

0376
1976
N° d'ordre : 576

50376
1976
7

THESE

Présentée à

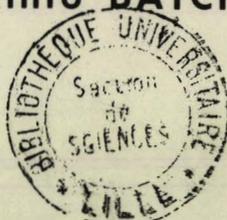
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

par

Mekinto **BATCHO**



ETUDE DE L'USTILAGO VIOLACEA (Pers.) Rouss..
SON ACTION SUR SILENE ALBA (Miller)
E.H.L. KRAUSE ET SILENE DIOICA (L.) CLAIRV.

Soutenu le 23 Février, devant la COMMISSION D'EXAMEN

MM. BOURIQUET	Président
ZAMBETTAKIS	Rapporteur
BIGUET	} Examineurs
LACOSTE	

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie végétale, sous la direction de Monsieur le Professeur BOURIQUET qui m'a accueilli il y a trois ans et constamment a entouré mon travail de sa sympathie, sa compétence, me communiquant ainsi le goût de la recherche. Il n'a pas ménagé sa peine ni son temps pour suivre et corriger cette thèse, malgré ses nombreuses activités. En dehors des problèmes matériels qu'il m'a aidé à résoudre, c'est aussi à lui que je dois d'avoir été introduit au Laboratoire de Cryptogamie du Museum National d'Histoire Naturelle. Je profite de cette occasion qui m'est offerte pour lui exprimer mes profonds respects ainsi que toute ma gratitude.

Qu'il me soit permis d'assurer Monsieur le Professeur ZAMBETTAKIS de ma respectueuse reconnaissance. Sa grande connaissance des Ustilaginales et ses conseils très utiles m'ont particulièrement guidé dans l'orientation de ce travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur BIGUET et Monsieur le Professeur LACOSTE de l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur et Madame DUBOIS pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont toujours réservé ; j'ajouterai à l'intention de Monsieur Jean DUBOIS qui m'a initié à la recherche et avec qui j'ai souvent travaillé, mon admiration ainsi que ma reconnaissance.

Je remercie aussi Madame DUTERCO, fonctionnaire du Centre International des Etudiants et Stagiaires pour la grande compréhension qu'elle a manifestée à mon égard tout au long de ce travail.

.../...

J'adresse tous mes remerciements à tout le personnel du laboratoire et particulièrement à Messieurs LEGRAND et VASSEUR qui m'ont aidé à résoudre mes problèmes matériels.

Que tous ceux qui m'ont apporté une aide précieuse, en particulier Melle TAHON qui s'est chargée de la dactylographie, soient assurés de ma profonde reconnaissance.

Enfin ce travail a pu être réalisé grâce à l'aide du Groupe de Mycologie fondamentale et appliquée à qui j'adresse tous mes remerciements.

• • • • •

HISTORIQUE	1
I INTRODUCTION	1
<u>=====</u>	
II BIOLOGIE DU CHAMPIGNON	1
<u>=====</u>	
a) <u>Cycle de développement de l'Ustilago violacea</u>	1
b) <u>Germination des téliospores</u>	2
c) <u>Formation des dicaryons</u>	3
d) <u>Mycélium dicaryotique</u>	3
III BIOLOGIE DE SILENE ALBA ET SILENE DIOÏCA	4
<u>=====</u>	
IV MODE D'INFECTION PAR LES USTILAGO	5
<u>=====</u>	
a) <u>Infection par les graines</u>	5
b) <u>Infection par les plantules</u>	6
c) <u>Infection par les fleurs</u>	6
d) <u>Infection par les bourgeons</u>	6
V MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES PROVOQUEES PAR LE CHAMPIGNON...	7
<u>=====</u>	
VI FACTEURS HORMONAUX	8
<u>=====</u>	
a) Action des hormones sexuelles animales	8
b) Production d'AIA, d'IAN et d'AG	9
VII CONCLUSION	9
<u>=====</u>	

CULTURE IN VITRO DE L' <u>USTILAGO VIOLACEA</u>	10
I <u>ETUDE DE LA GERMINATION DES TELIOSPORES</u>	14
a) <u>Matériel et méthodes</u>	14
b) <u>Résultats expérimentaux</u>	14
II <u>DESINFECTION DES TELIOSPORES DE L'USTILAGO VIOLACEA RECOLTEES DANS</u>	
<u>LA NATURE</u>	17
a) <u>Traitement des boutons floraux</u>	17
b) <u>Désinfection des télisporos</u>	17
1) <u>Action de la streptomycine</u>	18
2) <u>Action de la polymyxine</u>	18
III <u>ETUDE DE LA SOUCHE LEVURIFORME DE BAARN EN VUE D'UNE CULTURE</u>	
<u>ASSOCIEE "TISSU-PARASITE"</u>	21
IV <u>RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	23
a) <u>Croissance de l'Ustilago violacea sur différents milieux</u>	
<u>nutritifs liquides ou solides</u>	23
b) <u>Effet de différents éléments de la solution de Murashige</u>	
<u>et Skoog sur la croissance de l'Ustilago violacea</u>	25
importance de la teneur en glucose	27
importance de la vitamine B ₁	28

V	<u>EFFET D'UNE SOUCHE LEVUROIDE DE L'USTILAGO VIOLACEA SUR LA</u> <u>=====</u>	
	<u>CROISSANCE DES COLONIES TISSULAIRES ET DES SUSPENSIONS CELLULAIRES</u> <u>=====</u>	
	<u>DU SILENE ALBA</u>	30
	<u>=====</u>	
A.	<u>MATERIEL ET METHODES</u>	30
	a) <u>Les colonies tissulaires</u>	30
	b) <u>Culture simultanée du champignon et des tissus de Silene alba</u>	30
B.	<u>RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	30
	a) <u>Effet de l'Ustilago violacea sur les tissus isolés de Silene</u> <u>alba</u>	30
	. <u>l'inhibition est-elle due à un appauvrissement du milieu</u> <u>de culture ?</u>	33
	. <u>l'inhibition est-elle due à une modification du pH du milieu</u> <u>de culture ?</u>	35
	. <u>rejet par le champignon de substances inhibitrices dans le</u> <u>milieu de culture</u>	38
	1) <u>Effet du milieu de culture du champignon sur la croissance</u> <u>des colonies tissulaires du Silene alba</u>	38
	2) <u>Effet du milieu de culture du champignon sur la croissance</u> <u>d'une suspension cellulaire du Silene alba</u>	39
	b) <u>Conclusion</u>	40

ETUDE DE LA FLORAISON DE SILENE ALBA
ET SILENE DIOICA 41

I CULTURE DES PLANTES ENTIERES 41
=====

 a) En champ 41

 b) En serre 41

 c) culture aseptique des plantes entières 42

II CULTURE DES FRAGMENTS DE TIGES 43
=====

Conclusion 45

III OBTENTION IN VITRO DE FLEURS DE SILENE DIOICA ET SILENE ALBA
=====

 PARASITEES PAR L'USTILAGO VIOLACEA 45
=====

 a) Silene dioica 45

 b) Silene alba 47

Conclusion 48

ETUDE DE LA SOUCHE L 49

I GERMINATION DES TELIOSPORES 49
=====

II ISOLEMENT DES CLONES 49
=====

III DETERMINATION DE LA COMPATIBILITE 50
=====

IV INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LA CONJUGAISON DES SPORIDIES51
=====

a) Méthodes 52

 1) Détermination du taux de conjugaison 52

 2) Mesure de la croissance 52

b) Cinétique de la conjugaison 52

c) Variation de l'aptitude à conjuguer au cours de la croissance 55

d) Facteurs physiques contrôlant la conjugaison ... 56

 1) Température 56

 2) Lumière 57

e) Facteurs physiologiques 57

 1) Age des sporidies 57

 2) Densité des cultures 59

f) Importance du carbone et de l'azote 60

g) Mise en évidence de facteurs inhibiteurs de la conjugaison 62

h) Essais de caractérisation des facteurs inhibiteurs 63

i) Essais de culture in vitro de filaments dicaryotiques.... 64

 1) Observation de filaments dans des cultures axéniques 64

 2) Recherche en vue de cultiver le mycélium dicaryotique65

j) Conclusion 66

INFECTION EXPERIMENTALE DE SILENE ALBA
ET SILENE DIOICA PAR L'USTILAGO

VIOLACEA	67
I PREPARATION DES INOCULUMS	67
=====	
a) <u>Souche levuroïde haploïde</u> (clone n° 8) ..	67
b) <u>Suspension de téliosporos</u>	67
c) <u>Les dicaryons</u>	67
d) <u>Mycélium dicaryotique</u>	68
II MODE D'INFECTION	68
=====	
a) <u>Les plantules</u>	68
b) <u>Les rosettes</u>	68
c) <u>Milieux de culture</u>	68
III RESULTATS EXPERIMENTAUX	69
=====	
a) <u>Action d'une souche levuroïde haploïde de l'Ustilago violacea sur les fragments de tige de Silene alba.....</u>	69
b) <u>Action d'une souche levuroïde de l'Ustilago violacea sur les plantules de Silene alba</u>	69

c) <u>Infection de noeuds provenant de tiges saines par le mycelium dicaryotique</u>	70
d) <u>Infection des Silènes par les téliosporos de l'Ustilago violacea</u>	70
1) <u>Infection des plantules de Silene alba cultivées en serre</u>	70
2) <u>Les rosettes cultivées en serre</u>	70
3) <u>Les fragments de tiges de Silene alba cultivés in vitro</u>	70
4) <u>Conclusion</u>	71
e) <u>Infection des Silènes par les sporidies conjuguées</u> ...	71
1) <u>Silènes cultivés en serre</u>	71
1.1. plantules de <u>Silene dioica</u>	71
1.2. plantules de <u>Silene alba</u> infectées par les racines	71
1.3. rosettes de <u>Silene alba</u> et <u>Silene dioica</u> ..	72
2) <u>Silènes cultivés en champ</u>	72
3) <u>Silènes cultivés in vitro</u>	73
3.1. les plantules de <u>Silene alba</u>	73
3.2. fragments de tiges	73
3.3. les tissus isolés de <u>Silene alba</u>	74
 CONCLUSION	 75
=====	
 CONSIDERATIONS GENERALES	 76

HISTORIQUE

I INTRODUCTION

=====

Les charbons et les caries (smut, brunt, brandpilze, carbone, galavnia, anthrakes, davlites etc...) sont des maladies des plantes provoquées par des champignons appartenant au groupe des Ustilaginales (Zambettakis, 1970). De nombreuses espèces provoquent chez les végétaux supérieurs qu'ils parasitent, des troubles du métabolisme de la différenciation cellulaire et de la croissance ; par exemple, Ustilago hypodites (Fr.) est responsable du gigantisme de la tige du brome, alors que Ustilago paraguariensis (Sp.) en s'attaquant aux entrenœuds supérieurs des tiges de Cynodon dactylon (Pers.) bloque leur développement et empêche leur floraison (Zambettakis, 1963).

Ustilago violacea (Pers.) Rouss. se rencontre à la fois en Europe, en Asie, en Afrique et en Amérique ; on peut le trouver sur plus de 100 espèces de Caryophyllacées (Viennot-Bourgin, 1949) et son action sur Silene alba (Miller) E.H.L.Krause et Silene dioica (L.) Clairv. observée dès 1888 par Giard a suscité de nombreux travaux (Wang, 1934, Baker, 1947, Novat, 1967, Evans et Wilson, 1971 etc...).

II BIOLOGIE DU CHAMPIGNON

=====

a) Cycle de développement de l'Ustilago violacea (Pers.) Rouss.

Les téliospores de l'Ustilago violacea se forment en quantité considérable dans les anthères de Silènes parasitées. Elles sont de couleur brun violacé, leur paroi est réticulée, leur forme arrondie, leur taille varie de 4 à 14 μ m de diamètre.

Le cycle de développement du champignon comporte, selon Chadefaud et coll (1963) deux phases successives, l'une et l'autre sporophytiques, séparées par une périttogamie (fig. 1). La phase primaire est engendrée par les sporidies provenant du promycelium que la téliospore émet à la germination. Ces

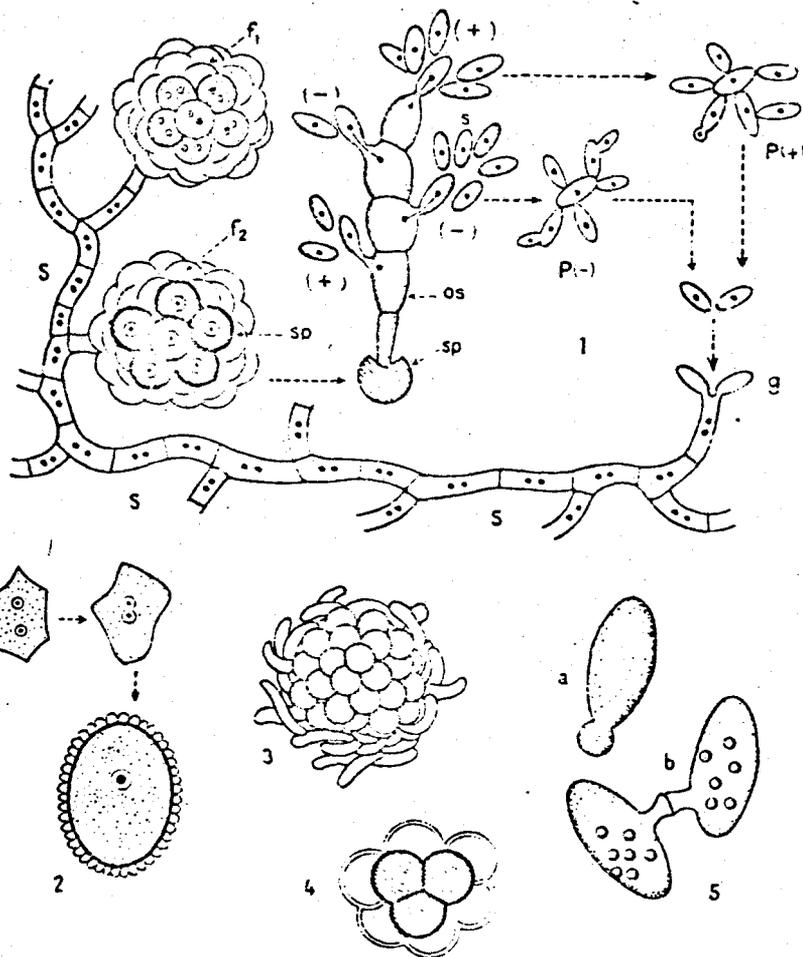


Fig. I : Cycle des Ustilaginales (selon Chadeaud et coll., 1963).

1. Le cycle des Ustilaginales : P (+) et P (-), phase primaire (= colonies de cellules levuriformes haploïdes, les unes positives, les autres négatives) ; g, copulation (= perittogamie) de deux cellules de la phase primaire, l'une (+), l'autre (-) ; S, phase secondaire (=mycélium dicaryotique, parasite) ; f₁, fruit charbonneux avec jeunes spores charbonneuses, encore à dicaryon ; f₂, fruit charbonneux plus âgé ; spores charbonneuses (sp) devenues diploïdes, par une caryogamie ; os, archéobaside convertie en un organe sporidien, producteur de sporidies (s), les unes (+), les autres (-), d'où dériveront de nouvelles colonies de cellules levuriformes. Souvent, au lieu de produire ces colonies, les sporidies se conjuguent elles-mêmes entre elles, chaque sporidie (+) avec une sporidie (-) ; - 2. Chez l'Ustilago du Salsifis (= *U. tragopogonis*), transformation d'une cellule à dicaryon en une spore charbonneuse diploïde ; - 3. Chez le Sorosporium de la Saponaire (= *S. saponariae*), jeune fruit charbonneux, formé par une masse compacte de spores charbonneuses, dans un péridium composé d'hyphes (qui ensuite se gélifient) ; - 4. Chez l'Urocystis du Seigle (= *U. occulta*), petit fruit charbonneux formé de quelques spores charbonneuses agglomérées, entourées d'un péridium composé de cellules stériles, hyalines ; - 5. Phase primaire de l'Ustilago violacee, des fleurs du *Lichnis* dioïque : a, cellule levuriforme bourgeonnant une cellule-fille (pas de lipides) ; b, copulation de deux cellules levuriformes (riches en globules lipidiques).



sporidies sont des cellules haploïdes, levuriformes, qui se multiplient par bourgeonnement ; lorsqu'elles s'unissent deux à deux pour former des cellules à dicaryon, c'est la périttogamie.

Au cours de la phase secondaire, le mycelium dicaryotique engendré par les cellules à dicaryon se développe en parasite dans les tissus de la plante hôte et produit des spores charbonneuses appelées selon les auteurs téliospores, téléutospores ou chlamydospores. Lorsque les spores sont libérées, elles germent et produisent un organe sporidien (probaside ou promycelium) producteur de sporidies et le cycle recommence.

b) Germination des téliospores

Chez les Ustilaginées, les téliospores comme les téléutospores des Urédinées se maintiennent pendant la période de vie latente sous forme binucléée, (Heim, 1971) et non uninucléée comme il a été admis par Wang (1932) et Chadeaud et coll. (1963).

Il n'a pas été établi d'une façon certaine à quel endroit (téliospore ou promycélium) s'effectue la première division du noyau, ni à quel moment s'accomplit la réduction chromatique. Diverses hypothèses ont été avancées ; selon Wang (1932) la première division du noyau ($2n$) est réductionnelle, elle a lieu au moment de la production du promycelium. L'un des deux noyaux fils passe dans ce promycélium où s'effectue la deuxième division. Les travaux de Heim (1971) révèlent qu'au moment de la germination de la spore, l'enveloppe sporale se déchire et dégénère sur place. Le contenu cellulaire, cytoplasme et noyau, s'étale en un promycelium et c'est dans cette masse, autour de laquelle quelques résidus de membranes en dégénérescence sont encore visibles, qu'ont lieu les divisions nucléaires.

Si les auteurs ne sont pas d'accord sur l'état caryologique de la téliospore ni sur les différents moments et lieux des divisions nucléaires au cours de la germination, ils sont unanimes pour admettre que théoriquement la spore germe en un tube (le promycelium) qui se partage en trois ou quatre cellules émettant chacune une ou plusieurs sporidies hyalines uninucléées.

Hassan et MacDonald ont montré en 1971 que les téliospores d'Ustilago violacea peuvent germer dans des anthères encore fermées : lorsqu'on les met en suspension dans l'eau distillée à 18°C la germination commence après 4 heures 15 minutes. Les promyceliums qui en résultent comprennent

deux à trois cellules, rarement quatre ; ces dernières émettent des sporidies qui se multiplient végétativement toutes les 45 minutes (Poon et Day, 1974).

Le pourcentage de germination des téliospores n'est pas affecté par la teneur du milieu en glucose ou en maltose (entre 0 et 5 %) ni par la lumière. Par contre, il varie en fonction du pH (optimum 6,6) et en fonction de l'âge des téliospores (40 à 50 % de germination après deux ans de conservation) (Hassan et MacDonald, 1971). Selon ces auteurs, la meilleure germination s'obtient dans l'eau stérile, alors que pour l'Ustilago striiformis certaines substances telles que le benomyl favorisent la germination et la croissance (Robinson et Hodges, 1973).

c) Formation des dicaryons

Les sporidies haploïdes émises par les cellules promycéliennes sont de signe (+) et (-); elles se conjuguent entre elles pour devenir des dicaryons (Viennot-Bourgin, 1964). Cette conjugaison peut aussi se produire entre les sporidies secondaires issues de la multiplication végétative des primaires. On peut aussi observer des conjugaisons entre une sporidie et une cellule promycélienne, entre deux articles d'un même promycélium, ou entre deux promycéliums différents (Poon, Martin et Day, 1974). La conjugaison peut débuter après 2 heures 30 minutes mais à 20 ou 22°C 40 % seulement des cellules fusionnent après 6 heures de contact. Une étude approfondie du phénomène montre qu'il se réalise en cinq phases :

- appariement des cellules de types opposés,
- développement d'ampoules copulatrices sur chacune des cellules en leur point de contact,
- élongation de ces ampoules copulatrices,
- dissolution des parois et membranes plasmiques au point de contact et formation d'un tube,
- élongation du tube de conjugaison.

d) Mycelium dicaryotique

Si l'Ustilago violacea peut être cultivé en milieu synthétique sous sa forme asexuée, le mycelium dicaryotique qui provient de la conjugaison des sporidies (+) et (-) ne peut pas se développer en dehors de la plante hôte, c'est donc un parasite strict (Baker, 1948; Clement et coll., 1969; Hassan et MacDonald, 1971).

Dans l'eau gélosée 1.10^{-5} sporidies conjuguées peuvent émettre 48 heures après la fusion, une courte hyphe mycélienne qui dégénère en produisant des sporidies quatre jours plus tard (Day et Jones, 1968). L'examen microscopique de différents organes d'une plante parasitée révèle que le mycélium dicaryotique est présent dans les anthères, abondant dans les espaces intercellulaires à la base de l'ovaire et entre les cellules parenchymateuses adjacentes aux tissus conducteurs ; dans les tiges, le développement du mycélium est plus important au niveau des noeuds que dans les entrenoeuds (Hassan et MacDonald, 1971) ; il serait également présent dans les racines, où Baker (1947) pense qu'il peut subsister pendant plusieurs années et être à l'origine de nouvelles fleurs parasitées tous les ans.

III BIOLOGIE DE SILENE ALBA (Miller) E.H.L.Krause ET SILENE DIOICA (L.) C1 =====

Silene alba et Silene dioica sont deux espèces dioïques appartenant à la famille des Caryophyllacées. Ce sont les hôtes habituels de l'Ustilago violacea ; Linne les avait décrites comme espèce commune Lychnis dioica (L.) avec les deux sous-espèces, celle à fleurs rouges et celle à fleurs blanches (Flore de France : Bonnier, 1948).

Ces espèces ont été séparées du genre Lychnis parce que le nombre de dents des capsules est double de celui des styles (Flore de Belgique, du G.D. du Luxembourg etc..., 1973).

Contrairement à la plupart des Silènes dont les capsules présentent des cloisons plus ou moins importantes à la base, les deux espèces qui nous intéressent n'en présentent pas ; ceci a permis à certains auteurs de les ranger dans le genre Melandrium (Flora Europaea, 1964). Selon cette flore, Silene alba (Miller) E.H.L. Krause ou Melandrium album (Miller) Garcke est une plante dioïque, vivace et parfois annuelle ; elle peut avoir 80 cm de hauteur avec de nombreuses ramifications. Les tiges sont garnies de poils mous et glanduleux. Les feuilles sont ovales et pointues aux extrémités, les caulinaires sont sessiles. L'inflorescence est une cyme lâche avec de grandes fleurs légèrement parfumées, s'ouvrant le soir. Le calice des

fleurs mâles mesure 15 à 22 mm et porte 10 nervures, celui des fleurs femelles plus ou moins gonflé, mesure 20 à 30 mm et porte 20 nervures.

Les pétales sont généralement blancs, les styles sont au nombre de cinq et la capsule (10 à 15 mm) de forme ovale s'ouvre par dix dents. C'est une plante qu'on retrouve dans toute l'Europe, de préférence dans les champs cultivés.

Silene dioica (L.) Clairv. ou Melandrium dioicum (L.) Cosson et Germ.
ou Melandrium rubrum (Weigel) Garcke, ou Melandrium sylvestre (Schkuhr) Röhl.

Cette plante est semblable à Silene alba, mais elle est surtout vivace. Les tiges sont peu glanduleuses, les feuilles largement ovales, les fleurs rouges s'ouvrent le jour. Le calice mesure 10 à 15 mm, les dents sont largement triangulaires et la capsule (10 à 15 mm) globuleuse et ovoïde s'ouvre par des dents recourbées. Elle vit dans les sous-bois et on la retrouve dans la plupart des pays européens.

IV MODE D'INFECTION PAR LES USTILAGO

=====

Viennot-Bourgin (1954) pensait que la dissémination du champignon pouvait se faire par le vent, la pluie et les insectes. D'autres recherches ont été entreprises pour tenter de déterminer comment le parasite s'introduit dans la plante hôte.

a) Infection par les graines

Dès 1883, Brefeld suggérait que les graines pouvaient être l'un des moyens de transmission de l'Ustilago violacea. Cette hypothèse a été discutée par Baker (1948) et Giuliano (1964) ; toutefois, les expériences de Hassan et MacDonald (1971) montrent que ce moyen de contamination est peu probable dans la nature. Cependant, Wanderwalle (1935) en injectant artificiellement du mycelium charbonneux d'Ustilago nuda dans les embryons de graines d'orge a obtenu des plantes parasitées ; de même, Veenenbos et Brandsma (1957) en éprouvant l'activité de divers fongicides ont observé 14 % d'infection après avoir enrobé de spores des semences humides.

b) Infection par les plantules

Certains chercheurs ont montré que l'épiderme fragile des plantules pouvait être une voie de pénétration du parasite. Par exemple, Wanderwalle et Sommereyns (1965) en trempant des coléoptiles d'orge sectionnés dans une suspension aqueuse de spores d'Ustilago nuda obtiennent 50 % de plantes charbonnées. De même, Day et Jones (1968) en injectant à la seringue une suspension concentrée de sporidies diploïdes d'Ustilago violacea, à l'aisselle de jeunes feuilles de plantules de Silene alba obtiennent 80 % à 100 % de plantes parasitées. Enfin, Hassan et MacDonald (1971) ont réalisé des infections sur des plantules de Silene dioïca (25 mm) en les trempant dans une suspension de téliosporos d'Ustilago violacea ; après 6 heures de contact avec les spores, chaque plantule est transplantée dans un petit pot contenant du sol indemne de contamination : 10 mois plus tard, toutes fleurissent et 30 plantules sur 35 sont infectées.

c) Infection par les fleurs

Nielsen (1968) a obtenu des épis charbonneux d'orge après inoculation à la seringue, dans les fleurs, de mycélium dicaryotique d'Ustilago nuda isolé sur milieu synthétique.

MacDonald et Hassan (1971) après avoir inoculé une suspension de chlamydo-spores d'Ustilago violacea dans les fleurs de Silene alba maintiennent les plantes en fleurs toute l'année en les plaçant en serre à 18°C et en les éclairant 18 heures par jour. Dans ces conditions, six pieds mâles sur huit et un pied femelle sur huit présentent dix mois plus tard les symptômes caractéristiques de l'infection.

d) Infection par les bourgeons

Radulescu et Munteanu (1967) montrent que l'injection d'une suspension de spores d'Ustilago maydis dans de jeunes bourgeons du maïs permet d'infecter les plantes à n'importe quelle étape de leur développement. D'ailleurs, les travaux de Becerescu (1973) sur de nombreuses espèces d'Ustilago (Ustilago nuda, Ustilago tritici, Ustilago nigra, Ustilago hordei) montrent que la pénétration des parasites peut se faire par les bourgeons, les plantules ou les fleurs, mais qu'il n'est pas possible, par les méthodes classiques, de préciser si la pénétration des champignons se fait préférentiellement par un organe ou un autre.

En ce qui concerne l'Ustilago violacea, certains auteurs pensent que l'infection aurait lieu par la région apicale de la plante hôte, puis le mycélium passerait directement dans les organes floraux : le cycle de développement du champignon s'effectuant entre le pédoncule floral et les anthères (Giuliano, 1964). Cette hypothèse, déjà formulée par Vuillemin en 1891, est reprise par Hassan et MacDonald (1971) ; en effet, en injectant une suspension concentrée de spores dans des bourgeons de Silene alba cultivé en serre, ces auteurs ont constaté que huit mois plus tard, six pieds mâles sur huit et un pied femelle sur huit présentaient les symptômes caractéristiques des plantes parasitées.

Des tentatives d'infection artificielle par les feuilles ou les tiges n'ont donné aucun résultat positif, le mycélium dicaryotique semblant incapable de pénétrer dans les tissus adultes de Silene alba (Blaringhem, 1923).

Ainsi, les organes les plus favorables à la pénétration du parasite sont les bourgeons, les fleurs, les plantules et éventuellement les graines. Il est possible d'infecter artificiellement une plante par injection de chlamydo-spores.

V MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES PROVOQUEES PAR LE CHAMPIGNON

=====

Il est très rare qu'après une infection parasitaire la plante se développe normalement ; le plus souvent on assiste à des troubles du métabolisme qui peuvent se traduire par des modifications morphologiques. L'Ustilago kolleri (W.) qui parasite Avena sativa (L.) détruit la partie interne de la base des épillets (Zambettakis, 1970), l'Ustilago hordei (Pers.) K.S. responsable du charbon de l'orge, hypertrophie les épillets avant que les épis parasités se distinguent par leur teinte noirâtre (Wang, 1934).

L'action de l'Ustilago violacea sur Silene alba et Silene dioica varie selon qu'il s'attaque aux pieds mâles ou femelles. Sur les pieds mâles, le champignon apparaît dans les anthères qui prennent l'aspect charbonneux bien avant l'éclosion des boutons floraux (Baker, 1948; Mani, 1964): les anthères se transforment en vésicules de teinte violacée, bourrées de spores qui occupent la place de grains de pollen. Dans certains cas, les plantes parasitées sont aussi atteintes de nanisme (BAKER, 1948; EVANS et coll., 1971), mais les symptômes de l'infection ne sont vraiment

caractéristiques qu'au moment où les anthères éclatent et libèrent les spores (fig. II₃ et 4).

Les pieds femelles parasités sont stériles, les ovaires se développent anormalement, leur taille est réduite ; ils sont de forme allongée et portés par un pédoncule qui reste grêle. En même temps, les fleurs femelles différencient des étamines, ce qui leur donne l'aspect de fleurs hermaphrodites (Baker, 1947). Ces étamines sont bourrées de spores charbonneuses et il semblerait qu'elles soient les seuls organes dans lesquels le champignon soit capable de développer ses organes reproducteurs (fig. II₁ et 2).

VI FACTEURS HORMONAUX

=====

Différents auteurs ont étudié l'action de certaines hormones sur le développement de Silene alba. D'autres ont analysé les facteurs de croissance secrétés par l'Ustilago violacea.

a) Action des hormones sexuelles animales

Love et Love (1945) ont étudié l'action de l'oestrogène et de la testostérone sur le développement des plantes dioïques, en particulier Silene alba. S'ils appliquent sur les bourgeons de la lanoline contenant de faibles doses (0,0005 à 0,1 %) de ces hormones, 60 % des plantes meurent ; parmi les plantes qui survivent, le nombre qui présente des déformations varie selon la concentration et la nature de l'hormone. L'oestrogène, hormone femelle, n'affecte pas les pieds femelles du Silene alba quelle que soit sa concentration ; par contre, la testostérone à la dose de 0,01 % les rend hermaphrodites.

Inversement, les pieds mâles traités à l'oestrogène produisent un ovaire alors que la testostérone ne les affecte pas.

Malgré ces anomalies, il n'y a pas formation de grains de pollen dans les anthères et les ovaires restent stériles ; cela permet cependant de constater qu'un traitement chimique peut modifier le sexe des plantes dioïques.

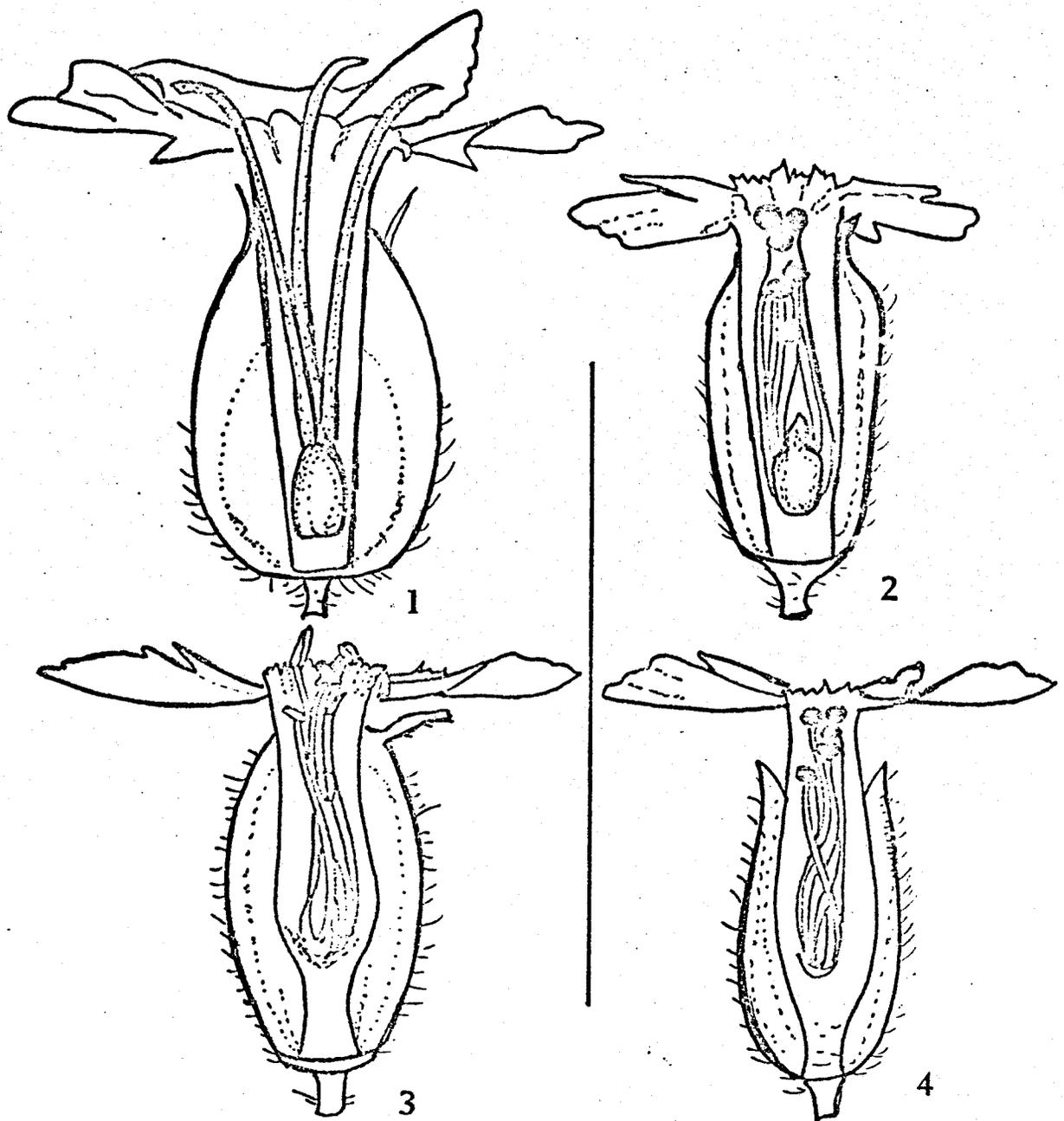


Figure II : Fleurs de *Silènes* et modifications morphologiques provoquées par l'*Ustilago violacea*.

1. fleur femelle saine
2. fleur femelle parasitée
3. fleur mâle saine
4. fleur mâle parasitée

b) Production d'A I A (acide indolyl-acétique), d'I A N (indol-acéto-nitrile et d'A G (acide gibberellique)

L'analyse d'extrait alcoolique de Silene alba a permis de mettre en évidence la présence d'A I A et d'A G dans les plantes saines ou infectées ; mais il y a plus d'A G dans les plantes saines, ce qui expliquerait peut-être le nanisme observé par Evans et Wilson (1971). Ces auteurs n'ont retrouvé ni d'A G ni d'A I A dans le milieu de culture des téliosporos de l'Ustilago violacea, mais ils constatent la présence d'I A N. Toutefois, l'application exogène de ce nitrile à une plante saine ne provoque chez elle aucun trouble.

Les travaux de Hirata (1957) et de Novat (1967) ont montré que l'Ustilago violacea synthétise de l'A I A, mais rien ne prouve que cette substance soit responsable des modifications observées sur les plantes parasitées. De même, les extraits aqueux de stigmates de Silene alba possèdent une activité auxine-oxydasique ; chez les plantes saines, les sépales des fleurs mâles contiennent beaucoup plus d'anthocyane que les sépales des fleurs femelles mais, après infection, le taux de ce pigment est presque semblable dans les fleurs des deux sexes (Gary et Sagi, 1960).

VII CONCLUSION
=====

L'action parasitaire de l'Ustilago violacea sur les silènes a retenu l'attention de nombreux phytopathologistes ; en recherchant des explications au phénomène de castration parasitaire, ils ont fourni de précieuses indications sur la biologie de Silene alba et Silene dioïca et sur celle de l'Ustilago violacea.

Malgré les résultats obtenus, les relations hôte-parasite restent encore bien imprécises et l'on ignore toujours pourquoi l'Ustilago violacea ne développe ses organes reproducteurs que dans les anthères, ou pourquoi la présence du champignon provoque la différenciation d'anthères dans les fleurs femelles. Certes, des études génétiques ont montré que ces modifications florales peuvent apparaître spontanément à un taux très faible sur des plantes saines, ce qui a fait penser à Hassan et MacDonald (1971) qu'il s'agirait d'un caractère chromosomique apparu à la suite d'une infection,

caractère récessif qui ne s'exprimerait qu'après plusieurs générations.

Il s'agit donc d'un problème complexe dont l'étude est difficile, d'autant plus que la période de végétation des Silènes est relativement courte. De plus, dans les conditions naturelles, de nombreux facteurs échappent au contrôle des chercheurs : nous avons pensé que les techniques de culture "in vitro" nous permettraient d'étudier ces phénomènes dans des conditions plus rigoureuses.

CULTURE IN VITRO DE L'USTILAGO VIOLACEA

Pour étudier les relations "hôte-parasite" dans des conditions d'asepsie rigoureuse, il nous a fallu d'abord étudier in vitro le développement de la phase haploïde saprophytique du cycle du champignon et obtenir des inoculums à pouvoir pathogène suffisant pour réaliser des infections expérimentales.

Hassan et MacDonald (1971) ont montré que les téliospores de l'Ustilago violacea germent mieux dans l'eau distillée que dans une solution glucosée (5 %) ou dans l'extrait de malt ; toutefois, pour réaliser nos expériences, il était intéressant de disposer à tout moment d'un inoculum capable d'infecter une plante saine. L'eau distillée par suite de phénomènes de carence ne permet pas la culture indéfinie du champignon. Il a donc fallu rechercher un milieu plus riche susceptible d'entretenir le champignon sans provoquer de mutation ni altérer son pouvoir pathogène pour Silene alba. Nous avons comparé l'effet de milieux utilisés habituellement, soit pour la culture des champignons (Sabouraud), soit pour celle des cellules ou des tissus végétaux (Lescure, 1966) et Murashige et Skoog (1962).

MILIEU DE SABOURAUD

Peptone	30 g.l ⁻¹
Glucose	30 g.l ⁻¹

MILIEU DE LESCURE (1966)

COMPOSITION DU MILIEU		CONCENTRATION (g.l ⁻¹)
Nitrate de calcium	Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	290. 10 ⁻³
Chlorure de potassium	KCl	65. 10 ⁻³
Nitrate de potassium	KNO ₃	1960. 10 ⁻³
Sulfate de magnésium	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	360. 10 ⁻³
Phosphate monopotassique	KPO ₄ H ₂	500. 10 ⁻³
Phosphate dissodique	Na ₂ PO ₄ H 12 H ₂ O	97. 10 ⁻³
Acide borique	H ₃ BO ₃	1,5. 10 ⁻³
Iodure de potassium	KI	0,75. 10 ⁻³
Sulfate de manganèse	MnSO ₄ · 4 H ₂ O	4,5. 10 ⁻³
Sulfate de zinc	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1,5. 10 ⁻³
Sulfate de fer	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,785. 10 ⁻³
	Na ₂ EDTA	3,725. 10 ⁻³
Thiamine	Vitamine B ₁	1. 10 ⁻³
Acide 2,4 dichloro-phénoxyacétique (2,4 D)		1. 10 ⁻³
Saccharose		20

MILIEU DE MURASHIGE ET SKOOG (1962) MODIFIE

COMPOSITION DU MILIEU	CONCENTRATION (g.l ⁻¹)
ELEMENTS MINERAUX	
NH ₄ NO ₃	1650. 10 ⁻³
K NO ₃	1900. 10 ⁻³
CaCl, 2 H ₂ O	440. 10 ⁻³
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	370. 10 ⁻³
K H ₂ PO ₄	170. 10 ⁻³
Na ₂ EDTA	37. 10 ⁻³
Fe SO ₄ , 7 H ₂ O	27. 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	6. 10 ⁻³
MnSO ₄ 4 H ₂ O	22. 10 ⁻³
ZnSO ₄ , 4 H ₂ O	8. 10 ⁻³
KI	0,83.10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,25.10 ⁻³
Ca SO ₄ , 5 H ₂ O	0,025.10 ⁻³
CaCl ₂ , 6 H ₂ O	0,025.10 ⁻³
ELEMENTS ORGANIQUES	
Inositol	0,1
Edamine(caséine traitée par la trypsine)	1
Glycocolle	2. 10 ⁻³
2,4 D	0,1. 10 ⁻³
Kinétine	0,1. 10 ⁻³
Acide nicotinique	0,5. 10 ⁻³
Pyridoxine HCl	0,5. 10 ⁻³
Thiamine	0,5. 10 ⁻³
Glucose	30



I ETUDE DE LA GERMINATION DES TELIOSPORES

a) Matériel et Méthodes

Les téliospores proviennent d'anthères de fleurs parasitées de Silene dioïca récoltées dans un bois aux environs de Lille et conservées pendant 6 mois dans des boîtes de Pétri à la température du laboratoire (20-22°C).

Tous les milieux de culture sont liquides et contiennent 3 % de glucose et les éléments nutritifs de la solution de Murashige et Skoog, de Sabouraud ou de Lescure; une culture sur eau distillée servant de témoin. Environ 1 ml de milieu est mis dans une microcuvette de 3 ml, placée dans une boîte de Pétri.

Les téliospores d'un même bouton floral sont réparties à l'aide d'une pince fine dans trois microcuvettes. Les cultures sont maintenues dans une pièce à $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

Le taux de germination est évalué au microscope. Après homogénéisation, 1 goutte de culture prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur est mélangée à une goutte de bleu lactique pour être observée entre lame et lamelle.

b) Résultats expérimentaux

Le taux de germination des téliospores ainsi que le pourcentage de sporidies capables de se conjuguer ont été évalués après 12 heures de culture (tableau 1) et après 5 jours (tableau 2).

MILIEU DE CULTURE	GERMINATION	CONJUGAISON
Eau	40 %	23 %
Murashige et Skoog	37 %	25 %
Sabouraud	14 %	34 %
Lescure	39 %	26 %

Tableau 1 : Pourcentage de germination des télisporos et de conjugaison des sporidies compatibles après 12 heures de culture.

MILIEU DE CULTURE	GERMINATION	CONJUGAISON
Eau	66 %	15 %
Murashige et Skoog	45 %	10 %
Sabouraud	54 %	9 %
Lescure	56 %	13 %

BUS
LILLE

Tableau 2 : Pourcentage de germination des télisporos et de conjugaison des sporidies compatibles après 5 jours de culture.

Les téliospires en germant produisent un promycelium qui se divise le plus souvent en deux ou trois cellules sur lesquelles se forment les sporidies. Une fois libérées, celles-ci s'anastomosent deux à deux pour constituer un dicaryon (Planche I). Selon Hassan et MacDonald (1971), la germination peut s'observer dans l'eau au bout de 6 heures. Toutefois, dans nos expériences, ces téliospires ne germent qu'à partir de 12 heures, ce qui indique que la conservation (six mois au laboratoire) retarde cette germination et explique qu'après cinq jours (Tableau 2), le taux de spores en germination soit encore élevé.

Après leur formation, les promyceliums se détachent très vite et tombent au fond des microcuvettes avec les sporidies. Une même spore peut produire deux promyceliums à la fois ; les anastomoses s'effectuent non seulement entre deux sporidies, mais aussi entre sporidies et cellules promycéliennes ou même, entre deux cellules promycéliennes d'origine différente.

Lorsque la suspension de sporidies est dense, on peut observer la conjugaison entre trois sporidies différentes (Planche I) ; inversement, quand les suspensions sont pauvres, les conjugaisons ont plus de mal à se produire, parfois elles ont lieu par de longs canalicules qui unissent deux sporidies compatibles. Après cinq jours de culture, le taux de conjugaison diminue (Tableau 2), en raison peut-être de l'encombrement important de promyceliums qui gênent le déplacement des sporidies et provoquent leur asphyxie.

Les sporidies non conjuguées, comme les cellules levuroïdes, se multiplient activement par bourgeonnement ; l'eau distillée seule, quoi que permettant une bonne germination, est incapable d'assurer leur prolifération.

Dix jours plus tard, sporidies et promycéliums constituent une masse pâteuse de couleur blanchâtre sur les solutions nutritives de Murashige et Skoog et de Lescure, ou jaunâtre sur celle de Sabouraud.

De manière générale, on peut noter que la germination des téliospires d'Ustilago violacea, avec toutes les phases qu'elle comporte, est possible dans tous les milieux de culture utilisés.

II DESINFECTION DES TELIOSPORES DE L'Ustilago violacea RECOLTEES

=====

DANS LA NATURE

=====

Certes, il est possible d'obtenir la germination des télisporos récoltées dans la nature sur des plantes parasitées ; nous avons pu observer les différentes phases de la conjugaison sur les solutions nutritives. Mais ces cultures n'étaient pas réalisées dans des conditions aseptiques, les bactéries se développant en même temps que le promycélium ; il n'est donc pas possible de prolonger leur durée, ni de les utiliser pour pratiquer des infections in vitro. Nous avons alors essayé d'obtenir des télisporos aseptiques, soit en désinfectant les boutons floraux, soit en désinfectant directement les télisporos.

a) Traitement des boutons floraux

Les jeunes boutons floraux, encore parfaitement fermés et provenant des plantes parasitées, contiennent déjà les télisporos du champignon. Nous espérons pouvoir les obtenir dans des conditions aseptiques, après les avoir désinfectés extérieurement en les trempant successivement dans une solution de mercryl à 3 % (15 mn), puis dans une solution d'hypochlorite de calcium à 120 g/l (20 mn). Ils sont ensuite rincés trois fois à l'eau stérile (5, 10, 15 minutes) et nous avons prélevé les télisporos qui sont mises à germer dans une goutte d'eau distillée autoclavée. Le contenu d'un même bouton est réparti sur dix lames différentes. 24 heures plus tard, l'observation microscopique permet de constater que les spores germent, mais que des bactéries subsistent dans la suspension.

b) Désinfection des télisporos

Nous avons alors pensé pouvoir obtenir des télisporos aseptiques en les traitant par un antibiotique, dans la mesure où cette substance élimine les bactéries sans empêcher la germination des spores. Nous avons donc comparé l'action de différents antibiotiques, afin de déterminer celui qui se révélerait le plus efficace.

1) action de la streptomycine

streptomycine g.l ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
germination	50 %	80 %	80 %	80 %
bactéries	+++	+++	+++	+++

Tableau 3 : Influence de la streptomycine sur la germination des télisporos de l'Ustilago violacea

+++ : présence de bactéries.

La streptomycine (Tableau 3) n'inhibe pratiquement pas la germination des télisporos mais, dans nos conditions expérimentales, elle laisse subsister les bactéries. Le chloramphénicol, la terramycine et la polymyxine également utilisés à la dose de 10⁻⁴ réduisent considérablement la germination. On assiste souvent à l'éclatement de télisporos et les germes bactériens subsistent, sauf en présence de polymyxine (Batcho, 1973). Nous avons donc tenté de réduire la dose de ce dernier composé, afin d'améliorer le taux de germination (Tableau 4).

2) action de la polymyxine

polymyxine g.l ⁻¹	5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
germination	1 %	1 %	30 %
bactéries	0	0	+++

Tableau 4 : Influence de la polymyxine sur la germination des télisporos de l'Ustilago violacea

Des concentrations de l'ordre de 10^{-5}g.l^{-1} sont encore efficaces mais le taux de germination est extrêmement faible ; il ne s'améliore qu'en présence d'une solution plus diluée (10^{-6}) qui alors, n'est plus efficace pour éliminer les bactéries. La prolifération de ces bactéries est rapide (7 ou 8 heures), alors que la germination des spores du champignon est plus lente et nécessite une dizaine d'heures. Nous avons donc réduit le temps de contact des spores avec une solution de polymyxine à 10^{-5} (Tableau 5) en espérant que les bactéries seraient réduites en temps limité, et qu'en remplaçant, après rinçage, les spores dans l'eau distillée, elles pourraient germer convenablement en condition aseptique.

Temps d'exposition en heures	7	10	20
germination	80 %	2 %	2 %
bactéries	+++	0	0

Tableau 5 : Germination des télisporos exposées à temps variable dans la solution de polymyxine, après 12 heures de culture.

En 7 heures, la polymyxine 10^{-5}g.l^{-1} n'élimine pas les bactéries ; après 10 heures, son pouvoir bactéricide est efficace mais le taux de germination des télisporos est considérablement réduit. Ces différentes méthodes étant peu satisfaisantes pour stériliser les spores récoltées dans la nature, nous avons alors utilisé un mélange dihydrostreptomycine-bipénicilline 1 g/1 M dont le spectre d'activité antibactérienne est assez large (Tableau 6).

antibiotique g/ml	0	10^{-3}	2.10^{-3}	5.10^{-3}	10^{-2}	2.10^{-2}	5.10^{-2}
taux de germination	80 %	30 %	30 %	32 %	35 %	25 %	0 %
bactéries	+++	0	0	0	0	0	0

Tableau 6 : Action du mélange dihydrostreptomycine - bipénicilline sur la germination des téliospores de l'Ustilago violacea après 12 heures de culture.

La dihydrostreptomycine-bipénicilline se révèle efficace dans nos conditions expérimentales (10^{-3}) mais le taux de germination est réduit (Tableau 6). De plus, à ces concentrations, les conjugaisons sont rares et anormales.

Pour tenter d'éviter ces anomalies morphologiques, nous avons prélevé des suspensions de téliospores mises à germer en l'absence d'antibiotiques ; nous les avons réparties à raison de 1 ml par microcuvette en présence de concentrations d'antibiotiques comprises entre 10^{-1} et 10^{-3} .

Dans ces conditions, les bactéries sont détruites après un traitement de 12 heures et les sporidies ne présentent pas de modifications morphologiques ; mais, des champignons autres que l'Ustilago violacea se développent dans les cultures.

Cette méthode n'est donc pas plus satisfaisante que les précédentes ; si le mélange dihydrostreptomycine-bipénicilline a un pouvoir bactéricide certain, il est à fortes concentrations défavorable à la germination des spores et à faible concentration, ne permet pas une culture rigoureusement axénique.

III ETUDE DE LA SOUCHE LEVURIFORME DE BAARN EN VUE D'UNE CULTURE

ASSOCIEE "TISSU-PARASITE"

Compte tenu de ces difficultés, nous avons fait appel à la mycothèque de Baarn (Hollande) qui nous a fourni une souche axénique haploïde d'Ustilago violacea n° 438.34. Il s'agit d'une souche levuroïde obtenue par multiplication asexuée des sporidies. A côté d'éléments isolés, arrondis ou ovales, on trouve de très nombreux éléments plus ou moins allongés, restant souvent attachés les uns aux autres. La souche s'entretient facilement par repiquages tous les deux mois environ, sur le milieu de Sabouraud. Cependant, afin de déterminer le milieu favorable à la fois au champignon et aux colonies tissulaires de Silene alba, la souche de Baarn est cultivée sur le milieu de Heller (1953), de Murashige et Skoog (1962), de Czapek (1921), de Sabouraud et de Lescure (1966).

MILIEU DE HELLER (1953)

COMPOSITION DU MILIEU	CONCENTRATION (g.l ⁻¹)
KCl	750. 10 ⁻³
NaNO ₃	600. 10 ⁻³
SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	250. 10 ⁻³
PO ₄ H ₂ Na, H ₂ O	125. 10 ⁻³
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	75. 10 ⁻³
FeCl ₃ , 6 H ₂ O	1. 10 ⁻³
SO ₄ Zn, 7 H ₂ O	1. 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	1. 10 ⁻³
SO ₄ Mn, 4 H ₂ O	0,1. 10 ⁻³
SO ₄ Cu, 5 H ₂ O	0,03. 10 ⁻³
AlCl ₃	0,03. 10 ⁻³
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	0,03. 10 ⁻³
KI	0,01. 10 ⁻³
Glucose	30

MILIEU DE CZAPECK (1921)

COMPOSITION DU MILIEU	CONCENTRATION (g.l ⁻¹)
ELEMENTS MINERAUX	
Na NO ₃	2
K ₂ PO ₄ H	1
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,001
ELEMENTS ORGANIQUES	
Glucose	30

La colonie levuroïde est mise en suspension dans environ 10 ml d'eau distillée ; après homogénéisation, on repique une partie aliquote de cette suspension dans le milieu liquide ou gélosé. Pour la culture en milieu liquide, on introduit à la pipette 0,1 ml de la suspension dans une fiole de Roux de 1 litre renfermant 100 ml de solution nutritive, ou dans une fiole de Fourneau de 125 ml qui en renferme 50 ml.

Pour les cultures en milieu gélosé réalisées en boîtes de Pétri, deux méthodes ont été utilisées :

la première consiste à déposer quatre gouttes de 0,1 ml chacune à la surface du milieu,

la deuxième consiste à tremper dans la suspension de champignon, un anneau de fil de fer de 50 mm de diamètre, préalablement stérilisé à l'alcool, puis séché dans la flamme ; après avoir égoutté cet anneau, on l'applique contre la surface du milieu de culture. On laisse les boîtes pendant quelques heures en position normale, afin de favoriser l'adhérence du champignon sur la gélose. Les boîtes de Pétri sont ensuite scellées à

l'aide d'un ruban adhésif, puis on les retourne de façon à éviter la retombée de l'eau de condensation sur le milieu.

Les cultures sont alors placées dans une pièce dont la température est réglée à $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ éclairée par la lumière du jour et un éclairage d'appoint fourni 12 heures sur 24 par des tubes luminescents (1500 Lux).

La croissance du champignon sur milieu gélosé est évaluée approximativement, compte tenu de la surface et de l'épaisseur des colonies ; après culture en milieu liquide, on recueille le champignon sur un papier filtre puis on détermine le poids frais et le poids sec après séchage à 100°C .

IV RESULTATS EXPERIMENTAUX

=====

La croissance du tissu de Silene alba n'est possible que sur certains milieux nutritifs, elle nécessite obligatoirement une forte concentration de 2,4 D (acide dichlorophénoxyacétique) ou d'A N A (acide naphtyl-acétique). La solution de Sabouraud, milieu d'entretien habituel du champignon, convient mal aux colonies tissulaires du Silene alba, même lorsqu'on ajoute 10^{-7}g.l^{-1} de 2,4 D et de kinétine (Dubois et Bouriquet, 1974).

a) Croissance de l'*Ustilago violacea* sur différents milieux nutritifs liquides ou solides -

Le champignon a été ensemencé soit en milieu gélosé, soit en milieu liquide relativement bien aéré (fiolle de Roux) ou peu aéré (fiolle de Fourneau).

Après trois semaines de culture, la croissance du champignon a été évaluée ; les résultats sont réunis dans le Tableau 7 et illustrés par la planche III.

SOLUTION NUTRITIVE	MILIEU GELOSE	M I L I E U L I Q U I D E			
		AERE		PEU AERE	
		PF	PS	PF	PS
Sabouraud	+++	596,8	91	91,6	19
Murashige et Skoog (éléments minéraux et organiques, 2,4 D + kinétine)	+ +	491	87	84,6	13
Murashige et Skoog (éléments minéraux et organiques)	+++	524	87	84,6	13
Murashige et Skoog (éléments minéraux)	0	188,4	5	35,8	2
Czapeck	0	123,6	4	17,8	1
Heller	0	114,4	2	26	1

Tableau 7 : Croissance de l'Ustilago violacea sur un milieu solide ou liquide plus ou moins aéré.

En milieu liquide, elle est exprimée en mg de matière fraîche (PF) ou de matière sèche (PS).

En milieu solide, elle est évaluée arbitrairement :

0 : croissance nulle + + : croissance moyenne +++ : bonne croissance

Les milieux solides et liquides bien aérés sont beaucoup plus favorables que les milieux liquides peu aérés (fiolle de Fourneau).

Les milieux exclusivement minéraux (Heller, Czapeck, et solution minérale de Murashige et Skoog) ne permettent pas la croissance du champignon.

Le milieu de Murashige et Skoog complet convient pratiquement aussi bien que la solution de Sabouraud utilisée habituellement pour l'entretien de cette souche, bien que la morphologie des colonies soit très différente (Planche III).

Les substances phytohormonales utilisées (2,4 D et kinétine) ne modifient pas la croissance du champignon.

Parmi les milieux utilisés, seul celui renfermant les éléments de la solution de Murashige et Skoog convient à la fois au champignon et au tissu, à condition dans ce cas, d'y ajouter du 2,4 D.

Nous nous sommes demandé si tous les éléments organiques qu'il contient étaient indispensables et si les doses utilisées étaient les plus favorables au développement du champignon.

b) Effet de différents éléments de la solution de Murashige et Skoog sur la croissance de l'*Ustilago violacea*

Le milieu de Murashige et Skoog est un milieu synthétique relativement complexe puisqu'il renferme des éléments minéraux, des éléments organiques ainsi que des facteurs hormonaux. Ces derniers ont été retirés pour cette expérience puisque, comme nous venons de le voir, ils interviennent peu sur la croissance du champignon. En outre, différentes substances ou groupes de substances ont été soustraits au milieu complet.

Ces essais ont été réalisés sur milieu gélosé. Dans chaque cas, dix boîtes de Pétri ont étéensemencées : cinq par la "technique des taches" et cinq par celle de "l'anneau métallique". Après 15 jours de culture, les observations effectuées sont résumées dans le Tableau 8 et Planche III.

Les vitamines, autres que la vitamine B₁, c'est-à-dire l'acide nicotinique, la pyridoxine et l'inositol ne sont pas indispensables.

Les acides aminés de l'édamine (hydrolysate de caséine) ne sont pas indispensables au cours d'un premier repiquage ; ils favorisent cependant la croissance au cours des repiquages successifs que nécessite l'entretien de la souche.

La vitamine B₁ est absolument indispensable, ce qui confirme les résultats obtenus par Schopfer et Blumer (1938) qui ont étudié les facteurs de croissance des espèces du genre Ustilago.

N°	MILIEU DE CULTURE	CROISSANCE DU CHAMPIGNON
1	Murashige et Skoog complet	+++
2	Murashige et Skoog moins : . acide nicotinique . pyridoxine . inositol	+++
3	Murashige et Skoog moins : . édamine	++
4	Murashige et Skoog moins : . édamine . acide nicotinique . pyridoxine . inositol	++
5	Murashige et Skoog moins : . édamine . vitamine B ₁	0
6	Murashige et Skoog moins : . acide nicotinique . pyridoxine . inositol . vitamine B ₁	0
7	Murashige et Skoog moins : . vitamine B ₁	0

Tableau 8 : Action de différents milieux de culture sur la croissance de l'Ustilago violacea en milieu gélosé.



Importance de la teneur en glucose

Cette étude a été réalisée sur milieu gélosé renfermant tous les éléments de la solution nutritive de Murashige et Skoog excepté les facteurs phytohormonaux. L'examen des boîtes de Pétri a été effectué 25 jours après l'ensemencement. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 9 et la planche III.

TENEUR EN GLUCOSE (g.l^{-1})	CROISSANCE DU CHAMPIGNON
0	0
5	+
10	++
20	+++
40	+++
60	+++
100	+++

Tableau 9 : Effet de la teneur en glucose sur la croissance de l'Ustilago violacea cultivé sur milieu de Murashige et Skoog gélosé.

En l'absence de glucose, le champignon ne se développe pas.

Une concentration faible (5 ou 10 g.l^{-1}) ne permet qu'une faible croissance.

Pour toute concentration supérieure ou égale à 20 g.l^{-1} , la croissance du champignon est rapide ; mais cette technique ne permet pas de déterminer la concentration optimale.

L'absence d'inhibition pour une concentration aussi élevée que 100 g.l^{-1} est à souligner. Nous utiliserons pour les cultures ultérieures 30 g de glucose par litre, concentration employée aussi pour cultiver les tissus de Silene alba.

Importance de la vitamine B₁

Différentes doses de la vitamine B₁ (sous forme de chlorhydrate de thiamine) sont ajoutées à la solution nutritive gélosée renfermant les éléments minéraux et organiques du milieu de Murashige et Skoog (à l'exception des facteurs phytohormonaux). Les observations faites après 25 jours de culture sont illustrées par le Tableau 10 et la Planche IV.

VITAMINE B ₁ EN g.l ⁻¹	CROISSANCE DU CHAMPIGNON
0	0
1.10 ⁻¹⁰	+
1.10 ⁻⁸	++
1.10 ⁻⁷	+++
1.10 ⁻⁶	+++
1.10 ⁻⁵	+++
1.10 ⁻⁴	+++
1.10 ⁻³	+++

Tableau 10 : Action de la thiamine sur la croissance de l'Ustilago violacea

La vitamine B₁ est indispensable au développement du champignon, puisque son absence empêche toute prolifération. Elle agit cependant à très faible dose.

Une concentration de l'ordre de 10⁻⁷ g.l⁻¹ de vitamine B₁ est tout-à-fait suffisante pour assurer la croissance ; néanmoins nous continuons d'utiliser 10⁻⁶ g.l⁻¹ qui est la dose normale contenue dans le milieu de Murashige et Skoog.

Comme pour le glucose, on constate que les fortes concentrations, qui sont très toxiques pour les tissus isolés de Phanérogames, ne présentent pas de toxicité pour le champignon.

On comprend donc pourquoi la solution minérale de Heller dépourvue de vitamine B₁ ne pouvait pas convenir au développement du champignon.

L'apport de 10^{-6}g.l^{-1} de vitamine B₁ à la solution minérale de Heller permet le développement du champignon, il est cependant inférieur à celui obtenu sur le milieu de Murashige et Skoog. On remarquera par ailleurs que les substances phytohormonales n'améliorent pas la croissance du champignon (Tableau 11, Planche IV).

N°	MILIEU DE CULTURE	CROISSANCE
1	Heller	0
2	Heller + vitamine B ₁	++
3	Heller + vitamine B ₁ + kinétine 10^{-7} + 2,4 D 10^{-7}	++
4	Murashige et Skoog	+++
5	Murashige et Skoog + kinétine 10^{-7} + 2,4 D 10^{-7}	+++

Tableau 11 : Importance de la vitamine B₁ dans les solutions minérales de Heller et celle des phytohormones dans le milieu de Murashige et Skoog.

En conclusion, la culture simultanée du champignon et des colonies tissulaires du Silene alba pourrait se faire sur le milieu gélosé de Murashige et Skoog qui, d'une part, par la vitamine B₁ et l'édamine qu'il contient, permet le développement du champignon et d'autre part, par ses phytohormones, assure la croissance des tissus de Silene alba.

V EFFET D'UNE SOUCHE LEVUROIDE DE L'Ustilago violacea (Pers.) Rouss.

SUR LA CROISSANCE DES COLONIES TISSULAIRES ET DES SUSPENSIONS

CELLULAIRES DU Silene alba (Miller) E.H.L. Krause

A. MATERIEL ET METHODES

a) Les colonies tissulaires

Elles proviennent de la souche isolée par Dubois et Bouriquet (1974) à partir de fragments d'entre-nœuds de tiges. Elles sont repiquées environ toutes les six semaines sur un milieu gélosé renfermant les sels minéraux, les acides aminés et les vitamines de la solution de Murashige et Skoog (1962), 3 % de glucose, et 10^{-7} g.l⁻¹ de 2,4 D et de kinétine. La culture se fait dans des tubes en pyrex de 16 x 3 cm renfermant environ 35 ml de solution nutritive, ou dans des boîtes de Pétri en plastique de 90 mm de diamètre, contenant environ 20 ml de milieu gélosé. En fermant ces boîtes avec un ruban adhésif, on ne note pas de déshydratation importante du milieu après six semaines de culture.

b) Culture simultanée du Champignon et des tissus de Silene alba

Pour étudier l'interaction entre le champignon et le tissu, nous ensemençons d'abord le champignon par la méthode de l'anneau de fil de fer, puis un fragment de tissu de Silene (environ 250 mg) est déposé au centre de l'empreinte marquée sur le milieu gélosé contenu dans des boîtes de Pétri ; la distance séparant le tissu du champignon, au moment de la mise en culture est ainsi toujours la même.

Toutes les cultures sont placées dans une pièce dont la température est maintenue à $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Elles reçoivent, en plus de la lumière du jour, un éclairage d'appoint, fourni 12 heures sur 24 par des tubes lumineux (type lumière de jour de luxe) dont l'intensité d'éclairage au niveau des cultures est d'environ 1500 lux.

B. RESULTATS EXPERIMENTAUX

a) Effet de l'Ustilago violacea sur les tissus isolés de Silene alba

Après 30 jours de culture des tissus en présence du champignon, leur poids de matière fraîche et sèche est déterminé (Tableau 12).

	CROISSANCE					
	EXPERIENCE N° 1		EXPERIENCE N° 2		EXPERIENCE N° 3	
	M F	M S	M F	M S	M F	M S
Tissu seul	1561	86	1574	106	1691	107
Tissu + Champignon	727	38	810	46	970	46

Tableau 12 : Action de l'Ustilago violacea sur la croissance des colonies tissulaires du Silene alba

(Les expériences 1, 2 et 3 sont indépendantes. La croissance est mesurée en milligrammes de matière fraîche (MF) et sèche (MS) par colonie)

La croissance des colonies tissulaires est fortement ralentie par la présence du champignon. (Planche IV).

Afin de vérifier si l'action de l'Ustilago violacea est spécifique ou non, nous l'avons cultivé en présence de tissus appartenant à différentes espèces végétales : carotte, érable, scorsonère ou silène, dans des boîtes de Pétri renfermant le milieu gélosé de Murashige et Skoog additionné de 2,4 D à la concentration de 10^{-8} pour les tissus de Carotte, 10^{-7} g/ml pour le Silène et l'Erable et sans phytohormone pour les tissus de crown-gall de Scorsonère.

Les mesures de matière fraîche (MF) et de matière sèche (MS) ont été réalisées après 30 jours de culture dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente (Tableau 13).

DIFFERENTS TISSUS	TISSUS SEULS		TISSUS + CHAMPIGNON.	
	MF	MS	MF	MS
Silène	2732	102	345	11
Carotte	2124	99	402	14
Erable	743	38	299	10
Scorsonère	2100	167	1109	60

Tableau 13 : Action de l'Ustilago violacea sur la prolifération des tissus de carotte, d'érable, de scorsonère et de silène

Dans tous les cas, la présence du champignon ralentit considérablement la croissance des tissus. L'action inhibitrice ne se limite donc pas aux tissus de Silene alba (Planche IV).

Il nous a paru intéressant de préciser cette inhibition de la souche levuroïde de l'Ustilago violacea sur la prolifération cellulaire. Pour cela, nous avons fait appel à des suspensions cellulaires de Silène (souche de Silene alba isolée par Dubois et Bouriquet, 1974) et d'érable (souche d'Acer pseudoplatanus isolée par Lamport, 1964) qui ont été cultivées dans les milieux liquides de Murashige et Skoog et de Lescure. Environ 3 g de cellules sontensemencées dans une fiole d'attaque à fond plat de 500 ml, contenant 200 ml de milieu de culture ; différents volumes de la souche de l'Ustilago violacea âgée de 10 jours, cultivée en milieu liquide de Lescure, sont ajoutés à la suspension cellulaire.

Les fioles, inclinées à 45°C sont placées sur un agitateur rotatif tournant à la vitesse de 70 tours par minute. Les cultures sont entreposées dans une pièce à 21° ± 1°C où elles reçoivent en plus de la lumière du jour, 12 heures par jour d'un éclairage d'appoint fourni par des tubes luminescents. Après 10 jours de culture, la croissance des cellules est mesurée volumétriquement après décantation (Tableau 14).

VOLUME DE L'INOCULUM	SUSPENSION CELLULAIRE DU SILENE		SUSPENSION CELLULAIRE D'ERABLE	
	Lescure	Murashige et Skoog	Lescure	Murashige et Skoog
0	44	40	10	15
0,5	23	-	-	-
1	20	10	9	6
2	20	-	-	6

Tableau 14 : Croissance des suspensions cellulaires de Silene alba et d'Acer pseudoplatanus cultivées en présence de la souche levuroïde haploïde d'Ustilago violacea sur les milieux liquides de Lescure et de Murashige et Skoog

Les cellules de silène prolifèrent plus activement que les cellules d'érable mais, dans un cas comme dans l'autre, la présence du champignon réduit fortement la prolifération cellulaire (Tableau 14). Cette inhibition pouvait être attribuée à des causes diverses :

- . appauvrissement du milieu dû au développement du champignon,
- . modification du pH du milieu provoqué par la présence du champignon,
- . rejet par le champignon de substances inhibitrices dans le milieu de culture .

Nous avons tenté de vérifier ces trois hypothèses.

- . L'inhibition est-elle due à un appauvrissement du milieu de culture ?
-

Nous avons comparé la croissance du tissu cultivé seul ou en présence du champignon sur des milieux de Murashige et Skoog gélosés dont les éléments minéraux et organiques sont soit dilués au 1/2 ou au 1/4 soit multipliés par 2 (Tableau 15).

C R O I S S A N C E		C O N C E N T R A T I O N D U M I L I E U D E M U R A S H I G E E T S K O O G						
		x 1/4	x 1/2	x 1		x 2		
				exp.1	exp.2	exp.1	exp.2	
des tissus du <i>Silene alba</i>	En absence du champignon	mg MF/ colonie	667	1077	1574	1691	1053	853
		mg MS/ colonie	38	63	106	107	113	87
	En présence du champignon	mg MF/ colonie	376	503	810	970	904	739
		mg MS/ colonie	15	23	45	46	74	65
de l' <i>Ustilago violacea</i>			+	++	+++	++	++	

Tableau 15 : Action de différentes concentrations du milieu de Murashige et Skoog, sur la croissance des tissus du *Silene alba* et de la souche levuroïde de l'*Ustilago violacea*

Durée de la culture :

- . expérience n° 1 : 27 jours
- . expérience n° 2 : 25 jours



Le milieu de Murashige et Skoog normal est celui qui assure la meilleure croissance du tissu, alors que le champignon se développe mieux sur le milieu deux fois plus concentré. Quelle que soit la concentration du milieu, la prolifération est toujours plus faible en présence du champignon. Lorsqu'on cultive simultanément tissu et champignon sur le milieu deux fois concentré, l'*Ustilago* utilise une partie des substances nutritives et réduit la concentration du milieu qui devrait être alors plus favorable à la croissance des colonies tissulaires. Or, il n'en est rien puisque la présence du champignon ralentit la prolifération du tissu. L'inhibition ne semble donc pas pouvoir être attribuée à l'épuisement du milieu de culture.

. L'inhibition est-elle due à une modification du pH du milieu de culture ?

Au cours de la culture du champignon dans la solution nutritive de Murashige et Skoog, l'évolution du poids frais et du poids sec montre que la croissance est active pendant les 12 premiers jours, elle continue ensuite jusqu'au 40^{ème} jour mais plus lentement (figure III).

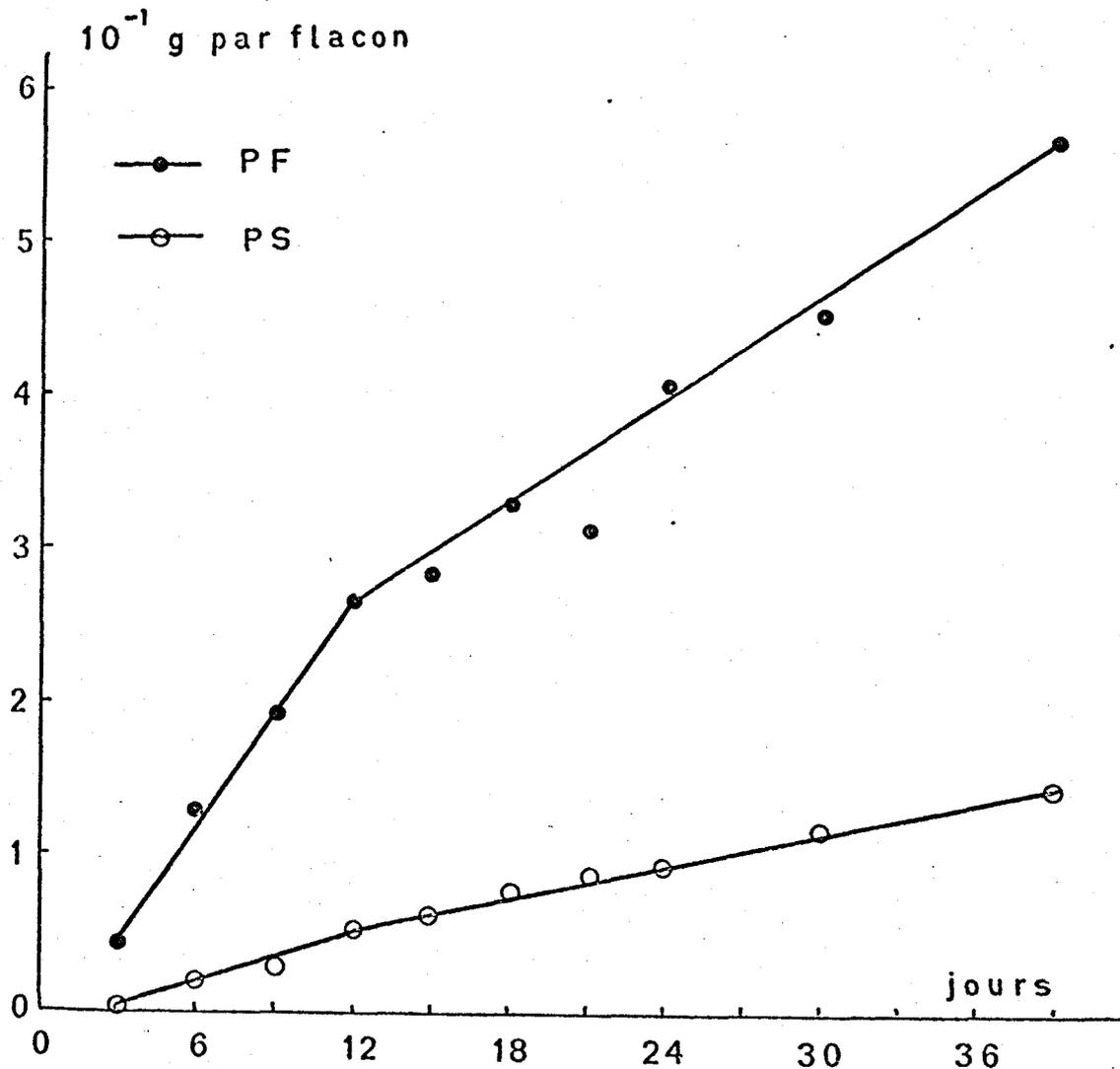


Fig. III : Croissance du champignon en milieu liquide

- poids frais (PF, 10⁻¹ g par flacon)
- poids sec (PS, 10⁻¹ g par flacon)

Parallèlement, l'Ustilago violacea (souche de Baarn) acidifie fortement le milieu de culture. Entre le 3ème et le 12ème jour, l'acidification est très rapide ; elle se poursuit plus lentement jusqu'au 24ème jour puis reste ensuite stationnaire (figure IV)

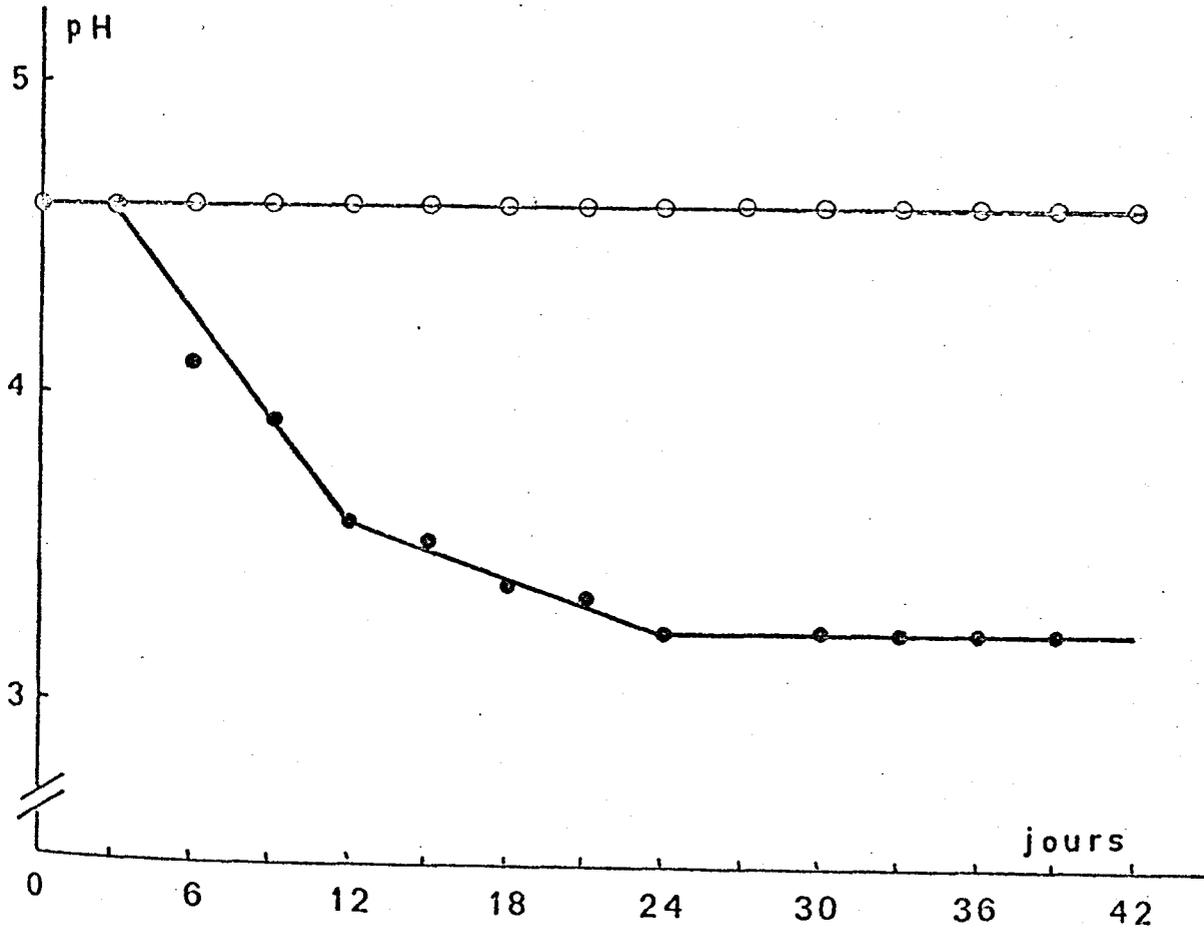


Fig. IV : Evolution du pH du milieu de culture de l'Ustilago violacea

- milieu de culture seul
- milieu de culture avec champignon



Le champignon acidifiant le milieu de culture, nous avons recherché quels pouvaient être, sur la prolifération des colonies tissulaires de Silene alba, les effets de milieux plus ou moins acides, tamponnés (Tableau 16) ou non (Tableau 17).

Le pH est ajusté par HCl 0,1 N après autoclavage, de manière à éviter l'hydrolyse de la gélose. Les tissus sont pesés après 25 jours de culture et le pH du milieu est à nouveau mesuré.

pH du milieu	- initial	3	3,5	4	4,5	5,1
	- final	4	4,3	4,3	4,4	4,4
Croissance	mg MF/ colonie	1795	1629	1547	1591	1393
	mg/MS/ colonie	95	91	90	92	77

Tableau 16 : Action du pH sur la croissance des tissus du Silene alba

pH du milieu	- initial	3	3,5	4	4,5	5
	- final	3,4	3,7	4	4,5	4,8
Croissance	mg MF/ colonie	958	1496	1368	1486	1312
	mg MS/ colonie	58	87	77	88	77

Tableau 17 : Action du milieu de culture tamponné par du Tris HCl 0,01 M sur la croissance des colonies tissulaires du Silene alba



Le pH initial du milieu, lorsqu'il n'est pas tamponné, n'a que peu d'effet sur la croissance du tissu qui tend à l'ajuster au cours de la culture (Gautheret, 1959).

Lorsque le milieu est tamponné (Tris HCl 0,01 M), les colonies tissulaires ajustent plus difficilement le pH ; leur prolifération est cependant peu modifiée, sauf à pH 3. Dans ce cas, le milieu est encore très acide à la fin de la culture, mais la réduction de la croissance est plutôt la conséquence d'une dilution de la solution nutritive, provoquée par l'addition d'une quantité plus importante d'HCl 0,1 N; elle est d'ailleurs hors de proportion avec l'inhibition provoquée par la présence du champignon.

. Rejet par le champignon de substances inhibitrices dans le milieu de culture

1) effet du milieu de culture du champignon sur la croissance des colonies tissulaires du *Silene alba*

L'inhibition de croissance provoquée par l'*Ustilago violacea* n'est pas due à l'épuisement du milieu ou à une simple modification du pH, nous avons voulu vérifier si elle provenait éventuellement de substances excrétées par le champignon dans le milieu de culture. Pour cela, nous avons cultivé pendant 30 jours le champignon en milieu liquide. Après filtration, nous avons recueilli le milieu de dix fioles que nous avons concentré sous vide, puis incorporé, à volume égal, avant ou après autoclavage, aux milieux gélosés sur lesquels nous avons repiqué les colonies tissulaires de silène. De façon à modifier le moins possible la concentration des éléments minéraux et organiques présents dans ces milieux, la concentration de chaque constituant a été arbitrairement multipliée par deux. (Tableau 18).

M I L I E U	C R O I S S A N C E			
	EXPERIENCE N° 1		EXPERIENCE N° 2	
	MF	MS	MF	MS
Témoin	1561	86	1574	106
Filtrat incorporé avant autoclavage	1318	60	948	81
Filtrat incorporé après autoclavage	920	75	1162	119

Tableau 18 : Effet du filtrat d'une culture du champignon sur la croissance des colonies tissulaires du *Silene alba*

Le filtrat des cultures levuroïdes de l'Ustilago ralentit la croissance des tissus : il renferme donc probablement des substances inhibitrices excrétées par le champignon. Il faut toutefois noter que certains constituants du milieu de culture du champignon, qui n'auraient pas été entièrement consommés au cours de son développement, sont susceptibles de modifier ultérieurement la prolifération des colonies tissulaires de Silène.

2) effet du milieu de culture du champignon sur la croissance d'une suspension cellulaire du Silene alba

Afin de préciser les résultats obtenus sur les colonies tissulaires, nous avons étudié l'effet du milieu de culture du champignon sur la suspension cellulaire. Elle est beaucoup plus sensible à l'effet inhibiteur du filtrat de culture du champignon que les colonies tissulaires (Tableau 19).

	VOLUME DE FILTRAT AJOUTE A UNE CULTURE (ml)							
	0		1		5		10	
	EXP.N°1	EXP.N°2	EXP.N°1	EXP.N°2	EXP.N°1	EXP.N°2	EXP.N°1	EXP.N°2
10^{-1} g MF/ culture	606	534	202	232	5	35	2	7
10^{-2} g MS/ culture	330	305	104	107	4	25	3	7

Tableau 19 : Effet du filtrat d'une culture du champignon sur la croissance d'une suspension cellulaire du Silene alba

Exp. n° 1 pH du filtrat : 3,0
 durée de la culture : 15 jours

Exp. n° 2 pH du filtrat : 5,7
 durée de la culture : 10 jours

1 ml de filtrat ajouté à 200 ml du milieu utilisé pour cultiver la suspension cellulaire réduit la croissance des cellules d'environ 50 %. Cette importante inhibition n'est pas due au pH acide (3,0) du filtrat puisqu'elle persiste lorsqu'on ramène celui-ci à 5,7, c'est-à-dire au pH normalement utilisé. La réduction de la croissance n'est pas imputable non plus à une modification importante de la concentration du milieu de culture puisque le volume du filtrat ajouté est négligeable par rapport au volume du milieu utilisé pour cultiver la suspension cellulaire.

b) Conclusion

La souche levuroïde haploïde d'Ustilago violacea réduit la croissance des tissus de Silène, de Carotte, d'Erable et de Scorsonère cultivés in vitro. Cette inhibition est vraisemblablement due à des substances excrétées par le champignon au cours de son développement. La différence de sensibilité manifestée par les colonies tissulaires et les suspensions cellulaires s'explique par le fait que toutes les cellules de la suspension baignent dans la solution nutritive alors qu'une partie seulement des cellules des colonies tissulaires est en contact avec le milieu solide : les phénomènes de diffusion sont également beaucoup plus rapides dans un milieu liquide que dans un milieu solide. Il serait certes intéressant de préciser la nature des substances inhibitrices ; pour le moment, nous savons seulement qu'elles sont thermostables.

Il faut, par ailleurs se garder d'extrapoler des résultats obtenus avec une souche levuroïde se cultivant facilement sur un milieu synthétique, à un mycélium dicaryotique qui ne se développe que dans les tissus d'une plante supérieure (Hassan et MacDonald, 1971). En particulier, il est peu probable que les substances excrétées par une culture levuroïde puissent provoquer les modifications florales induites par le mycélium. Par contre, l'excrétion de substances inhibant la croissance pourrait expliquer un certain nanisme signalé par Baker (1947), Viennot-Bourgin (1949) et par Evans et Wilson (1971) chez divers Silènes parasités par Ustilago violacea.

ETUDE DE LA FLORAISON DE SILENE ALBA ET SILENE DIOICA

Selon les travaux de Baker (1947) et de Wilson et coll. (1971) l'Ustilago violacea est un parasite obligatoire, spécifique des fleurs de Caryophyllacées. Pour faire une étude approfondie de la biologie de ce champignon, il est important de préciser les conditions de floraison des Silènes ; nous avons étudié ces conditions sur des plantes entières (cultivées en champ, en serre ou aseptiquement) ou sur des fragments de tiges cultivés in vitro.

I CULTURE DES PLANTES ENTIERES

=====

a) En champ

Des graines de Silene alba et Silene dioica germent et produisent des plantules de 2 cm environ au bout de deux semaines. Ces plantules repiquées en champ à la fin de l'automne, évoluent rapidement en rosettes, puis restent dans cet état pendant tout l'hiver. Les rosettes montent et fleurissent au printemps et durant l'été.

b) En serre

Les plantules placées en serre éclairée 12 heures par jour, forment des rosettes et restent à ce stade pendant une durée variable, fonction essentiellement de la température ambiante. En effet, les plantules obtenues en octobre restent en rosettes pendant tout l'hiver et commencent à monter au mois de mars. Celles qui sont mises en culture en février fleurissent en mai, celles obtenues en avril sont en fleur au mois de juin. Il suffit d'ailleurs en plein hiver de placer des rosettes à 25°C pour obtenir leur floraison deux semaines plus tard. D'une façon générale, nous avons constaté que les pieds femelles sont plus vigoureux que les pieds mâles mais leurs fleurs s'ouvrent plus tardivement.

c) Culture aseptique de plantes entières

Les graines de Silene alba sont stérilisées par immersion, pendant 15 minutes dans le mercryl laurylé à 3 %, puis 30 minutes dans l'hypochlorite de calcium 120 g/l. Après trois rinçages à l'eau stérile, elles sont ensemencées aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (0,8 %) sans aucune substance nutritive. Ces boîtes de Pétri sont conservées à la température du laboratoire : 8 jours plus tard, les plantules ont en moyenne 2 cm, elles sont alors transplantées dans des tubes en pyrex contenant le milieu gélosé de Murashige et Skoog. Les cultures sont réparties en quatre lots placés respectivement à 15, 21, 25 et 30°C, éclairées de façon continue. Les boutons floraux et les fleurs épanouies ont été dénombrés après deux mois de culture (Tableau 20).

TEMPERATURE	15°	21°	25°	30°
BOUTONS FLORAUX PAR PLANTULE	0	1,71	2,02	1,53
FLEUR OUVERTE PAR PLANTULE	0	0,08	0	0

Tableau 20 : Action de la température sur la floraison in vitro des plantules de Silene alba

A 15°C, les plantules restent rabougries avec des entrenoeuds très réduits, elles ne produisent pas de boutons floraux. A 21°C, certaines sont restées en rosettes ; celles qui se sont développées sont plus grêles avec des feuilles moins larges que celles des plantules cultivées en serre ou en champ. Seule 1 plantule sur 24 portait trois fleurs parfaitement épanouies, alors que nous avons observé une moyenne de 1,71 bouton par plante.

Les températures de 25 et 30°C provoquent une croissance rapide des tiges qui atteignent le sommet des tubes de culture, se courbent et se

cassent dans certains cas. A ces températures de 25 et 30°C, seuls des boutons floraux ont été observés.

II CULTURE DES FRAGMENTS DE TIGE

=====

Les travaux de Dubois et Bouriquet (1974) montrent que des explantats prélevés au niveau des noeuds de Silene alba cultivés sur le milieu minéral de Heller gélosé, avec 5 % de glucose ne produisent ni cal ni racine. Mais, les bourgeons axillaires évoluent rapidement en tiges feuillées qui, après 15 jours, comprennent généralement trois entrenoeuds et portent un ou deux boutons floraux. Après un mois de culture, les tiges feuillées remplissent le tube de culture et la plupart des boutons floraux se nécrosent.

Ces auteurs ont cependant précisé quelques conditions favorables à la floraison *in vitro* de Silene alba ; par exemple, la teneur en glucose du milieu (5 %), la température (comprise entre 21 et 25°C) et la photopériode (éclairage continu ou plus de 18 h de lumière du jour).

A la suite de ces recherches, nous avons tenté d'améliorer les conditions d'obtention des fleurs et de vérifier si elles pouvaient s'appliquer à Silene dioica.

Nous avons fait une étude comparée de la culture des fragments de noeuds sur le milieu nutritif préconisé par Murashige et Skoog et sur celui de Heller.

Des fragments de noeuds (20 mm) sont découpés dans des tiges préalablement désinfectées (3 % de mercryl pendant 15 minutes et 140 g/l d'hypochlorite de calcium pendant 30 minutes) et rincés trois fois à l'eau stérile. Ces noeuds sont repiqués en position normale sur les deux milieux gélosés par 0,8 % d'agar.

Les cultures sont entreposées dans une pièce éclairée 24 heures par jour et à la température constante de $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

Après 30 jours de culture (Tableau 21) (Planche V et VI),

MILIEU DE CULTURE	MURASHIGE ET SKOOG		HELLER	
	♂	♀	♂	♀
Sexe des explantats				
Pourcentage de reprise	82 %	91 %	81 %	87 %
Fleurs ouvertes par explantat	0,55	0,69	0,34	0,20
Bouton nécrosé par explantat	0,42	0,51	0,11	0,34
Nombre de boutons par explantat	6,01	4,11	2,12	1,21
Teneur en chlorophylle	+++	+++	++	++

Tableau 21 : Action comparée du milieu nutritif de Murashige et Skoog et celui de Heller sur la floraison in vitro des fragments de tige de Silene alba

+++ très chlorophyllienne
++ peu chlorophyllienne

le pourcentage de reprise est comparable sur les deux milieux utilisés ; il est par contre très variable selon le lieu de prélèvement des explantats. La reprise est plus lente et plus difficile avec les fragments provenant des régions âgées plus lignifiées des tiges, que pour ceux prélevés dans les régions jeunes. Pour des raisons d'homogénéité, nous préconisons de faire appel aux trois derniers noeuds des jeunes tiges.

Tous les fragments qui ont repris sont susceptibles de produire des boutons floraux ; leur nombre est plus important sur le milieu de Murashige et Skoog après 30 jours de culture; six en moyenne sur les explantats provenant des pieds ♂ (Planche V) quatre sur ceux prélevés sur les pieds ♀ (Planche VI). De plus, sur ce milieu, le nombre de boutons capables

de s'épanouir en fleurs est plus important ; par ailleurs, si on prolonge la culture, la floraison se poursuit, même après deux mois, sur les nouvelles tiges formées, tandis que sur le milieu de Heller, les tiges se nécrosent après trois semaines.

Conclusion

Ainsi, les techniques de culture in vitro ont permis d'obtenir la floraison dans des conditions satisfaisantes. Certes, les expériences entreprises avec les plantules ont été plus décevantes que celles réalisées avec des fragments de tiges ; mais les observations faites sur des plantes récoltées dans la nature nous ayant montré la présence de téliospores d'Ustilago violacea dans les jeunes boutons floraux non épanouis, ne rendent pas nécessaire d'obtenir la floraison complète.

Il était sans doute possible d'améliorer cette floraison de plantules en faisant varier au cours de la culture le facteur température mais, dans le cadre de nos recherches, nous n'avons pas cru devoir préciser le besoin de vernalisation des silènes puisque d'une part, les essais réalisés en serre et d'autre part les résultats obtenus avec les explantats cultivés in vitro, nous permettent d'obtenir sans intervention du froid, des fleurs en quantité suffisante pour étudier la castration parasitaire provoquée par l'Ustilago violacea sur Silene alba et Silene dioica.

III OBTENTION IN VITRO DE FLEURS DE SILENE DIOICA ET SILENE ALBA =====

PARASITEES PAR L'USTILAGO VIOLACEA =====

a) Silene dioica

Les travaux de Morel en 1948 indiquent que la culture d'organes contenant le mycélium du parasite était un moyen d'obtenir in vitro sa culture. Compte tenu des résultats positifs acquis pour la floraison in vitro des silènes, nous avons donc tenté d'obtenir des fleurs de Silene dioica parasitées par l'Ustilago violacea, en repiquant dans des conditions aseptiques des fragments de noeuds provenant de tiges parasitées (Batcho et Zambettakis, 1975).

Les plantes parasitées ont été récoltées dans un bois des environs de Lille. Sur les tiges désinfectées superficiellement, nous prélevons au niveau des noeuds des explantats de 20mm que nous mettons en culture sur le milieu de Murashige et Skoog gélosé.

Les bourgeons axillaires se développent en tiges feuillées ; en général, leur croissance est comparable à celle des explantats prélevés sur des plantes saines. Le nanisme des plantes infectées signalé par Baker (1947) et Wilson et coll. (1971) n'est donc pas un phénomène général. Nous avons cependant constaté que des boutons floraux apparaissent presque directement au niveau des noeuds, sans développement important de pédoncule floral.

Les deux expériences que nous avons réalisées comportant chacune 10 paniers de 24 tubes de culture, ont permis de constater que les premières fleurs charbonnées apparaissent après 13 jours de culture. Un mois plus tard, nous avons dénombré les fleurs parasitées (Tableau 22) (Planche VII et VIII).

SEXE	♂	♀
Pourcentage de reprise des explantats	87 %	81 %
Pourcentage d'explantats ayant produit des fleurs	85 %	80 %
Pourcentage d'explantats portant des fleurs parasitées	73 %	42 %
Nombre moyen de fleurs épanouies par explantat	6	2,4
Nombre moyen de boutons floraux par explantat	3	1

Tableau 22 : Etude de la floraison in vitro de fragments de noeuds de Silene dioica parasités dans la nature.

Les explantats prélevés sur les pieds mâles produisent plus de fleurs (ou de boutons floraux) que ceux provenant de pieds femelles, ils sont d'ailleurs plus précoces ; ce qui confirme ce que nous avons observé dans la station où nous avons récolté les plantes parasitées.

Parmi les fleurs obtenues in vitro, 73 % des mâles (Planche VIII) et 42 % des femelles (Planche VII) manifestent la présence d'Ustilago violacea. Ces fleurs ont des pièces périanthaires (5 sépales, 5 pétales) normales, mais la morphologie de leurs pièces reproductrices est profondément modifiée par la présence du champignon. Les fleurs mâles ont des anthères qui renferment les téliospores d'Ustilago violacea à la place des grains de pollen. Les fleurs femelles ont un ovaire réduit et stérile tandis que les organes mâles normalement atrophiés se développent en étamines (bourrées de téliospores) qui leur donnent l'aspect de fleurs hermaphrodites. Ces observations sont analogues à celles réalisées dans la nature sur des plantes entières (Baker, 1948).

Signalons enfin que certains explantats, bien que provenant de plantes parasitées, ont produit des fleurs saines ; ce qui laisse supposer que sur une plante parasitée, il peut exister des rameaux indemnes du champignon.

b) Silene alba parasités

Dans des conditions analogues à celles utilisées pour Silene dioïca, nous avons cultivé des explantats prélevés sur des tiges parasitées de Silene alba (Tableau 23, Planche X et XI).

SEXE	♂	♀
Pourcentage de reprise des explantats	90 %	88 %
Pourcentage d'explantats ayant produit des fleurs	25 %	58 %
Pourcentage d'explantats portant des fleurs parasitées	85 %	78 %
Nombre moyen de fleurs épanouies par explantat	1,42	1,31
Nombre moyen de boutons floraux par explantat	5,60	4,25

Tableau 23 : Etude de la floraison in vitro de fragments de noeuds de Silene alba parasités dans la nature

Les premiers boutons floraux apparaissent après 15 jours de culture mais se nécrosent le plus souvent. Par contre, ceux qui se forment ultérieurement sur des pousses latérales donnent des fleurs charbonnées.

Avec cette espèce, les résultats sont moins spectaculaires qu'avec Silene dioica, car la floraison obtenue in vitro est moins abondante.

Quoi qu'il en soit, 85 % des pieds mâles et 78 % des pieds femelles étaient parasités par l'Ustilago violacea après deux mois de culture.

Conclusion

L'Ustilago violacea se développe donc in vitro comme dans les conditions naturelles. Jusqu'à présent, il semble qu'on n'ait pu cultiver ce champignon sur milieu synthétique que sous sa forme asexuée, levuroïde ; il se multiplie alors par bourgeonnement.

La méthode que nous venons de réaliser permet d'obtenir dans un temps relativement court (deux semaines) et dans des conditions aseptiques, des fleurs parasitées de silène ; en 1971, Hassan et MacDonald avaient étudié le phénomène en cultivant les plantes parasitées dans la nature ; ils n'obtenaient les fleurs charbonnées que cinq à dix mois plus tard.

Soulignons enfin que notre méthode permet de recueillir aseptiquement des téliospores et résout ainsi le problème de leur désinfection.

ETUDE DE LA SOUCHE L

Les méthodes de culture in vitro de plantules ou de fragments de tiges de Silène nous permettant d'obtenir des téliospores dans des conditions aseptiques, il nous était possible d'envisager leur culture pure, d'étudier les conditions de conjugaison chez ce champignon et de réaliser des inoculums pour infecter des plantes saines.

I GERMINATION DES TELIOSPORES

=====

En plaçant dans de l'eau stérile des téliospores recueillies dans des fleurs (ou des boutons floraux) obtenues in vitro, elles germent rapidement (12 h), leur taux de germination est bon (80 %). Nous avons pu ainsi observer les différentes phases de la germination.

Si l'on introduit 0,1 ml de cette suspension dans 200 ml de solution nutritive de Lescure, contenus dans des fioles de 500 ml placées sur un agitateur rotatif, 4 jours plus tard, nous obtenons une suspension blanchâtre, dont l'examen microscopique révèle l'abondance des sporidies et des promycéliums. Si on prélève une petite quantité de cette suspension et qu'on l'observe en goutte pendante, après 12 heures, on peut voir une quantité élevée de conjugaisons. Il nous a donc paru intéressant d'entretenir la culture, en la repiquant tous les dix jours dans le milieu initial (Lescure) qui s'était déjà révélé (§ "germination des téliospores") convenable pour la germination des téliospores.

BUS
LILLE

La souche L. ainsi obtenue comprend en fait un mélange de sporidies (+) et (-) ainsi que des promycéliums et quelques téliospores dont le nombre diminue à chaque repiquage. A chaque passage sur un milieu neuf, nous avons vérifié le pouvoir de conjugaison des sporidies.

II ISOLEMENT DES CLONES

=====

A partir du 7e repiquage, nous avons constaté une diminution importante du taux de conjugaison. Ceci nous a incité à isoler de la souche L. des clones et à vérifier s'ils étaient compatibles ou non. Nous avons prélevé

0,5 ml d'une suspension âgée de 7 jours et l'avons diluée dans 200 ml d'eau distillée stérile. Une goutte de cette suspension diluée a été étalée sur du milieu de Lescure gélosé contenu dans une boîte de Pétri. Après 8 jours à 21°C, de petites colonies blanchâtres apparaissent à la surface de la gélose ; elles correspondent au développement des sporidies haploïdes qui se sont multipliées végétativement pour former un clone. 17 clones ont été isolés.

III DETERMINATION DE LA COMPATIBILITE

=====

Pour montrer que deux clones sont compatibles ou non, il suffit de mélanger à volumes égaux deux clones après les avoir mis en suspension. 24 heures plus tard, en observant ces mélanges, on peut vérifier l'homogénéité et la pureté des isoléments.

Quand le mélange de deux clones renferme des sporidies conjuguées et que les cultures pures n'en contiennent pas, on peut en déduire que ces deux clones sont compatibles ; sans pouvoir préciser lequel est le (+) ou le (-). Si le mélange n'en renferme pas, c'est que les deux clones sont du même signe.

De cette façon, nous avons déterminé au hasard un certain nombre de clones compatibles (Tableau 24) parmi lesquels nous avons choisi 6 pour une étude de la polarité (Tableau 25) des sporidies.

Couples	1-15	2-20	4-8	8-9	10-11	12-13	15-19	6-17	7-18
Dicaryons									

Tableau 24 : Détermination des clones compatibles

 clones compatibles

 clones non compatibles

N°	1	6	8	9	15	17
1	0 0	⊖ ⊖	⊖ ⊖	0 0	⊖ ⊖	0 0
6	⊖ ⊖	0 0	0 0	⊖ ⊖	0 0	⊖ ⊖
8	⊖ ⊖	0 0	0 0	⊖ ⊖	0 0	⊖ ⊖
9	0 0	⊖ ⊖	⊖ ⊖	0 0	⊖ ⊖	0 0
15	⊖ ⊖	0 0	0 0	⊖ ⊖	0 0	⊖ ⊖
17	0 0	⊖ ⊖	⊖ ⊖	0 0	⊖ ⊖	0 0

Tableau 25 : Etude de la polarité entre 5 clones

⊖ ⊖ clones compatibles

0 0 clones non compatibles

50 % des clones sont compatibles et 50 % sont non compatibles. (Tableau 25). Les sporidies sont donc bipolaires.

De tous les clones compatibles isolés, nous n'avons conservé (par repiquages réguliers) que les n^{os} 1 et 15 ainsi que 8 et 9, ces deux derniers ont été plus particulièrement étudiés.

IV INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LA CONJUGAISON

DES SPORIDIES

Le taux de conjugaison des sporidies compatibles et leur croissance ont été étudiés en fonction de facteurs physiques (température et lumière), physiologiques (âge et densité des sporidies) ou nutritionnels (azote et saccharose), afin de déterminer les conditions qui permettent d'obtenir

Le maximum de dicaryons pour des infections expérimentales.

a) Méthodes

Les différentes mesures sont effectuées de la façon suivante :

1) Détermination du taux de conjugaison

Le taux de conjugaison (Cg. %) est déterminé à partir d'un ou de plusieurs comptages d'environ 1000 cellules chacun

$$\text{Cg. \%} = \frac{\text{sporidies conjuguées}}{\text{sporidies conjuguées} + \text{végétatives}} \times 100$$

Pour établir ce pourcentage, nous n'avons pas tenu compte des sporidies conjugant par 3 (comptées pour 2) ni des bourgeons encore attachés sur les sporidies végétatives.

2) Mesure de la croissance

Les cultures clonales ne renferment que des sporidies isolées se multipliant par bourgeonnement. Leur homogénéité et leur faible taille (4,3 x 3µm) permettent d'évaluer la croissance végétative de la culture, par la mesure de la D.O. (densité optique). Celle-ci s'effectue à 550 nm, sur une partie aliquote des cultures diluée dix fois (dans certaines expériences, la lecture est effectuée sans dilution).

La croissance des microcultures mixtes a également été appréciée par la mesure de la D.O. après dilution au 1/10e. Il est évident qu'elle a une signification très différente de la croissance végétative mesurée sur les cultures clonales. Ces mesures sont toutefois nécessaires pour apprécier la viabilité des sporidies, en particulier, lorsqu'on les place dans un environnement leur étant défavorable.

b) Cinétique de la conjugaison

A partir de sporidies (clones 8 et 9) cultivées séparément pendant 48 h en milieu liquide agité, on réalise une série de microcultures mixtes. Pour cela, on mélange 0,5 ml de chacune des suspensions clonales dans une microcuvette recouverte d'une lame de verre et placée dans une boîte de Pétri. Ces boîtes sont mises à l'obscurité à 20 ± 1°C.

La conjugaison se déroule en trois temps :

- stade 1 = Appariement : deux sporidies de signe contraire
 se rapprochent et se déplacent ensemble dans le milieu liquide, sans toutefois qu'il y ait de contact entre leurs "membranes". Les premiers appariements se produisent en deux heures.
- stade 2 = Accolement : après trois heures de culture mixte, les sporidies
 s'accolent par paires, sans qu'on puisse distinguer si leurs "membranes" sont réellement soudées ou non.
 Des observations en microscopie électronique (Cummins et Day, 1974) ont montré qu'à ce stade, les parois sont soudées, alors que les plasmalemmes sont encore séparés.
- stade 3 = Développement du tube de conjugaison. Après 5 heures, les
 premiers tubes de conjugaison apparaissent entre les sporidies accolées ; ils s'allongent dans les heures qui suivent pour atteindre une taille égale à celle des sporidies (4 à 5µm)

Le pourcentage de conjugaison a été déterminé en tenant compte des couples de sporidies ayant formé un tube de conjugaison (Stade 3). Il a été évalué pendant 72 heures de culture, d'abord toutes les heures, puis à intervalles plus espacés (Tableau 26). Ce pourcentage est nul pendant les 4 premières heures, puis augmente rapidement la 5e et la 12e heure de culture ; le taux maximum est atteint 24 heures après la mise en place des microcultures. Nous avons également observé que les sporidies conjuguent aussi lorsqu'on les dépose en mélange à la surface du milieu nutritif solidifié par de l'agar (8 %). Poon Martin et Day (1974), qui utilisent de l'eau gélosée comme milieu de conjugaison, obtiennent les premiers tubes (2 h à 2 h 30 mn après avoir mélangé les clones compatibles). Néanmoins, après 12 ou 24 heures de culture en milieu liquide, les taux de conjugaison que nous obtenons sont supérieurs à ceux qu'ils dénombrent sur de l'eau gélosée (respectivement 70,9 et 87,2 % pour environ 50 à 70 %).

En même temps, la prolifération des cellules a été évaluée en mesurant la D.O. des microcultures diluées 10 fois . Elle est rapide entre la 2e et la 5e heure. Dès qu'un grand nombre de sporidies sont accolées,

TEMPS (h)	CONJUGAISON (%)	CROISSANCE (D.O.)
0	0 ± 0	11,5 ± 0,5
1	0 ± 0	11,5 ± 0,5
2	0,1 ± 0,1	12,0 ± 1,0
3	0,1 ± 0,1	13,5 ± 0,5
4	0 ± 0	15,5 ± 0,5
5	6,3 ± 5,1	17,0 ± 1,0
6	27,8 ± 17,8	17,0 ± 0,5
9	58,5 ± 12,1	18,5 ± 1,5
12	70,9 ± 9,0	20,5 ± 1,5
24	87,2 ± 3,9	29,0 ± 5,0
48	81,8 ± 3,2	32,5 ± 3,5
72	80,3 ± 8,0	35,0 ± 4,0

Tableau 26 : Evolution du pourcentage de conjugaison et croissance d'une microculture mixte (clones 8 et 9) d'*Ustilago violacea*, à l'obscurité et à la température de 20 ± 1°C.

elle est ralentie, sans doute parce que seules les cellules végétatives bourgeonnent activement. D'ailleurs, dans des cultures en gouttes pendantes, lorsque les sporidies sont trop éloignées les unes des autres, on observe après 5 ou 6 jours, de nombreuses petites colonies végétatives bien séparées

et provenant du bourgeonnement des sporidies isolées. Par contre, dans les cultures riches en sporidies, où les conjugaisons sont nombreuses, ces colonies végétatives sont presque inexistantes.

On comprend donc que la croissance ralentisse dès que le taux de conjugaison augmente. Après 24 heures, il ne reste dans les microcultures qu'environ 10 à 15 % de sporidies non conjuguées ; la croissance est alors très faible.

c) Variation de l'aptitude à conjuguer au cours de la croissance

Des flacons renfermant chacun 200 ml de milieu nutritif sontensemencés à la densité de $3 \cdot 10^6$ cellules/ml avec les clones 8 et 9 provenant d'une culture âgée de 7 jours, puis placés à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ sur un agitateur rotatif. Toutes les 24 heures, on mesure la croissance et on prépare des microcultures mixtes que l'on place à l'obscurité à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Le taux de conjugaison déterminé 24 heures plus tard et les mesures de la croissance effectuées à partir des cultures clonales, sont rapportés sur la figure V.

La croissance des sporidies est rapide jusqu'au 3e jour, puis beaucoup plus lente. A partir du 7e jour, on observe un plateau correspondant à une phase stationnaire pouvant se prolonger pendant une semaine.

L'aptitude à la conjugaison, qui est très élevée dans les cultures les plus jeunes, diminue entre le 2e et le 3e jour, puis plus lentement par la suite. Au cours de la phase stationnaire, les sporidies sont pratiquement incapables de conjuguer. La diminution très rapide de leur aptitude à conjuguer semble liée à trois facteurs au moins :

- l'âge des sporidies,
- la densité des cultures,
- la composition du milieu nutritif.

Il est évident que la croissance végétative s'accompagne de la consommation d'un certain nombre d'éléments qui peut entraîner des déséquilibres ioniques, une modification du pH et même des carences.

Par ailleurs, en vieillissant, les cellules rejettent dans le milieu des substances diverses dont certaines pourraient favoriser ou inhiber la conjugaison. Avant d'analyser l'action propre de chacun de ces facteurs, nous déterminerons les effets de la température et de la lumière qui jouent

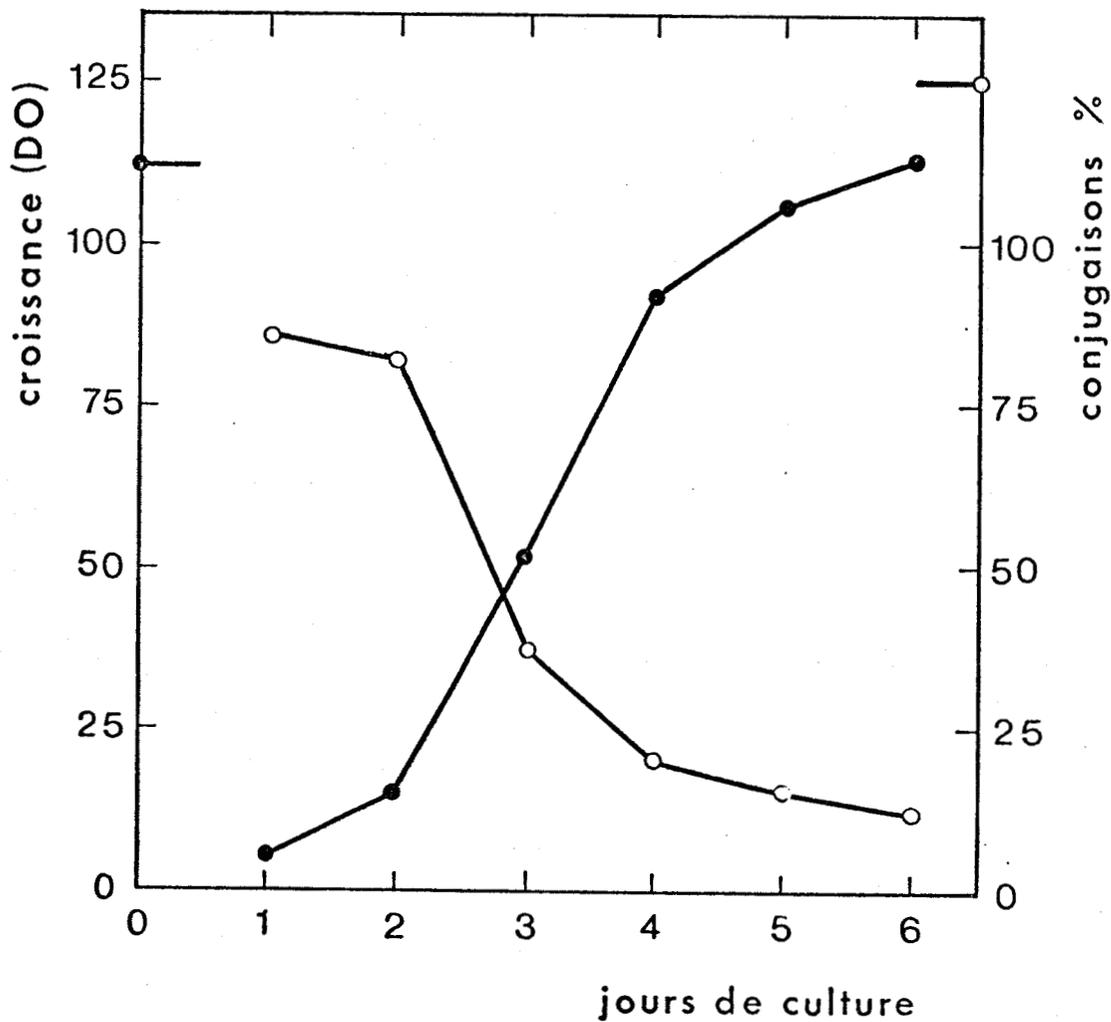


Figure V : Croissance d'une culture clonale d'Ustilago violacea en milieu liquide agité (—●—) et variation de l'aptitude à conjuguer (—○—) au cours d'un cycle de croissance (la croissance est évaluée par la mesure de la D.O. après dilution au 1/10e, l'aptitude à conjuguer par le taux de conjugaison, 24 h après avoir mélangé les mating-types).



un rôle important sur la sexualité des champignons, mais dont les effets sur la conjugaison de l'Ustilago violacea sont peu connus.

d) Facteurs physiques contrôlant la conjugaison

1) Température

Des sporidies âgées de 48 heures (clones 8 et 9) sont séparées de leur milieu de culture par centrifugation (15 mn à 9000 g), rincées à l'eau distillée et remises en suspension à la concentration de $22 \cdot 10^6$ cellules/ml dans du milieu neuf. On mélange alors à volume égal les deux clones compatibles et on introduit 1 ml de ce mélange dans une série de microcuvettes, elles-mêmes placées dans des boîtes de Pétri. Ces dernières sont placées à l'obscurité dans des enceintes dont les températures s'échelonnent entre 2,5 et 40°C.

Après 24 heures de traitement, on constate que les températures stimulant le bourgeonnement ne sont pas les mêmes que celles qui favorisent la conjugaison (fig.VI). A 2,5°C, le taux de conjugaison est très variable mais toujours faible ; le bourgeonnement est très faible également. Les températures les plus favorables à la conjugaison sont comprises entre 15 et 20°C (optimum à 17,5°C). Au-dessus de 20°C, le taux de conjugaison diminue très rapidement, il est pratiquement nul à partir de 25°C. La croissance des sporidies est stimulée par les températures moyennement élevées. Celle de 25°C, pour laquelle la croissance est optimale, provoque des modifications de la morphogénèse. Après 48 heures, on observe dans des microcultures de nombreuses chaînettes linéaires ou ramifiées formées de 3 à 8 cellules accolées. Après 4 jours, ces "chaînettes" commencent à se dissocier et un certain nombre de cellules commencent à s'engager sur la voie de la reproduction sexuée. A partir du 5e ou du 6e jour, les accolements sont nombreux et on observe des conjugaisons dont le pourcentage varie selon les cultures, mais qui se caractérisent le plus souvent par un tube de conjugaison relativement court.

Les températures de 25 à 30°C n'inhibent donc pas la conjugaison : elles en ralentissent considérablement les processus. On comprend que dans ces conditions, après 24 heures de culture, le bourgeonnement soit beaucoup plus important. A 35°C, les cellules ne se divisent plus et meurent très rapidement.

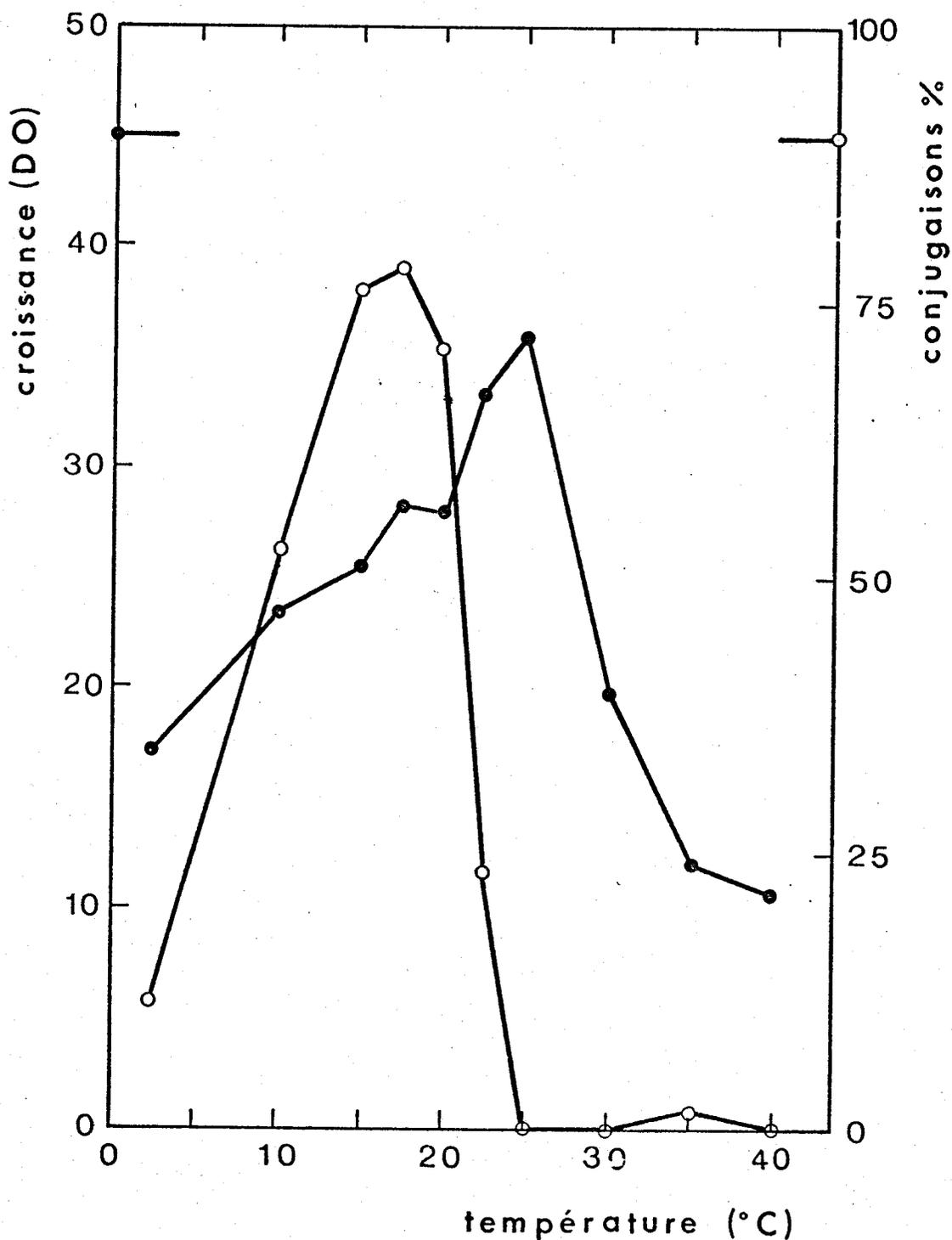


Figure VI : Variation de la croissance (—●—) et du taux de conjugaison (---○---) de microcultures mixtes de l'*Ustilago violacea* en fonction de la température (les mesures de la D.O. et du taux de conjugaison sont effectués 24 h après l'ensemencement).

Des cultures placées à 25 et même à 30°C pendant 24 h puis remises à la température de 17,5°C présentent 24 heures plus tard des taux de conjugaison élevés. De même, des sporidies laissées 24 heures à 2,5 °C et remises à 17,5 ou à 20°C conjuguent tout à fait normalement 24 heures après leur transfert.

2) Lumière

Pour déterminer l'influence de la lumière sur le déroulement de la conjugaison, nous avons préparé une série de microcultures mixtes analogues à celles utilisées pour analyser les effets de la température. Une partie des cultures est placée à l'obscurité à 20° ± 1, l'autre reçoit en plus de la lumière du jour, un éclairage continu d'environ 1000 lux fourni par des tubes luminescents (type lumière de jour de luxe). Le taux de conjugaison et la croissance, après 24 heures de traitement, sont les mêmes à la lumière qu'à l'obscurité (Tableau 27).

FACTEURS PHYSIQUES	CONJUGAISON %	CROISSANCE (D.O.)
Lumière	60,8 ± 2,6	27,0 ± 2,0
Obscurité	61,5 ± 2,2	28,0 ± 3,5

Tableau 27 : Effet de la lumière et de l'obscurité sur la conjugaison et la croissance des sporidies de l'Ustilago violacea

e) Facteurs physiologiques

1) Age des sporidies

Pour étudier les effets de l'âge des sporidies, nous ensemençons trois séries de microcultures avec des cellules provenant de la culture des clones 8 et 9 âgés de 2, 11 et 19 jours. Les cultures mixtes sont préparées dans les mêmes conditions que pour les expériences précédentes, à la densité initiale de $22 \cdot 10^6$ cellules/ml. Elles sont placées à l'obscurité à la température optimale de 17,5°C.

6, 12, 18 et 24 heures après la mise en place des microcultures, on détermine le pourcentage des cellules parvenues aux différents stades de conjugaison précédemment définis.

L'âge des sporidies modifie la dynamique de la conjugaison (Fig.VII).Après 6 heures, seules les sporidies les plus jeunes parviennent au 3e stade (45,6 % des cellules de deux jours). Après 9 heures, 69,8 % des sporidies âgées de 11 jours y parviennent également, alors que la plupart de celles prélevées à 19 jours sont encore au stade 2. En 24 heures, 68,3 % des sporidies les plus âgées sont à leur tour au stade 3. La conjugaison se déroule donc d'autant plus lentement que les cellules mises en contact sont plus âgées, mais après 24 heures, les pourcentages de conjugaison (stade 3) diffèrent peu. Ils sont toutefois un peu plus faibles lorsque les cellules ont plus de 11 jours.

L'âge des sporidies ne modifie pas la croissance (Tableau 28) ;

DUREE DE LA CULTURE (h)	AGE DES SPORIDIES ENSEMENCEES					
	microcultures mixtes			cultures clonales		
	2 j.	11 j.	19 j.	2 j.	12 j.	22 j.
0	12	11	13	05	06	05,5
6	15	14	15,5	08,5	09	08,5
9	16	14,5	-	10,5	10,5	10
12	17	16,5	18	13	12	11
24	23	22	24	29	22	19
48	-	-	-	40	80	69
46	-	-	-	125	122,5	125

Tableau 28 : Effet de l'âge des sporidies sur la croissance (mesurée par la D.O.) de cultures clonales et de microcultures mixtes de l'Ustilago violacea

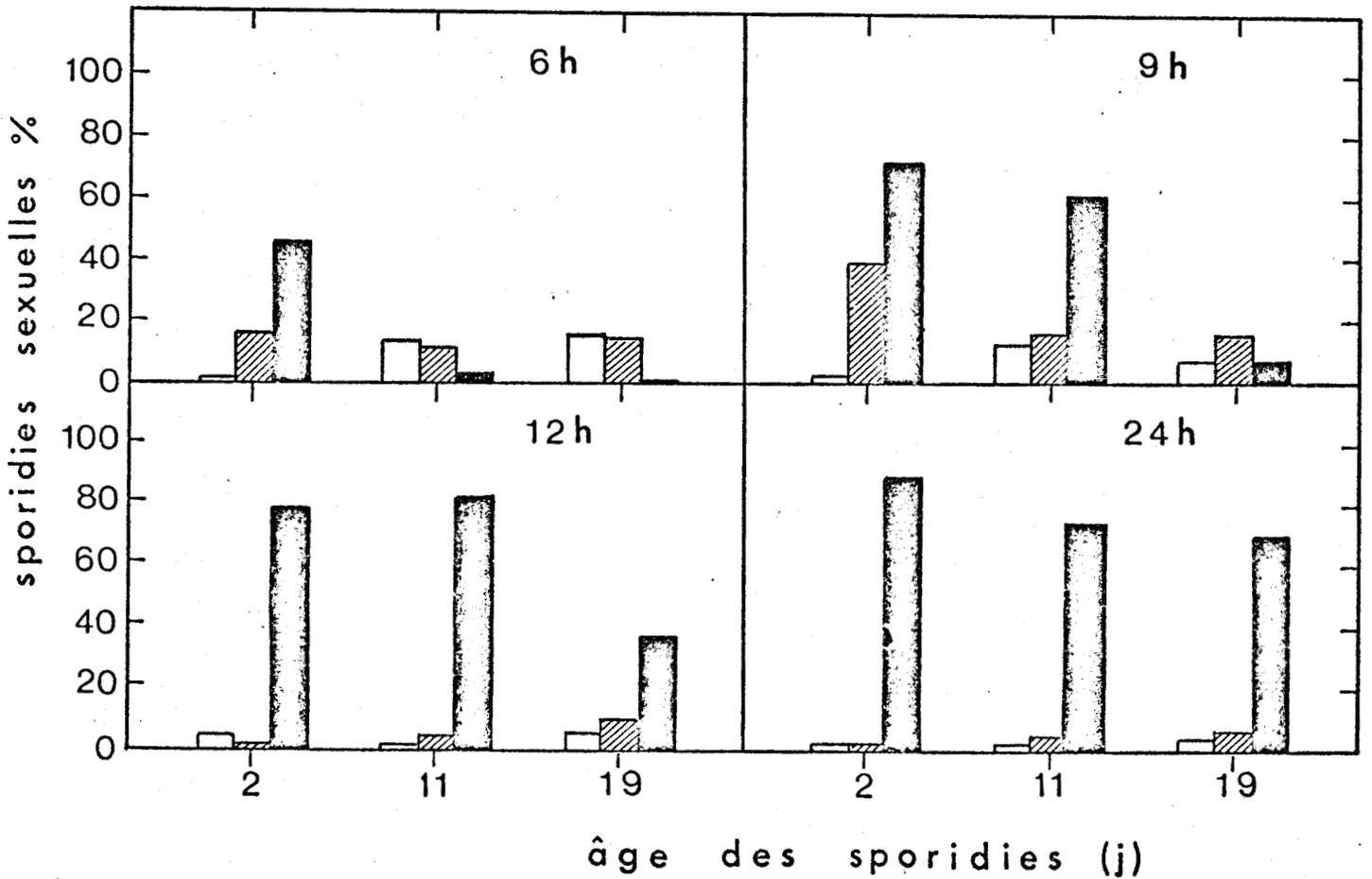


Figure VII : Histogramme montrant l'effet de l'âge des sporidies de l'*Ustilago violacea* sur la cinétique de la conjugaison. Les pourcentages de cellules appariées (en blanc), accolées (en hachures) et présentant un tube de conjugaison (en noir) sont mesurés après 6, 9, 12 et 24 h de culture.

en particulier, on ne constate pas d'augmentation de la phase de latence comme c'est le cas pour des cellules isolées de nombreux plantes supérieures (Dubois, 1975). Dans les microcultures, la croissance n'est pas indépendante des phénomènes sexuels puisque le ralentissement de la conjugaison, lorsque les cellules sont âgées, semble favoriser le bourgeonnement. Dans les cultures clonales, en milieu liquide agité, où il n'y a pas conjugaison, l'âge des cellules ne modifie pas la croissance tout au moins lorsqu'elles ont moins de 11 jours au moment de l'ensemencement. Des cellules plus âgées présentent cependant une courte phase de latence avant de commencer à bourgeonner.

2) Densité des cultures

Des sporidies âgées de 7 jours, provenant des clones 8 et 9, sont séparées de la solution nutritive, rincées et introduites dans du milieu neuf ; à partir de ces suspensions, nous réalisons des microcultures mixtes à des concentrations variant de $6 \cdot 10^5$ à $6 \cdot 10^8$ cellules/ml. Ces microcultures sont placées pendant 24 heures dans une enceinte obscure dont la température est maintenue à $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les pourcentages de conjugaison les plus élevés sont obtenus quand on dilue 100 ou 200 fois les suspensions, ce qui correspond à une densité cellulaire comprise entre $6 \cdot 10^6$ cellules/ml et $3 \cdot 10^6$ cellules/ml. Une densité cellulaire 100 fois plus élevée ou 10 fois plus faible réduit fortement le taux de conjugaison. Un trop grand nombre de cellules doit gêner la rencontre des cellules compatibles ; de plus, si l'inhibition est liée à une modification du milieu, celle-ci sera d'autant plus importante que la densité des sporidies est élevée. Inversement, lorsque la densité des cellules est très faible, la réduction du taux de conjugaison résulte sans doute de la difficulté qu'ont les sporidies à rencontrer un partenaire compatible (Tableau 29).

Densité des sporidies	$6 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$
% de conjugaison	$1,6 \pm 0,4$	$50,4 \pm 4,8$	$57,0 \pm 2,9$	$66,6 \pm 5,3$	$65,4 \pm 9,3$	$9,5 \pm 2,6$

Tableau 29 : Effet de la densité cellulaire sur le pourcentage de conjugaison.

f) Importance du carbone et de l'azote

L'équilibre entre ces deux substances joue souvent un rôle prépondérant sur la croissance et la reproduction sexuée des champignons. On sait même depuis longtemps que des milieux pauvres favorisent la conjugaison de nombreuses espèces d'Ustilago, dont Ustilago violacea (Kniep, 1919 ; Bauch, 1922). Notre milieu d'entretien renferme des nitrates (1,96 g/l de NO_3K et 0,29 g/l de $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}$, 4 H_2O) et du saccharose (20 g/l). Pour ces expériences, nous avons simplement multiplié les doses de NO_3K et de saccharose par 0, 1/2, 1, 2 et 4. Dans ces conditions, les milieux testés renferment respectivement 35, 170, 305, 580 et 1120 mg/l d'azote et 0, 10, 20, 40 et 80 g/l de saccharose.

Dans une première expérience (Tableau 30), les sporidies sont cultivées séparément pendant 48 h sur le milieu d'entretien puis recueillies par centrifugation, rincées à l'eau distillée et ensemencées en mélange dans des microcultures renfermant des doses variables de carbone et d'azote.

Azote (mg/l)	Saccharose (g/l)				
	0	10	20	40	80
35	73,6	67,0	79,1	66,0	54,1
170	67,5	84,6	82,9	76,9	64,5
305	67,3	79,6	68,8	68,0	57,3
580	52,8	68,9	71,7	66,8	46,7
1120	41,5	40,5	43,8	35,9	0,2

Tableau 30 : Effet de la concentration du saccharose et du nitrate de potassium sur la conjugaison des sporidies

Les cultures, dont la densité cellulaire a été ajustée à $15 \cdot 10^6$ cellules/ml, sont placées 24 h à l'obscurité à 17,5°C. Les sporidies conjuguent même en l'absence de sucre. Des doses de 10 et de 20 g/l stimulent la conjugaison ; des doses plus élevées, sont inhibitrices. Une augmentation de la teneur en azote entre 35 et 1120 mg/l est d'abord favorable (jusqu'à

170 mg/l) puis de plus en plus défavorable.

Les milieux les plus concentrés en azote réduisent le taux de conjugaison d'environ 50 % et lorsque la teneur en saccharose est elle-même élevée (80 g/l), l'inhibition est presque totale (taux de conjugaison : 0,2 %).

Dans une seconde expérience (Tableau 31), les deux clones sont

Azote (mg/l)	Saccharose (g/l)				
	0	10	20	40	80
35	73,5	75,9	82,8	68,2	78,7
170	78,1	84,8	86,9	81,9	77,3
305	69,1	67,2	75,3	76,4	60,1
580	67,3	57,7	68,0	53,8	1,3
1120	55,7	49,6	60,6	6,8	0,2

Tableau 31 : Effet de la concentration du saccharose et du nitrate de potassium sur la conjugaison des clones nos 8 et 9 préalablement cultivés séparément pendant 6 jours sur les milieux à tester.

d'abord cultivés séparément pendant 6 jours sur les différents milieux à tester. Une partie aliquote de chacune des cultures est alors diluée avec du milieu neuf présentant les mêmes proportions de carbone et d'azote, de manière à ramener la densité cellulaire à $15 \cdot 10^6$ cellules/ml et les deux suspensions compatibles sont mélangées. Des microcultures renfermant 1 ml de mélange sont placées dans les mêmes conditions que lors de l'expérience précédente.

Les résultats diffèrent peu des précédents. Notons toutefois que les fortes teneurs en saccharose sont mieux tolérées quand les concentrations d'azote sont favorables, mais que l'inhibition de la conjugaison est encore plus marquée quand les milieux sont trop riches en azote.

Les effets de la teneur en carbone et en azote sur la croissance végétative ont été déterminés sur des parties aliquotes des cultures clonales après 2 et 4 jours de culture (fig.VIII). Les milieux dépourvus de sucre empêchent le bourgeonnement. La croissance est optimale avec 20 g/l de saccharose ; elle n'est pas réduite par des doses supérieures (jusqu'à 80 g/l). L'azote favorise

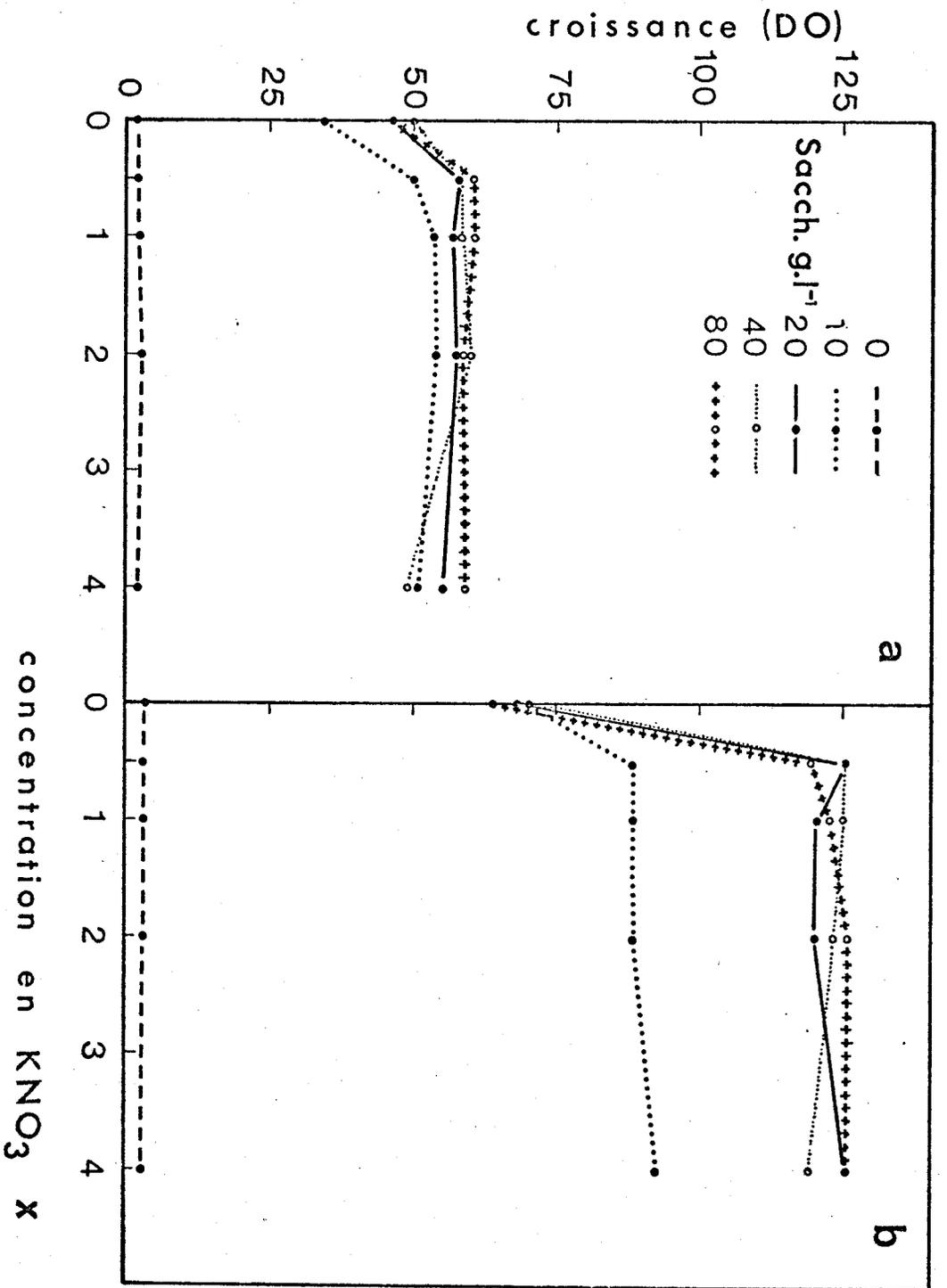


Figure VIII : Action conjuguée de la concentration en nitrate de potassium et en saccharose sur la croissance de cultures clonales d'*Ustilago violacea*, en milieu liquide agité (KNO₃ x 1 et Sacch. = 20 g.l⁻¹ sont les concentrations du nitrate de potassium et du saccharose du milieu d'entretien), après 2 jours (a) et 4 jours (b).

également la croissance végétative jusqu'à environ 200 mg/l mais des doses supérieures ne la réduisent pas non plus.

Le rapport carbone/azote qui contrôle la sexualisation de nombreux champignons (Hall, 1971, DEHORTER, 1972) n'intervient pas sur la conjugaison de l'Ustilago violacea, que ce soit pendant la culture mixte ou pendant la culture clonale précédant le mélange des mating-types, mais les teneurs en carbone et en azote ne doivent pas dépasser respectivement 20 g/l et 200 mg/l. On remarque que les doses qui favorisent la croissance végétative et la conjugaison sont les mêmes.

Les résultats obtenus jusqu'ici, montrent que la réduction de l'aptitude à conjuguer qui se manifeste dans les cultures clonales entretenues en milieu liquide agité (fig.V) ne peut s'expliquer ni par le vieillissement des cellules (fig.VII) ni par l'augmentation de la densité cellulaire (Tableau 29), ni par une diminution -même importante- de l'azote ou du carbone (Tableau 30 et 31) ; et nous avons vérifié que le pH -qui varie de 5,6 à 7,4 en 7 jours de culture- intervient très peu. On peut donc supposer qu'au cours de la croissance végétative, les sporidies rejettent dans le milieu des substances qui inhibent la conjugaison.

g) Mise en évidence de facteurs inhibiteurs de la conjugaison

Nous avons réalisé une série de microcultures mixtes sur du milieu de Lescure neuf, sur un filtrat provenant d'une culture clonale de 10 jours et sur de l'eau distillée, dans les conditions favorables suivantes : température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, obscurité, densité cellulaire d'environ 1.10^7 cellules/ml. L'expérience effectuée avec des sporidies âgées de 48 h et de 10 jours montre que le filtrat inhibe totalement la conjugaison, alors que l'eau distillée et le milieu de Lescure neuf fournissent des taux de conjugaison très élevés (Tableau 32). Des vérifications effectuées après 48 h et 3 jours montrent qu'il s'agit bien d'une inhibition et pas d'un simple retard. L'origine des substances mises en cause peut être double : sécrétions des sporidies ou rejet dans le milieu dû à la lyse de cellules âgées. Dans les deux cas, il est normal que la concentration des produits augmente au fur et à mesure du vieillissement des cultures et donc que l'aptitude à conjuguer des sporidies diminue progressivement : c'est bien

MILIEU DE CULTURE	TAUX DE CONJUGAISON	
	Exp. 1	Exp. 2
Lescure neuf	75,7	80,7
Filtrat de 10 jours	0	0
Eau distillée	82,2	78,1

Tableau 32 : Mise en évidence de facteurs inhibiteurs de la conjugaison dans un filtrat (milieu dans lequel les sporidies se sont multipliées pendant 10 jours). L'ensemencement des microcultures est effectué avec des sporidies de 48 heures (Exp. 1) ou de 10 jours (Exp. 2)

ce que l'on constate sur la fig. V

h) Essais de caractérisation des facteurs inhibiteurs

Les inhibiteurs sont-ils des petites molécules ou des protéines ?

Des filtrats provenant de cultures clonales sont divisés en trois fractions : la première est utilisée telle quelle, la seconde est autoclavée à 110°C pendant 25 minutes, la troisième est dialysée pendant 24 heures contre de l'eau distillée. Des sporidies âgées de 2 ou 3 jours sont séparées de leur milieu et remises en suspension dans chacune des fractions à la densité d'environ 1.10^7 cellules/ml. Les microcuvettes renfermant 1 ml des suspensions sont placées pendant 24 h à l'obscurité, à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Les taux de conjugaison (Tableau 33) montrent que les substances inhibitrices sont thermostables et dialysables. La fraction dialysée fournit des taux de conjugaison variant selon les conditions expérimentales, mais qui peuvent égaler ceux obtenus avec du milieu neuf.

MILIEU DE CULTURE		TAUX DE CONJUGAISON		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Filtrat	brut	0	0	0
	autoclavé	0	0	0
	dialysé	65,4 ± 5	22,8 ± 3	65,5 ± 6
Lescure	neuf	-	57,6 ± 8	60,1 ± 4

Tableau 33 : Essai de caractérisation des facteurs inhibiteurs de la conjugaison

le filtrat provient de culture clonale de 7 jours (Exp. 1) ou de 10 jours (Exp. 2 et 3).

i) Essais de culture in vitro de filaments dicaryotiques

1) Observation de filaments dans des cultures axeniques

On sait que dans la nature, les sporidies conjuguées donnent naissance à des filaments dicaryotiques qui pénètrent dans les tissus de la plante hôte. In vitro, ces filaments sont rarement observés chez l'Ustilago violacea.

Dans les microcultures destinées à dénombrer les conjugaisons, nous observons de temps en temps des filaments dicaryotiques, ou supposés tels parce qu'issus de la conjugaison de deux sporidies. Le plus souvent, le filament mycélien se développe à partir de l'une des deux sporidies conjuguées (Planche II) et très rapidement, l'autre sporidie se vide de son contenu cytoplasmique. Quelquefois, le filament se forme à partir du tube de conjugaison (Planche II). Quelle que soit leur origine, ils ont une croissance limitée, dépassant rarement 25 µm et ne se ramifient pas. Beaucoup plus rarement encore, nous observons des filaments émettant des sporidies, soit à leur base (Planche II), soit à leur extrémité (Planche II). Pour Day et Jones (1968), ces filaments bourgeonnants -qui sont semble-t'il

ceux qu'ils observent le plus fréquemment- marquent un retour vers un stade levuroïde haploïde ou diploïde. Mais il n'est pas impossible que ces figures correspondent à des conjugaisons anormales entre un filament présumé dicaryotique et une sporidie haploïde. En effet, les conjugaisons entre partenaires multiples (le plus souvent 3) ne sont pas rares (Planche I), et nous avons déjà signalé que des conjugaisons pouvaient s'effectuer entre des éléments très variés.

Dans les microcultures, le pourcentage de conjugaison produisant un filament est toujours très faible : moins de 1.10^{-4} . Pour pouvoir faire des observations pendant une période relativement longue, sur une même population de sporidies conjuguées, nous avons adopté une technique de culture en goutte pendante.

Bien que les sporidies restent vivantes pendant une quinzaine de jours, les filaments ne sont pas plus nombreux et leur croissance s'arrête dès qu'ils mesurent 30 à 35 μm .

2) Recherches en vue de cultiver le mycélium dicaryotique

Nous avons réalisé une culture associée de sporidies compatibles et de colonies tissulaires de Silene alba. Les sporidies non conjuguées présentes dans la goutte de suspension déposée sur le tissu se multiplient très rapidement et recouvrent en quelques jours la surface du milieu gélosé, rendant les observations d'éventuels filaments mycéliens très difficiles.

La culture associée de sporidies (souche L) et de cellules relativement isolées de Silène provenant de cultures entretenues en milieu liquide agité (Dubois et Bouriquet, 1974) est plus fructueuse. Les essais ont été conduits en goutte pendante avec du milieu de Lescure conditionné (les cellules isolées de Silène y ont séjourné pendant 10 jours. Les sporidies demeurent vivantes pendant une quinzaine de jours, les cellules de Silène, un peu plus d'une semaine. Des filaments dicaryotiques se forment de préférence sur le pourtour des amas cellulaires. Leur nombre varie beaucoup selon les cultures : une dizaine dans les cas les plus favorables ; de nombreuses cultures n'en renferment qu'un ou deux, et certaines pas du tout. Avec du milieu de Lescure neuf, le bourgeonnement des sporidies est beaucoup plus intense et les pourcentages de conjugaisons et de filaments sont plus faibles après une semaine de culture.

Des cultures effectuées dans les mêmes conditions mais sans cellules de Silène fournissent également des filaments. Comme par ailleurs nous n'avons jamais constaté de contact entre une hyphes mycélienne et une cellule de la plante hôte, bien que la distance les séparant fût quelque-

fois très faible, on ne peut conclure à un effet favorable des cellules sur l'induction ou la croissance des filaments. Tout au plus, peut-on signaler un effet favorable de la part des milieux conditionnés. Il peut être provoqué par l'appauvrissement du milieu, aussi bien que par la présence de substances inductrices.

j) Conclusions

- Les cultures clonales de sporidies secondaires de l'Ustilago violacea, entretenues en milieu liquide agité depuis plus d'une année, gardent la possibilité de conjuguer quand on les mélange dans des conditions favorables.

- Les taux de conjugaison les plus élevés sont obtenus lorsque les sporidies, prélevées dans des cultures clonales repiquées depuis 24 ou 48 heures, sontensemencées en mélange à une densité initiale d'environ 5.10^6 cellules/ml, dans un milieu liquide relativement peu concentré en sucre (moins de 20 g/l de saccharose) et en azote (environ 200 mg/l).

- Les milieux dans lesquels se développent les cultures clonales inhibent plus ou moins la conjugaison. Cette inhibition, qui est totale après une dizaine de jours de culture, n'est pas due à une modification du pH ni à un épuisement du milieu. Elle est provoquée par des substances thermostables et dialysables rejetées dans le milieu par les sporidies végétatives ou provenant des cellules mortes.

- Moins d'une conjugaison sur 10 000 produit un filament mycélien. Des essais de cultures associées avec des tissus ou des cellules du Silene alba ou des cultures en présence de filtrats provenant de suspensions cellulaires de Silène, n'ont pas permis d'obtenir des pourcentages de filaments plus importants, ni un meilleur développement de ces derniers.

INFECTION EXPERIMENTALE DE SILENE ALBA ET SILENE DIOICA PAR L'USTILAGO VIOLACEA

Nous avons tenté d'infecter des plantules, des rosettes et des fragments de tiges, par des inoculums d'Ustilago violacea d'origines différentes.

Le but de ces expériences était de déterminer le pouvoir pathogène de ces inoculums et de préciser le stade de développement des silènes le plus favorable à la pénétration du parasite.

I PREPARATION DES INOCULUMS

=====

a) Souche levuroïde haploïde (clone n° 8)

Cette souche a été cultivée en milieu liquide agité (milieu de Lescure). Après 8 jours de culture, nous prélevons un volume déterminé de la suspension cellulaire que nous diluons au 1/3 et nous l'inoculons à des plantules ou à des explantats.

b) Suspension de téliospores

Des téliospores prélevées aseptiquement dans des fleurs obtenues in vitro à partir de fragments de tiges parasitées de Silene alba sont concentrées dans de l'eau stérile, environ 2 heures avant utilisation pour infecter des plantes en rosettes et des fragments de tiges de Silene alba.

c) Les dicaryons

A partir des clones compatibles 8 et 9, nous réalisons une suspension mixte pour obtenir des dicaryons.

Les sporidies (+) et (-) âgées de 48 heures sont mélangées à volume égal, en tenant compte de la concentration de la suspension, puisque les cultures très riches en sporidies sont défavorables à la formation des dicaryons. Le mélange est maintenu à 20°C dans des conditions aseptiques pendant 24 heures avant utilisation, de manière à obtenir un taux élevé (>60 %) de dicaryons. Cet inoculum servira à infecter des plantules, des plantes en rosettes et des fragments de tige de Silene alba et Silene dioica.

d) Mycélium dicaryotique

On considère jusqu'à présent que seul le mycélium dicaryotique peut se développer à l'intérieur des tissus des silènes. Les travaux de Hassan et MacDonald (1971) ayant montré que ce mycélium était plus abondant au niveau des noeuds que des entrenoeuds, nous avons essayé d'étudier son action parasitaire en déposant des fragments de tissus découpés au niveau des noeuds de tiges parasitées (contenant donc le mycélium dicaryotique) sur des noeuds provenant de tiges saines.

II MODE D'INFECTION

a) Les explantats

Les explantats prélevés au niveau des noeuds de jeunes tiges saines sont infectés, soit en injectant à la seringue 0,1 ml d'inoculum (suspension de spores, de sporidies haploïdes ou de dicaryons) au niveau du bourgeon axillaire, soit en déposant sur les bourgeons une goutte de l'inoculum, soit en trempant le noeud entier pendant 6 heures dans l'inoculum, soit enfin par contact avec un fragment de tissu parasité.

b) Les plantules

Les plantules de Silene alba et Silene dioïca ont été infectées soit par immersion complète pendant 6 heures, soit en trempant seulement les racines dans l'inoculum. Les premières ont été cultivées en serre et in vitro, les secondes n'ont été cultivées qu'en serre.

c) Les rosettes

Les rosettes provenant du développement de plantules saines ont été infectées par injection de l'inoculum à l'aide d'une seringue. L'injection se fait au centre de la rosette, de façon à toucher le bourgeon central.

d) Milieux de culture

Les plantules, après avoir été infectées expérimentalement, sont placées certaines en champ ou en serre comme les plantes en rosettes, d'autres comme les fragments de tige, sont cultivées aseptiquement sur un milieu gélosé renfermant du glucose (3 % dans le cas des plantules, 6 % dans celui des explantats) ainsi que les éléments nutritifs de la solution de Murashige et Skoog.

III RESULTATS EXPERIMENTAUX

=====

a) Action d'une souche levuroïde haploïde de l'*Ustilago violacea* sur les fragments de tige de *Silene alba*.

10 jours après la mise en culture des noeuds infectés par la souche levuroïde, les tiges secondaires formées in vitro sont tout à fait semblables aux tiges saines observées au cours de la floraison in vitro. Les colonies levuroïdes se multiplient rapidement sur les explantats et atteignent la surface du milieu de culture où elles constituent une masse pâteuse autour des noeuds. Aucune structure mycélienne n'a été constatée. Le phénomène de castration parasitaire qui caractérise le développement du champignon dans l'hôte n'a pas été observé dans cette expérience qui portait sur 15 paniers de 24 tubes de culture. Par ailleurs, le nombre anormalement faible de reprises des explantats laisse supposer que les colonies levuroïdes haploïdes de l'*Ustilago violacea* gênent le développement des noeuds cultivés in vitro.

b) Action d'une souche levuroïde haploïde de l'*Ustilago violacea* sur les plantules de *Silene alba*

Les plantules immergées pendant six heures dans l'inoculum sont ensemencées sur le milieu gélosé de Murashige et Skoog contenu dans des bouteilles à large ouverture.

Après 4 jours de culture, correspondant à la période d'adaptation des plantules sur leur nouveau milieu, la reprise paraît bonne. Un mois plus tard, alors que les témoins se développent normalement, qu'ils forment de nouvelles feuilles et que leurs tiges s'épaississent, la croissance des plantules infectées est bloquée par le développement très rapide des sporidies qui couvrent presque toute la surface du milieu de culture. Après deux mois, la presque totalité des plantules infectées meurt intoxiquée par la présence du champignon.

La souche haploïde de l'*Ustilago violacea* qui s'était déjà révélée inhibitrice de la croissance des colonies tissulaires de *Silene alba* et incapable de parasiter les explantats cultivés in vitro, est aussi toxique pour le développement des plantules de silène.

c) Infection de noeuds provenant de tiges saines par le mycélium dicaryotique

Des noeuds prélevés sur des tiges saines mis en contact avec des fragments de tissu parasite renfermant le mycélium dicaryotique, sont ensemencés sur le milieu gélosé de Murashige et Skoog.

A partir du 2^e jour de culture, la plupart d'entre eux sont envahis par des champignons autres que l'Ustilago violacea ; quand nous avons pu éviter ces pollutions, les fleurs néoformées sont indemnes du champignon. L'hypothèse qui consistait à croire que le mycélium dicaryotique contenu dans les tissus parasites passerait dans les tissus sains n'a malheureusement pas pu être vérifiée.

d) Infection des silènes par les téliospores de l'Ustilago violacea

1) Infection des plantules de Silene alba cultivées en serre

Des plantules de Silene alba âgées de deux semaines sont immergées pendant 6 heures dans une suspension renfermant à la fois des téliospores, des sporidies haploïdes et des sporidies conjuguées. Elles sont ensuite repiquées en pots. Après un mois de culture, ces plantules forment des rosettes comparables à celles obtenues avec des plantes n'ayant pas été soumises à l'action du champignon.

Les premiers boutons floraux apparaissent après 2 mois et les fleurs s'épanouissent deux semaines plus tard.

Dans ce cas, nous avons pu constater que 11 pieds mâles sur 14 et 18 pieds femelles sur 21 étaient parasités par l'Ustilago violacea. Toutefois, la méthode utilisée ne permet pas de savoir si l'agent infectieux était représenté par les téliospores ou les sporidies conjuguées.

2) Les rosettes cultivées en serre

Les rosettes de Silene alba sont infectées au niveau du bourgeon terminal par une suspension concentrée de téliospores. Quatre mois plus tard, 6 plantes sur 10 portaient des fleurs dont la moitié (2 pieds femelles et 1 pied mâle) étaient parasitées par l'Ustilago violacea.

3) Les fragments de tiges de Silene alba cultivés in vitro

Des noeuds provenant de plantes saines sont infectés par une suspension de téliospores. Un mois plus tard, 105 explantats sur 144 portaient

des fleurs. Une observation rigoureuse des fleurs mâles et femelles ne révèle aucune modification morphologique caractérisant la présence de l'Ustilago violacea.

4) Conclusion

Les téliospores de l'Ustilago violacea se sont montrées pathogènes sur les rosettes cultivées en serre, et probablement sur les plantules cultivées dans les mêmes conditions. Les résultats négatifs enregistrés sur les noeuds cultivés in vitro seraient peut-être provoqués par une mauvaise germination des téliospores.

e) Infection des silènes par les sporidies conjuguées

1) Silènes cultivées en serre

1.1. plantules de Silene dioica

Les plantules infectées par immersion dans la suspension de sporidies conjuguées se développent en rosettes. Beaucoup d'entre elles sont restées à ce stade sans qu'on puisse préciser si elles étaient parasitées ou non. Certaines ont néanmoins manifesté le phénomène de montaison ; parmi ces dernières, aucun pied femelle n'était parasité, alors que 7 pieds mâles sur 7 l'étaient.

Notons aussi que le parasitisme de ces pieds a été obtenu à partir de dicaryons provenant de la germination de téliospores récoltées dans les anthères de Silene alba ; c'est donc le même Ustilago violacea qui parasite les deux espèces de silènes.

1.2 plantules de Silene alba infectées par les racines

On pouvait se demander si tous les organes de la plantule étaient réceptifs et si par exemple les racines pouvaient être une voie d'infection. Nous avons donc entrepris des expériences identiques aux précédentes, mais en prenant soin de n'immerger pendant 6 heures que les racines dans la suspension de dicaryons. Les plantules sont ensuite repiquées en serre.

En fin de culture, les anthères de 9 pieds mâles et de 16 pieds femelles étaient bourrées de téliospores d'Ustilago violacea ; 5 pieds étaient restés en rosettes.

La méthode d'infection par la racine donne donc des résultats positifs qui montrent que les racines peuvent constituer une voie de pénétration du parasite.

1.3 rosettes de Silene alba et Silene dioica

Afin de vérifier que le stade plantule n'était pas le seul sensible à l'Ustilago violacea, nous avons réalisé des infections expérimentales quand les plantes (âgées d'environ 4 mois) avaient atteint le stade de rosette. Nous avons alors injecté au mois de Mai l'inoculum constitué de dicaryons au niveau du bourgeon terminal de Silene alba et Silene dioica.

L'expérience a porté sur 5 pots de chaque espèce. 3 pieds femelles et 1 pied mâle de l'espèce alba étaient parasités par l'Ustilago violacea ; le 5e pot est resté en rosette jusqu'à la fin de l'expérience.

L'espèce dioica avait un pied mâle et un pied femelle parasités ; 2 pieds mâles portaient des fleurs parfaitement saines et un pied est resté à l'état de rosette.

2) Silènes cultivées en champ

Les rosettes de Silene alba et Silene dioica infectées de la même façon que celles maintenues en serre, sont cultivées dans un champ où elles ont passé l'hiver. A la belle saison, elles se développent et fleurissent. Dans le cas de Silene alba, 10 pieds mâles sur 15 et 18 pieds femelles sur 19 étaient parasités ; avec Silene dioica, 5 pieds mâles sur 10 et 7 pieds femelles sur 10 étaient également parasités.

Ainsi, les plantes au stade rosette peuvent être infectées et le champignon résiste au froid hivernal.

Nous avons également réalisé des infections avec les deux souches 8 et 9, haploïdes et compatibles, réunies quelques minutes seulement avant l'expérience, de façon que l'infection soit réalisée par des sporidies non conjuguées. Cette suspension a été injectée à des rosettes de Silene dioica. 4 pieds mâles sur 5 et 5 pieds femelles sur 5 étaient parasités à la fin de l'expérience.

En conséquence, les sporidies conjuguées (dicaryons) ont un pouvoir pathogène à l'égard des deux espèces de silènes, quel que soit leur stade de développement, quelles soient cultivées en serre ou en champ. D'autre part, il n'est pas indispensable d'attendre que les sporidies conjuguent pour réaliser ces infections, puisque la réunion de deux clones compatibles suffit pour provoquer le phénomène de castration parasitaire sur Silene alba et Silene dioïca.

3) Silènes cultivées in vitro

Après avoir montré qu'il était possible d'obtenir in vitro des fleurs de silènes parasitées par l'Ustilago violacea, à partir d'explantats déjà infectés dans la nature et qu'il était aussi possible de réaliser des infections artificielles sur des plantes entières cultivées en pot, nous avons tenté d'infecter à l'aide de dicaryons des plantes entières cultivées aseptiquement, des fragments de tiges ou des colonies tissulaires cultivées in vitro.

3.1 les plantules de Silene alba

Des graines de Silene alba sont mises à germer dans des conditions aseptiques ; lorsque les plantules ont atteint 3 cm, elles sont immergées pendant 6 heures dans l'inoculum constitué par une suspension de dicaryons. Elles sont ensuite transplantées sur un milieu gélosé comprenant les éléments nutritifs de la solution de Murashige et Skoog et 3 % de glucose. Le développement des plantules est tout d'abord normal, elles ne tardent pas à former de petites rosettes, mais leur croissance s'arrête rapidement. Pendant ce temps, sporidies et dicaryons se multiplient très activement par bourgeonnement, forment des colonies qui s'étalent et s'épaississent à la surface du milieu, inhibent les plantules qui jaunissent et se nécrosent.

3.2 fragments de tiges

Des explantats prélevés au niveau des noeuds de tiges saines de Silene alba et Silene dioïca sont préparés pour être cultivés in vitro. Au moment de l'ensemencement, on les infecte à la seringue au niveau du bourgeon axillaire, avec 0,1 ml environ d'un inoculum constitué par une suspension de sporidies conjuguées.

Après un mois de culture, l'espèce alba présente 17 explantats sur 73 portant des fleurs parasitées. Quant à l'espèce dioïca, le nombre

d'explantats ayant fleuri était faible parce que les noeuds étaient déjà très lignifiés. Néanmoins, 5 pieds sur 13 étaient infectés par le champignon.

Nous avons recommencé la même expérience en variant le mode d'inoculation. Au lieu d'injecter, nous déposons à la seringue une goutte correspondant à 0,1 ml de la suspension de dicaryons : seulement 6 explantats de Silene alba sur 84 étaient parasités par l'Ustilago violacea.

Au cours de ces expériences d'infections expérimentales, le seul critère que nous avons retenu pour affirmer que la plante était ou non parasitée, était la présence des fleurs charbonnées. Il est possible que d'autres explantats n'ayant pas encore fleuri renferment aussi du mycélium dicaryotique, mais nous n'avons pas fait d'observations cytologiques.

Quoi qu'il en soit, ces essais montrent cependant que le cycle complet de l'Ustilago violacea peut être obtenu dans des conditions rigoureusement contrôlées.

3.3 les tissus isolés de Silene alba

Nous nous sommes demandé si l'Ustilago violacea, parasite obligatoire, pouvait effectuer son cycle de développement en présence de tissus de l'hôte, sans différenciation florale. Nous avons donc mis en culture (milieu de Murashige et Skoog, 3 % de glucose $2,4 \text{ D } 10^{-7}$) des fragments de 250 mg prélevés sur des colonies tissulaires de Silene alba. A l'aide d'une seringue, nous déposons à la surface des explantats environ 0,1 ml d'inoculum (suspension de sporidies conjuguées).

La présence du champignon réduit très fortement la croissance des tissus qui finissent par se nécroser, alors que les sporidies se multiplient rapidement, envahissent les tissus et le milieu de culture.

Une observation au microscope montre que les sporidies qui se développent fusionnent entre elles sans donner de filaments mycéliens. Nous n'avons pas observé non plus la formation des téliosporos sur ces tissus.

Nous avons recommencé l'expérience en infectant les tissus lorsque les colonies tissulaires sont en pleine croissance (environ 2 g). La goutte d'inoculum est déposée de façon qu'il n'y ait aucun contact entre le champignon et le milieu de culture. Le résultat est le même que précédemment avec un délai plus long.

CONCLUSION

=====

En résumé, nous constatons que les clones 8 et 9 d'Ustilago violacea que nous avons isolés au laboratoire depuis 15 mois et entretenus régulièrement dans des conditions aseptiques, ont conservé leur pouvoir pathogène. Toutefois, comme cela avait déjà été signalé (Hassan et MacDonald, 1971), nous confirmons que les sporidies haploïdes qui ne peuvent pas produire de filaments dicaryotiques sont incapables de parasiter les silènes, alors que les sporidies conjuguées ont un bon pouvoir pathogène.

Les inoculums que nous avons utilisés proviennent de téliospores récoltées dans des anthères de Silene alba, ils sont susceptibles d'infecter aussi Silene dioica ce qui souligne que l'Ustilago violacea n'a pas de spécificité très stricte. De plus, la pénétration du champignon dans les tissus de l'hôte semble se faire de façon identique dans les pieds mâles et femelles de deux espèces.

Les essais réalisés sur des plantes entières ont permis de montrer que l'infection pourrait avoir lieu à différents stades de développement de la plante. La pénétration du parasite peut se faire par différents organes, les bourgeons et les racines étant particulièrement favorables à cette pénétration. Par ailleurs, alors que la température et la lumière jouent un rôle important dans la floraison des silènes, il semblerait que le champignon résiste très bien au froid hivernal. L'Ustilago violacea est certes un parasite strict, c'est-à-dire qu'il ne peut pas effectuer son cycle de développement sur milieu synthétique ; mais il ne le peut pas non plus sur les cellules vivantes des colonies tissulaires de Silene alba, il semble donc que les relations hôte-parasite soient très étroites et que le champignon ne puisse avoir son développement complet que par l'intermédiaire des anthères de silènes, sans qu'on sache d'ailleurs exactement pourquoi.

Du reste, après avoir obtenu la floraison in vitro des silènes, nous avons réalisé le cycle du champignon dans des conditions rigoureusement contrôlées et dans un délai relativement court (1 mois).

CONSIDERATIONS GÉNÉRALES

Beaucoup de travaux sur les champignons parasites se rapportent à la germination des téliospores et à leur culture en milieux artificiels (Nielsen, 1972 ; Zambettakis, 1973). Certains auteurs ont précisé l'action de la lumière (Becerescu, 1973, KRAJNY, 1974), de la température ou du pH (Huguenin, 1974).

Pour aborder plus aisément les relations hôte-parasite, nous avons été amené à utiliser un milieu permettant à la fois la croissance des tissus de l'hôte et celle du champignon. Toutefois, l'étude de la germination des téliospores de l'Ustilago violacea nous a permis de constater qu'elles germent facilement sur des milieux très divers ; les bons résultats obtenus, même sur l'eau distillée stérile, soulignent que les téliospores n'ont aucune exigence particulière. Hassan et MacDonald (1971) ont d'ailleurs montré qu'elles germent aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité à des températures comprises entre 5 et 38°C. Cette indifférence n'est cependant pas générale puisque les téliospores d'Ustilago tritici germent mieux à l'obscurité qu'à la lumière qui exerce une inhibition marquée entre 460 et 600 nm (Krajny, 1974). Signalons aussi que Forsyth (1955) a mis en évidence un phénomène d'auto-inhibition de la germination des Uredospores de Puccinia graminis var. tritici par suite de l'émission de triméthylethylène. Si la germination de l'Ustilago violacea ne nécessite aucune substance nutritive, le développement ultérieur exige d'une part, la présence de vitamine B₁, ce qui confirme les résultats de Schopfer et Blumer (1938), d'autre part, celle d'un sucre, par exemple le glucose ou le saccharose que nous préconisons à la dose de 2 %. Toutefois, contrairement à ce qu'on observe avec les tissus de Phanérogames, les fortes doses (100 g/l) n'inhibent pas la croissance du champignon. La température optimale de cette croissance est de l'ordre de 25°C ; elle est presque nulle en-dessous de 2,5°C et au-dessus de 35°C.

Comme la germination des téliospores, la conjugaison des sporidies (+) et (-) ne semble pas avoir d'exigences nutritives particulières, puisque nous l'avons obtenue à un taux élevé, aussi bien dans l'eau distillée que sur le milieu nutritif de Lescure.

Elle n'est pas influencée par le rapport C/N du milieu comme c'est parfois le cas (Huguenin, 1974). Elle se déroule aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière, alors que chez de nombreuses espèces de champignons, l'induction lumineuse, à un stade déterminé, est indispensable à la sexualisation (Toussoun et Weinhold, 1967 ; Dehorter, 1972 ; MERIMOTO et ODA, 1974). Parfois même, comme chez Coprinus congregatus, l'influence de la lumière est encore plus complexe (Manachere, 1970).

L'âge des sporidies d'Ustilago violacea, leur densité dans le milieu de culture et la température influent sur la conjugaison qui est inhibée au-dessous de 10°C et au-dessus de 22°C. L'inhibition provoquée par les températures élevées est à rapprocher du blocage de la reproduction sexuée mise en évidence chez divers ascomycètes (Henriksson et Morgan Jones, 1962 ; Dehorter, 1972), bien que ce ne soit pas un phénomène général, puisque chez Sordaria fimicola le maximum de périthèces est obtenu pour des températures élevées (Hall, 1971). D'ailleurs, des températures, même peu élevées, influent sur la fructification des Basidiomycètes, car le nombre de carpophores produit par diverses agariales est réduit entre 14 et 20°C (Flegg, 1968), alors que la température optimale pour la fructification de Agaricus bisporus est comprise entre 14,5 et 16,5°C (Atkins, 1966).

Le pourcentage de mycéliums dicaryotiques formés par les sporidies conjuguées reste toujours faible, quelles que soient les conditions réalisées. L'Ustilago violacea se comporte donc différemment de l'Ustilago nuda dont on cultive facilement le mycélium dicaryotique en milieu synthétique, mais dont l'isolement des sporidies haploïdes exige des conditions particulières (Nielsen, 1972). Même si l'opinion de Baker (1947) et celles de Hassan et MacDonald (1971) étaient un peu trop pessimistes quand ils affirmaient que la culture du mycélium dicaryotique était impossible en dehors de l'hôte, il nous faut reconnaître que malgré nos différents essais, nous n'avons pas encore précisé les modalités de cette culture. Rappelons aussi, quoi que nous n'ayons pas expérimenté dans ce domaine, que les rayons X selon leurs doses peuvent, soit stimuler, soit inhiber la croissance du mycélium dicaryotique de U. nuda, U. tritici, U. nigra, U. avena, U. hordei, et U. cyne-dontis (Becerescu, 1973). Il serait peut-être intéressant en ce qui concerne l'Ustilago violacea de vérifier l'action de ce facteur.

Nous avons aussi constaté que les sporidies excrètent des substances inhibitrices de la conjugaison. Il s'agit de petites molécules thermostables. Quoi que nous n'ayons pas encore précisé leur nature, il n'est pas exclu

qu'il s'agisse d'acides aminés ou de sucres particuliers. Nous savons par exemple que certains acides aminés réduisent le pouvoir pathogène de certains champignons (Van Andel, 1966) et que Rhizoctonia solani cultivé en milieu liquide excrète des acides aminés (ac. glutamique, glycolle, histidine, alanine, leucine, isoleucine (Reddy et Rao, 1975). Nous avons également remarqué que l'Ustilago violacea secrète des substances toxiques pour les tissus de Silene alba (Batcho et Dubois, 1974). Cette toxicité n'est d'ailleurs pas spécifique puisqu'elle se manifeste aussi à l'égard des tissus de Carotte, d'Erable ou de Scorsonère. L'identité entre l'inhibition de la conjugaison et l'inhibition de la prolifération des cellules végétales n'a pas été établie et nous nous garderons de comparer les résultats obtenus avec une souche levuroïde se cultivant facilement sur un milieu synthétique et ceux fournis par un mycélium dicaryotique se développant dans les tissus de la plante hôte. Il est peu probable en effet que les substances excrétées par une culture levuroïde puissent être responsables des modifications florales induites par le mycélium dicaryotique de l'Ustilago violacea. Par contre, l'inhibition de la prolifération des tissus isolés et des suspensions cellulaires de Silene alba pourrait expliquer le nanisme observé chez divers silènes parasités par ce champignon (Baker, 1947; Viennot-Bourgin, 1949 ; Evans et Wilson, 1971).

La technique de culture in vitro nous a permis d'obtenir la floraison de Silene alba et Silene dioica dans des conditions satisfaisantes. En mettant en culture des fragments de tiges parasitées, nous avons, dans des conditions aseptiques, et dans un temps relativement court (8 à 15 jours) obtenu des fleurs parasitées ; ce qui nous a permis de résoudre le problème difficile de la désinfection des téliospores et de confirmer par la même occasion l'hypothèse émise par Morel en 1948.

Par la suite, avec des inoculums d'origines différentes (téliospores, sporidies haploïdes, sporidies conjuguées, et mycélium dicaryotique) nous avons infecté des Silene alba et Silene dioica à différents stades de développement (plantules, rosettes, fragments de tiges) et vérifié leur pouvoir pathogène. Soulignons que ces infections sont réalisées sur des plantes cultivées en champ, en serre et in vitro.

Depuis les travaux de Hotson et Cutter (1951), au moins une dizaine de télionycètes, considérées comme des parasites obligatoires ont été cultivées en association avec des tissus isolés de l'hôte ; plusieurs ont même pu se développer, au moins pendant un temps limité, dans des

conditions saprophytiques (Williams et coll., 1967 ; Turel, 1969). Ingram, (1973) a répertorié les espèces ayant donné lieu à des cultures associées, mais il ne signale aucune Ustilaginale. Nous avons obtenu le cycle complet de l'Ustilago violacea dans des conditions rigoureusement contrôlées. Les premières étapes (germination des téliospores, entretien des souches levuroïdes axéniques et conjugaison des sporidies compatibles) s'effectuent en milieu synthétique en dehors de l'hôte. Les dernières étapes (croissance du mycélium dicaryotique, formation des téliospores) se déroulent dans des cultures de fragments de tiges isolées de Silene alba (Batcho et Dubois, 1975).

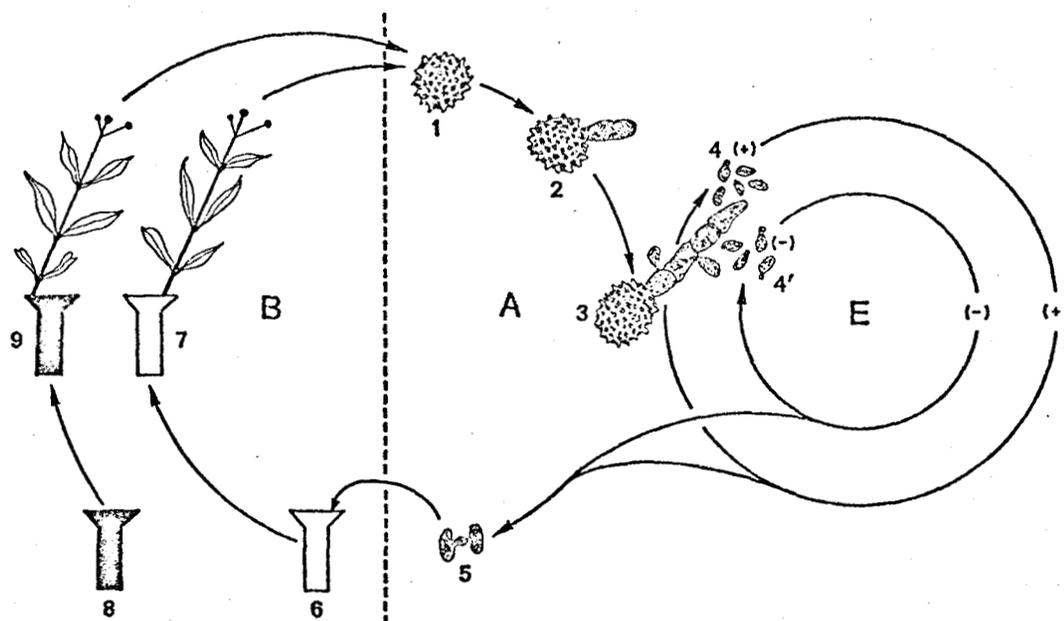


Fig. : IX : Culture *in vitro* de l'*Ustilago violacea*

- A. Phase saprophytique, en milieu synthétique. B. Phase parasitaire : culture associée avec un fragment de tige de *Silene alba* : *en blanc*, fragment de tige prélevé sur une plante saine ; *en noir*, fragment de tige prélevé sur une plante déjà infectée. — 1. Télisporé aseptique ; 2. Germination de la télisporé et formation d'une archéobaside ; 3. Emission des sporidies haploïdes + et - ; 4 et 4'. bourgeonnement des sporidies haploïdes et entretien, E, des cultures levuroïdes ; 5. Conjugaison de deux cellules levuroïdes compatibles ; 6. Infection d'un fragment de tige saine de *Silene alba* par une suspension de cellules levuroïdes conjuguées ; 7. Formation des fleurs charbonnées ; 8. Culture *in vitro* d'un fragment de tige de *Silene alba* prélevé sur une plante déjà infectée ; 9. Formation de fleurs charbonnées.

Le passage de la phase saprophytique à la phase parasitaire est réalisé par injection dans les tissus de l'hôte d'une suspension de sporidies conjuguées.

Certes, Wanderwalle et Sommereyns (1965) ainsi que Nielsen (1968) avaient obtenu des épis charbonneux d'orge, après inoculation de mycélium dicaryotique ou de télisporos d'Ustilago nuda. De même, Hassan et MacDonald (1971) après injection de télisporos d'Ustilago violacea dans les bourgeons axillaires des jeunes plantules ont observé des fleurs charbonnées de Silene dioïca. Mais tous ces travaux ont été réalisés sur des plantes entières cultivées dans la nature et ne permettent pas de préciser les facteurs qui influent sur le développement du champignon et de son hôte.

Notre travail met bien en évidence le pouvoir pathogène des télisporos récoltées in vitro ; il montre aussi que les sporidies haploïdes en sont dépourvues alors qu'elles sont toxiques à l'égard des plantules et des tissus isolés de silènes. L'action parasitaire des sporidies conjuguées s'exerce bien sur les plantules, les rosettes et les fragments de tiges, qu'ils soient cultivés en champ, en serre ou in vitro. Cette action parasitaire n'est d'ailleurs pas altérée par les basses températures hivernales.

Nous avons aussi montré que le même Ustilago violacea peut parasiter Silene alba et Silene dioïca qui sont sensibles au parasite quel que soit leur stade de développement.

Notre travail, à certains égards, s'apparente à celui réalisé par Raynal (1974) sur U. maydis. Cet auteur a pu obtenir des contaminations artificielles, en injectant avec une seringue hypodermique des sporidies cultivées en milieux liquides agités. Radulescu et Munteanu (1967) avaient d'ailleurs remarqué que la contamination par U. maydis était possible pendant toute la période végétative de la plante. Becerescu (1973) a de son côté montré que la pénétration des Ustilaginales (U. nuda, U. ritici, U. nigra, U. hordei) pouvait se faire par des organes très différents sans préférence particulière pour l'un ou l'autre.

Malgré les précisions supplémentaires que nous avons pu apporter sur l'Ustilago violacea et sur ces hôtes habituels Silene alba et Silene dioïca, il nous est encore impossible de dire pourquoi ce champignon ne développe ses télisporos que dans les organes floraux de ses hôtes, ni pourquoi il provoque la différenciation d'anthères dans les fleurs femelles qui en sont normalement dépourvues. Nous espérons que la culture en milieux synthétiques du mycélium dicaryotique pourra nous fournir des informations précieuses dans ce domaine.

Certains dicaryons d'Ustilago violacea, au lieu de produire un mycélium dicaryotique, fusionnent leurs noyaux et deviennent une cellule diploïde. Certaines d'entre elles ont été isolées et étudiées par Day et Jones (1968) qui ont éprouvé leur pouvoir pathogène. Ces diploïdes qu'on peut considérer comme des téliosporos dépourvues de paroi sporale, pourraient excréter dans leur milieu de culture des substances dont l'identification aiderait à élucider le problème de castration parasitaire provoqué par l'Ustilago violacea sur Silene alba et Silene dioica.

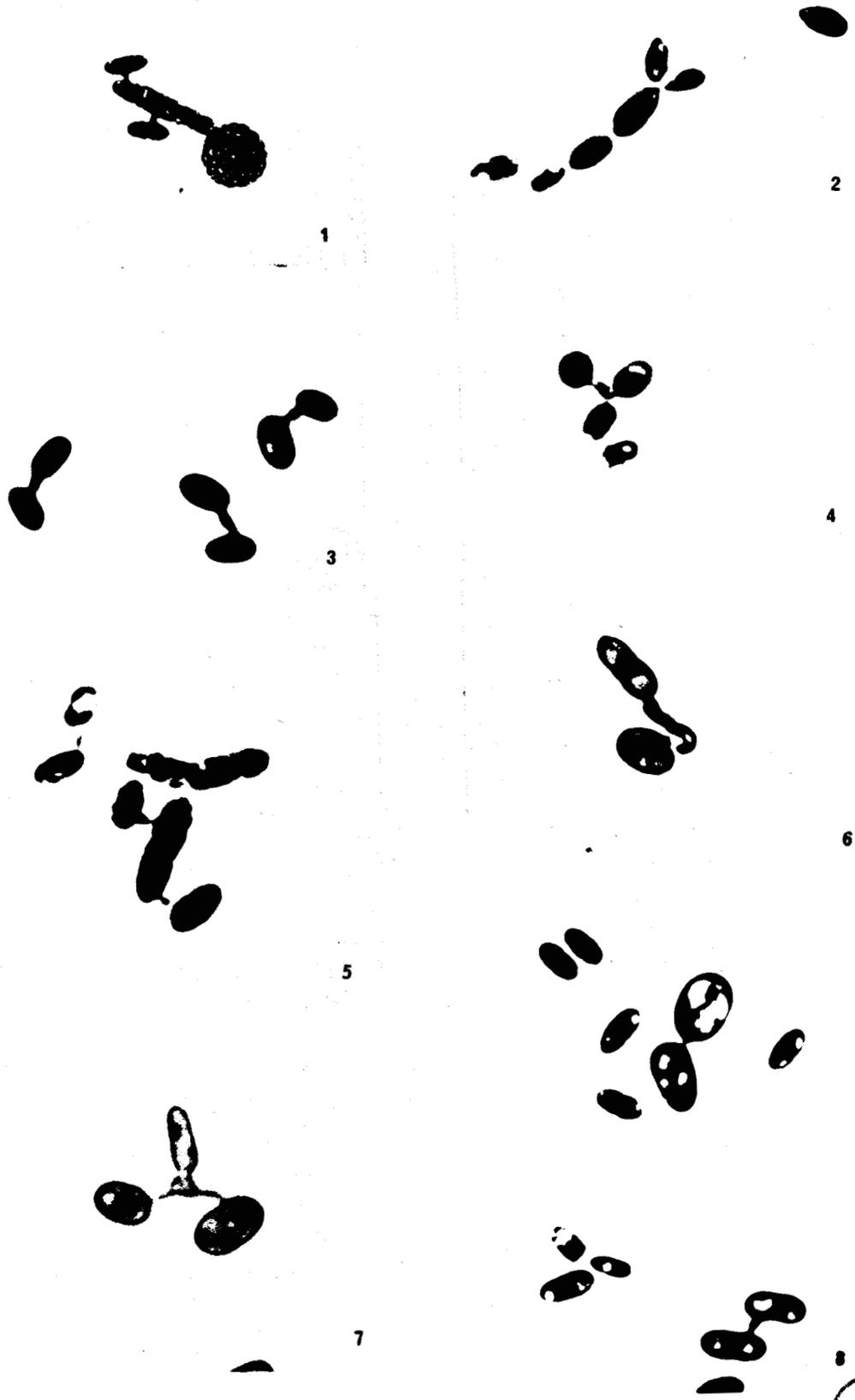
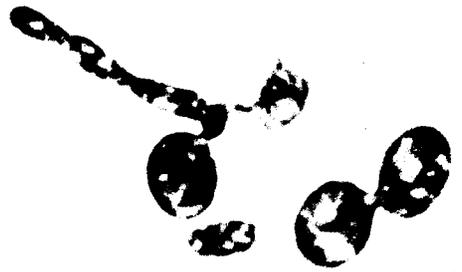
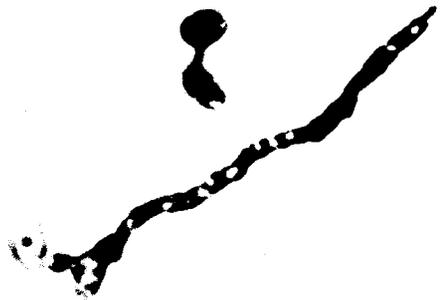


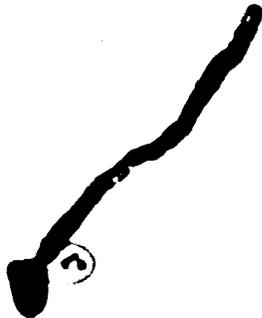
PLANCHE n°1



2



1



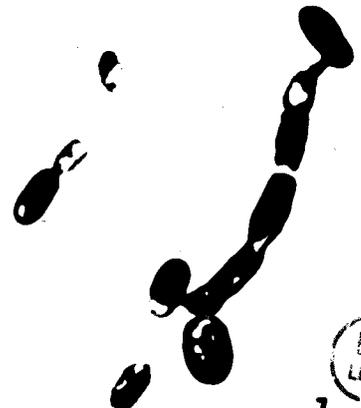
3



3



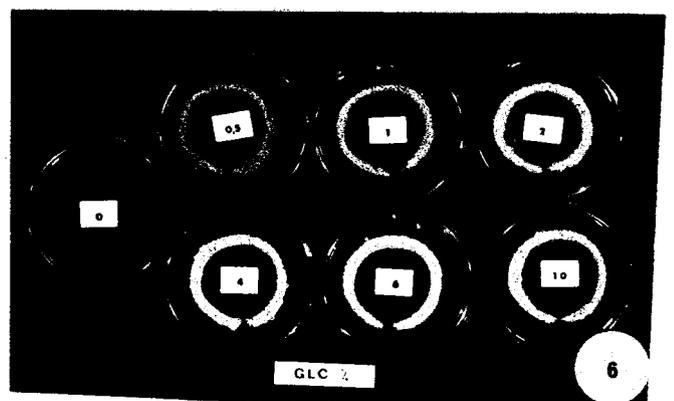
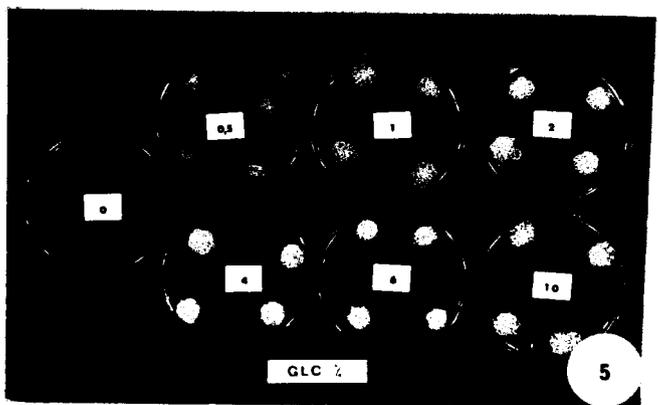
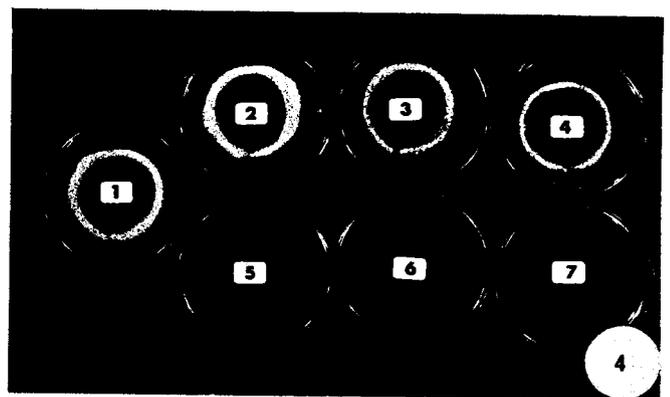
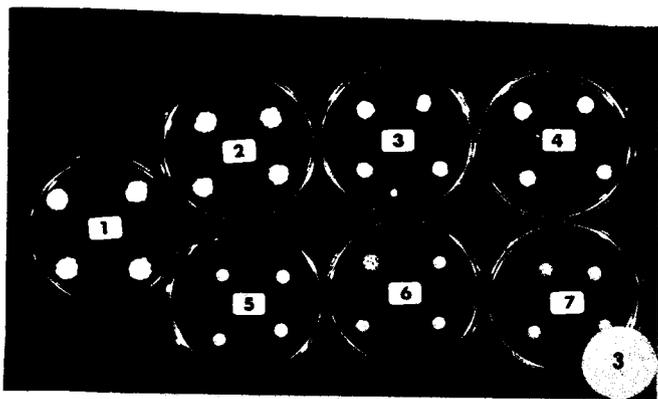
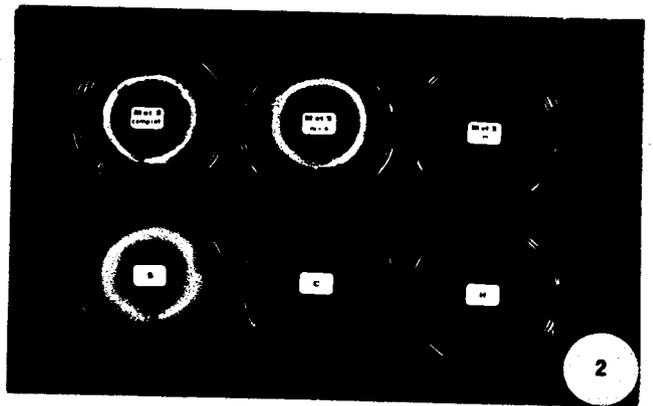
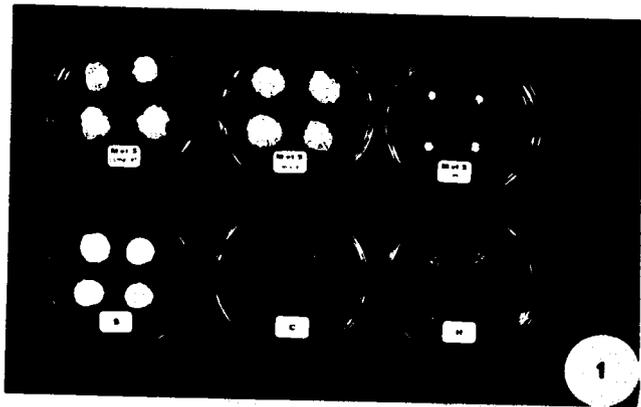
6



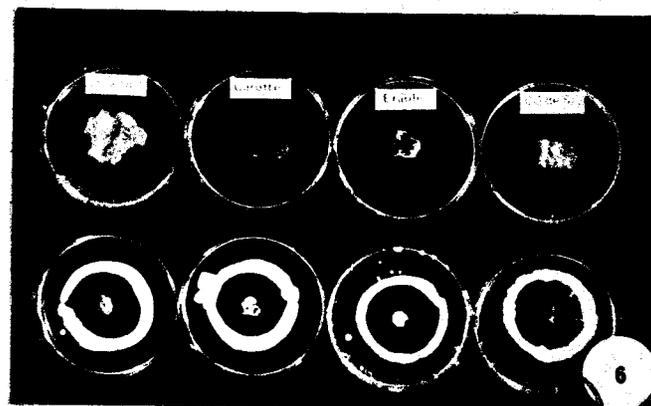
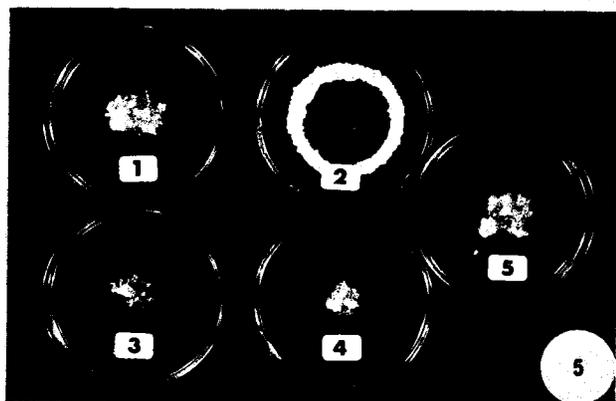
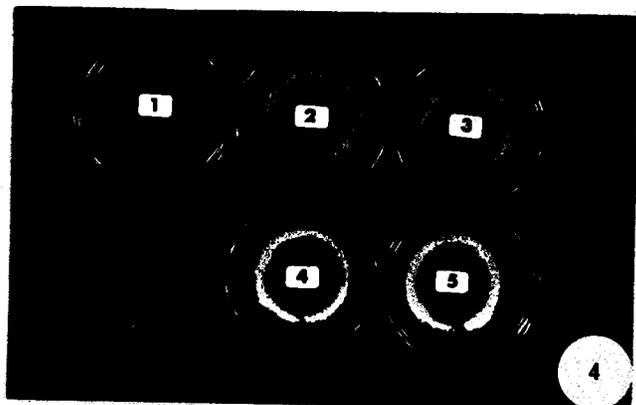
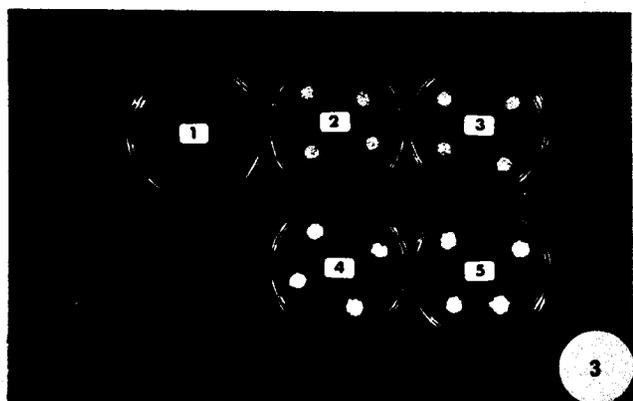
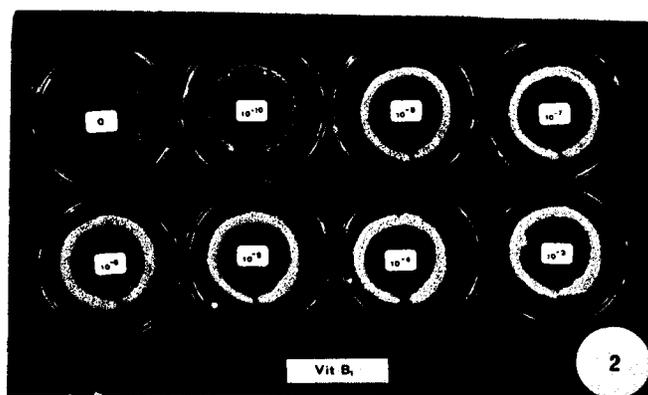
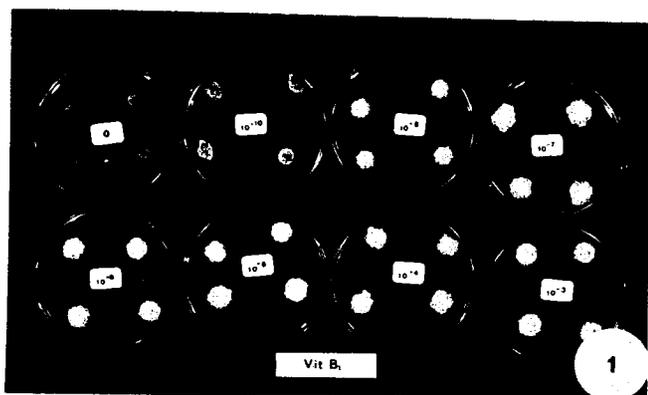
7

PLANCHE n° II





BUS
SLE



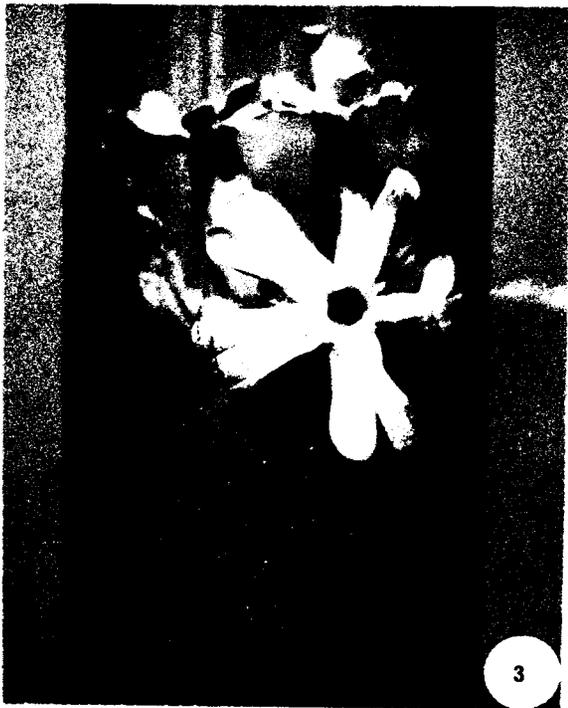
LILLE

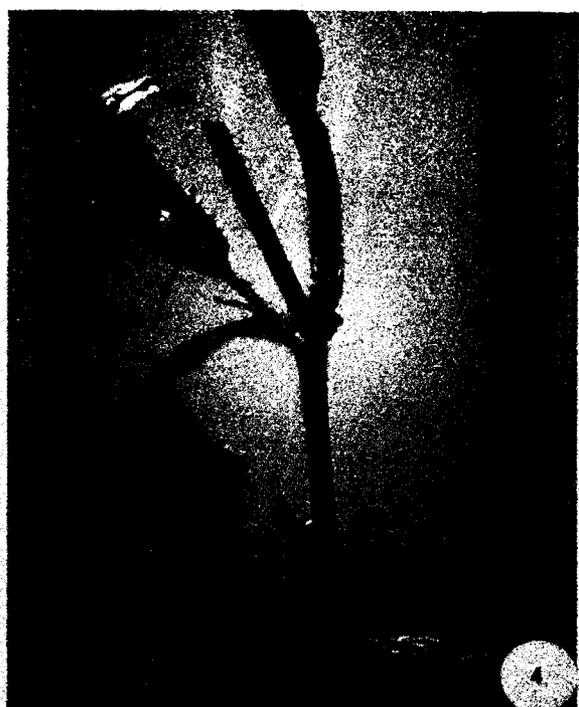


PLANCHE n°V



BUS
LITON



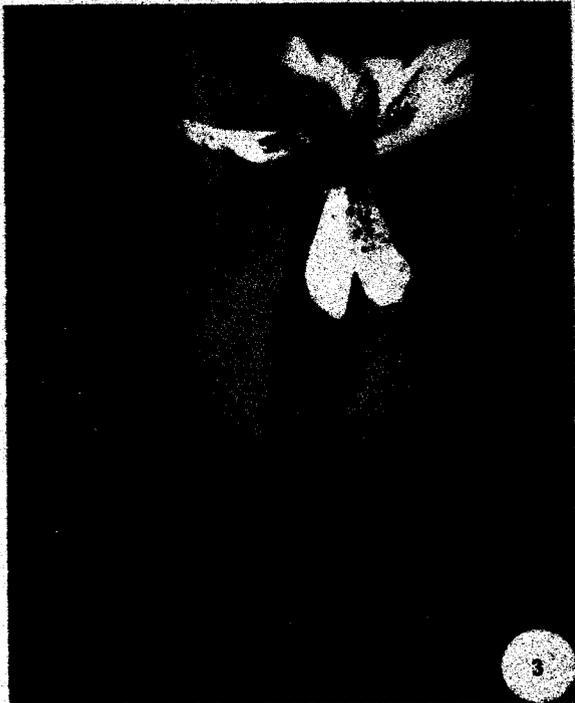
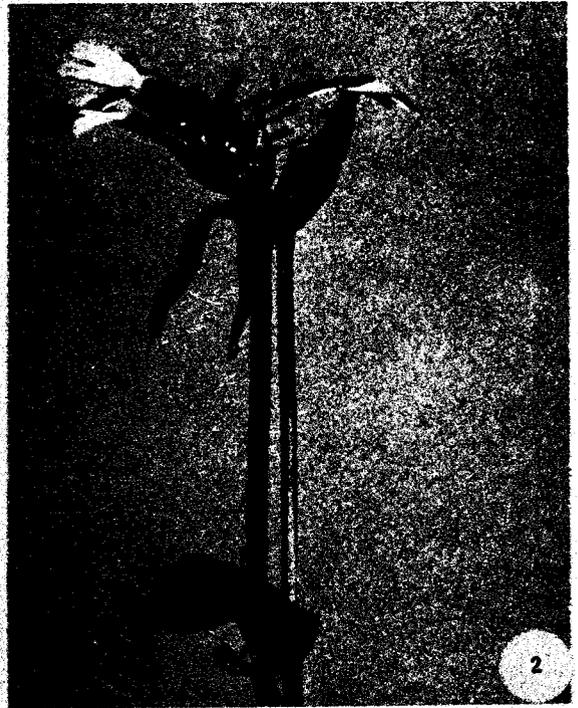


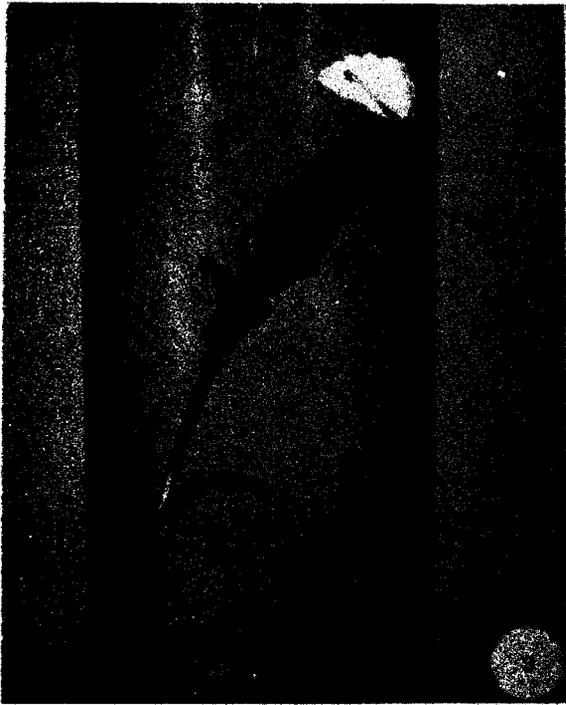
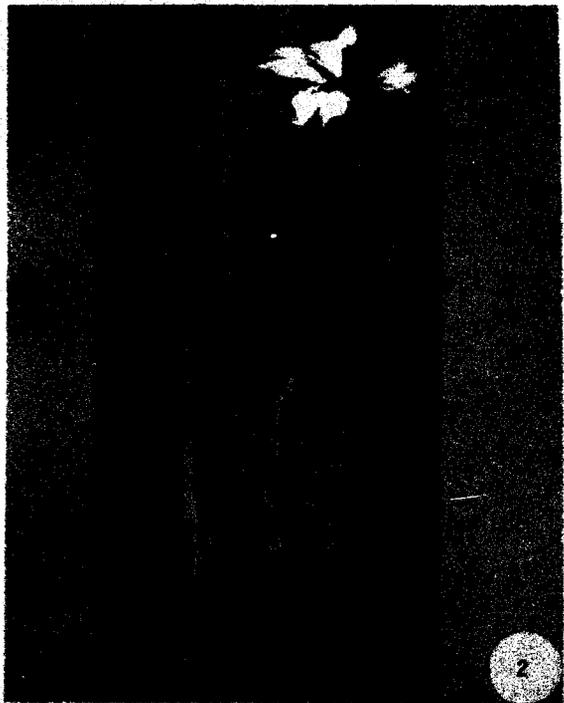
BUS
LILLE



PLANCHE n°VIII

BUS
LILLE





BUS
LILLE

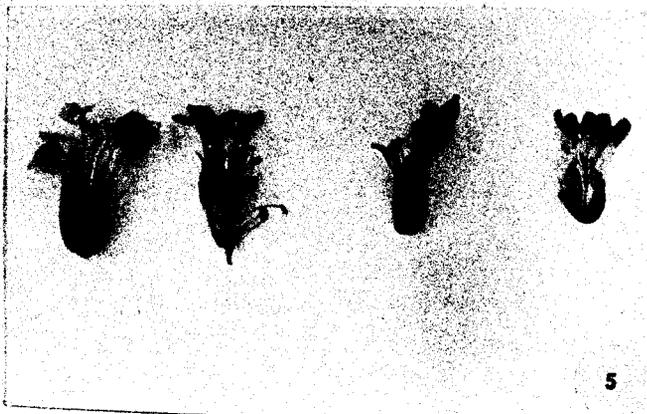


PLANCHE n°X

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

- ATKINS F.C., 1966.- Mushroom growing to-day
Faber and Faber Limited, London.
- BAKER H.G., 1947.- Infection of species of Melandrium by Ustilago violacea (Pers)
Fuckel. and the transmission of resultant disease.
Ann. Bot., 11, 333-348.
- BAKER H.G., 1948.- Stages in invasion and replacement demonstrated by species
of Melandrium.
J. Ecol., 36, 96-119.
- BATCHO M., 1973.- Etude de quelques effets de l'Ustilago violacea (Pers.)
Fuckel sur la croissance et la morphogenèse du Silene alba (Miller)
Krause cultivé in vitro.
DEA de Biol. vég., Univ. de Lille I.
- BATCHO M. et ZAMBETTAKIS Ch., 1975.- Obtention in vitro de fleurs du Silene
dioica (L.) Clair. parasitées par l'Ustilago violacea (Pers.) Rouss.
Bull. Soc. myc. Fr., 91 (2), 225-229.
- BATCHO M. et DUBOIS J., 1975.- Développement de l'Ustilago violacea (Pers.)
Rouss. dans des fragments de tige du Silene alba (Miller) E.H.L.
Krause cultivés in vitro.
C. R. Acad. Sc. Paris, 281, 399-402.
- BATCHO M. et DUBOIS J., 1974.- Etude de quelques effets de l'Ustilago violacea
(Pers.) Rouss. sur la croissance de colonies tissulaires et de
suspensions cellulaires du Silene alba (Miller) E.H.L. Krause.
Bull. Soc. Bot. Nord de la France, 26-27 (sous presse)
- BAUCH R., 1922.- Kopulationsbedingungen und sekundäre Geschlechtsmerkmale bei
Ustilago violacea.
Biol. Zentbl., 42, 9-38.
- BECERESCU D., 1973.- The influence of X-radiations on the growth of the
dicaryotic mycelium and the behaviour of haploid strains of certain
species of Ustilago.
Rev. Roum. Biol. Botanique, 18 (2), 119-124.
- BECERESCU D., 1968.- Considerations concerning the mode of infection of the
Ustilago species. (Ro-an).- "Microbiologia", Lucr. Confer. nation.
Microbiol. Gen. aplic. Bucarest, vol. I, 575-577.

- CHADEFAUD H., GRASSE P.P., OZENDA P., PREVOT A.R., 1963.- Précis des Sciences biologiques. Masson et Cie, Paris.
- CLEMENT L.L., DAY A.W., JONES J.K., 1969.- Effects of Ultraviolet light on nuclear fusion in Ustilago violacea.
Nat. G.B., 223, (n° 5209), 961-963.
- DAY A.W. and JONES J.K., 1968.- The production and characteristics of diploïds in Ustilago violacea.
Genet. Res., Camb., 11, 63-81.
- DEHORTER B., 1972.- Biologie et physiologie de la reproduction sexuée de Nectria galligena Bres.
Thèse 3e Cycle, Lille.
- De LANCHE J.E., DELVOSALLE L., DUVIGNEAU D., LAMBINON J., VANDEN BERGHEN C., 1963.- Nouvelle flore de la Belgique du G. D. du Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines.
Edit. du Patrimoine du Jardin Botanique National de Belgique.
B- 1030, Bruxelles.
- DUBOIS J., 1975.- Analyse quantitative de la croissance d'une culture de cellules du Silene alba (Miller) E.H.L. Krause.
Bull. soc. Bot. de France, 122, 269-280.
- DUBOIS J. et BOURIQUET R., 1974.- Culture de cals et de suspensions cellulaires du Silene alba (Miller) E.H.L. Krause.
Bull. soc. Bot. du Nord de la France, 26-27, 70-88.
- EVANS S.M. and WILSON T.M., 1971.- The anther smut of sea campion. A study of the role of growth regulators in the dwarfing symptom.
Ann. Bot., 35, 543-553.
- FLEGG P.B., 1968.- Response of the cultivated mushroom to temperature at various stages of crop growth.
J. Hort. Sci., 43, 441-452.

- FORSYTH, 1955.- The nature of inhibiting substance emitted by germinating uredospores of Puccinia graminis var. Triticici.
Canad. J. Bot., 33 (5), 363-373.
- GARAY A. and SAGI F., 1960.- Investigations on sex reversal in Melandrium album. Mill. after infection with Ustilago violacea (Pers.) Fckl., with particular reference to auxin-oxidase and flavonoids (Al-an).
Phytopath. Z., 38 (2), 201-208.
- GAUTHERET R.J., 1959.- La culture des tissus végétaux.
Masson et Cie, Paris.
- GIARD A., 1888.- Notes sur la castration parasitaire du Lychnis dioïca L. par l'Ustilago antherarum Fr.
C. R. Acad. Sci., Paris, 107, 757-759.
- GIULIANO E., 1964.- Osservazioni sul Melandrium album (Miller) Garcke parassitato da Ustilago violacea (Pers.) Roussel.
Delpinoa ital., 4 (1), 177-200.
- HALL R., 1971.- Effect of carbon-nitrogen ratios on production of perithecia by Sordaria fimicola.
Canad. J. microbiol., 17 (1), 132-134.
- HASSAN A. and MacDONALD J.A., 1971.- Ustilago violacea on Silene dioïca.
Trans. Br. mycol. Soc., 56 (3), 451-461.
- HEIM P., 1971.- Le noyau dans la vie du champignon.
Ann. Sc. Nat., 12e sér., 12 (4), 466-513.
- HELLER R., 1953.- Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro.
Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. veg., 14, 1-223.
- HENRIKSSON L.E.E. and MORGAN JONES J.F., 1951.- The effect of temperature pH and malt extract upon growth and perithecial development of two gnomonina species.
Svensk bot. Tidsk., 45, 648-656.

- HIRATA S., 1957.- Studies on the phytohormone in the malformed portion of the diseased plants. Auxin formation on the culture grown Exobasidium, Taphrina, and Ustilago sp.
Ann. phytopath Soc. Japan, 22, 153-158.
- HUTSON H.H. and CUTTER W.M., 1951.- The isolation and culture of gymnosporangium Juniperi virgininae Schw. upon artificial Media.
Proc. nat. Acad. Sc., U.S.A., 37, 400-403.
- HUGUENIN B., 1974.- Influence des conditions de culture sur la formation et la germination in vitro des chlamydozoozites de Phytophthora palmivora.
Ann. phytopath., 6 (4), 425-440.
- INGRAM D.S., 1973.- Growth of plant parasites in tissue culture.
in Plant tissue and cell culture,
H.E. Street, Blackwell Scientific Publications, London, 392-421.
- KNIEP H., 1919.- Untersuchungen über den antherenbrand (Ustilago violacea Pers.)
Ein Beitrag zum Sexualitätsproblem.
Zeitschr. f. Bot., 11, 257-284.
- KRAJNY P., 1974.- Influence of various wave lengths of light on the germination of chlamydozoozites of fungus Ustilago tritici (Pers.) Jens.
Biologia (Bratislava), 29, 257-262.
- LAMPORT D.T.A., 1964.- Cell suspension cultures of higher plants : isolation and growth energetics.
Experim. Cell. Res., 33, 195-206.
- LESCURE A.M., 1969.- Mutagenèse et sélection des cellules d'Acer pseudoplatanus L. cultivées in vitro.
Physiol. vég., 7, 237-250.
- LOVE A. and LOVE D., 1945.- Experiment on the effects of Animal Sex Hormones on Dioecious Plants.
Arkiv För Botanik, 32 (1), 1-60.

- MANACHERE G., 1970.- Recherches physiologiques sur la fructification de Coprinus congregatus. Bull. et Tr. : action de la lumière, rythme de production des carpophores.
Ann. des Sc. Nat. Bot. Paris, 11, 1-96.
- MANI M.S., 1964.- The ecology of plant galls.
The Hague : Dr W. Junk publishers.
- MERIMOTO N. and ODA Y., 1974.- Photo induced Karyogamy in a Basidiomycete Coprinus macrorhizus.
Plant and Cell Physiol., 15, 183-185.
- MOREL G., 1948.- Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux.
Ann. epiphyt. N.S., 14, 123-234.
- MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962.- A revised Medium for Rapid growth and Bio Assays with Tobacco Tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 473-497.
- NIELSEN J., 1968.- Isolation and culture of monokaryotic haplonts of Ustilago nuda, the role of proline in their metabolism, and the inoculation of barley with resynthesized dikaryons.
Canad. J. Bot., 46, 1193-1200.
- NIELSEN J., 1972.- Isolation and culture of monokaryotic haplonts of Ustilago tritici, observations on their physiology and the taxonomic relationship between U. Tritici and U. nuda.
Canad. J. Bot., 50, 1775-1782.
- NOVAT N., 1967.- Production d'acide indolyl-acétique par quelques espèces d'Ustilago.
C. R. Soc. Biol., 160 (7), 1414-1417.
- POON N.H. and DAY A.W., 1974.- Somatic nuclear division in the sporidia of Ustilago violacea. II. Observations on living cells with phase-contrast and fluorescence microscopy.
Canad. J. of Microbiol., 20 (5), 739-746.

- POON N.H., MARTIN J. and DAY A.W., 1974.- Conjugation in Ustilago violacea
I. Morphology.
Canad. J. of Microbiol., 20 (2), 187-191.
- RADULESCU E. and MUNTEANU I., 1966.- Development of a technique for the
artificial inoculation of corn plants with Ustilago maydis (D.C.) Corda
Inst. Cercet. Agric. An., 4, 33-39.
- RAYNAL G., 1974.- Une technique de contamination artificielle du maïs par
Ustilago maydis (D.C.) Corda.
- REDDY M.N. and RAO A.S., 1975.- Amino acids in Mycelium and culture filtrates
of Rhizoctonia solani.
Trans. Br. mycol. Soc., 64 (3), 527-528.
- ROBINSON P.W. and HODGES C.F., 1973.- Benomyl-induced growth of
Ustilago striiformis in vitro.
Phytopath., 63, 1074-1075.
- SCHOPFER W.H. et BLUMERS S., 1938.- Les facteurs de croissance des espèces
du genre Ustilago.
C. R. Acad. Sc. Paris, 206, 1141-1143.
- TOUSSOUN T.A. and WEINHOLD A.R., 1967.- Light requirements and light
inhibition of sexual reproduction in fusarium (hypomyces)
solani sp. cucurbitae, race II
Canad. J. Bot., 45, 951-954.
- TUREL F.L.M., 1964.- Saprophytic development of the flax rust Melampsora lini,
race III
Canad. J. Bot., 47, 821-823.
- TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., VALENTINE D.H., WALTERS S.M. and
WEBB D.A., 1964.- FLORA EUROPAEA, vol. I, p. 174.
Cambridge at the University press.
- VAN ANDEL O.M., 1966.- In "amino acids and plant diseases".
Ann. Review of Phytopath., 4, 340-368.

- 7
- VEENENBOS J.A.J. and BRANDSMA T.W., 1957.- Artificial contamination of oats with loose smut, Ustilago avena (Pers.) Jens.
T. Planteziekt., 63 (6), 375-379.
- VIENNOT-BOURGIN G., 1949.- Les champignons parasites des plantes cultivées.
Masson et Cie, Paris.
- VIENNOT-BOURGIN G., 1964.- Systématique des champignons parasités des plantes.
C.D.U. et S.E.D.E.S. réunis, 115-116, Paris.
- VUILLEMIN P., 1891.- Notes sur les effets du parasitisme de l'Ustilago antherarum.
C. R. Acad. Sc. Paris, 113, 662-665.
- WANDERWALLE R., 1935.-
Bulletin de la Classe des Sciences, 5e sér.,
Acad. royale de Belgique, 21 (7), 759-765.
- WANDERWALLE R. et SOMMEREYNS G., 1965.- Note sur l'inoculation artificielle d'Ustilago Spp.
Parasitica, 21 (1), 9-15.
- WANG D.T., 1932.- Quelques observations sur l'Ustilago violacea (Pers.) Fuckel.
C. R. Acad. Sc., Paris, 195, 1417-1418.
- WANG D.T., 1934.- Contribution à l'étude des Ustilaginales. Cytologie du parasite et pathologie de la cellule hôte.
Le Botaniste, 26, 540-670.
- WILLIAMS P.G., SCOTT K.J., MUHL J.L. and MACLEAN D.T., 1967.- Sporulation and pathogenicity of Puccinia graminis f. sp. tritici, grown on an artificial media.
Phytopath., 57, 326-327.
- ZAMBETTAKIS Ch., 1963.- Les charbons du chiendent.
Rev. de Mycol., 28 (5), 312-348.

ZAMBETTAKIS Ch., 1970.- Recherches sur les Ustilaginales d'Afrique.
Bull. Soc. myc. Fr., 86 (2), 305-692.

