étude approfondie.

MATERIEL ET METHODES

Les souches de D. helianthi proviennent de nombreux isollements effectués à partir de tiges de Tournesol parasitées dans le Lauragais ainsi que d'isollements d'origine yougoslave et roumaine. Pour l'étude plus précise des conditions de formation des périthèces, les souches lauragaises A, D, P et la souche yougoslave NS ont été retenues. Des isolats monospores ont été réalisés à partir d'ascospores en germination sur eau

gélifiée. Les ascospores sont prélevées dans les exsudats de périthèces produits sur tiges infectées ou en culture.

Des milieux de culture variés ont été utilisés : Malt Agar, Potato Dextrose Agar (PDA), Oat Meal Agar (à 20 g/l de farine d'avoine), milieu plante-hôte (fragments de tiges mortes de Tournesol non infectées, stérilisés et déposés sur eau gélifiée), milieu synthétique élaboré pour réaliser le cycle biologique de *Gnomonia leptostyla* (Fayret, 1975) et de composition suivante : KH_2PO_4 : 0,8 g ; $\text{Ca}(\text{P}_{04}\text{H}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,01 g ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,005 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,001 g ; L-alanine : 0,15875 g ; L-sérine : 0,1875 g ; D-glucose : 5 g ; thiaminé : 100 μg ; biotine : 5 μg ; eau distillée : qsp 1000 ml ; gélose : 20 g ; pH ajusté à 6 avec NaOH N/10. Les milieux sont répartis en tubes (220 x 20 mm), inclinés après stérilisation, ou en boîtes de Pétri. L'ensemencement est réalisé avec 1 ml de suspension de conidies et de fragments mycéliens à partir de cultures sur PDA.

L'incubation des cultures s'effectue dans des enceintes thermostatées aux températures constantes de 15-20-23-27 ou 30°C. Les cultures sont placées soit à l'obscurité, soit sous photopériodes de lumière blanche fluorescente de 14 h par jour (énergie lumineuse de 500 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ en moyenne au niveau des cultures).

RESULTATS

1 - Production de pycnides : Pour toutes les souches utilisées, tous les milieux de culture produisent des pycnides en général au bout d'une semaine. Cependant les milieux Malt Agar et PDA se sont montrés plus favorables à la pycnidogénèse. Quand les cultures sont placées à différentes températures, il se produit une complète inhibition de la formation des pycnides à 30°C. On n'observe pas par contre de variations quantitatives significatives à 15-20-23°C. Dans les cultures éclairées, il apparaît avec toutes les souches une augmentation importante du nombre de pycnides. Cette photostimulation se manifeste aussi par la différenciation plus rapide des pycnides : elles apparaissent dès le 5e jour à la lumière et vers le 7e jour à l'obscurité.

Tableau 1 - Evolution de la conidiogénèse (conidies α et β) à la lumière et à l'obscurité. Cultures sur PDA à 23°C.

Conditions de culture	Jours											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Lumière	+	+	+	α	α	α	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$	β	β	β	β
Obscurité	-	+	+	+	+	+	α	α	α	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$	β

+ présence de pycnides - absence de pycnides

Le tableau 1 indique la nature des conidies observées à 23°C dès que commence la conidiogénèse. Pour toutes les souches et avec tous les milieux cultureux, à la lumière ou à l'obscurité, les pycnides ne produisent d'abord que des conidies α qui restent toujours en nombre restreint. On assiste ensuite à une différenciation des conidies β . Après 48 h de coexistence avec les conidies α , les conidies β sont seules présentes et deviennent alors très abondantes. La même évolution de la conidiogénèse se produit aux températures de 15 et 20°C.

2 - Production de périthèces. Nous avons obtenu ces fructifications en nombre restreint avec les substrats Malt Agar et PDA en réduisant les concentrations à 10 g/l. Sur Oat Meal Agar, ils peuvent se former en abondance mais par contre ils apparaissent toujours de façon très hétérogène et sont souvent enfouis dans la gélose, ce qui a limité l'intérêt de ce milieu. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec le milieu

plante-hôte et le milieu synthétique. Le comptage des périthèces est effectué au 35^e jour de culture (au 45^e jour à 15°C où le développement est retardé). Sur plante-hôte, le nombre de périthèces est rapporté à 10 cm² de substrat.

Avec le milieu plante-hôte (figure 1), on constate :

- une absence totale de périthèces à 30 et 15°C ;
- la formation de périthèces à 20 et 23°C mais avec d'importantes variations selon les souches. La température de 20°C apparaît la plus favorable ;
- une nette stimulation de la morphogenèse périthéciale sous irradiation par la lumière blanche (sauf pour la souche P à 23°C).

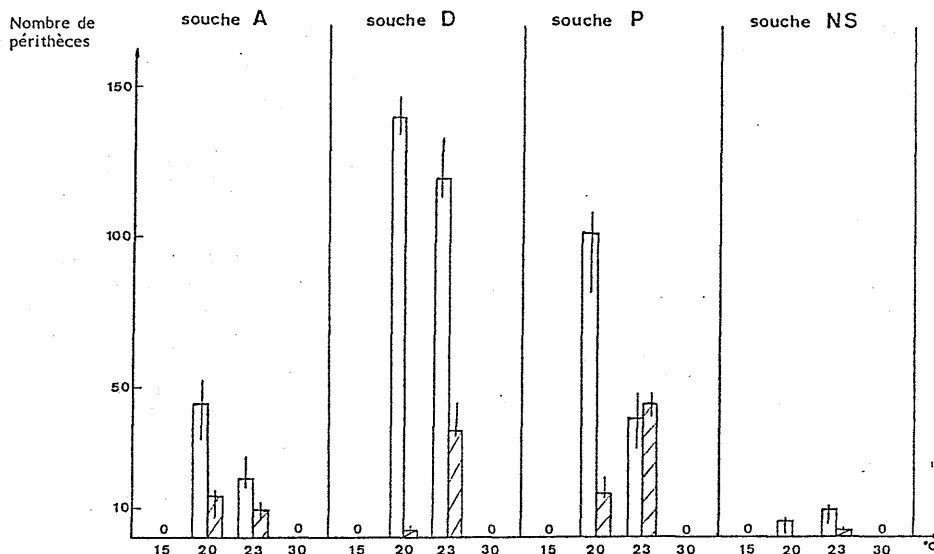


Fig. 1 : Production de périthèces sur milieu "plante-hôte". Chaque rectangle représente le nombre moyen de périthèces obtenus dans trois tubes et le trait vertical indique les valeurs extrêmes (en blanc : cultures éclairées ; en hachuré : cultures à l'obscurité).

Avec le milieu synthétique (figure 2) on note que :

- la température de 27°C, qui dans cette expérimentation a été substituée à celle de 30°C, s'avère pour toutes les souches totalement inhibitrice de la différenciation des périthèces ;
- aux températures de 20 et 23°C, si les périthèces se forment à l'obscurité, la lumière blanche stimule leur développement. La température de 20°C apparaît optimale. On observe encore d'importantes variations selon les souches ;
- à 15°C les périthèces peuvent se différencier mais ils nécessitent alors une photo-induction.

Quelles que soient les conditions de température, d'éclairage ou la nature du substrat, les périthèces parviennent à maturité en général au bout d'un mois de culture. Ils produisent alors un grand nombre d'ascospores à pouvoir germinatif élevé, de l'ordre de 80 %.

La formation des périthèces étant en général précédée dans la nature d'une période de froid, nous avons soumis des cultures sur milieu synthétique, à 20°C et à la lumière, à des séjours à 4°C avec des durées variables et à des moments différents (figure 3).

En aucun cas le froid n'a d'effet stimulant sur la production des périthèces. La période de froid retarde seulement d'une période égale l'apparition des périthèces. La durée du séjour à 20°C nécessaire à la formation des périthèces reste constante (21 jours), ainsi que celui qui conduit à leur maturation (6-7 jours).

3 - Comportement des souches monospores : Selon leur origine, deux catégories d'isolats monoascospores ont été expérimentés : 26 proviennent de périthèces formés sur tiges malades, 7 de périthèces produits in vitro. Après 35 jours de culture sur milieu synthétique à 20°C et à la lumière, 12 isolats de la première catégorie et 7 de la deuxième ont différencié des périthèces. Les périthèces ne sont jamais apparus sur les isolats stériles après croisement entre eux ou confrontation avec les souches monospores fertiles. Ces résultats montrent que seul l'existence d'un homothallisme peut être mis en évidence chez D. helianthi.

DISCUSSION

Cette étude fait apparaître que le cycle biologique complet de D. helianthi peut être réalisé in vitro. En ce qui concerne la conidiogénèse, si les deux types de conidies caractéristiques de l'anamorphe Phomopsis ont été obtenues en culture, les conidies α ne se forment jamais en grand nombre. Muntanola-Cvetkovic et al. (1985) n'ont pu produire qu'occasionnellement ces conidies α in vitro. Par contre, Acimovic et Straser (1982) ont montré que certaines souches différencient les deux types de conidies à la lumière mais seulement des conidies β à l'obscurité. De ces résultats, il apparaît que le déterminisme de ces deux types de conidiogénèse reste à élucider.

En ce qui concerne la formation des périthèces, notre étude constitue une première approche du déterminisme de leur différenciation. Leur stimulation sous lumière blanche fait apparaître une photosensibilité de cette morphogénèse. La température de 20°C s'est révélée être de façon régulière la température optimale. Un fait à souligner est que, contrairement à d'autres Pyrénomycètes qui différencient leurs ascocarpes pendant la saison froide (Fayret, 1975 ; Ross et Hamlin, 1962), cette différenciation ne nécessite pas de cryo-induction chez D. helianthi. Cette observation justifie l'hypothèse formulée par Maric et al. (1982). Les séjours à 4°C des cultures de ce champignon ne font en effet qu'interrompre momentanément le développement de ces organes sexués. A partir de ces résultats in vitro, on peut considérer que dans la nature, où des protopérithèces sont formés dès le mois de novembre, le froid stoppe leur développement en périthèces jusqu'au printemps.

La formation de périthèces sur les isolats monoascospores de D. helianthi montre un phénomène d'homothallisme chez cette espèce. Dans le genre Diaporthe, ce même caractère a été seulement précisé pour D. phaseolorum var. batatatis (Kulik, 1984). L'existence d'un homothallisme signifie que toutes les tiges de Tournefortia parasitées par D. helianthi sont capables de produire des périthèces lors de conditions climatiques favorables. Un autre facteur qui influence la production des périthèces est la nature du substrat nutritif. Celui-ci peut représenter un paramètre déterminant comme Timnick et al. (1950) l'ont aussi souligné pour D. phaseolorum var. batatatis. Avec D. helianthi, en comparant les résultats obtenus avec le milieu plante-hôte et le milieu synthétique, on constate une quantité de périthèces très variable selon les souches.

CONCLUSION

Malgré la variabilité du comportement des souches selon la nature du milieu nutritif, la production des périthèces de D. helianthi peut être maîtrisée in vitro en contrôlant certains facteurs de l'environnement. Il est donc possible d'obtenir des ascospores à pouvoir germinatif élevé indépendamment du cycle naturel. Connaissant le rôle épidémiologique primordial des ascospores, on peut dès lors envisager une meilleure étude expérimentale des modalités de l'infection dans cette grave maladie du Tournefortia.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le CETIOM, Paris, pour le soutien financier qui a permis la réalisation de ce travail.

REFERENCES

- Acimovic M., Straser N., 1982, Phomopsis sp. A new parasite in sunflower. *Zastita Bilja*, 33 : 117-158.
- Assémat P., 1986, Contribution à l'étude de la biologie de Diaporthe helianthi (Phomopsis helianthi) Munt.-Cvet., parasite du Tournesol. D.E.S. Univ. P. Sabatier, Toulouse.
- Fayret J., 1975, Etude du cycle de reproduction du Gnomonia leptostyla (Fr) Ces. et de Not. Déterminisme et physiologie. Thèse Doct. Etat, Toulouse.
- Herr L.J., Lipps P.F., Watters B.L., 1983, Diaporthe Stem Canker of Sunflower. *Plant Disease*, 67 : 911-913.
- Kulik M.M., 1984, Symptomless infection, persistence and production of pycnidia in host and non-host plants by Phomopsis batatae, Phomopsis phaseoli and Phomopsis sojæ and the taxonomic implications. *Mycologia*, 76 : 274-291.
- Lamarque C., Perny R.A., 1985, Nouvelle maladie du Tournesol : le Phomopsis. *Cultivar*, 179 : 57-59
- Maric A., Masirevic S., Su Li, 1982, Contribution to the study of Phomopsis spp. (Diaporthe sp.) The causer of gray spot of sunflower stem. *Zastita Bilja*, 33 : 403-419.
- Mihaljcevic M., Muntanola-Cvetkovic M., Petrov M., 1980, Phomopsis sp., a new parasite of sunflower in Yugoslavia. *Savremena Poljopriveda*, 28 : 531-539.
- Muntanola-Cvetkovic M., Mihaljcevic M., Vukojevic J., Petrov M., 1985, Comparisons of Phomopsis isolates obtained from sunflower plants and debris in Yugoslavia. *Transactions of the British Mycological Society*, 85 : 477-483.
- Ross R.G., Hamlin S.A., 1962, Production of perithecia of Venturia inaequalis (Cke) Wint. on sterile apple leaf discs. *Canadian Journal of Botany*, 40 : 629-635.
- Su Li, Maric A., Masirevic S., 1985, Biological and epidemiological studies of Phomopsis sp. (Diaporthe sp.). *Zastita Bilja*, 36 : 357-370.
- Timnick M.B., Lilly V.G., Barnett H.L., 1950, Factors affecting sporulation of Diaporthe phaseolorum var. batatatis from soybean. *Phytopathology*, 41 : 327-336.
- Yang S., Berry R.W., Lutrell E.S., Vongkaysone T.A., 1984, A new sunflower disease in Texas caused by Diaporthe helianthi. *Plant disease*, 68 : 254-255.