

MOESZIOMYCES PENICILLARIAE (Brefeld) Vánky, L'AGENT DU CHARBON DU MIL *Pennisetum GLAUCUM* (L.) R. BR : LA PENETRATION PAR LES RACINES

MOESZIOMYCES PENICILLARIAE (Brefeld) Vánky, THE CAUSAL AGENT OF SMUT OF PEARL MILLET *Pennisetum GLAUCUM* (L.) R. BR: THE PENETRATION BY ROOTS.

Diagne-Leye G.^{1*}; Ba A. T.²; Sare I. C.¹; Roux C.³

Résumé :

Le mil à chandelle, *Pennisetum glaucum*, (L.) R. BR., est une importante culture pluviale adaptée aux conditions climatiques extrêmes d'Amérique d'Asie du Moyen Orient et d'Afrique. Les rendements à l'hectare sont généralement très faibles à cause des nombreuses contraintes abiotiques et biotiques dont le charbon du mil. L'agent infectieux de cette maladie est *Moesziomyces penicillariae* (Brefeld) Vánky (*Basidiomycota*, *Ustilaginaceae*), un champignon biotrophe endophyte présent dans toutes les zones de culture du mil. La maladie se manifeste par la castration des ovaires qui sont transformés en un organe appelé sore rempli de téliospores. A l'heure actuelle, seul le mode de pénétration par la fleur est connu. Toutefois la présence de téliospores viables dans le sol jusqu'à une profondeur de 22,5 cm laisse supposer la possibilité d'une infection systémique. Les travaux réalisés portent sur la pénétration de ce champignon par les racines et son incidence sur la formation de sores. Des plantules ont été inoculées au niveau des racines en boîte de Magenta par des sporidies de *M. penicillariae*. Des portions de racines prélevées sur de jeunes plants au stade F4 ont montré au microscope à balayage que la pénétration racinaire est possible. Au microscope électronique à transmission quelques rares cas de présence du mycélium au niveau du méristème caulinaire ont été observés. Sur les dix échantillons inoculés par la racine et placés en serre jusqu'à la maturation des épis, aucun sore n'a été détecté. Ainsi les observations montrent qu'une pénétration au niveau des racines suivie d'une croissance systémique du champignon dans la partie aérienne des jeunes plants est possible. Si la voie efficiente d'infection du mil à chandelle par *M. penicillariae* est la voie florale, il reste à définir l'impact de la pénétration au niveau des racines sur l'étiologie et l'épidémiologie de la maladie.

Mots clés :

Mil à chandelle, *Pennisetum glaucum*, charbon, *Moesziomyces penicillariae*, pénétration racinaire.

Abstract :

Pearl millet, *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br, is a major rain culture adapted to the extreme climatic conditions of America, Asia, Middle-East and Africa. The yields are generally very weak because of many abiotic and biotic factors among which smut disease. The causal agent of this disease is *Moesziomyces penicillariae* (Brefeld) Vánky, (*Basidiomycota*, *Ustilaginaceae*). This biotrophic endophytic fungus is present in all the areas of Pearl millet culture. Typical symptom of this disease consists in transformation of ovaries in a structure filled of teliospores called sorus. Up to now, only infection via spicklets by teliospores is considered. However, the presence of viable teliospores in soil until 22.50 centimeters depth is in favour of a systemic growth of the fungus in Pearl millet. The works completed concern the mode of infection of this fungus via the root and its incidence on sorus formation. Young seedlings were root-inoculated in Magenta boxes by sporidia of *M. penicillariae*. Using scanning electronic microscopy, hyphae were observed in root samples from seedlings at the stage L4, revealing that root penetration is possible. Using transmission electronic microscopy, hyphae were observed in stem apices, although rarely. Upon ten plantlets inoculated by the root and cultivated in greenhouse until maturation of spicklets, no sorus was detected. Although roots penetration of Pearl millet by *M. penicillariae* and systemic growth was demonstrated, the efficient way of infection is via spicklets. The incidence of roots penetration on aetiology and epidemiology of Pearl millet smut disease remains to be defined.

Key words :

Pearl millet, *Pennisetum glaucum*, smut, *Moesziomyces penicillariae*, root penetration.

1* Laboratoire de Biologie des Champignons (LBC), Département de Biologie Végétale Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop B.P. 5005 Dakar-Fann, Sénégal.

E. mail : magdley@yahoo.fr. Correspondant.

2 Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop B.P. 5005 Dakar-Fann, Sénégal.

3 Université Paul Sabatier, UMR CNRS 5546 Pôle de Biotechnologie Végétale BP 42617 Auzeville, 31326 Castanet Tolosan, France.

1. Introduction

Le mil à chandelle ou mil perlé, *Pennisetum glaucum*, (L.) R. BR., est une importante culture pluviale dans les pays tropicaux. Il constitue l'alimentation de base d'une grande partie des populations en Afrique Occidentale et en Inde (Kumar and Andrew [1]). Considéré comme une des céréales les mieux adaptées aux conditions climatiques extrêmes, il est cultivé dans les zones arides ou semi-arides d'Amérique du Nord, d'Amérique Latine, d'Asie Centrale, du Moyen Orient et d'Afrique. En Asie et en Afrique principalement le mil occupe la majeure partie des surfaces cultivées, et couvre environ 26 millions d'hectares. C'est la principale culture vivrière au Sahel avec plus de 90% de la production africaine qui représente 40% de la production mondiale (rapport ROCAFREMI-WCAMRN [2]). Malgré son importance économique et agronomique dans cette zone, les rendements à l'hectare sont très faibles et se situent entre 500 et 600 kg/ha en moyenne (Andrews et al., [3], rapport ROCAFREMI-WCAMRN [4]).

Outre les aléas climatiques et la pauvreté des sols, la production du mil en zone sahélienne est sujette à de nombreuses contraintes notamment biotiques dont le charbon du mil. L'agent infectieux de cette maladie est *Moesziomyces penicillariae* (Brefeld) Vanky, (*Basidiomycota*, *Ustilaginaceae*) un champignon biotrophe endophyte présent dans toutes les zones de culture du mil. La maladie se manifeste par la castration des ovaires qui sont transformés en un organe rempli de téliospores appelé sore. Ces téliospores diploïdes à maturité, germent et formeraient après méiose une baside générant de façon itérative des cellules haploïdes, les sporidies. A l'heure actuelle, seul le mode de pénétration par la fleur a été décrit, (Bhatt [5], Girard et Delassus [6]).

Les Ustilaginacées développent différentes stratégies d'infection de leurs hôtes : certaines espèces telles que *Sporisorium relianum* f.sp. *zeae* sur maïs ne pénètrent qu'au niveau racinaire (Martinez et al., [7]), d'autres comme *Ustilago maydis* sur *Zea mays* peuvent réaliser des infections par pénétration foliaire et/ou florale (Snetselaar et al., [8, 9, 10]). Les infections artificielles du mil par *Moesziomyces penicillariae* sont généralement réalisées par inoculation des inflorescences au stade gonflement de l'épi avec une suspension de sporidies, de téliospores, ou d'un mélange de sporidies et de téliospores. La présence de téliospores viables dans le sol a été signalée jusqu'à une profondeur de 22,5 cm (rapport ICAR [11]). Malgré tout les modes d'infection en plein champ autres que par la fleur ne sont pas connus, et les mécanismes de pénétration racinaire n'ont jamais été observés.

Les travaux réalisés portent sur l'existence ou non d'un mode de pénétration et d'infection de ce champignon par la racine.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Souche fongique

La souche de *Moesziomyces penicillariae* (Brefeld) Vanky utilisée est S13, issue de téliospores collectées à Tankanto (Sud du Sénégal) en 1999 sur la variété de mil Sanio. Des sores à enveloppe intacte ont été désinfectés durant 10 minutes à la chloramine T 2% (Sigma). Après rinçages, l'enveloppe de chaque sore est brisée aseptiquement, des téliospores sont prélevées et mises à germer sur milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) à 28°C. La germination de plusieurs balles de téliospores d'un même sore engendre des colonies multisporidiales.

Matériel végétal

La variété de mil [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br] utilisée est GB 8735, fournie par le Centre de Recherches Agronomiques de Bambey Sénégal (CNRA). Les grains

sont désinfectés à la chloramine T 2% durant une nuit. Après rinçage, ils sont mis à germer sur PDA. Pour les analyses microscopiques, les grains germés sains avec des racicules d'environ 1cm sont transférés dans des boîtes de Magenta contenant 150 mL de milieu M sans saccharose (Bécard and Fortin [12]). Les inoculations en puits (1 puits central recevant la racicule du jeune plant et 3 puits autour) sont faites avec 30µl d'une suspension multisporelle de l'échantillon S13 dans chaque puits (Fig. 1). Les boîtes de Magenta sont ensuite placées en salle de culture (photopériode 16h/8h, 27°C/23°C, 70% d'humidité relative) durant 20 jours. Pour tester l'efficacité de l'infection racinaire, les boîtes de Magenta n'étant pas appropriée à des cultures longues, les grains en germination sains sont transplantés en pot avec terreau, inoculés puis cultivés en serre (Photopériode 16h/8h, 26°C/24°C, 60% d'humidité relative).

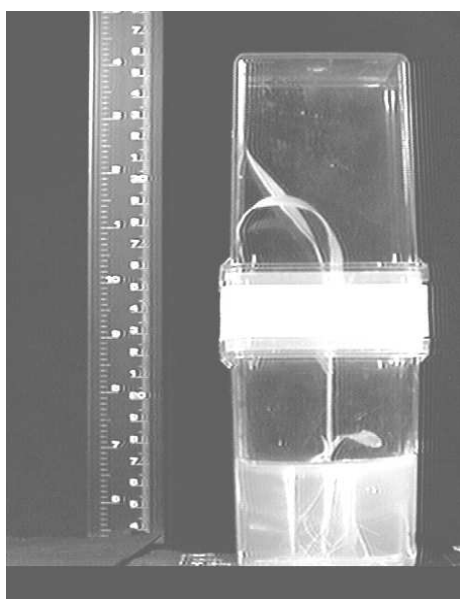


Figure 1 : Co - culture mil - *M. penicillariae* sur le milieu M en boîte de Magenta.

2.2. Méthodes

L'efficacité de la pénétration par la racine a été vérifiée par l'observation microscopique du champignon dans les tissus de l'hôte et par la formation de sores sur les chandelles.

Méthodes d'analyses microscopiques

Des fragments de racines de 5 mm de longueur et des extrémités caulinaires de tiges de jeunes plants de mil cultivés en boîte de Magenta sont prélevés au stade F3 (racines) et F4 (apex) pour les observations microscopiques. Tous les échantillons sont fixés pendant une nuit avec une solution de glutaraldéhyde (2,5%) dans le tampon cacodylate de sodium (0,05M pH 7,2).

Pour les observations en microscopie électronique à balayage des fragments de racine, les échantillons ont été lavés dans le tampon cacodylate 0,05M puis déshydratés progressivement à l'éthanol et passés au point critique avant métallisation (or/palladium à 30mA). Les observations ont été effectuées avec les appareils JEOL JSM-840 (Tokyo, Japan) à 15 KV et HITACHI S 450 à 10 KV.

Pour les observations en microscopie électronique à transmission des extrémités caulinaires, les échantillons ont été lavés dans le tampon cacodylate 0,05M [2h (4x 30 min)], post-fixés à l'osmium 1% (1h) puis inclus dans de la résine spurr après déshydratation séquentielle à l'éthanol. Des coupes ultra fines (60 à 90 nm) réalisées au microtome Ultracut E, (Leica France) à l'aide d'un couteau Diatome diamant ont été traitées au PATAg (Periodic Acid-Thiocarbohydrazide-Arget protéinate). Les observations ont été réalisées sur microscope Philips 301 (Eindhoven, Pays-Bas).

Essais sur l'efficacité de l'infection racinaire

Dix plantules inoculées par les racines ont été cultivées en serre jusqu'à la fin de l'anthèse pour observer l'apparition des symptômes sur les épis.

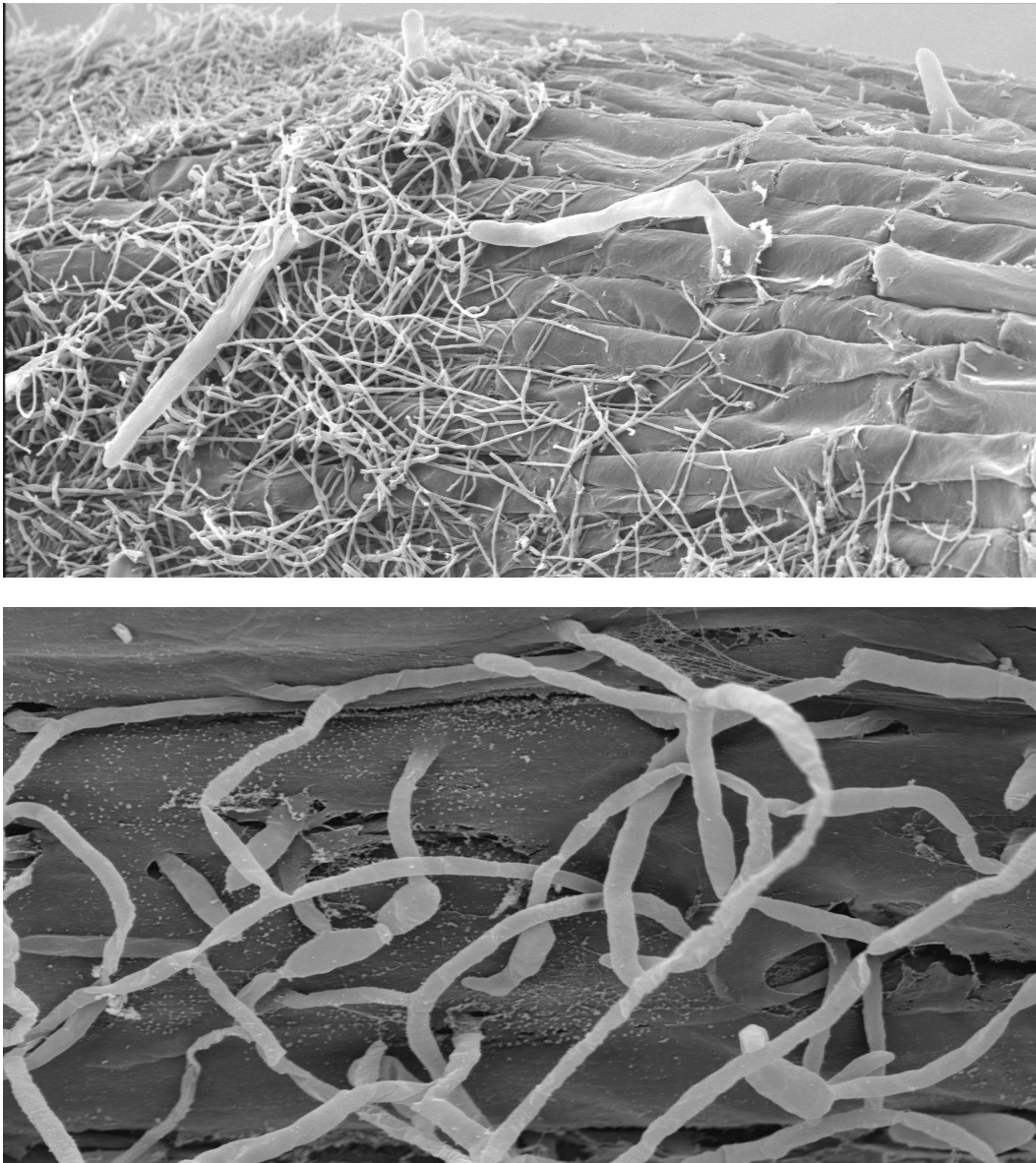
3. Résultats

3.1. Analyse microscopique

L'observation en microscopie électronique à balayage (Figs. 2 et 3) révèle la présence d'un lacis d'hyphes et de sporidies formant

un manchon adhérent à la surface de quelques racines.

Des sections d'apex caulinaires observées au microscope électronique à transmission



Figures 2, 3 : vues en MEB de la surface racinaire. Lacis de mycélium (my) et de sporidies (spd) formant un manchon autour de la racine (R).

L'observation d'une section de coupe en microscopie à balayage permet de mettre en évidence la présence d'hyphes à l'intérieur des cellules de la racine (Fig. 4). Sur l'ensemble de nos observations, les hyphes sont essentiellement localisés dans les cellules du rhizoderme. La progression du mycélium est essentiellement intracellulaire mais des ramifications intercellulaires peuvent être observées.

ont montré la présence du mycélium dans certaines cellules (Fig. 5). Il faut souligner qu'à ce stade de développement de la plante et dans nos conditions expérimentales, le champignon a été très difficile à détecter dans cette zone. En figure 5, l'hyphe en position intracellulaire est entouré d'une membrane en continuité avec le plasmalemme. Les cellules de l'hôte ne semblent pas être affectées de façon notable, l'intégrité cellulaire étant

préservée. Cette organisation ultra-structurale est typique des interactions biotrophes des *Ustilaginaceae*.

nanisme, symptôme observé dans d'autres cas de pathologie par les *Ustilaginaceae*.

Figure 4: vue en MEB d'une coupe de racine (technique du etching) révélant la présence de mycélium en position intracellulaire (my).

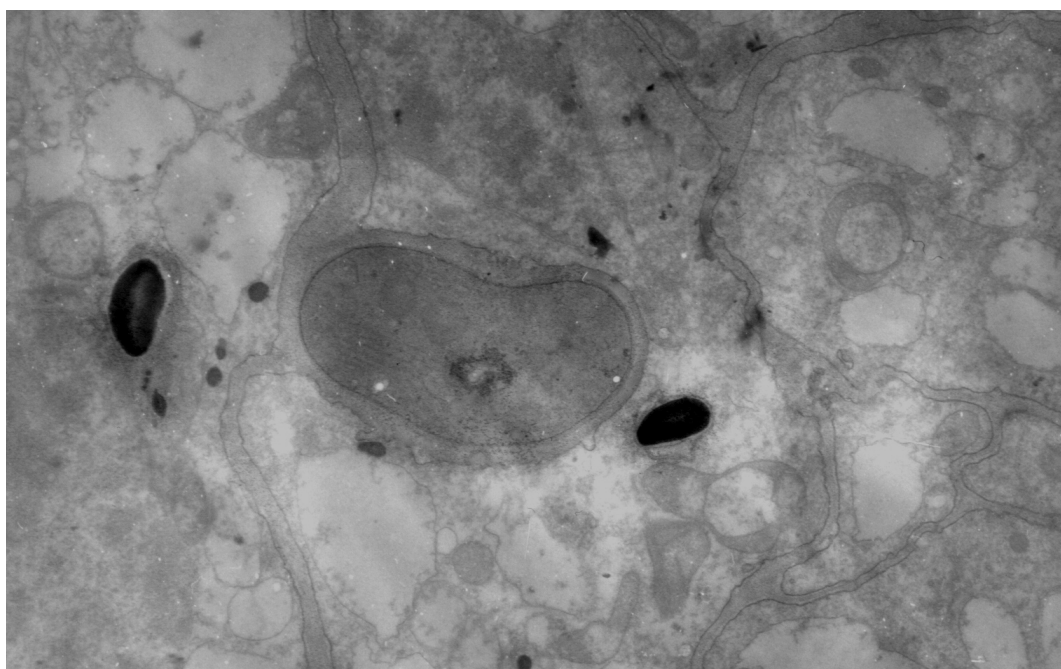
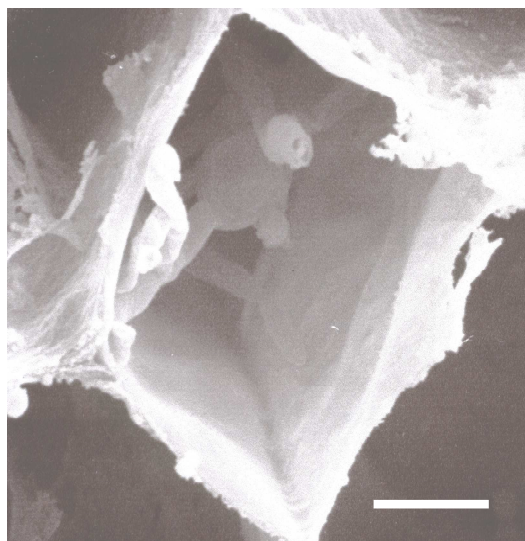


Figure 5: vue en MET d'une coupe de méristème apical caulinaire après infection racinaire. Un hyphe (Hy) en position déjetée dans une cellule hôte (CH), est entouré par une membrane (mb) reliée (flèche double) au plasmalemme (p) de la cellule hôte.

Efficiencia de l'infection racinaire

Après infection au niveau des racines, un développement normal des épis et des grains a été observé. Aucun sore n'est apparu sur les dix échantillons placés en serre. Néanmoins deux plantes ont développé un phénomène de tallage et de

4. Discussions–conclusions

Ce présent travail a permis de mettre en évidence que l'infection au niveau des racines du mil à chandelle par *Moesziomyces penicillariae* est possible, comme c'est le cas pour d'autres *Ustilaginaceae*. La présence de mycélium

extra-racinaire et la formation de manchon autour des racines d'hôtes ont déjà été observées dans le cas d'*Ustilaginaceae* pénétrant par les racines (Martinez et al., [7]).

Nos observations microscopiques ont révélé quelques cas de présence du champignon dans les méristèmes caulinaires après inoculation de plantules au niveau des racines. Ainsi si l'ensemble des résultats montrent la capacité de pénétration racinaire de *M. penicillariae*, son aptitude à la croissance systémique *in planta* semble réduite. Ceci est confirmé par la non production de sores. En conclusion : l'infection au niveau des racines n'est pas efficiente quant à la production de sores dans nos conditions expérimentales.

Cette conclusion est à nuancer. D'une part ces essais n'ayant pas été répétés suffisamment ne nous permettent pas de fournir une affirmation statistiquement fiable sur l'efficacité de la pénétration par les racines. D'autre part, ces résultats ayant été obtenus sur une seule variété (GB 8735), ne signifie pas que *M. penicillariae* ne soit pas capable d'infecter efficacement d'autres variétés de mil ou d'autres plantes hôtes telles que *Pennisetum violaceum*. Enfin, les conditions climatiques ont une importance dans le développement de la maladie. Des travaux antérieurs effectués en condition naturelle ont montré que l'inoculation du mil au niveau des racines peut aboutir à la formation de quelques sores en saison pluvieuse (période favorable pour la maladie) mais pas en saison sèche (Diagne-Leye [13]). Nous avons alors conclu à un apport extérieur d'inoculum déposé sur les inflorescences par des insectes, mais les résultats actuels nous amènent à revoir cette interprétation. Malgré tout, les différences enregistrées entre l'efficacité de l'infection racinaire et de l'infection par la voie florale sont des arguments en faveur de la prépondérance de l'infection au niveau des inflorescences

lors du cycle épidémiologique. Sur la base de nos résultats nous pouvons nous poser la question de l'impact du mode de pénétration par les racines lors des semis en début de saison des pluies, et dans la conservation de l'espèce sur les plantes adventices en saison défavorable. Pour cela, l'étiologie et l'épidémiologie de la maladie après infection au niveau des racines devront être évalués en condition naturelle contrôlée, sur différentes variétés et espèces de plante hôte.

Remerciements :

Les auteurs adressent leurs remerciements au département Soutien - formation de l'IRD et aux autorités de l'Université Cheikh Anta Diop pour leur appui financier. Ces remerciements s'adressent aussi aux membres de l'équipe de mycologie de l'UMR CNRS-UPS 5546 à Toulouse, particulièrement à Madame Collette SAVY et Monsieur Yves MARTINEZ, à Monsieur Bruno DENNETIERE du Laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle à Paris, pour leur collaboration.

5. Références

1. Kumar K. A., Andrews, D. J. Genetics of qualitative traits in pearl millet: a review. *Crop Sci.*, 1993, **33** (1): 1–20.
2. Réseau Ouest et Centre Africain de Recherche sur le mil–West and Central African Millet Research Network (ROCAFREMI-WCAMRN). Tendances et contraintes à la production du mil dans les pays membres du Réseau Ouest et Centre Africain de la Recherche sur le mil. (ROCAFREMI) : Bénin, Côte d'Ivoire, Gambie, Ghana, Sénégal, Togo. Niamey: Rapport, 2002, 56 p.
3. Andrews D. J., Rajewski, J. F., Kumar, K. A. Pearl millet: New feed grain crop. In: New crops, Janick, J. and Simon J. E. (edit.). New York. 1993. 198-208

4. Réseau Ouest et Centre Africain de Recherche sur le mil–*West and Central African Millet Research Network* (ROCAFREMI-WCAMRN). Résultats du projet P6 : 1997-2001. Gestion intégrée des ennemis du mil. Niamey: 2002, 36p.
5. Bhatt R. S. Studies in the Ustilaginales I: The mode of infection of the bajra plant (*Pennisetum typhoides* Stapf. and Hubbard), by the smut *Tolyposporium penicillariae* Bref. J. Indian Bot. Soc., 1946, **25**: 163–186.
6. Girard J.C., Delassus, M. Les maladies parasitaires des mil et des sorghos au Sénégal. Rapports. Centre National de la Recherche Agronomique, Bambey (Sénégal), 1978, 20 pp.
7. Martinez C., Jauneau A., Roux C., Savy C., Dargent R. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f.sp. *zaae*. Protoplasma, 2000, **213**: 83 - 92.
8. Snetselaar K.M., Mims, C.W. Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. Mycologia, 1992, **84** (2): 193–203.
9. Snetselaar K.M., Mims C.W. Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis* : Light and electron microscopy. Phytopathology, 1993, **83**: 843–850.
10. Snetselaar K.M., Mims C.W. Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. Mycol. Res. 1994, **98** (3): 347–355.
11. ICAR, (Indian Council of Agricultural Research). Annual report 1958–1959, 1961: 3 - 51. New Delhi, India.
12. Bécard G., Fortin J.A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol., 1988, **108**: 211-218.
13. Diagne-Leye G. Etude de quelques aspects de la Biologie et de la physiologie des relations parasitaires du charbon du mil (*Tolyposporium penicillariae* Bref.). Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle en Sciences Naturelles, Faculté des Sciences et techniques, Université Cheikh Anta Diop Dakar, 1993, 129p.