

Intérêt des racines transformées pour le maintien du pouvoir pathogène de quelques agents cryptogamiques

PM Molot *, JP Leroux, M Conus, A Burgerjeon-Glandard

INRA, station de pathologie végétale, domaine Saint-Maurice, BP 94, 84140 Montfavet, France

(Reçu le 29 octobre 1989; accepté le 26 décembre 1989)

Résumé — Trois champignons dont le pouvoir pathogène en culture artificielle ne se maintient pas de façon satisfaisante, ont été expérimentés : *Pyrenochaeta lycopersici*, *Phytophthora infestans* et *Rhizoctonia violacea*. Sauf pour *P. lycopersici*, la conservation sous azote liquide est impossible ou très aléatoire; les techniques de maintien en condition anaérobie ne conviennent guère (et encore avec des réserves) qu'à *P. infestans*. Pour les 3 parasites, nous avons utilisé avec succès la culture associée du champignon et de racines transformées. Cette technique permet, dans la majorité des cas, un léger gain d'agressivité. Plusieurs cultures de racines transformées ont été expérimentées : tomate, pomme de terre, carotte, betterave à sucre et endive. Après passages répétés sur ces cultures, nous n'avons observé ni préférence, ni adaptation parasitaire. L'intérêt des cultures associées en phytopathologie est discuté.

***Pyrenochaeta lycopersici* / *Phytophthora infestans* / *Rhizoctonia violacea* / tomate / pomme de terre / carotte / betterave à sucre / endive**

Summary — Use of transformed roots to preserve the pathogenicity of fungal cultures. Alternative means were sought to preserve 3 fungi, *Pyrenochaeta lycopersici* (tab I), *Phytophthora infestans* (tab II) and *Rhizoctonia violacea* (tab III) the pathogenicity of which is not maintained satisfactorily in artificial culture. With the exception of *P. lycopersici*, preservation in liquid nitrogen is either not possible or very uncertain; maintenance in anaerobic conditions may suit *P. infestans* only if at all. We successfully maintained the 3 pathogens in culture on transformed roots; with this method, the aggressiveness of the strains is maintained, and nearly always slightly increased, and it is not necessary to inoculate and reisolate from host plants in the greenhouse. Several cultures of transformed roots have been tested : tomato, potato, carrot, sugar-beet and endive. After repeated transfers on these cultures, no parasitic specialization was observed. The interest of mixed cultures is discussed.

***Pyrenochaeta lycopersici* / *Phytophthora infestans* / *Rhizoctonia violacea* / tomato / potato / carrot / sugar-beet / endive**

INTRODUCTION

Pour les phytopathologistes, le maintien en bonne condition d'une collection d'agents cryptogamiques en culture artificielle soulève des problèmes dont la solution n'est pas toujours aisée : — choix d'un milieu favorable à la croissance mycélienne ou à la fructification du champignon (les 2 milieux étant souvent différents) ; — détermination des conditions optimales de développement, notamment température, qualité de la lumière, photopériode, etc. Il convient également de s'assurer que la souche est totalement indem-

ne de pollutions (certaines bactéries étrangères pouvant s'exprimer sur un milieu et pas sur un autre).

Conserver une souche nécessite en outre, dès que celle-ci commence à vieillir, des repiquages dont la fréquence peut, dans certains cas, être très élevée (toutes les 3 semaines par exemple). Or de nombreuses observations ont montré qu'après plusieurs repiquages successifs, beaucoup de champignons perdaient fréquemment une partie, sinon la totalité de leur pouvoir pathogène. Pour y apporter un remède, il importe donc de réduire, voire même de supprimer les repi-

* Correspondance et tirés à part

quages grâce à des techniques spéciales : utilisation du froid (azote liquide ou lyophilisation), mise des cultures sous eau ou sous huile. Ces techniques ne sont malheureusement pas applicables à tous les champignons.

Si l'on choisit de repiquer régulièrement une souche, il est toujours possible de lui redonner son pouvoir pathogène initial en effectuant une contamination artificielle sur une plante hôte et en pratiquant un nouvel isolement de la souche. Mais cette technique est longue et sujette à des risques de pollution, donc de perte de souche, surtout si l'on a à faire à des parasites racinaires (Molot, 1973).

Dans ce dernier cas, une solution élégante peut être trouvée dans l'emploi des racines transformées. En utilisant des *hairy roots*, autrement dit des racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes*, il est commode de cultiver *in vitro* des racines et ce en l'absence de la bactérie (Tepfer et Tempe, 1981) : les racines induites par *A. rhizogenes* sont génétiquement transformées, car la bactérie intègre de manière durable, dans le génome des cellules qu'elle infecte, un fragment de son ADN, le T-DNA, porté par un plasmide pathogène Ri (Chilton *et al*, 1982).

In vitro, les racines transformées se caractérisent par de nombreuses ramifications latérales, l'abondance de leurs poils absorbants et leur tendance à pousser horizontalement. Elles se prêtent facilement à des études *in vitro*, en modèle réduit, de la rhizosphère.

Leur utilisation dans l'étude des symbiotes obligatoires et dans la compréhension des processus d'infection a déjà fait l'objet d'applications intéressantes. Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (champignons V A) établissent, avec les racines de la plupart des espèces végétales, une association symbiotique vitale. Leur culture pure est impossible, mais en revanche l'association *in vitro* entre des racines transformées de *Calystegia sepium* et 2 endomycorhizes VA, *Glomus mosseae* et *Gigaspora margarita*, a été réalisée avec succès (Mugnier et Mosse, 1987 ; Bécard et Fortin, 1988). De plus, d'autres champignons, parasites obligatoires de racines, peuvent être étudiés de façon précise grâce aux *hairy roots* : *Plasmodiophora brassicae*, agent causal de la hernie des Crucifères (Mugnier, 1987a) et *Polymyxa betae*, vecteur du *Beet Necrotic Yellow Vein Virus* (BNYVV) responsable de la rhizomanie de la betterave (Yacoub, 1987 ; Mugnier, 1987a). Enfin, grâce au système des cultures bicompatimentées, une meilleure approche des relations hôte-parasite sur cultures associées de racines transformées et de champignons du sol, a été entreprise : *Phytophthora*,

Pythium, *Fusarium*, *Rhizoctonia* (Mugnier, 1987b)

Dans le cadre de cette étude, nous nous proposons de cultiver sur racines transformées de diverses plantes, quelques parasites dont le pouvoir pathogène apparaît, après plusieurs repiquages sur milieux classiques, assez instable. Nous avons utilisé 2 champignons racinaires : *Pyrenochaeta lycopersici*, agent du corky root de la tomate et *Rhizoctonia violacea*, responsable de dépérissements chez de nombreuses plantes, ainsi qu'un parasite plutôt inféodé aux parties aériennes : *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de plusieurs Solanacées. Nous porterons principalement notre attention sur l'évolution du pouvoir pathogène de ce matériel fongique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Nous avons expérimenté sur 3 agents cryptogamiques phytopathogènes : *Pyrenochaeta lycopersici* (9 souches), *Phytophthora infestans* (5 souches), *Rhizoctonia violacea* (2 souches). Les caractéristiques de chacune de ces souches sont décrites dans le tableau I.

Afin de tester le pouvoir pathogène, nous avons utilisé pour :

- *Pyrenochaeta lycopersici* : des racines de jeunes tomates (var. Monalbo) ;
- *Phytophthora infestans* : des feuilles en survie ou des plantes entières de tomate (var. Monalbo) ou de pomme de terre (var. Bintje). Il s'agit alors de plantes élevées en serre et âgées de 4 semaines ;
- *Rhizoctonia violacea* : des racines de carotte (var. Touchon), des racines de betterave à sucre (ITB n° 3368), des tubercules de pomme de terre (var. Bintje).

Dans ce cas, carottes et pommes de terre proviennent de plantes à maturité, tandis que les racines de betterave sont prélevées sur des plantes élevées en serre et âgées de 2 mois.

Culture de racines transformées

Nous avons utilisé différentes cultures de racines transformées correspondant aux plantes suivantes : carotte, pomme de terre, betterave, tomate, endive. Ces cultures nous ont été aimablement communiquées par M. Mugnier de la société Rhône-Poulenc Agrochimie. Elles sont conservées sur milieu liquide à l'obscurité et sans agitation. Au moment de leur utilisation, on les transfère sur un milieu gélosé de même composition ne renfermant pas d'hormone (tableau II).

Lorsque la culture de racines atteint dans la boîte de Petri un diamètre voisin de 5 cm, on dépose à la surface des tissus un ou plusieurs implants provenant d'une culture mycélienne classique sur milieu nutritif gélosé. A partir de ces implants se développent des colonies fongiques strictement inféodées à la croissance

Tableau I. Caractéristiques des différentes souches.

	<i>Souche</i>	<i>Année</i>	<i>Isolement</i>	<i>Plante</i>	<i>Lieu</i>
<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	7	1982		Tomate	Montfavet (84)
	57	1985		Tomate	Canaries (Espagne)
	59	1986		Tomate	Montfavet (84)
	60	1985		Salade	Montfavet (84)
	60 bis	1985		Tomate	Montfavet (84)
	62	1985		Melon	Les Vignères (84)
	64	1985		Salade	Montfavet (84)
	68	1986		Tomate	Montfavet (84)
	72	1987		Tomate	Eyragues (13)
<i>Phytophthora infestans</i>	LQ 2	1983		Tomate	Bouches-du-Rhône (13)
	RP	1985		Tomate	?
	SL	1983		Tomate	Sainte-Livrade (47)
	855	1981		Tomate	?
	VIL	1984		Tomate	Lot (46)
<i>Rhizoctonia violacea</i>	VN 78	1978		Asperge	Vaison-la-Romaine (84)
	DR 80	1980		Asperge	Nyons (26)

Tableau II. Composition du milieu adapté à la culture de racines transformées.

<i>Macro-éléments de Murashige et Skoog (mg/L)</i>		
NO ₃ NH ₄	1650	Nitrate d'ammonium
KNO ₃	1900	Nitrate de potassium
Ca Cl ₂ 6H ₂ O	440	Chlorure de calcium
Mg SO ₄ 7H ₂ O	370	Sulfate de magnésium
KH ₂ PO ₄	17	Phosphate monopotassique
Na ₂ EDTA	37,3	EDTA sel disodique
Fe SO ₄ 7H ₂ O	27,8	Sulfate ferreux
<i>Micro-éléments de Murashige et Skoog (mg/L)</i>		
H ₃ BO ₃	6,2	Acide borique
Zn SO ₄ 4H ₂ O	8,6	Sulfate de zinc
Mn SO ₄ 4H ₂ O	22,6	Sulfate de manganèse
IK	0,83	Iodure de potassium
Na ₂ Mo O ₄ 2H ₂ O	0,35	Molybdate de sodium
SO ₄ Cu 5H ₂ O	0,025	Sulfate de cuivre
Co Cl ₂ 6H ₂ O	0,025	Chlorure de cobalt
<i>Vitamines de Morel (mg/L)</i>		
Calcium pantothénate	1	
méso-Inositol	100	
Biotine	0,01	
Acide nicotinique	1	
Pyridoxine HCl	1	
Thiamine HCl	1	
<i>Acide indolbutyrique</i>	1 mg/L	
<i>Saccharose</i>	30 g/L	
<i>AGAR</i>	8 g/L	
<i>pH</i> 6,5		

ce racinaire (le milieu pour les cultures de racines ne convenant généralement pas aux champignons). Au bout de 15 jours de confrontation, on repique, après découpage à l'emporte-pièce, des implants (racines + champignon) sur une culture vierge de racines. Plusieurs repiquages successifs sur racines d'un même hôte peuvent ainsi être pratiqués (dans certains cas, jusqu'à 6).

Contrôle du pouvoir pathogène

Après plusieurs repiquages sur milieu classique ou sur racines transformées, l'agressivité des différentes souches est appréciée par des tests de laboratoire ou de serre.

Au laboratoire

Pyrenochaeta lycopersici : des implants mycéliens calibrés sont mis au contact de jeunes racines de tomate issues directement d'une germination *in vitro* selon une technique décrite par ailleurs (Clerjeau et Conus, 1973). La lecture des symptômes s'effectue selon le barème suivant :

- 0 = rien;
- 1 = nécrose sous implant;
- 2 = nécrose commençant à dépasser l'implant;
- 3 = nécrose plus longue demeurant marron clair;
- 4 = nécrose nette, brun foncé, partant des 2 côtés de l'implant.

Phytophthora infestans : des folioles de l'étage moyen, prélevées sur des tomates âgées de 4 semaines, sont mises en survie sur de l'eau, en boîte de Petri. Au centre du limbe et sur une légère blessure, on dépose un implant calibré d'une culture mycélienne ($\varphi = 0,4$ cm) à partir duquel se développe une nécrose tissulaire dont on mesure le diamètre.

Rhizoctonia violacea : des tubercules de pomme de terre, des racines de carotte ainsi que des racines de betterave (âgées de 2 mois) sont désinfectés superficiellement à l'alcool. A leur surface et sans pratiquer de blessure, on dépose un implant calibré de culture mycélienne ($\varphi = 0,6$ cm). Les hyphes se développent en donnant une colonie circulaire dont on mesure le diamètre.

En serre (*P infestans* uniquement)

Sur des plantes âgées de 4 semaines (pomme de terre ou tomate), on pulvérise une suspension de sporanges ajustée pour chaque souche à 10 000/mL. L'incubation est réalisée en chambre humide à 18 °C sous un éclairage faible. L'appréciation des symptômes s'effectue en attribuant à chaque plante une note visuelle globale allant de 0 (pas de maladie) à 5 (mortalité).

RÉSULTATS

Pyrenochaeta lycopersici (Tableau III)

Sur 9 souches expérimentées, nous constatons qu'après repiquage sur milieu classique, toutes ont perdu leur agressivité. En revanche, 6 passages successifs sur racines transformées la maintiennent à un bon niveau. Par rapport au test de contrôle de départ, 4 souches (7, 57, 60 bis, 62) se révèlent légèrement plus agressives, tandis que 2 autres (68, 72) semblent un peu moins pathogènes. Remarquons que les racines d'endive, expérimentées sur 2 souches seulement, sembleraient capables, au même titre que les racines de tomate, de conserver les potentialités du matériel cryptogamique. Parallèlement à ces essais, nous avons pu, après conservation pendant 6 mois sans repiquage à 4 °C, freiner les pertes d'agressivité qu'il est courant d'observer en conditions classiques.

Phytophthora infestans (Tableau IV)

Le pouvoir pathogène des implants mycéliens obtenus après repiquage soit sur milieu normal (avoine, pois chiche), soit sur racines transformées (tomate ou pomme de terre) a été contrôlé simultanément sur tomate et pomme de terre. On remarque, pour les 5 souches étudiées, qu'après passages répétés sur racines transformées, il y a une nette augmentation d'agressivité. Cette hausse s'observe surtout sur feuilles en survie,

Tableau III. Evolution de l'agressivité de 11 souches de *Pyrenochaeta lycopersici* en fonction du mode de repiquage. L'agressivité est exprimée par rapport à de jeunes racines de tomate (note de 0 à 4). - = absence de mesures.

Numéro des sources	Au départ	Au bout de 6 mois			
		Après repiquage sur :			Sans repiquage (conservation + 4 °C)
		Milieu classique	Racines transformées de		
		Tomate	Endive		
7	0,8	0	1,3	-	0
57	3,2	0	4	-	2,6
59	3	0	3	-	2,4
60	0,8	0	0,6	-	0,6
60 bis	1,2	0	1,5	1,1	1
62	0,9	0	2,4	-	0,7
64	2,3	0	2,4	2,2	2,3
68	2,9	0	1,6	-	2,9
72	2,8	0	2,2	-	1,8

sans doute à cause de la plus grande sensibilité du test. Les résultats ne montrent pas de différence entre racines transformées de tomate ou de pomme de terre.

gnon acquiert une spécificité parasitaire. Par exemple, après passage sur racines de carotte, son agressivité se trouve augmentée, mais aussi bien sur carotte que sur d'autres plantes (pomme de terre ou betterave à sucre).

Rhizoctonia violacea (Tableau V)

DISCUSSION - CONCLUSION

La souche VN 78 est plus agressive que la souche DR 80 et, d'une façon générale, la sensibilité des plantes hôtes dans l'ordre décroissant est la suivante : carotte, betterave, pomme de terre. Comme pour les 2 champignons précédents et quelle que soit la souche considérée, il apparaît qu'après passages sur racines transformées, la souche augmente d'agressivité par rapport à la même souche repiquée sur milieu classique. Cependant, il ne semble pas qu'après passage sur racines transformées, le champi-

En dépit du caractère assez restreint de notre étude faisant intervenir 3 champignons, chacun d'eux ayant été repiqué 6 fois sur diverses racines transformées, nous avons pu constater que, mis à part quelques souches, il y avait dans la grande majorité des cas, non seulement maintien de l'agressivité, mais encore assez souvent une augmentation de cette dernière. Confronté au problème de vieillissement des souches, il apparaît donc tout à fait possible d'éviter ainsi un

Tableau IV. Influence de 2 modes de repiquage (sur racines transformées ou sur milieu classique) sur le pouvoir pathogène de 5 souches de *Phytophthora infestans* vis-à-vis de la tomate (var. Monalbo) ou de la pomme de terre (var. Bintje). Sur feuilles en survie, on mesure le diamètre des nécroses en mm. Sur plantes entières, la sensibilité est exprimées par une note de 0 à 5.

Plante hôte testée	Six passages sur racines transformées de :											Six repiquages sur milieu classique (avoine, pois-chiche)							
	Tomate						Pomme de terre												
	LQ2	RP	SL	855	VIL	Moy	LQ2	RP	SL	855	VIL	Moy	LQ2	RP	SL	855	SL	Moy	
Tomate	Feuilles en survie	-	12,8	30,5	16,4	8,8	17,1	3,7	9,1	43,3	17,8	8,6	16,5	2,2	6,1	11,8	6,8	7,7	6,9
	Plantes entières	-	1,3	3,3	2,3	1,1	2	0,1	1	3,4	2,8	1	1,6	0	1,1	3	1,7	0,35	1,2
Pomme de terre	Plantes	-	1,9	2,9	2,4	2,4	2,4	2,0	1,7	3,0	2,5	2,5	2,3	0,35	1,75	2,7	2,3	2,4	1,9

Tableau V. Influence de 2 modes de repiquage (sur racines transformées ou sur milieu classique) sur les contaminations artificielles par 2 souches de *Rhizoctonia violacea*. Les croissances mycéliennes sur racines (carotte, betterave) ou tubercules (pomme de terre) sont exprimées en mm. A = souche DR 80 de *R violacea*; B = souche VN 78 de *R violacea*.

Plante hôte testée	Six passages sur racines transformées de :								Six repiquages sur milieu classique			
	Carotte		Pomme de terre		Betterave		Tomate					
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Carotte	30,0	29,5	25,6	30,3	21,1	29,6	25,7	27	22,6	23,9		
Pomme de terre	3,2	4,9	3,7	4,1	3,2	4,7	5,0	5,4	2,5	4,2		
Betterave à sucre	14,7	17,9	18,1	19,9	16,2	16,4	17,3	19,4	12,7	14,7		

«repassage» sur l'hôte, en conditions généralement non stériles, opération toujours délicate, surtout lorsqu'il s'agit d'un parasite racinaire.

A l'image des racines normales, les racines transformées sont le lieu de synthèse de nombreux métabolites secondaires, notamment d'alcaloïdes tropaniques (Hammil *et al*, 1986). On comprend dès lors qu'elles soient propices à la croissance mycélienne de nombreux champignons. Cependant, le fait qu'elles soient incapables de synthétiser les substances produites par les parties aériennes et aussi qu'elles soient 100 à 1 000 fois plus sensibles aux auxines (Shen *et al*, 1988) que les racines normales, explique peut-être que nous n'ayons jamais observé d'adaptation parasitaire après passages répétés sur racines transformées d'un hôte donné.

Malgré les avantages offerts (notamment gain d'agressivité), les repiquages sur racines transformées représentent une technique lourde qu'il convient de ne réserver qu'à quelques cas d'espèces, chaque fois que le recours à des techniques plus simples est impossible. A ce propos, nous avons résumé dans le tableau VI, le comportement des 3 champignons étudiés après séjour dans l'azote liquide ou après immersion sous eau stérile.

Les observations recueillies ici montrent que si la culture sur racines transformées est inutile avec *Pyrenochaeta lycopersici* que l'on conserve très bien dans l'azote liquide, en revanche elle peut offrir des avantages substantiels avec *Rhizoctonia violacea* ou *Phytophthora infestans*. Cette étude mériterait d'être poursuivie avec d'autres champignons.

RÉFÉRENCES

- Becard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108, 2, 211-218
- Clerjeau M, Conus M (1973) Méthode rapide de contamination de jeunes plantules de tomates par *Pyrenochaeta lycopersici* Schneider et Gerlach. *Ann Phytopathol* 5, 2, 143-150
- Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempe J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. *Nature* 295, 432-434
- Hammil JD, Parr AJ, Robins RJ, Rhodes MJC (1986) Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 5, 111-114
- Molot PM (1973) Mise au point sur *Rhizoctonia violacea*. Biologie du parasite, technique d'inoculation artificielle, possibilités de lutte. CR 4^e réunion Eucarpia Asperge, Versailles, 77-88
- Mugnier J (1987a) Infection by *Polymyxa betae* and *Plasmodiophora brassicae* of roots containing root-inducing transferred DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytopathology* 77, 4, 539-542
- Mugnier J (1987b) Spécificité d'hôte entre *Rhizoctonia solani* et des racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. SFP, 32^e colloque 14-15 Mai, Angers
- Mugnier J, Mosse B (1987) Vesicular arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77, 7, 1 045-1 050
- Shen W, Petit A, Guerin J, Tempé J (1988) Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proc Natl Acad. Sci USA* 85, 3 417-3 421
- Tepfer D, Tempe J (1981) Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*, souche A4. *CR Acad Sci* 292, série III, 153-156
- Yacoub A (1987) Culture *in vitro* de *Polymyxa betae* en association avec des racines de betterave transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. Thèse de doctorat, INA, Paris

Tableau VI. Comportement des 3 champignons étudiés après séjour dans l'azote liquide ou après immersion sous eau stérile. + = repart; - = ne repart pas; ~ = repart (selon la souche); ? = manipulation non réalisée.

	Azote liquide		Mise sous eau pendant	
	Refroidissement brutal	Refroidissement ménagé + glycérol	1 mois	6 mois
<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	+	+	?	?
<i>Phytophthora infestans</i>	-	-	+	~
<i>Rhizoctonia violacea</i>	~	+	-	-