



HAL
open science

Etude d'un comportement atypique de *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. sur vitroplant microbouturé de pommier *Malus x domestica* Bork

Michel Chevalier, Luciana Parisi

► To cite this version:

Michel Chevalier, Luciana Parisi. Etude d'un comportement atypique de *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. sur vitroplant microbouturé de pommier *Malus x domestica* Bork. Bulletin de la Société Botanique de France Lettres Botaniques, 1991, pp.117-122. hal-01601887

HAL Id: hal-01601887

<https://hal.science/hal-01601887>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Etude d'un comportement atypique de *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. sur vitroplant microbouturé de pommier *Malus x domestica* Bork (*)

par Michel CHEVALIER ⁽¹⁾ et Luciana PARISI ⁽²⁾

⁽¹⁾ I.U.T. Département de biologie, Bd Lavoisier, F-49035 Angers

⁽²⁾ I.N.R.A. Station de Phytopathologie, Centre de Recherche d'Angers, F-49070 Beaucozéz

Résumé - Des vitroplants microbouturés de *Malus x domestica* sont contaminés avec une suspension conidienne de *Venturia inaequalis*, agent de la tavelure du pommier. L'évolution de la maladie est suivie grâce à la microscopie électronique à balayage. Dans ces conditions particulières le comportement de l'agent pathogène est modifié. Des aspects atypiques sont observés : multiplication du nombre des appressoriums, mycélium superficiel hétérogène, temps de latence infectieuse très long. L'apparition de lésions faiblement sporulantes, bien que tardive, laisse envisager qu'il est possible de reproduire *in vitro* les symptômes observés en serre.

Summary - *In vitro* micropropagated apple plantlets were sprayed with a conidial suspension of *Venturia inaequalis*, causing agent of apple scab. Disease development was observed by scanning electron microscopy. In these conditions the pathogenic behaviour was modified. Atypical aspects were observed : a great number of appressoria, superficial and heterogen mycelium, with a very long incubation period. The appearance of sporulating lesions, even if late, shows that it is possible to reproduce *in vitro* the symptoms observed in the greenhouse.

Abridged english version - Only a few studies of host-pathogen relationships on plantlets cultivated *in vitro* concern fruit trees (Aldwinckle *et al.*, 1987 ; Paulin et Duron, 1988). Nevertheless, these studies are of a great interest for early selection for disease resistance and for the co-culture of obligate parasites and their hosts. The behaviour of *Venturia inaequalis*, apple scab incitant, on *Malus x domestica* plantlets cultivated *in vitro*, has rarely been taken up (Boone, 1971 ; Beech *et al.*, 1985 ; Beech et Gessler, 1986).

In this study, we have tried to obtain *in vitro* apple scab symptoms comparable with those observed in the greenhouse. If successful, this work would allow a better control of experimental conditions and would permit vitroplantlets experimentation throughout the year ; its applications to resistance selection should be interesting.

Golden Delicious plantlets, micropropagated *in vitro*, were inoculated with a strain of *Venturia inaequalis*. The pathogenic behaviour was observed by scanning electron microscopy.

After the contamination, conidia germinated and formed an appressorium. The mycelium which developed remained superficial and ramified, with a characteristic verrucous appearance (Fig. 1). At this time, no cuticular penetration was observed ; two kinds of mycelial filaments were differentiated (Fig. 2). After 40 days, a solid subcuticular mycelium appeared (Fig. 3 and 4), always accompanied by an abundant superficial felting (Fig. 5). The sporulation arose from subcuticular stroma as well as from superficial mycelium (Fig. 6 and 7).

In the greenhouse, the subcuticular stroma is observed 48 hours after the contamination (Chevalier *et al.*, 1988), whereas *in vitro* it is observed after 40 days.

(*) Manuscrit reçu le 14 septembre 1990 ; accepté le 24 septembre 1990

The multiplication of the number of appressoria, the presence of a superficial and heterogen mycelium, the very long incubation period, and the solid appearance of subcuticular stroma are atypical aspects of *Venturia inaequalis* behaviour.

However, the appearance of sporulating symptoms, even when slow, shows that it is possible to obtain, *in vitro*, an expression of host pathogen relationships. For this reason, this model merits further studies to improve its utilisation.

Key words : *Venturia inaequalis* – apple – *in vitro* – scanning electron microscopy.

*

* *

INTRODUCTION

Les progrès récents des techniques de culture *in vitro* ouvrent des perspectives nouvelles pour l'étude des relations hôte-parasite. C'est notamment le cas de l'étude des relations plantes-microorganismes en conditions contrôlées et la coculture des parasites obligatoires et de leur hôte. La culture *in vitro* peut offrir des possibilités de sélection précoce pour la résistance, à condition d'avoir obtenu une bonne corrélation avec le comportement *in vivo*. Parmi ces études, peu d'exemples concernent les arbres fruitiers à pépins ; peuvent cependant être cités les travaux sur le feu bactérien des pommoides qui ont permis l'étude de la virulence de différentes souches de la bactérie (Aldwinckle *et al.*, 1987) et l'identification des souches pathogènes d'*Erwinia amylovora* après inoculation sur des cals de racine de la variété Golden Delicious (Paulin et Duron, 1986).

De nombreux travaux ont été consacrés au couple *Malus x domestica-Venturia inaequalis* (Williams et Kuc, 1969 ; Boone, 1971), mais peu d'auteurs ont abordé l'étude des relations hôte-parasite *in vitro*. Beech *et al.* (1985) ont pu cependant décrire la croissance de *Venturia inaequalis* sur des cultures de tissus de pommiers sensibles et résistants mais sans parvenir à mettre en évidence des différences importantes.

Bien que les études microscopiques des relations entre *Venturia inaequalis* et son hôte soient nombreuses, seuls Beech et Gessler (1986) ont décrit les symptômes observés en culture *in vitro* après inoculation de cals de tige de pommier. Par ailleurs, Yepes et Aldwinckle (1986) ont pu montrer que les conidies germent, forment un appressorium puis pénètrent la cuticule des feuilles des vitroplants microbouturés mais ils n'ont pu décrire les étapes ultérieures.

Nous avons entrepris de déterminer les conditions d'inoculation de *Venturia inaequalis* permettant d'obtenir sur des vitroplants microbouturés les symptômes observés en serre. Ce travail doit conduire à mieux contrôler les conditions expérimentales, à s'affranchir des contraintes liées au rythme biologique du pommier et à disposer d'un grand nombre d'échantillons aux caractères génétiques homogènes. L'une des applications serait la mise au point d'un test précoce de sélection *in vitro*. Le comportement de *Venturia inaequalis* sur les vitroplants est suivi grâce à la microscopie électronique à balayage.

MATERIEL ET METHODES

I.- Matériel végétal

1°) L'hôte : Les plantules du cv Golden Delicious sont multipliées par microbouturage ; le cycle

de rapiquage est de 5 semaines. Le milieu de culture est celui de Murashige et Skoog (1962) complété en acide gibberellique (0,5 mg/l), B.A.P. (0,5 mg/l) et A.I.B. (0,1 mg/l). Les vitroplants sont placés à $23 \pm 1^\circ\text{C}$ sous un éclairage de 3000 Lux avec une photopériode de 16 h.

2°) *Le Champignon* : La souche de *Venturia inaequalis* utilisée est une souche monospore isolée en 1978 sur la variété Golden Delicious. L'inoculum est obtenu en conditions stériles en fiole de Roux (Keitt et Palmiter, 1938). La suspension conidienne est ajustée avec de l'eau stérile à $3,5 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$.

II.- Les méthodes

1°) *L'inoculation et les prélèvements* : Les vitroplants âgés de trois semaines sont inoculés par pulvérisation de la suspension conidienne jusqu'à la limite du ruissellement ; un lot témoin est pulvérisé avec de l'eau distillée stérile. Les vitroplants sont ensuite maintenus à 18°C et à l'obscurité pendant 48 h, puis replacés dans les conditions habituelles de culture.

Les échantillons sont prélevés 24 h, 6 jours, 15 jours et 40 jours après l'inoculation.

2°) *Les observations en microscopie électronique à balayage* : Les échantillons sont fixés au glutaraldéhyde à 4% dans un tampon Soërensens 0,1 M à pH 7,4 pendant deux heures, sous vide, à 4°C . Après déshydratation les échantillons sont traités par la méthode du point critique (Boyde, 1978). Après métallisation avec de l'or-palladium, ils sont examinés avec un microscope électronique à balayage JEOL J.S.M. 35C.

RESULTATS

I.- Les résultats macroscopiques

Un feutrage mycélien très limité apparaît sur quelques feuilles au bout de 6 jours ; son extension reste très faible jusqu'au seizième jour. Il se développe à la surface de la feuille et ne sporule pas. Ce n'est qu'au bout de 30 à 40 jours après l'inoculation que se différencient des taches aux contours mieux délimités et sporulant faiblement. A ce stade les vitroplants sont âgés de 8 à 9 semaines ; un certain nombre d'entre eux entrent en sénescence.

II.- Les observations en microscopie électronique à balayage

L'observation des feuilles prélevées 24 heures après l'inoculation montre que les conidies donnent naissance à un filament germinatif et à un appressorium peu différents de ceux observés dans les conditions de serre (Chevalier *et al.*, 1988). La cuticule apparaît déchirée en de nombreux points autour de l'appressorium ; il ne se forme pas de stroma subcuticulaire.

Six jours après l'inoculation, le mycélium demeure à la surface de la feuille, il s'est abondamment ramifié ; les hyphes prennent alors un aspect verruqueux (Fig. 1).

Les échantillons prélevés après 16 jours d'incubation montrent deux types de filaments mycéliens (Fig. 2). Des hyphes fortement ramifiés et très adhérents à la surface de la feuille forment un réseau à larges mailles. D'autres hyphes plus nombreux constituent un réseau superficiel à faible cohésion avec la feuille ; ces hyphes peuvent se ramifier abondamment et donner naissance à plusieurs appressoriums. Il n'y a pas de pénétration de la cuticule et à partir des appressoriums de nouveaux hyphes longs et de faible diamètre se différencient (Fig. 2).

Quarante jours après l'inoculation apparaît un substrat subcuticulaire. Les hyphes de faible diamètre semblent jouer un rôle important dans la pénétration de la cuticule ; ils forment un petit appressorium (Fig. 3) puis un cordon subcuticulaire de fort diamètre apparaît. Un stroma compact se développe ensuite (Fig. 4), il est souvent accompagné d'un mycélium superficiel abondant (Fig. 5). Des conidiophores se différencient à partir du stroma subcuticulaire (Fig. 6) ; la conidiogenèse reste peu active. Des conidies peuvent se

former également directement sur le mycélium superficiel (Fig. 7) ; la sporulation présente alors les mêmes aspects que celle observée en fiole de Roux.

DISCUSSION

Macroscopiquement les symptômes décrits sur les vitroplants microbouturés diffèrent de ceux observés en serre où ils apparaissent au bout de 10 à 12 jours sous forme de lésions étendues sporulant abondamment.

Dans les stades précoces, la germination des conidies et la formation de l'appressorium s'effectuent de la même manière que dans le cas des feuilles de pommiers inoculées en serre. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Yepes et Aldwinckle (1986) sur des feuilles de vitroplants microbouturés.

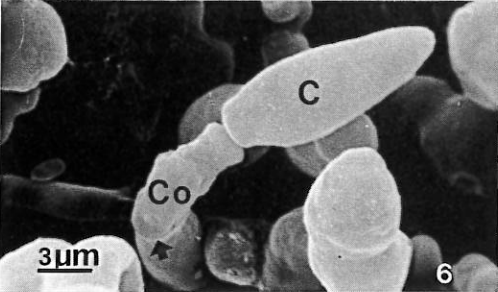
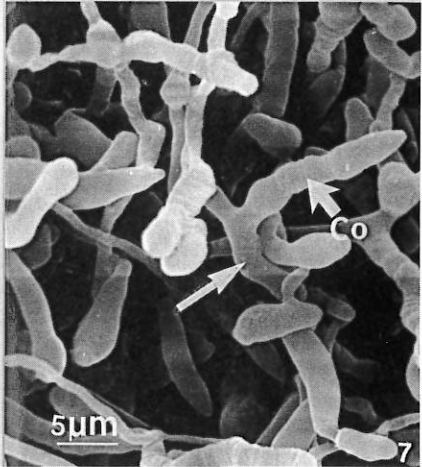
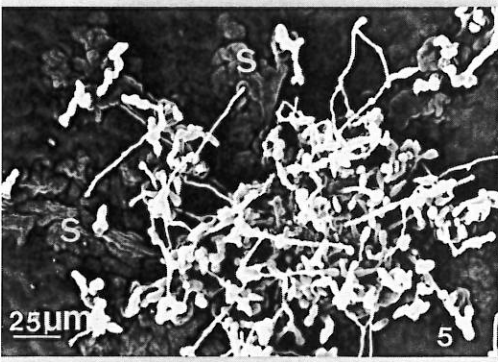
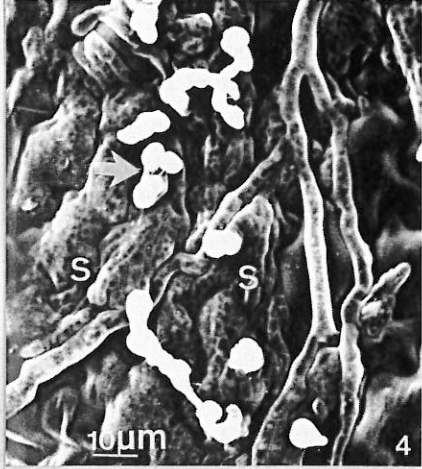
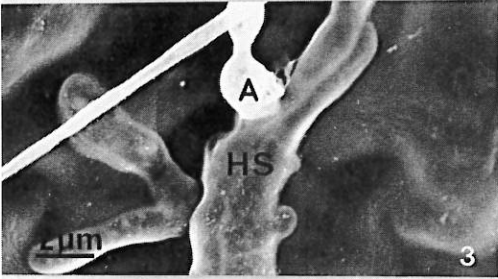
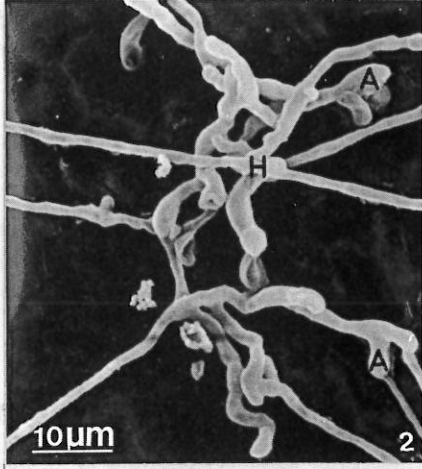
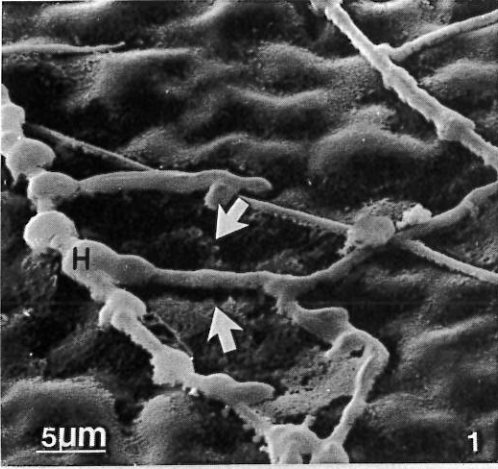
Dans le cas des feuilles de vitroplants microbouturés le nombre d'appressoriums est élevé ce qui est différent des résultats obtenus en serre où les conidies donnent naissance sur les variétés sensibles à un filament germinatif court puis à un seul appressorium (Chevalier, 1988). Par contre, après inoculation de cals de tige de la variété Golden delicious (Beech et Gessler (1986) montrent que le nombre d'appressoriums reste faible.

Le stroma subcuticulaire apparaît en serre dès 48 h après l'inoculation puis il se développe de façon dendritique (Nusbaum et Keitt, 1938 ; Locci et Bisiach, 1971 ; Paul et Brandes, 1983). *In vitro* la différenciation du stroma subcuticulaire ne se produit qu'au bout de 30 à 40 jours ; son aspect est très massif. La sporulation n'est observée que 40 jours après l'inoculation des vitroplants ; elle se produit indifféremment sur le mycélium superficiel et sur les conidiophores issus du stroma subcuticulaire. La conidiogenèse est conforme à celle décrite par Corlett *et al.* (1976) dans le cas de *Malus opa*, espèce très sensible à la tavelure.

Bien que la formation de l'appressorium et la sporulation soient typiques, par de nombreux aspects les vitroplants microbouturés inoculés avec une suspension conidienne de *Venturia inaequalis* conduisent à des comportements atypiques. La multiplication du nombre des appressoriums, l'abondance et le caractère hétérogène du mycélium superficiel, le temps de latence infectieuse

LEGENDES DE LA PLANCHE

- Fig. 1.- Six jours après l'inoculation les hyphes (H) restent superficiels, se ramifient et prennent un aspect verruqueux. La cuticule est déchirée en de nombreux points (flèches).
- Fig. 2.- Le mycélium superficiel, seize jours après l'inoculation, donne naissance à de nombreux appressoriums (A) ; à partir de ces derniers se différencient des hyphes de faible diamètre.
- Fig. 3.- Quarante jours après l'inoculation, un petit appressorium (A) conduit à la formation d'un stroma subcuticulaire massif (HS).
- Fig. 4.- Sur le stroma subcuticulaire (S) compact se différencient quelques conidiophores (flèches).
- Fig. 5.- Le plus souvent le stroma subcuticulaire (S) est accompagné d'un mycélium superficiel abondant.
- Fig. 6.- Un conidiophore court (Co) émerge de la cuticule (flèche) et donne naissance à une conidie (C).
- Fig. 7.- Sur les hyphes superficiels (flèche) les conidies apparaissent sur des conidiophores différenciés (Co).
- Fig. 1.- Six days after inoculation fungal hyphae (H) remains superficial, ramify and gives a verrucous aspect. In many places, the cuticle is torn (arrow).
- Fig. 2.- Superficial mycelium (H), sixteen days after inoculation, gives birth to numerous appressoria (A) from which hyphae of small diameter (arrow) originate.
- Fig. 3.- Forty days after inoculation, a small appressorium (A) has permitted the formation of a massive subcuticular hyphae (HS).
- Fig. 4.- Some conidiophores (arrow) are visible on the compact subcuticular stroma (S).
- Fig. 5.- Subcuticular stroma (S) is often accompanied by a superficial mycelium.
- Fig. 6.- A short conidiophore (Co) emerges from the cuticle (arrow) and gives birth to a conidium (C).
- Fig. 7.- On the superficial hyphae (arrow) conidia are fixed on conidiophores (Co).



Planche

très long et le stroma mycélien subcuticulaire très massif sont autant d'aspects inhabituels de la relation hôte-parasite. Ces observations montrent que les relations tavelure-pommier sont modifiées dans les conditions particulières de la culture *in vitro*. Le milieu de culture très riche, l'atmosphère confinée et l'environnement (température, éclairage) sont autant de facteurs qui influent sur le comportement de l'agent pathogène et le métabolisme de la plante-hôte. La cuticule des vitroplants microbouturés, toujours présente, est très fine. L'installation subcuticulaire tardive pourrait être liée à l'évolution de ces conditions particulières : sénescence des vitroplants, épuisement ou modification du milieu de culture, épaissement de la cuticule...

Ce travail montre qu'il est possible, en dépit du temps de latence très long, d'obtenir une expression de la relation hôte-parasite sur des vitroplants. Cependant les symptômes macroscopiques et microscopiques présentent des aspects atypiques. Afin d'obtenir une expression des symptômes la plus proche possible de celle observée en serre, il sera nécessaire de déterminer le rôle de nombreux facteurs : milieu et conditions de culture, vitroplants microbouturés ou enracinés, choix de la souche et des méthodes d'inoculation. Ce travail conditionne l'élaboration d'un modèle d'étude en conditions *in vitro* dont les applications seraient nombreuses.

BIBLIOGRAPHIE

- ALDWINCKLE H.S., L.M. YEPES et J.L. NORELLI, 1987.- Inoculation de pommiers *in vitro* avec *Venturia inaequalis* et *Erwinia amylovora*. Communication au 32ème colloque de la Société Française de Phytopathologie. Angers 14 -15 mai 1987.
- BEECH I., G. DEFAGO and C. GESSLER, 1985.- Growth of *Venturia inaequalis* on apple tissue culture. *Bot. Helvetica*, **95**, 121 - 124.
- BEECH I. and C. GESSLER, 1986.- Interaction between *Venturia inaequalis* and apple callus cultures : an electron microscopy study. *J. Phytopathology*, **116**, 315 - 322.
- BOONE D.M., 1971.- Genetics of *Venturia inaequalis*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **9**, 297 - 318.
- BOYDE A., 1978.- Pros. and cons. of critical point drying and freeze drying for S.E.M. *Proc. S.E.M. Symp.*, On Jakari (edit), 1978, chap. 1.
- CHEVALIER M., 1988.- Contribution à l'étude des relations hôte-parasite dans le cas du couple *Malus x domestica* - *Venturia inaequalis* : étude histologique et cytologique de deux cas de résistance dépendant des gènes Vf et Vm. Thèse doctorat Université de Nantes, 229 p.
- CHEVALIER M., Y. LESPINASSE, J.M. OLIVIER et S. RENAUDIN, 1988.- Etude histologique et cytologique en microscopie optique et électronique de l'interaction *Malus-Venturia inaequalis* dans le cas d'une résistance verticale à hérédité simple. 7ème colloque sur les recherches fruitières, C.T.I.F.L. - I.N.R.A., Bordeaux, 2 - 3 décembre 1987.
- CORLETT M., J. CHONG and E.C. KOKO, 1976.- The ultrastructure of the *Spilocea pomi* state of *Venturia inaequalis*. *Can J. Microbiol.*, **22**, 1144 - 1152.
- KEITT G.W. and D.H. PALMITER, 1938.- Heterothallism and variability in *Venturia inaequalis*. *Am. J. Bot.*, **25**, 338 - 345.
- LOCCI R. and M. BISIACH, 1971.- Scanning electron microscopy of the invasion of leaf tissue by the apple scab fungus. *Rev. Pat. Veget.*, **7**, 15 - 29.
- MURASHIGE T. and F. SKOOG, 1962.- A revised medium for rapid growth and bio-essays with tobacco tissues cultures. *Physiol. plant.*, **15**, 473 - 497.
- NUSBAUM J.C. and G.W. KEITT, 1938.- A cytological study of host-parasite relation of *Venturia inaequalis* on apples leaves. *J. Agric. Res.*, **56**, 595 - 618.
- PAUL V.H. and W. BRANDES, 1983.- Scanning electron microscopy studies on pathogenesis of apple scab and its control with Baycor. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*, **36**, 21 - 37.
- PAULIN J.P. et M. DURON, 1986.- Identification des souches pathogènes d'*Erwinia amylovora* par inoculation de cal de racine de *Malus domestica*, cv "Golden Delicious". *Agronomie*, **6**, (9), 869 - 872.
- WILLIAMS E.B. and J. KUC, 1969.- Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **7**, 223 - 246.
- YEPES L.M. and H.S. ALDWINCKLE, 1986.- Screening apple cultivars for resistance to *Venturia inaequalis* *in vitro*. Int. congress of plant tissue and cell culture, August 3 - 8, 1986, U. Minnesota, MN, U.S.A.