

N° d'ordre : 351

T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

Docteur de Troisième Cycle

par

Bertrand DEHORTER

BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION SEXUEE  
DE NECTRIA GALLIGENA BRES.

*membres du jury* : M.M. R. BOURIQUET, président  
L. LACOSTE, rapporteur  
E. BONNOT, examinateur  
R. JACQUES, membre invité



*soutenue le 14 décembre 1972*

A V A N T - P R O P O S .

-----

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Cryptogamie de l'U.E.R. de Biologie à l'Université des Sciences et Techniques de Lille et je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à son Directeur, Monsieur le Professeur LACOSTE, pour l'aide morale et scientifique qu'il a toujours su me prodiguer. Sa foi en la recherche et son optimisme m'ont été d'un grand secours.

Je remercie Monsieur le Professeur BOURIQUET, qui a bien voulu me faire l'honneur de présider mon Jury et qui a souvent mis à ma disposition les moyens de son Laboratoire.

Que Monsieur le Professeur BONNOT, veuille bien trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude, pour les conseils qu'il m'a donnés et pour la cordiale bienveillance qu'il a eu à mon égard, en acceptant de participer à ce Jury.

Je sais gré à Monsieur JACQUES, Sous-Directeur du Laboratoire du Phytotron, de l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail en acceptant de le juger, après nous avoir donné les moyens d'effectuer certaines expériences sur le grand illuminateur spectral de Gif-sur-Yvette.

Madame PARGUEY, Maître-Assistant à l'Université de Paris VI, m'a fait bénéficier, avec gentillesse et patience de sa très grande compétence en matière d'ontogénie des ascocarpes, et m'a aidé pour illustrer ce mémoire ; je lui en suis très reconnaissant.

J'adresse à Monsieur le Professeur GUILLAUME, mes sincères remerciements, pour la confiance dont il m'honore, en m'acceptant comme Assistant de Travaux Pratiques dans l'enseignement du Certificat de Microbiologie.

Enfin, ce travail est le fruit de l'étroite collaboration et de la précieuse amitié que les membres des divers Laboratoires de Biologie végétale, ceux du Laboratoire de Cryptogamie en particulier, n'ont cessé de me témoigner ; j'en suis profondément touché et je les en remercie, tous, très chaleureusement.

## R E S U M E .

-----

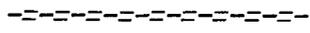
La biologie et la physiologie de la reproduction sexuée de Nectria galligena Bres. ont été étudiées in vitro sur les bases de l'écologie naturelle de ce parasite du pommier. Il est démontré que la fructification résulte de l'intervention simultanée, à leur valeur optimale, des 3 facteurs suivants : milieu nutritif, température et lumière.

La recherche qualitative et quantitative des divers besoins nutritifs a conduit à l'élaboration d'un milieu synthétique, sur lequel se différencient de nombreux ascocarpes fertiles en 25 jours.

Au cours de l'étude de l'influence des facteurs physiques, il a été démontré que la croissance et la reproduction sexuée dépendent d'intervalles thermiques différents. De plus, il existe une période de thermo-sensibilité optimale qui favorise la différenciation sexuée.

Par ailleurs, la production des ascocarpes de Nectria galligena est un phénomène photo-induit. Par des irradiations de durée, de longueurs d'onde et d'énergie variables, la période de photo-sensibilité optimale a pu être précisée. A la suite d'une stimulation lumineuse induisant la reproduction sexuée, il a été extrait du mycélium jeune, un complexe chimique dénommé "P<sub>310</sub>" en raison de son maximum d'absorption à 310 nm. Ce complexe, après addition au milieu de culture de N. galligena, maintenu à l'obscurité et par suite stérile, restaure la fertilité. Il peut donc être substitué à l'action de la lumière pour permettre la différenciation sexuée, et notamment pour stimuler le développement de la phase sporophytique. Cependant dans ces conditions, les ascospores ne se forment pas et il convient pour les obtenir de donner aux cultures maintenues à l'obscurité, avec du P<sub>310</sub> dans le milieu, 24 heures d'éclairement au 25ème jour du cycle de développement, éclairement normalement inefficace. Ces résultats suggèrent l'intervention d'un second photorécepteur.

T A B L E   D E S   M A T I E R E S .



<i>INTRODUCTION.</i>	1
<i>CHAPITRE I - DETERMINISME DE LA REPRODUCTION SEXUEE FONGIQUE. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.</i>	3
I - <u>REPRODUCTION SEXUEE ET MILIEU NUTRITIF.</u>	4
1 - milieux naturels et semi-synthétiques.	5
2 - milieux synthétiques.	6
1) éléments minéraux.	6
2) nature et concentration des sources de carbone	7
3) nature et concentration des sources d'azote	10
4) le rapport carbone-azote	13
5) facteurs de croissance	15
II - <u>REPRODUCTION SEXUEE ET TEMPERATURE.</u>	16
III - <u>REPRODUCTION SEXUEE ET LUMIERE.</u>	19
1 - influence de longueurs d'onde	19
2 - durée des irradiations.	21
3 - valeur énergétique de l'éclaircissement des cultures.	23
4 - hypothèse sur le rôle de la lumière dans le métabolisme sexué	24
- action des stéroïdes	25
- rôle des carotènes et des flavines.	26
- rôle du facteur sporogène appelé "P <sub>310</sub> "	28
<i>CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES.</i>	30
I - <u>MILIEUX DE CULTURE.</u>	31
II - <u>CONDITION PHYSIQUE.</u>	33
III - <u>ORIGINE DE LA SOUCHE.</u>	34
IV - <u>EXPRESSION DES RESULTATS.</u>	35
<i>CHAPITRE III - BIOLOGIE DE NECTRIA GALLIGENA BRES.</i>	37
I - <u>POSITION SYSTEMATIQUE.</u>	38
II - <u>FACTEURS ECOLOGIQUES DU DEVELOPPEMENT DE N. GALLIGENA.</u>	40

III	-	<u>CONDITION GENERALE DE LA REPRODUCTION SEXUEE DE N. GALLIGENA</u> <u>IN VITRO.</u>	43
	1	- historique	43
	2	- recherche préliminaire sur les conditions externes favorables à la reproduction sexuée.	46
	1)	étude des milieux naturels.	46
	2)	étude des températures.	47
	3)	étude de l'éclairement.	48
IV	-	<u>MORPHOGENESE DE N. GALLIGENA IN VITRO.</u>	49
	1	- le développement mycélien	50
	2	- la reproduction	51
CHAPITRE IV	-	<i>INFLUENCE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DE N. GALLIGENA.</i>	56
I	-	<u>INFLUENCE DES SOURCES DE CARBONE ET D'AZOTE SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DE N. GALLIGENA.</u>	58
	1	- étude de la nature et de la concentration des sources de carbone.	58
	2	- étude de la nature et de la concentration des sources d'azote	61
	3	- influence de la nature des diverses combinaisons : carbone - azote.	62
	4	- étude du rapport carbone/azote.	66
		<u>DISCUSSION.</u>	69
II	-	<u>INFLUENCE DES ELEMENTS MINERAUX ET DES VITAMINES.</u>	70
	1	- étude de la composition minérale du milieu.	70
	2	- étude des vitamines.	78
		<u>DISCUSSION.</u>	81
CHAPITRE V	-	<i>ACTION DES FACTEURS EXTERNES SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DE N. GALLIGENA.</i>	83
I	-	<u>ACTION DE LA TEMPERATURE?</u>	84
I	-	INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE ET LA REPRODUC- TION SEXUEE.	85
II	-	INFLUENCE DES CHANGEMENTS DE TEMPERATURE SUR LA MORPHOGENESE SEXUEE.	89



## I N T R O D U C T I O N .

-----

La reproduction sexuée des champignons s'accompagne de phénomènes biologiques au moins aussi complexes que chez les autres groupes végétaux. Actuellement, la recherche du déterminisme de ces processus par la technique des cultures pures sert de thème à de nombreux auteurs.

De multiples facteurs entrent en jeu : facteurs génétiques, facteurs externes et internes du métabolisme. Mais, de plus en plus, le déclenchement des processus de sexualisation paraît tributaire de variations de conditions physiques et nutritionnelles du milieu : TURIAN (1969) les désigne comme des "signaux de déclic d'origine externe". Leur importance, dans la nature, est grande ; au Laboratoire, la reproduction des conditions optimales de sexualisation pose des problèmes difficiles.

Certains faits illustrent quelques aspects particuliers de ces difficultés. Ainsi, près de 50 années d'adaptation au milieu environnant ont été nécessaires pour qu'Uncinula necator produise des fructifications parfaites sur les vignes françaises, alors qu'elles sont constantes sur les Vitis américains atteints d'oidium. Chez Nectria galligena Bres., une ascospore peut engendrer la forme asexuée Cylindrocarpon mali (All.) Wr. ; inversement, une conidie de C. mali peut donner naissance au périthèce de N. galligena. Pourtant, les conditions qui régissent ces phénomènes sont bien dissemblables dans la nature et au Laboratoire. Dans la nature, ces deux formes de reproduction d'un même organisme se manifestent à des époques différentes. Cela est en relation avec le fait que l'orientation que peut prendre la fructification des Ascomycètes tantôt vers le type sexué, tantôt vers le type asexué, dépend en grande partie des facteurs externes et de leur variation.

Le présent travail, consacré à la reproduction sexuée de l'Ascomycète Nectria galligena Bres., a pour but de déterminer in vitro les facteurs physiques et chimiques du milieu responsable de l'induction du phénomène sexuel chez ce parasite. Le choix d'un Ascomycète parasite comme matériel d'étude est source de difficultés supplémentaires d'expérimentation car, chez les Ascomycètes en général et les agents pathogènes en particulier, bien que les conditions favorables à la croissance mycélienne et à la conidiogénèse soient généralement bien définies, celles relatives à l'obtention in vitro des formes sexuées ne sont précises que pour un nombre limité d'espèces et demeurent aléatoires dans la majorité des cas.

Dans ce mémoire, nous nous proposons successivement :

- d'analyser les principaux travaux relatifs au déterminisme de la reproduction sexuée fongique, principalement des Ascomycètes, afin d'orienter nos propres recherches ;
- d'obtenir, par l'étude de la biologie naturelle de N. galligena Bres. et par la description de sa morphogénèse dans des conditions culturelles simples, les bases nécessaires à nos expériences ultérieures ;
- de découvrir, grâce à l'élaboration d'un milieu synthétique liquide, les éléments nutritionnels favorables à la fructification parfaite ;
- d'étudier l'influence de la température et de la lumière sur le déclenchement de la formation des périthèces ;
- d'aborder un aspect particulier du métabolisme en mettant en évidence un composé chimique, le "P<sub>310</sub>", présent dans le mycélium soumis à l'influence de la lumière et susceptible de remplacer l'effet de celle-ci dans les processus de sexualisation.



*DETERMINISME DE LA REPRODUCTION SEXUEE FONGIQUE.**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.*

-----

Dès 1898, KLEBS précisait toutes les raisons internes, externes, génétiques... susceptibles de provoquer la fructification fongique. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux conditions externes principalement nutritives, thermiques et lumineuses qui n'induisent la reproduction sexuée, selon LACOSTE (1965), que dans la mesure où elles sont simultanément maintenues à leur valeur optimale. La déficience de l'un de ces 3 facteurs implique qu'il devient limitant et entraîne l'inhibition des processus sexuels.

Nous nous proposons d'analyser les données acquises sur le rôle, dans la reproduction sexuée, des 3 éléments suivants :

- milieu nutritif ;
- température ;
- lumière.

**I - REPRODUCTION SEXUEE ET MILIEU NUTRITIF.**

Le milieu nutritif constitue un facteur externe déterminant de la reproduction sexuée au même titre que la température ou la lumière. Il doit comprendre les éléments essentiels nécessaires au développement végétatif et à la fructification puisque la différenciation sexuée dépend d'un état de croissance préalable qui peut être, selon les organismes fongiques,

plus ou moins important. Mais l'élaboration de constituants cellulaires différents au cours de ces deux phénomènes, végétatif et sexué, n'implique-t-elle pas des exigences nutritionnelles spécifiques ? On peut penser que les facteurs nutritifs induisant à leur optimum ces deux aspects de la différenciation fongique ne sont pas forcément identiques et que selon les définitions de KLEBS, les conditions "larges" de la croissance mycélienne s'opposent, quantitativement et qualitativement, aux conditions "étroites" de la formation des ascocarpes. Aussi l'élaboration d'un milieu synthétique impose la recherche d'un équilibre nutritionnel qui doit permettre la formation d'un grand nombre de fructifications et une croissance mycélienne harmonieuse.

On étudiera donc l'influence particulière des différents éléments minéraux, carbonés, azotés, vitaminiques ou autres, constituant les milieux synthétiques favorables à la reproduction sexuée, après avoir défini les milieux naturels ou semi-synthétiques généralement utilisés comme témoins lors de ces études.

#### 1 - Les milieux naturels et semi-synthétiques :

Ces milieux sont composés exclusivement ou en partie de produits naturels extrêmement variés : des fragments ou des extraits d'origine végétale (tige - feuille... pomme de terre - carotte...) représentant souvent l'hôte pour les champignons parasites, ou des substances issues de la transformation d'éléments naturels (malt, hydrolysats de caséine...). Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) représente le type même du milieu semi-synthétique constitué en partie de jus de pomme de terre de composition chimique imprécise et de 1 à 2 p. 100 de glucose. HOLMES (1970) étudie la formation des périthèces de Ceratocystis ulmi sur quelques 37 milieux de cette nature.

Généralement gélosés et de composition chimique indéfinie et variable selon les modes de préparation, ces substrats ne permettent pas de discerner l'influence propre de chacun de leurs composants sur la

reproduction sexuée. Néanmoins, ils constituent souvent le milieu témoin sur lequel la fructification parfaite se développe avec facilité. Parfois leur spécificité ou leur analyse chimique oriente l'élaboration du milieu synthétique.

## 2 - Les milieux synthétiques :

### 1) Eléments minéraux :

La composition minérale des divers milieux synthétiques repose ou dérive d'un certain nombre d'oeuvres pionnières : RAULIN (1870), MORQUER (1936), STEINBERG (1941), RAPER (1952), NICHOLAS (1952), FRIES (1956)... que COCHRANE (1958) et LILLY (1965) ont répertoriées dans une volumineuse bibliographie.

L'examen de ces divers substrats révèle la présence indispensable de phosphore, de magnésium, de soufre et de potassium et ces macroéléments sont introduits dans les milieux de culture à des concentrations et sous des formes similaires. On note aussi la présence presque constante de fer, de zinc, de manganèse, de cuivre parfois celle du molybdène, du bore et du calcium. La concentration et le rôle de ces composés ont souvent été déterminés par des études relatives à la croissance mycélienne ou à la sporulation asexuée, plus rares sont les travaux consacrés à l'action de ces éléments sur la reproduction sexuée.

BARKSDALE (1962) comparant le développement végétatif et la différenciation sexuée du Phycomycète : Achlya ambisexualis en fonction de la teneur du milieu en phosphore, magnésium, potassium, calcium, zinc et soufre, remarque la spécificité d'action du calcium, du potassium et du magnésium sur la production des oogones. LENNEY et col. (1966) soulignent l'importance des différents microéléments : fer, zinc, cuivre, molybdène, calcium, qui agissent simultanément sur la croissance et sur le nombre d'oogones de Pythium graminicola.

fructose et surtout le glucose constituent des sources de carbone très favorables pour Nectria sp. (HANLIN, 1961), et R. limoniispora (HAYMAN, 1963). En fait pour KOEHN (1971) la stimulation de la reproduction sexuée par les hexoses, indépendamment de leur nature, s'explique par leur facile inter-conversion à partir d'une forme enolique commune.

Le rôle des diholosides diffère, lui aussi, selon les champignons. Podosordaria leporina (KOEHN, 1971) ne fructifie pas sur des substrats contenant comme source de carbone : du saccharose, du maltose ou du lactose tandis que divers ascomycètes décrits par HAWKER et CHAUDHURI (1946) donnent des ascocarpes sur de tels milieux. Ces auteurs signalent le rôle prépondérant du saccharose tout comme HALL (1971) celui du maltose sur la fructification parfaite de Sordaria fimicola. Le lactose semble être en général peu favorable. Le cellobiose, inversement au mélibiose induit des périthèces de Neurospora (WESTERGAARD et col., 1947) mais aussi les oogones du Phycomycète Pythium sp. (CHILD et col., 1969).

Des polyosides, l'amidon, est sans doute, la source de carbone la plus efficace, il induit la reproduction sexuée de nombreux champignons (P. leporina - Neurospora - C. variispora). LACOSTE (1965) obtient des périthèces de divers Leptosphaeria sur cellulose.

Divers travaux ont prouvé que, dans certains cas, des lipides, des alcools, des acides organiques, des protéines peuvent satisfaire les exigences en carbone des champignons. En particulier, CURTIS (1969) met en évidence, en tant que sources de carbone, le rôle de la tyrosine et de la phénylalanine dans l'induction des périthèces de Nectria haematococca.

Cette dernière expérience confirme que le pouvoir d'induction sexuée ne peut être rapporté à un seul type de composés carbonés. Aussi la conclusion de COCHRANE (1958) attribuant aux oligo et polysaccharides un rôle primordial dans la reproduction sexuée, même si elle est corroborée par les travaux de HAWKER (1939), de ROSS et BREMMER (1971), de KOEHN (1971), de HALL (1971), doit être réservée à un certain nombre

Chez les Ascomycètes, KOEHN (1971), étudiant la formation des périthèces de Podosordaria leporina note que le manganèse, le zinc et le magnésium, contrairement au fer et au calcium, sont indispensables à la formation des ascocarpes et le manganèse se révèle même nécessaire à la croissance mycélienne. Pour LACOSTE (1965), si la suppression du fer dans le milieu de culture n'entraîne pas la stérilité des périthèces de Leptosphaeria sp. elle en diminue le nombre. BASU (1951) considère le calcium comme un facteur essentiel à la maturation des ascocarpes de Chaetomium globosum et même comme un élément spécifique de la reproduction sexuée puisqu'il n'intervient pas dans la croissance mycélienne. Devant ces faits, doit-on concevoir comme ARAGAKI (1964) que la reproduction sexuée ne requiert pas d'éléments particuliers mais qu'une déficience ou un excès de nutrition minérale peut la réduire ou l'inhiber ? Seules des expériences établissant les besoins propres de chaque champignon peuvent préciser les influences multiples des éléments minéraux dans le métabolisme fongique. A ce propos, LILLY (1965) a analysé le rôle plastique, énergétique ou catalytique de chacun d'eux.

## 2) Nature et concentration des sources de carbone :

Il a été démontré que la nature de la source carbonée peut influencer la reproduction sexuée des champignons.

Ainsi, les pentoses sont diversement appréciés : le xylose n'entraîne ni la fructification sexuée ni même la croissance végétative de Ceratocystis variopora (CAMPBELL, 1958) mais il induit la formation des ascocarpes de Podosordaria leporina (KOEHN, 1971). Chez ce dernier contrairement à Sordaria fimicola (HAWKER, 1939), l'arabinose ne permet pas la formation de périthèces.

L'action des hexoses (glucose - mannose - galactose - fructose) est très variable : le galactose ne peut donner naissance à la reproduction sexuée de Rosellinia limoniispora (HAYMAN, 1963) et stimule très faiblement celle de Neurospora (WESTERGAARD et col. 1947). Le

de champignons. Infirmant l'idée de COCHRANE, WESTERGAARD et col. (1947), HANLIN (1961), HAYMAN (1963) considèrent la grande efficacité des hexoses et en particulier du glucose. Pour HAWKER et CHAUDHURI (1946) - HAWKER (1947) - BRETZLOFF (1954), l'effet inducteur d'un carbohydrate particulier est lié à sa vitesse d'utilisation par le champignon. Pour être particulièrement favorable à la reproduction sexuée, ces auteurs précisent qu'un composé, hydrolysé à vitesse moyenne, doit fournir des produits d'hydrolyse facilement phosphorylés, capables de maintenir pendant une longue période un taux de carbone optimal. Cette conception basée sur la spécificité des potentialités enzymatiques des champignons rend compte d'une part, de la très grande variété des sources de carbone capable d'induire les ascocarpes et d'autre part, elle souligne l'importance de la teneur en carbone dont la valeur semble être en fait, bien plus que la nature de la source carbonée, responsable de la fructification.

On constate généralement que les concentrations en carbone favorables à la croissance mycélienne et à la sporulation asexuée sont nettement supérieures, de l'ordre de 10 p. 100 pour les hexoses (HAWKER, 1966), à celles requises pour la reproduction sexuée. De plus pour obtenir la fructification parfaite, les concentrations optimales en carbone varient selon la nature des composés carbonés. Ainsi pour HAWKER (1939) les hexoses (glucose et fructose) sont inhibiteurs à des taux plus faibles que ceux des carbohydrates complexes (saccharose). Mais HANLIN (1961) expose des résultats inverses. Hormis ces considérations, on peut mettre en évidence, selon la concentration du milieu en source carbonée, deux catégories de champignons : les uns produisant un maximum de périthèces à des taux en carbone relativement faibles, les autres capables de fructifier à des teneurs élevées.

Dans le premier cas, HAWKER (1939-1951), HAWKER et CHAUDHURI (1946) trouvent qu'une augmentation de la concentration en sucre provoque une diminution du nombre de périthèces chez divers pyrénomycètes. BRETZLOFF (1954) reporte que Sordaria fimicola fructifie plus rapidement et plus abondamment à de faibles teneurs en hydrates de carbone, il note par exemple que les hexoses agissent de façon favorable à

0,5 p. 100 et inhibitrice à 2 p. 100. Ces différents auteurs emploient des teneurs en sucre variant de 0,5 à 1 p. 100. LEBBE (1968) écrit qu'il convient d'utiliser des concentrations en carbone du même ordre pour induire les périthèces de Leptosphaeria typhae. ROSS et BREMMER (1971) remarquent de façon similaire que des taux en sucre supérieurs à 1 p. 100 réduisent le nombre de périthèces de Venturia inaequalis. Ces divers travaux appuient l'idée émise par KLEBS (1898) selon laquelle des conditions de nutrition restreintes favorisent la reproduction sexuée.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de HANLIN (1961). Cet auteur observe que des concentrations croissantes en glucose, maltose, fructose, élèvent le nombre de périthèces de Nectria gliocladioides et sont optimales à 2 p. 100. Selon lui des conditions de haute nutrition pour cet organisme sont favorables simultanément à la croissance végétative, à la formation des conidies et des ascocarpes. WESTERGAARD et col. (1947), HAYMAN (1963), CAMPBELL (1958) confirment les vues de HANLIN et emploient des teneurs en sucre égales ou supérieures à 2 p. 100 pour stimuler au maximum la formation des périthèces de Neurospora, de R. limoniispora et de C. variispora. Ces différentes analyses ne permettent pas d'envisager l'emploi d'un composé carboné qui, en fonction de sa nature et de sa concentration, induirait infailliblement la reproduction sexuée de nombreux champignons.

L'extrême variabilité des résultats exprime la singularité du métabolisme sexué de chaque champignon liée à des potentialités enzymatiques particulières. Enfin, ces données ne tiennent pas compte de la source d'azote ajoutée conjointement à celle de carbone.

### 3) Nature et concentration des sources d'azote :

En admettant avec HAWKER (1966) que les champignons n'assimilent pas l'azote atmosphérique, on distingue alors 3 types de source azotée : nitrique, ammoniacal et organique, que les organismes fongiques métabolisent plus ou moins spécifiquement.

L'azote nitrique fourni par le nitrate de potassium représente la source azotée la plus satisfaisante pour la formation des périthèces de Neurospora (WESTERGAARD et col., 1947). CAMPBELL (1958) décrit le nitrate de calcium comme l'élément azoté inorganique le plus favorable à la reproduction sexuée de C. variospora. HIX et col. (1964) trouvent que l'azote minéral initie faiblement les ascocarpes d'Hypomyces solani f. cucurbitae et des pyrénomycètes en général.

L'utilisation de l'ion ammonium par les champignons rend les milieux de culture beaucoup plus acides (LILLY et col., 1951) provoquant ainsi une réduction parfois totale de la fructification parfaite. C'est pourquoi, certains auteurs (ROSS et HAMLIN, 1965), confondant ces 2 phénomènes, concluent à la non-métabolisation et au faible pouvoir inducteur de l'azote ammoniacal. Contrôlant rigoureusement le pH du milieu, ROSS et BREMMER (1971) ont pu établir que seule l'addition du carbonate de calcium ou d'un tampon rendait les sels d'ammonium (chlorure, sulfate, phosphate et tartrate) efficaces pour la fructification sexuée de Venturia inaequalis. Dans cette expérience, l'oxalate d'ammonium ou le carbonate d'ammonium, incorporés seuls, sans carbonate de calcium, constituaient d'excellentes sources d'azote et maintenaient le pH à une valeur constante.

Les acides aminés représentent la source essentielle d'azote organique. De nombreux travaux tentent d'accorder à un acide aminé ou à un groupe d'acides aminés un rôle primordial dans l'induction sexuée. Les expériences de WESTERGAARD et col. (1947), de CAMPBELL (1958), de CHILD et col. (1969), de WESTE (1970) de KOEHN (1971) destinées à étudier la reproduction sexuée de Neurospora, Ceratocystis variospora, de Pythium sp., Ophiobolus graminis et Podosordaria leporina dénotent l'importance des acides aspartique et glutamique, mais surtout de l'asparagine. D'autre part, HIX et col. (1964), McONIE et col. (1966), ROSS et BREMMER (1971), LEAL et col. (1967) CHILD et col. (1969) démontrent l'inefficacité de la leucine de la thréonine, de la cystéine et de la méthionine sur les phénomènes sexués et même parfois sur la croissance des Ascomycètes : Hypomyces solani, f. cucurbitae, Gnomonia fructicola, Venturia inaequalis et des

Phycomycètes : Phytophthora sp., Pythium sp. Ces résultats ne doivent pas faire ignorer la spécificité de la réponse fongique vis à vis de certains acides aminés. Ainsi l'induction des périthèces de Penicillium vermiculatum Dangeard, par la leucine, l'histidine et le tryptophane (BHATTACHARYA et col., 1962), ceux de Nectria haematococca par la tyrosine et la phénylalanine (CURTIS, 1969) figure le métabolisme particulier de chaque champignon.

On peut interpréter l'effet très favorable des milieux naturels sur la reproduction sexuée au fait qu'ils contiennent non pas un seul mais de nombreux acides aminés. McONIE et SNYDER (1966) révèlent l'action bénéfique d'un ensemble d'acides-amino ; ainsi l'association de l'histidine, de la valine et de l'alanine bien plus que leur incorporation isolée engendre une fructification très importante de Gnomonia fructicola. L'effet synergique est plus remarquable encore avec la thréonine et la leucine qui, totalement inefficaces isolément, augmentent de façon considérable l'effet inducteur sexué de la proline et de l'isoleucine.

TOUSSOUN (1962) constate que les différents isomères (L-D ou DL) de l'isoleucine affectent différemment la formation des ascocarpes d'Hypomyces solani f. sp. cucurbitae race 2, tandis que ROSS et BREMMER (1971) ne voient pas en l'isomérisation de la leucine un facteur responsable de l'inefficacité de cet acide-amino sur la fructification de V. inaequalis.

Selon LILLY (1965) la plupart des champignons étudiés appartiennent à la classe III définie par ROBBINS (1937) qui regroupe les champignons capables d'assimiler l'azote ammoniacal et l'azote organique.

On peut penser que les organismes fongiques exigeant, pour l'élaboration de leurs protéines, un acide aminé ou un groupe d'acides aminés, indépendamment de toute autre source azotée, sont déficients dans la synthèse de ces composés. Ceux qui utilisent l'azote minéral possèdent par suite des capacités enzymatiques et métaboliques plus élevées.

D'une manière générale, il n'existe pas de source azotée propre de la reproduction sexuée. Seul le nombre des fructifications observées et la précocité de leur apparition permettent d'établir une hiérarchie dans l'utilisation des composés azotés. Le rôle prépondérant des acides aspartique et glutamique, de l'asparagine, réside dans le fait qu'ils se situent à des carrefours métaboliques communs à tous les champignons.

Les concentrations d'azote inhibant la reproduction sexuée et la croissance mycélienne sont sensiblement identiques. Des teneurs trop élevées en azote diminuent la fructification parfaite en provoquant souvent l'accumulation de produits métaboliques toxiques (HAWKER, 1966). Les recherches de HIRSCH (1954) sur Neurospora crassa et celles déjà citées de ROSS et BREMMER (1971), de McONIE et SNYDER (1966)... prouvent unanimement la valeur stimulatrice des faibles concentrations d'azote . Si la teneur désirable en azote dans le milieu de culture, dépend de la nature du composé azoté et du champignon, elle semble aussi varier proportionnellement avec la concentration en carbone. A cet égard, on remarque que LACOSTE (1965) pour diverses espèces de Leptosphaeria et ROSS et BREMMER (1971) pour V. inaequalis jugent optimales les quantités de 50 - 60 mg d'azote pour 2 g. de carbone par litre de milieu, HIX-BAKER (1964) celles de 200 mg d'azote pour 6 g. de carbone par litre. La reproduction sexuée réclame peut être plus un équilibre entre les concentrations d'azote et de carbone qu'une nature et une teneur particulière de ces composés.

#### 4) Le rapport carbone-azote = C/N :

Si l'influence du rapport C/N sur la croissance végétative et la pycnidio-genèse a été très étudiée, il n'en va pas de même pour les phénomènes sexués. Les travaux de DAS GUPTA et NANDI (1957), de WESTE et THROWER (1963) révèlent qu'à une concentration donnée d'azote correspond une concentration particulière de carbone favorable à la reproduction sexuée de Penicillium vermiculatum D. ou d'Ophiobolus graminis. Par exemple, la formation des périthèces d'O. graminis est

importante pour des teneurs en asparagine de 0,2 et 0,4 p. 100 à condition que le taux de glucose égale respectivement 1 et 2 p. 100. La proportion optimale des quantités de carbone et d'azote fournies par divers composés carbonés ou azotés ou rapport C/N varie selon les espèces fongiques.

Ce rapport est toujours supérieur à l'unité et ses valeurs limites sont généralement comprises entre 5 et 60. Elles sont optimales aux environs de 10 pour la formation des périthèces de Ceratocystis variopora (CAMPBELL, 1958), de Nectria haematococca (CURTIS, 1969), d'O. graminis (WESTE, 1970) et de Sordaria fimicola (HALL, 1971) ; des rapports C/N compris entre 20 et 30 stimulent la reproduction sexuée d'Achlya ambisexualis (BARKSDALE, 1962), d'Hypomyces solani (HIX-BAKER, 1964) et de Pythium sp. (CHILD et col., 1969).

Les recherches de WESTERGAARD et col. (1947), de HALL (1971) et de LACOSTE et col. (1972) prouvent que, dans certaines limites, la production des ascocarpes de Neurospora sp., de Sordaria fimicola et d'Arachniotus albicans relève du rapport C/N indépendamment des concentrations absolues en carbone et en azote. Parmi toutes les combinaisons de concentrations expérimentées, sont seules efficaces celles qui définissent l'équilibre C/N adéquat. A condition qu'elles restent toujours dans un rapport convenable, des concentrations de carbone et d'azote fort différentes et modifiant donc profondément l'importance de la croissance mycélienne, peuvent ne pas avoir d'influence notable sur la reproduction sexuée. Celle-ci est donc moins tributaire de la croissance mycélienne qui ne doit donc plus être limitée ou au contraire prolifique, selon les théories déjà citées, mais équilibrée. Cependant, elle demeure contingente de la nature des éléments nutritifs. D'autre part, elle n'est maximale que pour des concentrations absolues de carbone et d'azote particulières, liées par le rapport C/N optimal .

5) Facteurs de croissance :

On désigne par ce terme les vitamines et certains composés chimiques particuliers qui initient ou stimulent la formation des ascocarpes. On négligera ici l'action d'extraits végétaux ou autres et celle des substances de type hormonal.

LILLY (1965) décrit toutes les possibilités pour qu'un champignon requiert une ou plusieurs vitamines, HAWKER (1957), COCHRANE (1958) et FRIES (1965) évoquent le rôle de chacun des composés. Les vitamines B<sub>1</sub> (ou thiamine ou aneurine) et H (biotine) sont incorporées dans de nombreux milieux de culture synthétiques depuis que leur efficacité sur la reproduction sexuée de Ceratostomella fimbriata, Melanospora destruens Shear. et Rosellinia limoniispora a été démontrée par LILLY et BARNETT (1947), HAWKER (1950) et HAYMAN (1963). Toutefois CAMPBELL (1958) et Mc ONIE et SNYDER (1966) accordent un rôle prépondérant à la thiamine dans la fructification parfaite de Gnomonia fructicola et Ceratocystis variospora, mais pour BRETZLOFF (1954) la biotine agit en synergie avec la thiamine dans l'induction des ascocarpes de Sordaria fimicola. A ces 2 vitamines, ROSS (1968) et HOLMES (1970) ajoutent la vitamine B<sub>6</sub> (ou pyridoxine) pour stimuler la reproduction de Venturia inaequalis et Ceratocystis ulmi. Enfin de nombreux auteurs additionnent systématiquement au milieu une solution vitamini- que comprenant, outre ces 3 vitamines, l'inositol, l'acide paraminobenzoïque, la riboflavine, le pantothénate de calcium, l'acide nicotinique... Les concentrations employées, toujours très faibles, présument du rôle catalytique de ces éléments qui ne sont pas toujours spécifiques de la différenciation sexuée. Ils peuvent, en fait, intervenir sur ce phénomène par l'intermédiaire de la croissance qu'ils accélèrent ou parfois même induisent (KOEHN, 1970).

Quelquefois la présence d'esters phosphoriques de glucose et de fructose stimulent la formation des périthèces de Melanospora destruens Shear. (HAWKER, 1948) et de Chaetomium globosum (BUSTON et col., 1953-1956). Enfin l'addition de stérols dans le milieu de culture

augmente beaucoup la reproduction sexuée de divers espèces de Phycomycètes de Pythium sp. et de Phytophthora sp. (LENNEY et KLEMMER, 1966 ; CHILD et col., 1969 ; LEAL et col., 1971). Le rôle possible de ces substances sera discuté par ailleurs.

En conclusion la reproduction sexuée fongique ne dépend pas d'une seule formule chimique mais d'une multitude, dérivant d'un ensemble nutritif de base, comprenant toujours des sels minéraux, des sources de carbone et d'azote. La très grande variété des besoins nutritifs en qualité et en quantité réside dans les potentialités enzymatiques et génétiques spécifiques de chaque champignon. La recherche d'un milieu synthétique sera donc particulière pour chaque champignon mais elle mettra en évidence sans aucun doute le fait que, d'une manière générale, l'induction sexuée relève de conditions nutritives beaucoup plus étroites que la croissance mycélienne ou même la sporulation asexuée.

Il faut souligner enfin que la plupart des expériences déterminant les exigences nutritionnelles de la reproduction sexuée ont été effectuées sur milieu gélosé et qu'exceptionnels sont les travaux réalisés avec succès en milieu liquide.

## II - REPRODUCTION SEXUEE ET TEMPERATURE.

Si l'on excepte certains champignons zoopathogènes (dermatophytes et agents des mycoses), coprophiles et thermophiles capables de croître végétativement à des températures supérieures à 37°C, 40°C ou même 50°C (Chaetomium thermophile), on peut estimer que la plupart des organismes fongiques se développent à moins de 35°C. D'autre part COCHRANE (1958) note que certaines souches de Cladosporium et Sporotrichum produisent de nouveaux filaments mycéliens à -5°C et -8°C. On admettra donc que des températures comprises entre -8°C et +35°C favorisent la croissance mycélienne de très nombreux champignons et sont donc susceptibles d'induire les phénomènes sexués.

In vitro, divers ascomycètes tels Neurospora sp. (WESTERGAARD et col., 1947), Nectria sp. (HANLIN, 1961 ; CURTIS, 1969), Ceratocystis sp. (CAMPBELL, 1958 ; HOLMES, 1970), Sordaria fimicola (HALL, 1971) produisent un maximum de périthèces à 25°C. Il ne faut cependant pas en déduire que des températures proches de 25°C représentent l'optimum thermique spécifique de la reproduction sexuée des Pyrénomycètes puisque des Pyrénomycètes comme les Leptosphaeria (LACOSTE, 1965), Gnomonia intermedia (HENRICKSSON et col., 1951) ou Venturia inaequalis (ROSS et col., 1962) ne fructifient normalement que pour des températures inférieures à 20°C.

En outre la valeur optimale des températures varie même selon les espèces, en effet LACOSTE (1965) observe que seules les températures voisines de 10°C pour Leptosphaeria acuta et de 18°C pour Leptosphaeria maculans induisent, parmi les 3 températures employées 10°C, 18°C et 23°C la formation des ascocarpes. Il existe donc pour chaque champignon un optimum thermique favorable au développement du processus sexué mais de plus celui-ci diffère selon l'état de différenciation de l'organisme : croissance, induction, maturation. Pour G. intermedia (HENRICKSSON et col., 1951) des températures comprises entre 5° et 35°C permettent d'obtenir la croissance mycélienne qui est maximale à 19°C mais la fructification parfaite est conditionnée par des températures variant de 5°C à 19°C avec un optimum situé à 15°C. Ce fait, comme la plupart des travaux se rapportant à divers groupes fongiques, confirme que l'intervalle thermique inducteur des phénomènes sexués est beaucoup plus étroit que celui favorisant la croissance mycélienne.

L'induction des périthèces et leur maturation nécessitent des températures très différentes, ainsi les protopérithèces de Neurospora crassa apparaissent à 30°C - 35°C mais leur maturation exige une température de 25°C (HIRSCH, 1954). De même LEACH (1971) expose que les protopérithèces de Pleospora herbarum induits à 24°C - 27°C ne deviennent des périthèces fertiles que par un traitement aux basses températures inférieures à 10°C. LEACH précise encore que les températures élevées, supérieures à 15°C, inhibent la formation des asques et ascospores et cite, à

l'appui de ses recherches, de très nombreux exemples. La reproduction asexuée, quoique soumise à des conditions thermiques moins strictes, manifeste les mêmes réponses. Ainsi CHUNG et WILCOXSON (1971) rapportent que si les pycnides de Phoma medicagensis sont nombreuses à 30°C, leur fertilité est faible, la conidiogénèse requérant 20°C. Les températures affectent encore la morphologie des structures reproductives par exemple, on note une augmentation du volume des périthèces aux basses températures. Enfin HAWKER (1946) et HANLIN (1961) signalent que l'optimum thermique varie selon les concentrations en hydrates de carbone du milieu.

L'action des températures sur le métabolisme sexué paraît s'exercer surtout au moment de la maturation des ascocarpes. Plus que tout autre, c'est cette étape de la reproduction sexuée qui semble la plus étroitement dépendante des températures. La valeur de l'optimum thermique se rapproche parfois des conditions écologiques et peut être particulière pour chaque étape de la différenciation sexuée. A ce sujet le cas de Gnomonia leptostyla décrit par FAYRET (1967 a - b) est très significatif. L'évolution des périthèces de G. leptostyla dans la nature et in vitro s'accomplit de façon identique, les ébauches périthéciales se forment à la fin de l'automne et à 18°C en culture pure, elles ne parviennent à maturité sur les feuilles mortes de noyer qu'à la fin de l'hiver et à 10°C au laboratoire. On peut dégager deux idées générales quant à l'influence des températures sur la reproduction sexuée. D'une part les hautes températures inhibent beaucoup plus la reproduction sexuée que la croissance végétative et la sporulation asexuée. D'autre part, pour chaque champignon l'optimum thermique de fructification, tant dans la nature qu'in vitro, constitue un caractère spécifique.

### III - REPRODUCTION SEXUEE ET LUMIERE.

Au cours de cette étude, nous n'envisagerons pas le cas des Ascomycètes dits "photo-indifférents" pour lesquels la lumière n'exerce aucun effet sur la reproduction sexuée tel Sordaria fimicola (INGOLD et DRING, 1957), qui forme un nombre égal de périthèces à la lumière ou à l'obscurité continue. Nous nous limiterons donc aux Ascomycètes qualifiés de "photo-sensibles" dont la formation des ascocarpes requiert absolument un stimulus lumineux. Ainsi une certaine quantité d'énergie lumineuse est nécessaire pour la formation des apothécies de Pyronema confluens (ROBINSON, 1926), des périthèces d'Ascobolus magnificus (YU, 1954), des périthèces de Nectria gliocladioides (HANLIN, 1961) et d'Ophiobolus graminis (WESTE et THROWER, 1963). Ces différents chercheurs faisaient un simple constat de la photostimulation ou de la photoinduction de la reproduction sexuée. Or il importe de caractériser l'activité lumineuse par la longueur d'onde de la radiation utilisée, par la valeur énergétique de l'éclairement au niveau des cultures et par la durée de celui-ci. L'analyse du rôle de ces 3 composantes du flux lumineux sur la reproduction sexuée des Ascomycètes nous permettra d'apprécier l'importance relative de ces 3 éléments dans l'évolution des processus sexuels.

#### I - Influence de longueur d'onde :

On considère que des radiations ultra-violettes lointaines et moyennes ont des longueurs d'onde comprises entre 200 et 320 nm, que le domaine du proche ultra-violet se situe entre 320 et 400 nm et que les  $\lambda$  des radiations visibles s'étendent entre 400 et 750 nm.

L'effet inducteur des radiations ultra-violettes lointaines a été mis en évidence pour la première fois par STEVENS en 1928 sur Glomerella cingulata où l'irradiation du mycélium âgé de 7-8 jours par des éclairements de  $\lambda$  égal à 300 nm, d'une durée variant de 0,25sec. à 120 sec.,

induisent la formation des périthèces. Par la suite TIMNICK et col. (1951) utilisent la radiation  $\lambda = 254 \text{ nm}$  à raison d'une minute pendant 5 jours consécutifs pour provoquer l'apparition des ascocarpes de Diaporthe phaseolarum. De la même manière, BUXTON (1959) constate l'efficacité des U.V. pour donner naissance à la forme parfaite de Fusarium oxysporum (Nectria haematococca). LEACH et TRIONE (1966) soulignent l'importance des radiations ultra-violettes entre 230 nm et 310 nm dans l'initiation des périthèces de Pleospora herbarum, sous un éclaircissement de  $1.000 \text{ ergs cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ . Pareillement LEATH (1971) tient pour essentiel le rôle joué par les longueurs d'ondes comprises entre 290 et 330 nm dans l'induction des périthèces de Leptosphaerulina briosiana, cet auteur note que 18 heures d'éclaircissement, d'une valeur énergétique correspondant à 400 ft. -c, donnent naissance à des périthèces fertiles lorsque les radiations ont des longueurs d'onde égales à 310 - 320 et 330 nm et que par contre la radiation 340 nm a une action nulle semblable à l'obscurité continue.

L'étude des radiations proches U.V. et visibles a permis à CALLAGHAN (1962) de constater que les radiations vertes ( $\lambda > 510 \text{ nm}$ ) sont inefficaces sur la reproduction sexuée de Pleurage setosa à l'inverse des radiations violettes et bleues. KOEHN (1971) confirme ce fait, il emploie 3 radiations monochromatiques de  $\lambda$  égale à 450 nm, 550 nm et 654 nm, sous un éclaircissement isoquantique à raison de 12 heures quotidiennes. Dans ces conditions, Podosordaria leporina forme des ascocarpes uniquement à 450 nm. Les expériences de WESTE (1970) sur Ophiobolus graminis et de CURTIS (1964-1972) sur Nectria haematococca sont très significatives, dans les 2 cas, le spectre d'action des radiations sur la reproduction sexuée présente de nombreuses similitudes. Ainsi WESTE relève que 150 heures d'éclaircissement au 14ème jour de culture sous une intensité de  $800 \text{ ergs cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$  induisent fortement les périthèces pour les radiations comprises entre 390 et 450 nm et CURTIS irradiant les cultures de N. haematococca à partir du 10e-15e jour en lumière continue sous une intensité de  $150 \text{ ergs cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$  montre l'induction des ascocarpes pour les longueurs d'ondes 360 - 420 - 440 - 460 et 480 nm. Dans leurs travaux, ROQUEBERT et LACOSTE (1971) étudient l'effet inducteur et stimulateur de la lumière de WOOD

( $\lambda = 360 \text{ nm}$ ) sur la reproduction sexuée de quelques espèces de Leptosphaeria graminicoles soumis à 12 heures de lumière par jour sous un éclairage de 500 lux.

La relation de ces différents travaux met en cause dans l'induction des ascocarpes deux domaines du spectre lumineux, le premier concerne les radiations de 230 nm à 320 nm, le second de 320 nm à 510 nm. Le mode d'action des longueurs d'onde de type "lointain U.V." qui comprend les radiations dites "abiotiques" (210 nm - 290 nm) semble discutable, mais les auteurs expérimentant ces rayonnements ne rapportent ni leur effet léthal, ni leur effet mutagène. Les radiations proches U.V. et visibles constituent le second ensemble spectral dont la limite supérieure se situe à 510 nm. Pour de nombreux chercheurs (CALLAGAN - KOEHN - WESTE - LEATH - LEACH et CURTIS) les longueurs d'onde supérieures à 510 nm ne possèdent aucun effet inducteur ou stimulateur de la reproduction sexuée. Cette unanimité prend forme de loi et on serait tenté de conclure que les radiations verte, jaune, orangée, rouge sont dépourvues d'efficacité tout comme l'obscurité continue. Mais les travaux de WINSTEAD et col. (1966) sur Glomerella magna et de HOGENSON et HOSFORD (1971) sur Leptosphaeria avenaria rapportent la formation des périthèces à des longueurs d'onde supérieures à 510 nm. Ces dernières données nous obligent donc à une certaine prudence et l'on peut encore dire qu'en fonction de l'espèce fongique et des interactions dues à la nature du substrat et à la température, l'action de la lumière peut revêtir des modalités très variées.

## 2 - Durée des irradiations :

La durée des irradiations change considérablement selon les expériences et semble dépendre de plusieurs facteurs.

La longueur des éclairages nécessaire à l'induction des ascocarpes varie avec le genre, l'espèce et parfois la souche du champignon. La lumière blanche continue est favorable à la souche  $S_{12}$  d'Hypomyces solani mais un plus grand nombre de périthèces apparaît chez la souche  $S_{28}$

du même champignon soumise à une alternance journalière de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité (CURTIS, 1964). Une irradiation continue réduit considérablement la quantité d'ascocarpes de Diaporthe phaseolarum (TIMNICK et col. 1951). L'alternance quotidienne des périodes obscures et lumineuses stimule la reproduction sexuée de nombreux Lep-tosphaeria (LACOSTE, 1965) de même que la formation des périthèces de Gelasinospora calospora (TYLUTKI, 1958).

INOUE et FURUYA (1970) constatent qu'un éclaircissement continu en lumière blanche, d'une valeur de  $2.000 \text{ ergs cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ , inhibe la formation des ascocarpes de Gelasinospora reticulospora et que l'activité stimulatrice de la lumière dépend étroitement du développement végétatif. Pour la même raison, TOUSSOUN & WEINHOLD (1967) n'irradient continuellement les cultures d'Hypomyces solani f. sp. cucurbitae race 2 qu'après 15 jours de croissance mycélienne à l'obscurité. Ces auteurs notent la très forte diminution des périthèces consécutive à un éclaircissement continu de 250 ft. -c. en lumière blanche dès les premiers jours de développement.

Des travaux de LEACH et TRIONE (1966) relatifs à Pleospora herbarum, il ressort qu'un éclaircissement de  $1.000 \text{ ergs cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ , de quelques secondes, à la longueur d'onde de 238 nm suffit à induire des ascocarpes alors que 6 heures d'exposition à la longueur d'onde 400 nm sous un éclaircissement de  $3.000 \text{ ergs cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$  sont nécessaires pour parvenir à un résultat identique. CURTIS (1964) observe les mêmes résultats : des cultures de Nectria haematococca soumises à un éclaircissement de même valeur produisent des périthèces après 60 secondes d'irradiation à 254 nm, après 10 heures à 50 heures d'irradiation entre 310 nm et 425 nm.

En conclusion, il apparaît que la durée de l'éclaircissement est tributaire de l'espèce fongique, de la croissance mycélienne, du moment d'application du stimulus lumineux, de la valeur énergétique de l'éclaircissement et surtout de la longueur d'onde. En particulier dans le domaine des lointains U.V., il ne peut être palié à l'effet léthal des radiations que par une diminution de la durée des irradiations (JOLY, 1962) qui sont alors de l'ordre de quelques secondes.

### 3 - Valeur énergétique de l'éclairement des cultures :

On désigne par éclairement le flux lumineux (Watt ou lumen) reçu par unité de surface ( $\text{cm}^2$  ou  $\text{m}^2$ ). Les multiples systèmes d'unités utilisés pour mesurer cette valeur et leur complexe conversion rendent très délicate la comparaison des divers travaux.

Les études de CURTIS (1964) sur Nectria haematococca et de WESTE (1970) sur Ophiobolus graminis suggèrent que, 50 et 60 ft. -c. respectivement, représentent les valeurs minimales de l'éclairement qui, en lumière blanche, induisent les phénomènes sexués. Ces mêmes chercheurs ainsi que BAKER (1956) situent l'optimum d'éclairement à 200 ft. -c. Cependant les valeurs des éclairagements nécessaires à la reproduction sexuée varient corrélativement avec les longueurs d'onde. Ainsi LEACH et TRIONE (1966) placent les cultures de Pleospora herbarum sous des éclairagements croissant de 50 à 500  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  lorsque les radiations passent de 230 à 320 nm.

Compte tenu de ces travaux et des valeurs citées antérieurement, il apparaît que l'éclairement pour induire la formation d'ascocarpes, doit être de l'ordre de 50-200 ft. -c. (foot-candle), ou de 500-2.000 lux., ou de 800-3.000  $\text{ergs cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$  ou de 80-300  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , selon les différents systèmes unitaires.

Ces valeurs indiquent que l'éclairement agit de façon complexe sur la reproduction sexuée. Il convient surtout de considérer la quantité d'éclairement qui est égale au produit de la valeur énergétique de l'éclairement par sa durée. Cette grandeur, en particulier lorsqu'elle est isoquantique, permet d'apprécier l'efficacité d'une longueur d'onde et constitue une base d'interprétation de l'effet lumineux à l'échelle moléculaire. En outre, elle permet de discerner les moments favorables d'application du stimulus lumineux au cours de la croissance végétative.

L'efficacité lumineuse sur la reproduction sexuée des Ascomycètes est liée aux conditions de milieu et de température, si on conçoit ces deux facteurs à leur optimum, la lumière agit alors sur le phénomène sexué par ses trois composantes propres : la longueur d'onde, l'éclairement et la durée des irradiations. De ce fait, il apparaît que la longueur d'onde représente l'élément déterminant dans l'induction sexuelle, en effet la quantité d'éclairement ne peut en aucune manière se substituer à la longueur d'onde pour induire ce phénomène, elle est capable seulement dans une certaine mesure de suppléer à la relative inefficacité de celle-ci. Il est remarquable de constater, à de rares exceptions près, que les mêmes régions spectrales sont stimulatrices de la reproduction sexuée de divers champignons. Cet effet est d'autant plus significatif qu'il intervient de la même manière dans la reproduction asexuée : on ne peut que citer les travaux de LEACH (1961-1962) sur de nombreuses espèces fongiques, de CALPOUZOS et LAPIS (1970) sur Septoria nodorum, de SPROSTON (1971) sur Stemphylium solani, de KUMAGAI et ODA (1969) sur Trichoderma viride, où les longueurs d'onde inductrices se situent entre 230 et 350 nm pour les 3 premiers chercheurs, entre 350 et 480 nm pour le dernier.

Cette constatation évoque la possibilité d'un même système photorécepteur pour les reproductions asexuée et sexuée d'un même champignon comme le suggère LEACH (1966). Tandis que les longueurs d'onde inductrices confinées dans 2 régions différentes du spectre : lointain U. V. d'une part, proche U. V. - bleu d'autre part, semblent mettre en cause 2 photorécepteurs différents (CURTIS, 1972).

#### 4 - Hypothèse sur le rôle de la lumière dans le métabolisme sexué :

Le flux lumineux peut agir sur divers aspects morphologiques de la reproduction sexuée : pigmentation des ascocarpes, phototropisme du col périthécial, taille et décharge des ascospores (INGOLD, 1962), ces photoréponses sont secondaires. L'essentiel est de déterminer le rôle de la lumière au moment de l'induction du phénomène sexuel.

Par quel processus, une irradiation lumineuse oriente-t-elle le métabolisme du mycélium dans le sens de la différenciation sexuée ?.

En guise de réponses, les théories sont nombreuses, JOLY (1962) fait une critique judicieuse des hypothèses émises sur l'action des radiations ultra-violettes lointaines, CARLILE (1965-1970) en cite d'autres plus générales sur la photosensibilité des champignons. Certaines conclusions expérimentales orientent actuellement les recherches sur l'activité métabolique de la lumière.

Premièrement, certains milieux naturels, par leur composition chimique, induisent, à l'obscurité continue, la reproduction sexuée de champignons qui, sur d'autres substrats, ne fructifiaient qu'en présence de lumière. Il existe donc une possibilité de fournir par voie exogène des substances fertilisantes qui, préexistantes dans le milieu de culture, se substituent au flux lumineux pour induire les ascocarpes. Dans le second cas, l'action de la lumière doit sans doute, permettre au champignon de synthétiser ces composés soit à partir d'éléments précurseurs présents dans le milieu, soit de novo. De cette manière, les chercheurs ont pu apprécier le rôle possible des stéroïdes dans la morphogénèse sexuelle.

Deuxièmement, le fait que des radiations monochromatiques bien déterminées provoquent la différenciation sexuée chez divers champignons suggère la présence de photorécepteurs. Ces molécules en fonction des similitudes de leur spectre d'absorption avec celui des longueurs d'onde inductrices sont de nature différente : caroténoïdique, flavinique ou encore indéterminée pour le facteur "P<sub>310</sub>".

On envisagera successivement ces diverses hypothèses :

- Action des stéroïdes :

La très importante revue bibliographique d'HENDRIX (1970) rend compte des travaux, qui, depuis 1953, soulignent le rôle des stéroïdes dans la différenciation sexuée des champignons en particulier des Phycomycètes : Pythium et Phytophthora. Chez l'Ascomycète Leptosphaeria typhae

étudié par LACOSTE (1965), l'addition de stérols au milieu de culture n'induit pas d'ascocarpe à l'obscurité continue, mais elle accroît considérablement et prolonge l'effet stimulateur de la lumière. Ces résultats indiquent que les composés stéroliques, cholestérol et sitostérol ou leur photo-produits interviennent dans les phénomènes sexuels. NELSON et col. (1967) introduisent dans le milieu de culture de Cochliobolus carbonum, à différents moments de la croissance et à des concentrations déterminées, des inhibiteurs de la synthèse des stéroïdes, ainsi ils bloquent, successivement la formation des périthèces, puis des asques et enfin des ascospores. L'addition de squalène et de divers stérols (sitostérol, cholestérol, ergostérol, cholestanol) annule les effets des inhibiteurs, la biosynthèse des stéroïdes reprend, la fructification se déroule normalement. ELLIOTT (1969) réverse l'action des inhibiteurs de la formation des périthèces de Sordaria fimicola par l'acide oléique et le cholestérol. Enfin HENDRIX (1970) critique la spécificité des inhibiteurs employés par NELSON.

Les mécanismes par lesquels les stérols induisent ou stimulent la reproduction sexuée sont inconnus (HENDRIX et col., 1970). Par analogie avec le monde animal, certains chercheurs ont envisagé un rôle hormonal des stérols ou une action stimulante des composés dérivés de leur transformation par les radiations ultra-violettes. Actuellement, de nombreux auteurs attribuent l'intervention des stérols dans la différenciation sexuée à leur participation dans des réactions oxydatives productrices d'énergie ou à leur activité dans la perméabilité cellulaire.

- Rôle des carotènes et des flavines :

Basée sur l'étude des spectres d'absorption et l'emploi d'inhibiteurs, la nature du photorécepteur est très controversée. Mais elle a fait l'objet de nombreuses hypothèses ; les principales identifient, aux carotènes ou aux flavines, les molécules qui absorbent les longueurs d'onde favorables à l'induction de la morphogenèse sexuée.

ARPIN (1968) et FIASSON (1968) analysent les caroténoïdes de nombreuses espèces fongiques, ils soulignent leur importance et leur possible utilisation comme critères taxonomiques. Au point de vue physiologique, en tenant compte des carotènes incolores tel le phytoène dont les maximums d'absorption s'établissent à 282 nm et 348 nm, on constate que le spectre d'absorption des caroténoïdes s'étend de 280 nm à 480 nm. Il rend alors parfaitement compte de l'efficacité d'un grand nombre de radiations sur la reproduction sexuée. Mais l'addition d'inhibiteurs spécifiques de la caroténogénèse en particulier la diphénylamine dans le milieu de culture ne modifie pas la morphogénèse sexuée d'Allomyces sp. (TURIAN, 1957), et n'affecte pas le métabolisme mycélien de Phycomyces sp. (CARLILE, 1962). Et si ROBBINS (1926) fait dépendre de la caroténogénèse la formation des apothécies de Pyronema confluens, CARLILE et FRIEND (1956), on obtenant des mutants albinos de P. confluens capables de former à la lumière des apothécies dépourvues de carotène, dissocient les 2 phénomènes photo-chimiques : caroténogénèse et reproduction sexuée. CARLILE (1965) trouve quant à lui, peu d'explications à l'action éventuelle des carotènes en tant que photo-récepteurs.

La morphogénèse sexuée souvent photo-induite par des longueurs d'onde de 260 à 450 nm suggère la présence dans le mycélium d'un photo-récepteur flavo-protéique ; le spectre d'absorption de la riboflavine présentent des max. à 266 - 273 et 445 nm. TSCHABOLD (1967) empêche la formation des périthèces d'Hypomyces solani par addition au milieu de culture de mepacrine, décrite par HAAS (1944) comme un inhibiteur spécifique des flavoprotéines, de plus la riboflavine à certaines concentrations annule l'effet de la mepacrine. Les résultats de TSCHABOLD indiquent une corrélation étroite entre l'induction par la lumière des ascocarpes d'H. solani et un photorécepteur riboflavinique, partie intégrante d'un système de transfert d'électrons activé par la lumière, la même constatation est faite par LEWIS et col. (1961) où l'efficacité des radiations 367 nm et 448 nm chez l'algue Euglena sp. confirme le rôle photocatalytique d'un flavoprotéine dans l'oxydation des cytochromes.

Une ou plusieurs flavoprotéines paraissent donc être les photorécepteurs fongiques responsables de la stimulation par la lumière d'un système enzymatique oxydatif orientant le métabolisme végétatif vers la reproduction sexuée. Néanmoins, si on considère globalement le spectre des radiations efficaces de 350 nm à 510 nm, il est possible d'envisager avec JEREBZOFF et JACQUES (1969) chez Leptosphaeria michotii l'intervention : "d'un système de pigments énergétiquement associés comprenant vraisemblablement des cytochromes et plusieurs caroténoïdes (seuls) ou associés à une flavine". Enfin, il faut noter que la détermination de la nature du photorécepteur caroténoïdique ou flavinique repose souvent sur l'emploi d'inhibiteurs dont la spécificité a pu être mise en doute, celle de la diphenylamine par SLATER (1961), de la mépacrine ou atébrin par HEMKER et col. (1960), CIAK et col. (1967) notamment.

- Rôle du facteur sporogénique appelé "P<sub>310</sub>" :

Pour LEACH (1965), la photo-induction de la reproduction est liée à la présence dans le mycélium fongique d'une substance dont le spectre d'absorption correspond aux radiations efficaces, en particulier les rayons ultra-violet. Cette substance est appelée P<sub>310</sub> en raison de son maximum d'absorption à 310 nm. Ce facteur existe uniquement dans les cultures irradiées qui produisent des périthèces (Pleospora herbarum) ou des pycnides (Ascochyta pisi). Il est absent du mycélium, qui, placé à l'obscurité continue, ne différencie pas de structures reproductrices. TRIONE et col. (1966) montrent que le "P<sub>310</sub>" ajouté au milieu de culture se substitue à l'action lumineuse et induit la formation des ascocarpes de P. herbarum à l'obscurité continue. LEACH et TRIONE (1966-1969) pensent qu'un seul mécanisme photochimique est à la base des phénomènes asexués et sexués, que le photorécepteur ou l'un des produits essentiels de ce métabolisme photochimique est le "P<sub>310</sub>". Ces auteurs fondent leur spéculation sur la présence du "P<sub>310</sub>" chez diverses espèces d'Ascomycètes, de Basidiomycètes et d'Adélomycètes et sur le fait que ce facteur peut induire à la fois la reproduction asexuée et sexuée (P. herbarum).

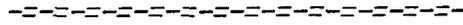
Mais WESTE (1970) ne peut mettre en évidence ce facteur " $P_{310}$ " dans le mycélium des cultures d'Ophiobolus graminis pourtant irradiées et formant des ascocarpes. Si VARGAS et WILCOXSON (1969) VAN DEN ENDE et CORNELIS (1970) confirment la présence de " $P_{310}$ " dans les cultures d'Helminthosporium dictyoides, de Sclerotinia fructicola et d'autres espèces, ils ne parviennent cependant pas à établir l'activité sporogénique de ce facteur.

Malgré ces derniers travaux, les hypothèses et les recherches de LEACH et TRIONE ouvrent une nouvelle perspective sur l'action de la lumière dans le métabolisme sexuel.

En conclusion, on peut concevoir que l'action de la lumière dans l'induction sexuelle est liée à l'absorption de l'énergie lumineuse par des molécules de nature chimique encore indéterminée. Ces photorécepteurs peuvent catalyser des réactions d'oxydation. Ils peuvent aussi faire partie de système de transfert d'électrons. Cette physiologie davantage orientée vers la production d'énergie corollaire d'un déplacement du métabolisme intermédiaire dans le sens oxydatif caractérise l'induction des périthèces. Par dosages enzymatiques de l'isocitrate-déshydrogénase et de l'isocitratase, VIALA et VIDAL (1972) ont, en effet, démontré qu'une activité accrue du cycle citrique, au détriment du cycle glyoxylique, différencie le métabolisme des cultures éclairées et la formation des ascocarpes de Leptosphaeria typhae. Cette déviation métabolique conduit-elle, en outre, à la synthèse de substances chimiques, spécifiques de l'induction sexuée ?



## M A T E R I E L   E T   M E T H O D E S :



Cette partie traite des manipulations et conditions expérimentales d'ordre général. Par la suite, nous ne citerons que les modalités opératoires particulières.

MILIEUX DE CULTURE.1 - Milieu hôte :

Des fragments de tige de pommier sont disposés verticalement dans un erlen-meyer de 300 ml contenant 50 ml d'eau distillée. Afin de permettre un meilleur développement de l'organisme fongique, les rameaux sont préalablement incisés.

2 - Milieus naturels :- Fragment de carotte et de pomme de terre :

Découpés à l'emporte pièce, des demi-cylindres de racine de carotte ou de tubercule de pomme de terre sont introduits dans des tubes à étranglement dit de ROUX dont l'ampoule est remplie à moitié d'eau distillée ou d'eau distillée glycérolisée à 1 %.

- Farine d'avoine :

On met en suspension 20 g. de farine d'avoine dans 1 litre d'eau distillée, le tout est ensuite placé à 60°C pendant 1 nuit. Après centrifugation à 10.000 tours/minute pendant 15 minutes, on filtre le surnageant. Ramenée à son volume initial, la décoction, gélosée à 2 % est coulée dans des tubes pyrex (25 mm x 200 mm), à raison de 20 ml/tube.

- Eau de pomme de terre :

Selon la concentration choisie:10, 20, 30, 40... g. de tubercules de pomme de terre,soigneusement épluchés, sont broyés à l'ultra-turrax et mis à bouillir dans 1 litre d'eau distillée durant 5 minutes. Après refroidissement et filtration sur verre fritté, on ramène le volume du filtrat à la valeur initiale par de l'eau distillée. Utilisé liquide ou gélosé à 2 p. 100, ce milieu est réparti soit en fioles de ROUX de 1 litre, 100 ml par fiole ; soit dans des tubes pyrex à raison de 20 ml par tube. Un tel milieu gélosé auquel on ajoute 1 ou 2 p. 100 de glucose constitue une forme du P.D.A. (Potato Dextrose Agar) très utilisé en mycologie.

3 - Milieux synthétiques :

Afin d'éviter toute variation dans la composition des milieux de culture d'une série expérimentale à l'autre, nous avons réalisé une gamme de solutions "mères":minérales et organiques conservée à 4°C, à l'obscurité. Les sucres de la série D, les acides aminés de la série L et tous les produits utilisés sont manufacturés par MERCK ou N.B.C. La répartition du milieu synthétique liquide s'effectue en fioles de ROUX (100 ml/fiole) ou en tubes pyrex, (25 mm x 200 mm, 16 ml/tube). Pour ces expériences toute la verrerie employée, après nettoyage à l'acide sulfo chromique et nombreux rinçages à l'eau distillée,est soumise à un autoclavage en chaleur humide à une atmosphère,pendant 30 minutes.

Stérilisation :

Après répartition des milieux de culture dans les récipients adéquats, bouchés au coton hydrophile, la stérilité est assurée par un autoclavage en chaleur humide, à 0,5 atmosphère, durant 20 minutes, pour les substances thermorésistantes. La filtration sur membrane millipore (0,45  $\mu$ ) rend stérile les substances thermolabiles.

## CONDITIONS PHYSIQUES.

### 1 - Aération :

Bien souvent les phénomènes de différenciation sont liés à l'aération du milieu. Les procédés couramment utilisés dans le but d'assurer une bonne oxygénation des milieux de culture liquide : agitation, barbotage d'air, ne peuvent convenir pour nos expériences car ils n'induisent jamais la formation de périthèces. En effet, l'agitation des cultures entraîne de profondes modifications morphogénétiques et on observe souvent la formation d'agrégats mycéliens (boulettes ou "pellets") de consistance très dure dont l'activité respiratoire est faible (GABRIEL, 1967). A l'inverse les milieux gélosés conduisent à des résultats très favorables mais ils interdisent toute récupération aisée du champignon en vue d'études chimiques ultérieures, de plus la gélose souvent impure modifie la composition des milieux.

Par la suite, la plupart de nos expériences ont été réalisées en milieu liquide dans les fioles de ROUX ou des tubes pyrex. Pour assurer une bonne aération des cultures, le fond des fioles de ROUX est garni de 18 baguettes de verre plein de 6 mm de diamètre et 3 baguettes de même type sont introduites dans les tubes. L'ensemencement du champignon s'effectue à la surface des baguettes où affleure le niveau supérieur du milieu liquide. Nous évitons ainsi les méfaits de l'immersion totale de l'inoculum.

### 2 - Température :

L'incubation des cultures a lieu dans des enceintes climatisées où la température est réglée à plus ou moins 0°5C.

### 3 - Lumière :

Les cultures sont placées perpendiculairement par rapport au flux lumineux émis par des tubes fluorescents. Les tubes fluorescents (MAZDAFLUOR TF 20 W blanc brillant de luxe) assurent l'éclairage en lumière blanche, les tubes fluorescents (SYLVANIA F 20 T 12) fournissent

les lumières rouge, verte, bleue. Les longueurs d'ondes voisines de 350 nm sont données par des tubes fluorescents (MAZDAFLUOR TF W N 20), la figure 15 a, b, c, d, e, (page 108) représentent les émissions spectrales de ces tubes et indiquent la valeur énergétique des éclairagements mesurés, au niveau des cultures, à l'aide d'une thermophile (modèle KIPP and ZONEN) ou d'un radiomètre (modèle ISCO). Des compteurs horaires assurent les photopériodes désirées. Pour les expériences menées à l'obscurité, les flacons de culture sont recouverts de papier noir et placés dans des enceintes obscures. Dans ce cas, les manipulations ou observations nécessaires, sont réalisées en lumière diffuse de couleur rouge.

### ORIGINE DE LA SOUCHE.

#### 1 - Isolement :

La souche de Nectria galligena Bres. provient d'un périthèce prélevé en mars 1965 sur un chancre de branche de pommier. Suivant les méthodes classiques, à l'aide du micromanipulateur de DE FONTBRUNE, nous avons isolé un asque et une série d'ascospores. Sur milieu eau de pomme de terre gélosée, les cultures monoascosporées ont différencié des périthèces fertiles révélant ainsi l'homothallisme du champignon. Ultérieurement à partir de cultures in vitro, nous avons, à nouveau, pratiqué des isollements d'ascospores, mais aussi de micro et macroconidies. Dans tous les cas, le développement de ces différents isolats en redonnant des ascocarpes, a confirmé les données antérieures.

#### 2 - Entretien :

Afin de préserver toutes les potentialités de la souche qu'une mise en culture artificielle prolongée risquerait d'amoinrir, onensemence périodiquement un fragment mycélien sur milieu hôte (branche de pommier). L'apparition des périthèces, après 45 jours de culture environ, témoigne de la vigueur de la souche qui sert alors à de nouveaux ensemencements.

### 3 - Ensemencements :

L'inoculum consiste en un petit fragment mycélien, prélevé au fil de Nichrome à partir des cultures âgées de 10 jours et gardées à l'obscurité sur milieu nutritif liquide. Pour les expériences en milieu synthétique, les cultures, servant aux ensemencements, sont carencées deux fois par passage sur milieu nutritif minimum.

## EXPRESSION DES RESULTATS.

### 1 - Etude de la croissance :

Les courbes de croissance traduisent, quantitativement, le développement mycélien en milieu liquide et rendent compte des relations qui existent entre les différents degrés de la croissance végétative et les divers stades de la différenciation sexuée.

Les courbes de croissance sont établies par mesure périodique du poids de matière sèche. Ces mesures sont effectuées sur 3 à 5 fioles de ROUX à chaque jour de prélèvement.

Le mycélium est recueilli sur papier filtre sans cendre par filtration sous vide et lavé abondamment à l'eau distillée. Le filtre et le mycélium récolté sont placés dans une boîte à tare, l'ensemble est soumis à dessiccation dans une étuve à 105°C jusqu'à obtention de poids constant. On déduit le poids de matière sèche de la différence entre les résultats de la pesée préalable : boîte à tare + filtre soumis à dessiccation à 105°C, 1 heure et de la pesée boîte à tare + filtre + mycélium.

### 2 - Etude de la reproduction sexuée :

L'importance de la reproduction sexuée et sa qualité sont fonction respectivement du nombre de périthèces et de leur fertilité. Ces 2 facteurs sont pris en considération au 30ème jour de culture.

Le comptage des périthèces dans les tubes de culture, sur milieu gélosé ou liquide, peut être effectué de manière précise et les valeurs indiquées dans les divers tableaux ou diagrammes expriment le nombre

moyen d'ascocarpes par tube, soit sur une surface de  $10 \text{ cm}^2$ . Par contre, l'évaluation quantitative des périthèces apparus dans les fioles de ROUX s'avère très délicate, c'est pourquoi nous avons choisi le terme indice périthécial pour désigner approximativement le nombre de périthèces par fiole. Cet indice permet de comparer commodément l'importance de la reproduction sexuée dans les diverses conditions expérimentales. Le nombre des ascocarpes situés au niveau de 3 baguettes de verre, multiplié par 6 donne le total des fructifications sur les 18 baguettes garnissant le fond d'une fiole de ROUX et donc "l'indice périthécial". Cette manière de procéder est rendue possible en raison de la répartition uniforme des ascocarpes sur l'ensemble du milieu.

La fertilité des périthèces caractérisée par la présence des ascospores peut être constatée : soit à la loupe binoculaire où l'on observe la masse jaunâtre des ascospores émergeant de l'ostiole des ascocarpes, soit au microscope après écrasement des fructifications.

La date d'apparition des premières ébauches peut servir de critère dans le choix des conditions expérimentales, comme d'une manière générale tous les éléments descriptifs (dimensions, couleur...) qui sont de nature à vérifier le parfait développement des ascocarpes et leur ressemblance avec les périthèces observés dans la nature.

*C H A P I T R E   I I I   :*

*B I O L O G I E   D E   N E C T R I A   G A L L I G E N A   B R E S .*

-----

BIOLOGIE DE *NECTRIA GALLIGENA* BRES.

-----

Dans ce chapitre concernant la biologie de Nectria galligena Bres., nous étudierons successivement : la position systématique de l'organisme, les facteurs écologiques de son développement et les conditions générales de la reproduction sexuée in vitro.

Après avoir déterminé et classé le champignon en tant que parasite du pommier, une étude des conditions écologiques de son développement naturel nous servira à définir les éléments nécessaires pour retrouver, in vitro, les différentes étapes de la morphogénèse de N. galligena. Parmi ceux-ci, nous nous sommes particulièrement attaché à préciser les facteurs nutritifs et les facteurs physiques favorables, d'abord à la croissance mycélienne, puis à l'obtention des fructifications sexuées.

I - POSITION SYSTEMATIQUE DE N. GALLIGENA BRES.

N. galligena Bres. fait partie des Eu-Ascomycètes dont la systématique repose sur les caractères morphologiques des fructifications sexuées ou ascocarpes mais aussi des asques et des ascospores.

N. galligena Bres. possède pour ascocarpes ou fruits à asques : des périthèces globuleux surmontés d'un col ostiolé et à paroi pigmentée de couleur rouge cinabre. L'étude morphogénique a démontré qu'ils avaient une origine stromatique et qu'ils étaient pourvus, à maturité, de pseudo-paraphyses descendantes s'intercalant entre les asques. Ces deux

caractères propres aux ascocarpes de N. galligena Bres. permettent de le classer, selon NANNFELDT (1932) parmi les Pyrénomycètes ascoloculaires et non parmi les Pyrénomycètes ascohyméniaux qui possèdent, à l'inverse, des ascothécies, parois d'origine non stromatique, et de vraies paraphyses ascendantes.

Les asques de N. galligena sont entourés d'une paroi composée de deux tuniques (endoascus et exoascus) intimement soudées. N. galligena Bres. appartient donc aux Pyrénomycètes ascoloculaires Unituniqués qui se distinguent des Bituniqués où l'endoascus et l'exoascus sont nettement indépendants (LUTTRELL, 1951). La présence et la nature (anneau ou nasse) de l'appareil apical de l'asque demeurent encore imprécises chez N. galligena qui ne peut donc être rangé parmi les Annellascés ou les Nassascés définis par CHADEFAUD (1965).

Ces observations permettent de constater que N. galligena n'entre en fait dans aucun des 3 groupes de Pyrénomycètes classiques :

- les Dothidéens : Ascoloculaires Nassascés Bituniqués ;
- les Sphaériacéens : Ascohyméniaux Unituniqués Annellascés ;
- les Clavicipitiens : Ascohyméniaux Unituniqués à bouchon apical.

Les ascospores bicellulaires de N. galligena diffèrent des ascospores filamenteuses des Clavicipitiens, aussi peut-on concevoir N. galligena soit comme un Dothidéen ascoloculaire mais aberrant par la structure unituniquée de ses asques ; soit comme un Sphaeriacéen à cause de la paroi asquale unituniquée mais atypique en raison de la nature uniquement stromatique de la paroi et de la présence de pseudo-paraphyses descendantes.

Ces divergences témoignent de l'ambiguïté structurale des Nectriales originellement ascoloculaires bituniqués mais que l'évolution a rapproché des Ascohyméniaux unituniqués. A ce propos, PARGUEY (1966) estime que les caractères ontogéniques des Nectriales obligent à ne plus considérer Ascoloculaires ou Ascohyméniaux, Bituniqués ou Unituniqués, comme des groupes radicalement différents.

Malgré les incertitudes quant à la position systématique et phylogénique exacte des Nectriales, on se réfèrera à la classification énoncée par CHADEFAUD. Cet auteur rattache l'ordre des Nectriales au groupe des Sphaériacéens. Les Nectriales sont issues de l'ancien ordre des Hypocréales composé de Pyrénomycètes charnus aux couleurs vives et claires. Cet ordre regroupe les principaux genres suivants : Hypocrea ; Hypomyces dont H. perniciosus, agent de la môle du champignon de couche ; Giberella : G. Fujikuroi célèbre par sa production d'acide gibberellique qui provoque le gigantisme du riz. Malgré l'absence fréquente de formes parfaites, les espèces asexuées classées dans le vaste ensemble des Fusarium, agents des nombreuses endomycoses végétales ou fusarioses, peuvent être rattachées à l'ordre des Nectriales. Ce dernier comprend aussi le genre Nectria avec les espèces N. cinnabarina responsable de la maladie du corail, parasite de faiblesse fréquent sur les rameaux morts des arbres et dont la forme conidienne est Tubercularia vulgaris, N. galligena Bres. parasite du pommier où il provoque des plaies chancreuses dûes en partie aux auxines qu'il secrète. Sa forme conidienne imparfaite appelée Cylindrocarpon mali fait partie des Mélanconiales.

## II - FACTEURS ECOLOGIQUES DU DEVELOPPEMENT DE N. GALLIGENA BRES.

Dans la nature, le développement de N. galligena se manifeste par la maladie du chancre des arbres fruitiers, du pommier principalement. On doit à WILKOMM (1866), BRESADOLA (1901), WEESE (1911) WOLLENWEBER (1913) la mise en évidence du rôle de N. galligena Bres. et de sa forme imparfaite Cylindrocarpon mali (All.) W. dans la maladie du chancre du pommier qu'HARTIG (1880) et GOETHE (1904) attribuaient à N. ditissima Tul. décrit par TULASNE en 1865. Le nom de "chancre européen du pommier", encore donné à la maladie, souligne le caractère endémique de cette dernière en Europe. Toutefois, ZELLER (1926), WILSON et Mc CARTNEY (1964), LORTIE (1969) montrent la présence de N. galligena en Amérique du Nord, sur pommier mais aussi sur diverses espèces forestières : bouleau, érable et chêne.

Les symptômes de la maladie, les dégâts causés aux vergers et les méthodes de lutte sont amplement décrits dans de nombreux ouvrages de phytopathologie, VIENNOT-BOURGIN (1967), en particulier, analyse le parasitisme de N. galligena et de Cylindrocarpon mali.

De ces études, nous ne retiendrons que les facteurs nutritionnels, dépendants du pommier, et les données climatiques qui favorisent l'infection parasitaire.

Le développement du champignon dans les tissus du pommier débute par la contamination c'est à dire la pénétration du filament mycélien issu de la germination d'une conidie ou d'une ascospore. La contamination est tributaire de 3 éléments : la sporulation, la présence de blessures et les conditions climatiques.

L'émission des spores relativement continue au cours de l'année est cependant très réduite durant l'hiver ; le début du printemps pour les ascospores, mais aussi l'été et surtout l'automne pour les conidies constituent les saisons d'intense sporulation. Les observations et les expériences d'inoculation (ZELLER, 1919 ; WILTSHIRE, 1926 ; MARSH, 1936 ; CROWDY, 1949) montrent que N. galligena envahit le pommier par les cicatrices foliaires à l'automne et lors du débourrement au printemps. La pluie agit de façon multiple : elle provoque l'éjection des ascospores hors des périthèces par éclatement des asques devenus turgescents et elle entraîne les conidies par lessivage des coussinets sporifères. En plus de son rôle de transport et de dissémination : la pluie ou, à défaut, un degré hygrométrique élevé est indispensable à la germination des spores que des températures voisines de 20°C favorisent beaucoup. A cet égard, LORTIE (1970) note qu'une humidité supérieure à 90 p. 100 et des températures comprises entre 20°C et 26°C engendrent, au Laboratoire, un grand pourcentage de germination des ascospores et un maximum de croissance mycélienne.

Dans ces conditions (temps doux et pluvieux), les spores germent rapidement (en 6 heures à 25°C) sur les plaies et le filament mycélien qu'elles émettent pénètre en suivant les tissus conducteurs. Au-delà de la période de contamination, la progression mycélienne est très lente, le mycélium se répand dans l'écorce, atteint les vaisseaux et les rayons médullaires, et provoque une altération fonctionnelle profonde du système vasculaire. A propos de la nutrition du parasite, on peut noter les faits suivants. Sa croissance est étroitement liée à sa présence au niveau du système vasculaire où les courants de sève du pommier lui apportent les éléments nutritifs nécessaires à sa survie. Deuxièmement pour franchir la barrière phellodermique et atteindre le xylème (ASCHROFT, 1934), le champignon infecte les rayons médullaires : tissu de réserve riche en amidon que *N. galligena* dégrade comme le démontre la disparition de ce composé de toutes les cellules infectées (GOETHE, 1880). Enfin les hyphes inter-cellulaires dissolvent la lamelle moyenne par action pectolytique et LORTIE (1964) obtient en culture pure un développement mycélien à partir de composés pectiques comme seule source de carbone par contre la lignine et la cellulose ne sont pas utilisées. Parvenu à un certain stade de développement, le mycélium constitué de filaments, grêles, hyalins, cloisonnés, intra- ou inter-cellulaires, donne naissance aux fructifications.

La fin de l'infection se traduit par l'apparition des structures reproductrices.

Les fructifications asexuées ou sporochies débutent par la formation d'un stroma sur lequel se développe un coussinet hémisphérique, blanc à jaune clair, produisant des conidies hyalines, uni ou pluricellulaires, droites ou arquées, arrondies à leurs deux extrémités. Les sporochies naissent au niveau des altérations corticales, dès le début du printemps sur les chancres de l'année précédente ou en juillet consécutivement aux contaminations de printemps de la même année. Les coussinets sporifères restent fertiles durant toute la bonne saison et la période de pleine végétation stimule la sporulation qui cesse l'hiver.

Essentiellement sur les chancres développés, se constituent les formes sexuées. Sur un stroma se différencient des périthèces globuleux, visibles à l'œil nu sous forme de granulations rouge cinabre, isolées ou le plus souvent agglomérées. Chaque périthèce contient de nombreux asques qui renferment, chacun 8 ascospores hyalines, bicellulaires, ovoïdes. Les périthèces se forment durant l'hiver en période de dormance de l'hôte. Ils mûrissent à cette époque et émettent des ascospores au printemps. On doit donc attribuer à la forte pluviosité et aux faibles moyennes thermiques de l'été 1954 les causes de l'apparition inaccoutumée d'ascocarpes de N. galligena durant cette saison et observée par BULIT (1954) à Versailles. VIENNOT-BOURGIN (1967), quant à lui, observe le développement de périthèces sur pommes momifiées soumises au froid à 0°C.

Les périthèces de N. galligena Bres. semblent donc constituer des formes de conservation adaptées au froid et à la dormance de l'hôte. Par contre, les conidies de Cylindrocarpon mali, par leur nombre et leur formation quasi permanente liée à la période de pleine végétation de l'hôte, se présentent comme les véritables agents pathogènes responsables de l'extension de la maladie. Certains auteurs attribuent à la forme parfaite un rôle de saprophyte et à la forme imparfaite un rôle de parasite vrai.

En conclusion, l'écologie de N. galligena nous suggère que pour des températures de 20°C à 26°C, une nutrition importante (éléments nutritifs de la sève en période de pleine végétation) et des sources de carbone de nature amylacée, le développement mycélien et la conidiogénèse seront importants. Par contre, des températures peu élevées (hiver) et des conditions nutritionnelles restreintes (dormance de l'hôte) peuvent induire la formation des périthèces.

### III - CONDITIONS GENERALES DE LA REPRODUCTION SEXUEE DE N. GALLIGENA IN VITRO.

#### 1 - Historique :

Le métabolisme hormonal (auxine-cytokinine) particulier de Nectria galligena et ses corrélations ont et suscitent encore de fructueuses recherches (BERDUCOU, 1957 - QUINTIN, 1964 - BELTRA et col., 1969 -

TARIS et col., 1970 - MARCHAL et col., 1970 - BARTHE, 1971). Ces études, in vitro, s'appuient sur d'importantes quantités de mycélium obtenues de cultures en milieux synthétiques liquides très variés tels ceux de WESTERGAARD et col., de CZAPEK-DOX ou de KNOP (1/2), glucosés à 10-30 g/l et comportant diverses sources azotées. N. galligena manifeste donc de faibles exigences nutritionnelles : sa croissance et sa sporulation asexuée sont satisfaisantes sur des milieux synthétiques simples dont les compositions ont été particulièrement étudiées par BERDUCOU (1957). Cet auteur constate que les éléments minéraux du milieu de MORQUER et NYSTERAKIS plus encore que ceux de KNOP additionnés ou non de solution de micro - éléments de BERTHELOT ou HELLER favorisent la croissance et la multiplication asexuée de N. galligena. BERDUCOU montre que le fructose (20 g/l) et le glucose (20-30 g/l) pour la croissance, le galactose et l'amidon (20-30 g/l) pour la conidiogénèse constituent les meilleures sources carbonées. Les nitrates permettent également une bonne croissance et une grande sporulation que peuvent activer éventuellement certains acides aminés (alanine, cystéine, tyrosine) et quelques vitamines (biotine, pantothénate de calcium, nicotinamide et riboflavine). Par ailleurs des températures de 22°C-25°C accélèrent le développement mycélien ainsi que la formation des conidies que la lumière stimule fortement.

Contrairement à la conidiogénèse, l'obtention des périthèces de Nectria galligena en culture pure semble très aléatoire et l'étude du déterminisme de la reproduction sexuée de ce parasite in vitro, demeure très incomplète. Pourtant dès 1920, WILTSHIRE obtient des ascocarpes de N. galligena sur milieu maltosé après 3 mois d'incubation. Puis CAYLEY (1921) découvre le stade parfait du parasite dans les conditions suivantes : les cultures de N. galligena se développent sur fragment ou eau de pomme de terre gélosée glycélinée à 25°C, à l'obscurité durant 5 jours puis sont abandonnées pendant 2 mois à la température et à la lumière ambiantes du laboratoire. En 1928, RICHTER renouvelle avec succès l'expérience précédente. Mais MUNSON (1939) n'observe pas de périthèces sur rameaux de

pommier stérilisés ou sur extrait de malt gélosé, par ailleurs il remarque l'importance des basses températures de l'hiver pour la formation des périthèces sur pommier. En 1957, BERDUCOU reprend les expériences de CAYLEY, essaie divers milieux naturels (fragments de carottes, morceaux de pommes, jus de pomme gélosé...) et synthétiques. Elle réalise ses expériences à la température de 22°C sous la lumière naturelle, aucune de ses tentatives n'a permis la fructification parfaite de N. galligena. Elle attribue ses échecs à une perte du pouvoir de fructification sexuée de la souche de N. galligena qu'elle utilise. Enfin LORTIE (1964) cultive à 21°C une souche de Nectria galligena issue de périthèces recueillis dans la nature sur érable et bouleau jaune. Il expérimente sur quatre milieux gélosés à 1 ou 2 % : pomme de terre glucosée (P.D.A.), extrait de malt, milieu de blé (35 g/l) + avoine (35 g/l) et extrait d'écorce de bouleau jaune (70 g/l). Après 8 semaines d'incubation, seuls les deux derniers substrats et surtout celui à base de blé-avoine fournissent de très nombreux périthèces. Cet auteur note que la lumière, sans en préciser les paramètres, est indispensable à la formation des protopérithèces et à leur maturation.

En conclusion, les conditions nutritives et physiques favorables à la croissance mycélienne et à la conidiogénèse semblent faciles à réunir et identiques pour ces 2 phénomènes, contrairement à la reproduction sexuée. La fructification parfaite de Nectria galligena nécessite l'intervention simultanée des facteurs nutritionnels et physiques placés à leur valeur optimale. On peut invoquer le rôle de facteur limitant joué par le milieu ou la température ou la lumière pour expliquer les échecs de certains des travaux précédents. In vitro la formation des périthèces sur milieu synthétique liquide n'a jamais été obtenue, pas plus que ne furent précisés les températures ou les éclaircissements inducteurs du stade parfait de N. galligena.

Toutefois, les travaux de CAYLEY et de LORTIE déjà cités, certains aspects écologiques de la biologie naturelle de N. galligena nous suggèrent les hypothèses suivantes. Premièrement, la disparition de l'amidon des cellules parasitées de pommier et l'obtention de périthèces in vitro sur des substrats naturels amylicés ou maltosés semblent indiquer un effet favorable des milieux naturels riches en amidon ou en ses dérivés. Deuxièmement, dans la nature l'apparition hivernale des périthèces laisse supposer que leur induction in vitro doit s'effectuer à des températures plus basses que celles qui stimulent la croissance mycélienne (20°C - 26°C). Enfin LORTIE a remarqué le rôle indispensable de la lumière dans la formation des ascocarpes au laboratoire.

## 2 - Recherche préliminaire sur les conditions externes favorables à la reproduction sexuée :

Les diverses données précédentes ont orienté les conditions expérimentales des études suivantes. Celles-ci, préliminaires, consistent à rechercher un ensemble de facteurs successivement, le milieu naturel, la température et la lumière, susceptible d'induire la fructification sexuée de N. galligena et destiné à servir de conditions témoins dans la suite de notre expérimentation.

### 1) Etude des milieux naturels :

#### a - Conditions expérimentales :

Durant ces expériences, la température est maintenue constante à 18°C et les cultures sont soumises à une photopériode journalière de 12 heures de lumière blanche. Les milieux de culture sont constitués de fragment de racine de carotte, de morceaux de tubercule de pomme de terre et des substrats gélosés suivants : farine d'avoine 20 g/l, eau de pomme de terre (50 g/l) glucosée à 1 p. 100, eau de pomme de terre aux concentrations de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 g/l.

b - Résultats :

Les résultats sont exprimés dans le tableau n° 1 :

Tableau n° 1 : Influence des milieux naturels sur la reproduction sexuée de N. galligena.

Nature des milieux	A	B	C	D	E <sub>10</sub>	E <sub>20</sub>	E <sub>30</sub>	E <sub>40</sub>	E <sub>50</sub>	E <sub>60</sub>	E <sub>80</sub>
Nombre de périthèces/tube	40	40	80	0	20	50	100	150	200	100	30

LEGENDE :

- A - Fragment de racine de carotte ;  
 B - Fragment de tubercule de pomme de terre ;  
 C - Farine d'avoine (20 g/l) gélosée ;  
 D - Eau de pomme de terre (50 g/l) glucosée à 1 p. 100 et gélosée ;  
 E<sub>10</sub> à 80 - Eau de pomme de terre à la concentration de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 g/l et gélosée.

2) Etude des températures :a - Conditions expérimentales :

Les cultures se développent sur milieu gélosé eau de pomme de terre à la concentration de 50 g/l et sont éclairées en lumière blanche à raison de 12 heures par jour. Nous avons expérimentés aux températures de 10°C, 18°C, 20°C, 22°C et 25°C.

b - Résultats :

Tableau n° 2 : Influence des températures sur la reproduction sexuée de N. galligena.

Température °C	10	14	18	20	22	25
Nombre de périthèces/tube	40	100-150	150-200	0	0	0

3) Etude de l'éclaircissement :a - Conditions expérimentales :

Sur milieu eau de pomme de terre (50 g/l) à la température de 18°C, les cultures sont placées à l'obscurité continue, sous une photopériode journalière de 12 heures de lumière blanche et à la lumière continue.

b - Résultats :

Tableau n° 3 : Influence de la lumière sur la reproduction sexuée de N. galligena.

Conditions d'éclaircissement	Obscurité continue	Photopériode de 12h de lumière blanche/12h d'obscurité.	Lumière continue
Nombre de périthèces/tube	0	150 - 200	100

Discussion - Conclusion :

La formation de périthèces fertiles de N. galligena sur fragment de pomme de terre et sur milieu gélosé farine d'avoine confirme les résultats de CAYLEY et de LORTIE. L'eau de pomme de terre aux concentrations de 40 - 50 g/l induit précocement le plus grand nombre d'ascocarpes alors que le même milieu glucosé à 1 p. 100 inhibe la reproduction sexuée tout en provoquant une croissance mycélienne maximale. Ainsi il existe de grandes différences entre les milieux favorisant soit le développement végétatif soit la différenciation sexuée. L'obtention de fructifications parfaites sur fragment de carotte laisse supposer que les échecs de BERDUCOU ne sont pas dûs au milieu de culture. En plus, des raisons que cet auteur invoque, on peut expliquer la stérilité de la souche de Nectria par des conditions physiques inadéquates en particulier des températures trop élevées. On constate, en effet, que des températures égales ou supérieures à 20°C stérilisent les ébauches périthéciales qui peuvent apparaître ou inhibent totalement la reproduction sexuée. Les valeurs comprises entre 14°C et

18°C représentent l'intervalle thermique optimal pour la formation des ascocarpes que la température de 18°C stimule davantage et plus précocement. Enfin ces expériences montrent que la reproduction sexuée de Nectria galligena est photo-inductible. A l'obscurité continue, il n'y a jamais de différenciation de périthèces fertiles.

On peut conclure que le milieu eau de pomme de terre aux concentrations de 40 - 50 g/l, une température de 18°C et un éclaircissement journalier de 12 heures de lumière blanche contribuent à la formation importante de périthèces fertiles de N. galligena in vitro. Cet ensemble constituera le témoin positif de toutes nos expériences.

#### IV - MORPHOGENESE DE N. GALLIGENA IN VITRO.

La description chronologique des principales étapes de la morphogénèse de N. galligena in vitro et l'étude des rapports croissance mycélienne - reproduction sexuée, font l'objet de ce travail.

##### - Techniques :

L'accroissement de la masse mycélienne en culture liquide est mesurée par le poids de matière sèche.

L'étude morphologique et anatomique mettent en œuvre les techniques exposées par PARGUEY (1966). Les filaments mycéliens, les jeunes primordium et ébauches de périthèces, les asques et ascospores après écrasement des périthèces mûrs sont observés in toto au microscope. L'examen microscopique de la structure des formes reproductives adultes s'effectue à la suite de coupes sériées au microtome.

##### - Conditions expérimentales :

Les différentes observations ont été réalisées sur des cultures placées dans les conditions suivantes :

- milieu eau de pomme de terre (50 g/l) gélosé ou liquide ;
- température : 18°C ;
- éclaircissement : alternance journalière de 12 heures de lumière blanche - 12 heures d'obscurité.

1 - Le développement mycélien :1) Description :

Le mycélium se présente sous forme de filaments ramifiés, grêles, hyalins, cloisonnés de manière éparse, renfermant des gouttelettes huileuses.

N. galligena semble avoir un rythme endogène de zonation que l'alternance journalière de lumière et d'obscurité accentue fortement. On observe alors une zone mycélienne diurne aux hyphes dressées qui alterne avec une zone mycélienne nocturne aux filaments couchés. Ce phénomène de zonation nettement visible à partir du 4ème jour de culture sur milieu gélosé n'apparaît pas en culture liquide où le thalle rarement aérien recouvre uniformément toute la surface du substrat.

2) Croissance (Fig. 1) :

La croissance mycélienne en milieu liquide est très faible durant les 3-4 premiers jours. A cette période de latence, succède une phase exponentielle de croissance qui, du 5ème au 10ème jour, correspond à une croissance très active où le mycélium forme un feutrage continu à la surface du liquide. Au 11ème jour il se produit alors un fléchissement, la masse mycélienne augmente plus lentement pour atteindre un maximum vers les 14ème-15ème jours. Au-delà du 16ème jour, s'amorce rapidement la phase de déclin que les phénomènes d'autolyse, analysés biochimiquement chez N. galligena par BELTRA et col. (1972) atténuent.

Par ailleurs, nous avons réalisé d'autres expériences au cours desquelles variaient les conditions soit de lumière, soit de température, soit de milieu. Nous avons ainsi constaté que :

- la lumière continue ou l'obscurité totale affecte peu l'accroissement pondéral de la masse mycélienne ;

- les températures interviennent surtout sur la période de latence qui est de plus longue durée aux basses températures (10°C et 14°C) et inversement plus courte aux températures supérieures à 18°C. Ces variations se répercutent pendant toute la culture ;

- les modifications de la composition du milieu de culture impliquent un changement de l'allure sigmoïde de la courbe (fig. 1), en particulier les substrats riches en hydrates de carbone (milieu P.D.A. par exemple) réduisent la période de latence et augmentent la valeur du maximum de croissance.

## 2 - La reproduction :

En même temps qu'il croît, le mycélium différencie des organes de reproduction: les uns asexués, les autres sexués.

### 1) Reproduction asexuée :

Ces formes de multiplication végétative appartiennent au genre Cylindrocarpon mali. On distingue :

- des microconidies : 1-2  $\mu$  x 5-7  $\mu$ , hyalines, unicellulaires, ovoïdes. Elles se détachent de l'apex des hyphes mycéliennes et apparaissent en culture liquide vers les 6ème-7ème jours.

- des macroconidies : 3-4  $\mu$  x 20 x 75  $\mu$  : hyalines, droites ou légèrement arquées, arrondies à leurs deux extrémités, pluriseptées (3-7 cellules). Elles sont portées par des conidiophores dichotomisés, agglomérés en touffes dressées à la surface du mycélium. On remarque leur présence en même temps que celle des microconidies ou plus généralement 1 à 2 jours après. La conidiogénèse précède toujours la reproduction sexuée, elle est soumise aux conditions expérimentales définies par BERDUCOU (1957).

### 2) Reproduction sexuée :

Les principaux stades de différenciation des fructifications parfaites ou périthèces de Nectria galligena Bres. à partir du mycélium sont les suivants :

#### a - Apparition des ébauches périthéciales :

Elle constitue la première manifestation macroscopique de la reproduction sexuée. Les ébauches apparaissent sous forme de

petites sphères de couleur orangée vers les 11ème - 12ème jours sur milieu gélosé, les 13ème - 14ème jours en culture liquide.

Les ébauches dérivent d'un primordium méristogène de type stromato-glomérulaire formé sur le trajet d'hyphes mycéliennes ; plusieurs cellules grossissent et se cloisonnent dans tous les sens tandis que s'y ajoutent des filaments recouvrants. Il se forme ainsi un petit nodule que l'on discerne dès les 8-9ème jours de culture.

L'évolution du nodule conduit aux ébauches périthéciales où une couche de cellules externes riches en caroténoïdes enveloppe une masse carpocentrale ; à la base de celle-ci apparaît un peloton ascogonial formé de grosses cellules plurinuclées. Sans que l'on puisse déterminer à quel moment et comment intervient la fécondation de l'ascogone, on peut penser que la formation de l'ébauche avec le peloton ascogonial marque la fin de la phase gamétophytique. Ces formations haploïdes peuvent être induites dans des conditions qui se révèlent par la suite, inhibitrices du développement ultérieur en périthèces avec asques et ascospores, par exemple : obscurité continue, température élevée, milieu trop riche.

#### b - Formation des périthèces sub-adultes :

Le passage des ébauches aux périthèces sub-adultes, du 13ème au 17ème jour de culture, s'effectue selon le schéma classique de la reproduction sexuée des pyrénomycètes :

- formation de la locule à asques par lyse de certaines cellules carpocentrales ;
- transformation des cellules carpocentrales supérieures en un méristème apical générateur des pseudoparaphyses ;
- évolution des cellules ascogoniales en vésicules prosporophytiques puis en sporophyte à dicaryon.

Extérieurement, l'individualisation du col et une pigmentation rouge cinable distinguent les périthèces sub-adultes.

c - Périthèce adulte :

Vers le 20ème jour de culture, à l'intérieur du périthèce, des cellules ascogènes dangeardiennes engendrent des asques (75 - 95  $\mu$  x 12 - 15  $\mu$ ). Des divisions successives (méiotique et mitotique) du noyau de la cellule ascogène donnent naissance à 8 ascospores par asque.

Les ascospores (6 - 8  $\mu$  x 15 - 21  $\mu$ ) sont hyalines, ovoïdes, bicellulaires, observables à partir du 25ème jour de culture.

Au 30ème jour de culture, durée de nos expériences, de nombreux périthèces globuleux, de 250 à 400  $\mu$  de diamètre et de 400-500  $\mu$  de hauteur, sont parvenus à maturité. Ils exudent alors au sommet de leur col une masse jaunâtre d'ascospores agglomérées.

- Remarques :

La production des organes sexués se prolonge et s'intensifie durant une dizaine de jours après la formation des premières ébauches. Celles-ci apparaissent, sur milieu gélosé, au niveau de la zonation mycélienne développée au 5ème jour de culture. Cette étude révèle que la maturation des périthèces de Nectria galligena est très lente, 10 jours au moins séparent la différenciation des ébauches de celle des ascospores alors que seulement 24 heures distancent ces 2 évènements chez Leptosphaeria typhae. Ce phénomène constitue un élément de choix pour apparécier distinctement le déterminisme de chacune des étapes de la reproduction sexuée de N. galligena : primordium, peloton ascogonial, pro-sporophyte, sporophyte à dicaryon, asques, ascospores.

La croissance mycélienne conditionne la différenciation sexuée, plusieurs expériences corroborent cette idée. Ainsi un développement mycélien peu rapide (basses températures, 10-14°C ; milieu nutritif pauvre) va de pair avec une apparition tardive des ébauches. Mais dans tous les cas, les premiers ascocarpes précèdent de quelques jours (2 jours) le maximum de croissance et leur nombre s'accroît considérablement au début de la phase de déclin. Il semble alors qu'un état particulier du mycélium et l'appauvrissement du milieu nutritif constituent des facteurs importants de la différenciation sexuée.

PLANCHE HORS TEXTE N° 1 :

-----

Etapas de la différenciation sexuelle de Nectria galligena Bres.

-----

- Figure 1 : Ebauche contenant un ascogone et son trichogyne.
- Figure 2 : Périthèce subadulte ; la cloche sus-hyméniale commence à produire les pseudoparaphyses ; sur le ménisque sous-hyménial, en voie de désorganisation, repose l'appareil sporophytique.
- Figure 3 : Périthèce adulte ; la locule est occupée par les asques et par un tissu pseudoparenchymateux, dérivant des pseudoparaphyses ; quelques ascospores mûres se sont échappées par le col, ouvert et garni de périphyses.
- Figure 4 : Asque adulte, contenant 8 ascospores bicellulaires.
- Figure 5 : Ascospore adulte.

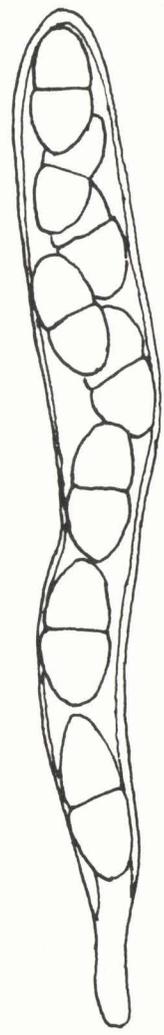
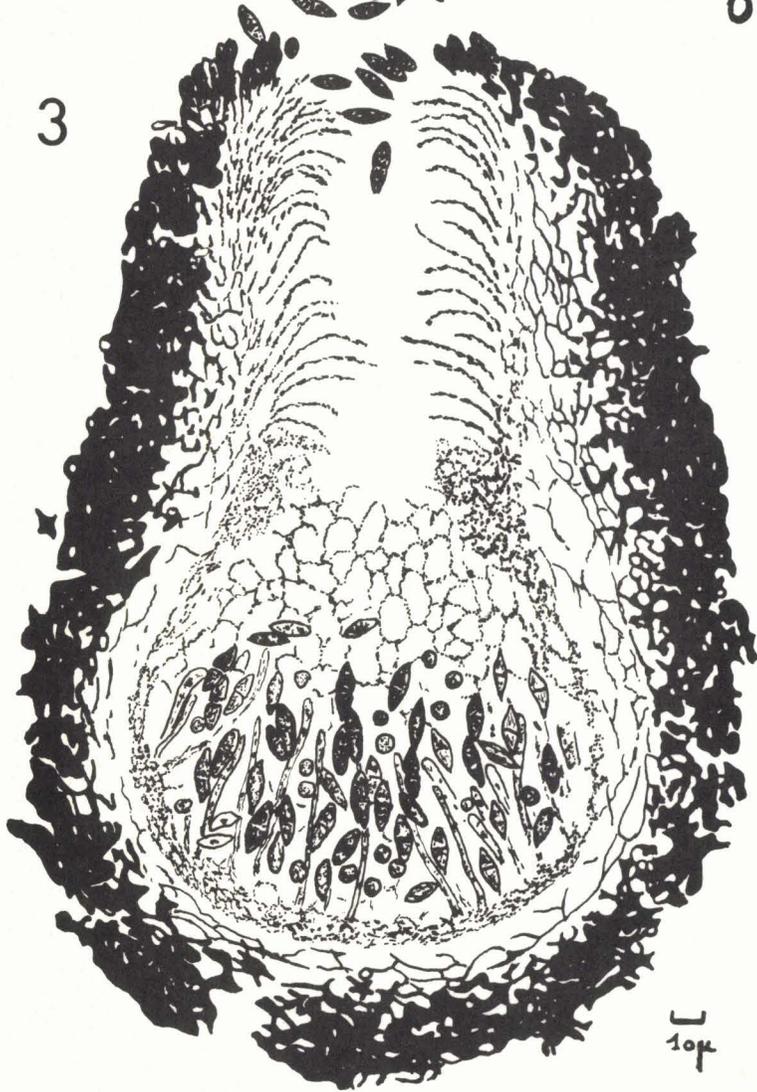
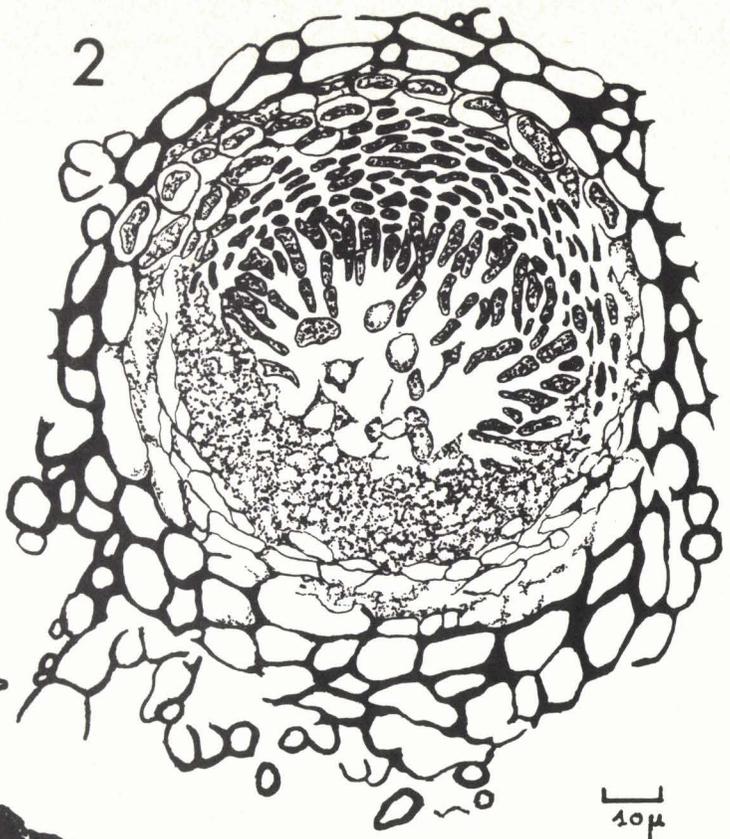
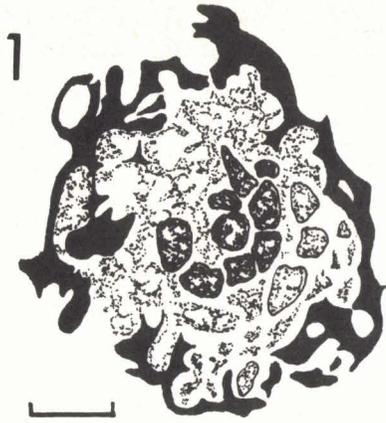
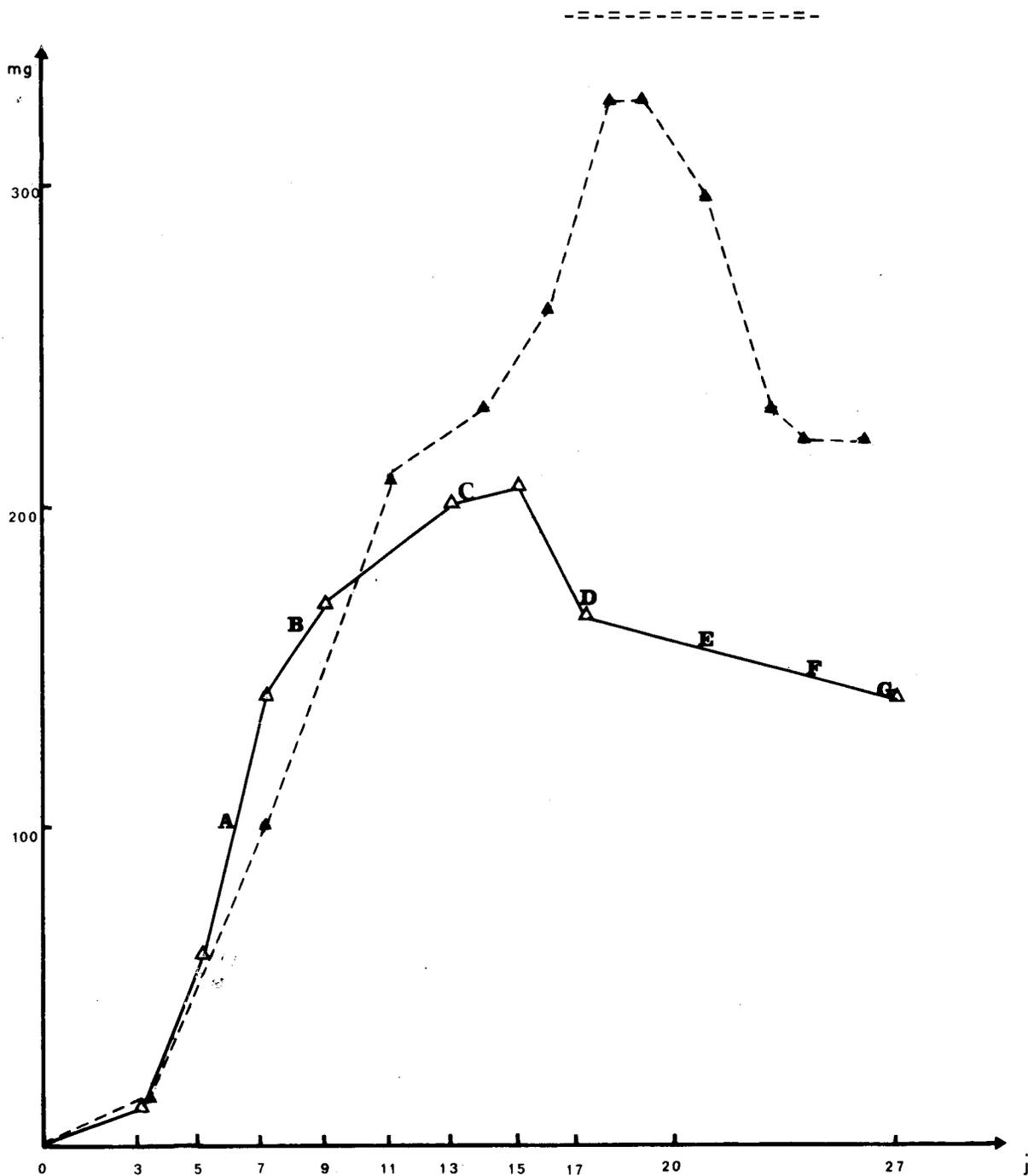


Figure 1 : Croissance et reproduction de *Nectria galligena* Bres.



- |         |   |  |
|---------|---|--|
| abs.    | : | nombre de jours de culture                                 |
| ord.    | : | poids de mycelium sec en mg                                |
| -Δ--Δ-- | : | croissance mycélienne sur eau de pomme de terre 50 g/l     |
| —▲—▲—   | : | croissance mycélienne sur P.D.A. (1 p. 100 de glucose)     |
| A       | : | début de la conidiogenèse                                  |
| B       | : | formation des primordium                                   |
| C       | : | apparition des ébauches périthéciales                      |
| D       | : | évolution du sporophyte à dicaryon. Périthèces sub-adultes |
| E       | : | périthèces adultes. Formation des asques                   |
| F       | : | différenciation des ascospores                             |
| G       | : | périthèces matures.  |

En conclusion la figure n° 1 résume nos observations. Elle traduit l'évolution simultanée de la croissance mycélienne et de la différenciation sexuée sur un milieu favorable à la reproduction, comparée à la croissance et à la stérilité provoquée par un milieu défavorable (P.D.A.).

Par rapport aux travaux déjà effectués sur la reproduction sexuée de N. galligena, notre étude précise les conditions culturales : température 18°C, lumière blanche (photopériode journalière) et milieu qui induisent en moins de 30 jours une formation importante et régulière de périthèces fertiles.

CH A P I T R E I V :

INFLUENCE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DU MILIEU DE CULTURE

SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DE N. GALLIGENA BRES.

-----

INFLUENCE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DU MILIEU  
DE CULTURE SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DE N. GALLIGENA BRES.

-----

L'élaboration d'un milieu synthétique induisant, en culture liquide, la reproduction sexuée de N. galligena constitue le but de ce travail. Nous avons tenu compte, dans cette étude, des nombreuses expériences qui définissent l'influence des éléments chimiques du substrat sur la différenciation sexuée de divers champignons. Nous n'en rappellerons pas les résultats mais il faut souligner que toutes ces recherches à de rares exceptions près, ont été effectuées sur milieu gélosé et qu'elles témoignent de la difficulté d'obtention de la fructification fongique en culture liquide. En raison du grand nombre d'ascocarpes produit par N. galligena sur eau de pomme de terre, nous avons analysé, plus particulièrement, les travaux de MILLER (1956), de BURTON (1966) et de BEEVER et BOLLARD (1970). En effet, MILLER établit la composition minérale de l'eau de pomme de terre glucosée ; BURTON précise, à des fins alimentaires, la nature chimique et la concentration de tous les éléments constitutifs des tubercules de pomme de terre. Enfin BEEVER et BOLLARD déterminent, par comparaison avec des milieux synthétiques, comment la composition chimique de l'eau de pomme de terre stimule la croissance mycélienne de divers champignons (Diplodia pinea ; Mycosphaerella melonis, Peniophora sacrata, Rhizoctonia sp.). Nous devons à ces dernières analyses le choix du milieu synthétique ayant servi de base à notre expérimentation. Nous étudierons successivement les besoins en carbone, en azote, en sels minéraux et en facteurs de croissance essentiels à la fructification parfaite de N. galligena Bres.

- Conditions expérimentales générales :

Les expériences sur milieu naturel nous ont permis de préciser les conditions de température et de lumière favorable à la reproduction

sexuée de N. galligena. Aussi, toutes les séries culturales ont été soumises :

- à une température de 18°C ;

- à un éclairage photopériodique : 12 heures de lumière blanche alternant avec 12 heures d'obscurité.

Dans ces conditions, les cultures réalisées sur eau de pomme de terre (50g/l) et la reproduction sexuée de N. galligena qui en résulte, telle que nous l'avons décrite, ont servi de témoin. Toutes les expériences ont été pratiquées en milieu liquide dans des fioles de ROUX dont le fond est garni de baguettes de verre.

#### I - INFLUENCE DES SOURCES DE CARBONE ET D'AZOTE SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DE N. GALLIGENA.

Dans cette partie, le rôle des sources de carbone et d'azote a été déterminé par addition de ces éléments à un milieu synthétique composé comme suit :

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,8 g	$\text{BO}_3\text{H}_3$ .....	3 mg
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,25 g	$\text{AlCl}_3$ .....	1 mg
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, \text{H}_2\text{O}$ ....	0,4 mg	$\text{MoNa}_2\text{O}_4, 2\text{HO}$ ...	1 mg
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....	10 mg	Thiamine.....	100 µg
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....	10 mg	Pyridoxine.....	100 µg
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ .....	1 mg	Biotine.....	5 µg
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ .....	5 mg	Eau.....	1000 ml

Le sulfate de fer présent dans le milieu a été préalablement complexé par l'E. D. T. A.

##### 1 - Etude de la nature et de la concentration des sources de carbone :

Dans ces expériences, le nitrate de potassium à raison de 370 mg par litre soit 50 mg d'azote/litre assure les besoins azotés de N. galligena.

1) Choix de la nature de la source de carbone :

Nous avons expérimenté avec les composés carbonés suivants :

- Trois pentoses : xylose, arabinose, ribose ;
- Trois hexoses : glucose, galactose, fructose ;
- Trois diholosides : lactose, maltose, saccharose ;
- Un triholoside : raffinose ;
- Deux polyholosides : amidon, tylose (méthyl cellulose) ;
- Un polyalcool : mannitol.

Chacun de ces éléments est introduit dans le milieu de culture à la concentration de 1 g de carbone par litre.

Après 30 jours de culture, on constate que N. galligena utilise toutes les sources de carbone pour sa croissance végétative que les hexoses et les diholosides stimulent plus sensiblement. De même, les ascocarpes de N. galligena sont apparus sur les divers substrats mais l'obtention précoce et importante de périthèces caractérise le développement sur xylose, glucose, saccharose, maltose et amidon.

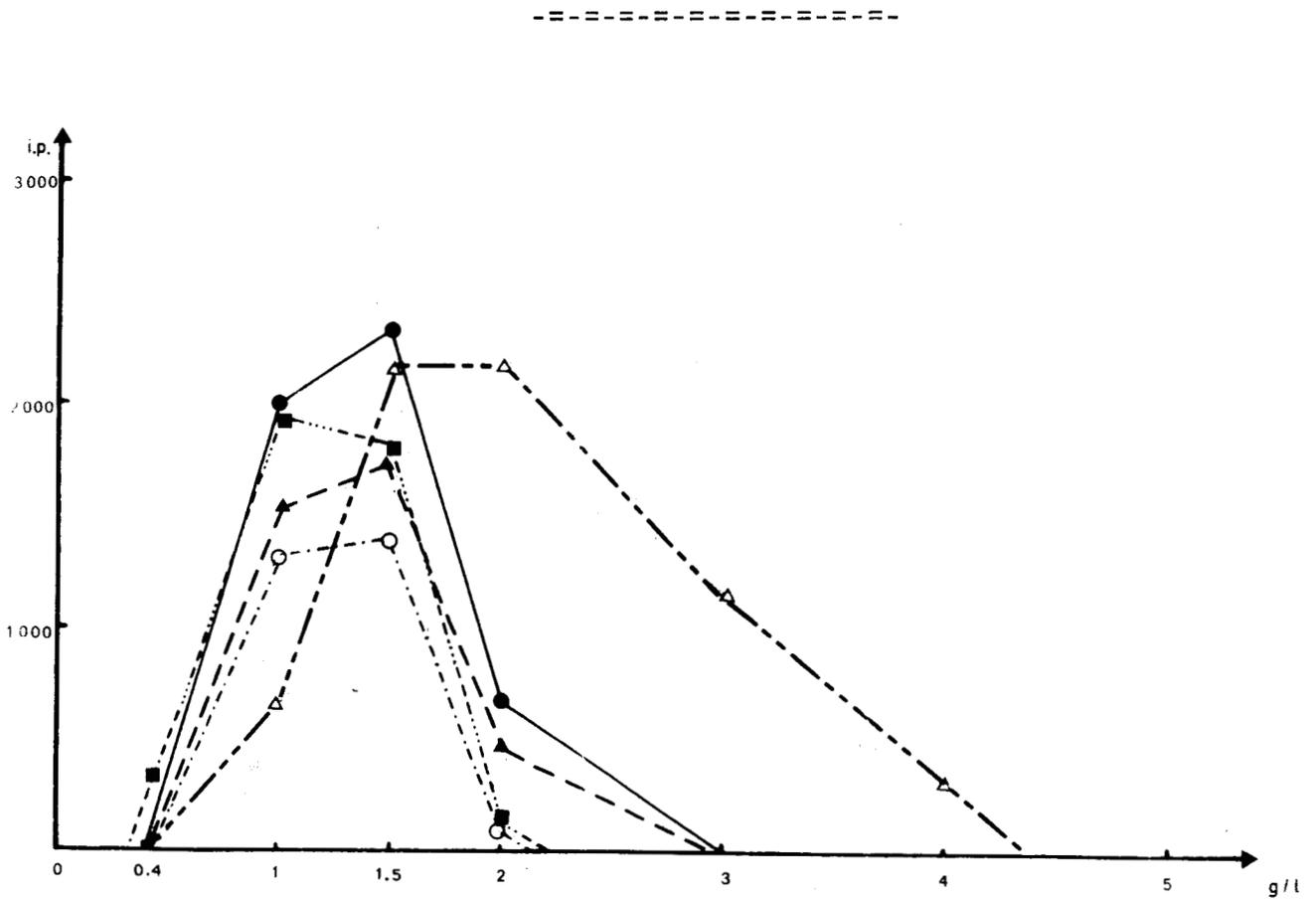
2) Etude de la concentration en carbone :

Afin de préciser davantage la nature et la concentration du composé carboné favorable à la reproduction sexuée de N. galligena, nous avons employé le xylose, le glucose, le saccharose, le maltose et l'amidon aux concentrations de 0,4 ( 1 - 1,5 - 2 - 3 - 4 et 5 g de carbone par litre.

Les résultats sont exprimés dans la figure n° 2.

Il ressort, de ces expériences, que la nature de la source carbonée intervient plus spécifiquement sur la stimulation que sur l'induction de la fructification parfaite. On note ainsi que des périthèces peuvent se développer sur tous les substrats carbonés mais l'on observe un nombre d'ascocarpes important uniquement sur xylose, saccharose, glucose avec un maximum sur maltose et amidon. Il en résulte que la différenciation

Figure 2 : Influence de la nature et de la concentration de la source de carbone sur la reproduction sexuée de *N. galligena* Bres.



abs. : concentration de carbone en g/l

ord. : indice périthécial i.p.

○---○ xylose

■---■ glucose

▲---▲ saccharose

●---● maltose

△---△ amidon

sexuée de N. galligena dépend étroitement de la concentration en carbone dont les valeurs optimales sont comprises entre 1 et 2 g. de carbone par litre. Ces dernières diffèrent selon la nature de la source de carbone utilisée : 1 g. de carbone / litre pour le glucose ; 1,5 g. de carbone/l pour le maltose et 1,5 à 2 g de carbone/litre pour l'amidon. Seul, parmi ces composés, l'amidon présente un large spectre d'activité où les concentrations supérieures à 2 g de carbone par litre n'inhibent pas totalement la fructification parfaite au profit d'une croissance mycélienne exubérante.

## 2 - Etude de la nature et de la concentration des sources d'azote :

Pour cette expérimentation, on emploie le glucose comme source de carbone à raison de 2,5 g par litre soit une concentration de 1 g de carbone par litre.

### 1) Choix de la nature de la source d'azote :

Les analyses de BEEVER et BOLLARD (1970) montrent que l'eau de pomme de terre, après autoclavage, procure aux champignons des sources d'azote de nature très variée. Parmi tous les acides aminés présents, l'asparagine, l'arginine, l'acide  $\gamma$  aminobutyrique et à un degré moindre la valine, les acides glutamique et aspartique, l'alanine, l'isoleucine, la serine et la phénylalanine sont présents en quantité appréciable dans l'eau de pomme de terre. A ces sources d'azote organique, il convient d'ajouter comme sources d'azote susceptibles d'alimenter N. galligena : l'azote minéral sous forme de nitrate de potassium et de sodium et aussi l'azote ammoniacal fourni par le sulfate d'ammonium.

Nous avons expérimenté chacune de ces sources d'azote en les introduisant dans le milieu synthétique à la concentration de 50 mg d'azote par litre. A la même concentration finale d'azote, nous avons réalisé une série culturale comportant un mélange de tous ces composés.

A la fin de l'expérience, on remarque que les ascocarpes fertiles de N. galligena sont apparus en grand nombre sur les milieux où l'azote est fourni par l'acide  $\gamma$  aminobutyrique, l'asparagine, les acides

aspartique et glutamique et les nitrates de potassium et sodium. Il faut noter cependant que tous les autres milieux initient la reproduction sexuée, en particulier l'arginine et la phénylalanine, tandis que l'azote ammoniacal et le mélange des diverses sources azotées sont moins bien métabolisés par N. galligena tant pour la croissance végétative que par sa différenciation sexuée.

## 2) Etude de la concentration en azote :

En vue de déterminer la concentration favorable d'azote, nous avons utilisé le nitrate de potassium, l'asparagine, l'acide  $\gamma$  aminobutyrique, l'acide aspartique et l'acide glutamique aux concentrations de 25, 50, 75, 100 et 125 mg d'azote par litre.

Les résultats sont exprimés dans la figure n° 3.

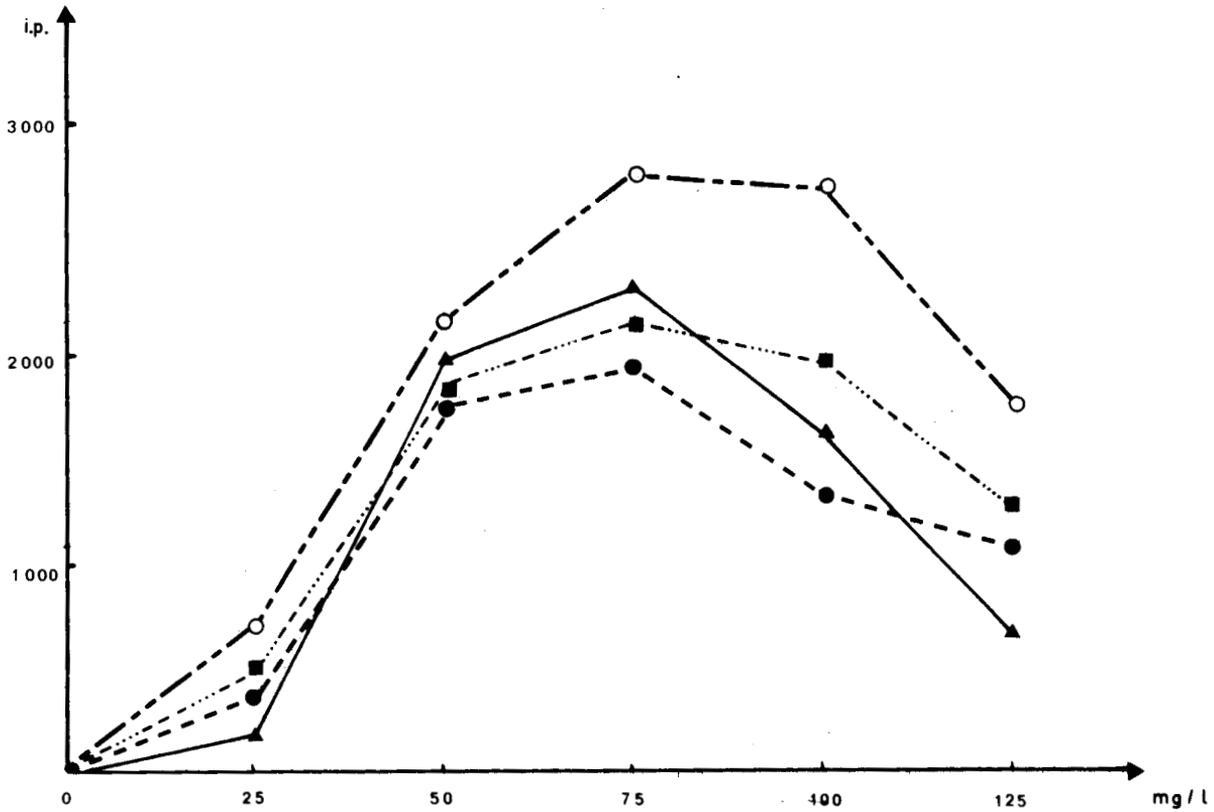
Cette étude établit de manière très nette, que 75 mg d'azote par litre induit un maximum d'ascocarpes et ceci quelque soit la nature de la source azotée. On remarque de plus que les teneurs en azote présentent un spectre d'efficacité plus large que celles en carbone. En effet pour obtenir une quantité de périthèces supérieure à l'indice 1.000 les teneurs de carbone peuvent varier de 1 à 1,5 g par litre tandis que celles d'azotes sont comprises entre 50 mg et 125 mg par litre. La nature de la source azotée affecte peu le nombre de périthèces ; mais l'asparagine, les acides aspartique et glutamique et tout particulièrement l'acide  $\gamma$  aminobutyrique, stimulent nettement la différenciation sexuée de N. galligena.

## 3 - Influence de la nature des diverses combinaisons carbone-azote :

L'effet sur la reproduction sexuée de N. galligena des combinaisons entre diverses sources de carbone et d'azote fait l'objet de cette expérience. Nos travaux précédents révèlent que les associations, d'une part glucose ou maltose ou amidon - nitrate de potassium, d'autre part glucose-asparagine ou acide  $\gamma$  aminobutyrique ou acide aspartique ou acide glutamique, favorisent la reproduction sexuée de N. galligena. Mais dans les 2 cas, le choix du nitrate de potassium puis du glucose et de leur

Figure 3 : Influence de la nature et de la concentration de la source d'azote sur la reproduction sexuée de N. galligena Bres.

-----



abs. : concentration d'azote en mg/l

ord. : indice périthécial i.p.

● - - ● nitrate de potassium

■ - - - ■ asparagine

▲ - - ▲ acide aspartique ou acide glutamique

○ - - ○ acide  $\gamma$ amino-butyrique.

concentration était fixé arbitrairement, aussi peut-on supposer, à l'appui des résultats acquis, que des combinaisons différentes entre des sources de carbone et d'azote stimuleront davantage le nombre des ascocarpes formés.

### 1) Conditions expérimentales :

#### Source de carbone :

- glucose        1 g de carbone par litre ;
- maltose      1,5 g de carbone par litre ;
- amidon       1,5 g de carbone par litre.

Ces 3 composés ont toujours été expérimentés isolément de façon que la source de carbone n'ait qu'une origine unique.

#### Source d'azote :

La source d'azote a été fournie dans tous les cas à la concentration de 75 mg d'azote par litre sous forme de :

- nitrate de potassium ;
- asparagine ;
- acide amino-butyrique ;
- acide glutamique.

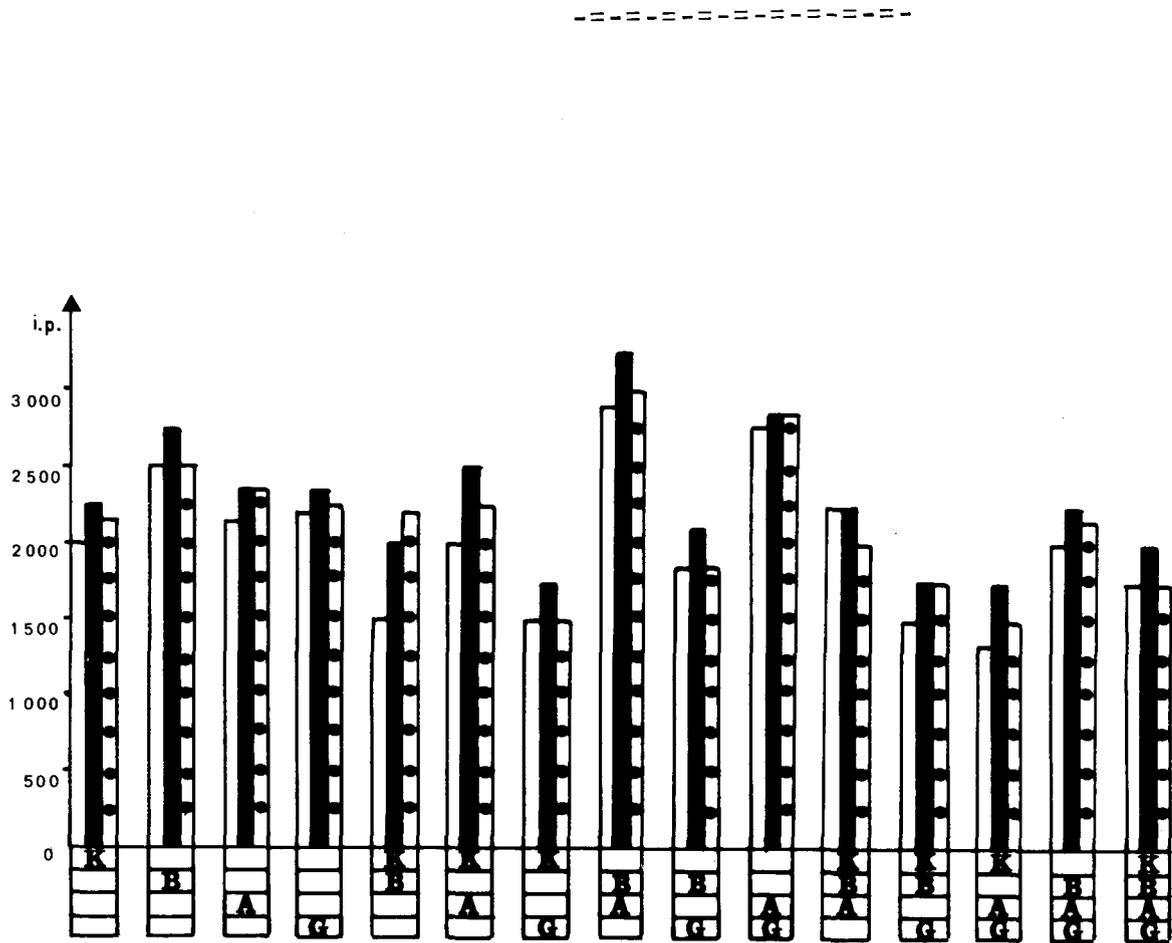
Soit isolément, soit en combinaison, chacune des sources azotées fournit alors la moitié, le tiers ou le quart de la concentration d'azote finale (75 mg/l).

Nous avons ainsi cherché à déterminer l'importance de la reproduction sexuée de N. galligena en fonction des associations d'une source de carbone soit le glucose, soit le maltose, soit l'amidon avec une source azotée issue de la combinaison du nitrate de potassium, de l'asparagine, de l'acide  $\gamma$  amino-butyrique et de l'acide glutamique ce qui représente 45 possibilités.

### 2) Résultats :

La figure n° 4 exprime les résultats obtenus.

Figure 4 : Influence de la nature de la combinaison carbone-azote sur la reproduction sexuée de *N. galligena* Bres.



- glucose 1 g de carbone/l
- maltose 1,5 g de carbone/l
- ▨ amidon 1,5 g de carbone/l
- K** nitrate de potassium
- B** acide amino-butyrique
- A** asparagine
- G** acide glutamique

i.p. indice périthécial

La concentration finale en azote du milieu est toujours égale à 75 mg/l quelque soit l'origine de la source azotée.

Il se dégage de ces résultats que le maltose, plus encore que l'amidon, constitue le meilleur substrat carboné, les combinaisons azote-carbone à base de maltose stimulant, dans l'ensemble, davantage la reproduction sexuée de N. galligena. L'acide  $\gamma$  amino-butyrique, seul, augmente fortement le nombre des ascocarpes qui possèdent cependant des dimensions plus réduites que ceux observés sur asparagine. Ces 2 sources d'azote combinent leurs effets quantitatifs et qualitatifs pour induire, dans des proportions supérieures au témoin eau de pomme de terre, un grand nombre de périthèces fertiles. Ce phénomène existe, quelque soit la source de carbone utilisée, mais il est encore plus net lorsque l'on emploie le maltose. Les autres combinaisons azotées comportant 3 ou 4 sources d'azote y compris l'asparagine et l'acide  $\gamma$  amino-butyrique conduisent à des résultats quantitativement moins importants, leur efficacité étant parfois inférieure à celle des sources d'azote simples.

En conclusion, le maltose à la concentration de 1,5 g de carbone par litre, et une source d'azote constituée d'asparagine et d'acide  $\gamma$  amino-butyrique, à la concentration de 75 mg d'azote par litre forment un complexe carbone-azote capable d'induire en très grande quantité des périthèces fertiles de N. galligena.

#### 4 - Etude du rapport carbone/azote :

De nombreux chercheurs attachent une importance primordiale au rapport carbone/azote et considèrent la valeur de celui-ci comme l'élément déterminant de la reproduction sexuée.

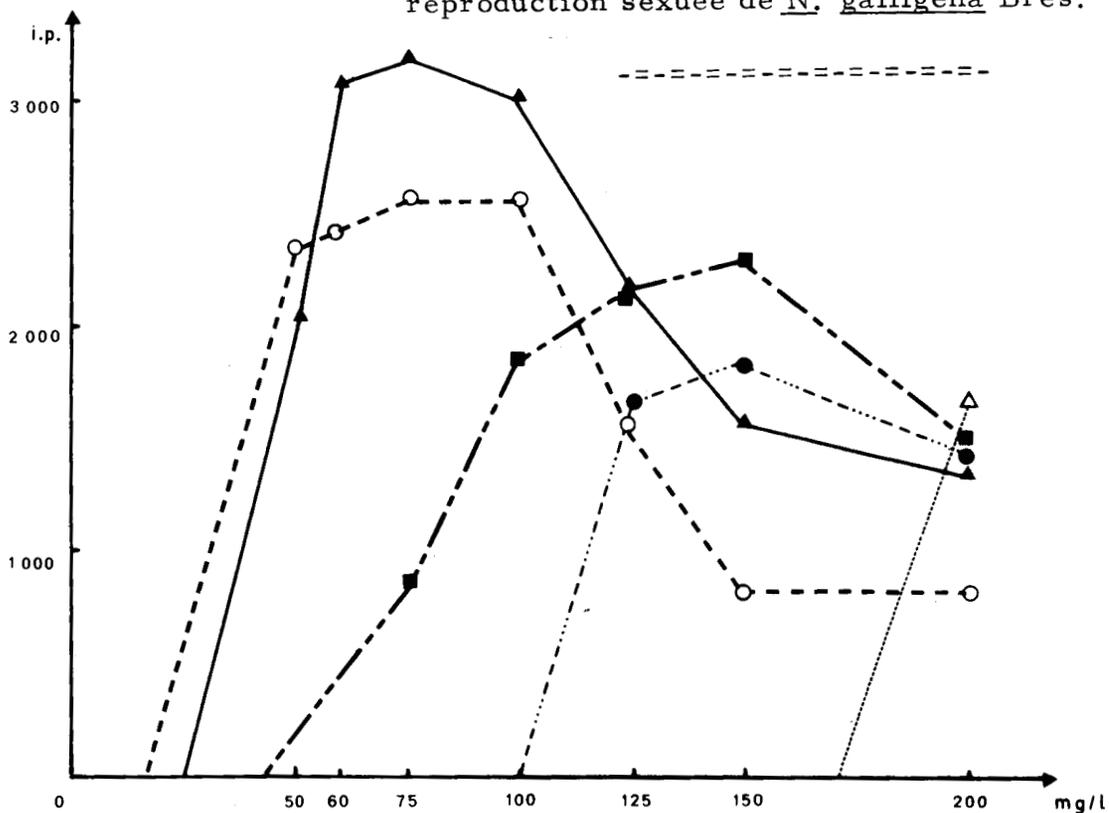
##### 1) Conditions expérimentales :

Dans cette étude le maltose constitue la source de carbone, l'asparagine et l'acide  $\gamma$  amino-butyrique interviennent simultanément et à part égale comme sources d'azote. A chacune des concentrations d'azote suivantes :

50 ; 60 ; 75 ; 100 ; 125 ; 150 ; 200 mg d'azote par litre, nous avons fait correspondre 5 concentrations en carbone :

1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 et 3 g de carbone.

Figure 5 : Influence de la valeur du rapport carbone-azote sur la reproduction sexuée de *N. galligena* Bres.



abs. : concentration d'azote en mg/l fournie à égalité par l'asparagine et l'acide  $\gamma$ amino-butyrique.

ord. : indice périthécial i.p.

- O--O maltose 1 g. de carbone/l
- ▲—▲ maltose 1,5 g. de carbone/l
- maltose 2 g. de carbone/l
- maltose 2,5 g. de carbone/l
- Δ.....Δ maltose 3 g. de carbone/l

Ce mode opératoire permet de définir pour des concentrations d'azote et de carbone de valeurs absolues très différentes des rapports carbone/azote identiques ou très voisins. Ainsi les concentrations en g. de carbone/litre de 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 et 3 correspondant respectivement aux concentrations en mg d'azote/litre de 50, 75, 100, 125 et 150 sont dans le même rapport C/N égal à 20. Les valeurs des rapports C/N étudiés sont comprises entre 5 et 60.

Les résultats de cette étude sont reportés dans la figure n° 5.

Les résultats expérimentaux mettent en valeur l'importance du rapport C/N dans l'induction sexuée de N. galligena.

Des rapports C/N supérieurs à 25 inhibent la fructification parfaite de N. galligena qu'elles que soient les teneurs en carbone et en azote. Inversement, les rapports C/N compris entre 5 et 25 initient les périthèces à des concentrations de carbone et d'azote considérées jusqu'alors comme inhibitrices. Ainsi au cours des expériences précédentes, nous avons précisé que, pour des concentrations d'azote de 50 - 75 mg/l, des taux de carbone supérieurs à 2 g/l, soient des rapports C/N de l'ordre de 30 à 40, empêchent la formation des ascocarpes. Dans la présente expérience, ces données sont confirmées, mais si pour des teneurs en carbone identiques, le rapport C/N est ramené à une valeur voisine de 15 par une concentration en azote de 200 mg/l, on note encore la présence de périthèces. Le rapport C/N intervient donc d'une manière déterminante dans la reproduction sexuée bien plus que les valeurs absolues des concentrations de carbone et d'azote. Ces dernières semblent ne stimuler la différenciation sexuée que dans la mesure où un rapport C/N favorable, induit ce phénomène. A cet égard, des concentrations en carbone de 1,5 g/l et en azote de 75 mg/l définissent un rapport optimal C/N égal à 20 et amplifient, d'une manière significative, le nombre des ascocarpes fertiles de N. galligena.

## DISCUSSION.

Les "témoins zéro" de toutes nos expériences c'est-à-dire les milieux dépourvus d'azote ou de carbone ont démontré les besoins absolus de N. galligena pour ces éléments. L'utilisation du maltose ne représente pas un aspect spécifique du métabolisme de N. galligena puisque de nombreux chercheurs notamment HALL (1971), LACOSTE et col. (1972) emploient ce composé pour obtenir des périthèces de Sordaria fimicola et d'Arachniotus albicans. La fructification abondante de N. galligena sur milieu eau de pomme de terre suggérait que l'amidon ou un de ses dérivés : maltose ou glucose constituerait sans doute une source de carbone appréciée. L'emploi du maltose confirme les vues de COCHRANE (1958) selon lesquelles les di ou polysaccharides stimulent la reproduction sexuée plus que les hexoses. Une vitesse d'hydrolyse ou de métabolisation plus lente maintenant, un taux de carbone optimal pendant une plus longue période suffit-elle à expliquer, selon la théorie de BRETZLOFF (1954), la supériorité du maltose sur le glucose dans l'induction sexuée ?. Les concentrations inhibitrices différentes de ces 2 composés le laissent supposer.

Les nombreux acides aminés présents dans l'eau de pomme de terre et divers travaux expérimentaux (NICHOLAS, 1965) plaident en faveur d'une source azotée composée par un mélange d'acides aminés plutôt que par un seul de ces corps. Nos expériences où un mélange de plusieurs acides aminés pourvoit aux besoins azotés de N. galligena ne s'avèrent pas concluantes. Nous avons adopté une solution mixte : l'asparagine associée à l'acide  $\gamma$  amino-butyrique constitue la source d'azote la plus favorable à la reproduction sexuée de N. galligena. Le rôle de l'asparagine sur le développement périthécial a déjà été mis en évidence par TIMNICK et col. (1951) chez Diaporthe phaseolarum et par WESTE et col. (1963) chez Ophiobolus graminis. L'emploi de l'acide  $\gamma$  amino-butyrique paraît plus spécifique et son efficacité supérieure à celle de l'acide glutamique est curieuse vu leur interconversion aisée. En effet l'acide  $\gamma$  amino-butyrique cède son groupement aminé à l'acide céto-glutarique pour former l'acide L glutamique et l'acide butyrique et à l'inverse la décarboxylation enzymatique de l'acide glutamique conduit à l'acide  $\gamma$  amino-butyrique.

Pour fructifier sexuellement N. galligena requiert des teneurs en carbone et en azote très faibles. Les quantités de carbone (1,5 g/l) initiant la différenciation sexuée sont très inférieures à celles que préconise HAWKER (1939 - 1951). De même les taux d'azote voisins de 75 mg/l stimulent la fructification de N. galligena mais aussi des Leptosphaeria, (LACOSTE, 1964) ou encore de Venturia inaequalis (ROSS et BREMMER, 1971). Ces différentes concentrations définissent un rapport carbone/azote optimal égal à 20 mais des valeurs C/N comprises entre 5 et 25 demeurent inductrices, corroborant ainsi les travaux de CAMPBELL (1958), de CURTIS (1959), de WESTE (1970), de HALL (1971). Un rapport C/N favorable permet d'étendre la gamme des concentrations de carbone et d'azote efficaces mais, dans le cas de N. galligena, celles-ci n'atteignent jamais les proportions fixées par HANLIN (1961) qui obtient des périthèces de Nectria gliocladioides, sur un milieu contenant 2 p. 100 de glucose. L'action du rapport C/N est prépondérante mais le mécanisme physiologique par lequel elle contrôle la reproduction sexuée reste indéterminé. Quoique des quantités très élevées de carbone, tout en favorisant la croissance mycélienne, inhibent la formation des périthèces, on ne peut cependant pas en déduire que l'initiation et la maturation sexuelles sont dépendantes d'un arrêt du développement mycélien ou d'un épuisement du milieu. Elles sont conditionnées par un état d'équilibre particulier où le rapport puis la valeur des concentrations d'azote et de carbone jouent un rôle primordial.

## II - INFLUENCE DES ELEMENTS MINERAUX ET DES VITAMINES.

### 1 - Etude de la composition minérale du milieu :

Certains auteurs imputent à l'apport minéral de la gélose le fait que les substrats gélosés engendrent de meilleurs résultats que les milieux liquides. Les analyses spectrographiques de MILLER (1956) de l'eau gélosée mais aussi de l'eau de pomme de terre gélosée précisent ces idées. Par ailleurs BURTON (1966) détaille la composition minérale des cendres de tubercule de pomme de terre. Nous retenons de ces travaux

que les éléments suivants forment l'essentiel du contenu minéral de l'eau de pomme de terre : potassium, phosphore, magnésium, calcium, soufre, sodium, fer, zinc, manganèse, cuivre, bore, molybdène et aluminium.

De nombreux travaux antérieurs aux nôtres et des expériences personnelles relatives à l'influence du potassium, phosphore, magnésium et soufre ont démontré le caractère indispensable de ces éléments dans la croissance et la reproduction sexuée de N. galligena. Nous envisagerons donc uniquement ci-après :

- l'étude du fer, du zinc, du manganèse et du cuivre ;
- l'étude du bore, du molybdène et de l'aluminium ;
- l'étude du calcium ;

dont les rôles dans le métabolisme inducteur des périthèces pouvaient paraître plus aléatoire.

#### Conditions expérimentales :

Le milieu de base ayant servi à toutes les expérimentations est le suivant :

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,8 g	D maltose .....	3,7 g
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,25 g	Asparagine .....	180mg
Thiamine .....	100 $\mu\text{g}$	Acide $\gamma$ amino butyrique ...	300mg
Pyridoxine .....	100 $\mu\text{g}$		
Biotine .....	5 $\mu\text{g}$	Eau .....	1000ml

#### 1) Influence des concentrations de fer, de zinc, de manganèse et de cuivre :

##### a) Conditions expérimentales :

Pour cette étude nous ajoutons au milieu de base :

$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, \text{H}_2\text{O}$ .....	0,4 g	$\text{AlCl}_3$ .....	1 mg
$\text{MoNa}_2\text{O}_4, \text{H}_2\text{O}$ .....	1 mg	$\text{BO}_3\text{H}_3$ .....	3 mg.

Le fer, le zinc, le manganèse et le cuivre sont introduits dans le milieu sous forme de sulfates.

FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....(10 mg)    MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O..... (5 mg)  
 ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....(10 mg)    CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O..... (1 mg).

Nous déterminerons successivement l'influence de diverses concentrations de fer, de zinc, de manganèse, et de cuivre sur la formation des périthèces de N. galligena. Chaque série d'essais, concernant l'étude des variations quantitatives d'un seul élément, s'effectue toujours en présence des 3 autres dont les concentrations, figurées ci-dessus entre parenthèses, demeurent constantes.

Nous avons employé les concentrations suivantes :

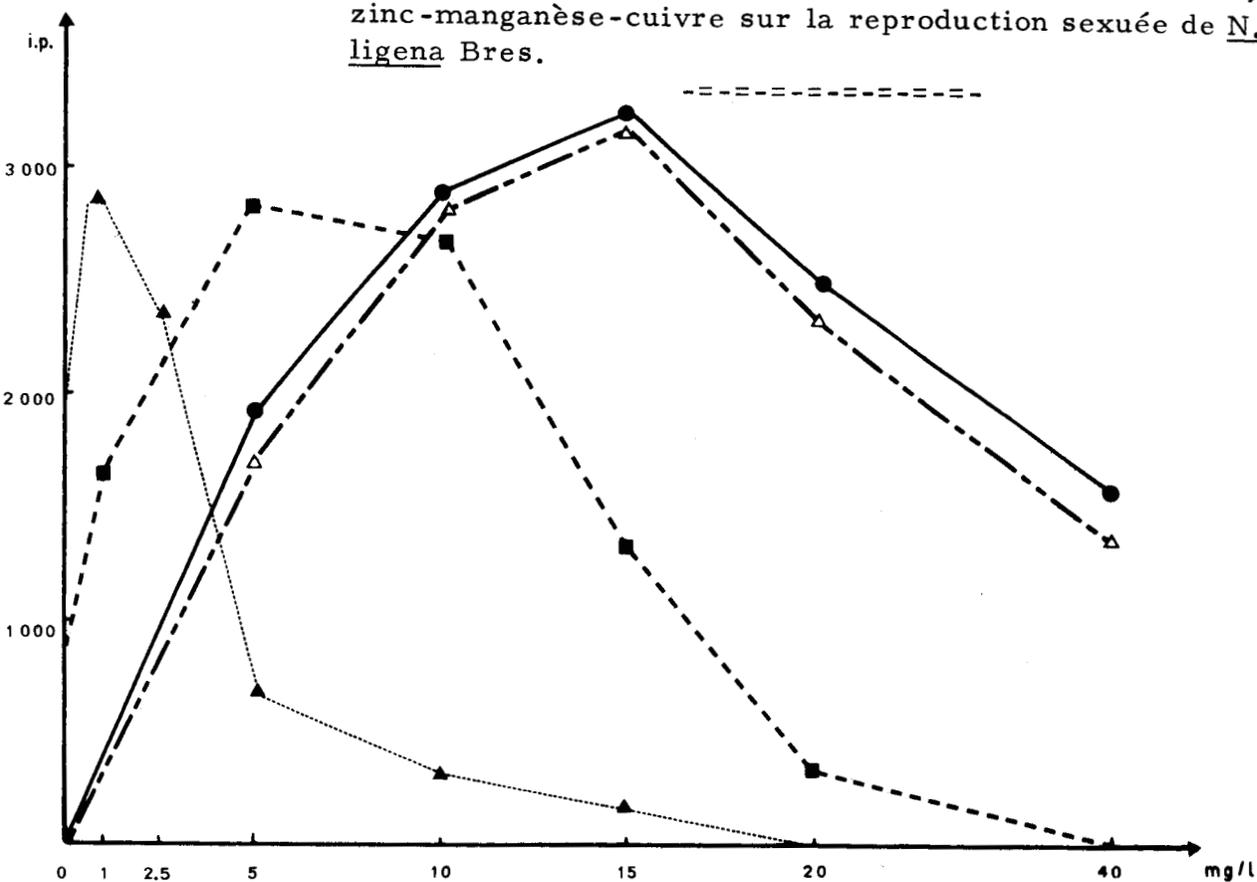
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0 - 5-10-15-20-40 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	
MnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0 - 1-5-10-15-20-40 mg/l
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0 - 0,5-1-2,5-5-10-20-40 mg/l.

b - Résultats :

Ils sont exprimés dans la figure n° 6.

Le fer et le zinc sont indispensables à l'initiation des périthèces de N. galligena. Ils représentent un besoin nutritionnel spécifique de la reproduction sexuée puisque leur absence n'entraîne pas une inhibition de la croissance mycélienne. Les courbes d'efficacité des diverses concentrations de fer et de zinc sont semblables, on observe une grande stimulation des ascocarpes de N. galligena pour des teneurs en sulfate de fer et de zinc égales à 15 mg/l ce qui correspond à environ 3 mg de fer ou de zinc par litre. Chez N. galligena, le fer ne peut palier l'absence du zinc et réciproquement, mais certains auteurs (KOEHN, 1971 ; McHAW et JOHNSON, 1970) accordent un rôle plus essentiel au zinc. Le zinc agirait au niveau des mécanismes régulateurs régissant les rapports entre les métabolismes glucidique et azoté. Des taux de sulfate de fer ou de zinc supérieurs

Figure 6 : Influence de la concentration des éléments minéraux, fer-zinc-manganèse-cuivre sur la reproduction sexuée de N. gal-  
ligena Bres.



abs. : concentration des divers sulfate en mg/l

ord. : indice périthécial. i.p.

△---△ sulfate de fer

●---● sulfate de zinc

■---■ sulfate de manganèse

▲.....▲ sulfate de cuivre

à 20 mg/l deviennent toxiques et entraînent une diminution du nombre des périthèces. Ces résultats sont en accord avec ceux de nombreux chercheurs. L'induction sexuée de N. galligena ne dépend pas du cuivre et du manganèse. Ces 2 sels minéraux interviennent uniquement dans la stimulation de la différenciation sexuée. Les concentrations de sulfate de manganèse comprises entre 1 et 5 mg/l soit environ 0,3 à 2 mg de manganèse par litre augmentent le nombre de périthèces. Mais, à 20 mg/l, le manganèse devient inhibiteur de la reproduction sexuée alors qu'il n'exerce aucun effet défavorable sur la croissance mycélienne. La toxicité du cuivre lors du développement de N. galligena apparaît nettement pour des teneurs en sulfate de cuivre dépassant 5 mg/l et des taux supérieurs à 20 mg/l inhibent totalement la fructification et sont de plus très néfastes pour la croissance mycélienne. Cette toxicité du cuivre est mise à profit par les arboriculteurs qui emploient des bouillies cuivriques pour enrayer la maladie du chancre dans les vergers. Par contre de faibles concentrations de sulfate de cuivre, situées entre 0,5 et 1 mg/l soit 0,1 à 0,2 mg de cuivre par litre, s'avèrent optimales pour la fructification parfaite.

## 2) Influence de l'aluminium, du bore et du molybdène :

### a - Conditions expérimentales :

Préalablement à cette expérimentation, on complète le milieu de base par les composés suivants :

Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O.....	0,4 g	MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O.....	5 mg
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	15 mg	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O.....	1 mg.
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	15 mg		

L'aluminium, le bore et le molybdène sont introduits sous forme d'AlCl<sub>3</sub>, de BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub> et de MoNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O aux concentrations de 0 ; 0,5 ; 1 ; 3 et 5 mg/l.

b - Résultats :

On constate que ces composés ne modifient pas d'une manière perceptible le nombre de périthèces de N. galligena qui est équivalent en l'absence ou en la présence de ces 3 composés. Il nous a semblé que les concentrations de 0,5 mg/l pour  $AlCl_3$ , de 3 mg/l pour  $BO_3H_3$  et de 1 mg/l pour  $MoNa_2O_4$ ,  $H_2O$  peuvent être adoptées. On peut remarquer que le bore et le molybdène sont des éléments constitutifs des milieux synthétiques utilisés par CURTIS (1969), McONIE-SNYDER (1966) pour la production des ascocarpes de Nectria haematococca et de Gnomonia fructicola. L'aluminium fait partie de solution oligodynamique (HELLER) et c'est seulement à ce titre qu'il a pu être utilisé dans les milieux de culture fongique.

3) Influence du calcium :

Le rôle du calcium dans la reproduction sexuée est très controversé. Pour certains auteurs (CURTIS, 1969 ; HALL, 1971 ; ROSS et col., 1971) le calcium n'exerce aucun effet sur la formation des ascocarpes de Nectria haematococca, de Sordaria fimicola ou de Venturia inaequalis. D'autres chercheurs reconnaissent le calcium comme indispensable à la croissance mycélienne de Phytophthora cryptogea (ERWIN et col., 1961), à la maturation des structures sexuelles de Podosordaria leporina (KOEHN, 1971) et de divers Pythium sp. (YANG et col., 1965, LENNEY et col., 1966). Pour BASU (1951 - 1958), le calcium constitue un facteur indispensable de l'initiation de périthèces de Chaetomium sp. et un élément nutritionnel spécifique de la reproduction sexuée.

Ces résultats contradictoires nous ont incité à étudier plus particulièrement l'influence du calcium sur la formation des ascocarpes de N. galligena.

a - Conditions expérimentales :

Nous additionnons au milieu de base les éléments suivants :

FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	15 mg	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O.....	1 mg
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	15 mg	MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O.....	5 mg
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub> .....	3 mg	MoNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O.....	1 mg

Nous avons étudié l'influence des concentrations de phosphate monocalcique Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O suivantes :

	0	50	100	200	400	800	mg/l
ce qui implique respectivement des teneurs en calcium et en phosphore de :							
	0	8	16	32	64	128	mg/l de calcium
et de	0	12	24	48	96	192	mg/l de phosphore.

Afin de dissocier l'action éventuelle de ces deux éléments, nous avons entrepris trois nouvelles séries d'essais à partir :

- d'un mélange de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) et de phosphate monosodique (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O) qui fournit des taux en calcium et en phosphore identique à ceux définis précédemment.

- de chlorure de calcium uniquement aux concentrations en calcium de

0	8	16	32	64	128	mg/l
---	---	----	----	----	-----	------

et en phosphore nulle

- de phosphate monosodique aux concentrations en calcium nulle et en phosphore de

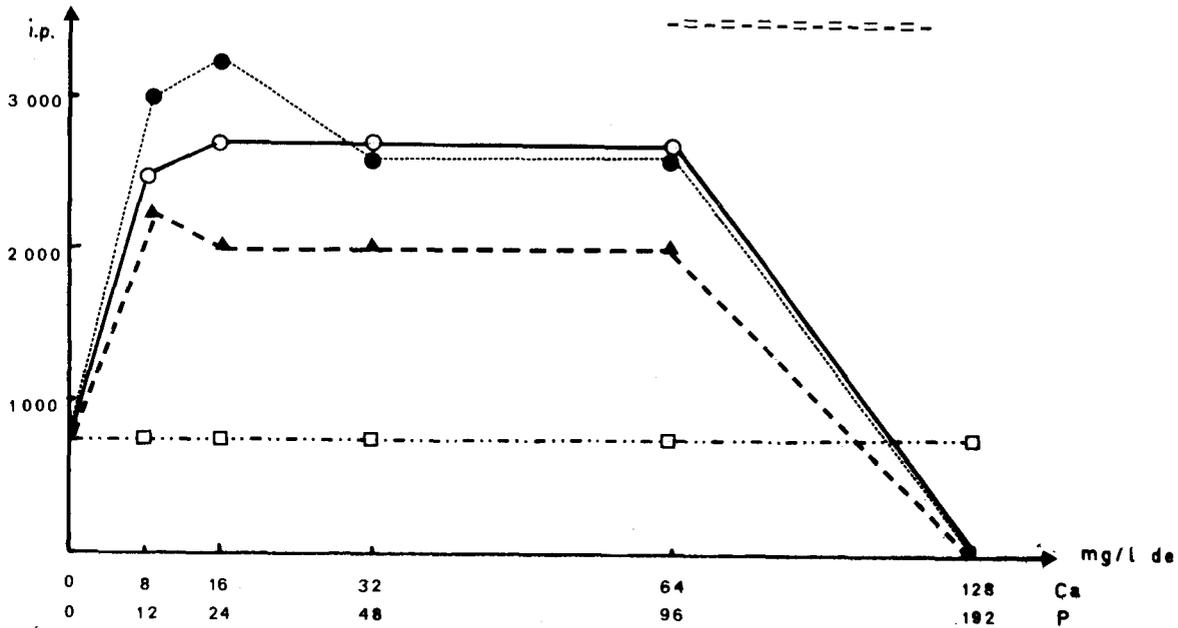
0	12	24	48	96	192	mg/l.
---	----	----	----	----	-----	-------

Dans cette expérience, nous avons voulu préciser l'effet éventuel du phosphore dû à l'incorporation du phosphate monocalcique. Aussi nous entendons par "milieu témoin sans phosphore" l'absence d'un apport supplémentaire d'éléments. Mais en réalité, le milieu n'est jamais dépourvu de phosphore puisqu'il contient toujours 0,8 g de phosphate monopotassique.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure n° 7.

Le calcium n'est pas essentiel à l'initiation de la reproduction sexuée de N. galligena mais il la stimule de façon très nette. De plus l'influence du calcium se traduit sur la morphologie de périthèces qui sont

Figure 7 : Influence du calcium sur la reproduction sexuée de Nectria galligena Bres.



Nota : Dans le milieu minéral, le phosphate monopotassique est constant.

□ ···· □ influence du phosphate monosodique : témoin sans calcium

▲ - - ▲ influence du phosphate monoalcalique

○ — ○ influence du chlorure de calcium : témoin sans phosphore

● ····· ● influence du chlorure de calcium et phosphate monosodique

i.p. indice périthécial (ord.)

Ca calcium

P phosphore.

de plus grandes dimensions et de couleurs plus vives. Une teneur en calcium égale à 128 mg/litre inhibe la formation des ascocarpes tandis que 15-20 mg de calcium par litre exercent un effet maximal sur le nombre de fructifications. Le phosphate monosodique induit des périthèces en quantité égale à ceux apparus sur milieu témoin sans calcium et sans phosphore mise à part la présence de ce dernier élément due à l'addition du phosphate monopotassique. Pourtant les combinaisons, chlorure de calcium - phosphate monosodique, augmentent plus que le chlorure de calcium, utilisé seul, le nombre des ascocarpes de N. galligena. Le phosphate monocalcique semble moins bien convenir au champignon. Pour HENDRIX et col. (1969) le calcium annule la toxicité des agents chélateurs, on peut aussi lui attribuer un rôle au niveau de la perméabilité membranaire.

### 3 - Etude des vitamines :

Selon BURTON (1966), les tubercules de pomme de terre contiennent de la vitamine C et surtout des vitamines du groupe B : la thiamine (ou aneurine ou vitamine B<sub>1</sub>), la pyridoxine ou vitamine B<sub>6</sub>, la riboflavine ou vitamine B<sub>2</sub>, l'acide nicotinique (ou vitamine B<sub>5</sub>). De nombreux chercheurs ajoutent communément au milieu de culture une solution vitaminique comprenant, outre les vitamines précédentes, l'acide para amino-benzoïque, l'inositol et la biotine. Plus précisément les expériences de HAWKER (1939) sur Melanospora destruens Shear. ; de ROBBINS et MA (1942), BARNETT et LILLY (1947) sur Ceratostomella fimbriata ; de LILLY et BARNETT (1947) sur Sordaria fimicola ; de CAMPBELL (1958) et de HOLMES (1970) sur Ceratocystis sp. ; de McONIE et SNYDER (1965) sur Gnomonia fructicola et de KAARIK (1960) sur Ophiostoma sp. montrent la prépondérance de la thiamine, de la biotine et de la pyridoxine dans la fructification parfaite de ces champignons. COCHRANE (1965) évoque le rôle des vitamines qui, en tant que constituants ou cofacteurs d'enzymes, interviennent dans la métabolisation du carbone et de l'azote.

Par suite, nous avons étudié l'influence de la biotine, de la thiamine, de la pyridoxine, de l'acide nicotinique et de la riboflavine sur la fructification parfaite de N. galligena.

1) Conditions expérimentales :

On incorpore les vitamines dans le milieu témoin "T"

suisvant :

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,8 g	$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ .....	1 mg
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,25 g	$\text{BO}_3\text{H}_3$ .....	3 mg
$\text{CaCl}_2$ .....	50 mg	$\text{MONa}_2\text{O}_4$ .....	1 mg
$\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$ .....	100 mg	Maltose.....	3,7g
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....	15 mg	Asparagine.....	180mg
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....	15 mg	Acide $\gamma$ amino butyrique.....	300mg
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ .....	5 mg	Eau.....	1000ml

Les vitamines sont introduites aux concentrations suivantes soit seules, soit selon certaines combinaisons :

Thiamine	vitamine $\text{B}_1$	100 $\mu\text{g}/1$
Pyridoxine	vitamine $\text{B}_6$	100 $\mu\text{g}/1$
Biotine	vitamine H	5 $\mu\text{g}/1$
Nicotinamide	vitamine $\text{B}_5$	100 $\mu\text{g}/1$
Riboflavine	vitamine $\text{B}_2$	100 $\mu\text{g}/1$ .

Nous avons observé la fructification sexuée de N. galligena sur les milieux suivants :

1 - T + $\text{B}_1$	7 - T + $\text{B}_1$ + $\text{B}_6$
2 - T + $\text{B}_6$	8 - T + $\text{B}_6$ + H
3 - T + H	9 - T + $\text{B}_1$ + $\text{B}_6$
4 - T + $\text{B}_2$	10 - T + $\text{B}_1$ + H + $\text{B}_6$ + $\text{B}_5$
5 - T + $\text{B}_5$	11 - T + $\text{B}_1$ + H + $\text{B}_6$ + $\text{B}_5$ + $\text{B}_2$
6 - T + $\text{B}_1$ + H	12* - T + ( $\text{B}_1$ + H + $\text{B}_6$ ) x 2

L'expérience 12\* T + ( $\text{B}_1$  + H +  $\text{B}_6$ ) x 2 indique, que, dans cet essai, nous avons doublé les concentrations des 3 vitamines.

2) Résultats :

La présence de la riboflavine dans les milieux 4 et 11, semble être à l'origine du faible développement mycélien et de l'absence de périthèce observé chez N. galligena. Pour CARLILE (1962), la régression de la croissance végétative de Phycomyces blakesleeanus, causée par la riboflavine, peut être due à une photolyse non biologique de ce composé qui est alors transformé en un produit inhibiteur appelé lumichrome.

A l'exception des milieux 4 et 11, tous les autres substrats favorisent la reproduction sexuée de N. galligena. En particulier, la formation de nombreux ascocarpes sur le milieu témoin "T" dépourvu de vitamines semble démontrer que N. galligena n'est pas exigeant vis à vis de ces facteurs de croissance. On enregistre des résultats comparables à ceux obtenus sur milieu témoin "T" dans les cas 2-3-5 et 8.

Cependant on remarque que les milieux 1 et 10 et plus encore 6-9 et 12 stimulent fortement la fructification parfaite. L'efficacité déterminante de l'aneurine (vitamine B<sub>1</sub>, milieu 1) est renforcée par l'addition de biotine (vitamine H, milieu 6). BRETZLOFF (1954) a déjà précisé l'action conjuguée de ces 2 facteurs de croissance et le rôle enzymatique important de la biotine dans l'induction sexuée de Sordaria fimicola. L'existence simultanée dans le milieu de culture (milieu 9) de la thiamine, de la biotine et de la pyridoxine augmente de façon importante la quantité de périthèces, l'effet synergique dû à l'association de ces 3 facteurs est encore plus marquée lorsque leurs concentrations sont doublées (milieu 12). Le substrat 12 réalise donc la meilleure combinaison vitaminique pour N. galligena.

Les teneurs en thiamine, en biotine et en pyridoxine égales, respectivement à 200 µg, 10 µg et 200 µg., doubles de celles couramment utilisées, ne sont pas spécifiques à la reproduction sexuée de N. galligena comme le prouvent HAYMAN (1963) et HALL (1971) qui incorporent ces facteurs de croissance à des concentrations semblables pour obtenir la fructification sexuée de Rosellinia limoniispora et de Sordaria fimicola.

Remarque : Nous avons vérifié l'influence de la concentration en ions  $H^+$  du milieu synthétique sur la fructification sexuée de N. galligena. Nous avons étudié les pH : 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9.

Nous constatons que :

- les pH 5 et 6 induisent beaucoup de périthèces, les pH 4 et 7 très peu ;
- les pH 3 - 8 - 9 inhibent la différenciation sexuée et de plus le pH 3 ne permet pas la croissance mycélienne.

Ces expériences confirment donc qu'un pH égal à 5,5, employé durant toutes les expériences précédentes, est optimal.

## DISCUSSION.

Au cours de ce travail, nous avons envisagé les diverses possibilités nutritionnelles favorables à la formation abondante et régulière de périthèces de N. galligena en culture liquide. Au terme de cette étude, nous pouvons admettre que la reproduction sexuée de ce champignon est optimale lorsqu'il se développe sur un milieu liquide composé des éléments suivants :

$KH_2PO_4$ .....	0,8 g	* $BO_3H_3$ .....	3 mg
$MgSO_4, 7H_2O$ .....	0,25 g	* $MoNa_2O_4, 2H_2O$ .....	1 mg
* $NaH_2PO_4, H_2O$ .....	100 mg	* Thiamine .....	200 $\mu g$
* $CaCl_2$ .....	50 mg	* Pyridoxine .....	200 $\mu g$
$FeSO_4, 7H_2O$ .....	15 mg	* Biotine .....	10 $\mu g$
$ZnSO_4, 7H_2O$ .....	15 mg	Maltose .....	3,7 g
* $MnSO_4, H_2O$ .....	5 mg	Asparagine .....	180 mg
* $CuSO_4, 5H_2O$ .....	1 mg	Acide $\gamma$ Amino Butyrique .....	300 mg

Eau distillée 1000 ml.

On peut distinguer parmi ces composés ceux indispensables à l'induction sexuée de ceux qui agissent uniquement sur la stimulation du nombre des ascocarpes, ces derniers étant désignés par un astérisque dans le tableau précédent. Cette recherche fait apparaître que les valeurs maximales de la croissance mycélienne et de la reproduction sexuée requièrent des

besoins nutritionnels qualitativement surtout quantitativement distincts voire antagonistes. Cette remarque peut s'appliquer aussi à la comparaison conidiogénèse-fructification parfaite, en particulier on peut observer des conidies sur les milieux riches en carbone (5 g de carbone/l) qui inhibent pourtant la reproduction sexuée. Nous avons obtenu sur ce milieu synthétique liquide des ascocarpes fertiles de N. galligena en très grand nombre (environ 3.000 par fiole de ROUX) et la morphogénèse sexuée se déroule de manière semblable à celle décrite sur le milieu naturel eau de pomme de terre (50 g/l).

*C H A P I T R E   V   :*

*ACTION DES FACTEURS EXTERNES SUR LA REPRODUCTION SEXUEE.*

*DE N. GALLIGENA BRES.*

-----

## ACTION DES FACTEURS EXTERNES SUR LA REPRODUCTION

SEXUÉE DE *N. GALLIGENA* BRES.

-----

Tout en demeurant favorable à l'induction sexuée, un milieu peut, selon sa nature chimique, modifier l'action des facteurs thermiques ou lumineux dans les processus sexuels. Ainsi MANACHERE (1970) remarque que, sous des conditions lumineuses identiques, les potentialités de fructification du basidiomycète *Coprinus congregatus* varient avec la composition du milieu. De même, des teneurs différentes de sulfate de cuivre influencent le rythme des zonations des cultures éclairées de *Leptosphaeria michotii* (JEREBZOFF, 1969). Dans le cas de *N. galligena* si, au cours d'expériences préliminaires, nous avons déterminé le rôle de la température et de la lumière, ces études ont été effectuées sur milieu naturel gélosé. Aussi ce chapitre a pour but de définir et de préciser l'action de ces deux facteurs externes sur la reproduction sexuée de *N. galligena* en milieu synthétique liquide.

## ACTION DE LA TEMPERATURE .

-----

Chez les champignons, la température constitue un facteur écologique ayant une action très importante sur la reproduction sexuée. Elle motive souvent l'utilisation, au laboratoire, de valeurs thermiques analogues à celles qui, dans la nature, induisent la fructification fongique. Ainsi WICKLOW et MALLOCH (1971) justifient la formation des ascocarpes de *Thelebolus* sp. in vitro à 0°C par son aptitude naturelle

à se reproduire sous la neige.

De plus, l'action de la température peut s'exercer différemment à chaque étape du développement fongique. COCHRANE (1957) a déjà souligné l'inégalité des optima thermiques de la croissance végétative et de la reproduction sexuée. De même, on peut se demander si la température conditionne uniformément l'ensemble de la morphogenèse sexuée de N. galligena ou si il est possible d'envisager comme HIRSCH (1954) chez Neurospora crassa, que l'initiation et la maturation sexuées sont tributaires de températures différentes. Enfin, comme le suggèrent les travaux de LEACH (1971) sur la fructification parfaite de Pleospora herbarum peut-on concevoir qu'une thermo-induction puisse se substituer à la lumière pour initier les ascocarpes de N. galligena Bres ?.

Nous aborderons donc ces divers aspects en étudiant l'influence thermique sur le développement de N. galligena cultivé sur milieu synthétique liquide.

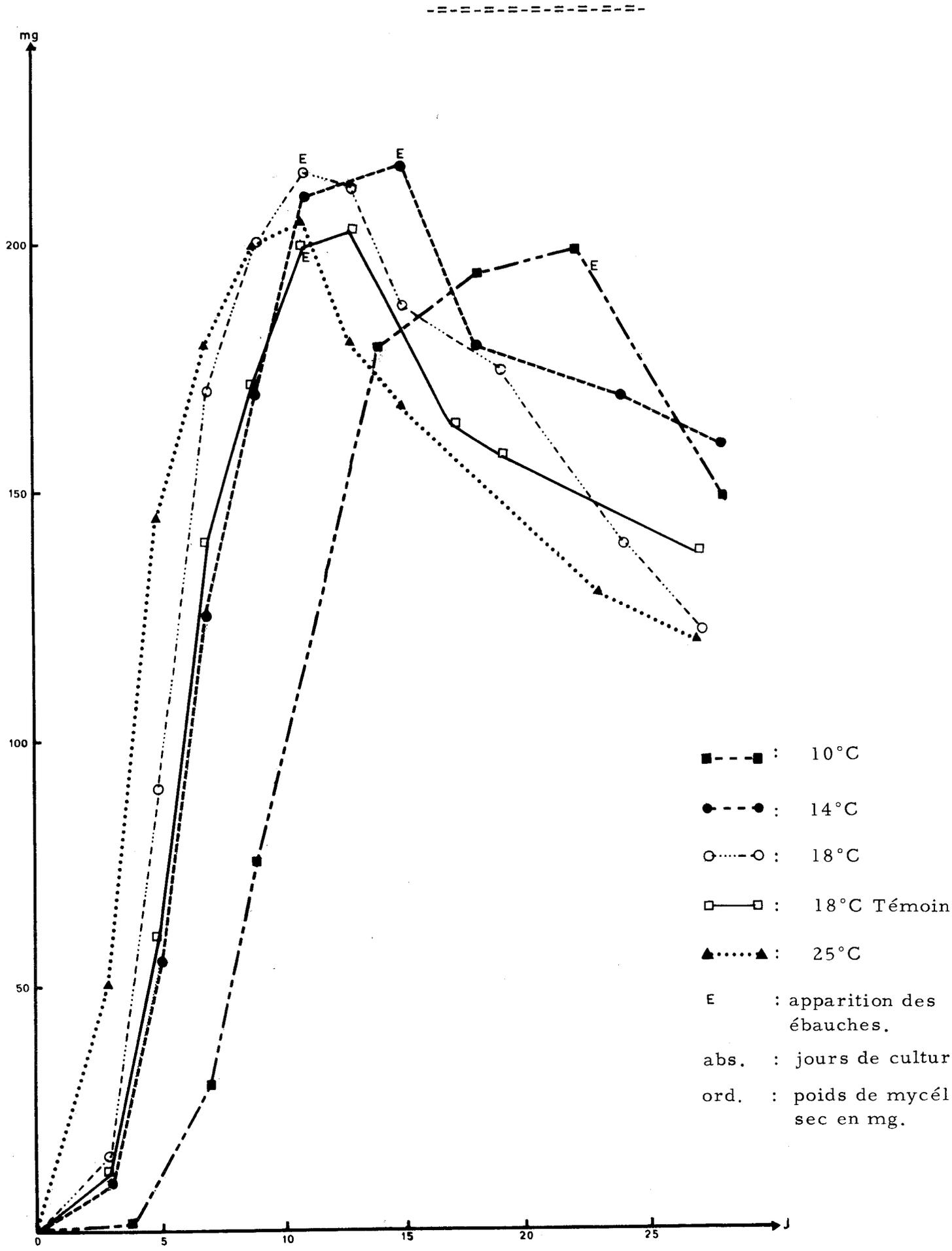
## I - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE ET LA REPRODUCTION SEXUEE.

Cette expérimentation a pour but de déterminer les températures optimales de la croissance mycélienne et de la reproduction sexuée de N. galligena et d'en définir les rapports éventuels. Elle doit nous permettre de préciser les résultats déjà acquis sur milieu naturel gélosé.

### 1 - Conditions expérimentales :

- Milieu : nous avons défini précédemment la composition chimique du milieu synthétique que nous avons utilisé dans tous les cas sauf, dans l'expérience témoin (T 18°C) où N. galligena se développe à 18°C sur eau de pomme de terre (50 g/l). Toutes les cultures ont été réalisées sur milieu liquide en fioles de ROUX.

Figure 8 : Influence de diverses températures sur la croissance et la reproduction sexuée de N. galligena cultivé sur un milieu synthétique.



- Lumière : les cultures sont soumises durant toute la période culturale, à une photopériode journalière de 12 heures de lumière blanche alternant avec 12 heures d'obscurité continue.

- Température : au cours de ces expériences, les températures demeurent constantes et sont égales à : 10°C - 14°C - 18°C - 22°C - 25°C.

## 2 - Résultats :

La mesure périodique des poids de matière mycélienne sèche nous a permis d'établir les différentes courbes de croissance du champignon. L'importance de la reproduction sexuée est évaluée par l'indice périthécial qui est fonction du nombre de périthèces fertiles par fiole de culture.

Les résultats les plus significatifs sont exprimés dans la figure 8 et dans le tableau n° 4.

Ces résultats nous montrent que les températures interviennent surtout durant la phase initiale du développement mycélien. Durant les 5 premiers jours de culture, la vitesse de croissance mycélienne est proportionnelle à la température, elle est grande à 25°C et faible à 10°C. Les différentes températures affectent peu la valeur pondérale du maximum de croissance qui dépend du milieu nutritif mais elles en modifient la date d'apparition : au 9ème jour de culture à 25°C, au 22ème jour à 10°C. Chez N. galligena, la croissance mycélienne et la reproduction sexuée sont optimales entre 14°C et 18°C mais, contrairement au développement végétatif, la fructification parfaite ne s'accomplit que pour des températures inférieures à 20°C ce qui délimite un intervalle thermique plus étroit. En effet, à 20°C nous n'avons observé la formation que de quelques périthèces fertiles en milieu synthétique liquide et de rares ébauches stériles sur milieu naturel gélosé ; à 22°C la stérilité de N. galligena est totale. Malgré une bonne croissance mycélienne de très nombreux périthèces fertiles sont obtenus à 14°C et surtout à 18°C mais leurs dimensions et leur maturation

Tableau 4 : Influence de diverses températures sur la croissance et la reproduction sexuée de N. galligena.

Température °C.	Milieu naturel Témoin	Milieu synthétique.				
	18	10	14	18	22	25
croissance A	70	15	65	90	100	140
mycélienne B	(11) - 205	(22)-200	(15)-225	(11)-220	(10)-205	(9)-195
reproduction C	11 - (205)	23-(190)	15-(225)	11-(220)	0	0
sexuée D	3000	1000	2500	3500	0	0

LEGENDE :

T 18 : culture sur milieu eau de pomme de terre 50 g/l à 18°C.

Croissance mycélienne :

A : poids en mg de matière sèche au 5ème jour de culture.

B : jour de culture ( ) et valeur pondérale en mg du maximum de croissance.

Reproduction sexuée :

C : jour d'apparition des premières ébauches périthéciale et poids ( ) en mg du mycélium à ce jour.

D : indice périthécial.

semblent favorisées par les basses températures de l'ordre de 10°C. Le moment d'apparition des premières ébauches périthéciales représente l'élément le plus remarquable des rapports entre les différenciations végétative et sexuée. Aux températures de 10°C - 14°C et 18°C, l'initiation sexuée se produit toujours au stade de développement mycélien compris entre la fin de la phase active de croissance et le début de la période de sénescence. Ainsi la formation des premières ébauches, au 11ème jour à 18°C au 15ème jour à 14°C, au 23ème jour à 10°C, coïncide avec l'optimum de croissance mycélienne ou avec la période stationnaire lui succédant. La reproduction sexuée requiert donc un état mycélien spécifique créé par un équilibre entre le milieu nutritif et le développement fongique et à partir duquel doit s'exercer effectivement l'influence des diverses températures. A ce moment précis, des valeurs thermiques peu différentes (18°C ou 21°C) orientent les potentialités mycéliennes vers les voies sexuée ou végétative.

## II - INFLUENCE DES CHANGEMENTS DE TEMPERATURE SUR LA MORPHOGENESE SEXUEE.

Au cours de ce travail, N. galligena est soumis durant la même période culturale (30 jours) à des variations de température afin :

1 - de préciser à quel moment les températures interviennent spécifiquement sur le métabolisme fongique pour initier la reproduction sexuée ;

2 - de déterminer l'action des températures élevées sur l'évolution de la différenciation sexuée depuis l'induction jusqu'à la maturation des ascocarpes ;

3 - d'établir si un choc thermique, créé par un abaissement de la température, peut remplacer la photo-induction indispensable à la formation des périthèces.

Toutes les expériences ont été réalisées sur milieu synthétique liquide réparti en fioles de ROUX.

1 - Première expérience :

Précédemment, nous avons suggéré que l'influence des températures sur l'initiation des ascocarpes de N. galligena est liée à un état mycélien particulier qui semble atteint, hormis le temps, indépendamment des valeurs thermiques. Toutefois, on peut se demander si les températures ne conditionnent pas la reproduction sexuée antérieurement à ce stade de développement. Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons opéré de la manière suivante.

Les cultures de N. galligena sont maintenues à 25°C pendant 5 - 8 - 11 - 14 ou 17 jours après l'ensemencement. Dans chacun des 5 cas en vue d'apprécier les interactions lumière-température, un premier lot cultural est placé à l'obscurité continue, un second est soumis à une photopériode journalière de 12 heures de lumière blanche alternant avec 12 h. d'obscurité. A la suite des différents pré-séjours à 25°C, les fioles de culture sont transférées à 10°C - 14°C - 18°C sous un éclairage quotidien de 12 heures de lumière blanche.

Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau n° 5 :

Tableau 5 : Influence de la durée d'un pré-séjour à 25°C sur la reproduction sexuée de N. galligena Bres.

Durée du pré-séjour		5 j.		8 j.		11 j.		14 j.		17 j.	
25°C	éclairage	obs.	L.	obs.	L.	obs.	L.	obs.	L.	obs.	L.
		10°C	L	1500	1500	1000	1000	0	0	0	0
14°C	L	3500	3500	2500	3000	0	500	0	0	0	0
18°C	L	3500	3500	2500	3000	0	500	0	0	0	0

LEGENDE.

j : jour de culture

obs. : Obscurité continue

L. : Photopériode journalière de 12 heures de lumière blanche alternant avec 12 heures d'obscurité.

Les nombres indiqués dans chaque case du tableau figurent l'indice périthécial.

Ces résultats indiquent que lors de la phase végétative antérieure au développement optimal du champignon, les températures ne provoquent aucune réaction métabolique présageant la reproduction sexuée. Bien plus, des pré-séjours à 25°C de 5 et 8 jours stimulent, particulièrement sur les cultures transférées à 10° et 14°, le nombre des ascocarpes qui apparaissent plus précocement. On pouvait prévoir ce phénomène par le fait que des températures élevées (25°C) accélèrent la croissance mycélienne qui parvient plus rapidement au stade optimal.

La présence de périthèces, aux températures de 10°, 14°, 18°C à la suite d'un pré-séjour à 25°C de 8 jours et au contraire, leur quasi absence due à un pré-séjour à 25°C de 11 jours limitent avec précision le stade mycélien où les températures commencent à orienter (ou non) le métabolisme fongique vers la différenciation sexuée. En effet, à 25°C la croissance mycélienne est optimale au 9ème jour de culture ; la sénescence commence au 11ème jour. Le mycélium n'est thermosensible que pendant une période très brève.

## 2 - Deuxième expérience :

A l'inverse de l'expérience précédente, nous étudierons, au cours de ce travail, l'action des températures élevées, non pas sur l'initiation, mais sur la maturation des ascocarpes de N. galligena.

### 1) Conditions expérimentales :

Durant 5 - 8 - 11 - 14 - 17 - 20 - 25 jours après l'ensemencement, les cultures de N. galligena se développent à 18°C sous un éclairage photopériodique journalier de 12 heures de lumière blanche.

A la suite de chacun de ces différents pré-séjours à 18°C on transfère, à la température de 25°C, les fioles de culture dont une partie est gardée à l'obscurité continue et l'autre placée en lumière blanche à raison de 12 heures quotidiennes.

2) Résultats :

Après 30 jours de culture, les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau n° 6.

Tableau n° 6 : Influence des températures élevées sur le développement de *N. galligena* à la suite d'un pré-séjour à 18°C.

Durée du pré-séjour à 18°C - L.			5j.	8j.	11j.	14j.	17j.	20j.	25j.
25°C	Obs.	ébauches	-	-	+	+	+	+	+
		asques	-	-	-	-	-	+	+
		ascospores	-	-	-	-	-	+	+
	L.	ébauches	-	-	+	+	+	+	+
		asques	-	-	-	-	-	+	+
		ascospores	-	-	-	-	-	+	+

LEGENDE :

L : cultures éclairées en lumière blanche 12 heures par jour.  
 Obs. : cultures placées à l'obscurité continue.  
 le signe + : indique la présence d'ébauches, d'asques ou d'ascospores.  
 le signe - : indique l'absence d'ébauches, d'asques ou d'ascospores.  
 Dans les mêmes conditions, un pré-séjour des cultures à 14°C et non à 18°C donne des résultats identiques.

L'inefficacité des pré-séjours de 5 et 8 jours à 18°C ne nous étonne guère car précédemment nous avons établi que la thermosensibilité mycélienne n'est effective qu'à partir d'un certain stade de développement végétatif qui ne semble pas atteint au 8ème jour à 18°C.

On pouvait cependant supposer que, dès l'induction des ébauches périthéciales (11ème jour à 18°C) aucun facteur tout au moins

thermique n'empêcherait le déroulement normal de la reproduction sexuée jusqu'à la formation des ascospores. Cette expérience infirme notre hypothèse puisque des valeurs thermiques élevées (25°C), suppriment l'action favorable des basses températures (18°C) bien au-delà du moment d'apparition des périthèces, soit après 17 jours de culture à 18°C. Ces hautes températures inhibent donc la formation des asques. De plus, si à partir du 20ème jour de culture à 18°C, la différenciation sexuée est définitivement installée et irréversible, une température égale à 25°C agit, au-delà de cette période, de manière néfaste sur la morphologie des ascocarpes qui sont alors de petite taille et de couleur carbonacée.

La régulation thermique ne se limite pas à l'initiation des ébauches mais elle conditionne spécifiquement l'évolution de la différenciation sexuée jusqu'à l'apparition des asques. WICKLOW et MALLOCH (1971) constatent que les températures élevées diminuent le nombre d'asques par périthèces chez Thelebolus sp. mais que le nombre d'ascospores dans chaque asque n'est pas modifié. De même chez N. galligena, seule la différenciation des ascospores semble indépendante des valeurs thermiques dans la mesure où ces dernières, après la formation des asques, n'empêchent pas celle des ascospores. Il semble donc que les hautes températures (25°C) ne bloquent pas la méiose d'où dérivent les ascospores mais que l'inhibition thermique s'exerce, tout au moins chez N. galligena, uniquement sur le développement du sporophyte. De nombreux auteurs et notamment HIRSCH (1954, LEACH (1971) soulignent l'effet néfaste des températures élevées sur la maturation des ascocarpes mais aussi sur leur morphologie.

Le blocage de la reproduction sexuée, par les températures élevées, à tous les stades évolutifs induits par les basses températures, représente un moyen d'étude particulièrement intéressant. Il mériterait une étude cytologique approfondie.

### 3 - Troisième expérience :

On peut supposer que les basses températures hivernales et non la lumière jouent un rôle primordial dans l'induction des périthèces de N. galligena. En vue de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé l'expérience suivante :

#### 1) Conditions expérimentales :

Les cultures sont toujours maintenues à l'obscurité continue.

A la suite d'un pré-séjour à 25°C d'une durée de 5-8 et 11 jours, les cultures sont alors placées à 4°C - 10°C - 14°C et 18°C.

#### 2) Résultats :

Dans tous les cas, on n'a jamais observé des périthèces fertiles, ni d'ébauches périthéciales.

Chez N. galligena, il semble que des basses températures 4°-10°C ou qu'un choc thermique soient incapables d'induire la reproduction sexuée en l'absence de lumière. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par LEACH (1971) sur Pleospora herbarum, par BAKER et WARE (1962), WILSON (1968) et WILSON et BAKER (1969) sur Hypomyces solani f. sp. cucurbitae. Ces chercheurs révèlent que des températures de 4° à 10°C initient les primordiums des champignons maintenus à l'obscurité continue. Ils voient en ce fait un phénomène analogue à la vernalisation aux basses températures des végétaux supérieurs.

En conclusion, au cours de ce travail nous avons pu préciser :

1 - que les températures constantes supérieures à 20°C inhibent la reproduction sexuée qui est optimale à 18°C et 14°C ;

2 - que la régulation thermique du métabolisme sexué ne s'exerce qu'à partir d'un stade optimal de croissance ;

3 - que les températures supérieures à 20°C annulent l'effet inducteur des températures efficaces depuis l'apparition des ébauches jusqu'à la formation des asques ;

4 - que des basses températures ne peuvent remplacer le stimulus lumineux dans l'initiation de la reproduction sexuée.

#### ACTION DE LA LUMIERE .

-----

De nos travaux antérieurs, il résulte que N. galligena fait partie des champignons photosensibles pour lesquels la lumière est indispensable à l'accomplissement des phénomènes sexuels.

L'étude de la photo-induction des périthèces de N. galligena comporte une série d'expériences destinées à mettre en évidence :

- la durée d'éclairement favorable à la formation des ascocarpes fertiles ;
- les longueurs d'onde lumineuse , responsables de l'induction sexuelle ;
- le rôle de la valeur énergétique de l'éclairement sur la fructification parfaite.

La connaissance précise de ces paramètres s'avère indispensable en vue de déterminer ultérieurement la nature du système photo-récepteur présent chez N. galligena.

CONDITIONS EXPERIMENTALES GENERALES.

Pour réaliser cette étude de l'action de la lumière, nous avons placé nos cultures dans les conditions suivantes :

- sur milieu eau de pomme de terre (50 g/l) gélosé pris initialement comme milieu témoin ;
- en milieu synthétique liquide dont la composition chimique a été définie par ailleurs ;
- à la température de  $18^{\circ} \text{C} \pm 0^{\circ}5 \text{C}$ .

I - DUREE ET RYTHME DES IRRADIATIONS.

Afin de préciser le temps d'application du stimulus lumineux :

- nécessaire à la formation importante d'ascocarpes ;
- suffisant au déclenchement de l'induction sexuée,

nous avons placé les cultures de N. galligena sous diverses conditions d'éclairement en lumière blanche. Au cours de ces expériences, la valeur énergétique du flux lumineux est constamment égale à  $3.000 \text{ ergs cm}^{-2}\text{sec}^{-1}$ .

1 - Influence de la durée des irradiations quotidiennes :Expérience n° 1 :

Pendant 30 jours, les cultures de N. galligena sont soumises à des illuminations journalières de :

0	1	1h30	2	4	8	12	16	20	24 heures
alternant avec des périodes obscures de :									
24	23	22h30	22	20	16	12	8	4	0 heures.

La figure 9 rapporte les résultats obtenus.

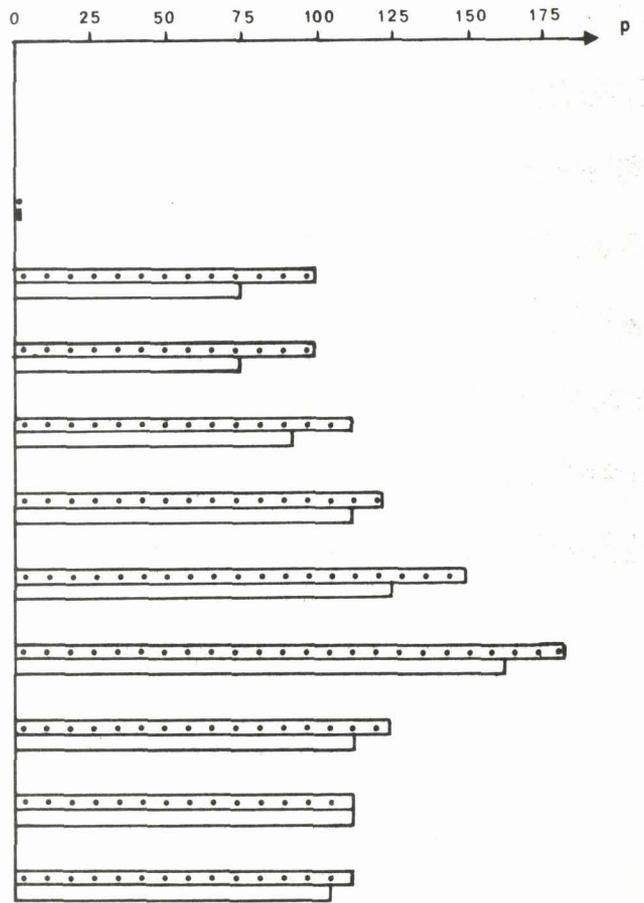
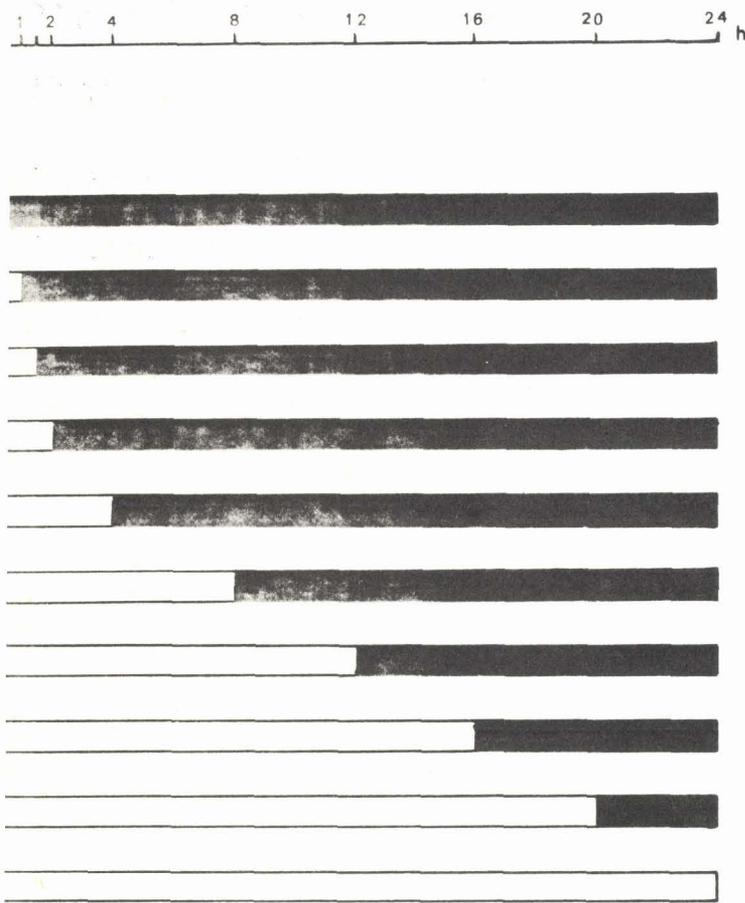
A l'obscurité continue, le champignon ne fructifie pas et demeure à l'état végétatif. Mais les exigences lumineuses de N. galligena sont faibles puisque des illuminations quotidiennes très brèves de 1 h à 2 h, soit au total 30 - 60 heures d'éclairement, suffisent à induire des ascocarpes

Figure 9 : Influence de la durée des irradiations quotidiennes sur la reproduction sexuée de *N. galligena* Bres. appliquées durant 30 jours.

-----

Conditions expérimentales journalières  
lumière blanche.

Résultats au 30ème jour de culture.



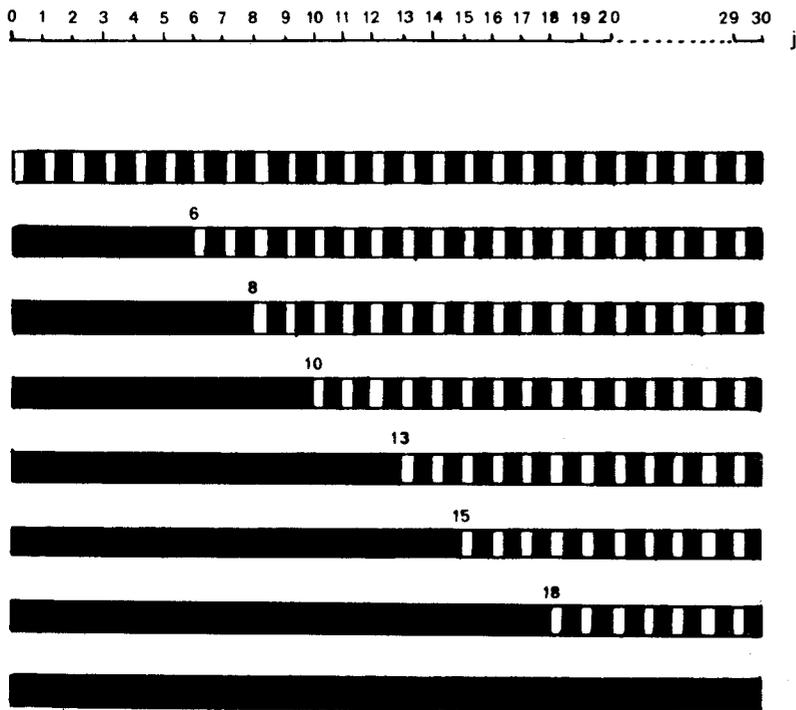
■ phase obscure  
□ phase d'éclairement  
h nombre d'heures d'éclairement quotidien

⋯ milieu naturel gélosé  
▭ milieu synthétique liquide  
p nombre de périthèces par tube.

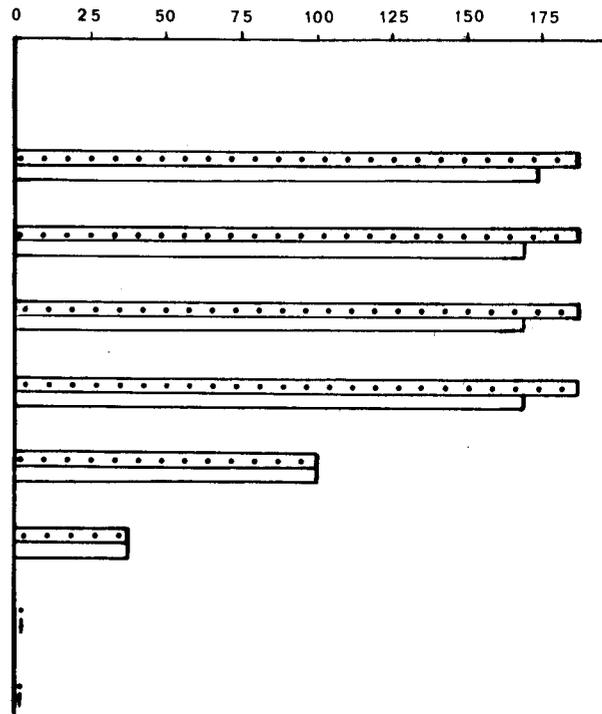
Figure 10 : Influence de la durée d'un pré-séjour à l'obscurité sur la reproduction sexuée de *N. galligena* Bres. soumis ensuite à un éclairage photopériodique.

-----

Conditions expérimentales



Résultats après 30 jours.



- phase obscure
- phase de 12 h. d'éclairage
- j nombre de jours de culture

- ◻◻◻ milieu naturel gélosé
- ▭ milieu synthétique liquide
- p nombre de périthèces par tube

fertiles. Des photopériodes plus longues stimulent le nombre de périthèces qui est maximal pour un éclaircissement de 12 heures de lumière blanche par jour. Au-delà de 12 heures, un excès de lumière réduit quelque peu le nombre des ébauches. Toutefois, la lumière continue n'inhibe pas le déroulement normal de la fructification de N. galligena.

## 2 - Moment d'application du stimulus lumineux :

Pour induire les périthèces de Glomerella cingulata, STEVENS (1928) a démontré la nécessité d'irradier le mycélium jeune et LEACH (1964) provoque la fructification de Pleospora herbarum par 1 seul éclaircissement au 4ème jour de culture. De même on peut supposer que la reproduction sexuée de N. galligena ne requiert pas un éclaircissement journalier appliqué de façon continue durant toute la période culturale.

En vue de déterminer les phases du développement fongique propices à l'action de la lumière, nous avons réalisé les 2 expériences suivantes :

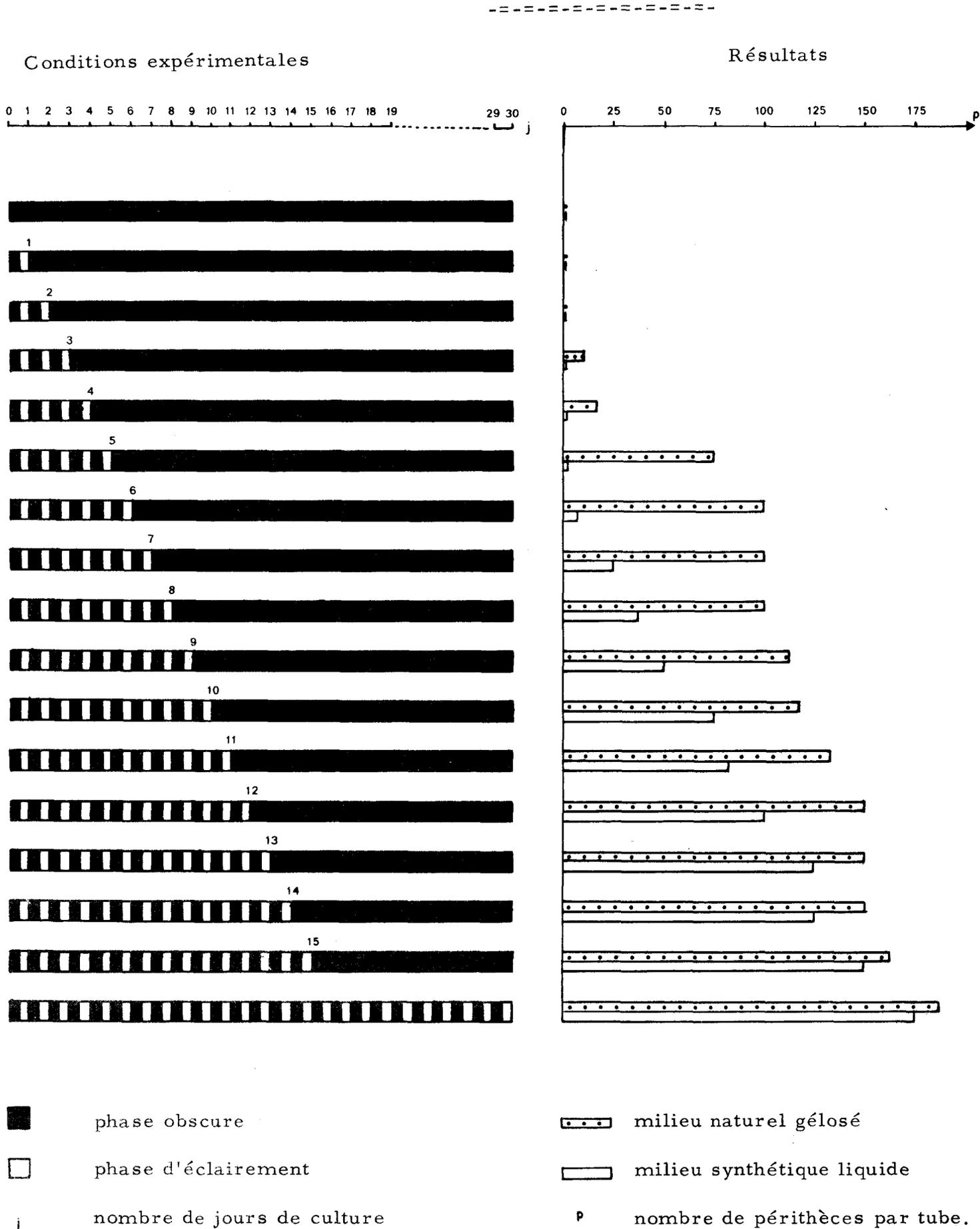
### 1) Influence d'un pré-séjour à l'obscurité : expérience n° 2 :

Les cultures de N. galligena sont maintenues à l'obscurité continue, 6, 8, 10, 13, 15 ou 18 jours après l'ensemencement puis éclairées à raison de 12 heures de lumière par jour jusqu'au 30ème jour.

Les résultats sont exprimés dans la figure 10. Les cultures irradiées à la suite d'un pré-séjour à l'obscurité continue d'une durée inférieure ou égale à 10 jours présentent un très grand nombre de périthèces fertiles. Par contre, l'efficacité du stimulus lumineux s'affaiblit fortement après 13 jours d'incubation à l'obscurité continue et devient nulle si l'illumination survient après une période obscure de 18 jours.

L'éclaircissement doit donc débiter durant la phase active de croissance mycélienne, l'efficacité lumineuse est tributaire des potentialités métaboliques d'un mycélium jeune et non de la senescence ou de l'épuisement du milieu nutritif. Ces observations corroborent celles de LACOSTE (1964) effectuées sur Leptosphaeria typhae.

Figure 11 : Influence de la durée d'un éclairciment précoce sur la reproduction sexuée de *N. galligena* Bres.



2) Action d'un éclaircissement précoce : expérience n° 3 :

Dès le repiquage, le mycélium se développe sous une alternance de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité pendant 1, 2, 3, 4... 14, 15 jours puis les cultures sont gardées à l'obscurité continue jusqu'au 30ème jour.

La figure 11 résume les résultats obtenus qui diffèrent sensiblement selon la nature solide ou liquide du substrat.

Sur eau de pomme de terre gélosée, un éclaircissement précoce durant les 5 premiers jours déclenche brusquement la reproduction sexuée. Les périthèces sont alors localisés en 1 seule auréole à proximité de l'implant au niveau du mycélium irradié. En milieu synthétique liquide, la réponse du champignon au stimulus lumineux est plus lente, les premiers ascocarpes apparaissent dans les cultures ayant subi 7 jours d'irradiation, leur nombre s'accroît progressivement proportionnellement à la durée de l'éclaircissement et ils sont répartis uniformément à la surface du milieu. L'application du photo-stimulus pendant 12 à 13 jours, soit 150 heures de lumière, induit de nombreuses fructifications quel que soit le milieu.

L'arrêt des irradiations, avant même la formation des ébauches périthéciales, n'empêche pas, cependant, le déroulement normal de la reproduction sexuée. Le développement complet des ascocarpes n'exige donc pas la présence de lumière dont l'effet se prolonge bien au-delà du temps d'application du stimulus lumineux. Ces faits suggèrent que les illuminations provoquent des réactions photo-chimiques qui déclenchent les processus sexuels. Ces 2 expériences démontrent que le stimulus lumineux doit être appliqué sur le mycélium jeune, en voie de croissance, soit avant le 13ème jour de culture. Durant cette période, des irradiations précoces suffisent à orienter le métabolisme du champignon qui peut alors, sans le recours direct de la lumière, achever son développement. Mais le nombre d'ascocarpes induits dans ces conditions (13 jours de lumière) demeure néanmoins inférieur à celui obtenu sur des cultures irradiées pendant 30 jours à raison de 12 heures de lumière par jour.

3 - Effet d'une application unique du stimulus lumineux : expériences  
n° 4 - 5 - 6

La régression de l'efficacité lumineuse à partir du 13ème jour de développement (exp. n° 2) - la formation de périthèces fertiles par des éclaircissements quotidiens d'une durée de 1 heure (exp. n° 1) - l'effet inducteur des irradiations précoces (exp. n° 3) laissent prévoir qu'une seule et brève période lumineuse est susceptible de déclencher l'induction sexuée.

Au cours de ce travail, nous avons voulu déterminer le temps d'irradiation minimal nécessaire au déclenchement de la reproduction sexuée. Nous avons substitué à l'éclaircissement photopériodique employé antérieurement un photo-stimulus unique dont la durée et le moment d'application sont variables.

1) Conditions expérimentales :

Le séjour (30 jours) à l'obscurité continue des cultures de N. galligena est interrompu chaque jour durant sa phase initiale (du 1er au 12ème jour) par une seule illumination d'une durée de :

- |              |               |
|--------------|---------------|
| - 144 heures | expérience 4  |
| - 72 heures  | expérience 5  |
| - 12 heures  | expérience 6. |

Ces durées d'éclaircissement ont été utilisées car, d'après les résultats des expériences n°2 et 3 :

- 144 heures représentent la durée totale des irradiations photopériodiques qui, à raison de 12 heures par jour durant les 12 premiers jours de culture, induisent dans des proportions convenables la fructification parfaite.

- 72 heures constituent de la même façon la somme horaire des irradiations qui, appliquées pendant les 6 premiers jours de développement, déclenche les phénomènes sexués.

- 12 heures de lumière peuvent être en fait suffisantes pour provoquer la reproduction sexuée dans la mesure où le mycélium se trouve dans sa phase de grande photosensibilité.

Figure 12 : Influence d'un photostimulus unique de 144 heures sur la reproduction sexuée de *N. galligena* Bres.

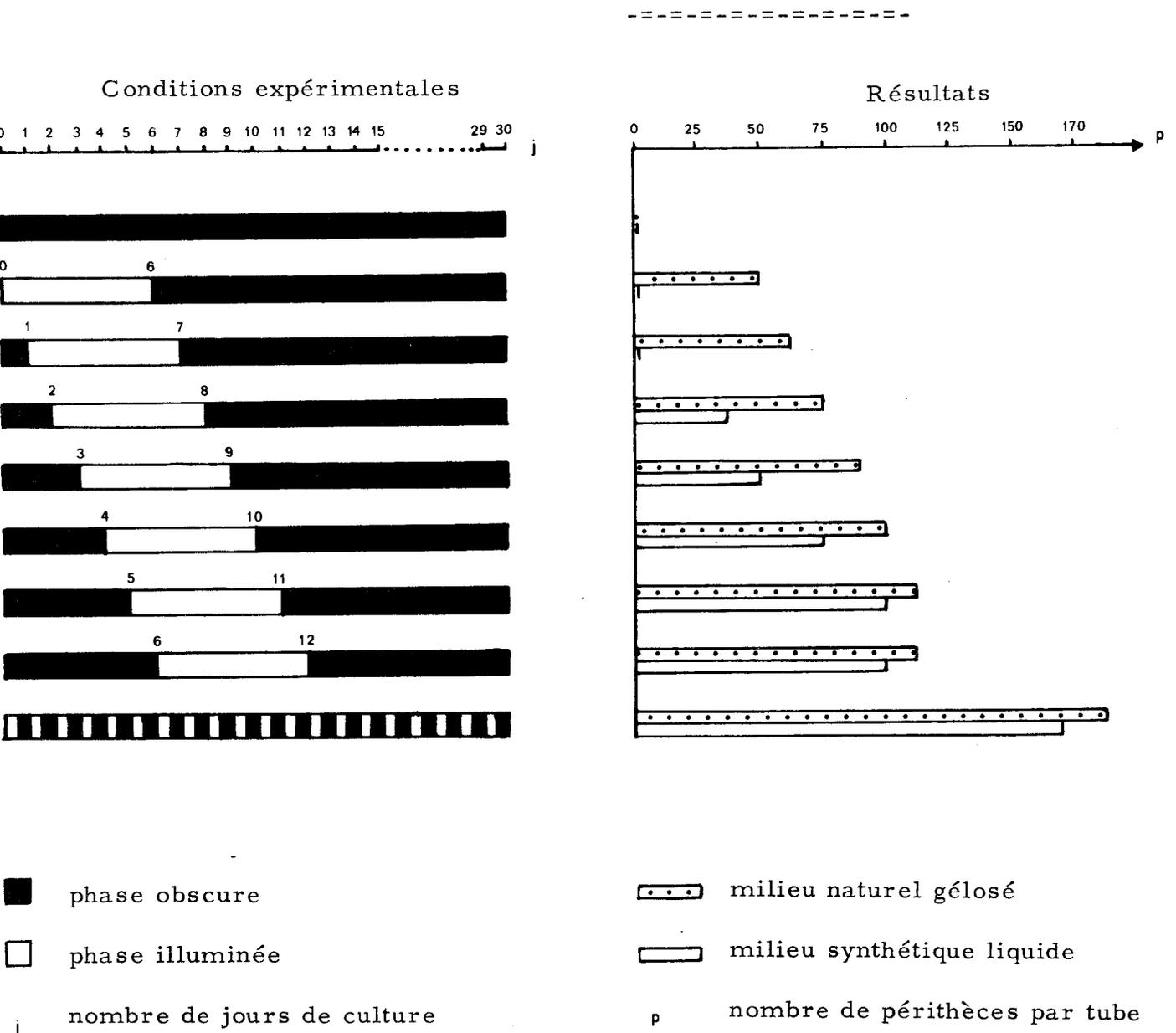
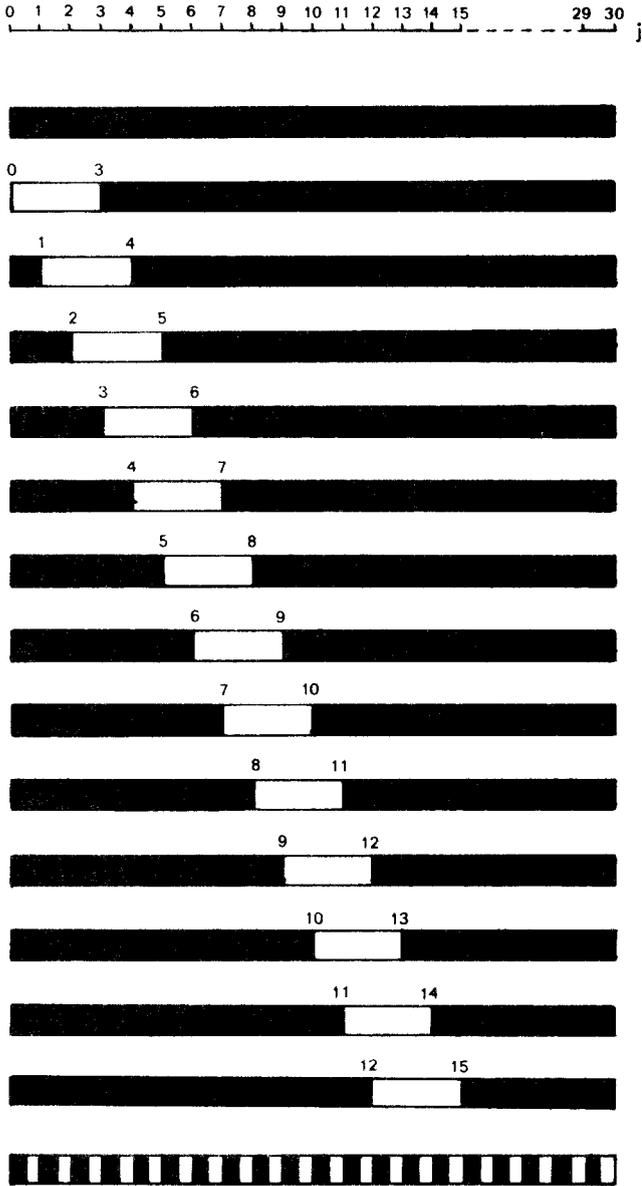


Figure 13 : Influence d'un photostimulus unique de 72 heures sur la reproduction sexuée de *N. galligena* Bres.

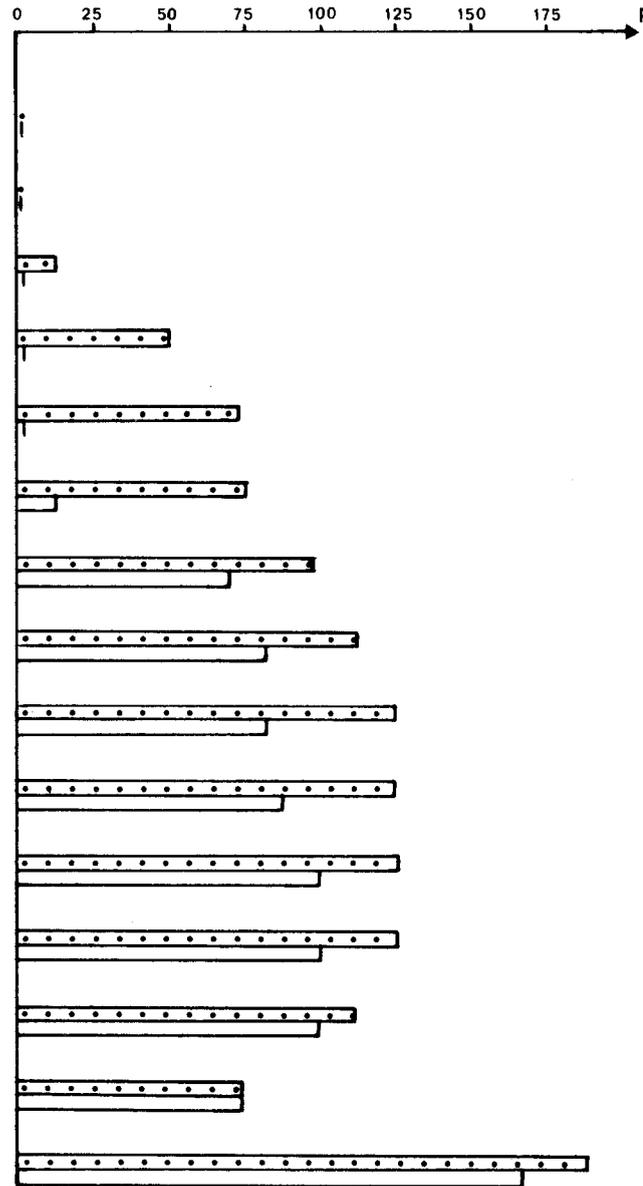
-----

Conditions expérimentales



- phase obscure
- phase illuminée
- j nombre de jours de culture

Résultats.

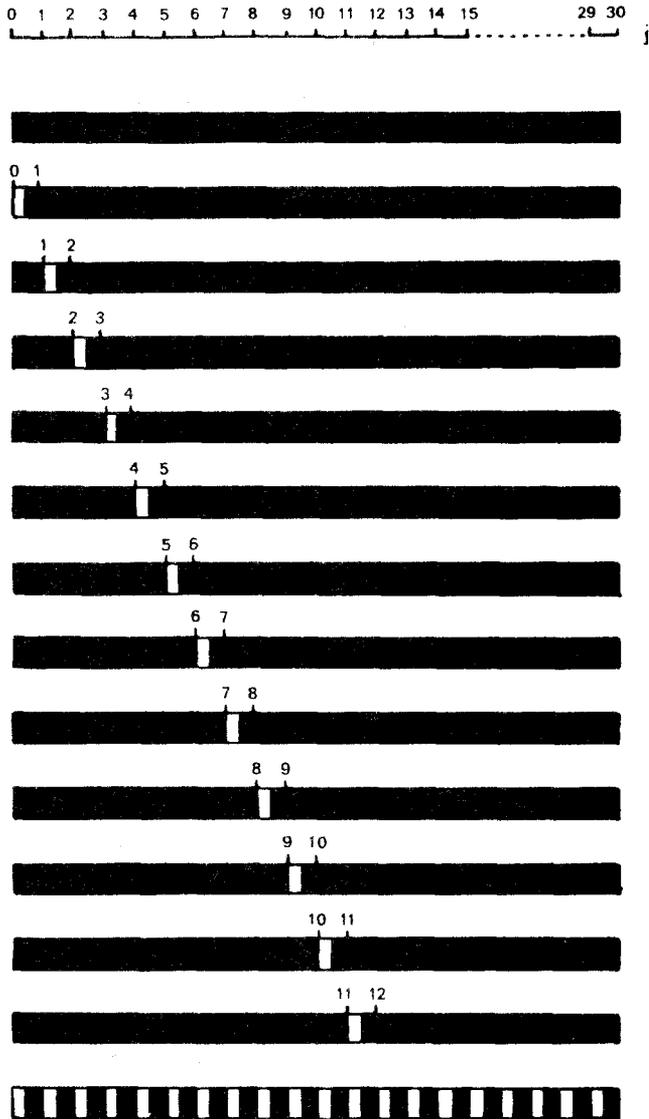


- milieu naturel gélosé
- milieu synthétique liquide
- p nombre de périthèces par tube

Figure 14 : Influence d'un photostimulus unique de 12 heures sur la reproduction sexuée de *N. galligena* Bres.

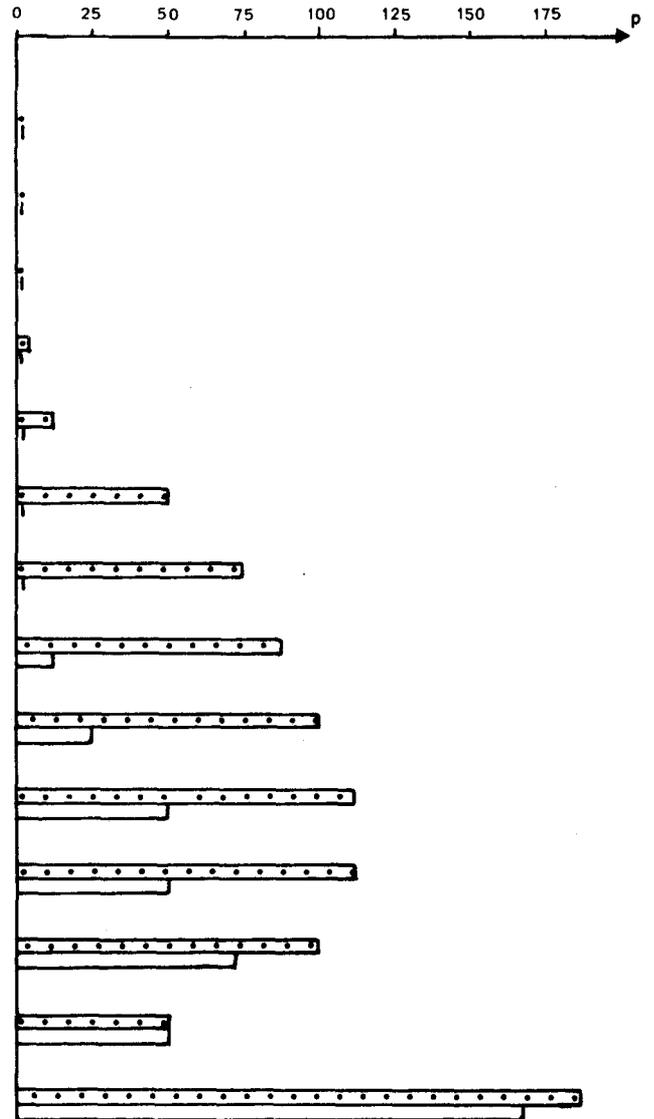
-----

Conditions expérimentales



- phase obscure
- phase illuminée
- j nombre de jours de culture

Résultats.



- ◻◻◻ milieu naturel gélosé
- ◻◻◻ milieu synthétique liquide
- p nombre de périthèces par tube

2) Résultats :

Les figures 12-13-14 expriment les résultats obtenus.

Ces expériences démontrent que l'induction de la fructification parfaite de N. galligena ne s'opère que si le mycélium, lors de l'irradiation, a déjà atteint un stade de développement bien défini : soient les 5ème et 7ème jours de croissance respectivement sur milieu gélosé et en milieu liquide.

Ainsi, sur substrat gélosé, un éclaircissement de 144 heures durant les 6 premiers jours ou de 72 heures du 2ème au 5ème jour ou de 12 heures au 5ème jour induit sensiblement le même nombre de périthèces. Par contre, toutes les illuminations de 72 heures ou de 12 heures précédant le 5ème jour de culture sont inefficaces. L'expérience 3 au cours de laquelle les cultures irradiées 12 heures par jour pendant 4 jours restent stériles, corroborent ces observations. Un raisonnement semblable est applicable aux résultats obtenus en milieu liquide avec cependant un retard de 2 jours.

De même, ces expériences confirment qu'un pré-séjour à l'obscurité continue excédant 11 jours affaiblit l'efficacité du stimulus lumineux.

N. galligena présente donc une photo-sensibilité optimale entre le 7ème et le 11ème jour de sa croissance, en particulier les 9ème et 10ème jours. Durant ces 2 jours, des éclaircissements de courte durée (12 h) donnent naissance à des fructifications parfaites. Mais la présence d'un petit nombre de périthèces fertiles d'une part, d'ébauches périthéciales avortées avant l'ascosporogénèse d'autre part, indique qu'une seule irradiation d'une durée de 12 heures représente le minimum lumineux requis pour déclencher l'induction sexuée. Par contre l'application aux 9ème et 10ème jours de croissance d'un seul stimulus de 72 heures de lumière provoque la formation de nombreux ascocarpes fertiles et se révèlent même plus actif qu'un éclaircissement de plus longue durée, par exemple de 144 heures.

Les résultats des recherches relatives aux exigences lumineuses de la fructification de N. galligena nous permettent d'observer que :

1 - l'existence d'une phase photo-sensible du 7ème au 11ème jour de développement au cours de laquelle les éclairagements appliqués auront un pouvoir d'induction maximum. Cette efficacité lumineuse optimale coïncide avec une intense activité anabolique du mycélium ;

2 - durant la phase photo-sensible, une seule illumination d'une durée de 12 heures suffit à déclencher l'induction sexuée et correspond au seuil d'efficacité du stimulus lumineux, un éclairage unique de 72 heures provoquant une réponse optimale ;

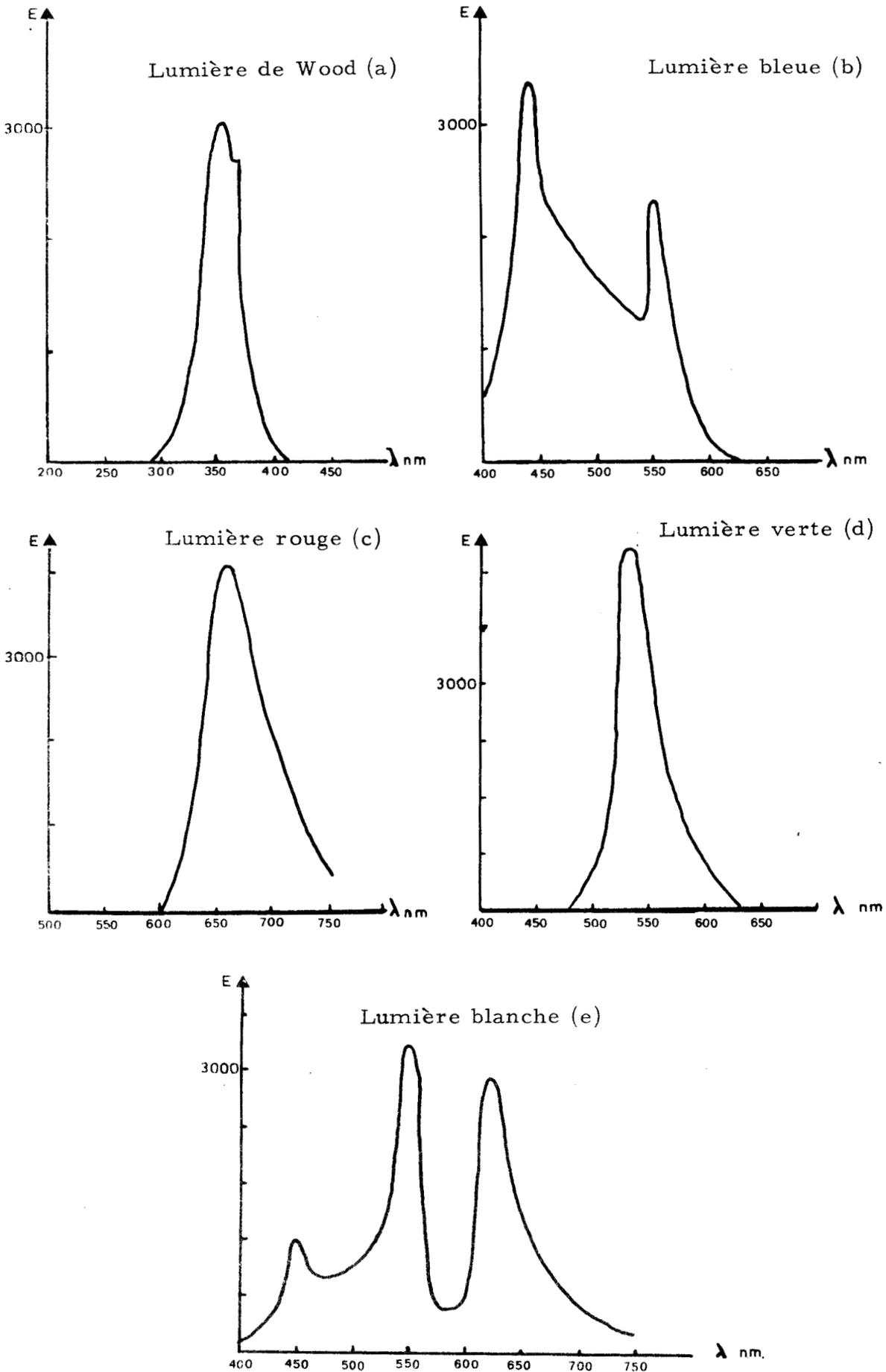
3 - la fertilité des ascocarpes, malgré l'interruption des irradiations avant l'apparition des primordiums, semble, prouver que la lumière n'intervient pas directement sur la suite du processus sexué. L'induction sexuée traduit une action photo-chimique précoce de la lumière orientant définitivement le métabolisme mycélien vers la fertilité.

## II - ACTION DES LONGUEURS D'ONDE.

Par l'emploi de radiations monochromatiques, de nombreux chercheurs ont pu démontrer le rôle spécifique de certaines longueurs d'onde dans l'induction sexuée fongique et plus particulièrement, la grande efficacité des radiations de  $\lambda$  inférieure à 510 nm.

Afin de déterminer l'action des irradiations monochromatiques dans la reproduction sexuée de N. galligena, nous avons utilisé diverses lumières : proche ultra-violette, bleue, verte, rouge et blanche dont les émissions spectrales et les valeurs énergétiques du flux lumineux, mesurées au niveau des cultures sont représentées dans la figure 15 ( a b c d e ).

Figure 15 a, b, c, d, e : Emission spectrale et valeur énergétique de l'éclairage émis par les tubes fluorescents Sylvania.



E : valeur énergétique de l'éclairage au niveau des cultures.

λ : longueur d'onde

Il apparaît alors que si les émissions spectrales des tubes fluorescents proche U. V. - vert et rouge, sont homogènes et délimitent un domaine spectrale bien défini, au contraire les tubes fluorescents de couleur bleue produisent des radiations vertes parasites qui nous obligent dans ces conditions à une certaine prudence quant à l'interprétation du rôle des radiations bleues dans la fructification parfaite de N. galligena.

De plus ces graphiques mettent en évidence la forte énergie ( $5.000 \text{ ergs cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ) du flux lumineux produit par les tubes fluorescents verts, d'une valeur double de celle émise par les autres rayonnements lumineux employés, et qui peut-être à l'origine d'effet secondaire.

Ces réserves étant faites, nous avons entrepris les recherches suivantes :

1 - Influence des éclairagements monochromatiques journaliers :  
expérience n° 7 :

1) Conditions expérimentales :

Pendant 30 jours, des cultures de N. galligena sont soumises aux conditions suivantes :

- soit selon une alternance de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité ;

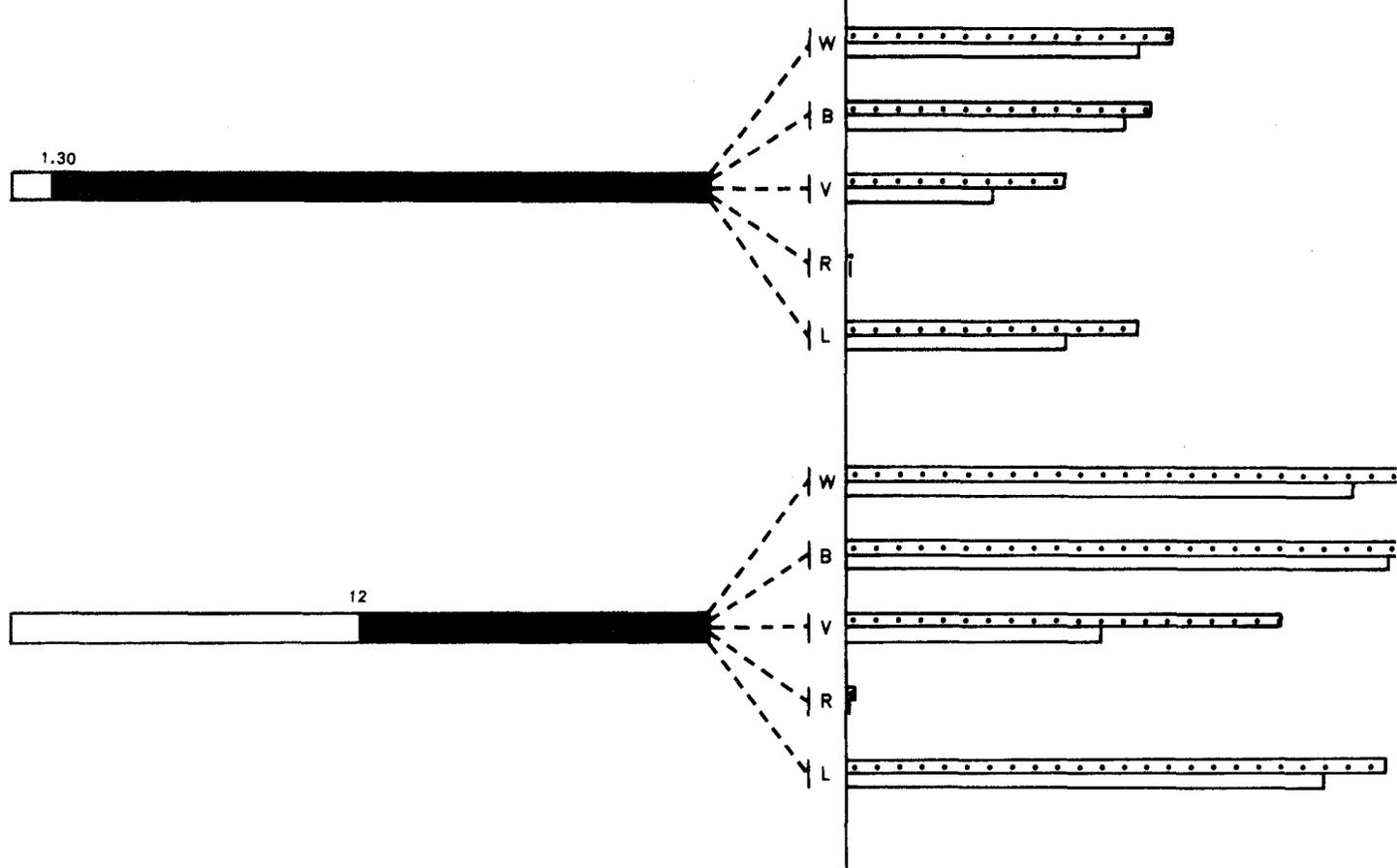
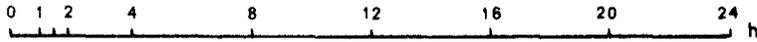
- soit selon une alternance de 1h30 de lumière et de 22h30 d'obscurité. Cette dernière expérience est dictée par le souci de mieux apprécier, d'une part l'efficacité des longueurs d'onde grâce à la diminution de la quantité d'éclairément fournie, d'autre part, le total horaire (45 heures) de ces brèves irradiations (1 h 30) se rapproche beaucoup de la durée du photo-stimulus unique de 48 heures utilisé par la suite et il doit ainsi nous permettre de comparer l'influence du rythme des éclairagements sur la fructification parfaite.

Dans les 2 cas, l'éclairément est assuré, de 5 manières différentes, par des radiations proche ultra-violette, bleue, verte, rouge et blanche, ces dernières servant de témoin.

Figure 16 : Influence de la durée des éclairagements monochromatique journaliers sur la reproduction sexuée de *N. galligena* Bres. appliqués durant 30 jours.

Conditions expérimentales journalières en lumière monochromatique.

Résultats après 30 jours de culture.



- phase obscure
- phase d'éclairément
- h durée (en heure) des éclairéments quotidiens

- ◻◻◻ milieu naturel gélosé
- ◻◻◻ milieu synthétique liquide
- p nombre de périthèces par tub
- W lumière de Wood (proche U. V)
- B lumière bleue
- V lumière verte
- R lumière rouge
- L lumière blanche

2) Résultats :

Ils sont exprimés dans la figure 16.

Quelle que soit la durée des irradiations, on constate l'inefficacité totale de la lumière rouge c'est à dire des longueurs d'onde supérieures à 625 nm qui ne provoquent la formation d'aucune ébauche périthéciale.

L'apparition d'ascocarpes fertiles de N. galligena éclairé par des radiations vertes (500 nm  $\langle \lambda \langle$  570 nm) d'une durée journalière de 12 heures ou même de 1 h 30 infirme les conclusions de LEACH et col. (1966) - CURTIS (1971) - LEATH (1971) qui n'obtenaient aucun périthèce de Pleospora herbarum - Nectria haematococca - Leptosphaerulina briosiana soumis à des éclairagements de  $\lambda$  supérieure à 510 nm. Cependant chez N. galligena, bien que l'énergie soit fournie à un niveau beaucoup plus élevé, les radiations comprises entre 500 et 600 nm stimulent la reproduction sexuée plus faiblement que la lumière blanche. Par contre les lumières bleue et proche ultra-violette sont très efficaces, on remarque en effet la grande photosensibilité de N. galligena pour ces radiations qui déclenchent la formation d'un nombre maximal de périthèces.

Les brèves irradiations quotidiennes d'une durée de 1h30 n'empêchent pas le développement des fructifications parfaites de N. galligena recevant le flux lumineux des tubes fluorescents verts et confirment le pouvoir inducteur des radiations vertes pour des quantités d'éclairément faibles.

2 - Déclenchement de la fructification par une seule application du photo-stimulus :

1) Expérience n° 8 :

Cette expérience est comparable à celles déjà effectuées (expériences n° 4-5-6) en lumière blanche. Des éclairéments en lumière de WOOD (proche U. V.) bleue, verte ou blanche d'une durée de 24, 48 ou 72 heures interrompent uniquement aux 5ème, 9ème et 11ème jours de croissance le séjour à l'obscurité continue de N. galligena.

Figure 17 : Influence de la durée d'un photostimulus unique de 24, 48 ou 72 heures en lumière monochromatique sur la reproduction sexuée de N. galligena.

-----

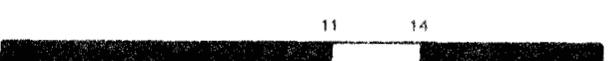
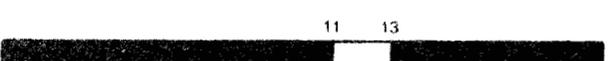
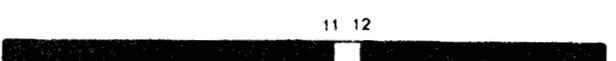
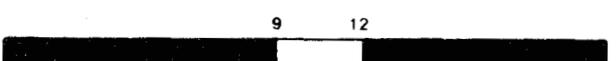
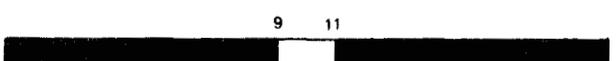
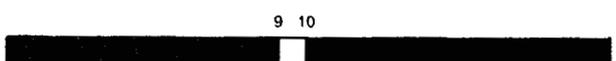
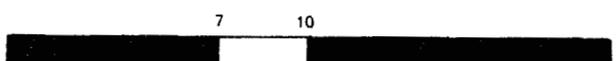
- |   |                            |   |                               |
|---|----------------------------|---|-------------------------------|
| ■ | Phase obscure              | ▬ | milieu synthétique liquide    |
| □ | Phase d'éclairement        | p | nombre de périthèces par tube |
| j | nombre de jours de culture |   |                               |

Lumière

- w wood
- b bleue
- v verte
- b blanche

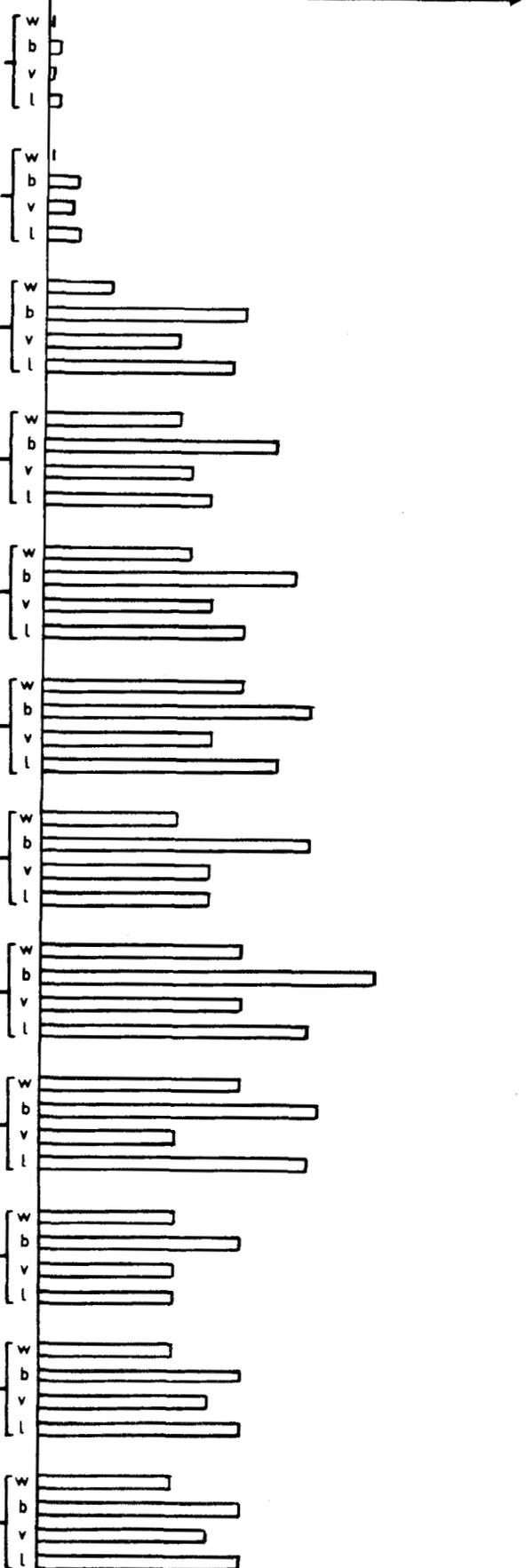
Conditions expérimentales

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 29 30 j



Résultats

0 25 50 75 100 125 150 p



La figure 17 rapporte les résultats obtenus en milieu synthétique liquide.

Appliqué au 9ème jour de croissance, un éclairage en lumière bleue d'une durée de 48 heures représente le traitement lumineux optimal pour le déclenchement de la reproduction sexuée. Il témoigne à la fois de la grande photo-sensibilité du mycélium et de l'efficacité particulière des radiations bleues. D'autre part, si l'effet inducteur de la lumière verte se confirme et correspond aux données optimales, nous ne pouvons expliquer la relative inefficacité du rayonnement proche U. V.

## 2) Expérience n° 9 :

Afin d'éviter les inconvénients dûs aux valeurs énergétiques très différentes du flux lumineux émis par les tubes fluorescents utilisés au laboratoire, nous avons entrepris une expérience à l'illuminateur spectral du Phytotron où les cultures de N. galligena ont été exposées à diverses radiations de valeur énergétique identique.

Le spectre d'action de la lumière sur l'initiation sexuée de N. galligena, étudié avec l'illuminateur spectral du Phytotron, a pu être précisé par application, au 5ème jour de culture, d'un photo-stimulus unique d'une durée de 12 heures. Nous avons utilisé les radiations de  $\lambda$  : 310, 405, 420, 440, 460, 480, 505, 525, 545, 560, 575, 595, 615, 625, et 640 nm, la bande passante est d'environ 10 nm. Pour toutes ces radiations, interrompant durant 12 heures, le séjour à l'obscurité continue de N. galligena, la valeur de l'éclairage atteint  $2.000 \text{ ergs cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sauf à 310 nm où elle est égale à  $150 \text{ ergs cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Cette expérience effectuée sur milieu gélosé n'a pu être répétée, les résultats obtenus figurent dans le tableau n° 7.

Tableau n° 7 : Action des longueurs d'onde sur la reproduction sexuée de N. galligena.

$\lambda$ nm	T <sub>L</sub>	To	310	405	420	440	460	480	505	525	545	560	575	595	612	625	640
n.p.	60	0	60	80	80	80	80	50	50	30	30	30	20	0	0	0	0

LEGENDE :

- T<sub>L</sub> : lumière blanche : 12 heures d'irradiation au 5ème jour de culture.
- To : obscurité continue.
- n.p. : nombre de périthèces par tube.

Cette expérience corrobore les résultats déjà acquis quant à l'efficacité optimale des longueurs d'onde inférieure à 500 nm. On note aussi l'induction sexuée déclenchée par la radiation 310 nm malgré un éclairage énergétique faible. En conclusion, à l'exception des radiations rouges, une gamme de longueurs d'onde très étendue peut provoquer la reproduction sexuée de N. galligena. Si l'on se réfère aux travaux de WINSTEAD et col. (1966) sur Glomerella magna et de HOGENSON et col. (1971) sur Leptosphaeria avenaria, on constate que l'induction sexuée de N. galligena par des radiations vertes ne constitue pas un fait particulier. N. galligena présente cependant une grande photo-sensibilité aux radiations proches U. V. et bleues qui stimulent fortement la reproduction sexuée. A cet égard, nous ne pensons pas que l'efficacité de la lumière bleue soit imputable, même partiellement, aux radiations vertes "parasites" qui accompagnent l'émission lumineuse des tubes fluorescents de couleur bleue, comme l'expérience n° 9 nous le démontre.

### III - INFLUENCE DE LA VALEUR ENERGETIQUE DES ECLAIREMENTS.

Si l'on tient compte de l'expérience n° 9, il apparaît que N. galligena peut fructifier sous des rayonnements énergétiques très différents (150 ou 2.000 ergs cm<sup>-2</sup> sec.<sup>-1</sup> et même l'énergie importante (5000 ergs cm<sup>-2</sup> sec.<sup>-1</sup>) produite par la lumière verte n'inhibe pas la formation des ascocarpes. D'une façon générale, les cultures de N. galligena, au cours des différentes expériences, ont reçu un éclairage dont la valeur moyenne de 3000 ergs cm<sup>-2</sup> sec.<sup>-1</sup> correspond à celle généralement utilisée pour induire la reproduction sexuée chez d'autres espèces fongiques.

Mais, si au cours de ce travail, nous avons employé des éclairages ne paraissant pas disconvenir à la fructification parfaite de N. galligena, nous n'avons pu toutefois en préciser les valeurs limites (inférieure et supérieure). La méconnaissance de ces seuils énergétiques nous empêche de définir l'activité de l'éclairage et d'interpréter le rôle qu'il joue dans l'efficacité des longueurs d'onde. On peut se demander, par exemple, si le pouvoir d'induction des radiations vertes ne provient pas, en grande partie, de l'énergie élevée émise par les tubes fluorescents verts.

Des recherches ultérieures s'imposent donc, afin de résoudre le problème suivant : déterminer pour chaque longueur d'onde la gamme des énergies efficaces et leurs optimums. Ces données sont essentielles pour comprendre les mécanismes photo-récepteurs de N. galligena. Il est très probable qu'elles confirmeront les expériences de LEACH et TRIONE (1966) sur Pleospora herbarum qui montrent que lorsque la sensibilité du champignon décroît en fonction de la longueur d'onde des irradiations, les éclairages doivent être de plus longue durée et plus énergétiques.

### CONCLUSION.

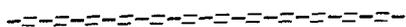
En fonction du stade de développement mycélien, du temps d'application et de la qualité du stimulus lumineux, l'action de la lumière se traduit de diverses manières.

La photo-sensibilité de N. galligena dépend de sa croissance mycélienne. La réceptivité du mycélium à la lumière débute au 7ème jour de culture en milieu synthétique liquide, c'est pourquoi des pré-séjours à l'obscurité de cette durée ou même de 10 jours n'affectent pas l'efficacité des radiations lumineuses, qui s'avère de plus en plus faible lorsque la période initiale obscure excède 11 jours et qui devient nulle au-delà du 18ème jour.

Appliquées entre les 7ème et 11ème jours de croissance, des irradiations très brèves (12 heures) déclenchent les phénomènes sexués et correspondent au seuil d'efficacité lumineuse mais le petit nombre d'ébauches périthéciales ou d'ascocarpes formés démontre la nécessité d'éclairer plus longtemps les cultures. La stimulation sexuée est donc tributaire de la durée des illuminations mais aussi de leur rythme c'est pourquoi un stimulus lumineux unique de 144 heures exerce un effet moindre sur la reproduction sexuée qu'un éclairage d'une durée égale mais appliqué quotidiennement à raison de 12 heures pendant 12 jours. Selon le mode d'application des irradiations, on peut dissocier les principales étapes de la fructification parfaite et si l'activité lumineuse se manifeste par une modification du métabolisme, comme cela a été démontré en particulier par VIALA et VIDAL (1972), il devient possible de caractériser biochimiquement chaque stade du développement sexuel de N. galligena.

Nos moyens expérimentaux ne nous ont pas permis de définir de façon rigoureuse le spectre d'action de la lumière sur la reproduction sexuée de N. galligena. L'impossibilité d'opérer avec des radiations monochromatiques de longueurs d'onde bien définies sous des éclairagements énergétiques précis et égaux, nous oblige à entreprendre des expériences ultérieures. On ne peut retenir, de ce travail, que l'inefficacité des radiations rouges ( $\lambda > 625 \text{ nm}$ ) et la grande stimulation du nombre des ascocarpes due à des éclairagements en lumière proche ultra-violette et bleue.



*MISE EN EVIDENCE D'UN FACTEUR SPOROGENE BIOSYNTHETISE**SOUS L'ACTION DE LA LUMIERE.*

Les réactions des champignons à la lumière, notamment l'induction ou la stimulation de la reproduction par des irradiations, ont posé le problème de la photoréception chez ces organismes.

On n'a pas encore pu mettre en évidence un composé mycélien endogène pré existant aux radiations et dont le rôle serait de capter l'énergie photonique pour la transmettre, sous une autre forme, à des molécules intervenant dans des processus biologiques. De plus, aucune analyse n'a révélé la présence d'un tel composé possédant un spectre d'absorption qui corresponde exactement au spectre d'activité de la lumière sur la reproduction et à celui de l'absorption de l'organisme considéré. De ce fait, l'existence d'un photo-récepteur, chez les champignons, n'a pas été parfaitement établie, à ce jour, même si la grande efficacité des longueurs d'onde comprises entre 230 nm et 480 nm suggère la mise en jeu d'un système photo-récepteur à base de flavine et de carotène.

Parallèlement à ces recherches, certains auteurs sont parvenus à remplacer, partiellement ou totalement, les irradiations, indispensables à la reproduction, par des composés chimiques qu'ils ont appelé "facteurs sporogènes". La biosynthèse et l'activité de certaines de ces substances sont étroitement dépendantes de la lumière. Parmi ces composés, l'un d'eux dénommé "P<sub>310</sub>", a été découvert par LEACH (1965).

Les analyses de cet auteur révèlent que, chez diverses espèces fongiques, des radiations de  $\lambda$  comprises entre 230 et 330 nm provoquent, en même temps que la sporulation, la synthèse d'un composé mycélien endogène présentant un pic d'absorption maximal à 310 nm. En particulier, chez Pleospora herbarum, ces longueurs d'onde ( $230 \text{ nm} < \lambda < 330 \text{ nm}$ ) induisent les reproductions asexuée et sexuée.

La présence du " $P_{310}$ ", dans les conditions ci-dessus, contraste avec son absence dans le mycélium non irradié et non sporulant et semble démontrer son rôle de médiateur entre la stimulation lumineuse et la reproduction des champignons. Ultérieurement, TRIONE et col. (1966) décrivent l'activité sporogénique du " $P_{310}$ " qu'ils substituent aux irradiations pour induire la formation des pycnides d'Ascochyta pisi mais aussi celle des périthèces de Pleospora herbarum. Ils démontrent ainsi que le " $P_{310}$ " agit comme substituant de la lumière, à la fois sur la multiplication asexuée et sur la reproduction sexuée. Cependant l'activité sporogène du " $P_{310}$ " dans les processus sexués n'a jamais été observée par d'autres expérimentateurs qui se sont, d'ailleurs uniquement intéressés, au rôle de ce composé dans les processus asexués.

Ainsi VARGAS et col. (1969), VAN DEN ENDE et col. (1970) extraient le composé " $P_{310}$ " du mycélium d'Helminthosporium dictyoïdes et de Sclerotinia fructicola, mais ils ne parviennent pas à établir le caractère sporogénique du " $P_{310}$ " chez ces deux champignons qui manifestent, il est vrai, une photo-sensibilité très différente de celle des espèces fongiques étudiées par LEACH. En effet, chez H. dictyoïdes, la sporogénèse est indépendante de la lumière, bien plus les radiations de  $\lambda$  inférieures à 480 nm inhibent la conidiogénèse. Ces faits peuvent expliquer l'inactivité du composé " $P_{310}$ ". De même, si les radiations proche U. V., indispensables à la formation des conidiophores de ce champignon, laissent supposer l'intervention du " $P_{310}$ ", la très haute énergie ( $2.000 \text{ ergs sec}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ) requise, en fait, pour leur induction permet de comprendre l'inefficacité du " $P_{310}$ ". Chez S. fructicola, on peut observer un phénomène comparable c'est à dire l'inhibition

de la formation des conidies à la lumière, aussi pour VAN DEN ENDE, le " $P_{310}$ " ne constitue qu'un photo-produit provenant de la transformation d'un métabolite synthétisé par le champignon et qu'en l'absence de ce dernier élément, le " $P_{310}$ " ne se forme pas.

Enfin WESTE (1970), renouvelant les expériences de LEACH, ne trouve pas de " $P_{310}$ " dans les cultures irradiées d'Ophiobolus graminis produisant pourtant des périthèces.

Devant ces résultats discordants, nous avons cherché à vérifier les expériences décrites par LEACH et TRIONE en recherchant chez N. galligena :

- la présence de " $P_{310}$ " dans le mycélium soumis à des éclairagements favorables à la reproduction sexuée ;
- les effets de l'incorporation de " $P_{310}$ ", dans le milieu de culture, sur le développement sexué en l'absence de lumière.

# I - MISE EN EVIDENCE DU P<sub>310</sub> CHEZ N. GALLIGENA.

## 1 - Technique d'extraction : obtention de l'extrait brut :

Le mycélium recueilli sur filtre, après plusieurs lavages à l'eau distillée, est mis en suspension dans l'éthanol absolu puis broyé à l'ultra-turrax. Il est maintenu ainsi, submergé d'alcool éthylique, pendant 24 heures à 4°C. Après filtration, la phase éthylique est concentrée à sec par évaporation sous vide. On reprend le résidu obtenu par un faible volume d'eau distillée et on réalise 2 extractions à l'éther. On écarte la phase étherée, et on concentre par évaporation sous vide, la phase aqueuse. Le produit obtenu, ou extrait brut, dissout dans l'eau distillée ajustée à pH 4, est prêt à être chromatographié ou analysé au spectrophotomètre.

## 2 - Recherche du composé "P<sub>310</sub>" :

Nous avons recherché la présence du facteur "P<sub>310</sub>" :

- dans les milieux nutritifs : expérience n° 1 ;
- dans le mycélium ou les périthèces de N. galligena placé dans des conditions de lumière, de milieu et de température simultanément favorables à la reproduction sexuée : expérience n° 2 ;
- dans le mycélium de N. galligena soumis à des facteurs externes défavorables à la fructification parfaite : expérience n° 3.

Dans tous les cas, on enregistre au spectrophotomètre l'absorption spectrale des différents extraits ou milieux qui contiennent le facteur "P<sub>310</sub>" s'ils présentent un pic d'absorption à 310 nm.

### 1) Expérience n° 1 :

Les milieux nutritifs liquides : eau de pomme de terre et synthétique ne renferment jamais de "P<sub>310</sub>". En particulier, les irradiations ne provoquent pas la formation de ce composé dans les milieux ni dans les filtrats de cultures irradiées de N. galligena.

2) Expérience n° 2 :

Dans cette expérience, des extractions ont été effectuées à partir :

a) de périthèces prélevés sur milieu eau de pomme de terre gélosée après 30 jours de culture à 18°C sous un éclairage journalier de 12 heures de lumière blanche.

b) de mycélium provenant de cultures placées dans des conditions optimales à 18°C, en milieu synthétique liquide et sous des rythmes d'éclairage en lumière blanche, verte, bleue et proche U.V. suivants:

- une alternance de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Les prélèvements mycéliens sont effectués les 6ème, 8ème, 10ème, 12ème et 30ème jours de culture.

- un éclairage unique de 48 heures interrompant du 9ème au 11ème jour le séjour à l'obscurité continue de N. galligena. Le mycélium est recueilli au 11ème jour dès la fin de l'illumination.

Dans tous les cas, les extraits présentent deux pics d'absorption maximale, l'un à 260 nm, l'autre à 310 nm (figure 18, A), ils renferment donc tous du "P<sub>310</sub>". Les périthèces accumulent ce facteur qui est présent aussi dans le mycélium dès le 6ème jour de culture mais la concentration du "P<sub>310</sub>" augmente avec la durée des éclairages. Une seule irradiation de 48 heures provoque la synthèse de "P<sub>310</sub>" tout comme elle déclenche l'induction sexuée. Les différentes radiations blanche-verte-bleue ou proche ultra-violette induisent les ascocarpes et la formation de "P<sub>310</sub>".

3) Expérience n° 3 :

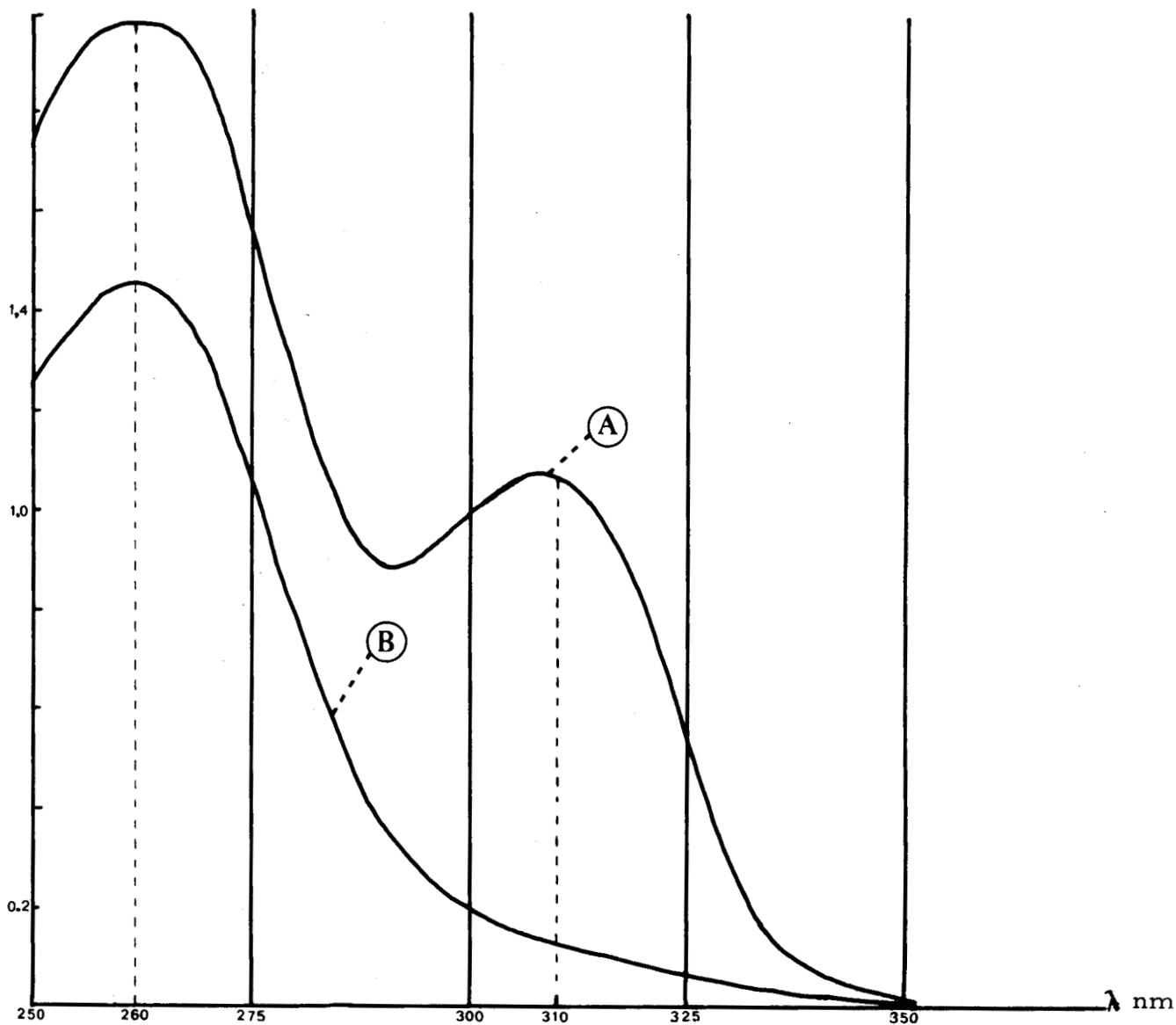
Au cours de cette expérience, les extractions sont pratiquées sur du mycélium âgé de 30 jours et placé dans des conditions qui toutes entraînent la stérilité de la souche :

a - En milieu synthétique liquide à 18°C :

à l'obscurité continue ;

sous des éclairages quotidiens de 12 heures de lumière rouge.

Figure 18 : Mise en évidence du facteur  $P_{310}$  dans les divers extraits mycéliens de Nectria galligena.



- Ⓐ extraits mycéliens placés dans des conditions d'éclairement favorables à la reproduction sexuée
- Ⓑ extrait mycéliens placés dans des conditions défavorables à la reproduction sexuée.

b - Sous une alternance de 12 heures de lumière blanche  
et de 12 heures d'obscurité :

à 25°C en milieu synthétique liquide ;

à 18°C en milieu synthétique liquide dépourvu des oligo-éléments minéraux suivants : sulfates de fer, de zinc, de cuivre et de manganèse.

On note l'existence d'un seul pic d'absorption maximale à 260 nm (figure 18, B) et par conséquent l'absence de "P<sub>310</sub>" dans les extraits mycéliens provenant de cultures stériles de N. galligena à l'obscurité continue ou éclairées en lumière rouge. Ces faits et les précédents illustrent l'origine photo-chimique du "P<sub>310</sub>" et ses liens étroits avec la reproduction sexuée puisque des conditions lumineuses identiques régissent ces 2 phénomènes.

Cependant nous avons noté que la présence du "P<sub>310</sub>" dans les extraits mycéliens n'implique pas forcément qu'il y ait reproduction sexuée. Il en est ainsi dans les conditions de l'expérience n° 3 - b, au cours de laquelle on obtient une inhibition de la fructification parfaite en présence de lumière en raison de l'utilisation soit d'une température excessive, 25°C, soit d'un milieu dépourvu d'éléments minéraux indispensables. L'hypothétique action sporogène du "P<sub>310</sub>" est donc tributaire d'une activité métabolique optimale de N. galligena et sa seule intervention, pas plus que celle de la lumière, ne suffit à déclencher les phénomènes sexuels si la température et la composition du milieu sont inadéquates.

En conclusion, la figure 18, résume les résultats essentiels de ces expériences et confirme ceux de LEACH et TRIONE. La présence de "P<sub>310</sub>" dans le mycélium est révélatrice de l'effet inducteur des irradiations dans la reproduction sexuée, mais son éventuelle efficacité, tout comme celle de la lumière, est étroitement dépendante des optimums nutritifs et thermiques. La parfaite connaissance de ces deux derniers facteurs nous procure un grand avantage sur les autres chercheurs qui opèrent dans des conditions moins précises.

## II - ISOLEMENT DU $^{310}\text{P}$

A l'issue de l'extraction effectuée sur 25 g. de mycélium frais prélevé après 12 jours d'irradiation en lumière blanche (12 heures par jour), on dispose d'une solution aqueuse dont l'examen spectrophotométrique révèle 2 maximums d'absorption à 260 nm et à 310 nm (figure 18, A). Il s'agit donc de dissocier ces 2 pics d'absorption puisque selon LEACH, seule la substance absorbant à 310 nm caractérise l'action de la lumière sur la reproduction sexuée. Pour y parvenir, nous avons adopté la technique de chromatographie sur résine échangeuse d'ions de TRIONE et LEACH (1969).

### 1 - Technique :

1) l'extrait brut dissous dans 50 ml d'eau distillée de pH 4 est placé sur une résine (2,5 x 25 cm) de type DOWEX 1 x 8 (200- 400 mesh) (forme  $\text{Cl}^-$ ). Après rinçage de la résine à l'eau distillée, le volume de l'éluat est ramené à 50 ml et ajusté à pH 4,5.

2) cette solution est soumise à une seconde chromatographie sur résine DOWEX 50 W x 8 (200-400 mesh) (forme  $\text{H}^+$ ). La résine, préalablement lavée à l'eau distillée, est éluée par des solutions d'acide chlorhydrique de normalité croissante. Les éluats neutralisés par le soude ( $\text{NaOH}$  - 0,5 N), sont évaporés à sec et débarrassés du chlorure de sodium par des extractions répétées au méthanol absolu.

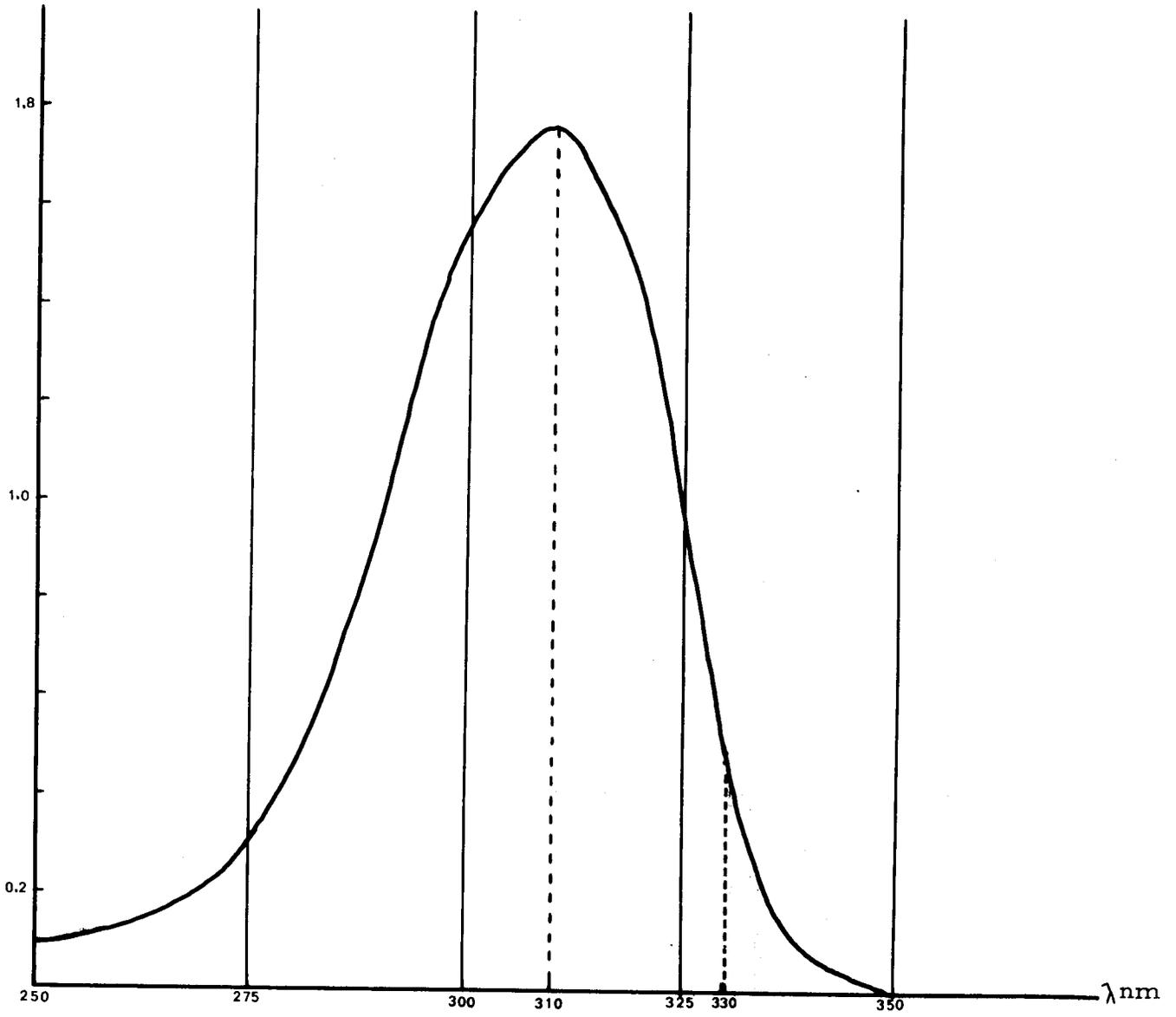
Les extraits secs obtenus sont finalement mis en solution dans l'eau distillée.

### 2 - Résultats :

Après chaque opération, nous avons contrôlé au spectrophotomètre l'absorption des différents éluats.

Le facteur  $^{310}\text{P}$  n'est pas adsorbé sur la première résine (forme  $\text{Cl}^-$ ), échangeuse d'anions, qui retient les substances présentant un pic à 260 nm.

Figure 19 : Spectre d'absorption du P<sub>310</sub> après chromatographie sur résine.



Par contre le "P<sub>310</sub>" est fixé sur la résine DOWEX 50 W x 8 (forme H<sup>+</sup>), il est alors élué par une solution d'acide chlorhydrique HCl 0,1N. Après cette opération, et l'élimination du chlorure de sodium, la solution de "P<sub>310</sub>" présente un seul pic d'absorption reporté dans la figure 19 et défini par les longueurs d'onde maximale 310 nm et minimales : 275 nm et 330 nm. Le composé "P<sub>310</sub>", isolé par LEACH et TRIONE, revêt les mêmes caractéristiques spectrophotométriques.

### III - ACTIVITE SPROGENIQUE DU FACTEUR "P<sub>310</sub>".

La photo-induction de la reproduction sexuée s'exerce-t-elle par l'intermédiaire du "P<sub>310</sub>" ? Nous avons déjà montré que seules les radiations lumineuses, qui par leur qualité, leur durée et leur moment d'application provoquent la fructification parfaite, rendent possible la synthèse de "P<sub>310</sub>". Il convient donc de rechercher si le facteur "P<sub>310</sub>" peut remplacer les indispensables éclaircissements pour déclencher la formation des périthèces et s'il constitue, ainsi, le principal médiateur chimique de l'activité lumineuse. Dans ce but, on observera les effets sur le développement sexuel de N. galligena, maintenu à l'obscurité continue, d'un apport exogène de "P<sub>310</sub>" dans le milieu de culture.

#### 1 - Conditions expérimentales :

Les cultures de N. galligena sont incubées :

- à l'obscurité continue ;
- à la température de 18°C ;
- en milieu synthétique liquide réparti en tubes.

Avant l'ensemencement, nous avons ajouté à raison de 0,1 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 ml par tube une solution aqueuse de "P<sub>310</sub>" obtenue dans les conditions définies lors de l'isolement (II) et dont les caractéristiques spectrophotométriques sont établies dans la figure 18, courbe A.

Simultanément et servant de témoins à la série expérimentale précédente des cultures de N. galligena sont placées à 18°C, sur milieu synthétique liquide mais dans les conditions suivants :

- sous une alternance de 12 heures de lumière blanche et de 12 heures d'obscurité durant 30 jours : témoin 1 ;

- à l'obscurité continue sur milieu dépourvue de "P<sub>310</sub>" : témoin 2 ;

- à l'obscurité continue sur un milieu où l'on a introduit, avant l'ensemencement 0,1 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 ml par tube d'une solution aqueuse de "P<sub>310</sub>", préalablement dégradée, par action de la soude (Na OH 4N) à 100°C durant 2 heures puis ramenée à pH 5,5, et qui ainsi n'absorbe plus à 310 nm : témoin 3.

## 2 - Résultats :

Nous avons compté le nombre moyen de périthèces par tube dans les différents cas après 30 jours de culture. Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau n° 8 : Activité du "P<sub>310</sub>" sur la formation des périthèces de N. galligena.

	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	volume (ml) de "P <sub>310</sub> " incorporé par tube.				
				0,1	0,5	1	1,5	2
nombre de périthèces par tube.	150	0	0	0	20	50	70	70

## LEGENDE :

- T<sub>1</sub> : Cultures éclairées à raison de 12 heures par jour durant 30 jours ;
- T<sub>2</sub> : Cultures maintenues à l'obscurité continue ;
- T<sub>3</sub> : Cultures se développant à l'obscurité continue sur un milieu additionné de "P<sub>310</sub>" dégradé.

En dépit de l'obscurité continue et selon sa concentration dans le milieu de culture, le facteur " $P_{310}$ " induit la formation d'un plus ou moins grand nombre de périthèces. Comparée à la reproduction sexuée produite par des éclairagements quotidiens de 12 heures ( $T_1$ ), la quantité relativement faible d'ascocarpes, due à l'addition de 1, 5 ou 2 ml de la solution de " $P_{310}$ ", peut être imputable à la fourniture exogène de ce composé. Nous avons constaté, en effet, qu'une partie du volume de " $P_{310}$ " ajouté demeure dans le milieu extérieur et ne semble pas être utilisée par *N. galligena*. De même, la pénétration difficile du " $P_{310}$ ", dans le mycélium, peut être la cause de l'inefficacité des teneurs minimales (0,1 ml) de " $P_{310}$ " incorporées au milieu. L'addition de " $P_{310}$ " dégradé est inopérante et le champignon demeure à l'état végétatif, cela semble signifier que l'intervention du " $P_{310}$ " dans les processus sexuels repose sur sa spécificité et son intégrité moléculaires et non sur un apport nutritionnel.

Les périthèces induits par le " $P_{310}$ ", à l'obscurité continue, renferment uniquement de très jeunes asques toujours dépourvus d'ascospores cependant, des éclairagements appliqués au 30<sup>ème</sup> jour de culture, donc sans effet sur l'initiation des primordiums, permettent l'achèvement de la reproduction sexuée. On peut donc supposer que toutes les étapes de la fructification parfaite en particulier l'ascosporogénèse ne sont pas entièrement dépendantes de l'activité du " $P_{310}$ ".

#### IV - PURIFICATION DU " $P_{310}$ ".

TRIONE et LEACH (1969) ne sont pas encore parvenus à établir la formule chimique du " $P_{310}$ ", néanmoins ils en définissent un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques. A la suite de ces travaux, nous avons tenté divers essais de purification du composé " $P_{310}$ " extrait de 25 grammes de mycélium frais provenant de cultures irradiées en lumière blanche durant 12 jours (12 heures par jour) et recueilli finalement après passage sur résine DOWEX 50 W x 8 (forme  $H^+$ ) et dessalage au méthanol.

### 1 - Filtration sur gel :

Après concentration, 2 ml d'une solution aqueuse de "P<sub>310</sub>" sont déposés sur colonne de Sephadex G 10 ( 2,5 x 40 cm) éluée par l'eau distillée à pH = 7 à raison de 30 ml/h. Un collecteur de type "Ultronac LKB 7000" muni d'une pompe péristaltique "Perpex" nous permet de recueillir des fractions d'un volume égal à 5 ml.

Pour chaque fraction, on effectue :

- une mesure de l'absorption au spectrophotomètre ;
- une réaction à la ninhydrine où 1 ml d'une solution de ninhydrine à 0,1 % dans le butanol est incorporé dans 2 des 5 ml de la fraction. Après un bain marie de 10 minutes à 100°C, on observe la coloration.

Une absorption maximale à 310 nm caractérise un seul pic d'éluion pour les fractions 18 à 36 qui donnent, parallèlement, une coloration violette instantanée en présence de ninhydrine.

Par filtration sur gel et selon la technique employée, la présence d'un seul pic d'éluion ne nous permet pas de discerner si des substances, de poids moléculaires différents, absorbent à 310 nm. La réaction positive à la ninhydrine révèle la nature protéique du "P<sub>310</sub>".

### 2 - Dialyse :

Contenu dans un boudin de cellulose (manufacturé par Union Carbide Corporation) et soumis à une dialyse contre l'eau distillée à pH = 7, à la température de 20°C, pendant 12 heures, le composé "P<sub>310</sub>", traverse la membrane dialysante. Il est décelé dans le milieu extérieur par une mesure spectrophotométrique.

### 3 - Chromatographie sur papier :

Nous avons étudié la solution aqueuse de "P<sub>310</sub>", par chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1, à l'obscurité, à 22°C. Nous avons utilisé 2 systèmes d'éluion :

- 1 - Ethanol/Acide acétique/Eau (6/2/2, v/v) ;
- 2 - N Butanol/Acide acétique/Eau (4/1/5, v/v) .

Après migration, respectivement 12 et 32 heures, chaque chromatogramme est découpé en bandes, dans le sens de développement du solvant, certaines sont révélées par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,1 p. 100 dans le butanol. Par cette technique, on met en évidence de nombreuses tâches. Des fragments, correspondant aux "Rf" des tâches apparues lors de la révélation, sont prélevés dans les parties des chromatogrammes non utilisées précédemment, ils sont ensuite élués dans l'eau. On mesure l'absorption des différents éluats au spectrophotomètre. On constate que plusieurs éluats absorbent à 310 nm. La solution initiale de "P<sub>310</sub>" est donc composée de différentes substances douées d'absorption à 310 nm correspondant probablement aux trois formes A, B, C de "P<sub>310</sub>" découvertes par TRIONE et LEACH, elle en renferme aussi d'autres dont l'absorption n'est pas définie par cette longueur d'onde. En conclusion, il apparaît nécessaire de poursuivre, par d'autres méthodes, la purification du composé "P<sub>310</sub>" en n'omettant jamais de vérifier, à chaque manipulation, l'activité biologique du produit obtenu.

### CONCLUSION.

En conclusion, nos expériences relatives aux conditions de formation du "P<sub>310</sub>" et au rôle éventuel de ce facteur dans le développement de N. galligena confirment les résultats obtenus par LEACH et TRIONE. Nous avons isolé, du mycélium irradié et des périthèces de N. galligena, une substance présentant un pic d'absorption maximum à 310 nm et certains caractères physico-chimiques définis par les auteurs précédents.

Des conditions lumineuses identiques induisent la reproduction sexuée de N. galligena et la synthèse endogène du "P<sub>310</sub>" dont nous avons démontré l'activité dans le déclenchement du processus sexuel. Cependant, si le facteur "P<sub>310</sub>", ajouté à des cultures maintenues à l'obscurité, induit la formation des périthèces et des asques de N. galligena, il est, semble-t-il,

incapable de provoquer la formation des ascospores, cette inefficacité laisse supposer que d'autres composés, photo induits, interviennent à ce niveau.

D'autre part, si la formation de " $P_{310}$ " semble, dans une certaine mesure, indépendante de la température et de la composition du milieu, par contre son activité ne s'exerce que dans des conditions nutritives et thermiques optimales.

Seul l'examen spectrophotométrique révèle l'existence du " $P_{310}$ " et ne représente donc pas un élément suffisant pour envisager la nature chimique de ce composé. Une analyse physico-chimique du " $P_{310}$ " s'avère indispensable et doit nous conduire, par des expériences plus précises, à définir son rôle de médiateur entre la lumière et la reproduction sexuée. Nos expériences se rapprochent donc de celles entreprises par LEACH et TRIONE sur la fructification parfaite de Pleospora herbarum mais différent de tous les autres travaux consacrés, uniquement, à la multiplication végétative. Cependant, si nous devons préciser davantage le spectre d'activité de la lumière sur la reproduction sexuée et par conséquent sur la synthèse du " $P_{310}$ " le développement optimal de N. galligena en milieu synthétique liquide et à des températures définies nous fournit un matériel d'étude très appréciable dont ne disposent pas les auteurs pré-cités.

C O N C L U S I O N S   G E N E R A L E S .

-----

Ce travail, consacré principalement à l'étude de l'influence des facteurs externes sur la reproduction sexuée in vitro de l'Ascomycète homothallique N. galligena Bres., nous suggère les conclusions suivantes :

1 - L'élaboration d'un milieu synthétique liquide nous a permis de déterminer, d'une manière plus précise que les substrats naturels ou synthétiques gélosés généralement employés, la nature des éléments nutritifs nécessaires à la fructification parfaite. Ainsi nous avons pu mettre en évidence que la formation des ascocarpes de N. galligena requiert un milieu nutritif dont la composition chimique est, qualitativement et quantitativement, différente de celle favorable à la croissance végétative ou même à la multiplication asexuée. En particulier, des concentrations de carbone et d'azote relativement faibles et dans des proportions optimales définies par un rapport C/N égal à 20, de même que la présence indispensable du fer et du zinc reflètent, la spécificité nutritionnelle de la reproduction sexuée de N. galligena.

2 - La thermorégulation peu efficace durant la période initiale du développement mycélien, agit par la suite de façon très rigoureuse sur le déroulement des processus sexués. L'inhibition ou l'arrêt de la fructification parfaite par une élévation thermique de quelques degrés (18°C à 21°C) durant la phase thermo-sensible, en témoigne. Le maintien des cultures de N. galligena à des températures inférieures ou égales à 18°C permet l'accomplissement de toutes les étapes de la reproduction sexuée qui ne peut toutefois être induite, à l'obscurité continue, même par la méthode des chocs thermiques comme c'est le cas chez Pleospora herbarum (LEACH, 1971).

3 - Dans des conditions nutritionnelles et thermiques optimales, les cultures de N. galligena demeurent uniquement végétatives si elles sont maintenues à l'obscurité continue ou soumises à des irradiations soit trop tardives (après 18 jours de croissance) soit trop brèves (moins de 12 heures), soit en lumière rouge ( $\lambda > 625$  nm). Inversement, des conditions lumineuses précises provoquent la formation des ascocarpes. Ainsi, nous avons pu montrer que la photo-induction des périthèces est tributaire simultanément :

- d'un éclaircissement précoce lié à un état physiologique optimal défini, du 7<sup>ème</sup> au 11<sup>ème</sup> jour de culture, par une phase active de croissance :

- de la durée du photo-stimulus qui doit être égale ou supérieure à 12 heures. Des éclaircissements uniques, d'une durée de 48 heures, appliqués les 9<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jours de culture, stimulent la reproduction sexuée. Cependant, la fructification sexuée est abondante et régulière pour des illuminations quotidiennes de 12 heures soit durant 30 jours, soit à la suite d'un pré-séjour à l'obscurité inférieur à 10 jours, soit pendant les 15 premiers jours seulement :

- de la qualité des radiations lumineuses. L'efficacité des radiations de longueurs d'onde comprises entre 300 et 600 nm démontre leur absorption par N. galligena qui est particulièrement sensible aux lumières bleue et proche ultra-violette. Le spectre d'action de la lumière sur la reproduction sexuée ne se limite donc pas chez N. galligena aux longueurs d'onde inférieures à 510 nm comme c'est le cas chez de nombreuses autres espèces fongiques. L'intervention dans l'induction sexuée de N. galligena des radiations de  $\lambda$  variant de 300 à 600 nm, si l'on se réfère à l'absorption par des pigments de type connu, permet de supposer l'existence d'un système photo-récepteur comprenant des cytochromes, des caroténoides et des flavines. Toutefois, nous ne pouvons conclure dans ce sens par suite d'un contrôle insuffisant de la valeur énergétique des éclaircissements.

Un éclaircissement continu en lumière blanche n'inhibe pas les phénomènes sexués de N. galligena mais provoque simplement une légère régression du nombre de périthèces. Nous n'avons donc pas distingué chez N. galligena une phase photo-inhibée comme chez Diaporthe phaseolarum var. batatis (TIMNICK et coll., 1951), ou comme chez le Basidiomycète Coprinus congregatus (MANACHERE, 1970) où les appareils fructifères sont anormaux ou absents en lumière blanche permanente.

4 - En relation avec l'activité de la lumière sur le métabolisme de N. galligena, nous avons mis en évidence un composé appelé "P<sub>310</sub>" :

- caractérisée au spectrophotomètre par une absorption maximale à 310 nm ;

- présent uniquement dans le mycélium irradié ;

- synthétisé dans des conditions lumineuses identiques à celles déterminant la reproduction sexuée ;

- provoquant le déclenchement du processus sexué en l'absence d'éclaircissements auxquels il peut se substituer par apport exogène dans le milieu sans permettre cependant la formation des ascospores. Ces données confirment les expériences de LEACH et TRIONE, relatives à d'autres espèces fongiques. Ainsi, le "P<sub>310</sub>" semble-t-il correspondre à l'activité spécifique de la lumière sur le métabolisme de N. galligena et à l'origine chimique de la photo-induction ? La formation des structures sexuelles normales malgré l'arrêt prématuré des irradiations laissait supposer la présence d'un tel composé. La synthèse du "P<sub>310</sub>" résulte-t-elle de l'orientation donnée au métabolisme intermédiaire comme l'ont démontré VIDAL (1971) et VIALA (1972) sur Leptosphaeria typhae ? Pour ces auteurs, le développement de L. typhae à la lumière se traduit par une stimulation des processus oxydatifs au niveau du métabolisme intermédiaire, du cycle citrique en particulier, alors que sa stérilité à l'obscurité continue est liée à une

déviations métaboliques vers des voies plus réductrices : cycle glyoxylique et formation anaérobie d'acide lactique. Dans une certaine mesure, l'aération du milieu peut conduire aux mêmes effets mais ne peut induire les périthèces contrairement à la lumière qui possède en plus une action spécifique correspondant vraisemblablement à la formation du "P<sub>310</sub>".

Ce travail nous a permis d'acquérir une bonne maîtrise des facteurs nutritifs, thermiques et lumineux intervenant dans la fructification parfaite de N. galligena. Dans la perspective de recherches futures, il importerait de caractériser cytologiquement les différents états abortifs de la reproduction sexuée provoqués par certaines conditions culturales. On pourrait ainsi déterminer à quel niveau s'opère le blocage de la reproduction sexuée par suite d'une élévation de température de 18° à 25°C, d'une durée d'éclairement insuffisante ou de l'incorporation du "P<sub>310</sub>" dans le milieu. Il faudrait aussi préciser les limites d'action du spectre lumineux ainsi que les seuils énergétiques pour chaque longueur d'onde. Enfin, la purification du composé "P<sub>310</sub>" devrait aboutir non seulement à définir sa formule chimique mais aussi les voies métaboliques conduisant à sa synthèse. L'ensemble de ces recherches aurait ainsi pour objet l'analyse du rôle de la lumière dans la reproduction sexué de N. galligena Bres.

## B I B L I O G R A P H I E .

-----

- ARAGAKI M. — Some chemical requirements for the growth and sporulation of Alternaria tomato. - *Phytopath.*, 1964, 54 (5), 562-564.
- ARPIN N. — Les caroténoïdes des Discomycètes : essai chimiotaxinomique. - Thèse, Lyon 1968, 169 p.
- ASHCROFT J.M. — European canker of black walnut and other trees. - *W. Va. agr. exp. Stat. Bull.*, 1934, 261, 52 p.
- BAKER R. & WARE B. — Induction of perithecial primordia in Hypomyces solani f. cucurbitae. - *Phytopath.*, 1962, 52, 359.
- BARKSDALE A.W. — Effect of nutritional deficiency on growth and sexual reproduction of Achlya ambisexualis. - *Amer. J. Bot.*, 1962, 49, 633-638.
- BARNETT H.L. & LILLY V.G. — The relation of thiamin to the production of perithecia by Ceratostomella fimbriata. - *Mycologia*, 1947, 39, 699-708.
- BARTHE P. — Recherche de substances de type cytokinine synthétisées par Nectria galligena Bres. var. major en culture pure. - *C.R. Acad. Sc. Paris*, 1971, 272, 2881-2883.
- BASU S.N. — Significance of calcium in the fruiting of Chaetomium species, particularly Chaetomium globosum. - *J. gen. Microbiol.*, 1951, 5, 231-238.
- BASU S.N. — Effect of biotin, manganese and calcium on the growth and fruiting of Chaetomium species. - *J. Sc. Industr. Res.*, 1950, 17 C, 15-16.
- BEEVER R.E. & BOLLARD E.G. — The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. - *J. gen. Microbiol.*, 1970, 60 (2), 273-279.

- BELTRA R., BALLESTEROS A.M. & LAHOZ R. — Estudios sobre la producción de substancias de crecimiento por Nectria galligena. - Microbiol. esp., 1969, 22, 41.
- BERDUCOU J. — Mécanisme de la formation des chancre à Nectria du pommier. - Thèse, Toulouse 1967, 179 p.
- BHATTACHARYYA J.P. & BASU S.N. — The effect of trace elements, other nutritional factors and pH on the growth and sporulation of Penicillium species. - J. Sci. Ind. Res., 1962, 21, 263-268.
- BRETZLOFF C.W. Jr. — The growth and fruiting of Sordaria fimicola. - Amer. J. Bot., 1954, 41, 58-67.
- BULIT J. — Contribution à l'étude biologique du Nectria galligena Bres., agent du chancre du pommier. - Ann. Epiph., 1957, 8 (1), 67-89.
- BURTON W.G. — The potato. - Wageningen, 1966, 383 p.
- BUSTON H.W., JABBAR A. & ETHERIDGE D.E. — The influence of hexose phosphates, calcium and jute extract on the formation of perithecia by Chaetomium globosum. - J. gen. Microbiol., 1953, 8, 302-306.
- BUXTON E.W. — Production of a perfect stage in a nutritionally deficient mutant of pathogenic Fusarium oxysporum after ultra-violet irradiation. - Nature, 1959, 184, 1458.
- CALLAGHAN A.A. — Observations on perithecium production and spore discharge in Pleuraea setosa. - Trans. brit. mycol. Soc., 1962, 45, 249-254.
- CALPOUZOS L. & LAPIS D.B. — Effects of light on pycnidium formation, sporulation and tropism by Septoria nodorum. - Phytopath., 1970, 60 (5), 791-794.
- CAMPBELL R. — Nutrient requirements for the production of perithecia by Ceratocystis variospora and other species. - Amer. J. Bot., 1958, 45 (4), 263-270.
- CARLILE M.J. & FRIEND J. — Carotenoids and reproduction in Pyrenema confluens. - Nature, 1956, 178, 369-370.
- CARLILE M.J. — Evidence for a flavoprotein photoreceptor in Phycomyces. - J. gen. Microbiol., 1962, 28, 161-167.
- CARLILE M.J. — The photobiology of fungi. - Ann. Rev. Plant Physiol., 1965, 16, 175-202.

- CARLILE M.J. — The photoresponses of fungi. - In Photobiology of Microorganisms, Chap. 11, 309-344, Londres 1970.
- CAYLEY D.M. — Some observations on the life history of Nectria galligena Bres. - Ann. of Bot., 1921, 35 (137), 79-92.
- CHADEFAUD M. — Traité de botanique systématique. Tome I : les Végétaux non vasculaires. - Paris 1960, 1018 p.
- CHILD J.J., DEFAGO G. & HASKINS R.H. — The influence of carbon and nitrogen nutrition on growth and sterol induced sexuality of Pythium sp. PRL 2142. - Mycologia, 1969, 61, 1096-1105.
- CHUNG H.S. & WILCOXSON R.D. — Effects of temperature, light, carbon and nitrogen nutrition on reproduction in Phoma medicaginis. - Myco-pathol. et Mycol. appl., 1971, 44 (4), 297-308.
- CIAK J. & HAHN F.E. — Quinacrine (atebrin) : mode of action. - Science, 1967, 156, 655-656.
- COCHRANE J.W. — Physiology of fungi, New-York, 1958. 524 p.
- CROWDY S.H. — Observations on apple canker. III. The anatomy of the stem canker. - Ann. appl. Biol., 1939, 36, 483-495.
- CURTIS C.R. — Physiology of sexual reproduction in Hypomyces solani f. cucurbitae. II. Effects of radiant energy on sexual reproduction. - Phytopath., 1964, 54, 1141-1145.
- CURTIS C.R. — Action spectrum of the photoinduced sexual stage in the Fungus Nectria haematococca Berk. et Br. - Pl. Physiol., 1971, 47,
- CURTIS C.R. — Photoinduced perithecial formation by Nectria haematococca on media containing either L Tyrosine ; L Phenylalanine ; or D glucose + NaNO<sub>3</sub> as sole carbon and nitrogen sources. - Canad. J. Microbiol., 1969, 15, 863-868.
- ELLIOTT C.G. — Effects of inhibitors of sterol synthesis on growth of Sordaria and Phytophthora. - J. gen. Microbiol., 1969, 56, 331-343.
- ERWIN D.C. & KATZNELSON H. — Studies on the nutrition of Phytophthora cryptogea. - Canad. J. Microbiol., 1961, 7, 15-25.
- FAYRET J. — Cycle biologique naturel et in vitro de Gnomonia leptostyla (Fr.) Ces. et de Not. - C.R. Acad. Sc. Paris, 1967, 265, 908-911.

- FAYRET J. — Action de la température et de la lumière sur la multiplication asexuée et la reproduction sexuelle de Gnomonia leptostyla (Fr.) Ces. et de Not. en culture pure. - C.R. Acad. Sc. Paris, 1967, 265, 1897-1900.
- FIASSON J.L. — Les caroténoïdes des Basidiomycètes, survol chimio-taxinomique. - Thèse, Doc. 3ème Cycle Lyon 1968, 84 p.
- FRIES N. — The chemical environment for fungal growth. 3-Vitamins and other organic growth factors. - in: The fungi, 1964, 1, 491-523.
- GABRIEL M. — Recherches sur la physiologie du mycelium des basidiomycètes en aérobiose et anaérobiose. - Thèse, Lyon 1967, 211 p.
- GOETHE R. — Über der Krebs der Obstbäume. - Berlin 1904.
- HALL R. — Effect of carbon-nitrogen ratios on production of perithecia by Sordaria fimicola. - Canad. J. Microbiol., 1971, 17 (1), 132-134.
- HANLIN R.J. — Studies on the genus Nectria. - I. Factors influencing perithecial formation in culture. - Bull. Torrey bot. Club., 1961, 88 (2), 95-103.
- HARTIG R. — Der Krebs der Laubholzbaume. - Untersuch. Forstbot. München, 1880, 1, 209.
- HAAS E. — The effect of atebirin and quinine on isolated respiratory enzymes. - J. biol. Chem., 1944, 155, 321
- HAWKER L.E. — The influence of various sources of carbon on the formation of perithecia by Melanospora destruens Shear. in the presence of accessory growth factors. - Ann. of Bot. N.S., 1939, 3, 455-468.
- HAWKER L.E. — The nature of accessory growth factors influencing growth and fruiting of Melanospora destruens Shear. and some other fungi. - Ibid., 1939, 3, 657-676.
- HAWKER L.E. & CHAUDHURI S.D. — Growth and fruiting of certain ascomycetous fungi as influenced by the nature and concentration of carbohydrate in the medium. - Ibid., 1946, 10 (38), 185-194.
- HAWKER L.E. — Further experiments on growth and fruiting of Melanospora destruens Shear. in the presence of various carbohydrates, with special references to the effects of glucose and of sucrose. - Ibid., 1947, 11, 245-260.

- HAWKER L.E. — The stimulation of the formation of perithecia of Melanospora destruens Shear. by small quantities of phosphoric esters of glucose and sucrose. - *Ibid.*, 1948, 12, 77-79.
- HAWKER L.E. — *Physiology of fungi*. - London 1950, 360 p.
- HAWKER L.E. — The physiology of reproduction in fungi. - Cambridge Univ. Press London, 1957 128 p.
- HAWKER L.E. — Environmental influences on reproduction. - in : *The fungi*, 1966, 2, 435-469.
- HAYMAN D.S. — Rosellinia limoniispora : effect of biotin and thiamin and various sugar sources on perithecial production in pure culture. - *Canad. J. Bot.*, 1963, 41, 1649-1656.
- HEMKER W.C. & HULSMANN W.C. — Inhibition of enzyme by atebrin. - *Biochem. Biophys. Acta*, 1960, 44, 175-177.
- HENDRIX J.W. — Sterols in growth and reproduction of fungi. - *Ann. Rev. Phytopath.*, 1970, 8, 111-130.
- HENDRIX J.W., GUTTMAN S.M. & WIGHTMAN D.L. — Cation and sterol effects on growth of Phytophthora parasitica var. nicotianae. - *Phytopath.*, 1969, 59, 1620-1624.
- HENRIKSSON L.E.E. & MORGAN-JONES J.F. — The effect of temperature, pH and malt extract upon growth and perithecial development of two Gnomonia species. - *Svensk bot. Tidsk.*, 1951, 45, 648-656.
- HIRSCH H. — Environmental factors influencing to differentiation of protoperithecia and their relation to Tyrosinase and melanin formation in Neurospora crassa. - *Physiol. Plant.*, 1954, 7, 72-97.
- HIX S.M. & BAKER R. — Physiology of sexual reproduction in Hypomyces solani f. cucurbitae. I. Influence of carbon and nitrogen. - *Phytopath.* 1964, 54 (5), 584-586.
- HOGENSON R.O. & HOSFORD R.M. — Sexual reproduction in Leptosphaeria avenaria f. sp. triticea induced by wavelengths of light greater than 560 m $\mu$ . - *Mycologia*, 1971, 63 (5), 958-964.
- HOLMES F.W. — Formation of perithecia by Ceratocystis ulmi on natural and synthetic nutrient media. - *Netherl. J. Plant Pathol.*, 1970, 3, 129-134.

- INGOLD C.T. & DRING V.G. — Analysis of spore discharge in Sordaria. — Ann. of Bot. Lond., 1957, 21, 465-477.
- INOUE Y. & FURUYA M. — Perithecial formation in Gelosinospora reticulispora. I. Effects of light at two different growth states. — Development, growth and differentiation, 1970, 12 (2), 141-150.
- JEREBZOFF S. & JACQUES R. — Recherche du système pigmentaire actif sur la stabilisation du rythme interne de Leptosphaeria michotii. — C.R. Acad. Sc. Paris, 1969, 268, 691-694.
- JEREBZOFF-QUINTIN S. — Interactions de croissance d'organismes inégalement résistants à l'acide B-indolyl-acétique exogène. — Thèse Toulouse, 1964, 164 p.
- JOLY P. — Recherches sur les genres Alternaria et Stemphylium. III. Action de la lumière et des ultra-violets. — Rev. Mycol., 1962, 17, 1-16.
- KAARIK C.A. — Growth and sporulation of Ophiostoma. — Symbol. Bot. Upsal., 1960, 16, 3.
- KLEBS G. — Zur Physiologie der Forpflanzung einiger Pilze. — Jb. wiss. Bot., 1899, 33, 513-597.
- KOEHN R.D. — Laboratory culture and ascocarp development of Podosordaria leporina. — Mycologia, 1971, 63 (3), 441-458.
- KUMAGAI T. & ODA Y. — An action spectrum for photoinduced sporulation in the fungus Trichoderma viride. — Plant Cell Physiol., 1969, 10, 387-392.
- LACOSTE L. — Biologie naturelle et culturale du genre Leptosphaeria cesati et de notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. — Thèse, Toulouse 1965, 234 p.
- LACOSTE L. & DUJARDIN L. — La reproduction sexuée d'Arachniotus albicans Apinis; influence de l'équilibre carbone-azote et du pH. — Bull. Soc. mycol. France, 1972, (sous presse).
- LAHOZ R., BELTRA R. & BALLESTEROS A.M. — Biochemical changes in cultures of Nectria galligena during the autolytic phase of growth. — Ann. of Bot., 1970, 34, 134 p.
- LEACH C.M. — The sporulation of Helminthosporium oryzae as affected by exposure to near ultraviolet radiation and dark periods. — Canad. J. Bot. 1961, 39, 705-715.

- LEACH C.M. — Sporulation of diverse species of fungi under near ultraviolet radiation. - *Ibid.*, 1962, 40, 151-161.
- LEACH C.M. — The quantitative and qualitative relationships of ultraviolet and visible radiation to the induction of reproduction in Ascochyta pisi. - *Ibid.*, 1962, 40, 1577-1602.
- LEACH C.M. — The qualitative and quantitative relationships of monochromatic radiation to sexual and asexual reproduction of Pleospora herbarum. - *Mycologia*, 1963, 55, 151-163.
- LEACH C.M. — Detection of U.V. absorbing substances in living mycelium of fungi. - *Mycologia*, 1965, 57 (2), 291-300.
- LEACH C.M. — Ultraviolet absorbing substances associated with light induced sporulation in fungi. - *Canad. J. Bot.*, 1965, 43, 185-200.
- LEACH C.M. — Regulation of perithecium development and maturation in Pleospora herbarum by light and temperature. - *Trans. brit. mycol. Soc.*, 1971, 57 (2), 295-315.
- LEACH M. & TRIONE E.J. — Action spectrum for light induced sporulation of the fungi Pleospora herbarum and Alternaria dauci. - *Photochem. and Photobiol.*, 1966, 5, 621-630.
- LEAL J.A., GALLEGLY M.E. & LILLY V.G. — The value of 21 amino-acids as nitrogen sources for Phytophthora cactorum and P. heveae. - *Canad. j. microbiol.*, 1971, 17 (10), 1319-1325.
- LEAL J.A., GALLEGLY M.E. & LILLY V.G. — The relation of the carbon-nitrogen ratio in the basal medium to sexual reproduction in species of Phytophthora. - *Mycologia*, 1967, 56, 953-964.
- LEATH K.T. — Quality of light required for sporulation by Leptosphaerulina. *Phytopath.*, 1971, 61 (1), 70-72.
- LEBBE T. — Croissance et développement du Leptosphaeria typhae Karsten, sur milieu synthétique. - *D.E.S. Lille* 1968, 63 p.
- LENNEY J.F. & KLEMMER H.W. — Factors controlling sexual reproduction and growth in Pythium graminicola. - *Nature*, 1966, 209, 1365-1366
- LEWIS S.C., SCHIFF F.A. & EPSTEIN H.T. — Photo-oxidation of cytochromes by a flavoprotein from Euglena. - *Biochem. biophys. Res.*, 1961, 5, 221-225.
- LILLY V.G. & BARNETT H.L. — *Physiology of the fungi*. - New York, 1951, 464 p.

- LILLY V.G. — Chemical constituents of the fungal cell. I. Elemental constituents and their roles. - in : The fungi, 1965, 1(8), 163-175.
- LILLY V.G. & BARNETT H.L. — The influence of pH and certain growth factors on mycelial growth and perithecial formation by Sordaria fimi-  
cola. - Amer. J. Bot., 1947, 34, 131-138.
- LORTIE M. — Production of perithecia of Nectria galligena Bres. in pure culture. - Canad. J. Bot., 1964, 42, 123-124.
- LORTIE M. — Inoculations of Nectria galligena on Northern Hardwoods. - Laval Univ. Forest Res. Found., 1969, 13, 31 p.
- LORTIE M. — Notes on ascospore germination and mycelial growth of Nectria galligena. - Natur. canad., 1970, 97 (3), 315-324.
- LUTRELL E.S.— Taxonomy of the Pyrenomycetes. - Univ. of Missouri Studies, 1951, 24 (3), 1-120.
- Mc CARTNEY W.O. — An unusual occurrence of eye rot of apple in California due to Nectria galligena. - Plant Dis. Rep., 1967, 51 (4), 278-281.
- Mc HAN F. & JOHNSON G.T. — Zinc and amino acids : important components of a medium promoting growth of Monoascus purpureus. - Mycologia, 1970, 62 (5), 1018-1031.
- Mc ONIE K.C. & SNYDER W.C. — Production of perithecia by Gnomonia fruticola in culture. - Phytopath., 1966, 56, 197-202.
- MANACHERE G. — Recherches physiologiques sur la fructification de Coprinus congregatus Bull. ex Fr. : action de la lumière ; rythme de production de carpophores. - Thèse, Lyon 1970, 96 p.
- MARCHAL P. & RIGAUD J. — Sur la présence et le métabolisme de l'indolyl 3-acétaldéhyde chez Nectria galligena Bres. - C.R. Acad. Sc. Paris, 1970, 271, 479-481.
- MARSH R.W. — Observations on apple canker II Experiments on the incidence and control of shoot infections. - Ann. appl. Biol., 1939, 26, 458-469.
- MILLER P.M. — Spectrographic analysis of water agar, potato dextrose agar and V<sub>8</sub> juice agar. - Phytopath., 1956, 46, 526.

- MUNSON R.G. — Observations on apple canker I. The discharge and germination of ascospores of Nectria galligena. - Ann. appl. Biol., 1939, 26, 440-457.
- NANDI P.N. & DAS GUPTA A. — The role of nitrogen concentration and the production of perithecia in Penicillium vermiculatum Dang. - Nature, 1957, 179, 429-430.
- NANNFELDT J.A. — Studien über die Morphologie und Systematik der nichtlichenisierten, inoperculaten Discomyceten. - Nov. Act. Soc. Sc. uppsal., 1932, 8, 1-368.
- NELSON R.R., HUISINGH D. & WEBSTER R.K. — Sexual differentiation in Cochliobolus carbonum as influenced by inhibition and repair of sterold biosynthesis. - Phytopath., 1967, 57, 1081-1085.
- NICHOLAS D.J.D. — Utilization of inorganic nitrogen compounds and amino-acids by fungi. - in: The fungi, 1965, 1, 349-373.
- PARGUEY-LEDUC A. — Recherches sur l'ontogénie et l'anatomie comparée des ascocarpes des Pyrénomycètes Ascoloculaires. Le primordium et le développement des périthèces des Pyrénomycètes Ascohyméniaux. - Thèse, Paris 1966, 289 p.
- RICHTER H. — Die wichtigsten holzbewohnenden Nectrien aus der Gruppe der Krebserreger. - Z. Parasitenk., 1931, 1, 24.
- ROBBINS W.J. — The assimilation by plants of various forms of nitrogen. - Amer. J. Bot., 1937, 24, 243-250.
- ROBBINS W.J. & MA R. — Vitamin deficiencies of Ceratostomella and related Fungi. - Amer. J. Bot., 1942, 29, 835-843.
- ROBINSON W. — The conditions of growth and development of Pyrenema confluens Tul. - Ann. of Bot. London, 1926, 40, 245-272.
- ROQUEBERT-HUBERT M.F. & LACOSTE L. — Etude systématique et biologique de quelques Leptosphaeria graminicoles. II. Rôle des facteurs externes, principalement de l'éclaircissement, dans le déterminisme de la fructification de L. eustomoides, L. arundinacea, L. microscopica. - Bull. Soc. mycol. France, 1971, 87 (1), 67-72.
- ROSS R.G. — Amino-acids as nitrogen sources for conidial production of Venturia inaequalis. - Canad. J. Bot., 1968, 46 (12), 1555-1560.

- ROSS R.G. & BREMMER F.D.J. — Effect of ammonium nitrogen and amino-acids on perithecial formation of Venturia inaequalis. - Canad. J. Plant Sc., 1971, 51, 29-33.
- ROSS R.G. & HAMLIN S.A. — Production of perithecia of Venturia inaequalis (CKe) Wint on sterile apple leaf disc. - Canad. J. Bot., 1962, 40, 629-635.
- ROSS R.G. & HAMLIN S.A. — Influence of nutrients on perithecial production of Venturia inaequalis (Cke.) Wint. - Canad. J. Bot., 1965, 43 (8), 959-965.
- SLATER T.F. — Interference in the diphenylamine procedure for estimating deoxyribonucleic acid. - Nature, 1961, 189, 834-835.
- STEVENS F.L. — Effects of ultraviolet radiation on various fungi. - Bot. Gaz., 1928, 86, 483-491.
- TARIS B. & CLEMENCET Y. — Extraction et étude des substances de croissance produites, en culture pure, par le Nectria galligena Bres. agent du chancre européen des arbres fruitiers. - C.R. Acad. Sc. Paris, 1970, 271, 78-81.
- TYLUTKI E.E. — Some aspects of morphology, genetics and cultural behavior of Gelasinospora colospora var. autosteria. - Mycologia, 1958, 50, 353-356.
- TIMNICK M.B., LILLY V.G. & BARNETT H.L. — Factors affecting sporulation of Diaporthe phaseolarum var. batatis from soybean. - Phytopath., 1951, 41, 327-336.
- TOUSSOUN T.A. — Influence of isoleucin isomers on development of the perfect stage of Fusarium solani f. cucurbitae Race II. - Phytopath., 1962, 52, 11, 1141-1144.
- TOUSSOUN T.A. & WEINHOLD A.R. — Light requirements and light inhibition of sexual reproduction in Fusarium (Hypomyces) solani sp. cucurbitae Race II. - Canad. J. Bot., 1967, 45, 951-954.
- TRIONE E.J. & LEACH C.M. — Light induced sporulation and sporogenic substances in fungi. - Phytopath., 1969, 59 (8), 1077-1083.
- TRIONE E.J., LEACH C.M. & MUTCH J.T. — Sporogenic substances isolated from fungi. - Nature, 1966, 212, 5058, 163-164.

- TSCHABOLD E. — Physiology of sexual reproduction in Hypomyces solani f. cucurbitae. IV Influence of flavin inhibitors on perithecium formation. - *Phytopath.*, 1967, 57 (10), 1140-1141.
- TULASNE L.R.C. — *Selecta Fungorum Carpologia*, 1865, 3.
- TURIAN G. — Recherche sur l'action anticaroténogène de la diphénylamine et ses conséquences sur la morphogénèse reproductrice chez Allomyces et Neurospora. - *Physiol. Plant.*, 1957, 10, 667-679.
- TURIAN G. — Différenciation fongique. - Paris, 1969, 144 p.
- VAN DEN ENDE G. & CORNELIS J.J. — The induction of sporulation in Sclerotinia fructicola and some other fungi and the production of P<sub>310</sub> - *Netherl. J. Plant. Pathol.*, 1970, 76 (3), 183-191.
- VARGAS J.M. & WILCOXSON R.D. — Some effects of temperature and radiation on sporulation by Helminthosporium dictyoïdes on agar media. - *Phytopath.*, 1969, 59, 1706-1712.
- VIALA G. — Développement du Leptosphaeria typhae. Métabolisme intermédiaire et reproduction sexuée. Thèse, Toulouse 1972, 137 p.
- VIALA G. & VIDAL G. — Reproduction sexuée, croissance et métabolisme intermédiaire chez le Leptosphaeria typhae. - *Physiol. vég.*, 1972, 10 (3), 481-494.
- VIDAL G. — Relation entre le métabolisme des acides organiques et la reproduction sexuée du Leptosphaeria typhae (Auersw.) Karsten. - Thèse Doc. 3ème Cycle, Toulouse, 1971, 120 p.
- VIENNOT-BOURGIN G. — Les champignons parasites des arbres fruitiers à pépin. - Paris, 1966., 104-107.
- WEESE J. — Zur Kenntniss der Erregers der Krebskrankheit. - *Z. landw. Vehswe. Ost.*, 1911, 14, 872-885.
- WESTE G. — Factors affecting vegetative growth and the production of perithecia in culture of Ophiobolus graminis. - I. Variations in media and age of mycelium. - II. Variations in light and temperature. - *Austral. J. Bot.*, 1970, 18 (1), 1-28.
- WESTE G. & THROWER L.B. — Production of perithecia and microconidia in culture by Ophiobolus graminis. - *Phytopath.*, 1963, 53 (3), 354.



- WESTERGAARD M. & MITCHELL H. — Neurospora V : A synthetic medium favorising sexual reproduction. - Amer. J. Bot., 1947, 34, 573-577.
- WICKLOW D. & MALLOCH D. — Studies in the genus Thelebolus : temperature optima for growth and ascocarp development. - Mycologia, 1971, 63 (1), 118-131.
- WILLKOMM M. — Die mikroskopischen Feinde des Waldes, 1866, 101 p.
- WILSON D.M. — Physiology of sexual reproduction in Hypomyces solani f. sp. cucurbitae. V. Influence of tyrosinase on perithecial primordium formation. - Phytopath., 1968, 58, 1697-1699.
- WILSON D.M. & BAKER R. — Physiology of production of perithecia and microconidia in Hypomyces solani f. sp. cucurbitae. - Trans. brit. mycol. Soc., 1969, 53, 229-236.
- WILSON E.E. — Development of european canker in California apple district. - Plant. Dis. Repert., 1966, 50 (3), 182-186.
- WILTSHIRE S.P. — The apple canker fungus. - Ann. Repert. agr. hort. Res. St., 1920, 23-29.
- WINSTEAD N.N., JENKINS S.F., LUCAS L.T., CAMPBELL G.T. & BONE H.T. — Influence of light on perithecial formation in Glomerella magna. - Phytopath., 1966, 56 (1), 134-135.
- WOLLENWEBER H.W. — Studies on the Fusarium Problem. - Phytopath. 1913, 3(1), 24.
- WOLLENWEBER H.W. — Ramularia, Mycosphaerella, Nectria, Calonectria. Eine morphologisch pathologische Studie zur Abgrenzung von Pilzgruppen mit zylindrischen und sickelformigen Conidien. - Phytopath., 1913 3, 227.
- YANG C. & MITCHELL J. — Cation effect on reproduction of Pythium. - Phytopath., 1965, 55, 1127-1131.
- YU-SUN C.C.C. — Nutritional studies of Ascobolus immersus. - Amer. J. Bot., 1964, 51, 231-237.
- ZELLER S.M. — European canker of pomaceous fruit trees. - Oreg. Agr. cell. exp. Stat. Bull., 1926, 222, 52 p.