

50376
1979
110

50376
1979
110

N° d'ordre : 759

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR 3ème CYCLE
(Mention : Biologie végétale)

par

Monique JACQUET

PYTHIUM TRACHEIPHILUM Matta,
AGENT DU FLETRISSEMENT DE LA LAITUE (*LACTUCA SATIVA* L.)
ETUDE BIOLOGIQUE ET EPIDEMIOLOGIQUE



Soutenu le 1er juin 1979 devant la Commission d'Examen

E.J. BONNOT
L. LACOSTE
M. BODARD
D. BOUHOT

Président
Rapporteur
Examineur
Examineur

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

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Cryptogamie de l'UER de Biologie à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, avec le concours du Cercle des Maraîchers de la Ceinture Nord-Ouest de Paris.

Je suis heureuse, ici, de pouvoir présenter mes remerciements à :

Monsieur le Professeur LACOSTE, Directeur du Laboratoire de Cryptogamie, qui après m'avoir confié ce travail de recherche, l'a suivi en me prodiguant avec bienveillance ses conseils, et en me faisant profiter de ses connaissances.

Monsieur le Professeur BONNOT, qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le Jury de cette Thèse.

Monsieur le Professeur BODARD de l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail en acceptant de le juger et de participer à ce Jury.

Monsieur BOUHOT, Maître de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Dijon qui, malgré ses nombreuses occupations, me fait l'honneur de participer à ce Jury de Thèse.

Madame DUBOIS, Docteur ès-Sciences qui m'a témoigné sa confiance, en m'acceptant comme monitrice de travaux pratiques de Biologie végétale puis en suivant, avec beaucoup d'intérêt et de gentillesse, ce travail m'aidant en particulier dans la réalisation de l'étude histologique et dans l'illustration de ce mémoire.

Monsieur VIDAL, Maître Assistant et Monsieur DEHORTER, Assistant, qui m'ont apporté leurs conseils, notamment dans la rédaction. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Monsieur GALLE, Conseiller Agricole de la Chambre d'Agriculture de l'Ile-de-France, qui m'a accueillie comme stagiaire pendant 2 années et m'a aidée avec patience et amabilité dans la mise en place et l'interprétation des essais agronomiques.

Monsieur BLOUIN, Président du Cercle des Maraîchers, ainsi que Messieurs DRIEZ, ESTRADÉ et ROBBIN, Maraîchers à Montesson, qui ont mis à ma disposition les moyens matériels et techniques de ces essais, et m'ont permis de bénéficier de leur compétence dans la pratique maraîchère. Je leur en suis très reconnaissante ; je remercie également très chaleureusement pour leur aide efficace sur le terrain les exploitants que j'ai rencontrés au cours de mes séjours à Cergy.

S O M M A I R E

| | page |
|---|------|
| INTRODUCTION | 1 |
| PREMIERE PARTIE | |
| CHAPITRE I. | |
| I. Symptômes de la maladie..... | 3 |
| II. Conditions de l'épidémie en région parisienne..... | 4 |
| III. Bibliographie : connaissances sur cette maladie..... | 5 |
| Conclusion..... | 7 |
| CHAPITRE II. | |
| I. Classification du genre <i>Pythium</i> | 8 |
| II. Caractères spécifiques du <i>Pythium tracheiphilum</i> Matta | 9 |
| III. Cycle schématique d'un <i>Pythium</i> : <i>Pythium de Baryconum</i> Hesse | 10 |
| IV. Origine de la souche..... | 12 |
| Conclusion..... | 13 |
| DEUXIEME PARTIE | |
| CHAPITRE I. INFLUENCE DES CONDITIONS NUTRITIVES, DE LA TEMPERATURE ET DE LA LUMIERE SUR LE CYCLE DE QUELQUES PHYCOMYCETES. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE. | |
| I. Influence du milieu nutritif..... | 15 |
| II. Influence de la température..... | 23 |
| III. Influence de la lumière..... | 24 |
| Conclusion..... | 25 |

| | |
|---|----|
| CHAPITRE II. INFLUENCE DES CONDITIONS NUTRITIVES, THERMIQUES ET LUMINEUSES SUR LA CROISSANCE ET LA REPRODUCTION DU <i>PYTHIUM TRACHEIPHILUM</i> MATTA | |
| I. Matériel et méthodes..... | 26 |
| II. Résultats expérimentaux..... | 29 |
| Conclusion..... | 46 |

INTRODUCTION AUX CHAPITRES III ET IV..... 47

| | |
|---|----|
| CHAPITRE III. CONDITIONS FAVORABLES A LA GERMINATION DES SPORO-CYSTES DU <i>PYTHIUM TRACHEIPHILUM</i> | |
| I. Action des exsudats racinaires sur la croissance et la germination des sporocystes du <i>Pythium tracheiphilum</i> | 48 |
| II. Action des acides aminés et des sucres..... | 52 |
| III. Action des facteurs humidité, température, pH, lumière, âge des sporocystes sur leur germination..... | 54 |
| Conclusion..... | 59 |

CHAPITRE IV. GERMINATION DES OOSPORES

| | |
|---|-------|
| I. Dormance et germination des zygotes : revue bibliographique..... | 62 |
| II. Résultats expérimentaux..... | 66 |
| Discussion..... | 68bis |

TROISIEME PARTIE

| | |
|--|----|
| CHAPITRE I. RELATIONS HOTE-PARASITE DANS LES CULTURES <i>IN VITRO</i> | |
| I. Matériel et méthodes..... | 69 |
| II. Recherche du parasite dans les tissus de la plante-hôte et dans le substrat..... | 71 |
| III. Résultats expérimentaux..... | 72 |
| Conclusion..... | 75 |

| | |
|--|----|
| CHAPITRE II. ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA MALADIE : ESSAIS EN CHAMP | |
| I. Méthodologie expérimentale..... | 77 |
| II. Plan expérimental de 1974..... | 80 |
| III. Plans expérimentaux de 1975 et 1976..... | 83 |

| | |
|--|-----|
| IV. Résultats des essais de 1975 et 1976..... | 85 |
| Conclusion..... | 93 |
| CHAPITRE III. ACTION DE QUELQUES PRODUITS FONGICIDES SUR LA CROISSANCE ET LA REPRODUCTION DU <i>PYTHIUM TRACHEIPHILUM</i> | |
| I. Produits fongicides utilisés..... | 96 |
| II. Expérimentation..... | 97 |
| QUATRIEME PARTIE | |
| INTRODUCTION AUX CHAPITRES I ET II..... | 103 |
| CHAPITRE I. MISE EN EVIDENCE DE L'AGENT PATHOGENE DANS LES TISSUS DE LA PLANTE-HÔTE | |
| I. Techniques..... | 104 |
| II. Anatomie de la racine saine..... | 105 |
| III. Mise en évidence de l'agent pathogène..... | 106 |
| CHAPITRE II. MODIFICATIONS HISTOLOGIQUES CHEZ LA PLANTE-HÔTE | |
| I. Identification des substances obstruant les vaisseaux.... | 111 |
| II. Mise en évidence de composés phénoliques..... | 115 |
| III. Action du <i>Pythium tracheiphilum</i> sur la dégradation des parois lignifiées des vaisseaux..... | 117 |
| Conclusion..... | 119 |
| CONCLUSIONS GENERALES..... | 121 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 125 |

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

Les maladies vasculaires ou trachéomycoses sont causées par des Champignons qui restent localisés principalement dans le xylème de leur hôte, durant la plus grande partie de leur pathogénèse. Le syndrome caractéristique est un dépérissement plus ou moins rapide du végétal.

Parmi les trachéomycoses, les plus étudiées sont les fusarioses dues au *Fusarium oxysporum* (Schl.) Snyder et Hansen et les verticillioses dues au *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth. et au *Verticillium dahliae* Klebs., ces maladies affectant de nombreuses cultures dans le monde.

Cependant, malgré de nombreux travaux, la lutte contre ce type de parasite demeure difficile et l'usage de fongicides endothérapeutiques ne semble pas résoudre tous les problèmes.

La présente étude concerne une maladie de ce type : la trachéomycose de la Laitue due au *Pythium tracheiphilum* Matta; cette maladie cause d'importantes pertes dans les cultures maraîchères.

La systématique des Pythiacées a fait l'objet de nombreuses études (travaux de MIDDLETON, 1943 ; de SIDERIS, 1932 notamment). D'autres chercheurs parmi lesquels J.A. LEAL, J. FRIEND, J.P. HOLLIDAY, J.W. HENDRIX, C.G. ELLIOTT, R.H. HASKINS se sont intéressés à la solution des problèmes liés à la reproduction des Pythiacées. Ces recherches ont fourni des éléments permettant de réaliser, sur des milieux chimiquement définis, le cycle complet des *Pythium*. Cependant, la lutte contre ces agents pathogènes et notamment *Pythium tracheiphilum* demeure souvent insuffisante .

Le présent travail a été réalisé en collaboration avec le Cercle des Maraîchers et Arboriculteurs de la Ceinture Nord-Ouest de Paris qui, à la suite des sévères attaques dues au *Pythium tracheiphilum* durant l'été 1969, nous a proposé d'approfondir quelques aspects de l'étude épidémiologique de la maladie.

La première partie de notre travail concerne les symptômes et les conditions de la maladie, les caractères de la systématique des *Pythium*, les caractères morphologiques du *Pythium tracheiphilum* Matta.

La deuxième partie traite des besoins nutritifs du Champignon et de l'influence de facteurs internes et externes sur l'accomplissement du cycle du *P. tracheiphilum*. Nous étudions successivement les conditions favorables à la croissance du thalle, à la germination des sporocystes et des oospores.

La troisième partie est consacrée à l'étude épidémiologique de la maladie ; les relations hôte-parasite sont étudiées, d'une part à partir de cultures *in vitro*, d'autre part à la suite d'inoculations expérimentales réalisées en champ.

Dans la dernière partie, nous nous proposons de préciser quelques aspects histologiques et cytochimiques de l'invasion des tissus de racines par l'agent pathogène.

Enfin, dans la conclusion, nous présentons les résultats de nos travaux et les perspectives pour des travaux ultérieurs.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

I. SYMPTOMES DE LA MALADIE

Dans les cultures de Laitues, *Pythium tracheiphilum* Matta produit des manifestations pathologiques décrites par MATTA et GARIBALDI dans leurs travaux en 1965. Celles-ci consistent essentiellement en un flétrissement progressif des feuilles de la plante en liaison avec un brunissement des vaisseaux du secteur caulinaire correspondant. Les racines des Laitues malades sont tronquées et on note, au-dessus du point d'infection, un important développement de racines secondaires.

Des coupes longitudinales et transversales de ces racines montrent un brunissement intense de la stèle, les tissus et les vaisseaux du xylème sont envahis par le mycélium de l'agent pathogène, tandis que les tissus externes demeurent sains.

L'agent responsable de cette trachéomycose fut isolé et identifié par MATTA (1965) en Italie. La maladie a été observée en France dans les cultures maraîchères dans la vallée de la Seine, dans la zone de Montesson et Croissy, ainsi que dans les Pyrénées orientales.

L'évolution des symptômes de cette maladie est parfois difficile à suivre dans les cultures et seules les inoculations expérimentales permettent d'étudier avec précision le déroulement du processus infectieux.

II. CONDITIONS DE L'ÉPIDÉMIE EN RÉGION PARISIENNE

Avant de décrire les conditions de sol, les conditions météorologiques et les conditions variétales paraissant favoriser la maladie, il convient de résumer les techniques culturales pratiquées dans la région où sévit la maladie.

Bien abritées des vents par les collines de Cormeilles-en-Parisis, les côteaux de Marly et la forêt de Saint-Germain, les cultures de Laitues bénéficient d'un microclimat favorable au maraîchage.

Les semis sont effectués en pleine terre dès le début de février et échelonnés jusqu'au début d'août sur les différentes parcelles. Chaque parcelle fournit consécutivement deux récoltes au cours de la saison. En raison du semis très dense, un premier sarclage éliminatoire est nécessaire dès que les plantules atteignent le stade 2 à 3 feuilles. Un deuxième sarclage, effectué 15 à 20 jours avant la récolte, dénommé "mise en place définitive" ne laisse subsister que 12 laitues au m²

1 - Conditions de sol :

La maladie cause d'importantes pertes dans les champs sur sol sableux, très perméables, dont les taux de matière organique sont souvent supérieurs à 3 %, et le pH voisin de 6 ou de 7. Les sols argileux plus lourds sont moins favorables à la maladie. De plus, celle-ci s'observe généralement sur des sols où la culture de la Laitue est renouvelée chaque année et parfois depuis près de 25 ans. Il semble donc que l'inoculum se perpétue dans ce type de sol.

2 - Conditions météorologiques :

A partir des observations recueillies au cours de ces dernières années, on peut noter qu'il existe une relation entre les conditions de température et d'humidité et l'apparition des symptômes de flétrissement. Des températures relativement basses (inférieures à 20°C) et de fortes précipitations déclencheront le processus infectieux dans des champs de Laitues sur sols sableux.

3 - Conditions variétales :

Les variétés "Aurélia" et "Lilloise" seraient les plus sensibles à la maladie alors que les Laitues de type "Batavia" résisteraient à l'agent pathogène.

III. BIBLIOGRAPHIE : CONNAISSANCES SUR CETTE MALADIE

Les travaux relatifs à la trachéomycose de la Laitue et à la description de l'agent pathogène responsable ont été réalisés par BIRAGHI, MATTA, GARIBALDI en Italie et MENTION en France (travaux non publiés).

1 - Travaux de BIRAGHI (1940) :

Cet auteur décrit des symptômes de flétrissement sur des Laitues. Le feuillage ne porte aucune trace du Champignon ; par contre, les tissus vasculaires des racines malades sont envahis par le mycélium, les oospores, les sporocystes d'un agent pathogène isolé et identifié au genre *Pythium*.

Des contaminations expérimentales réalisées d'une part en disposant un fragment d'inoculum à la base des feuilles centrales sans provoquer de blessure, d'autre part après dépôt de l'inoculum sur la blessure causée par l'ablation des feuilles les plus externes, produisent les symptômes de la maladie et la désorganisation des tissus de la racine principale. BIRAGHI ne précise ni l'âge des Laitues au moment de la contamination, ni les conditions de température et d'humidité dans lesquelles ces contaminations furent réalisées.

Les caractères morphologiques des sporocystes et des oospores, leurs dimensions, leurs modes de germination conduisent l'auteur à différencier cette espèce de *de baryanum*, *ultimum* et *polymorphum* mais n'aboutissent à aucune appellation spécifique.

2 - Travaux de MATTA (1965-1966) :

L'agent pathogène responsable du flétrissement de la Laitue, isolé à partir de racines, est décrit et identifié à *Pythium tracheiphilum* par MATTA (1965).

En vue de tester la spécificité de ce parasite vis-à-vis de la Laitue, MATTA (1966) réalise des contaminations sur de nombreux végétaux notamment des espèces de la famille des Composées

Cet auteur utilise les deux méthodes de contamination suivantes :

- trempage des racines dans une suspension de sporocystes, de zygotes et de fragments mycéliens récoltés à partir de cultures du parasite réalisées sur un milieu gélosé à base de farine d'avoine ;
- arrosage du sol, au niveau du collet de la plantule, avec une suspension de ce même inoculum.

Les travaux de MATTA démontrent que *Pythium tracheiphilum* est plus virulent que *P. de baryanum*, que *P. salpingophorum* et *P. ultimum* vis-à-vis de nombreuses plantes de la famille des Composées.

3 - Travaux de GARIBALDI (1969) :

Reprenant la méthode d'inoculation de MATTA, cet auteur établit une échelle de susceptibilité de différentes variétés de Laitues cultivées en Italie, vis-à-vis du *Pythium tracheiphilum* par des contaminations expérimentales ; les Laitues ainsi inoculées sont repiquées en plein champ. Dans le classement ainsi établi, nous remarquons que "Aurélia" figure aux côtés des Laitues de type "Batavia", parmi les variétés les plus résistantes au *P. tracheiphilum*.

4 - Travaux de MENTION (1969-1970)*:

Les travaux de ce chercheur concernent des essais d'inoculations expérimentales sur différentes variétés de Laitues dans des conditions variables d'incubation. L'inoculum utilisé par MENTION est constitué d'une suspension de sporocystes et de fragments mycéliens, obtenu à partir de culture sur milieu liquide renfermant 20g par litre d'extrait de malt, ces cultures étant maintenues en agitation durant la période d'incubation.

Les plantules âgées de 3 à 4 semaines sont contaminées par trempage des racines dans l'inoculum ; les Laitues sont ensuite repiquées dans un sol traité par la vapeur. MENTION fait alors varier les conditions

* Station de Recherche de la Flore Pathogène du Sol. I.N.R.A., Dijon.

de température et d'humidité pendant la période correspondant à l'incubation de la maladie : malgré les conditions précises des inoculations expérimentales MENTION ne parvient pas à reproduire la maladie.

CONCLUSION

Les travaux cités ont mis en évidence l'agent pathogène dans les tissus de racines et permis de reproduire la maladie dans diverses conditions expérimentales. Cependant, il reste à définir les conditions précises de l'inoculation, en particulier le mode d'infection, l'âge des Laitues inoculées, ainsi que les conditions de température et d'humidité favorisant l'incubation de la maladie.

C H A P I T R E I I

I. CLASSIFICATION DU GENRE *PYTHIUM*

Le *Pythium tracheiphilum* fait partie de l'ordre des Péronosporales dont la systématique repose sur les caractères morphologiques des organes de multiplication, de reproduction et sur l'adaptation à la vie terrestre. Les espèces appartenant à cet ordre possèdent des zoïdes biflagellés, des oocystes pourvus d'une oosphère unique qui fécondée donne un oeuf ou zygote entouré d'une paroi très épaisse.

La famille des Pythiacées à laquelle appartient le genre *Pythium* regroupe des champignons saprophytes et plus rarement parasites de jeunes plantules.

Le genre *Pythium* se caractérise par son mycélium blanc, soyeux, ses sporocystes dont le contenu ne s'individualise que rarement en zoospores et qui germent par des tubes de germination ; ces sporocystes se forment au sommet d'un sporocystophore mal différencié.

Quant à la reproduction sexuée, elle est hétérogame ; les oocystes et les spermatocystes peuvent se différencier sur le même hyphe mycélien. Lors de la fécondation ou oogamie siphonogame, le spermatocyste émet un tube qui perce la paroi de l'oocyste et conduit jusqu'à l'oosphère le contenu nucléaire de ce spermatocyste. L'oospore, résultat de cette fécondation, peut dans certains cas, produire immédiatement un tube de germination ou, dans le cas d'autres espèces, rester à l'état de vie ralentie durant plusieurs mois, voire plusieurs années.

II. CARACTERES SPECIFIQUES DU *PYTHIUM TRACHEIPHILUM* MATTA

Les caractères spécifiques du *Pythium tracheiphilum* sont les suivants :

1) Mycélium :

Les hyphes mycéliens sont continus, hyalins et mesurent de 1,5 à 8 μm de diamètre (moyenne : 4,5 μm).

2) Multipliation asexuée :

Les organes de la multiplication asexuée sont constitués par les sporocystes terminaux ou intercalaires, globuleux à subglobuleux, dont le diamètre varie de 14 à 36 μm (moyenne : 25 μm). En culture *in vitro* ils germent par des tubes de germination. Selon MATTA (1965), dans les tissus de racines de Laitues, ces sporocystes se comportent comme des conidies ; ces sporocystes conidiaux contiennent 6 à 30 planoconidies réniformes, latéralement biciliées, globuleuses, mesurant de 8 à 10 μm de diamètre. Pour notre part, nous n'avons observé que des sporocystes germant par des tubes de germination ; nous n'avons jamais obtenu, ni en culture *in vitro*, ni dans les tissus malades, de sporocystes conidiaux à planoconidies.

Les cultures en voie de sénescence présentent des chlamydospores terminales et intercalaires, globuleuses à subglobuleuses dont le diamètre est compris entre 20 et 35 μm .

3) Reproduction sexuée :

Les structures assurant la reproduction sexuée sont les suivantes :

- les spermatocystes ou gamétocystes mâles, portés par le même filament que les oocystes, sont donc des spermatocystes monoclines ; au nombre de 1 ou 2 par oocyste ils contiennent des noyaux gamétiques non différenciés en gamètes ;
- les oocystes ou gamétocystes femelles, terminaux, sphériques, entourés d'une paroi lisse, mince, de 1 μm d'épaisseur, de diamètre compris entre 13 et 18 μm (diamètre moyen : 16 μm) ;
- l'oosphère, cellule femelle unique occupant la totalité de l'oocyste, est donc une oosphère plérotique. Après la fusion des noyaux, l'oosphère deviendra le zygote ; ce zygote s'entoure d'une paroi formée de 2 enveloppes : une enveloppe externe de nature callosique, l'exospore et une enveloppe interne de nature cellulosique, l'endospore. Le contenu du zygote est constitué de protoplasme granuleux renfermant un globule de réserve et un corps réfringent.

III. CYCLE SCHEMATIQUE D'UN *PYTHIUM* : *PYTHIUM DE BARYANUM* HESSE

Nous décrivons très brièvement le cycle du *Pythium de baryanum* Hesse dont l'étude a fait l'objet de nombreux travaux ; ce cycle nous servira de base à l'étude du *Pythium tracheiphilum* Matta (figure 1).

Les Pythiacées sont des Champignons dont le développement est favorisé dans l'eau ou dans les terres humides. Le genre *Pythium* provoque souvent des fontes de semis dans les pépinières où la densité des plantules est importante.

Pythium de baryanum Hesse attaque les semis de nombreuses plantes.

Les premiers symptômes de cette fonte de semis sont l'inclinaison des plantes et leur flétrissement. L'attaque qui débute au collet produit une désagrégation des tissus dont le résultat est l'amincissement de la tige ; la plantule se brise alors au ras du sol.

Dans les tissus de la plante, on note la présence d'hyphe mycéliens, très ramifiés, circulant entre les cellules et à l'intérieur de celles-ci ; à l'état jeune, le mycélium présente un contenu homogène ; âgé, il devient granuleux.

La multiplication asexuée est assurée par des sporocystes formés au sommet de sporocystophores dans les tissus de la plante mourante. Dans des conditions de forte humidité, ces sporocystes émettent un tube de germination qui peut envahir directement les tissus ou qui se renfle en une ampoule dans laquelle le protoplasme s'accumule : il s'agit de la formation d'un sporocyste secondaire (phénomène de polyplanétisme). Le contenu de ce sporocyste s'individualise en zoospores, qui perdent leurs flagelles, se fixent et s'entourent d'une paroi (zoospore enkystée), et germent par des filaments qui envahissent les tissus des plantules.

La reproduction sexuée résulte de la fécondation de l'oocyste par les noyaux du spermatocyste ; les zygotes ou oospores s'entourent d'une paroi épaisse : d'une part ces zygotes peuvent germer immédiatement par la production de zoospores qui, après perte de leurs flagelles et enkystement, émettent des tubes de germination capables d'envahir les tissus ; d'autre

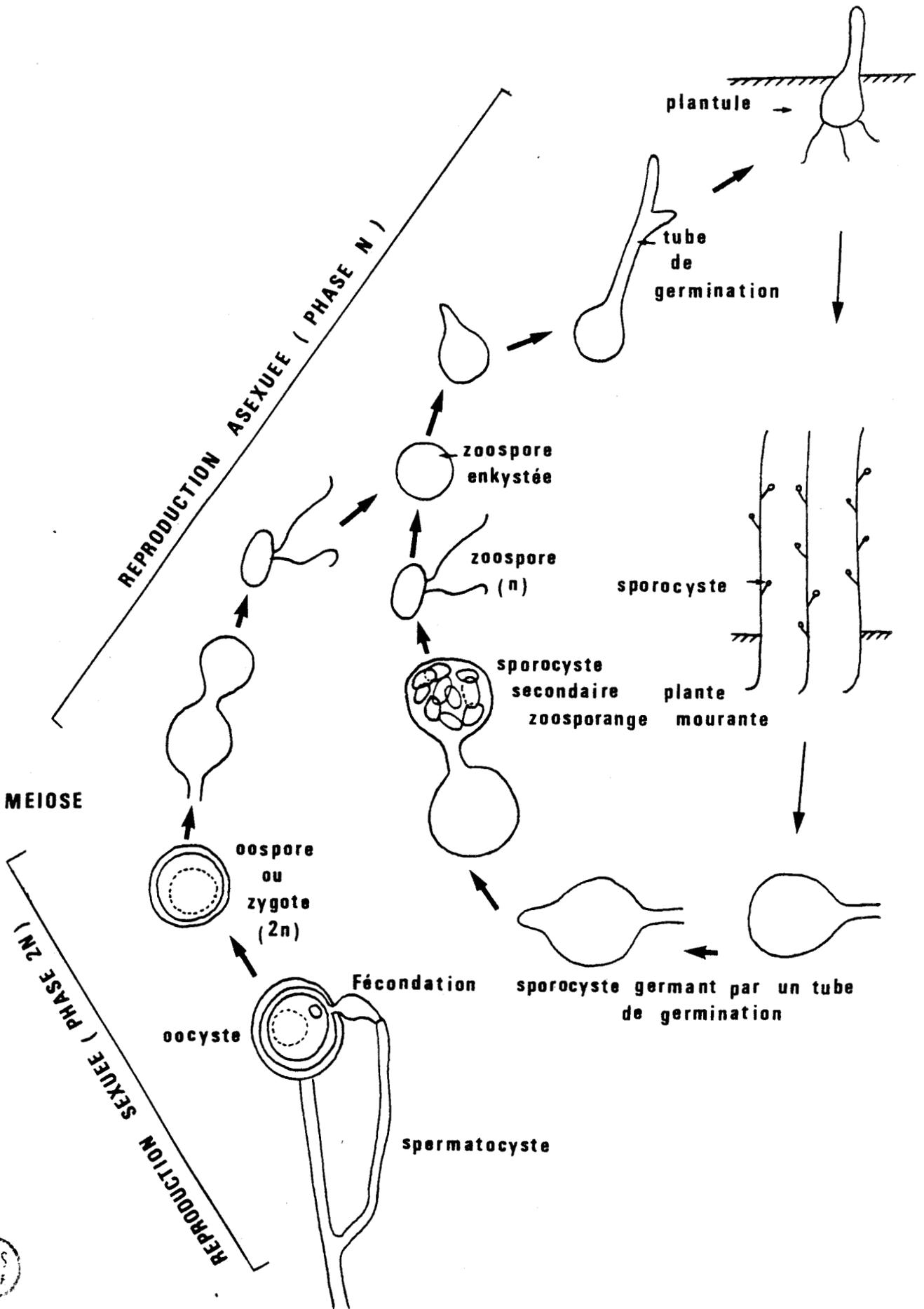


Figure n° 1: Cycle schématique de *Pythium de baryanum* Hesse

part, ces zygotes peuvent entrer en dormance, et apparaissent comme des structures de conservation, capables de survie durant de longues périodes dans les tissus de l'hôte.

Conclusion et discussion :

L'infection des tissus de plantules est donc réalisée après la pénétration du filament issu de la germination soit du sporocyste primaire, soit de la zoospore enkystée, résultant elle-même de la division du protoplasme du sporocyste secondaire, ou du zygote après méiose ; ces sporocystes ne conservent que peu de temps leur pouvoir pathogène, les plantules ne seront donc infectées que durant les quelques jours suivant la formation de ces sporocystes, et si le temps est humide.

Par contre, les zygotes libérés lors de la putréfaction des plantes, assurent la persistance du parasite dans le sol car ils restent de longues périodes à l'état de vie ralentie.

IV. ORIGINE DE LA SOUCHE

1) Isolement :

La souche du *Pythium tracheiphilum* Matta, que nous avons utilisée, provient de tissus de racines malades recueillies dans des champs à Montesson.

En vue de l'isolement de la souche, les opérations suivantes ont été réalisées :

- lavage très soigneux à l'eau du robinet, puis à l'eau distillée des racines préalablement débarrassées de leurs radicelles ;
- trempage pendant 5 minutes dans l'alcool éthylique 96° ;
- désinfection par passage pendant 15 minutes dans une solution contenant 35 g par litre d'hypochlorite de calcium ;
- rinçage par passage dans 4 bains successifs d'eau distillée stérile pendant des durées respectives de 5, 10, 15 et 20 minutes.

L'isolement proprement dit s'effectue en réalisant des coupes transversales de quelques millimètres d'épaisseur, qui sont déposées aseptiquement sur un milieu nutritif gélosé réparti soit en tubes 25 x 200 mm,

soit en boîtes de Pétri de 86 mm de diamètre. Le milieu nutritif utilisé est celui préconisé par MESSIAN et LAFFONT (1966), milieu favorisant la croissance sélective des genres *Pythium*, *Phytophthora*, *Peronospora* ; la composition est la suivante :

| | |
|--|--------|
| . saccharose..... | 5 g |
| . $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ | 1 g |
| . $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| . KNO_3 | 0,25 g |
| . KH_2PO_4 | 0,25 g |
| . extrait de levure..... | 1 g |
| . acide citrique..... | 0,05 g |

Nous avons également eu recours à des milieux moins sélectifs en particulier : milieu à l'eau de pomme de terre gélosée auquel nous incorporons des antibiotiques tels que l'auréomycine, la streptomycine, la néomycine, mais dans tous les cas, nous n'obtenions pas de résultats positifs. Selon les travaux de ECKERT et TSAO (1962), l'utilisation d'antibiotiques pour être efficace dans les isolements de souches, doit répondre aux impératifs suivants : solubilité dans le milieu, stabilité dans le milieu, spectre hautement spécifique, non toxicité vis-à-vis de l'organisme étudié.

L'échec de nos essais peut résider dans le fait que pour les antibiotiques étudiés, nous n'avons pu vérifier les conditions ci-dessus citées.

Les fragments de tissus ainsi préparés sont placés dans une enceinte régulée à 20°C et soumis à un éclairage de 2 000 lux, 12 h. par jour. Trois à quatre jours après l'isolement, des hyphes mycéliens blancs, soyeux, sortent des vaisseaux des racines. Des cultures pures ont été réalisées sur le milieu minéral utilisé par MESSIAN et LAFFONT, dans des boîtes de Pétri par prélèvement des marges d'une colonie propre. Des cultures pures monospores ont été obtenues par prélèvement sur des fragments mycéliens âgés de 6 jours par la méthode de dilution (100 sporocystes par millilitre). Des cercles de 5 mm de diamètre sont marqués sur le fond d'une boîte de Pétri renfermant de l'eau gélosée (20 g de gélose par litre d'eau). A l'aide d'une pipette Pasteur, une gouttelette de la suspension de sporocystes est disposée au centre de chaque cercle.

Les boîtes sont placées à 20°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$), sous un éclairage de 2 000 lux, 12 h. par jour. Après 36 à 48 h., les boîtes sont observées sous le microscope, et les cercles ne présentant qu'un sporocyste sont découpés et placés sur milieu de HUGUENIN (1970), dans des tubes inclinés.

Notre souche a été comparée à la souche *Pythium tracheiphilum* Matta, inventoriée sous le numéro 32 265 par le "Centraal Bureau Voor Schimmelcultures" de Baarn (Hollande).

L'identité entre notre souche et celle de MATTA est confirmée à cette petite différence près : avec notre isolat, nous n'avons jamais obtenu de sporocystes à planoconidies.

2) Entretien :

Afin de préserver les potentialités de la souche, nous la réisolons périodiquement à partir de racines de Laitues malades. Cette souche est réensemencée chaque mois sur le milieu chimiquement défini par HUGUENIN (1970).

3) Ensemencements :

L'inoculum consiste en un fragment mycélien de quelques millimètres de côté, prélevé à l'aide d'un fil de nickel-chrome sur des cultures gélosées âgées de 8 jours.

CONCLUSION

Notre étude concerne l'agent du flétrissement de la Laitue identifié par MATTA sous le nom de *Pythium tracheiphilum* MATTA. Nos isolats sont identiques à la souche déposée à Baarn ; l'étude épidémiologique exposée dans ce travail peut donc être rapportée à ce Phycomycète.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I

INFLUENCE DES CONDITIONS NUTRITIVES, DE LA TEMPERATURE ET DE LA LUMIERE SUR LE CYCLE DE QUELQUES PHYCOMYCETES. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

L'accomplissement du cycle des Champignons dépend de 3 types de facteurs : les facteurs génétiques, les facteurs internes liés au métabolisme et les facteurs externes. Le milieu nutritif constitue un de ces facteurs externes au même titre que la température et la lumière.

I. INFLUENCE DU MILIEU NUTRITIF

De nombreux travaux ont été consacrés à l'influence des différents éléments minéraux, carbonés, azotés, vitaminiques nécessaires à la croissance et à la multiplication du Champignon et ont souligné la nécessité de fournir des stérols pour obtenir la reproduction.

1 - Eléments minéraux :

L'examen des différents substrats utilisés en culture *in vitro* révèle la présence indispensable du phosphore, du magnésium, du soufre et du potassium. On note la présence presque constante du fer, du zinc, du manganèse, du cuivre, parfois celle du molybdène, du bore et du calcium. L'effet de ces différents éléments minéraux a été étudié dans de nombreux travaux relatifs à la croissance et à la reproduction asexuée et sexuée des Champignons.

BARKSDALE (1962) remarque la spécificité d'action du calcium, du potassium, du magnésium sur la production des oogones du Phycomycète *Achlya ambisexualis*. Selon YANG et MITCHELL (1965), les ions magnésium et potassium induisent la formation des sporocystes, tandis que les ions calcium favorisent à la fois la formation des sporocystes et celle des oocystes de *Pythium sp.* LENNEY et coll. (1966) notent l'importance des différents microéléments fer, zinc, cuivre, molybdène, calcium, sur la croissance et la différenciation sexuée de *Pythium graminicola*. Les travaux de STANGHELLINI (1972), de STANGHELLINI et RUSSELL (1973) soulignent l'action du calcium sur la résorption de l'endospore, qui constitue la phase initiale de la germination des zygotes. SCHMITTHENNER (1972) démontre le rôle de la lumière et du calcium dans la germination des zygotes de *Pythium sp.*

2) Nature et concentration de la source de carbone :

De nombreuses recherches ont démontré que la source carbonée peut influencer la croissance et la reproduction des espèces fongiques.

a) *les pentoses* sont diversement assimilés par les *Pythium*. En effet, le xylose ne permet ni la croissance, ni la reproduction de *Pythium mamillatum* (BARTON, 1960), ni celle de *Pythium ultimum* (AGNIHOTRI et VAARTAJA, 1967). Selon AGNIHOTRI et VAARTAJA (1967), l'arabinose favorise le développement de *Pythium ultimum*, tandis que le ribose et le rhamnose (6-desoxyhexose, dans lequel un hydrogène du carbone 5 est remplacé par un radical méthyl, il s'agit donc d'un sucre en C₆ mais dont le 6ème carbone ne porte pas de fonction alcoolique) sont inefficaces.

b) *l'action des hexoses* (glucose-fructose-mannose-galactose) favorise la croissance et la reproduction sexuée. Le glucose, le fructose stimulent la germination dans le sol des sporocystes de *Pythium ultimum* (AGNIHOTRI et VAARTAJA, 1967). BARTON (1960) montre l'action du glucose, du mannose sur la croissance de *Pythium mamillatum* dans le sol. CHILD et coll. (1969) prouvent que *Pythium sp.* croît et se reproduit normalement sur des substrats contenant comme source de carbone le glucose, le fructose et ne fructifie pas sur galactose.

c) *le rôle des diholosides est variable selon les espèces. Plus de 90 % des sporocystes du *Pythium ultimum* germent sur un substrat contenant le maltose ou le raffinose comme sources de carbone ; tandis que sur mélibiose seuls 13 % des sporocystes germent. AGNIHOTRI et VAARTAJA (1967), CHILD et coll. (1969) soulignent l'effet inducteur du maltose et du cellobiose sur la croissance et la reproduction du *Pythium sp.* ; par contre, ces mêmes auteurs notent que le lactose est une source de carbone inefficace. Quant au tréhalose, au mélibiose et au raffinose, bien qu'induisant une légère croissance végétative, ils ne peuvent satisfaire les exigences de la reproduction sexuée du *Pythium sp.* (CHILD et coll., 1969).*

d) *l'action des polyosides est en général bénéfique. KOFFI DONGO (1970) démontre que *Phytophthora palmivora* se développe aussi harmonieusement sur un substrat avec de l'amidon ou de la cellulose comme sources de carbone que sur ce même substrat contenant du glucose.*

Mais par ailleurs, il est démontré que les exigences en carbone des Champignons sont satisfaites par des lipides, des sucres alcool, des acides organiques ou des protéines (HENDRIX et APPLE, 1964).

Ces différents travaux montrent que les besoins en carbone lors de la croissance et de la reproduction des organismes fongiques sont variables en fonction des espèces. D'une manière générale, le glucose et le fructose sont favorables à de nombreuses espèces fongiques.

L'analyse bibliographique nous a fourni très peu de données sur le rôle de la concentration en carbone lors de la croissance mycélienne et la reproduction des Pythiacées.

De façon générale les concentrations en carbone favorisant la croissance mycélienne et la multiplication asexuée sont nettement supérieures à celles requises pour la reproduction sexuée ; l'ordre de variation peut être de 1 à 10, les doses optimales varient selon la nature des composés carbonés (HAWKER, 1966). Mais en étudiant *Nectria sp.*, HANLIN (1961) expose des résultats tout à fait différents en montrant qu'une même concentration en glucose de 2 % est favorable à la fois à la croissance végétative, à la multiplication et à la reproduction.

Ceci montre l'extrême variabilité d'action de la nature et de la concentration des sources de carbone nécessaires au bon déroulement du cycle des Champignons.

3) Nature et concentration de la source d'azote :

Les organismes fongiques métabolisent plus ou moins spécifiquement les 3 types de source azotée suivants : nitrique, ammoniacal, organique.

L'azote nitrique, fourni sous forme de nitrate de potassium, semble satisfaisant pour la croissance et la reproduction des genres *Pythium* et *Phytophthora*. Cependant, l'aptitude des *Pythium* à dégrader les nitrites varie selon les espèces. Les différences observées seraient un indice d'adaptation à des conditions écologiques particulières, ainsi des espèces capables d'utiliser un nitrite sont du point de vue morphologique, les moins évoluées ; ces espèces vivent dans le sol et parasitent les organes souterrains (RAVISE, 1968).

L'azote inorganique sous forme ammoniacale est utilisé de façon moins satisfaisante que les nitrates. Ceci pourrait s'expliquer selon LILLY et coll. (1951) par le fait que l'utilisation de l'ion ammonium rend les milieux de culture plus acides, ce qui provoque parfois une inhibition de la reproduction sexuée.

Les acides aminés constituent la source essentielle d'azote organique. De nombreux auteurs ont étudié le rôle d'un acide aminé ou d'un groupe d'acides aminés sur la croissance et la reproduction des organismes fongiques. LEAL et coll. (1967), CHILD et coll. (1969) montrent l'inefficacité de la DL-leucine, de la cystéine, de la méthionine sur la croissance du *Pythium* sp. GOMEZ-MIRANDA et LEAL (1965) affirment que la formation des sporocystes chez les *Phytophthora heveae* et *P. cactorum* dépend de la composition du milieu en acides aminés. LEAL et coll. (1968) démontrent que le L-tryptophane est peu efficace sur la croissance de 5 espèces du genre *Phytophthora*, celles-ci produisant toutes de l'acide indol-acétique, à partir de cette source d'azote.

Les travaux de CALDERONE (1968) montrent que les formes L- des acides aminés apparaissent être de meilleures sources d'azote que les formes D- .

La L- asparagine est une source d'azote efficace pour divers *Pythium* et *Phytophthora* (CAMERON et MILBRATH, 1965). De même ERWIN et KATZNELSON (1961) classent la L- asparagine, la L- histidine, la

L- alanine et le glycolle parmi les sources d'azotes efficaces, la tyrosine, la phénylalanine sont de pauvres sources d'azote. Selon LEAL, GALLEGLY et LILLY (1971), il existe deux types de réactions dues au Champignon en présence des acides aminés :

- le Champignon transforme l'acide aminé en un acide organique qui n'est pas métabolisé, l'acide aminé constitue une mauvaise source d'azote ;
- l'organisme fongique utilise le squelette carboné de l'acide aminé qui est alors une source efficace d'azote.

AGNEHOTRI et VAARTAJA (1967) montrent que l'acide glutamique, l'asparagine, l'extrait de levure sont favorables à la germination des sporocystes du *Pythium sp.* Le rôle prépondérant des acides aspartique, glutamique et de l'asparagine réside dans le fait qu'ils se situent à des carrefours métaboliques.

D'une manière générale, il n'existe pas de source azotée propre à la reproduction sexuée. La teneur en azote requise dans le milieu varie avec le Champignon, et avec la concentration en carbone ; LEAL et coll. (1967) démontrent que les *Phytophthora heveae* et *cactorum* produisent de l'ammoniaque à partir de la L- asparagine lorsque la concentration de celle-ci dépasse celle requise par la quantité de glucose présent.

4) Rapport carbone-azote = C/N :

Le rapport C/N optimal varie selon les espèces fongiques. Des rapports C/N compris entre 20 et 30 stimulent la croissance et la reproduction sexuée d'*Achlya ambisexualis* (BARKSDALE, 1962), du *Phytophthora palmivora* (HUGUENIN et BOCCAS, 1971), du *Pythium sp.* (CHILD et coll., 1969).

LEAL et coll. (1967) montrent l'influence du rapport C/N sur la formation des zygotes matures chez plusieurs espèces du genre *Phytophthora*. Selon ces auteurs, des rapports C/N élevés, compris entre 20 et 35, sont favorables à la production des oospores.

5) Substances de croissance : vitamines :

Des travaux sur les Ascomycètes ont montré le rôle prépondérant de la thiamine dans la fructification parfaite de *Gnomonia fructicola* (SNYDER, 1966). RAVISE (1968) démontre que l'aptitude à synthétiser la thiamine n'est pas un caractère distinctif entre les genres *Pythium*

et *Phytophthora*. Chez le genre *Pythium*, certaines espèces sont autotrophes, d'autres sont hétérotrophes vis-à-vis de la thiamine. De même, on retrouve cette distinction chez les *Phytophthora* dont les espèces hétérotrophes vis-à-vis de la thiamine présentent les caractères suivants : croissance faible, absence de formes de résistance, de reproduction sexuée et asexuée, dégénérescence du cytoplasme dans les hyphes mycéliens âgés. L'apport de très faibles concentrations en thiamine induit une croissance plus importante et le déroulement complet du cycle du Champignon. Des travaux de SMOOT et coll. (1958) attestent le rôle inducteur d'un mélange de 9 vitamines parmi lesquelles la thiamine, la riboflavine et le chlorhydrate de pyridoxine, sur la production et la germination des zygotes de *Phytophthora infestans*.

6) Les stérols :

De nombreux travaux ont été consacrés au rôle des stérols sur la croissance, la reproduction et le pouvoir pathogène des Champignons, plus particulièrement des Phycomycètes.

a) *rôle dans la reproduction sexuée* : HASKINS (1963) obtient la reproduction sexuée de *Pythium acanthicum* Drechs. si ce dernier est cultivé sur P.D.A., en présence de *Fusarium* sp. qui le parasite ; séparé de ce *Fusarium*, *Pythium acanthicum* ne se reproduit plus sexuellement. Par contre, si on ajoute au milieu de base P.D.A., les extraits lipidiques de *Fusarium*, la reproduction sexuelle est rétablie. Continuant ces travaux HASKINS, TULLOCH et MICETICH (1964) utilisent diverses huiles végétales comme substances stimulatrices et constatent que certaines fractions de l'insaponifiable jouent le rôle d'inducteur de la reproduction sexuée. Ces auteurs testent 40 stérols et stéroïdes pour leur activité et remarquent la grande efficacité de l'ergostérol et du β -sitostérol. HENDRIX (1964) montre également le rôle joué par l'apport exogène de stérols sur la reproduction sexuée du *Pythium periplocum* et *Phytophthora* sp. LEAL (1964) n'obtient la reproduction sexuelle de certaines espèces de *Pythium* et de *Phytophthora* que s'il ajoute dans le milieu de culture synthétique, des stérols extraits de farine d'avoine ou de petits Pois. ELLIOTT et coll. (1964) étudient la reproduction sexuelle de *Phytophthora cactorum* : cultivé sur un milieu à la farine d'avoine, gélosée, ce Champignon fructifie normalement, par contre la reproduction sexuée n'a pas lieu si le Champignon est cultivé sur un milieu synthétique contenant le glucose ou le saccharose, l'asparagine, des sels minéraux, la thiamine ; sur ce même milieu, la croissance

végétative est ralentie. Cependant, si à ce milieu, ces auteurs ajoutent des extraits éthérés d'avoine à raison de 500 mg par litre, la croissance est augmentée et la reproduction sexuelle est à nouveau induite ; par contre l'addition d'extraits aqueux ne fait que stimuler la croissance. HUGUENIN et coll. (1971) n'obtiennent la reproduction sexuée de *Phytophthora palmivora* que s'ils ajoutent 20 mg de β -sitostérol par litre de milieu. Les analyses chimiques effectuées sur ces différents extraits éthérés montrent que la fraction contenant les stérols, en particulier le β -sitostérol, le cholestérol, le Δ^7 -stigmastérol, le brassicastérol, le campestérol et l'ergostérol est la fraction active. ELLIOTT et coll. testent les stérols purs et avec l'addition de cholestérol, d'acétate de cholestérol, d'ergostérol, d'acétate de stigmastérol activent fortement la croissance et la reproduction sexuée du *Phytophthora cactorum*.

Ces travaux sur l'apport exogène de stérol et leur rôle sur la reproduction sexuée des Phycomycètes s'éclairent d'un jour nouveau depuis la découverte, l'analyse et l'étude métabolique du rôle de l'anthéridiol et de l'oogoniol chez *Achlya ambisexualis* (BARKSDALE, 1969). Ces deux substances dérivées de stérols, biosynthétisées par le Phycomycète, jouent le rôle d'hormones sexuelles ; l'anthéridiol produit par le thalle femelle induit sur le thalle mâle la formation de l'ébauche du spermatocyste. L'oogoniol produit par ce thalle mâle porteur de spermatocyste participe alors à la différenciation de l'oocyste.

Pour des Champignons, tels que *Pythium* et *Phytophthora* incapables de biosynthétiser les stérols, l'apport exogène est obligatoire et leur métabolisme conduit à la formation de composés actifs sur la reproduction sexuée.

HENDRIX (1970) rapporte que des cultures du *Pythium periplocum* sont capables de métaboliser le cholestérol, le β -sitostérol en deux métabolites : un ester et un composé plus polaire que le cholestérol, ressemblant à l'anthéridiol. OCANA (1967) constate qu'après 3 semaines de développement, il n'est plus possible de détecter la présence d'ergostérol dans le mycélium et les sporocystes de *Phytophthora sp.*, ni dans le milieu de culture auquel il avait été ajouté. Les extraits insaponifiables du mycélium sont capables d'induire la formation des zygotes sur un milieu sans ergostérol. Cet auteur émet l'hypothèse selon laquelle les stérols pourraient être transformés en hormone dont le rôle sur la différenciation sexuelle semble se préciser.

b) *hypothèses sur le rôle des stérols dans le métabolisme des champignons* : Si de nombreux travaux ont montré l'action des stérols sur la reproduction sexuée des *Pythium*, les modalités d'action de ces stérols restent ignorées, des hypothèses ont été formulées par différents auteurs. SCHLOSSER et GOTTLIEB (1968) montrent que le cholestérol augmente la croissance des espèces étudiées, et remarquent que *Pythium sp.* incorpore et métabolise plus rapidement le glucose en gaz carbonique, sur les milieux contenant un stérol. Des travaux ont démontré la probabilité de formation d'un complexe entre les stérols et les phospholipides ; c'est ainsi que GOTTLIEB (1950) indique que les antibiotiques polyènes, qui sont des inhibiteurs de la croissance et de la reproduction des champignons agissent par interférence avec les stérols cellulaires ; ils auraient pour effet la rupture de la perméabilité cellulaire, effet qui serait contrecarré par les stérols exogènes. SIETSMA et HASKINS (1968) étudient le rôle des stérols sur le métabolisme des cellules de *Pythium sp.* PRL 2142 ; pour eux le Champignon est capable d'incorporer le cholestérol dont le rôle serait de modifier la perméabilité cellulaire, ce changement de perméabilité serait probablement le facteur agissant sur la capacité du Champignon de survivre à des températures hautes (HASKINS, 1965). De plus, le cholestérol se retrouve en faible quantité dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique de certains organismes, agissant ainsi sur la respiration cellulaire. En changeant la composition du réticulum endoplasmique, le cholestérol agirait sur la synthèse des protéines, en particulier des enzymes telles que la cellulase et la laminaranase ; cet effet se traduirait sur la croissance et la morphologie du Champignon.

En effet, la paroi des cellules de *Pythium sp.* est constituée en partie de laminarane (β -1-3 glucose), de cellulose (β -1-4 glucose) qui maintiennent la structure de la paroi.

Les mécanismes par lesquels les stérols agissent sur le métabolisme et induisent ou stimulent la reproduction sexuée des Champignons, demeurent à ce jour inconnus. Par analogie avec le monde animal, certains chercheurs ont envisagé un rôle hormonal des stérols ou une action stimulatrice des composés issus de leurs transformations par les radiations ultra-violettes. De nombreux auteurs attribuent actuellement l'effet des stérols dans la reproduction sexuée à leur participation, dans les activités métaboliques, à des réactions oxydatives productrices d'énergie ou à leur action sur la perméabilité cellulaire.

c) *action des stérols sur le pouvoir pathogène* : Peu de travaux ont été consacrés au rôle des stérols sur le pouvoir pathogène des *Pythium*.

DEFAGO et coll. (1975) étudient le rôle des stérols et des saponines sur le pouvoir pathogène du *Pythium paroeocandrum*. Les saponines sont synthétisées par de nombreuses plantes ; elles interviendraient dans les phénomènes de résistance aux parasites *in vitro*, en se fixant sur les molécules de cholestérol incorporées à la membrane cytoplasmique des Champignons. D'une part, la formation du complexe saponine-cholestérol détruirait la semi-perméabilité de la membrane du Phycomycète, et d'autre part diminuerait son pouvoir de sporuler asexuellement et sexuellement. Ce phénomène est rencontré chez la Tomate et la Betterave dont les racines contiennent des saponines. Par contre, chez le Pois et le Soja dont les racines exemptes de saponines susceptibles de réagir avec le cholestérol, la maladie s'avère plus grave du fait que *Pythium* se reproduit sexuellement.

MELLANO et coll. (1970) démontrent les relations existant entre l'activité, de l'enzyme pectique du filtrat de culture du *P. ultimum* et les stérols présents dans les racines de Muflier, sur le pouvoir pathogène de ce Phycomycète du Muflier.

L'enzyme pectique présente dans les filtrats de culture provoque la destruction des tissus de la racine ; la présence de β -sitostérol dans le milieu induit la formation de zygotes d'une part, et diminue l'activité pectique de l'enzyme d'autre part. Des tissus de Muflier tolérants à *Pythium ultimum* contiennent des taux importants de stérols, permettant le passage du champignon de l'état végétatif à l'activité sexuelle, mais provoquant une baisse de l'activité pectique du filtrat, donc une diminution de la virulence. Chez les tissus sensibles, l'absence de stérols permet à l'activité pectique de s'exprimer, donc à la virulence de s'exprimer.

II. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

De façon générale, les températures comprises entre 10 et 35°C favorisent la croissance mycélienne de très nombreux organismes fongiques, et peuvent de ce fait induire leur reproduction. Cependant, les exigences thermiques des différents Champignons varient en fonction des genres et des espèces.

HUGUENIN et BOCCAS (1971) soulignent que la réalisation de la phase sexuée de *Phytophthora palmivora* requiert des températures plus basses que celles exigées par la croissance végétative (20 à 26°C au lieu de 28 à 30°C). Ces résultats sont confirmés par ceux de KOFFI-DONGO (1971) pour d'autres isolats de la même espèce ; en effet, cet auteur observe une croissance optimale à des températures comprises entre 26 et 31°C, tandis que le nombre maximum de zygotes se forme entre 20 et 26°C. AYERS et LUMSDEN (1975) définissent les températures optimales de formation des zygotes qui sont pour *Pythium ultimum* de 10 à 20°C, et de 15 à 25°C pour *Pythium myriotylum* et *aphanidermatum*.

Les températures optimales de croissance et de production et germination des oospores sont des caractères particuliers à chaque espèce.

III. INFLUENCE DE LA LUMIERE

L'action de la lumière sur la production des sporocystes a été étudiée en particulier chez plusieurs espèces du genre *Phytophthora*. Les résultats de divers travaux concernant ce paramètre ne sont pas concordants. Selon HARNISH (1965), la formation de sporocystes est stimulée par la lumière du jour et par les lampes à fluorescence bleue, la formation des zygotes est favorisée par l'obscurité et par les radiations rouges. Selon HUGUENIN et BOCCAS (1971) : "l'influence de la lumière se traduit par une régression du taux de reproduction en fonction de l'intensité ; les radiations de courte longueur d'onde étant les plus actives dans cette inhibition".

La levée de dormance des zygotes du *Phytophthora palmivora* Butl. est assurée de façon intense par les radiations bleu-violet (HUGUENIN et BOCCAS, 1971). RIBEIRO et coll. (1975) montrent que les radiations de longueurs d'onde 450 et 750 nm stimulent la reproduction de 4 espèces de *Phytophthora*. La nature des pigments de photoréponse n'est pas définie ; cependant, certaines flavines, ou des formes voisines de semi-quinones, absorbent respectivement à 450 et 700 nm.

En outre, certains milieux naturels, à l'obscurité continue, induisent la reproduction sexuée de Champignons qui, cultivés sur d'autres substrats, ne fructifient qu'en présence de lumière (LEAL, 1971).

Ces résultats nous montrent la complexité du rôle de la lumière qui agit simultanément avec la composition du milieu nutritif.

CONCLUSION

Il ressort de cette revue bibliographique que la croissance et la reproduction asexuée et sexuée des Phycomycètes se réalisent de façon optimale, dans la mesure où les conditions nutritives, thermiques et lumineuses sont simultanément maintenues à leur valeur optimale.

C H A P I T R E I I

INFLUENCE DES CONDITIONS NUTRITIVES, THERMIQUES
ET LUMINEUSES SUR LA CROISSANCE ET LA REPRO-
DUCTION DU *PYTHIUM TRACHEIPHILUM* MATTA

Avant d'exposer les résultats de nos travaux, nous décri-
rons les principales méthodes de culture et conditions expérimentales que
nous avons utilisées de façon générale. Nous ne préciserons, par la suite,
que les conditions opératoires particulières.

I. MATERIEL ET METHODES

1) Milieux de culture :a) *milieux naturels* :

- fragments de racines de carottes : des demi-cylindres
de racines de carottes sont découpés à l'emporte-pièce et placés dans des
tubes de Roux dont l'ampoule est à demi remplie d'eau distillée.

- farine d'avoine : 20, 40 ou 60 g de farine d'avoine sont
mis en suspension dans un litre d'eau distillée. Après une nuit à 60°C, la
décoction est soit gélosée à 2 % et coulée dans des tubes de pyrex 25 x
200 mm, à raison de 18 ml par tube, soit filtrée sur laine de verre, le fil-
trat réajusté à 1 litre, est gélosé puis réparti en tubes.

- eau de pomme de terre : la concentration choisie (20,
40 ou 60 g) de pulpe de pomme de terre finement broyée est mise à bouillir
dans un litre d'eau distillée pendant 10 minutes. Après refroidissement,
la pulpe est à nouveau broyée à l'ultra-turax puis filtrée sur verre fr:

Le volume du filtrat, ramené à sa valeur initiale par addition d'eau distillée, est gélosé à 2 % et réparti en tubes, ce milieu gélosé peut être additionné de 1 % de glucose (milieu potato-dextrose-agar, en abrégé P.D.A.).

b) *milieux synthétiques* :

Notre but dans ce travail n'était pas la mise au point d'un milieu chimiquement défini pour l'étude du cycle du *Pythium tracheiphilum*, c'est pourquoi nous avons utilisé le milieu synthétique mis au point par HUGUENIN (1970), milieu favorable à la croissance et à la reproduction du *Phytophthora parasitica* : ce milieu nous paraissant particulièrement complet ; les sources de carbone et d'azote, les éléments minéraux utilisés nous apparaissent, après l'étude de la bibliographie, favorables à la croissance et à la reproduction du genre *Pythium*.

Le milieu de base contient les éléments suivants :

| | | | |
|---|---------|---|-----------|
| - MgSO ₄ ,7H ₂ O..... | 0,5 g/l | - FeSO ₄ ,7H ₂ O..... | 0,5 mg/l |
| - K ₂ SO ₄ | 0,5 g/l | - ZnSO ₄ ,7H ₂ O..... | 0,5 mg/l |
| - CaCl ₂ ,2H ₂ O..... | 0,2 g/l | - CuSO ₄ ,5H ₂ O..... | 0,02mg/l |
| - K ₂ HPO ₄ | 0,1 g/l | - MnCl ₂ ,7H ₂ O..... | 0,02 mg/l |
| - KH ₂ PO ₄ | 0,8 g/l | - TiSO ₄ ,5H ₂ O..... | 0,02 mg/l |
| | | - Mo ₇ (NH ₄) ₆ ,4H ₂ O..... | 0,02 mg/l |

La source de carbone est le glucose, apporté à raison de 10 g par litre, la source d'azote est le nitrate de potassium, à raison de 1 g par litre, le chlorhydrate de thiamine est fourni au milieu à raison de 2 mg par litre.

c) *stérilisation* :

Les récipients bouchés au coton hydrophile sont stérilisés par un autoclavage en chaleur humide, à 0,5 atmosphère pendant 20 minutes.

2) Conditions physiques :

Les expériences réalisées en milieu liquide dans les fioles de Roux nécessitent une bonne oxygénation du mycélium assurée par 18 baguettes de verre plein de 6 mm de diamètre garnissant le fond des fioles. L'ensemencement s'effectue à la surface des baguettes.

a) *température* :

L'incubation des cultures a lieu dans des enceintes climatisées où la température est réglée à $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

b) *éclairage* :

Les cultures sont placées sous un éclairage en lumière blanche assuré par des tubes fluorescents (Mazda fluor TF 20 W blanc brillant de luxe). Les longueurs d'onde voisines de 350 nm sont fournies par des tubes fluorescents Mazda fluor TF WN 20.

Lors des expériences réalisées à l'obscurité, les récipients de culture sont recouverts de papier noir et placés dans des enceintes sans lumière.

3) Expression des résultats :a) *étude de la croissance* :

- technique des poids secs : les courbes de croissance traduisent quantitativement le développement mycélien en milieu liquide. Ces courbes de croissance sont établies par mesure du poids de matière sèche recueillie dans les fioles de Roux, en milieu liquide. Ces mesures sont effectuées sur 3 à 5 fioles tous les 2 jours. Le mycélium est récolté sur papier filtre sans cendre, sous vide, et lavé abondamment à l'eau distillée. Le filtre et le mycélium récolté sont ensuite placés dans une boîte à tare dont le poids ainsi que celui du filtre, ont fait l'objet d'une détermination préalable après passage à 105°C jusqu'à poids constant.

Au sortir de l'étuve, les boîtes à tare sont placées dans un dessiccateur jusqu'à complet refroidissement. Le poids sec du mycélium est déduit de la différence entre les résultats de la pesée préalable et de la pesée après dessiccation.

- mesure du diamètre de la culture : dans le cas de culture gélosée en boîte de Pétri, la mesure de la croissance est effectuée en notant après 3 jours, 4 jours et 6 jours, le diamètre des cultures.

b) *multiplication et reproduction sexuée* :

Les cultures sont examinées chaque jour sous le microscope et on note l'apparition et l'aspect des organes de la reproduction asexuée et sexuée. Le dénombrement des zygotes et des sporocystes est effectué à l'hématimètre. Les résultats sont rapportés au μl de milieu.

II. RESULTATS EXPERIMENTAUX

1) Croissance et reproduction sur les milieux naturels :

La croissance et la reproduction sexuée et asexuée ont été testées sur les différents milieux naturels ci-dessous, et les résultats sont rapportés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Influence du milieu naturel sur la croissance et la reproduction du *Pythium tracheiphilum*.

| | Pomme de terre | | Fragments de carotte | Malt 20g/litre | Farine d'avoine | | | Farine d'avoine filtrée | | |
|----------------------|----------------|---------------|----------------------|----------------|-----------------|------|------|-------------------------|------|------|
| | 50g/l | 50g/l glc 1 % | | | 20 g | 40 g | 60 g | 20 g | 40 g | 60 g |
| Croissance | ++ | +++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | + | + | ++ |
| Reproduction asexuée | ++ | +++ | + | ++ | + | ++ | ++ | + | + | ++ |
| Reproduction sexuée | 0 | 0 | 0 | 0 | ± | + | ++ | 0 | 0 | 0 |

0 : pas de reproduction
 + : croissance ou reproduction très faibles
 ++ : croissance moyenne, reproduction moyenne
 +++ : croissance et reproduction importantes.

Ces cultures ont été réalisées en tubes 25/200 mm sur gélose pour les milieux à base de malt, de pomme de terre et de farine d'avoine ou en tubes de Roux pour les fragments de carotte. Nous n'avons pu évalué de façon précise la croissance quantitative, aussi avons-nous eu recours à l'échelle de croissance ci-dessus notée.

Conclusion et discussion :

La croissance mycélienne du Champignon a lieu sur les différents milieux naturels utilisés ; elle est cependant plus importante sur pomme de terre glucosée, sur fragments de carotte et sur les milieux de farine d'avoine non filtrée, à partir de la concentration de 40g d'avoine par litre.

La multiplication asexuée se manifeste sur tous les substrats utilisés, le nombre de sporocystes variant en fonction des milieux : ceux favorisant la croissance du thalle étant les plus fournis en sporocystes.

Quant à la reproduction sexuée, elle n'est observée que sur les milieux à base de farine d'avoine non filtrée.

Ces observations et résultats sont en accord avec les travaux de HASKINS (1963) qui n'obtenait pas la reproduction sexuée du *Pythium acanthicum* sur milieu P.D.A. et avec ceux de LEAL (1964), d'ELLIOTT et coll. (1964), qui démontraient l'effet inducteur des composés stéroliques extraits de la farine d'avoine sur la reproduction sexuée du *Pythium* sp. et du *Phytophthora cactorum*.

2) Croissance et reproduction sur milieux synthétiques :

a) *influence de la nature et de la concentration des stérols sur la croissance et la reproduction sexuée du Pythium tracheiphilum :*

- nature de la source de stérol : étant donné que nous n'avons obtenu la reproduction sexuée du *P. tracheiphilum* que sur un milieu contenant des extraits stéroliques (milieu farine d'avoine non filtrée), nous avons testé l'activité inductrice des stérols suivants : β -sitostérol, ergostérol, cholestérol, palmitate de cholestérol, 7-déhydrocholestérol. Les différents stérols ont été incorporés de la manière suivante au milieu de culture :

- dans le cas de milieu gélosé, le stérol est ajouté avant l'autoclavage, sous forme d'une solution éthérée, à raison de 2 ml d'éther renfermant 2 mg de stérol par litre de milieu ;

- dans le cas de milieu liquide, le stérol dissous extemporanément dans l'éther, est ajouté à raison de 0,1 ml de solution éthérée, à chaque fiole, après autoclavage, dans le milieu légèrement tiède ; afin d'assurer le maximum d'évaporation du solvant éthéré, les fioles sont agitées après l'addition du stérol.

Nous avons utilisé dans ces expériences des doses de stérol de 2mg par litre, HUGUENIN incorporait 20 mg par litre de β -sitostérol.

Nous avons égalementensemencé des milieux liquides ne contenant pas de stérol.

- résultats : les résultats sont les suivants : sur le milieu contenant le β -sitostérol, le cholestérol, le 7-déhydrocholestérol après 3 jours de culture, les spermatocystes sont formés ; après le 5ème jour, on note la formation des oocystes et le début des phénomènes de conjugaison ; les jours suivants, jusqu'au 8ème jour, on remarque la formation des organes sexués et l'évolution vers la formation des oospores ou zygotes. Des changements interviennent au niveau du contenu des organes sexués : le contenu de l'oocyste est d'abord finement granuleux, la paroi est assez fine.

L'accolement du spermatocyste contre la paroi de l'oocyste s'accompagne de l'émission par le spermatocyste d'un tube de conjugaison qui perce la paroi de l'oocyste.

La fécondation de l'oospore s'accompagne d'un épaissement de la paroi de l'oogone et de la dégénérescence du spermatocyste. L'oospore ou zygote présente une paroi épaisse de nature callo-cellulosique ; son contenu s'individualise en deux régions : une région centrale granuleuse et un corpuscule en forme de croissant, dans un des pôles.

Il est à noter que l'ergostérol ne permet pas la différenciation des organes sexués.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Influence de la source de stérol sur la croissance et la reproduction sexuée du Pythium tracheiphilum.

| nature du stérol | Jour d'apparition des organes sexués | nbre de zygotes par μ l de milieu le 10e jour | poids de matière sèche en mg au 10e jour |
|--------------------------|--------------------------------------|---|--|
| β -sitostérol | 3ème | 190 | 302 |
| cholestérol | 3ème | 200 | 285 |
| 7-déhydrocholestérol | 3ème | 171 | 291 |
| palmitate de cholestérol | 3ème | 183 | 301 |
| ergostérol | - | 0 | 280 |

Ces résultats illustrent le fait que les différentes sources de stérol, à l'exception de l'ergostérol sont favorables à la croissance et à la reproduction sexuée de *P. tracheiphilum*.

- concentration en stérol : nous avons testé le β -sitostérol aux concentrations suivantes : 0,02, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 5 et 10 mg par litre. Les résultats sont exprimés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Influence de la concentration en β -sitostérol sur la croissance et la reproduction sexuée du *Pythium tracheiphilum*.

| concentrations en β -sitostérol en mg/litre | jour de formation des organes sexués | nbre de zygotes par μ l de milieu au 10ème jour | Croissance |
|---|--------------------------------------|---|------------|
| 0,02 | 3ème | 185 | +++ |
| 0,1 | 3ème | 189 | +++ |
| 0,2 | 3ème | 170 | +++ |
| 0,5 | 3ème | 192 | +++ |
| 1 | 3ème | 180 | +++ |
| 5 | 3ème | 198 | +++ |
| 10 | 3ème | 179 | +++ |

Il ressort de ces expériences que les concentrations en stérol de 0,02, 0,1, 0,2 et 0,5 mg par litre sont aussi efficaces dans la production des zygotes que les concentrations supérieures à 1 mg.

- conclusions : ces résultats nous montrent que *Pythium tracheiphilum* a besoin de stérol pour assurer sa reproduction sexuée. Le β -sitostérol, le cholestérol, le palmitate de cholestérol, le 7-déhydro-cholestérol sont efficaces pour l'induction de ce phénomène sexué ; par contre l'ergostérol se révèle inefficace dans la formation des organes sexués du *P. tracheiphilum*, tandis qu'il s'avère actif dans l'induction sexuée du *P. acanthicum* (HASKINS et coll., 1964), et du *Phytophthora cactorum* (ELLIOTT et coll., 1964). Quant à l'influence de la concentration en stérol sur la croissance et la reproduction sexuée du *P. tracheiphilum*, nos résultats montrent que le nombre de zygotes par μ l de milieu au

F I G U R E 2

INFLUENCE DE LA NATURE DE LA SOURCE DE CARBONE SUR LA
CROISSANCE DU *PYTHIUM TRACHEIPHILUM*

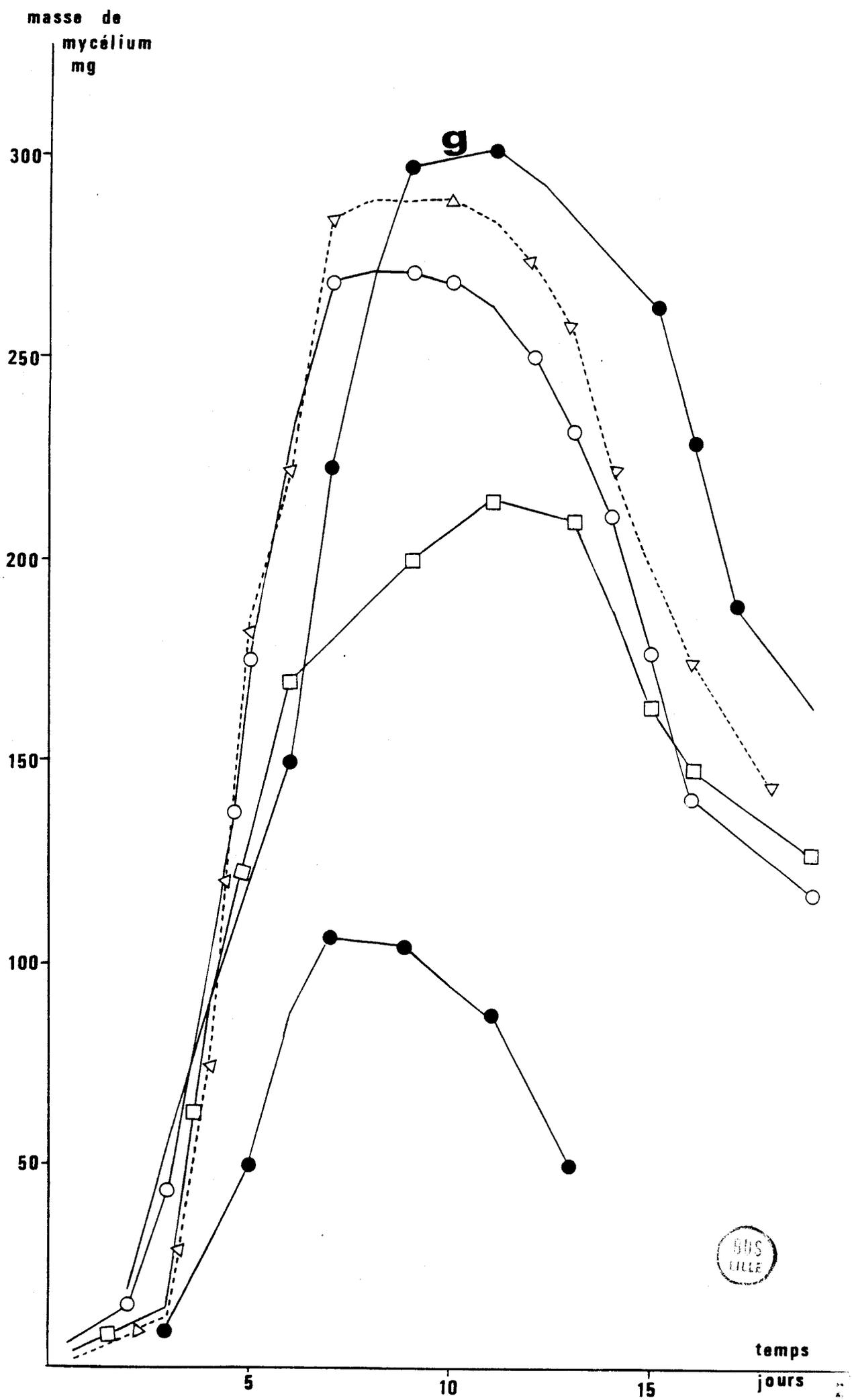
●—● ribose

○—○ maltose

●^{**g**}—● glucose

▽.....▽ fructose

□—□ raffinose



10ème jour de culture est sensiblement identique pour les concentrations de stérol utilisées. Notons que nous utilisons dans le milieu chimiquement défini de HUGUENIN, des doses de stérol 100 fois moins importantes que celles utilisées par cet auteur (0,2 mg/l). En présence de 0,2 mg par litre de β -sitostérol, la croissance du *Pythium tracheiphilum* est identique à celle obtenue sur le même milieu sans stérol.

b) *influence de la nature et de la concentration de la source en carbone :*

- nature de la source carbonée : dans les expériences qui suivent, le milieu utilisé est le milieu de HUGUENIN (1970) préalablement décrit ; les besoins en azote sont assurés par le nitrate de potassium, à raison de 138 mg par litre.

Nous avons testé les sources suivantes de carbone : ribose, glucose, fructose, maltose, raffinose, en milieux liquides, à raison de 4 g de carbone par litre, et l'inuline en milieu gélosé en boîte de Pétri à raison de 10, 15 et 20 g par litre.

résultats :

.influence de la source de carbone sur la croissance mycélienne : Les résultats sont exprimés dans la figure 2. Après 4 jours de culture, on constate que *P. tracheiphilum* utilise toutes les sources de carbone, à l'exception de l'inuline, pour sa croissance végétative, sa multiplication et sa reproduction sexuée. Cependant, on note des différences au niveau de la croissance quantitative et de la vitesse de croissance : en effet, le glucose, le fructose et le maltose permettent d'obtenir au 10ème jour de culture, des poids de matière sèche variant entre 270 et 300 mg, tandis qu'avec le raffinose, l'optimum de croissance est retardé au 11ème jour et correspond à 215 mg de matière sèche ; cet optimum est atteint au 7ème jour, avec 106 mg si nous utilisons le ribose comme source de carbone.

L'inuline apportée au milieu à 10, 15 ou 20g par litre ne permet pas la croissance mycélienne du *Pythium tracheiphilum*.

.influence de la source de carbone sur la multiplication et la reproduction sexuée : Nous avons effectué des comptages, à l'hématicmètre, de sporocystes et de zygotes par μ l de milieu après incubation de 10 jours. Les résultats sont exprimés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Influence de la source de carbone sur la multiplication et sur la reproduction sexuée du *P. tracheiphilum*.

| Sources de carbone | Nbre de sporocystes par μ l de milieu au 10 ^{ème} jour | Nbre de zygotes par μ l de milieu au 10 ^{ème} jour |
|--------------------|---|---|
| Ribose | 220 | 110 |
| Glucose | 228 | 200 |
| Fructose | 210 | 191 |
| Maltose | 219 | 178 |
| Raffinose | 181 | 155 |
| Inuline | 0 | 0 |

Il ressort de ces expériences que le glucose, le fructose, le maltose favorisent à la fois la multiplication et la reproduction sexuée du *P. tracheiphilum*. Tous les substrats carbonés, à l'exception de l'inuline, permettent un développement important des sporocystes. On observe un nombre moins important de zygotes sur raffinose et surtout sur ribose.

- concentration de la source de carbone : afin de préciser l'influence de la concentration en carbone sur la croissance et la reproduction, nous avons employé le glucose aux concentrations de 2, 2,4, 2,8, 3,2, 3,6 et 4 g par litre.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Influence de la concentration en carbone sur la croissance et la reproduction du *P. tracheiphilum*.

| Concentrations en carbone en g/litre | Croissance | Nbre de zygotes par μ l de milieu au 10 ^{ème} jour | Nbre de sporocystes par μ l de milieu au 10 ^e jour |
|--------------------------------------|------------|---|---|
| 2 | +++ | rare zygotes | 174 |
| 2,4 | +++ | 10 | 177 |
| 2,8 | +++ | 171 | 192 |
| 3,2 | +++ | 160 | 167 |
| 3,6 | +++ | 177 | 192 |
| 4 | +++ | 185 | 200 |
| 6 | +++ | 182 | 191 |
| 8 | +++ | 58 | 187 |

Cette étude établit de façon très nette que les doses de 2 et 2,4 g de carbone par litre n'induisent pas la reproduction sexuée du champignon ; par contre, ces doses permettent une croissance mycélienne normale et l'accomplissement de la multiplication. La concentration de la source carbonée affecte peu le nombre de sporocystes ; par contre, les doses de carbone comprises entre 2,8g et 4g par litre favorisent nettement la formation des zygotes ; la dose de 8g par litre de carbone inhibe la reproduction sexuée.

- conclusion : il se dégage de ces résultats que la nature de la source carbonée intervient plus spécifiquement sur le développement mycélien que sur les phénomènes de reproduction. On note que les zygotes peuvent se développer sur tous les substrats carbonés permettant la croissance, mais on observe un nombre plus important de zygotes sur glucose, fructose et maltose. La reproduction sexuée du *P. tracheiphilum* dépend étroitement de la concentration en carbone, les doses favorables varient de 2,8 à 6 g par litre. Les concentrations en carbone égales ou inférieures à 2,4 g, égales ou supérieures à 8 g inhibent la reproduction sexuée tandis qu'elles conviennent à la croissance et à la formation des sporocystes.

Nous constatons donc que les taux de carbone favorables à la reproduction sexuée de *Pythium tracheiphilum* peuvent être plus élevés que ceux qui stimulent la croissance et la multiplication. Les valeurs optimales sont cependant limitées. Il ne s'agit donc pas d'un phénomène dit "d'affamement" tel qu'il se produit chez les Levures, celles-ci produisant des asques lorsqu'elles sont privées d'aliments, mais de l'établissement d'un équilibre physiologique.

c) *influence de la nature et de la concentration de la source d'azote :*

- nature et concentration de la source en azote : dans ces essais, nous utilisons le milieu de HUGUENIN dans lequel le glucose est apporté à raison de 4g de carbone par litre. Nous avons expérimenté les sources d'azote suivantes :

- l'azote nitrique sous forme de nitrate de potassium à la concentration de 150mg d'azote par litre ;

- l'azote organique fourni successivement par de l'alanine, de l'asparagine, de la leucine à la dose finale de 150mg d'azote par litre ; nous avons choisi ces acides aminés car de nombreux auteurs ont étudié leur rôle dans la croissance et la reproduction des espèces du genre *Pythium*.

- concentration en azote : nous avons testé le nitrate de potassium de façon à fournir 50, 100, 138, 150 et 200mg d'azote par litre, l'alanine, la leucine et l'asparagine séparément à des doses finales de 50 et 150 mg d'azote par litre.

résultats :

Les résultats sont exprimés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Influence de la nature et de la concentration de la source d'azote sur la croissance et la reproduction du *Pythium tracheiphilum*.

| Source d'azote | | Quantité d'azote par litre | Poids de matière sèche après 11 jours de culture | Multiplication asexuée | Reproduction sexuée |
|----------------------|-----------------|----------------------------|--|------------------------|---------------------|
| Nitrate de potassium | Azote nitrique | 50 mg | 28 mg | + | - |
| | | 100 mg | 170 mg | +++ | - |
| | | 138 mg | 302,3 mg | +++ | +++ |
| | | 150 mg | 290 mg | +++ | +++ |
| | | 200 mg | 250 mg | +++ | +++ |
| Alanine | Azote organique | 50 mg | 90 mg | ++ | - |
| | | 150 mg | 270 mg | +++ | +++ |
| Asparagine | Azote organique | 50 mg | 83 mg | ++ | - |
| | | 150 mg | 250 mg | +++ | +++ |
| Leucine | Azote organique | 50 mg | 80 mg | + | - |
| | | 150 mg | 92 mg | + | - |

action sur la croissance mycélienne et la multiplication :

L'azote nitrique permet la croissance du *Pythium tracheiphilum* ; la masse mycélienne maximale est obtenue au 11ème jour avec les différentes doses testées. La croissance optimale est obtenue avec 138mg d'azote par litre. Les valeurs de 100 et surtout de 50mg d'azote par litre réduisent considérablement la croissance quantitative du *Pythium tracheiphilum* ; les doses de 150 et 200 mg permettent une croissance sensiblement moins importante que celles obtenues avec 138 mg/l.

L'azote organique fourni par l'alanine et l'asparagine à la dose de 150mg par litre permet une croissance mycélienne importante (poids de matière sèche de 250 et 270mg au 11ème jour de culture). Par contre, l'alanine et l'asparagine, à raison de 50mg d'azote par litre, ne permettent qu'une croissance faible. La leucine, aux concentrations de 50 ou 150mg d'azote par litre, ne fournit qu'une très faible masse mycélienne.

La multiplication asexuée a lieu sur les différentes sources d'azote ; de façon générale, on note une réduction de nombre de sporocystes formés lorsque la croissance mycélienne est moins importante.

action sur la reproduction : La reproduction sexuée réclame des conditions plus particulières : les zygotes se forment en grand nombre sur le milieu où l'azote est fourni par le nitrate de potassium, à raison de 138, 150 et 200 mg par litre ; les doses de 50 et 100mg ne permettent pas la production des zygotes. Parmi les acides aminés testés, nous remarquons l'inefficacité de la leucine fournie à des concentrations d'azote de 50 et 150mg par litre ; cet acide aminé est également moins bien métabolisé par *P. tracheiphilum* tant pour la croissance végétative que pour sa différenciation asexuée. En ce qui concerne l'alanine et l'asparagine, les doses de 50mg d'azote par litre semblent insuffisantes lors du déclenchement du processus sexué, par contre les doses de 150mg par litre stimulent nettement la production des zygotes du *P. tracheiphilum*.

Cependant, il aurait été intéressant de tester des quantités plus importantes d'azote, permettant d'atteindre les limites maximales pour l'inhibition de la reproduction sexuée du *P. tracheiphilum*.

- conclusions : l'azote nitrique fourni sous forme de nitrate de potassium semble satisfaisant pour la croissance et la reproduction du *Pythium tracheiphilum*.

L'alanine et l'asparagine constituent des sources d'azote efficaces pour la croissance, la multiplication et la reproduction sexuée du parasite. L'inefficacité de la leucine serait en accord avec les travaux de LEAL et coll. (1967), CHILD et coll. (1969), et de ERWIN et KATZNELSON (1961), qui l'observaient chez différentes espèces des genres *Pythium* et *Phytophthora*.

Les doses d'azote requises pour la croissance, la reproduction sexuée, la multiplication asexuée du *Pythium tracheiphilum* sont supérieures à celles habituellement requises par les organismes fongiques appartenant à la classe des Ascomycètes.

Il semblerait ressortir de ces expériences que la quantité d'azote nécessaire au Champignon varie avec la concentration en carbone ; un équilibre carbone-azote serait indispensable au bon déroulement du cycle du *P. tracheiphilum*.



| Quantité de carbone en g/litre fourni par le glucose | Quantité d'azote en g/litre fourni par KNO ₃ | Rapport C/N | Croissance et multiplication | Reproduction sexuée |
|--|---|-------------|------------------------------|---------------------|
| 2 | 0,138 | 14 | ++ | - |
| 2,4 | 0,138 | 17 | +++ | +++ |
| 2,8 | 0,138 | 20 | +++ | +++ |
| 3,2 | 0,138 | 23 | +++ | +++ |
| 3,6 | 0,138 | 26 | +++ | +++ |
| 4 | 0,138 | 29 | +++ | +++ |
| 4,8 | 0,138 | 34 | +++ | +++ |
| 5,4 | 0,138 | 39 | +++ | - |
| 6 | 0,138 | 43 | + | - |
| 4 | 0,050 | 80 | + | - |
| 4 | 0,100 | 40 | + | - |
| 4 | 0,200 | 20 | +++ | +++ |
| 4 | 0,400 | 10 | ++ | - |

Tableau 7 : Influence du rapport carbone/azote sur la croissance, la multiplication et la reproduction sexuée.

d) *étude du rapport carbone/azote* :

- première série d'expériences : dans cette première série d'expériences, le glucose fournit successivement 2 - 2,4 - 3,2 - 4 - 4,8 - 5,4 et 6 g de carbone par litre ; l'azote est apporté à raison de 138 mg par litre, sous forme de nitrate de potassium.

- deuxième série d'expériences : le carbone est apporté à la concentration de 4 g par litre, sous forme de glucose ; l'azote est fourni à raison de 50, 100, 200 et 400 mg par litre par le nitrate de potassium.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 7, ci-contre.

- conclusion : les résultats de ces essais montrent que des rapports C/N compris entre 17 et 34 favorisent à la fois la croissance mycélienne, la multiplication et la reproduction sexuée du *Pythium tracheiphilum* ; des rapports carbone/azote, inférieurs ou égaux à 14 d'une part, ou supérieurs à 34 d'autre part, ne permettent pas la reproduction sexuée de l'organisme étudié.

e) *rôle de la thiamine ou vitamine B1* :

Les travaux cités dans la bibliographie font état du besoin exogène en thiamine, variable selon les espèces chez les genres *Pythium* et *Phytophthora*.

Le besoin en vitamine B1 a été étudié de la façon suivante : nous avons mesuré l'importance de la croissance mycélienne, et contrôlé la présence ou non de la reproduction, en fonction de la concentration en thiamine apportée au milieu sous forme de chlorhydrate. Les quantités suivantes ont été utilisées : 0,2 , 0,5 , 1 et 2 mg par litre ; des milieux sans addition de vitamine B1 servent de témoin.

- Résultats : Les résultats sont exprimés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Croissance, multiplication et reproduction sexuée en fonction de la concentration en thiamine.

| Concentration du chlorhydrate de thiamine en mg/l | Diamètre moyen des colonies (en mm) | | | | | Multiplication | Reproduction sexuée |
|---|-------------------------------------|-----|------|------|----|----------------|---------------------|
| | 2j | 3j | 4j | 6j | 7j | | |
| 0,2 | 6 | 7 | 24 | 84 | 86 | +++ | +++ |
| 0,5 | 6 | 7 | 28 | 82,2 | 86 | +++ | +++ |
| 1 | 7,5 | 8,3 | 22,2 | 77,8 | 86 | +++ | +++ |
| 2 | 8,5 | 12 | 21,8 | 74,3 | 86 | +++ | +++ |
| témoin | 5,7 | 13 | 34 | 83,3 | 86 | ++ | +++ |

La dose limite supérieure (2 mg/litre) testée est celle définie par HUGUENIN (1971) pour la reproduction du *Phytophthora palmivora*; cependant, cette concentration ainsi que les concentrations inférieures que nous avons utilisées sont très largement supérieures aux quantités requises pour la reproduction sexuée des Ascomycètes.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que *P. tracheiphilum* est autotrophe vis-à-vis de la thiamine : le développement mycélien et la reproduction asexuée et sexuée du Phycomycète s'effectuent en absence de thiamine.

3) Influence de facteurs physiques :

a) influence du pH du milieu :

Nos premiers essais ont été réalisés sur la souche non axénique, en milieu liquide après addition de HCl 0,01N ou de KOH 0,01N avant la stérilisation. Les pH inférieurs à 4,5 testés en vue d'éliminer les Bactéries par la méthode de RAULIN ne permettent pas le développement du Champignon ; au-delà de pH 5,5, le parasite se développe normalement en présence de nombreuses Bactéries.

Nous avons ensuite étudié l'influence du pH, en établissant une gamme de pH variant de 0,5 en 0,5 entre 4 et 8, sur le milieu chimiquement défini précédemment.

- résultats : les résultats sont exprimés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Influence du pH sur la croissance et la reproduction du *Pythium tracheiphilum*.

| | pH=4 | pH=4,5 | pH=5 | pH=5,5 | pH=6 | pH=6,5 | pH=7 | pH=7,5 | pH=8 |
|---|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|
| Croissance après 5 jours | - | - | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| Croissance après 10 jours | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Nombre de sporocystes par µl au 10ème jour de culture | 0 | 0 | 50 | 200 | 188 | 197 | 139 | 90 | 77 |
| Nombre de zygotes par µl au 10ème jour de culture | 0 | 0 | 39 | 189 | 181 | 151 | 129 | 101 | 42 |

Nous constatons que des pH inférieurs à 4,5 ne permettent ni la croissance ni la reproduction de l'agent pathogène étudié. Les pH favorables au développement mycélien sont compris entre 5 et 8. Quant à la multiplication asexuée, des pH compris entre 5,5 et 6,5 sont optimaux pour la production des sporocystes ; ces valeurs de pH sont également favorables à la reproduction sexuée.

Les valeurs de pH entre 7 et 8 permettent la reproduction asexuée et sexuée, mais le nombre de sporocystes et de zygotes formés est moins important.

- conclusion : les valeurs optimales de pH pour la croissance et la reproduction sexuée et asexuée du *Pythium tracheiphilum* sont comprises entre 5,5 et 7.

b) *influence de la température* :

Dans le but de déterminer les températures optimales pour la croissance et la reproduction de l'agent pathogène étudié, nous avons conduit notre expérimentation aux températures de 10, 15 et 18°C.

Les conditions opératoires sont les suivantes : les cultures sont réalisées sur milieu liquide en fioles de Roux, et soumises

F I G U R E 3

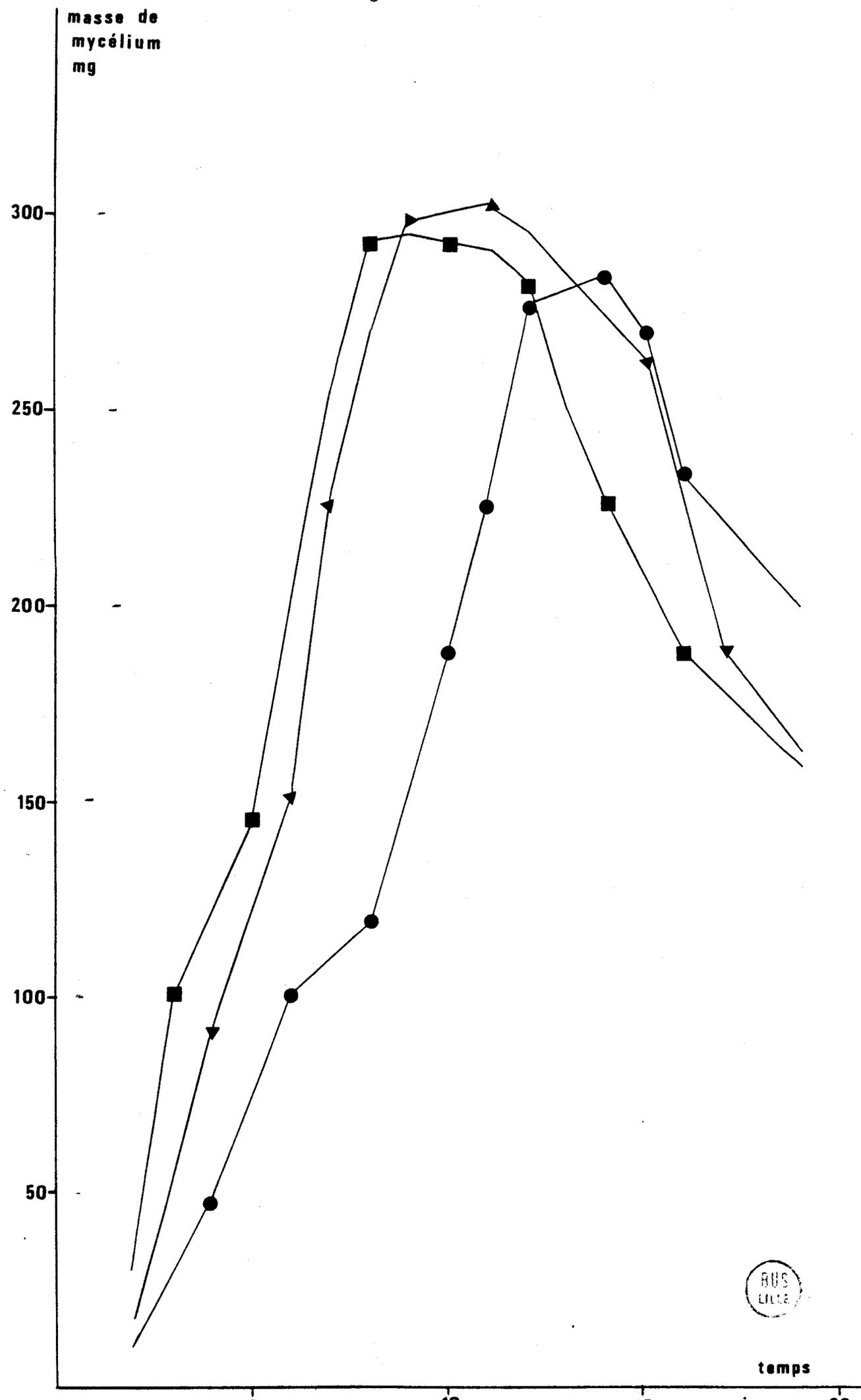
INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE DU *PYTHIUM*
TRACHEIPHILUM :

Courbes de croissance à la température de

● — ● 10°C

▼ — ▼ 15°C

■ — ■ 18°C



durant toute la période culturale, à une photopériode journalière de 12 heures de lumière blanche, alternant avec 12 heures d'obscurité continue.

- résultats : ils sont exprimés dans la figure 3. Ces résultats nous montrent que la température intervient surtout au cours des premiers jours de culture sur la vitesse de croissance qui est proportionnelle à la température ; elle est grande à 18°C, faible à 10 et 15°C. La température affecte peu la valeur pondérale du maximum de croissance, mais elle diffère la date d'apparition de ce maximum qui est au 9ème jour à 18°C, au 11ème jour à 15°C et au 14ème jour à 10°C.

Chez *P. tracheiphilum*, la multiplication et la reproduction sexuée s'accomplissent aux différentes températures testées. La production maximale de zygotes coïncide avec l'optimum de croissance mycélienne ou avec la période stationnaire lui succédant.

- conclusion : la multiplication et la reproduction sexuée du *P. tracheiphilum* ne nécessitent pas des conditions thermiques particulières : des températures comprises entre 10 et 18°C sont favorables à la croissance et à la formation des organes sexués et asexués. Au cours de nos expériences, la température demeurant constante, est fixée à 18°C.

c) influence de la lumière :

Cette étude a été réalisée en plaçant nos cultures dans les conditions suivantes :

- sur milieu synthétique défini par HUGUENIN avec 0,2mg de β -sitostérol ;
- à la température de 18°C \pm 0,5°C.

Pendant 20 jours, ces cultures sont soumises à des périodes d'illuminations de 0 - 6 - 9 - 12 - 18 - 24 heures de lumière blanche alternant avec des périodes d'obscurité de

24 - 18 - 15 - 12 - 6 - 0 heures.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Influence de la durée des irradiations journalières appliquées pendant 20 jours sur la croissance et la reproduction du *Pythium tracheiphilum*.

| Durée des irradiations par jour (en heures) | Croissance après 10 jours en mg de poids sec | Reproduction | |
|---|--|--------------|--------|
| | | asexuée | sexuée |
| 0 | 300,2 | +++ | +++ |
| 6 | 285,2 | +++ | +++ |
| 9 | 291,3 | +++ | +++ |
| 12 | 300,1 | +++ | +++ |
| 18 | 297,1 | +++ | +++ |
| 24 | 289,7 | +++ | +++ |

Ces résultats nous montrent qu'à l'obscurité continue, le Champignon se développe et fructifie. Nous n'observons aucune différence dans le comportement du *Pythium tracheiphilum* dans les différentes conditions étudiées : la valeur pondérale du maximum de croissance est sensiblement la même à l'obscurité qu'avec des irradiations de durées différentes, la multiplication et la reproduction sexuée sont induites dans tous les cas, et quantitativement équivalentes ; nous ne remarquons aucune anomalie de structure et aucune différence au niveau des sporocystes, des spermatocystes et des oocystes entre ceux formés en présence ou en absence de lumière.

- conclusion : il ressort de ces expériences que les différentes phases de formation des organes sexués et asexués du *Pythium tracheiphilum* se déroulent à la lumière comme à l'obscurité ; *P. tracheiphilum* fait partie des champignons photo-indifférents pour lesquels la lumière n'exerce aucun effet sur la reproduction sexuée.

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats montre que l'accomplissement du cycle du *Pythium tracheiphilum* dépend essentiellement de facteurs nutritifs et externes.

Les facteurs les plus favorables à la réalisation du cycle de l'agent pathogène sont :

- le nitrate de potassium comme source d'azote, à raison de 140 mg d'azote par litre ;
- le glucose, le fructose ou le maltose comme source carbonée à raison de 4 g de carbone par litre ;
- un rapport carbone/azote compris entre 17 et 30 ;
- le β -sitostérol, le cholestérol, le palmitate de cholestérol comme stérol exogène, à la dose de 0,2 mg par litre ;
- un pH compris entre 5,5 et 7.

Néanmoins, des variations sont possibles de part et d'autre de ces optimums formant ainsi une large plage de conditions, de telle sorte que l'agent pathogène puisse trouver dans le sol au cours de sa phase saprophytique -s'il en a une- ou dans les tissus de la Laitue au cours de sa phase parasitaire, tous les éléments nutritionnels nécessaires à sa croissance, sa multiplication et sa reproduction.

De plus, sa tolérance face à d'importantes variations de pH et son aptitude à se développer entre 10 et 28°C font du *Pythium tracheiphilum* un organisme capable de s'adapter aux conditions physico-chimiques communément rencontrées dans les sols des cultures maraîchères.

A partir de ces résultats, il est permis de penser que d'une part, la phase sexuelle du cycle du Champignon s'effectue à l'intérieur des tissus de l'hôte et que d'autre part, la germination des sporocystes et des zygotes intervient dans les conditions naturelles.

INTRODUCTION AUX CHAPITRES III ET IV

Dans les conditions optimales précédemment définies, les sporocystes apparaissent dans le milieu de culture à partir du 4ème jour, tandis que les zygotes sont formés dès le 5ème jour. La période de production des sporocystes et des oospores s'étend sur une quinzaine de jours.

En suivant les évolutions dans les différents milieux de cultures de ces deux types de fructifications, nous constatons que si les sporocystes présentent des figures de germination, dans ces mêmes conditions les zygotes ne germent pas.

Nous étudierons donc successivement les conditions de la germination des sporocystes et des zygotes.

C H A P I T R E I I I

CONDITIONS FAVORABLES A LA GERMINATION DES SPOROCYSTES
DU *PYTHIUM TRACHEIPHILUM*

Les sporocystes du *Pythium tracheiphilum* germent uniquement par des tubes de germination, sur les différents milieux que nous avons utilisés. Ces tubes de germination peuvent être au nombre de 1 à 5 par sporocyste et posséder des diamètres compris entre 2 et 6 μm : ces caractères dépendent de la composition du milieu de germination et des conditions de l'incubation (Figure 4).

Nous étudierons donc l'action de quelques facteurs nutritionnels et physiques sur la germination de ces sporocystes.

I. ACTION DES EXSUDATS RACINAIRES SUR LA CROISSANCE ET LA GERMINATION
DES SPOROCYSTES DU *P. TRACHEIPHILUM*1) Préparation des exsudats :

Des graines de Laitues de différents cultivars, désinfectées par trempage pendant 15 minutes dans l'hypochlorite de sodium à 1 %, rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile, sont semées sur un milieu gélosé : milieu de Czapeck de composition suivante : saccharose : 30g ; NaNO_3 : 3g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5g ; KCl : 0,5g ; FeSO_4 : 0,01g ; gélose : 18g. Après germination, seules les graines ne présentant pas de microorganismes sont transférées dans des tubes 25x200mm, autoclavés, contenant de la perlite imbibée de solution nutritive de Hoagland.

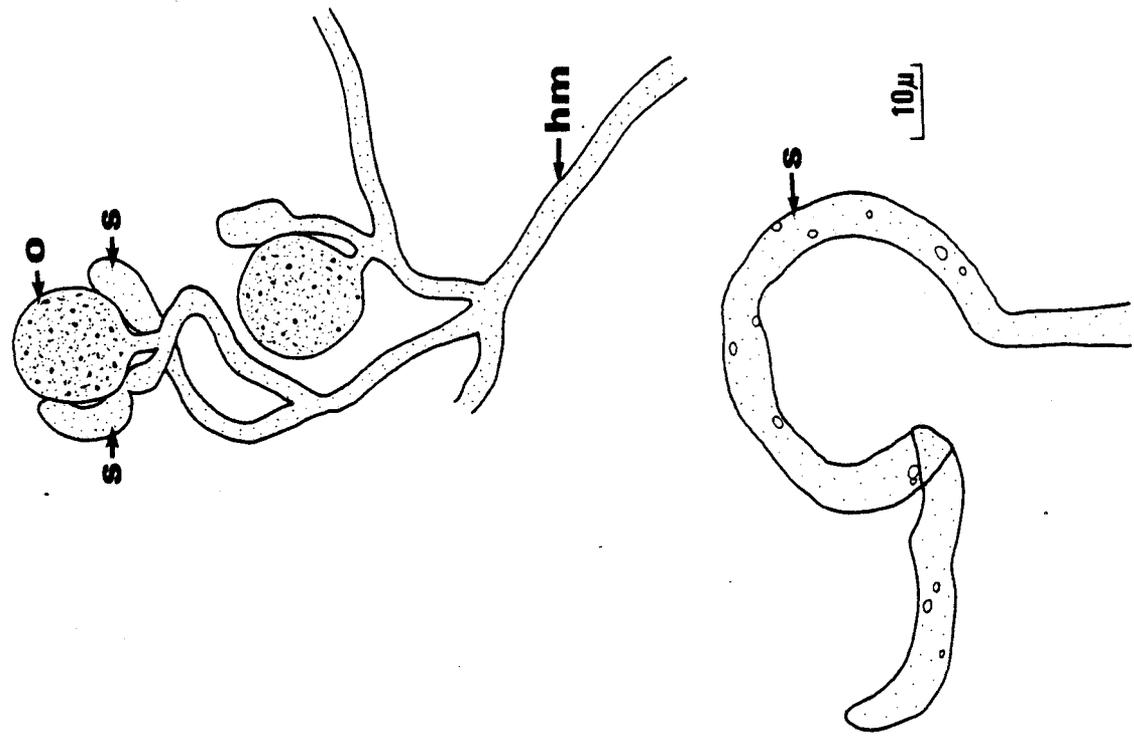
F I G U R E 4

GERMINATION DES SPOROCYSTES DU *PYTHIUM TRACHEIPHILUM*

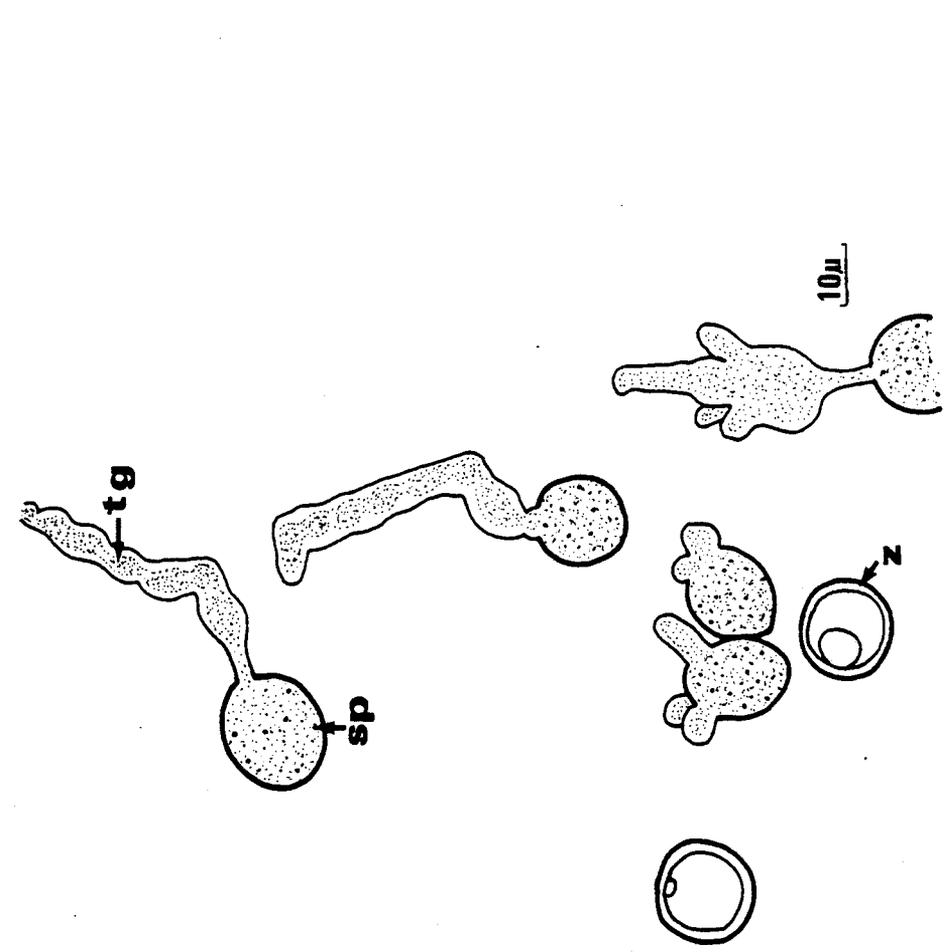
- z : zygote
- sp : sporocyste
- tg : tube de germination

OOCYSTES ET SPERMATOCYSTES DU *PYTHIUM TRACHEIPHILUM*

- o : oocyste
- sp : spermatocyste
- hm : hyphe mycélien



Oocystes et spermatocytes



Germination des sporocystes



Cinq jours plus tard, 3 plantules de Laitues sont placées aseptiquement dans un cristalliseur contenant 100 ml d'eau distillée stérile. Les racines plongent dans ce cristalliseur pendant 6 jours. Le contenu dilué au demi avec de l'eau distillée est réparti à raison de 15 ml par erlenmeyer. Ceux-ci sont répartis en 2 lots :

- un premier lot où l'exsudat racinaire est utilisé tel quel ;
- un deuxième lot additionné de glucose à raison de 5g/litre.

Ces deux lots sontensemencés par des fragments de culture âgées de 10 jours, incubés à 22°C pendant 10 jours, sous un éclairage journalier de 12 heures de lumière blanche alternant avec 12 heures d'obscurité.

Les résultats sont reportés dans le tableau 11.

*Tableau 11 : Influence des exsudats racinaires seuls ou additionnés de glucose sur la croissance et la germination des sporocystes du *Pythium tracheiphilum*.*

| | Exsudat naturel | | | Exsudat naturel + glucose 5g/l | | |
|--|-----------------|-----------|---------|-----------------------------------|-----------|---------|
| | variété n°7 | "Aurélia" | "Suzan" | variété n° 7 | "Aurélia" | "Suzan" |
| % de germination des sporocystes après 3 jours | 51 | 53 | 50 | 100 | 100 | 100 |
| Croissance en mg de matière sèche après 7 jours | 53 | 59 | 75 | 129 | 149 | 120 |

A l'examen de ce tableau, nous voyons que les exsudats racinaires stimulent la croissance mycélienne et la germination des sporocystes du *Pythium tracheiphilum* puisque sur le milieu de HUGUENIN, seuls 20 % de ces sporocystes germent.

En présence d'exsudats racinaires glucosés, nous observons un accroissement très sensible de la croissance mycélienne et un optimum de germination pour les sporocystes (100 %).

Ces résultats concordent avec ceux observés par de nombreux auteurs qui attribuent aux exsudats de graines ou de racines, et à différents extraits de plante hôte, un rôle important dans la germination des sporocystes.

STANGHELLINI et BURR (1973) montrent que 80 % des sporocystes du *Pythium aphanidermatum* germent par l'émission d'un à trois tubes de germination, et ceci 1 h 30 après que le sol ait été enrichi en exsudats de graines de Haricots. Ces mêmes sporocystes ne germent pas si on ajoute de l'eau au sol. De même SINGH (1965 et 1968) démontre l'effet stimulateur d'exsudats de nombreuses plantes sur l'augmentation du nombre de "propagules" du *Pythium ultimum* dans le sol. Selon cet auteur, cette stimulation serait due à la présence d'acides aminés et de sucres dans ces exsudats.

D'après KRAFT et ERWIN (1967), les graines de Haricots en germination exsudent des quantités plus importantes de sucre et d'acides aminés lorsqu'elles sont incubées à des températures extrêmes de 12° ou de 42°C ; corrélativement, ces auteurs notent une plus grande virulence de l'agent pathogène, lorsqu'il est en présence de ces substances organiques. Ainsi que l'ont montré SCHROTH et SNYDER (1961), les chlamydospores du *Fusarium solani f. phaseoli* germent en plus grand nombre dans le sol si elles se trouvent à proximité de graines de Haricots en germination, ou de région apicale de racine principale, latérale ou adventive .

Une analyse des exsudats de ces graines a révélé qu'ils étaient composés essentiellement d'acide aspartique, d'acide glutamique, d'asparagine, de glucose, de saccharose, de maltose et de fructose. TRUJILLO et HINE (1965) observent que l'incorporation de tissus de Papaye dans le sol, accroît la population des *Pythium aphanidermatum* et *Phytophthora parasitica*.

Nous nous sommes donc ensuite intéressée au rôle de différents acides aminés et sucres sur la germination des sporocystes.

II. ACTION DES ACIDES AMINÉS ET DES SUCRES

1) Première expérience :

Parmi les acides aminés, nous avons utilisé successivement l'alanine, le glycolle, la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, le tryptophane. Ceux-ci sont mis en solution à la concentration de 150mg d'azote par litre dans du tampon 0,1M, additionné de 1 % de glucose. Des solutions tampon phosphate 0,1M sont utilisées comme témoin.

Ces milieux liquides ensemencés par des fragments de culture âgées de 10 jours, sont incubés à 22°C pendant 4 jours.

*Tableau 12 : Influence des différents acides aminés en solution à 150mg d'azote par litre de tampon phosphate 0,1M additionnés de 1 % de glucose sur le pourcentage de germination des sporocystes du *Pythium tracheiphilum*.*

| Milieux utilisés | % de germination des sporocystes après 4 jours d'incubation | Milieux utilisés | % de germination des sporocystes après 4 jours d'incubation |
|------------------------------|---|---------------------|---|
| Témoin Milieu de HUGUENIN | 20 | leucine + glucose | 100 |
| Témoin tampon phosphate 0,1M | 20 | isoleucine+glucose | 72 |
| Glucose 1 % | 41 | glycolle+glucose | 67 |
| Alanine | 17,5 | méthionine+glucose | 88 |
| Alanine + glucose | 82 | tryptophane+glucose | 100 |
| Valine + glucose | 85 | | |

Ces résultats nous montrent que les différents acides aminés additionnés de 1 % de glucose favorisent la germination des sporocystes du *P. tracheiphilum*. Le glucose utilisé seul à raison de 4g de carbone par litre accroît ce pourcentage de germination qui est de 40 %, alors qu'en présence de milieu témoin tampon phosphate, ou du milieu de HUGUENIN,

il est de 20 %. L'alanine seule ne permet que 17,5 % de germination, alors que l'association alanine-glucose stimule la germination des sporocystes (82 %).

Les combinaisons leucine-glucose et tryptophane-glucose s'avèrent les plus favorables puisque 100 % des sporocystes germent.

Il ressort de cette expérience que l'association d'un acide aminé avec un sucre (le glucose) stimule très nettement la germination des sporocystes du *P. tracheiphilum*.

2) Deuxième expérience :

Nous avons ensuite retenu le tryptophane comme source d'azote, et nous l'avons associé successivement au fructose et au saccharose à 1 %.

Les résultats sont reportés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Pourcentages de germination des sporocystes du *Pythium tracheiphilum*, après 4 jours d'incubation, sur les solutions de tryptophane dans le tampon phosphate 0,1M, additionnées de fructose, saccharose ou glucose 1 %.

| Milieux utilisés | % de germination des sporocystes après 4 jours d'incubation |
|--------------------------|---|
| Tryptophane | 47 % |
| Tryptophane + glucose | 100 % |
| Tryptophane + fructose | 100 % |
| Tryptophane + saccharose | 91 % |

Nous voyons donc que le tryptophane utilisé seul stimule la germination des sporocystes du *Pythium* (47 %). Cependant, associé à une source de carbone (glucose - fructose ou saccharose), l'optimum de germination est obtenu (100 %).

3) Conclusion :

La germination des sporocystes du *Pythium tracheiphilum* a lieu en présence des exsudats racinaires des Laitues, ainsi qu'en présence de solutions d'acides aminés additionnées de glucose, fructose ou saccharose.

Parmi les acides aminés que nous avons testés, les plus efficaces se sont révélés être le tryptophane, la leucine, la méthionine et la valine.

III. ACTION DES FACTEURS HUMIDITE , TEMPERATURE, pH, LUMIERE, AGE DES SPOROCYSTES SUR LEUR GERMINATION

Il est permis de penser que dans la nature, la germination des sporocystes du *Pythium* ait lieu au contact des graines de Laitues ; les tubes de germination constitueraient une source d'inoculum capable d'envahir rapidement les tissus de la racine.

D'autres facteurs, tels que l'humidité du sol, la température, le pH, les conditions de lumière et l'âge des sporocystes doivent influencer la capacité germinative de ces sporocystes.

Nous étudierons donc successivement ces différents facteurs.

1) Action de l'humidité :

Afin de montrer l'éventuel effet de l'humidité sur la germination des sporocystes, nous les divisons en deux lots :

- un premier lot de sporocystes, prélevés au 10ème jour à partir du milieu gélosé précédemment décrit, est transféré sur un milieu P.D.A. glucosé à 1 % (milieux naturels p. 29) ;
- les sporocystes du deuxième lot sont répartis en 4 séries et soumis à un séjour dans l'eau distillée, durant des périodes respectives de 0 - 12 - 24 - 36 et 48 heures.

Ces sporocystes sont ensuite transférés sur le milieu naturel comme dans le cas du lot précédent.

48 à 72 heures après leur mise en incubation sur ce milieu à la température de 22°C, nous comptons le pourcentage de sporocystes présentant des figures de germination. Les résultats sont reportés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Pourcentage de germination des sporocystes après passage dans l'eau distillée, pendant différentes durées.

| Durée du séjour des sporocystes dans l'eau en heures | % de germination de ces sporocystes après 4 jours d'incubation |
|--|--|
| 0 | 20 |
| 12 | 35 |
| 24 | 40 |
| 36 | 42 |
| 48 | 55 |

Ces résultats prouvent que le pourcentage de germination des sporocystes est d'autant plus important que le préséjour dans l'eau est plus long.

Sur le plan morphologique, ce séjour préalable dans l'eau s'accompagne de modifications au niveau du protoplasme qui devient turgescent ; on assiste à un gonflement du sporocyste dont la paroi subit peut être une modification de sa perméabilité : l'eau jouerait un rôle dans le stade précédent la germination des sporocystes.

Ces résultats sont en concordance avec l'écologie du genre *Pythium* ; en effet, les sporocystes du *P. de baryanum* envahissent les tissus de leur hôte, dans les conditions de forte humidité particulièrement propices à leur germination.

2) Action de la température :

Des sporocystes prélevés à partir d'une culture âgée de 10 jours sur milieu gélosé, sont transférés sur des solutions de tryptophane (150 mg d'azote par litre) glucosées à 1 %.

Les cultures sont soumises durant l'incubation à des irradiations journalières de 12 heures de lumière blanche, alternant avec 12 heures d'obscurité.

Les températures suivantes ont été testées : 10, 14, 18, 22, 26 et 30°C. Les résultats exprimés en pourcentage de sporocystes germant après 4 jours, sont reportés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Pourcentage de germination des sporocystes en fonction de la température sur milieu tryptophane + glucose, après 4 et 6 jours.

| Age de la culture | Température °C | | | | | |
|-------------------|----------------|------|-------|-------|-------|------|
| | 10°C | 14°C | 18°C | 22°C | 26°C | 30°C |
| 4 jours | 30 % | 37 % | 87 % | 100 % | 100 % | 85 % |
| 6 jours | 57 % | 60 % | 100 % | 100 % | - | 85 % |

- Résultats et interprétation :

Ces résultats nous montrent que des températures supérieures à 18°C favorisent la germination des sporocystes, qui est optimale à 22°C et 26°C. Les températures assez basses 10 et 14°C, permettent respectivement des taux de germination de 57 et 60 %, le maximum étant atteint après 6 jours d'incubation.

Ces résultats semblent en accord avec les observations faites au cours des infections naturelles. En effet, les dégâts seraient plus importants au cours des périodes chaudes et en présence d'importantes précipitations.

3) Influence du pH sur la germination des sporocystes :

Des sporocystes prélevés à partir de cultures âgées de 10 jours, sont incubés sur le milieu utilisé précédemment, à 22°C, sous un éclairage de 12 heures de lumière blanche par jour ; le pH du milieu est ajusté aux valeurs suivantes : 4,5 - 5 - 5,5 - 6 - 6,5 - 7 et 7,5.

Après 4 jours, nous comptons le nombre de sporocystes germant. Les résultats sont reportés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Influence du pH sur le pourcentage de germination des sporocystes du Pythium tracheiphilum.

| | Valeur du pH | | | | | | |
|---|--------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 4,5 | 5 | 5,5 | 6 | 6,5 | 7 | 7,5 |
| % de sporocystes qui germent après 4 jours d'incubation | 91 | 70 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Les résultats fournis par cette expérience nous montrent que sur le milieu étudié (milieu contenant du tryptophane à raison de 150mg d'azote par litre et 1 % de glucose), les valeurs de pH comprises entre 5,5 et 7,5 fournissent 100 % de germination.

Les conditions optimales de pH pour la croissance du mycélium sont également les valeurs optimales lors de la germination des sporocystes.

4) Action de la lumière :

Des milieux liquides ensemencés avec des fragments de cultures âgées de 10 jours sont incubés à 22°C, soit sous un éclairage de 12 heures par jour de lumière blanche soit à l'obscurité continue.

Le pourcentage de sporocystes en germination est évalué après 4 jours d'incubation.

- Résultats :

A l'obscurité, comme à la lumière, le pourcentage de germination est de 100.

- Interprétation :

Ces résultats sont en accord avec les observations faites sur le terrain. Les sporocystes présents dans le sol, et dans les tissus de

l'hôte ne reçoivent en effet pas de lumière ; ces sporocystes germent vraisemblablement dans la nature, dans des conditions proches de celles que nous définissons.

5) Influence de l'âge des sporocystes sur leur pouvoir de germination :

Des sporocystes issus de cultures âgées de 10, 20 et 30 jours, 2, 4, 6, 9 et 12 mois sont placés sur le milieu de germination précédemment défini (glucose + tryptophane), dans les conditions optimales de température et sous 12 heures de lumière par jour.

Après 4 jours d'incubation, les cultures sont observées à la loupe binoculaire et des fragments de culture sont prélevés, montés entre lame et lamelle et observés au microscope.

- Résultats :

Le pourcentage de germination des sporocystes est noté après le 6ème et le 8ème jours de culture.

Tableau 17 : Influence de l'âge des sporocystes sur leur pouvoir de germination.

| Durée de l'incubation | Age des sporocystes | | | | | | | |
|-----------------------|---------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | 10 j | 20 j | 30 j | 2mois | 4mois | 6mois | 9mois | 12mois |
| 6 jours | 100% | 100% | 100% | 85% | 50% | 0 | 0 | 0 |
| 8 jours | 100% | 100% | 100% | 88% | 61% | 26% | 0 | 0 |

Ces résultats montrent que les sporocystes prélevés sur des cultures âgées de 10 jours à 2 mois germent en grand nombre si les conditions sont favorables ; par contre, des sporocystes âgés de 4 mois germent avec des pourcentages plus faibles (50 à 60 %). Des sporocystes issus de cultures âgées de 6 mois à 1 an perdent leur faculté germinative. Les observations effectuées au microscope nous montrent que le contenu protoplasmique est très condensé, que la paroi de la spore est parfois éclatée ;

soumis à un séjour de 48 heures dans l'eau, 30 % de ces sporocystes récupèrent un aspect morphologique normal par gonflement du protoplasme, mais le pourcentage de germination après cette réhydratation n'excède jamais 5 %.

Compte-tenu de ces observations *in vitro*, il est difficile d'attribuer aux sporocystes un rôle important dans la persistance du parasite dans le sol d'année en année ; cependant les conditions de conservation de ces sporocystes n'étaient peut être pas les plus favorables à leur survie : en effet, nous les conservons à 10 ou 18°C, dans les tubes de culture sur milieux gélosés ; il est à noter que dans ces mêmes conditions les hyphes mycéliens survivent et sont capables de redonner des cultures si on ensemence un fragment mycélien sur le milieu synthétique de HUGUENIN.

CONCLUSION

En culture *in vitro*, les sporocystes apparaissent dans les milieux de culture à partir du 4ème jour, leur production s'étend sur une durée de 15 jours environ.

La germination de ces sporocystes s'effectue par l'émission d'1 à 5 tubes de germination, qui en se développant, donnent naissance à des filaments mycéliens.

La présence d'exsudats racinaires de Laitue, ainsi que de l'exsudat additionné de glucose stimule la croissance mycélienne du Champignon, ainsi que la germination des sporocystes. Nous avons également montré l'influence des acides aminés en particulier tryptophane, leucine, méthionine, alanine et des sucres, glucose, fructose sur le pourcentage de germination.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par différents auteurs qui par des analyses ont révélé que les exsudats des graines et des racines sont formés essentiellement d'acides aminés et de sucres (SNYDER, 1961 ; KRAFT et ERWIN, 1967 ; TRUJILLO et HINE, 1965). De plus, la température, le pH et l'humidité conditionnent également la germination des sporocystes ; les températures comprises entre 18 et 26°C, les valeurs de pH

entre 5,5 et 7,5 et un préséjour dans l'eau de 36 heures constituent les conditions optimales de cette germination. Enfin, l'âge des sporocystes est un facteur important; en effet des sporocystes prélevés sur des cultures de plus de 4 mois ne germent plus.

Ces résultats acquis en culture *in vitro* peuvent être transposés dans la nature ; en effet, la présence de jeunes plantules de Laitues, favoriserait par leur exsudat la germination des sporocystes, germination qui s'effectuerait dans des conditions optimales après de fortes précipitations et des conditions de forte chaleur, dans un sol de pH voisin de 6, en absence presque totale de lumière. Les sporocystes seraient responsables des infections primaires, mais leur durée de vie limitée à quelques mois ne pourrait leur permettre d'assurer la survie de l'espèce, d'une année à l'autre.

C H A P I T R E I V

GERMINATION DES OOSPORES

Dans les conditions optimales, les oospores apparaissent à partir du 4^{ème} jour de culture et leur production se prolonge sur environ 10 jours. La phase d'active formation des oospores se situe durant les 8 premiers jours, le rythme de production baisse ensuite progressivement et devient pratiquement nul aux environs du 18^{ème} jour de culture, soit 14 jours après le début de la cystogamie.

Lorsque nous observons l'évolution de ces oospores dans le milieu de culture, nous constatons qu'aucune germination n'a lieu in situ ; les oospores passent donc par une période de dormance, que les auteurs ont décrite chez de nombreuses Pythiacées. Cette dormance permettrait aux oospores d'assurer la survie de l'espèce dans le sol, dans les conditions défavorables à son développement. Cette période de vie ralentie peut durer quelques semaines, parfois quelques mois, voire même plusieurs années.

Dans un premier paragraphe, nous étudierons différents aspects du problème de la germination : la dormance des zygotes, la levée de dormance, les conditions favorables à la germination proprement dite des zygotes, à travers les travaux bibliographiques. Dans un deuxième paragraphe, nous exposerons les résultats des travaux expérimentaux que nous avons réalisés.

I. DORMANCE ET GERMINATION DES ZYGOTES : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1) Dormance des zygotes :

SUSSMANN (1965) à partir des résultats de MANDELS et NORTON (1948) distingue deux types de dormance :

- une dormance dite constitutive pendant laquelle la spore ne germe pas en raison d'une condition propre à sa nature telle que l'imperméabilité des parois, l'autoinhibition par une substance excrétée ou le blocage d'une étape au cours du métabolisme ;
- une dormance d'origine exogène due à des conditions d'environnement physico-chimique devenues défavorables au développement du Champignon.

Ces deux types de dormance peuvent être illustrés par l'exemple des oospores du *Phytophthora cactorum*. Selon BLACKWELL (1943) ces oospores n'accomplissent leur fusion nucléaire que dans un délai de 3 à 4 semaines après leur formation, il s'agit d'une dormance constitutive. Après la fusion nucléaire, intervient une période de dormance exogène de 6 à 7 mois, période pouvant être raccourcie si les oospores subissent l'influence activatrice des basses températures.

2) Levée de la dormance :

Comme nous l'avons observé, les oospores du *Pythium tracheiphilum* ne germent pas in situ, ce qui implique l'utilisation de différentes méthodes afin de les détacher du mycélium porteur, avant leur transfert sur un milieu propice à leur germination.

Selon SAUVE et MITCHELL (1977), la filtration, l'action des ultra-sons sur des suspensions de cultures, l'addition de certaines enzymes d'escargots (*Helix pomatia*), sont des techniques efficaces dans la séparation des zygotes du filament porteur.

AYERS et LUMSDEN (1975) montrent que des zygotes du *Pythium ultimum* incapables de germer immédiatement après leur formation, acquièrent cette aptitude s'ils sont mis en contact avec des extraits de sol non stérile ; après 6 semaines de contact, on observe 90 % de germination. Par contre, ces auteurs n'obtiennent pas la levée de dormance par

des traitements thermiques faisant intervenir des alternances de très basses et très hautes températures ; de même l'action de la lumière, les facteurs nutritifs, les exsudats de racines sont inefficaces pour cette levée de dormance.

3) Conditions de la germination des zygotes :

a) rôle de l'eau :

De nombreux auteurs attribuent à l'eau un rôle essentiel lors de la germination des spores et en particulier des oospores.

GOTTLIEB (1950) affirme que l'eau est indispensable à la germination des spores des Champignons qui s'effectue de façon générale, pour des températures comprises entre 15 et 30°C. De même LUMSDEN et AYERS (1975) montrent que les conditions optimales pour la conversion des spores dormantes en spores capables de germer sont les suivantes : sol saturé en eau, température de 25°C, pH = 7.

Selon AL HASSAN et FERGUS (1973), les zygotes du *P. hydnosporum* germent en présence d'eau distillée ; cependant le taux de germination est plus élevé en présence de substances nutritives. Les zygotes du *P. aphanidermatum* présentent des pourcentages de germination plus importants dans les sols humides que dans les sols secs (STANGHELLINI et BURR, 1973).

b) facteurs nutritifs :

La germination des zygotes dépend également de la composition du milieu. STANGHELLINI et BURR (1973) étudient l'effet stimulateur des substances nutritives, et plus particulièrement celui d'exsudats et de substances extraites des graines de Haricots sur la germination des zygotes du *Pythium aphanidermatum*. L'addition de sucres et de composés azotés favorise également l'augmentation du taux de germination de ces zygotes. Ce taux est de 92 % après 6 heures d'incubation sur un sol amendé avec 25 µg d'asparagine et 40 µg de glucose, par g de sol. Selon STANGHELLINI (1972), la germination des oospores du *Pythium aphanidermatum* s'effectue en deux étapes : d'abord résorption de l'endospore sous l'action d'un apport exogène de calcium, ensuite production d'un tube de germination liée à la présence d'une source de carbone ; la germination nécessite donc un apport en calcium et en carbone.

BARTON (1957) note que les oospores du *Pythium mamillatum* germent dans le sol, lorsqu'elles se trouvent à proximité de racines de plantules de navets. Selon FLOWERS et LITTRELL (1972), l'acide gallique à 400 mg/litre et la caséine à 2 g/litre favorisent la germination des zygotes du *Pythium sp.* (94 %) dans un milieu de germination chimiquement défini et contenant 7,5g de sucre ; 0,5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g de KH_2PO_4 , 0,5g d'extrait de levure, 2mg de chlorhydrate de thiamine.

c) *action des enzymes :*

L'action de différentes enzymes sur la germination chez les Pythiacées a suscité de nombreuses recherches : SALVATORE et coll. (1973) constatent que le pourcentage de germination des zygotes du *Pythium sp.* passe de 5 à 93 % après ingestion par les escargots (*Helix aspersa*) ; les mêmes résultats sont observés en utilisant le complexe enzymatique : bétaglucuronidase-arylsulfatase et la bétaglucuronidase, sur des cultures âgées de 35 jours. Selon STANGHELLINI et RUSSELL (1973), des solutions à 5 % d'enzymes extraites d'escargots *Helix pomatia*, accroissent de façon considérable le taux de germination des zygotes du *Pythium sp.*

Les enzymes protéolytiques telles que la pronase ou la chymotrypsine induisent la germination des zygotes du Champignon *Aphanomyces euteiches*. Ces résultats confirment ceux apportés par les méthodes de microbiochimie et les analyses de biréfringence qui montrent que la paroi de l'oospore n'a pas une composition de nature exclusivement cellulosique (YANG, 1970).

d) *action de la lumière :*

L'influence des radiations lumineuses sur la germination des zygotes des *Pythium* et *Phytophthora* a fait l'objet de différentes recherches. C'est ainsi que SCHMITTHENNER (1972) rapporte le rôle du calcium et de la lumière blanche et ultra-violette sur les zygotes du *P. aphanidermatum*. Cet auteur observe 12 % de germination si les zygotes sont incubés à l'obscurité, sur un milieu gélosé contenant du chlorure de calcium, 31 % de germination dans les mêmes conditions de milieu, mais après 12 heures d'exposition à des radiations blanches ou des radiations dans le domaine du proche ultra-violet (comprises entre 320 et 400 nm) ; ce

taux de germination passe à 94 % après 36 heures de radiations ; de plus, les travaux de ce chercheur montrent que des zygotes produits sur un milieu gélosé contenant plus de 20 ppm de calcium ont besoin de plus de lumière pour germer que s'ils sont produits sur un milieu renfermant moins de 10 ppm de calcium. Il existerait donc une corrélation entre le calcium et les radiations lumineuses, mais aucune explication n'est fournie sur le mécanisme de cette action.

RIBEIRO et coll. (1975) montrent l'effet de radiations monochromatiques de longueurs d'onde 450 et 750 nm, utilisées au cours de la maturation des zygotes sur leur germination, chez trois espèces du genre *Phytophthora*. De nombreuses théories sont émises à propos de l'action des radiations lumineuses sur la germination des spores et les réponses des Champignons.

Le fait que la germination des zygotes n'ait lieu, pour certains organismes, qu'en présence de lumière suggère que celle-ci peut permettre au Champignon de synthétiser certains composés à partir d'éléments précurseurs présents dans le milieu.

Certaines radiations monochromatiques provoquent la germination des zygotes chez plusieurs espèces : ce fait suggérerait l'existence de photo-récepteurs, molécules dont le spectre d'absorption présente des similitudes avec celui des longueurs d'ondes inductrices.

L'existence de pigments photo-récepteurs de nature flavinique ou caroténoïdique mise en évidence chez certains Champignons, n'a pas été observée chez les *Phytophthora*.

4) Conclusion :

Les zygotes du genre *Pythium* ne germent pas immédiatement après leur formation ; ils traversent une période de dormance qui peut être plus ou moins longue selon les espèces et les conditions de développement. Cette dormance peut être levée par des traitements physiques, chimiques ou par l'action de la lumière.

La germination des zygotes requiert des facteurs nutritionnels (source de carbone d'azote), la présence d'humidité, des radiations lumineuses : ces différents facteurs varient selon les espèces étudiées.

II. RESULTATS EXPERIMENTAUX

Afin de résoudre le problème de la germination des zygotes du *P. tracheiphilum*, nous les avons extraits du milieu de culture sur lequel ils se forment, par une méthode de broyage suivie de filtration. Ces zygotes ont ensuite subi différents traitements physiques et chimiques en vue de lever leur dormance, avant d'être transférés sur des milieux propices à leur germination.

1) Séparation des zygotes des cultures gélosées :

Le broyat obtenu avec l'ultra-turax à partir de culture gélosée additionnée de 30 ml d'eau distillée stérile est filtré successivement sur un tamis à mailles de 120 μ m afin d'éliminer la gélose et les fragments mycéliens, puis sous vide sur un filtre de 40 μ m. Cette méthode nous permet de recueillir des suspensions de zygotes et de sporocystes.

Le filtrat ainsi recueilli est étalé directement à l'aide d'une pipette Pasteur sur le milieu de germination, après avoir subi différents traitements afin de lever la dormance des zygotes.

2) Traitements en vue de lever la dormance des zygotes :

a) *traitements thermiques :*

Des filtrats de zygotes prélevés sur des cultures d'âges différents (15, 30, 45, 60 et 75 jours) sont soumis à différentes conditions thermiques. Ces filtrats sont placés à 4°C pendant des durées respectives de 4 - 8 - 12 - 16 - 18 ou 24 heures, puis mis à 24°C pendant 6 - 12 - 18 ou 24 heures.

Les zygotes ainsi traités sont alors transférés sur des milieux naturels (décoction d'avoine 40 ou 60 g/litre), malt 2 %, PDA glucosé à 1 %) ou chimiquement définis, contenant une source d'azote et une source de carbone, et incubés à l'obscurité continue ou à 12 heures de lumière blanche par jour, à la température de 22°C.

b) *action de substances chimiques :*

- préparation enzymatique : Des zygotes prélevés à partir de cultures âgées de 10 jours, incubés à l'obscurité, ou en

présence de 12 heures de lumière par jour sont mis en contact avec une solution d'hélicase, enzyme préparée à partir de suc digestif d'*Helix pomatia* (Industrie Biologique Française), dans du tampon phosphate.

Nous avons utilisé les concentrations suivantes d'hélicase : 0,5 - 1 - 2,5 et 5 % ; l'examen de la bibliographie nous montre que des solutions à 5 % d'hélicase s'avèrent efficaces lors de la germination d'oospores de certaines espèces.

Les périodes de contact sont les suivantes : 12 - 24 - 48 et 72 heures. Après lavage à l'eau distillée stérile, ces zygotes sont incubés sur les différents milieux de germination à la température de 22°C, dans différentes conditions de lumière.

3) Conditions de germination :

Nous étudierons successivement l'influence de différents facteurs sur la germination des zygotes ayant subi préalablement un traitement thermique ou un traitement chimique.

a) *milieux de germination* :

Des zygotes ayant subi les différents traitements thermiques sont mis à incuber sur :

- les milieux naturels suivants :

- . milieu malt 2 % ;
- . milieu à base d'avoine (40 et 60 g/l) ;
- . milieu PDA glucosé 1 %

- sur des solutions contenant 150 mg d'azote par litre fourni successivement par l'alanine, le glycolle, le tryptophane, additionnés de 1 % de glucose.

Les conditions d'incubation sont les suivantes :

- température 22°C ;
- obscurité continue pour un premier lot ;
- 12 heures de lumière par jour pour le deuxième lot.

Après 4 - 8 - 10 et 30 jours d'incubation, nous n'avons observé aucune germination des zygotes.

De même, des zygotes mis en contact avec différentes concentrations d'hélicase durant des temps variables sont incubés sur ces mêmes milieux. Nous n'obtenons aucune germination des zygotes.

b) *influence de la température :*

Des zygotes ayant subi les traitements thermiques et enzymatiques sont incubés sur des solutions nutritives contenant 150 mg d'azote par litre fourni par le tryptophane et 4 g de carbone fourni par le glucose, à différentes températures. Nous avons conduit nos expériences à 14 - 18 - 22 - 26 et 30°C.

Dans aucun de ces cas, nous n'observons de germination.

c) *influence de l'âge des zygotes :*

Des zygotes de 10 - 20 - 30 jours, 2 - 6 - 9 et 12 mois subissent les traitements de levée de dormance, et sont ensuite incubés sur les milieux à 22°C.

Quelles que soient les conditions de cette incubation, nous n'observons aucune germination de ces zygotes.

d) *influence de la lumière :*

L'étude de la bibliographie nous a apporté nombre de renseignements sur l'action de la lumière sur la germination des spores.

Nous avons donc, au cours de cette expérimentation, placé nos cultures dans différentes conditions de lumière.

Des cultures en boîtes de Pétri, en pyrex, de 10 cm de diamètre sont éclairées à travers le fond de la boîte ; la source lumineuse est placée à 40 cm de la culture qui reçoit donc une intensité d'éclairement de 1500 à 2000 lux.

Nous avons eu recours à deux types de sources lumineuses :

- la lumière blanche fournie par des tubes fluorescents (Mazdafluor TF 20W blanc brillant de luxe) ;
- la lumière ultra-violette de longueur d'onde voisine de 350 nm fournie par des tubes fluorescents (Mazdafluor TF W N20).

Le comportement des oospores d'âges différents (cultures de 10, 20, 30 ou 60 jours) a été étudié après des expositions de durée croissante à la lumière blanche et à la lumière ultra-violette succédant ou non à des périodes variables à l'obscurité.

Les cultures ont subi durant les 12 jours d'incubation :

- 1) 0 jour d'obscurité et 3 - 5 - 7 - 10 et 12 jours de lumière blanche, ou de lumière ultra-violette ;

- 2) 3 jours d'obscurité et 0 - 2 - 4 - 7 et 9 jours de lumière blanche, ou de lumière ultra-violette ;
- 3) 5 jours d'obscurité et 0 - 2 - 5 et 7 jours de lumière blanche, ou de lumière ultra-violette ;
- 4) 0 jour de lumière et 3 - 5 - 7 - 10 et 12 jours d'obscurité.

Ces différents traitements ne nous ont fourni aucune germination des zygotes.

DISCUSSION

L'inefficacité de la lumière *in vitro* sur les zygotes n'est pas incompatible avec le fait que ce facteur ne doit pas avoir un rôle prédominant dans la nature ; en effet, il semble très peu probable que la lumière atteigne facilement les zygotes au sein des tissus parasités ou dans le sol. Ceci nous a conduit à penser que dans les conditions naturelles, la germination des zygotes n'est vraisemblablement pas déterminée par la lumière. Cependant, des zygotes formés à l'obscurité et maintenus à l'obscurité durant leur maturation n'ont présenté, après 30 et 60 jours d'incubation, aucune germination.

Par ailleurs, le fait que les oospores de *Pythium tracheiphilum* ne germent pas dans les différentes conditions testées suggère que le déterminisme de la dormance dépend de plusieurs facteurs.

Il semble que si l'on se rapporte à la terminologie de SUSSMANN à propos de la dormance, il ne s'agit pas dans le cas étudié d'une dormance d'origine exogène, dont la caractéristique principale est de s'interrompre lorsque les conditions externes favorables au développement se rétablissent ; il s'agirait plutôt d'une dormance constitutive déclenchée par un blocage métabolique, une autoinhibition par une substance du zygote, ou tout autre facteur interne qui, dans le cas de *Pythium tracheiphilum*, demeure à préciser.

TROISIEME PARTIE

CHAPITRE I

RELATIONS HOTE - PARASITE DANS LES CULTURES

IN VITRO

Avant de rendre compte des expériences réalisées en champ afin de définir les grandes lignes du développement de l'épidémie, nous avons effectué, en laboratoire, des recherches sur les modalités de l'infection ; ces recherches ont été entreprises sur des cultures axéniques de Laitues ou sur des cultures réalisées en microphytotron afin de cerner les relations entre le parasite et l'hôte.

I. MATERIEL ET METHODES

1) Mode de culture :

a) *culture axénique de plantules en tubes* :

Cette méthode de culture nécessite la désinfection au préalable des graines et l'usage de récipients et de milieux de culture adaptés.

- désinfection des graines : les graines sont passées dans l'éthanol 95° qui joue le rôle de mouillant ; elles sont ensuite baignées pendant 15 minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium (40 g/l), puis elles subissent 4 rinçages successifs de 3,5, 10 et 15 minutes dans l'eau distillée stérile.

- récipients et milieux de culture : nous avons utilisé des tubes à ergots. Ces tubes (2,5 x 20 cm) présentent au quart de leur hauteur 4 ergots internes disposés en croix permettant de supporter un

disque de coton hydrophile ou de coton cardé sur lequel sont déposées les graines. La zone inférieure ainsi délimitée est remplie d'une solution nutritive de KNOP diluée au demi ; la composition est la suivante :

- $\text{CaNO}_3, 4\text{H}_2\text{O}$ 0,5g
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0,125 g
- KNO_3 0,125 g
- KH_2PO_4 0,125 g

Nous avons également réalisé des cultures axéniques dans des tubes ordinaires 2,5 x 20 cm. Dans chaque tube, nous introduisons 18 ml de milieu gélosé de HUGUENIN, milieu précité, sans apport de stérol. A la sortie de l'autoclave, ces tubes sont refroidis en position inclinée de façon à ce que la surface du milieu gélosé forme un biseau de 8 cm de long environ.

- ensemencements : dans le premier cas, les graines désinfectées sont déposées à raison de une graine par tube à la surface du coton hydrophile soutenu par les ergots.

Dans le cas des tubes de milieu gélosé, une graine désinfectée est déposée stérilement à la partie supérieure du biseau.

- conditions d'incubation : les tubes ainsi ensemencés sont placés en chambre climatisée sous un éclairage de 3 000 lux, de lumière blanche, 12 heures par jour, et sous une température de 20°C.

b) culture en microphytotron :

Nous avons effectué des cultures en microphytotron et obtenu des plantules âgées de 14 ou 21 jours. Dans cette enceinte, nous contrôlons les facteurs température, hygrométrie et éclairage. Les conditions suivantes ont été utilisées :

- lumière blanche 14 heures par jour - température 22°C
- obscurité 10 heures par jour - température 18°C
- hygrométrie: 85 % d'humidité pendant 24 heures.

Les Laitues sont cultivées en pots de terreau, mélange de terre de fougères et de terre fine sableuse ; elles sont arrosées chaque jour. Nous obtenons ainsi des Laitues non étiolées.

2) Obtention de l'inoculum :

L'agent pathogène est ensemencé sur le milieu de HUGUENIN gélosé, additionné ou non de stérol à raison de 0,2 mg par litre. L'inoculum est préparé à partir de cultures de 10 jours, correspondant à la phase optimale de croissance et de reproduction du parasite.

3) Modes d'infection :a) *plantules cultivées aseptiquement en tubes à ergots* :

L'inoculum utilisé est constitué d'une suspension de sporocystes et de fragments mycéliens, ou d'une suspension de sporocystes, de zygotes et de fragments mycéliens, obtenues par lessivage de la surface du thalle. La contamination s'effectue par addition, au milieu de KNOP, de 1 ml de cette suspension contenant 8.10^2 sporocystes et 3.10^2 zygotes.

b) *plantules cultivées aseptiquement sur milieu gélosé* :

Prélevé à l'aide d'un fil ensemencé, un petit fragment de culture est déposé à la surface du milieu gélosé, à quelques millimètres des racines pour éviter de les blesser.

c) *plantes cultivées en microphytotron* :

L'inoculum est constitué d'une suspension de sporocystes, de zygotes et de fragments mycéliens, obtenue après lessivage de la surface du milieu gélosé et broyage ; 15 ml de cette suspension sont déposés au collet de chaque plantule.

Ces méthodes d'infection nous semblent très proches de celles ayant lieu dans la nature, étant donné que nous avons pratiqué des contaminations sans blesser les racines.

II. RECHERCHE DU PARASITE DANS LES TISSUS DE LA PLANTE-HOTE ET DANS LE SUBSTRAT

1) Examen microscopique des tissus de l'hôte :

Des coupes longitudinales et transversales réalisées à main levée, colorées par le bleu coton, sont montées entre lame et lamelle et observées au microscope, en vue de la détection du parasite. Dans le cas de plantes contaminées au stade cotylédonaire, ou au stade 2 feuilles, nous

effectuons des étalements de racines, de l'axe hypocotylé et de jeunes feuilles que nous colorons également par le bleu coton acétique.

2) Mise en culture de coupes sériées de la plante :

Des coupes transversales successives de 1 à 3 millimètres d'épaisseur sont prélevées aseptiquement dans la plante et déposées sur un milieu nutritif gélosé. Après quelques jours d'incubation à 18°C sous 12 heures de lumière par jour, l'agent pathogène se développe sur ce milieu à partir des tissus qui l'hébergeaient.

3) Détection du *Pythium tracheiphilum* dans le terreau :

Nous utilisons la technique de dilution qui nous fournira des résultats qualitatifs et quantitatifs en l'adaptant au Champignon étudié.

50 ml d'eau distillée stérile sont ajoutés à 5g de sol ; après une vigoureuse agitation, nous effectuons des dilutions de cette suspension au 100ème, 500ème et 1000ème. Des boîtes de Pétri reçoivent chacune 1 ml de ces différentes dilutions sur lequel nous coulons un milieu gélosé de malt à 1 % ou de pomme de terre 50 g/l, glucosé à 0,5 %, maintenu en surfusion à 40°C. Ces boîtes sont mises à incuber pendant 15 jours à 18°C.

Le milieu et les conditions de température utilisés favorisent la croissance du *Pythium* recherché et limitent la croissance des espèces concurrentes.

III. RESULTATS EXPERIMENTAUX

1) Symptômes externes :

a) *plantes contaminées en tubes* :

- inoculum constitué d'une suspension de sporocystes :

les plantules sont contaminées :

- . au stade cotylédonaire
- . au stade 4 feuilles
- . au stade 6 feuilles.

Quel que soit l'âge de la plante au moment de la contamination, les symptômes de la maladie sont les suivants :

| Nombre de jours après contamination | Age des Laitues | VARIETES UTILISEES | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------|--------------------|-------------|---------|-------------|---------|-----------------|---------|----------------|
| | | Lactuca Serriola | | Aurélia | | Suzan | | n° 7 | |
| | | Témoins | Contaminées | Témoins | Contaminées | Témoins | Contaminées | Témoins | Contaminées |
| 3 | 14 j. | (-) | 4(++) | (-) | 4(+) | (-) | 0(-) | (-) | 1(+) |
| | 21 j. | (-) | 6(++) | (-) | 3(+) | (-) | 0(-) | (-) | 2(+) |
| 5 | 14 j. | (-) | 8(+++) | (-) | 6(++) | (-) | 3(++) 3(+) | (-) | 3(++) 1(+) |
| | 21 j. | (-) | 7(+++) | (-) | 6(++) | (-) | 3(++) 5(+) | (-) | 4(++) 1(+) |
| 7 | 14 j. | (-) | 10(+++) | (-) | 10(+++) | (-) | 6(++) 3(+) | (-) | 5(++) |
| | 21 j. | (-) | 10(+++) | (-) | 10(+++) | (-) | 6(++) 4(+) | (-) | 5(++) |
| 8 | 14 j. | (-) | 10(+++) | (-) | 10(+++) | (-) | 8(+++) 2(++) | (-) | 6(+++) 1(+) |
| | 21 j. | (-) | 10(+++) | (-) | 10(+++) | (-) | 6(+++) 6(++) | (-) | 6(+++) 2(+) |
| 10 | 14 j. | (-) | 10(+++) | (-) | 10(+++) | (-) | 10(+++) | (-) | 10(+++) |
| | 21 j. | (-) | 100(+++) | (-) | 10(+++) | (-) | 10(+++) | (-) | 10(+++) |

Tableau 18 : Evolution de la maladie et du nombre de plantes malades après contaminations à 14 et 21 jours des laitues de différentes variétés.

4 : nombre de plantes malades - + : feuilles du bas flétries
 ++ : pétioles des feuilles flétris - +++ : plante flétrie, étiolée.

La totalité des plantes témoins sont saines.



- après 4 jours, la partie terminale de la racine et les extrémités des radicelles sont brunes ;
- après 5 jours, on observe un brunissement de la racine sur la totalité de sa longueur, puis sur les cotylédons et enfin sur les nervures des feuilles ;
- après 7 jours, la racine est entièrement noire, la plantule offre un aspect étioilé, flétri, totalement séché.

Toutes les plantules contaminées présentent après 7 jours les symptômes de flétrissement, les plantules témoins restent saines.

- inoculum constitué d'une suspension de sporocystes et de zygotes : les résultats sont identiques à ceux observés dans le cas précédent. 7 jours après la contamination, toutes les plantes infectées sont flétries.

b) *plantules contaminées en phytotron* :

Des plantes sont contaminées au stade 14 jours et 21 jours ; nous avons testé l'espèce sauvage *Lactuca serriola* L. et les cultivars suivants de sa variété *sativa* : "Suzan", "Aurélia", "n° 7" à raison de 10 plantes par traitement. Les résultats sont exprimés dans le tableau 18.

Il ressort de ces expériences que toutes les Laitues contaminées présentent 10 jours après l'inoculation, les symptômes ultimes de la maladie. Toutes les plantes testées sont flétries ; cependant on note que la maladie évolue très vite vers le stade ultime chez le *Lactuca serriola* et le cultivar "Aurélia".

2) Présence du parasite dans les tissus de l'hôte :

a) *examen microscopique des tissus de la laitue* :

- inoculations réalisées avec des suspensions de sporocystes et de fragments mycéliens : Les Laitues contaminées sont divisées en deux lots :

- les Laitues du premier lot sont prélevées, 4 jours après l'inoculation, soigneusement lavées à l'eau distillée et examinées au microscope. Nous effectuons des étalements de racines, ainsi que de l'axe feuillé, et des

feuilles. Les tissus de ces organes examinés après coloration, montrent la présence de sporocystes, d'hyphes mycéliens et de zygotes ;

- les Laitues du deuxième lot sont prélevées 8 jours après l'inoculation ; l'examen au microscope révèle également la présence de sporocystes, de zygotes et d'hyphes mycéliens dans les tissus de ces plantules.

Nous avons alors réalisé l'expérience suivante : des sporocystes et des fragments mycéliens sont mis en culture sur milieu de KNOP dans des tubes, sans Laitue. L'incubation a lieu dans les mêmes conditions de température et de lumière ; les cultures sont examinées après 4 et 8 jours afin de détecter la présence éventuelle de zygotes. Dans ce cas, nous n'observons aucune formation de zygotes.

Ces expériences démontrent que la formation des zygotes dans les tissus de la Laitue se trouve sous la dépendance d'un facteur de nature stérolique lié à la plante hôte, confirmant les résultats obtenus en culture *in vitro*.

- inoculations réalisées avec des suspensions de sporocystes, de zygotes et de fragments mycéliens : les résultats sont identiques à ceux décrits dans le paragraphe précédent.

b) *techniques des coupes sèriées* :

Cette technique permet de mettre en évidence le parasite dans les tissus de l'hôte après quelques jours d'incubation. Cette méthode a été utilisée dans le cas de plantes contaminées en microphytotron.

Des coupes transversales de racines sont réalisées 2, 3 et 5 jours après l'inoculation. Les résultats sont les suivants :

- Lactuca serriola et cv. "Aurélia" : 2 jours après l'inoculation, présence du parasite dans la partie terminale de la racine, sur une hauteur de 1 à 2 cm. 3 jours après l'inoculation, présence du parasite dans toute la racine.

- cv. "Suzan" et "n° 7" : 2 jours après l'inoculation, absence du parasite dans les tissus de l'hôte. 3 jours après l'inoculation, présence du parasite dans la partie terminale sur 1 à 3 cm. 5 jours après l'inoculation, présence du parasite sur toute la hauteur de la racine.

A partir de ces expériences entreprises en laboratoire, nous avons reproduit les symptômes de la maladie, tant dans les cultures axéniques de Laitues en tube, que dans le microphytotron. Nous avons mis en

évidence l'agent pathogène dans les tissus des plantules, quel que soit l'âge des Laitues au moment de la contamination.

c) présence du parasite dans le terreau :

Dans nos conditions expérimentales, nous avons essayé de préciser les possibilités de survie du *Pythium tracheiphilum* dans le substrat utilisé : 20 pots contenant des plantes de Laitues plantées en terreau et 20 autres pots contenant du terreau seulement, reçoivent chacun une suspension contenant environ 10^3 sporocystes et $5 \cdot 10^2$ zygotes.

Ces pots sont maintenus dans le microphytotron et arrosés périodiquement. Chaque semaine, le parasite est recherché dans l'échantillon de terreau à 2 cm de profondeur dans un pot de chaque lot, par la technique de dilution précédemment décrite.

Résultats : Pendant les 4 mois qui ont suivi la contamination, nous avons réisolé *Pythium tracheiphilum* dans les deux séries.

CONCLUSION

Ces infections expérimentales en culture *in vitro*, en tubes comme en microphytotron nous ont permis de reproduire la maladie ; les inoculations de plantules en culture axénique, sur milieux liquide et gélosé sont réalisées dans des conditions particulièrement propices au développement du parasite car la jeune Laitue est confrontée à un inoculum important ; de plus, *P. tracheiphilum* ne se trouve en compétition avec aucun autre microorganisme.

Nous avons mis en évidence l'action de certains composants de la racine, probablement de nature stérolique, sur la formation des zygotes du *Pythium*, si l'on confronte ce résultat à ceux obtenus lors de l'apport exogène de stérol dans les cultures *in vitro*.

Dans les conditions de nos essais en microphytotron, il nous a été possible de réisoler *P. tracheiphilum* dans le terreau pendant les 4 mois qui ont suivi les inoculations ; un potentiel infectieux non négligeable semble donc persister dans le sol plusieurs mois.

C H A P I T R E I I

ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA MALADIE

ESSAIS EN CHAMP.

Après avoir décrit la maladie, précisé les facteurs conditionnant *in vitro* le cycle complet de l'agent pathogène, établi quelques relations entre le parasite et la plante-hôte, nous avons mis en place des essais agronomiques en vue de définir les aspects suivants qui nous paraissent essentiels dans la compréhension de la maladie :

- 1 - les stades de développement de la plante les plus sensibles à l'attaque parasitaire ;
- 2 - les conditions climatiques favorisant la maladie ;
- 3 - les conditions de survie de l'agent pathogène dans le sol et les débris de cultures ;
- 4 - les moyens éventuels de lutte.

Pour réaliser cet objectif, nous avons dressé un programme expérimental qui a couvert les années 1974, 1975 et 1976 comprenant des essais en serre et en champ qui se sont déroulés dans le triangle délimité par les localités de Croissy-sur-Seine, Montesson et Le Pecq dans le département des Yvelines. Nous exposerons les différents aspects de la méthodologie expérimentale, puis nous décrirons successivement les plans et résultats expérimentaux obtenus au cours des essais de 1974, 1975 et 1976 ; enfin, nous essayerons de dégager les conclusions de ces essais.

I. METHODOLOGIE EXPERIMENTALE

1) Disposition des essais :

Les champs ont été installés à Croissy-sur-Seine et Montesson (Yvelines) ; ils sont inclus dans une exploitation qui se consacre en grande partie à la culture de la Laitue.

Le dispositif retenu est celui de parcelles de 2m x 2,5m comprenant 6 lignes espacées de 28 cm.

2) Techniques culturales :

Les terres utilisées étaient consacrées, les deux années précédents les essais, à la culture de la Laitue. Après le labour d'automne, l'exploitant a enrichi le sol par un apport en matières organiques sous forme de fumier de bovin, ainsi qu'en éléments minéraux par un apport d'engrais composé de type ammonitrate dont les rapports d'unité N/P/K sont respectivement 100 - 80 - 200. Au printemps, le sol fut occupé par une culture de 100 000 plants de Laitues par hectare.

Avant l'implantation de nos essais, le sol a subi une désinfection par le "fongosan", produit fongicide dont la matière active est le dazomet (essais de 1974 en champ), ou par le "brom-o-gas", fongicide dont la matière active est le bromure de méthyle, pour les essais réalisés en 1975 et 1976. L'utilisation du fongosan ne nécessitant pas des mesures exceptionnelles de sécurité, le traitement par ce fongicide est réalisé par l'exploitant. Par contre, le bromure de méthyle, produit gazeux à la température ordinaire, est très toxique pour l'homme ; il est associé à 2 % de chloropicrine, trichloronitrobenzène afin de supprimer son caractère inodore. En conséquence, la manipulation de ce produit nécessite d'importantes mesures de sécurité et la désinfection n'est pratiquée que par des entreprises spécialisées, après autorisation écrite du service de la protection des végétaux.

De plus, la désinfection ne peut avoir lieu que si la température atmosphérique est supérieure à 10°C et si le sol de la parcelle, préalablement ameubli, possède un taux d'humidité d'au moins 70 %. Lorsque ces conditions sont réalisées, le sol est recouvert d'une toile plastique formant un tunnel de 5 à 10 cm de hauteur, bordé sur son pourtour par un

apport de terre. C'est par des orifices ménagés dans la toile, pouvant être bouchés, que le fongicide est versé dans des boîtes métalliques disposées dans le tunnel.

Après 24 heures d'action, la parcelle est découverte ; 5 jours plus tard, nous effectuons les semis manuels à la densité d'environ 2kg de graines à l'hectare sur ce sol de nature sablo-calcaire, qui n'a pas été préalablement analysé. Nous n'avons utilisé qu'une variété de Laitue : la variété "Novir" sélectionnée par les généticiens de l'I.N.R.A.

3) Inoculations expérimentales :

Elles ont été effectuées au moment du semis et à différentes époques de la période de culture sur des Laitues alors parvenues à divers stades de leur développement, avec un inoculum constitué par une suspension de fragments de mycélium, de sporocystes et de zygotes.

a) *préparation de l'inoculum* :

Nous cultivons la souche du *Pythium tracheiphilum* dans des fioles de Roux, sur milieu non gélosé (milieu préconisé par HUGUENIN en 1970, pour la culture du *Phytophthora palmivora*), complété par 10 mg par litre de β -sitostérol. Après 10 jours d'incubation à 18°C, sous un éclairage fournissant 12 heures de lumière blanche par jour, nous recueillons le produit de la croissance de 25 fioles, c'est à dire environ 10 g de matière fongique sèche. Le produit de la croissance ainsi récupéré est lavé 3 fois à l'eau distillée, puis centrifugé 2 fois consécutivement à 4°C pendant 25 minutes à 4 000 tours/minute (centrifugeuse I.E.C. PR 6 000) avant d'être broyé pendant 2 minutes par l'ultra-turax. Le broyat récupéré est alors mis en suspension dans un volume d'eau tel que la concentration finale soit d'environ $8 \cdot 10^2$ sporocystes et $3 \cdot 10^2$ zygotes par ml de suspension. Cette suspension est agitée manuellement au moment de l'utilisation afin de l'homogénéiser.

b) *inoculations* :

Les contaminations au moment du semis sont effectuées en versant environ 100 ml de suspension d'inoculum par mètre, dans le sillon même du sol, au contact des graines qui sont ensuite recouvertes par 1 à 2 cm de terre.

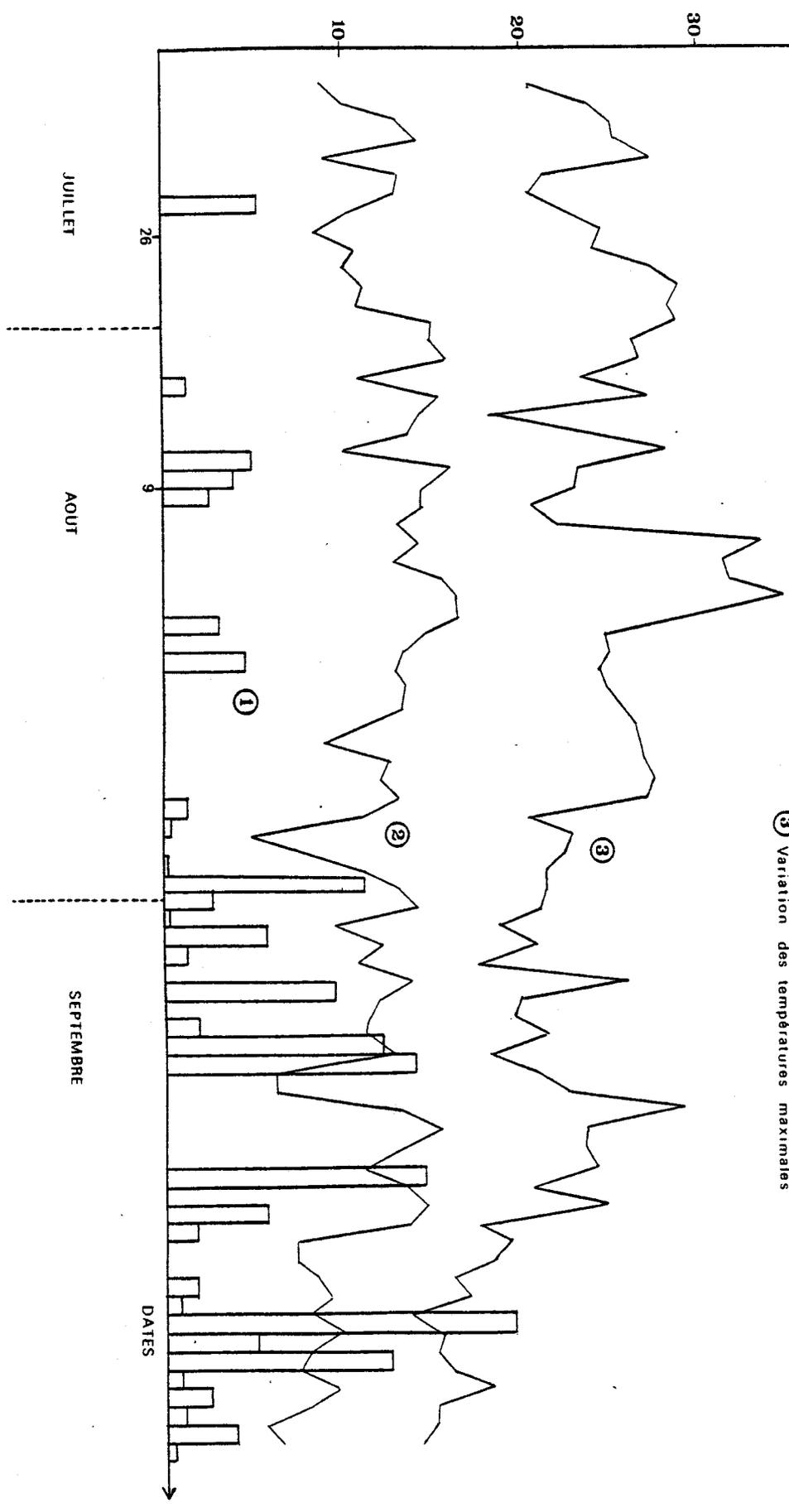
Les contaminations en cours de végétation sont réalisées au niveau du collet de chaque Laitue, à l'aide d'une pipette, par arrosage

Température en degrés
et hauteur d'eau en mm

FIGURE N° 5: DONNEES CLIMATIQUES

ANNEE 1974

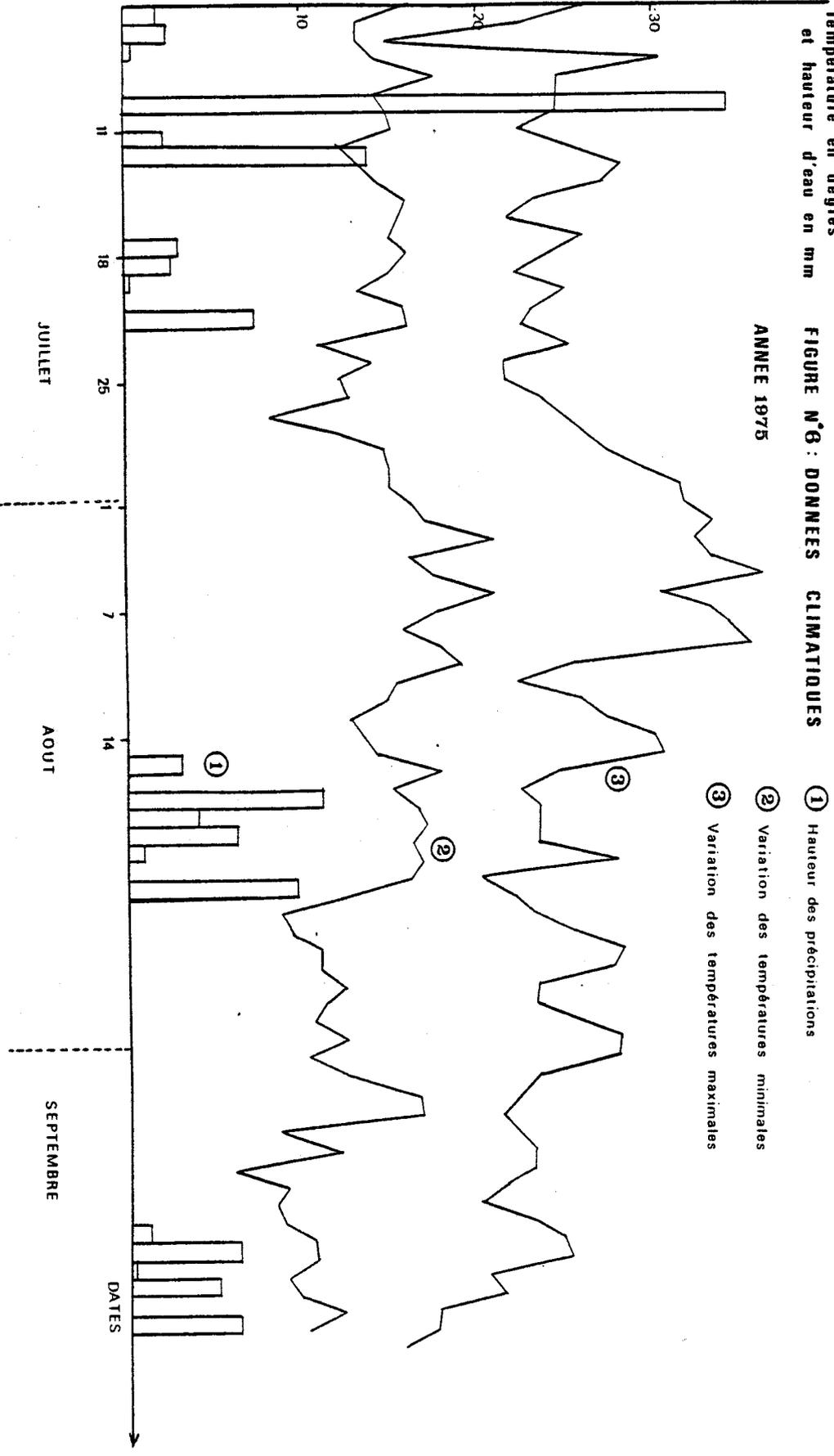
- ① Hauteur des précipitations
- ② Variation des températures minimales
- ③ Variation des températures maximales



Température en degrés
et hauteur d'eau en mm

FIGURE N°6 : DONNEES CLIMATIQUES

ANNEE 1975

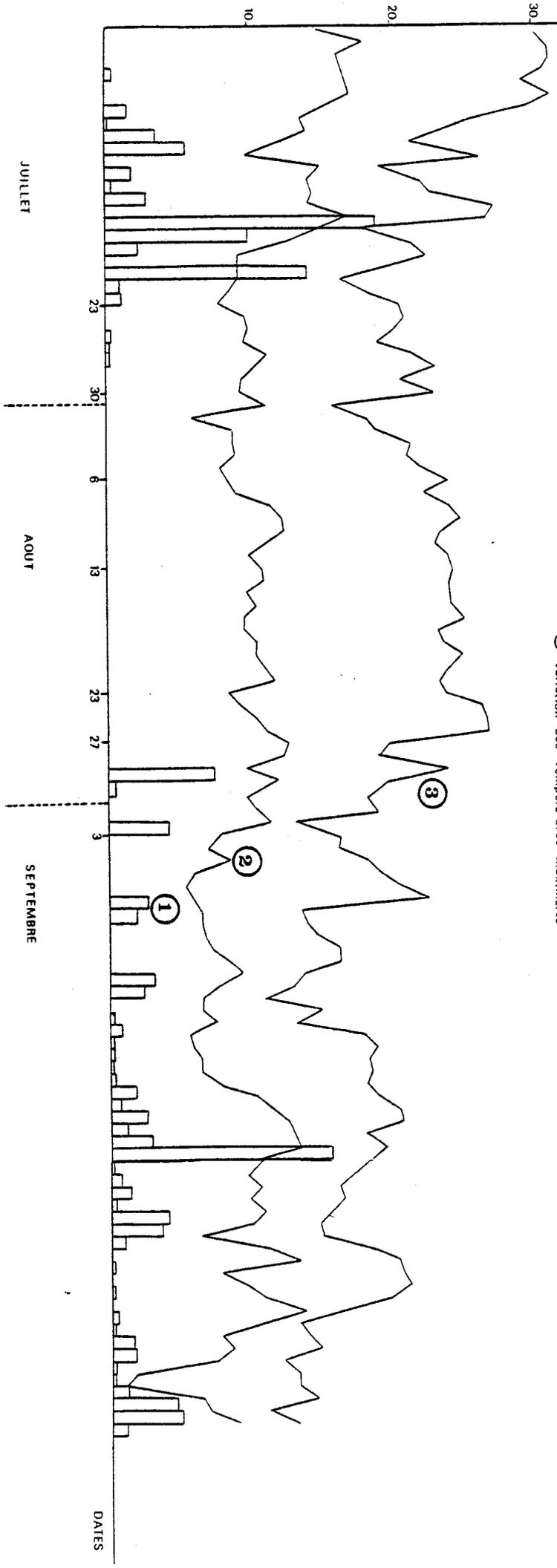




Température en degrés
et hauteur d'eau en mm

FIGURE N°7 : DONNEES CLIMATIQUES
1978

- ① Hauteur des précipitations
- ② Variation des températures minimales
- ③ Variation des températures maximales



du sol avec 5 ml environ de la suspension fraîchement préparée.

4) Méthodes des relevés :

Des contrôles et des comptages de plantes malades sont effectués chaque semaine. Nos essais préliminaires nous avaient permis de remarquer que nous devions les classer en deux catégories :

1-les plantes inoculées et présentant au cours de leur développement les symptômes de flétrissement ;

2-les plantes inoculées, ne flétrissant pas, mais dont les vaisseaux de la racine présentent un brunissement interne plus ou moins accentué, visible seulement après coupe longitudinale de la racine.

Des coupes sériées de ces racines montrent que plus de 95 % d'entre elles hébergent l'agent pathogène.

Après chaque opération culturale, sarclage, mise en place et lors de la récolte, nous comptons les Laitues appartenant à chacun de ces lots ; le total des plantes malades est effectué. Les résultats sont exprimés d'une part en pourcentage de plantes flétries (1ère catégorie), d'autre part en pourcentage de plantes infestées (1ère + 2ème catégories).

5) Données climatiques :

Les données climatiques journalières suivantes : température minimale, température maximale, hauteur des précipitations, enregistrées par la station météorologique du Pecq sont représentées dans les graphiques 5, 6 et 7.

6) Intervention d'autres parasites :

a) *parasites cryptogamiques* :

En fin de culture, nous avons observé des attaques du *Bremia lactucae*, agent du mildiou de la Laitue, et du *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise. Un traitement au dithane M22, poudre mouillable dont la matière active est le manèbe [N-N'éthylène bis (dithiocarbamate man-ganeux)] a été appliqué à la dose de 160 g par hectolitre d'eau, sans perturber le développement de l'agent pathogène étudié.

b) *parasites animaux* :

Des attaques de Pucerons, à divers moments de la culture, ont été combattues à l'aide du "folimat", insecticide, dont la matière active est le O-méthoate (thiophosphate de O-O diméthyl et de S diméthyl-carbamyl méthyl) qui fut pulvérisé sur le feuillage à la dose de 62,5 g par hectolitre d'eau. Signalons également que nous avons observé des chenilles de *Scotia segetum* Schiff, mais qu'elles n'ont pas affecté le développement de notre culture.

II. PLAN EXPERIMENTAL DE 1974

Le but de ces essais était de produire le flétrissement des Laitues par la méthode des inoculations artificielles.

Ces expériences se sont déroulées :

- d'une part en serre dans des conditions de température et d'humidité atmosphérique difficilement contrôlables et quantifiables ;
- d'autre part en champ sur un sol préalablement traité par le fongosan.

1) Essai en serre :

a) *méthodologie* :

Nous contaminons des plants de Laitues âgées de 8 jours cultivées en motte de terreau. 12 jours après l'inoculation, ces plants ainsi que des plants témoins non contaminés sont repiqués en champ.

b) *résultats* :

Les contrôles effectués à différents moments au cours du développement des plantes ne nous ont fourni aucun résultat positif quant à la production des symptômes de flétrissement.

2) Essai en champ :

a) *mise en place de l'essai* :

Le sol de 10 parcelles est traité par le "fongosan", alors que celui des 10 autres sert de témoin sans traitement.

Dans chacun de ces types de sol, les laitues de 5 parcelles sont contaminées par *Pythium tracheiphilum* tandis que les autres ne le sont pas.

La contamination a lieu au moment du semis, le 26 juillet, pour 3 rangs; au stade 1er sarclage, le 9 août pour les 3 autres rangs.

b) résultats :

Les différents contrôles effectués en cours de végétation n'ont révélé aucun symptôme de flétrissement. Cependant, bien que ne se manifestant pas extérieurement, l'agent pathogène est présent dans les tissus de racines présentant un brunissement au niveau du cylindre central ; des coupes sériées ont révélé les racines dont les tissus hébergeaient le parasite.

Les résultats sont exprimés dans le tableau

Tableau 19 : Pourcentage de racines infestées dans différentes conditions de contamination, sur sol naturel ou sur sol désinfecté au Fongosan.

| Conditions de sol et de contamination | | Pourcentage de racines dont les tissus hébergent <i>P. tracheiphilum</i> |
|---------------------------------------|---|--|
| sol naturel | sans contamination | 38,6 % |
| | contamination au semis le 26 juillet | 58,3 % |
| | contamination au 1er sarclage le 9 août | 64,1 % |
| sol désinfecté au fongosan | sans contamination | 32,1 % |
| | contamination au semis le 26 juillet | 48,6 % |
| | contamination au 1er sarclage le 9 août | 59,2 % |

Ces résultats nous montrent que les contaminations accroissent le pourcentage de racines infestées sur sol naturel et sur sol contaminé, bien qu'aucune plante ne soit flétrie.

3) Interprétation de ces essais de 1974 :

Ces essais nous permettent de dégager les enseignements suivants :

1-la désinfection du sol par le "dazomet" semble inefficace vis-à-vis de l'agent pathogène étudié ; en effet, nous observons sur un sol n'ayant pas subi de traitement, 38,6 % de racines malades alors que sur le sol désinfecté, le pourcentage est de 32,1 % ;

2-la présence de l'agent pathogène dans les tissus des racines ne se traduit pas toujours par le flétrissement de la plante, mais par un brunissement interne plus ou moins important des vaisseaux du cylindre central de la racine ;

3-les contaminations des 26 juillet et 9 août 1974 ont été réalisées dans des conditions météorologiques de sécheresse ; les relevés de la station du Pecq nous fournissent les données suivantes :

. pour la période comprise entre le 26 juillet et le 8 août:

- la moyenne des températures maximales est de 25,6°C
- la moyenne des températures minimales est de 12,7°C
- la hauteur d'eau due aux précipitations est de 8,8 mm

. pour la période comprise entre le 9 et le 25 août:

- la moyenne des températures maximales est de 26,6°C
- la moyenne des températures minimales est de 13,1°C
- la hauteur d'eau due aux précipitations est de 7,6 mm.

Ces conditions atmosphériques sèches n'ont pas permis à la maladie de s'extérioriser bien que le Champignon soit présent dans 58,3 et 64 % des Laitues sur sol naturel, contaminées respectivement au semis et au 1er sarclage, et dans 48,6 et 59,2 % des Laitues sur sol désinfecté, contaminées respectivement au moment du semis et du 1er sarclage.

Ces résultats très partiels nous ont permis d'établir les bases des programmes expérimentaux de 1975 et 1976, réalisés dans la perspective de mieux comprendre le déroulement du processus infectieux.

III. PLANS EXPERIMENTAUX DE 1975 ET 1976

Ces deux expériences ont été mises en place afin de poursuivre les objectifs suivants : l'étude de l'influence de l'âge de la Laitue et des facteurs climatiques sur l'intensité de l'épidémie.

Pour l'année 1975, nous avons procédé de la manière suivante :

- des semis ont été effectués les 3, 11, 18 et 25 juillet ;
- les contaminations ont été réalisées les 11, 18 et 25 juillet, 1er, 7 et 14 août, ainsi le 1er août par exemple, nous contaminons des parcelles de Laitues âgées de 7, 14, 21 et 28 jours.

Pour l'année 1976, la méthodologie a été identique, nous avons effectué des semis les 2, 9, 16, 23 et 30 juillet, les 6 et 13 août et des contaminations les 23 et 30 juillet, les 6, 13, 23 et 27 août et le 3 septembre. En 1975 et 1976, le sol des parcelles a été désinfecté par le "brom-o-gaz".

Nous avons reporté dans deux tableaux les dates des différentes opérations de semis et de contamination et indiqué l'âge des Laitues aux différentes dates de contaminations (tableaux 20 et 21).

Tableau 20 : Age des Laitues au moment de la contamination. Expérience de 1975.

| Date des contaminations | Date des semis | | | |
|-------------------------|----------------|------------|------------|------------|
| | 3 juillet | 11 juillet | 18 juillet | 25 juillet |
| 11 juillet | 7 jours | | | |
| 18 juillet | 14 jours | 7 jours | | |
| 25 juillet | 21 jours | 14 jours | 7 jours | |
| 1er août | 28 jours | 21 jours | 14 jours | 7 jours |
| 7 août | | | 21 jours | 14 jours |
| 14 août | | | | 21 jours |

Tableau 21 : Age des Laitues au moment de la contamination. Expérience de 1976.

| Date des contaminations | Date des semis | | | | | | |
|-------------------------|----------------|----------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|
| | 2juillet | 9juillet | 16juillet | 23juillet | 30juillet | 6août | 13août |
| 23 juil. | 21jours | 14jours | 7jours | 0jour | | | |
| 30 juil. | | 21jours | 14jours | 7jours | 0jour | | |
| 6 août | | | 21jours | 14jours | 7jours | 0jour | |
| 13 août | | | | 21jours | 14jours | 7jours | 0jour |
| 23 août | | | | | 21jours | 14jours | 7jours |
| 27 août | | | | | | 21jours | 14jours |
| 3 sept. | | | | | | | 21jours |

IV. RESULTATS DES ESSAIS DE 1975 ET 1976

Ces résultats sont exprimés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 22 : Intensité de l'attaque parasitaire en fonction de la date de contamination et de l'âge des Laitues au moment de cette contamination. Résultats de 1975.

| Date des contaminations | Age des Laitues au moment de la contamination | | | | |
|-------------------------|---|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | 0 jour | 7 jours | 14 jours | 21 jours | 28 jours |
| 11 juillet | | b 6,2 c 10,9 | | | |
| 18 juillet | | b 51,3 c 69 | b 6,9 c 45,5 | | |
| 25 juillet | a 51,1 b 0 c 10,3 | b 10,9 c 39,7 | b 0 c 25 | b 0 c 4,9 | |
| 1er août | | b 10,8 c 36 | b 17,5 c 43,5 | b 2,9 c 30,4 | |
| 7 août | | | b 12,1 c 52,6 | b 4,1 c 32 | b 0 c 4,2 |
| 14 août | | | | b 40,8 c 57,8 | b 0 c 66,6 |

Les résultats portés dans ce tableau expriment :

- a : le pourcentage de plantes à la levée par rapport à la parcelle témoin correspondante ;
- b : le pourcentage de plantes flétries ;
- c : le pourcentage de plantes flétries + le pourcentage de plantes non flétries mais dont les racines hébergent le parasite.



Tableau 23 : Intensité de l'attaque parasitaire en fonction des dates de contamination et du stade de développement des Laitues au moment de la contamination. Résultats de 1976.

| Date des contaminations | Age des Laitues au moment de la contamination | | | | | | | |
|-------------------------|---|---------|----------|----------|---|------|---|------|
| | 0 jour | 7 jours | 14 jours | 21 jours | | | | |
| 23 juillet | a | 17,7 | | | | | | |
| | b | 0 | b | 23,9 | b | 21,4 | b | 12,8 |
| | c | 0 | c | 37,5 | c | 36,4 | c | 14,8 |
| 30 juillet | a | 62,3 | | | | | | |
| | b | 0 | b | 3,1 | b | 0 | b | 0 |
| | c | 4,2 | c | 5,2 | c | 1,6 | c | 2,6 |
| 6 août | a | 36,1 | | | | | | |
| | b | 10,1 | b | 17 | b | 14,5 | b | 15,7 |
| | c | 21,2 | c | 29 | c | 20 | c | 21,5 |
| 13 août | a | 35 | | | | | | |
| | b | 2,1 | b | 8,1 | b | 8,1 | b | 5,1 |
| | c | 4,3 | c | 10,6 | c | 9,3 | c | 8,2 |
| 23 août | | | b | 10,2 | b | 7,2 | b | 0 |
| | | | c | 17,6 | c | 11,3 | c | 3,7 |
| 27 août | | | | | b | 6,1 | b | 4,1 |
| | | | | | c | 9,5 | c | 10,1 |
| 3 septembre | | | | | | | b | 17 |
| | | | | | | | c | 24,2 |

Les résultats portés dans ce tableau expriment :

- a : le pourcentage de plantes à la levée par rapport à la parcelle témoin correspondante ;
- b : le pourcentage de plantes flétries ;
- c : le pourcentage de plantes flétries + le pourcentage de plantes non flétries dont les racines hébergent le parasite.

Les résultats obtenus montrent que des contaminations artificielles permettent d'obtenir des Laitues flétries, mais des observations plus approfondies révèlent que le nombre de Laitues aux racines infestées est toujours supérieur au nombre de Laitues flétries.

Deux types de facteurs interviennent dans l'épidémie ; nous essayerons de dégager le rôle de chacun d'eux en les étudiant séparément ; nous étudierons ensuite la durée d'incubation de la maladie, les conditions de survie des *Pythium* dans le sol et les moyens éventuels de lutte contre l'agent pathogène.

1) Influence du stade de développement de la Laitue sur l'intensité de la maladie :

En faisant abstraction de l'influence des conditions climatiques, nous remarquons que des contaminations artificielles réalisées sur des Laitues d'âges différents provoquent des dégâts d'intensité variable.

Dans tous les cas, des contaminations effectuées au semis provoquent des réductions considérables du nombre de plantes à la levée. Ce nombre, dans les parcelles contaminées, exprimé en pourcentage par rapport à celui des parcelles témoins semées le même jour, varie de 17,7 à 62,3. Cette diminution du taux de levée est due à une attaque du Champignon sur l'axe hypocotylé, provoquant sa pourriture. Ces observations ont également été signalées dans les contaminations de plantules *in vitro*.

Cependant, il est à noter que dans les conditions de semis très denses, pratiquées par les maraîchers en région parisienne, cette fonte de semis peut passer inaperçue d'autant que le premier sarclage élimine ces plantules.

La contamination effectuée le 18 juillet 1975 sur des laitues de 7 et 14 jours fournit respectivement 51,3 et 7 % de laitues flétries. De même, la contamination du 7 août a donné les résultats suivants :

- Laitues de 14 jours : pourcentage de plantes flétries : 12,1 ; pourcentage de plantes porteuses de l'agent pathogène : 52,6 ;
- Laitues de 21 jours : pourcentage de plantes flétries : 4,1 ; pourcentage de plantes porteuses de l'agent pathogène : 32 ;
- Laitues de 28 jours : pas de plantes flétries ; pourcentage de plantes porteuses de l'agent pathogène : 4,2.

Pour l'année 1976, la contamination du 23 juillet illustre également le fait que les pourcentages de plantes atteintes sont d'autant plus importants que les Laitues sont contaminées à un stade plus précoce :

- Laitues de 7 jours : pourcentage de plantes flétries : 23,9
pourcentage de plantes porteuses de l'agent pathogène:37,5
- Laitues de 14 jours: pourcentage de plantes flétries : 21,4
pourcentage de plantes porteuses de l'agent pathogène:36,4
- Laitues de 21 jours: pourcentage de plantes flétries : 12,8
pourcentage de plantes porteuses de l'agent pathogène:14,8

Les résultats de ces essais révèlent que les stades physiologiques jeunes (7 et 14 jours) sont de façon générale plus sensibles à l'attaque parasitaire, tandis que les Laitues de 28 jours n'ont présenté aucun flétrissement. Les contaminations au moment du semis provoquent des fontes de semis très importantes étant donné la densité de population des plantules.

2) Influence des conditions climatiques sur l'intensité de la maladie :

Les résultats des essais en serre et en champ de 1974 révèlent que des conditions atmosphériques sèches ne permettent pas d'obtenir le flétrissement des Laitues. Nous avons donc confronté les résultats obtenus en 1975 et 1976 avec les relevés météorologiques correspondants.

La contamination du 18 juillet 1975 a été suivie d'une période dont les caractéristiques climatiques sont les suivantes :

période du 18 au 25 juillet 1975

- moyenne des températures maximales : 23°C
- moyenne des températures minimales : 13,9°C
- hauteur d'eau due aux précipitations : 13,2 mm

résultats :

- Laitues de 7 jours : pourcentage de Laitues flétries : 51,3
pourcentage de Laitues avec *Pythium* : 69
- Laitues de 14 jours: pourcentage de Laitues flétries : 6,9
pourcentage de Laitues avec *Pythium* : 45,5

Les contaminations des 25 juillet, 1er et 7 août qui ont été toutes trois suivies de périodes au cours desquelles aucune précipitation n'a été enregistrée, ont fourni des pourcentages relativement faibles de plantes flétries ; par contre, les plantes porteuses de l'agent pathogène sont assez nombreuses (52,6 % dans le cas de Laitues de 14 jours contaminées le 7 août).

Les Laitues contaminées le 14 août 1975 ont reçu d'importantes précipitations s'élevant à 24 mm dans les 8 jours suivants.

résultats :

- Laitues de 21 jours : pourcentage de plantes flétries : 40,8
pourcentage de plantes infectées : 57,8
- Laitues de 28 jours : pourcentage de plantes flétries : 0
pourcentage de plantes infectées : 66,6.

De même, au cours de l'année 1976, les conditions climatiques au lendemain des contaminations ont joué un rôle dans l'extension de la maladie.

Il est à noter que dans la période du 23 juillet au 3 septembre, dates limites de nos contaminations, la hauteur d'eau due aux précipitations a été inférieure à 10 mm (9,1 mm). Ces conditions de grande sécheresse ont provoqué de façon générale, des dégâts peu importants. Cependant, à l'examen du tableau des résultats de 1976, nous constatons que les pourcentages de plantes malades (flétries ou porteuses du *Pythium tracheiphilum*) les plus importants ont été observés après les contaminations des 23 juillet, 6 août et 3 septembre.

La contamination du 23 juillet 1976 a été réalisée sur un sol fortement imbibé par suite de précipitations orageuses ayant apporté une hauteur d'eau cumulée de 90 mm, au cours des 3 semaines précédentes ; cette forte humidité a pu favoriser la pénétration du *P. tracheiphilum* dans les tissus de la racine.

Les pourcentages de plantes flétries sont de 23,9 - 21,4 et 12,8 respectivement pour des Laitues contaminées à 7 - 14 et 21 jours alors que les pourcentages de plantes infectées sont de 37,5 - 36,4 et 14,8.

La contamination du 6 août n'a été suivie d'aucune précipitation, mais de deux arrosages effectués par l'exploitant et correspondant à une hauteur d'eau cumulée de 40 mm. Les résultats montrent que les dégâts sont importants.

- Laitues de 7 jours : pourcentage de plantes flétries : 17
pourcentage de plantes infectées : 29
- Laitues de 14 jours : pourcentage de plantes flétries : 14,5
pourcentage de plantes infectées : 20
- Laitues de 21 jours : pourcentage de plantes flétries : 15,7
pourcentage de plantes infectées : 21,5

Ces résultats confirment qu'une forte humidité du sol est favorable au déroulement du processus épidémiologique. Par contre, la sécheresse ne permet pas à la maladie de s'extérioriser par le symptôme du flétrissement mais elle n'interdit pas l'invasion des tissus de la racine par l'agent pathogène, favorisant ainsi la survie du *Pythium tracheiphilum*.

3) Durée d'incubation de la maladie :

Des contaminations artificielles réalisées précocement dans des conditions climatiques favorables (humidité importante du sol) déclenchent le flétrissement des Laitues après 6 à 8 jours. Dans des conditions atmosphériques sèches, cette période d'incubation peut atteindre 10, 15 voire même 18 jours : contamination du 25 juillet et 1er août 1975.

Dans des conditions défavorables, la pénétration de l'agent pathogène dans les tissus de la racine pourrait se réaliser ; lorsque les conditions de développement du *P. tracheiphilum* deviendraient meilleures, le parasite pourrait provoquer l'obstruction des vaisseaux et le flétrissement tardif de la Laitue.

4) Conditions de survie de l'agent pathogène dans le sol et les débris de culture :

Il semble vraisemblable que le potentiel infectieux du *Pythium tracheiphilum* se maintienne dans le sol sur les débris de culture ; des contaminations réalisées *in vivo*, à l'aide de suspensions contenant uniquement des fragments de mycélium et de sporocystes, ont conduit à la formation d'organes sexués (spermatocystes et oocystes), puis de zygotes dans les tissus des racines de Laitues.

Ces structures à parois épaisses sont considérées par de nombreux auteurs comme capables d'assurer la survie du Champignon dans le sol pendant de longues périodes.

HOPPE (1966) montre que certaines espèces de *Pythium* se conservent pendant plus de 12 années, sous forme de zygotes dans des sols maintenus à la température ambiante ; ces spores, après une période humide d'environ 15 jours, sont capables d'infecter à nouveau leur hôte. Selon STANGHELLINI et BURR (1971) des oospores du *Pythium aphanidermatum*

subsistent pendant 12 mois dans un sol saturé en humidité à 4°C ainsi que dans un sol sec à 40°C, mais ne subsistent pas plus d'un mois dans un sol saturé en humidité à 40°C.

Des zygotes de différents *Pythium* fréquemment observés dans des tissus infectés, peuvent y survivre pendant de longues périodes et germer lorsqu'ils reçoivent le stimulus déclenchant l'arrêt de dormance (TRUJILLO et HINE, 1965).

Ceux du *Pythium aphanidermatum* résistent pendant de nombreuses années à des conditions de sécheresse, quelques mois à des températures basses (TRUJILLO et MARCLEY, 1967).

Selon AL HASSAN et FERGUS (1973), pour *Pythium hydnosporum* parasite du champignon de couche, ils conservent leur vitalité durant 18 mois dans des conditions d'atmosphère sèche ou humide, alors que dans ces conditions, les hyphes mycéliens ne survivent qu'un mois.

ALLARD (1970) montre que *Peronospora pisi* Syd., agent du Mildiou du Pois, persiste dans le sol, sur les gousses à l'état de zygotes et comme GEESTERAMUS (1960) les rend responsables de l'infection dans de nombreux cas. De même les oospores du *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. survivent quelques années dans les restes de cultures (MAC KAY, 1957 ; VIRANYI, 1974).

BARTON (1958) montre que de nombreuses espèces du genre *Pythium* prolifèrent en saprophytes dans les sols sableux de cultures légumières, le pH de ces sols étant compris entre 5,5 et 7,5. Selon cet auteur, l'activité saprophytique du *Pythium mamillatum* dans le sol serait liée à la présence d'une source de carbone. Les conditions optimales de vie saprophytique de cette espèce sont les suivantes : humidité élevée du sol, température voisine de 10°C, pH du sol compris entre 5,5 et 7,5. Cet auteur ne donne aucune précision quant à la forme sous laquelle le *P. mamillatum* assure sa conservation dans le sol.

Selon d'autres travaux, la persistance des espèces de *Pythium* dans le sol serait assurée par les sporocystes.

AGNIHOTRI et VAARTAJA (1967) montrent que les sporocystes du *Pythium ultimum* Trow survivent dans les sols et les résidus de culture. Selon STANGHELLINI et HANCOCK (1971) ces organes persisteraient pendant plus de 11 mois dans un sol sec ou humide sans que leur taux de germination n'en soit affecté.

Des sporocystes du *Pythium ultimum*, recueillis à partir de racines de pois enfouies dans le sol, pendant 5 mois, germent s'ils sont placés sur un milieu nutritif assez pauvre (STANGHELLINI et HANCOCK, 1971). Selon ces auteurs, ces structures assureraient la conservation du Champignon dans des conditions assez défavorables.

Il résulte de l'examen de ces travaux, que les espèces du genre *Pythium* assurent leur persistance dans le sol, pendant de longues périodes, dans des conditions parfois drastiques, sous forme de zygotes ou de sporocystes. Les uns et les autres sont particulièrement abondants dans les sols cultivés sableux, ou argilo-sableux dont les pH sont compris entre 5,5 et 7,5.

5) Moyens éventuels de lutte :

Nos essais en champ de 1974 ont montré l'inefficacité du "dazomet" utilisé en désinfection de sol.

Les essais de désinfection du sol en 1975 et 1976 nous ont fourni des résultats satisfaisants : le bromure de méthyl associé à la chloropicrine s'est avéré efficace pour la destruction du *P. tracheiphilum* ; toutes les Laitues des parcelles désinfectées, non recontaminés expérimentalement sont saines, tandis que dans le reste de l'exploitation sur sol non traité, des Laitues se révèlent malades.

Cependant, en raison de son prix de revient élevé, l'utilisation de ce produit est souvent limitée à la désinfection de sols de pépinière ou de sols de culture horticole.

Selon HENDRIX et CAMPBELL (1973) le bromure de méthyl utilisé seul ou associé à la chloropicrine ne détruit pas la totalité de la microflore du sol : en effet, au cours des premières semaines suivant son application, la population bactérienne du sol augmente, puis il

s'établit un équilibre biotique ; ceci pourrait expliquer l'effet bénéfique de ce traitement sur les plantes des parcelles servant de témoins ; ces Laitues se développant mieux et en particulier leur système racinaire est plus développé que celui des plantes témoins des sols non désinfectés.

Une autre méthode de lutte pourrait être la rotation des cultures ; il n'est pas rare en effet que des Laitues soient cultivées, à raison de 2 récoltes par an, sur certaines parcelles, augmentant ainsi les risques d'épidémie et de survie de l'agent pathogène ; cependant, de nombreuses espèces du genre *Pythium* sont capables de vie saprophytique sur des plantes appartenant à diverses familles : il serait donc peut être assez difficile d'éliminer ces parasites par cette méthode.

Dans le but de sélectionner des cultivars résistants en collaboration avec la Station d'Amélioration des Plantes de l'I.N.R.A., nous avons testé 50 cultivars de Laitues sur des parcelles dont le sol était présumé infecté. Les résultats de ces essais nous ont montré l'extrême sensibilité à l'agent pathogène : aucun cultivar parmi ceux que nous avons expérimentés ne s'est avéré résistant à la maladie, un ^{et} plante sauvage *Lactuca serriola* et les cultivars "Aurélia" et "Lilloise" se sont révélés très sensibles.

CONCLUSION

Les résultats de ces essais ont fait apparaître les éléments suivants :

1 - les conditions de forte humidité sont favorables au déclenchement de l'épidémie ; elles accroissent le nombre des Laitues flétries. Ces résultats confirment les observations faites par les maraîchers qui enregistrent des dégâts importants durant les étés pluvieux ;

2 - les jeunes stades de développement de la Laitue sont plus sensibles à l'agent pathogène ; les contaminations au moment des semis provoquent des fontes de semis, et une diminution du nombre de plantules. Les Laitues âgées de 7 et 14 jours sont plus susceptibles d'être infectées que les Laitues de plus de 21 jours ;

3 - les symptômes de flétrissement ne sont que l'aspect terminal de la maladie ; la pénétration et l'installation du *P. tracheiphilum* dans les tissus de la plante n'aboutissent pas toujours à ces symptômes ;

4 - *Pythium tracheiphilum*, présent dans les tissus des racines, survivrait donc dans le sol par ses zygotes et ses sporocystes et assurerait une source d'infection pour l'année suivante ;

5 - le bromure de méthyl associé à la chloropicrine apparaît efficace dans la lutte contre cet agent pathogène.

Cependant, il reste à définir le seuil précis d'humidité déclenchant l'attaque parasitaire, la durée de survie du parasite dans le sol, le mécanisme exact de la pénétration dans les tissus et le comportement des différentes variétés de Laitues.

La mise au point de la méthodologie expérimentale, en particulier la méthode des contaminations en champ pourrait permettre d'élucider ces différents aspects.

C H A P I T R E I I I

ACTION DE QUELQUES PRODUITS FONGICIDES SUR LA CROISSANCE
ET LA REPRODUCTION DU *PYTHIUM TRACHEIPHILUM*

Le *Pythium tracheiphilum* provoque des fontes de semis sur de jeunes plantules de Laitues peu après leur germination ; ce micro-organisme se conserve dans le sol sur les débris de culture et accroît son potentiel infectieux. La lutte contre ce type de parasite peut s'organiser par la désinfection du sol, mais cette méthode, efficace avec le bromure de méthyl et la chloropicrine, est extrêmement chère ; on peut également envisager l'action de fongicides utilisés en enrobage de semences ; ces produits, franchissant les téguments des graines, diffusent dans les jeunes plantules et pourraient empêcher le développement du Champignon.

Peu de travaux, à notre connaissance, traitent de l'efficacité des produits fongicides vis-à-vis des *Pythium*.

Nos essais ont eu pour but de comparer l'action éventuelle de fongicides appartenant à divers groupes sur la croissance du *Pythium tracheiphilum*.

I. PRODUITS FONGICIDES UTILISES

Les fongicides se répartissent en plusieurs groupes en fonction de la nature chimique de la matière active dont ils sont constitués. Nous avons effectué des essais avec les produits suivants :

1) Groupe des carbamates :

sous-groupe des dérivés de l'acide carbamique :

- le bénomyl dont la matière active est l'ester méthylique de l'acide 1-(butyl-carbamoyl-2-benzimidazole carbamique).

sous-groupe des dérivés de l'acide thiocarbamique :

- le SN41.703 dont la matière active est le chlorhydrate de S-éthyl-N3-diméthyl-aminopropyl-thiocarbamate.

sous-groupe des dérivés de l'acide dithiocarbamique :

- le mangafort dont la matière active est le NN'éthylène-bis (dithiocarbamate manganéux).

sous-groupe des dithiocarbamates mais dérivés des thiurames :

- le thirame dont la matière active est le disulfure de bis (diméthylthiocarbamyle).

2) Groupe des dicarboximides :

sous-groupe des phtalimides qui sont des dérivés de l'industrie pétrolière :

- le captane dont la matière active est le N(Trichlorométhylthio)cyclohexène dicarboximide.

3) Groupe des thiadiazines :

- le tébuzate dont la matière active est le thiazolyl-benzimidazole ou thiabendazole.

4) Groupe des organomercuriques :

- la frumine dont la matière active est l'hydrate de mercure éthyloxy-éthylique.

5) Produits composés :

le V4X dont la matière active est constituée par la carboxine et l'oxyquinoléate de cuivre.

II. EXPERIMENTATION

Nous avons utilisé les trois méthodes suivantes :

- incorporation du produit fongicide au milieu de culture gélosé *in vitro* ;
- méthode des disques de Whatmann ou disques pour antibiogrammes ;
- enrobage des semences.

1) Incorporation dans le milieu de culture :

a) *procédure expérimentale* :

Les produits testés sont ajoutés après autoclavage, stérilement, aux doses de 3 et 12 mg par litre de milieu gélosé. Afin d'en assurer l'homogénéisation, celui-ci est agité manuellement puis réparti en boîtes de Pétri avant d'êtreensemencé.

Des boîtes contenant le milieu chimiquement défini, sans produit fongicide, servent de témoin et sontensemencées à l'aide d'un fragment de culture du *Pythium tracheiphilum* âgée de 10 jours. Nousensemencions 5 boîtes par traitement et nous répétons l'expérience.

Des boîtes de Pétri, de chacun des traitements, sont simultanémentensemencées à l'aide d'un fragment de *Penicillium expansum*, pour vérifier l'efficacité et la persistance des produits au cours de la culture vis-à-vis d'un microorganisme très sensible à l'ensemble des inhibiteurs étudiés.

Parmi les fongicides précités, nous utilisons pour cet essai, le captane, le mangafort, le quinolate V4X et le SN41.703.

Les cultures sont incubées à 20°C, sous 12 heures de lumière blanche par jour.

b) *résultats* :

La moyenne des diamètres en mm, des colonies obtenues sur 3 boîtes, notée chaque jour, est reportée sur le graphique 8.

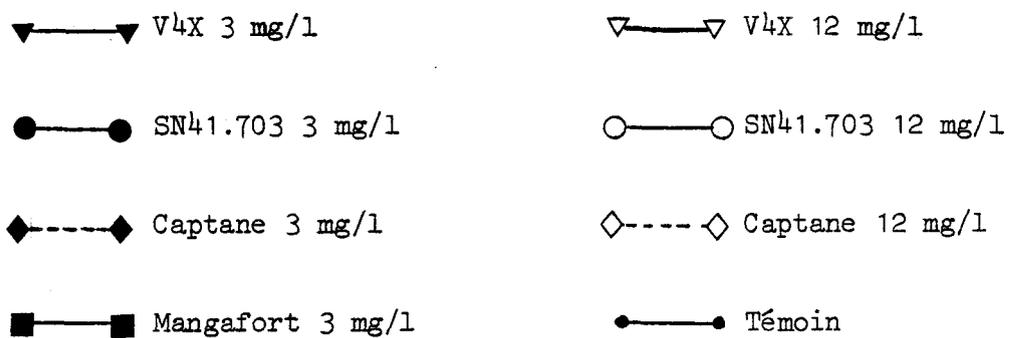
L'examen de celui-ci nous montre que :

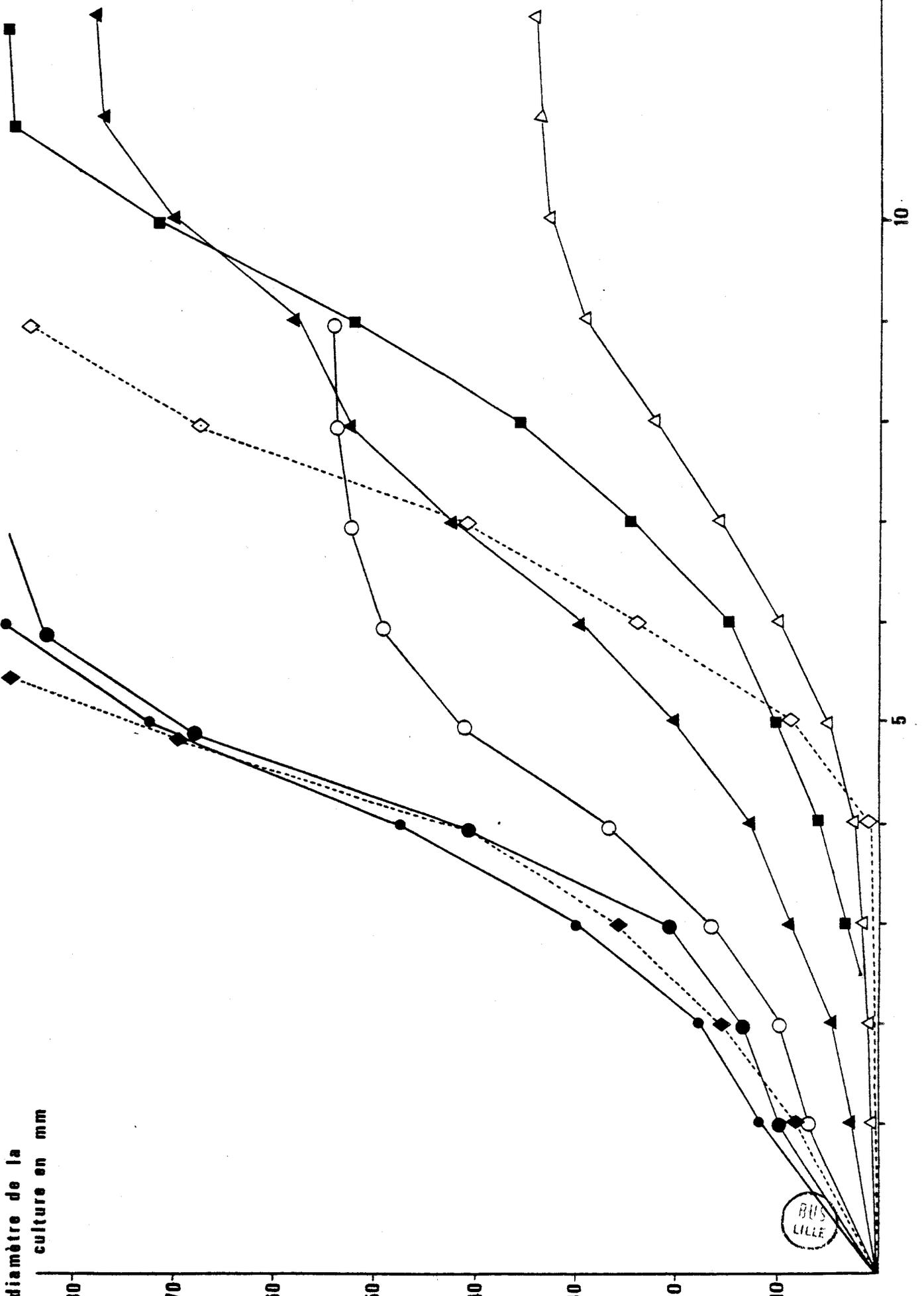
1-le captane et le SN41.703 utilisés à raison de 3 mg par litre sont inefficaces puisque la croissance est sensiblement égale à celle du témoin ;

F I G U R E 8

INFLUENCE DES DIFFERENTS PRODUITS FONGICIDES SUR LA CROISSANCE
DU *PYTHIUM TRACHEIPHILUM*

Courbes de croissance en présence des produits suivants





2-le captane à 12 mg par litre, le mangafort à la dose de 3 mg/litre et le V4X à 3 mg/litre sont peu efficaces vis-à-vis du *Pythium tracheiphilum* ; on note cependant un ralentissement de la croissance du Champignon puisque 9 ou 11 jours sont nécessaires au lieu de 6 dans le cas du témoin, pour coloniser la totalité de la surface du milieu gélosé ;

3-le SN41.703 à la concentration de 12 mg par litre montre une légère efficacité, le diamètre de la culture ne dépassant pas 55 mm ;

4-la dose de 12 mg/litre de V4X montre une efficacité moyenne, la croissance n'atteignant que 30 mm après 12 jours de culture ;

5-le mangafort à raison de 12 mg par litre, inhibe totalement le développement mycélien du *Pythium tracheiphilum*.

En ce qui concerne les cultures du *Penicillium expansum*, les produits fongicides testés, à l'exception du captane et du SN41.703 aux doses de 3 mg/litre, inhibent totalement le développement de ce microorganisme ; en présence de captane et de SN41.703, le diamètre maximum atteint est de 35 mm après 12 jours de culture.

c) conclusion :

Nous voyons donc que les produits fongicides testés ont une action assez faible sur la croissance du *Pythium tracheiphilum*. Cependant, le retard dans la croissance mycélienne pourrait, peut être, dans les conditions naturelles d'infection, être utilisé ; en effet, l'application de ces produits permettraient aux jeunes plantules de se développer et de dépasser le seuil de forte sensibilité (stade cotylédonaire).

Le mangafort inhibe à la dose de 12 mg par litre le développement de l'agent pathogène, mais pour que cette efficacité soit totale, il faudrait que le produit soit systémique, ce qui à notre connaissance, n'est pas démontré.

2) Méthode des disques pour antibiogrammes :

a) procédure expérimentale :

Des disques pour antibiogramme, de papier Whatmann, de 6 mm de diamètre préalablement désinfectés par l'éther sont trempés dans une suspension du produit fongicide, à 0,1 % dans l'eau distillée stérile.



Quatre disques ainsi traités sont déposés à la surface du milieu gélosé préalablement réparti en boîtes de Pétri. Le milieu est ensemencé à l'aide d'un fragment de culture âgée de 10 jours, à distance sensiblement égale des disques.

Des boîtes témoins, ensemencées, reçoivent 4 disques désinfectés par l'éther et trempés dans l'eau distillée stérile.

Nous avons utilisé les produits suivants : le captane, le mangafort, le V4X, la frumine et le SN41.703.

Nous avons ensemencé 10 boîtes de chaque traitement.

b) résultats :

Les résultats sont fournis par les valeurs des diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque, après 6 et 10 jours d'incubation.

Dans le cas de milieux ensemencés avec *Penicillium expansum*, nous observons avec le captane, la frumine et le mangafort des zones d'inhibition de 25 à 35 mm, ce qui démontre que la diffusion du produit se fait autour du disque.

En ce qui concerne les cultures du *Pythium tracheiphilum* nous n'observons, avec le mangafort, le V4X, la frumine et le SN41.703, aucune zone d'inhibition, l'agent pathogène recouvrant toute la surface gélosée après 6 jours. Seul le captane entraîne une zone inhibitrice de 9 mm autour des disques Whatmann.

Il nous paraissait intéressant de vérifier une éventuelle action du captane testé à des valeurs de 0,2 - 0,5 et 1 % ; les zones d'inhibition observées sont, dans ces 3 cas, sensiblement égales à celles obtenues avec la dose de 0,1 %.

c) conclusion :

A l'exception d'une légère action du captane, les produits fongicides testés se sont avérés inefficaces contre le *P. tracheiphilum*. Certains d'entre eux, tels la frumine, le captane et le mangafort, présentent une efficacité vis-à-vis du *Penicillium expansum*.



| effet sur les plantes traitements | Plantules contaminées | | | Plantules témoins | |
|--------------------------------------|--|------------------------------|-----------------------------------|--|------------------------------|
| | Pourcentage de germination des graines | Aspect général des plantules | Pourcentage de plantules flétries | Pourcentage de germination des graines | Aspect général des plantules |
| Témoin | 100 | normal | 100 | 100 | normal |
| SN41.703 | 120g/q | coloration brune | 0 | 100 | coloration brune |
| | 200g/q | du feuillage | 0 | 100 | du feuillage |
| V4X | 120g/q | normal | 20 | 100 | normal |
| | 200g/q | normal | 25 | 100 | normal |
| Mangafort | 120g/q | normal | 72 | 100 | normal |
| | 200g/q | normal | 50 | 100 | normal |
| Frumine | 120g/q | normal | 60 | 100 | normal |
| | 200g/q | normal | 62 | 100 | normal |
| Captane | 120g/q | normal | 60 | 97 | normal |
| | 200g/q | normal | 75 | 82 | normal |
| Benlate | 120g/q | normal | 100 | 84 | normal |
| | 200g/q | normal | 100 | 77 | normal |

Tableau 24 : Action de quelques produits fongicides en enrobage de semences sur la faculté germinative des graines, et sur le développement du flétrissement.

3) Enrobage des semences ;

a) *procédure expérimentale* :

Les graines utilisées sont des graines de Laitues, cultivar "Aurélia de Clause". Ces graines sont d'abord désinfectées par une solution d'hypochlorite de calcium (40g/litre) pendant 10 minutes, puis rincées à l'eau distillée stérile et enfin séchées.

L'enrobage par les produits fongicides s'effectue de la façon suivante : chaque lot de graines est traité par le fongicide, par agitation dans un flacon bouché jusqu'à adhérence du produit aux téguments des semences. Les doses utilisées correspondent aux doses de 120 et 200 g de produit par quintal de semences. Les produits testés ont été les suivants : benlate, captane, V⁴X, SN⁴1.703, mangafort, frumine, tébuzate et TMD.

Ces graines, ainsi que des graines non enrobées (témoin) sont disposées dans des tubes à ergots, en culture hydroponique (conditions décrites pages 69 et 70).

Ces cultures sont contaminées au stade 4 feuilles (8 jours) par des suspensions de sporocystes, de zygotes et de fragments mycéliens. Des plantules témoins ne reçoivent pas l'inoculum.

Nous avons utilisé 20 plantules dans chaque traitement et effectué ces essais deux fois.

b) *résultats* :

Nous avons noté le pourcentage de plantules flétries en fonction des différents traitements, et observé les effets de l'enrobage sur le pourcentage de germination des graines, et sur l'aspect des plantules.

Les résultats figurent dans le tableau 24 ci-contre.

L'examen de ce tableau fait ressortir l'efficacité du SN⁴1.703 utilisé aux doses de 120 et 200 g par quintal ; la faculté germinative des graines demeure intacte tandis que les plantules contaminées ne présentent pas de flétrissement.

On note également une action du V⁴X, moins importante cependant que celle du SN⁴1.703, mais les pourcentage de plantes flétries

n'atteignent que 20 et 25 %, alors que les plantules contaminées, sans traitement, des graines flétrissent à 100 %.

Quant aux produits suivants : mangafort, frumine, captane, aux concentrations de 120 et 200 g/q, on remarque une efficacité très moyenne puisque 60 % des plantes sont flétries.

Par contre, le benlate en enrobage à 120 et 200 g/q diminue le pouvoir de germination des graines et se révèle inefficace contre le *P. tracheiphilum*

Le tébuzate et le TMTD ne figurent pas dans le tableau des résultats car leur phytotoxicité a très vite empêché le déroulement des contaminations ; en effet, les plantes étaient rabougries et étiolées, nous n'avons pu analyser les résultats obtenus.

Notons également qu'avec le SN41.703 aux doses utilisées le feuillage est tacheté de brun, ce qui pourrait traduire une phytotoxicité du produit.

Ces résultats ne sont que partiels car réalisés uniquement en culture *in vitro*. Il serait intéressant de vérifier le caractère systémique de ces produits par voie chimique ou biologique, avant de tester leur efficacité en champ.

QUATRIEME PARTIE

INTRODUCTION AUX CHAPITRES I ET II

A notre connaissance, peu de travaux font part d'observations histologiques concernant le *Pythium tracheiphilum* dans les racines de Laitues.

Seul MATTA (1965) remarque, dans les tissus de racines, le parasite sous forme d'hyphes mycéliens flexibles dans les vaisseaux du xylème et observe sa forme conidienne dans l'épiderme de la nervure de la feuille. Ces observations sont réalisées sur des racines et des plantes feuillées contaminées artificiellement.

Nous nous proposons donc dans cette quatrième partie de montrer la présence du Champignon dans les éléments du tissu conducteur de la racine, et de mettre en évidence par des réactions histologiques et cytochimiques quelques réponses des tissus atteints.

C H A P I T R E I

MISE EN EVIDENCE DE L'AGENT PATHOGENE DANS LES TISSUS
DE LA PLANTE - HOTE

Après avoir décrit les techniques utilisées, et l'anatomie d'une racine saine, nous exposerons les différents résultats fournis par les colorations.

I. TECHNIQUES.

Nous préciserons quelques aspects des techniques de fixation et de coloration; celles-ci font l'objet de descriptions détaillées dans les précis de microscopie et de mycologie de LANGERON (1949).

1) Prélèvement :

Nous avons prélevé des échantillons de racines de Laitues âgées de 20 jours environ, contaminées par voie naturelle ou artificielle, ainsi que des racines de Laitues saines.

2) Fixation :

Nous avons eu recours au mélange fixateur:formol neutralisé 40 %, alcool 50°, acide acétique dans les proportions respectives suivantes : 6,5 ml, 100 ml et 3,5 ml. Ce fixateur ou "fixateur de Westbrook" assure également la conservation du matériel.

3) Obtention des coupes :

Des coupes longitudinales et transversales à main levée ont été réalisées à partir des lots de racines saines et malades. Nous avons également eu recours à la technique du microtome à paraffine mais l'emploi de cette méthode nous a très vite posé des problèmes ; en effet, le calibre important des racines étudiées, ainsi que la dissociation des tissus nécrosés provoquent une mauvaise inclusion.

L'utilisation du microtome à congélation nous a fourni quelques coupes longitudinales, que nous avons colorées et observées.

4) Colorations :

Nous avons eu recours à différents types de coloration afin de mettre en évidence le Champignon dans les racines, ainsi que pour préciser les aspects anatomiques des racines saines et les modifications apportées par le parasite.

5) Observations :

Elles ont été effectuées au microscope LEITZ ORTHOLUX, équipé d'une chambre claire et d'un appareil automatique de microphotographie ORTHOMAT.

II. ANATOMIE DE LA RACINE SAINE

Une coupe transversale de racine (figure 9) montre de l'extérieur vers l'intérieur, la structure suivante :

- l'assise périphérique ou assise pilifère constituée par une rangée de cellules plus ou moins en lambeaux ;
- une couche de liège d'épaisseur variable formé de cellules mortes réduites à leur paroi constituée de subérine ; ces cellules ont des formes irrégulières et se colorent en vert sale par le mélange carmin aluné-vert d'iode ;
- un parenchyme cortical ;
- un endoderme difficile à observer.

L'ensemble de ces tissus constitue ce que l'on appelle l'écorce de la racine qui entoure le cylindre central (planche II, photo 2) ; celui-ci comporte :

- le phloème primaire représenté par quelques massifs de cellules plus ou moins écrasées ;
- le liber ou phloème secondaire, une couche assez épaisse dont les cellules sont identiques et régulièrement alignées selon les rayons. On y observe vers l'extérieur des laticifères en réseau, articulés, anastomosés ;
- l'assise génératrice libéro-ligneuse ou cambium ;
- le xylème secondaire ou bois comprenant les cellules du parenchyme et les vaisseaux dont la paroi imprégnée de lignine se colore en vert par le vert d'iode ; des files de cellules à parois cellulosiques colorées en rouge par le carmin aluné représentent les rayons ligneux ;
- le parenchyme médullaire qui occupe le centre de la coupe.

Il est à noter que nous n'observons plus de xylème primaire sur ces coupes.

III. MISE EN EVIDENCE DE L'AGENT PATHOGENE

1) Méthodes de colorations :

La recherche du parasite à l'intérieur des tissus de l'hôte s'effectue à l'aide de colorations plus ou moins spécifiques. Nous avons utilisé les colorations suivantes :

a) *bleu coton acétique* :

Le bleu coton C4B de POIRRIER en solution aqueuse 0,5 %, légèrement acétique colore en bleu les éléments fongiques, la paroi des vaisseaux restant incolore.

b) *bleu tryptan 0,1 % dans le lactophénol* :

Les hyphes mycéliens sont colorés en bleu. Les tissus de l'hôte demeurent incolores.

c) *bleu coton-safranine* :

Cette double coloration s'effectue de la manière suivante : les coupes sont passées 10 minutes dans une solution de bleu coton à 0,5 % dans le lactophénol ; elles sont ensuite lavées au lactophénol ou à l'alcool à 70° afin d'éliminer l'excès de bleu coton, puis contre-colorées pendant 10 minutes dans une solution de safranine à 1 % dans l'eau distillée. Après lavage à l'alcool à 70°, à 90°, puis déshydratation par l'alcool absolu, les coupes sont éclaircies au xylène, et enfin montées dans le

Baume du Canada. Le Champignon se colore en bleu, alors que les éléments ligneux se colorent en rouge.

d) *rouge Magdala - vert lumière (méthode de DICKSON) :*

Les coupes sont traitées pendant 15 minutes par le rouge de Magdala à 2 % dans l'alcool à 85°, lavées à l'alcool à 95° puis colorées 1 minute par le vert lumière à 2 % dans l'eugénol. Après déshydratation à l'alcool absolu, les coupes sont montées dans le Baume du Canada.

Les tissus de l'hôte apparaissent vert, le mycélium du Champignon, rouge. (Figures 10 et 11).

e) *brun bismarck - violet de méthyle :*

La coloration est la suivante : 1 à 2 minutes dans le brun Bismarck à 2 % dans l'alcool à 70°, lavage à l'eau distillée, coloration pendant 2 minutes dans le violet de méthyle en solution aqueuse saturée.

Les hyphes mycéliens se colorent en violet et les parois lignifiées en jaune à brun.

f) *thionine - vert lumière - orange G - érythrosine :*

Les coupes sont d'abord traitées pendant 1 heure par une solution aqueuse de phénol à 45 % contenant 0,1 % de thionine. Après rinçage à l'eau distillée, les coupes sont passées dans une solution de vert lumière à 0,5 % dans l'alcool à 95° jusqu'à coloration verte, rincées à l'eau distillée, à l'alcool 95° et dans deux bains successifs d'alcool absolu.

Les préparations sont colorées par le mélange orange G dans l'alcool absolu (1 part) - érythrosine à saturation dans eugénol (2 parts), éclaircies au xylol et montées au Baume.

La cutine et la paroi des spores se colorent en jaune, la cellulose en jaune rosé, le cytoplasme en rose, la lignine en vert, la lamelle moyenne en rouge, les hyphes et les spores du champignon en violet.

F I G U R E 1 0

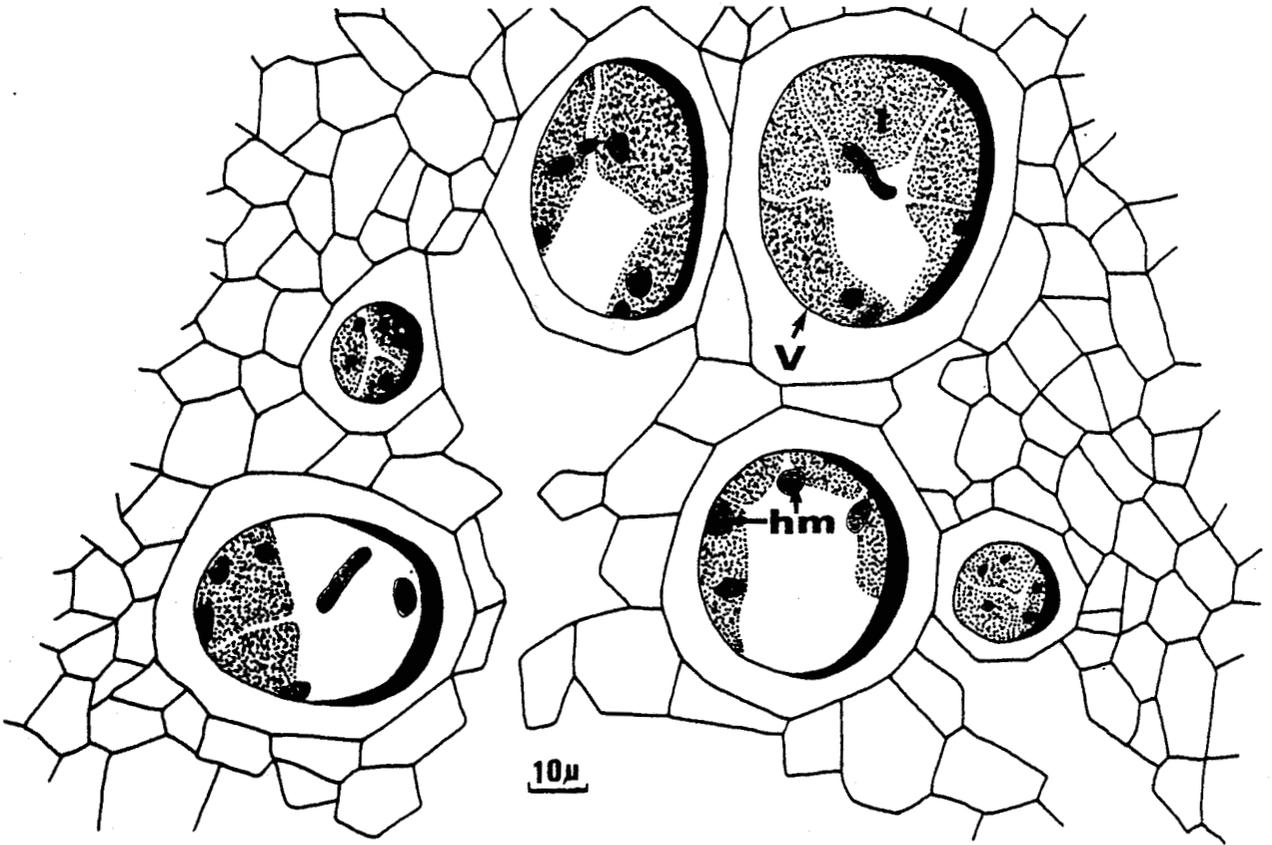
A - COUPE TRANSVERSALE DANS UNE RACINE DE LAITUE INFECTEE PAR LE
PYTHIUM TRACHEIPHILUM

hyphesmycéliens (hm) ; inuline (i) dans les vaisseaux (v),
désorganisation des cellules du parenchyme ligneux.
rouge de Magdala, vert lumière.

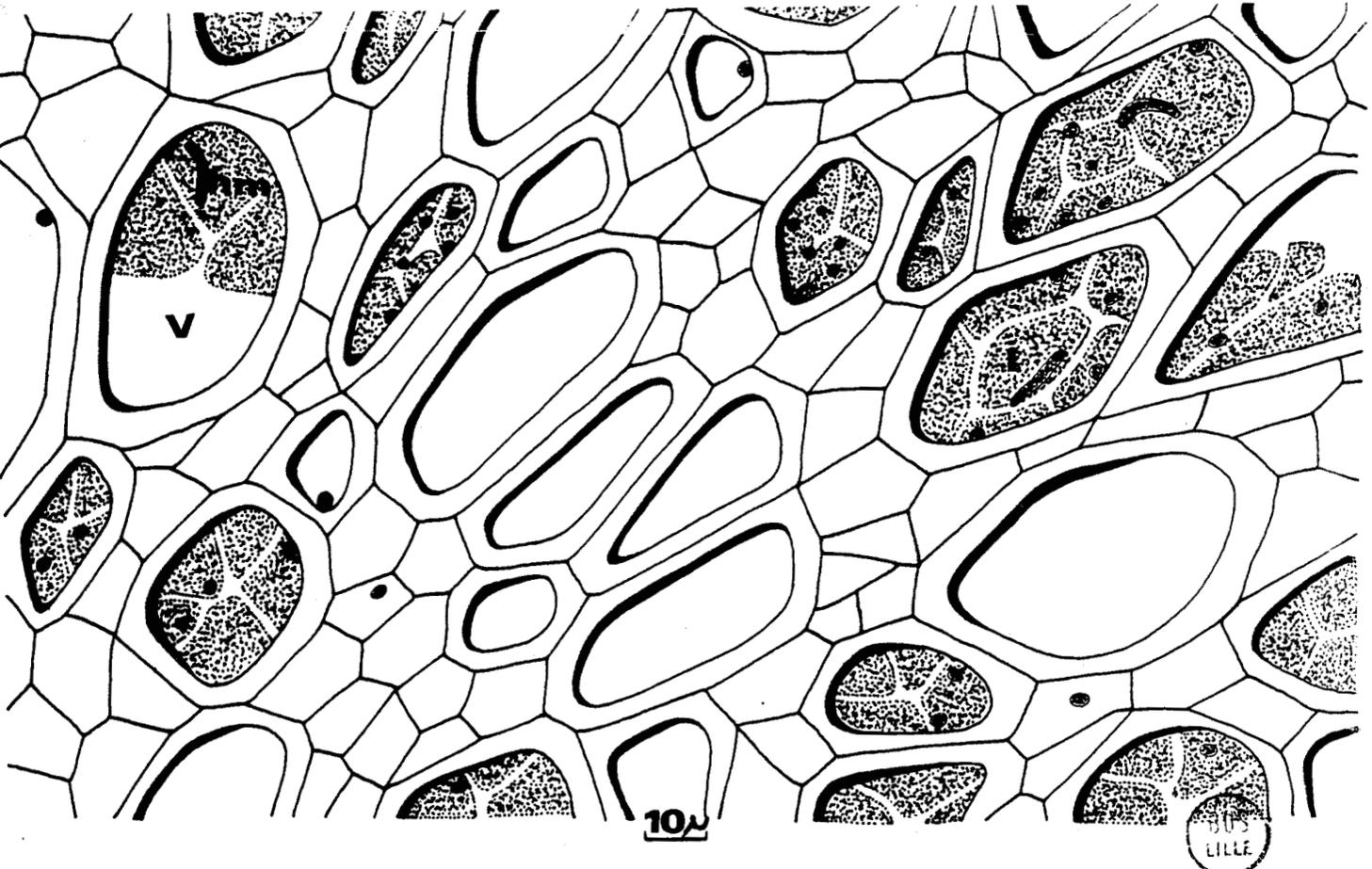
B - COUPE TRANSVERSALE DANS UNE RACINE DE LAITUE INFECTEE PAR LE
PYTHIUM TRACHEIPHILUM

rouge de Magdala, vert lumière.

**Hyphes mycéliens, inuline dans les vaisseaux
(Coupe transversale de racine infectée)**



**Hyphes mycéliens, inuline dans les vaisseaux
(Coupe transversale de racine infectée)**



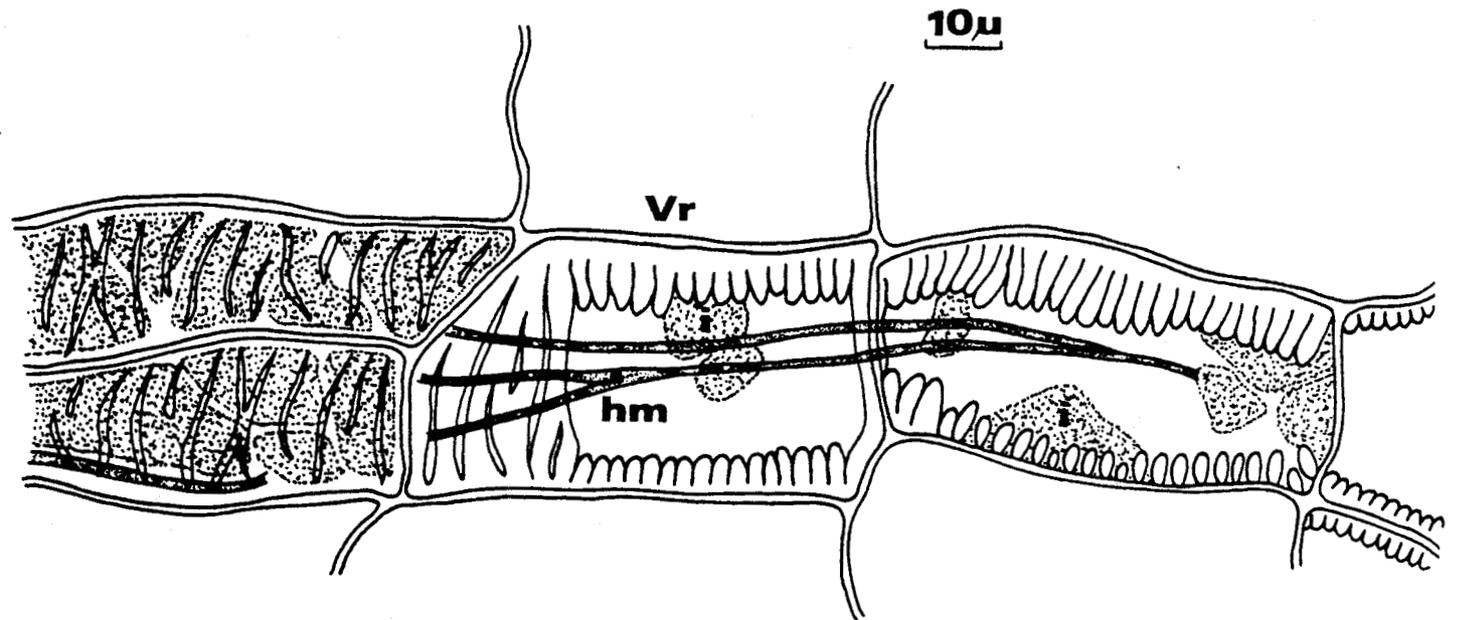
F I G U R E 1 1

A - COUPE LONGITUDINALE DANS UNE RACINE DE LAITUE INFECTEE PAR
LE *PYTHIUM TRACHEIPHILUM*

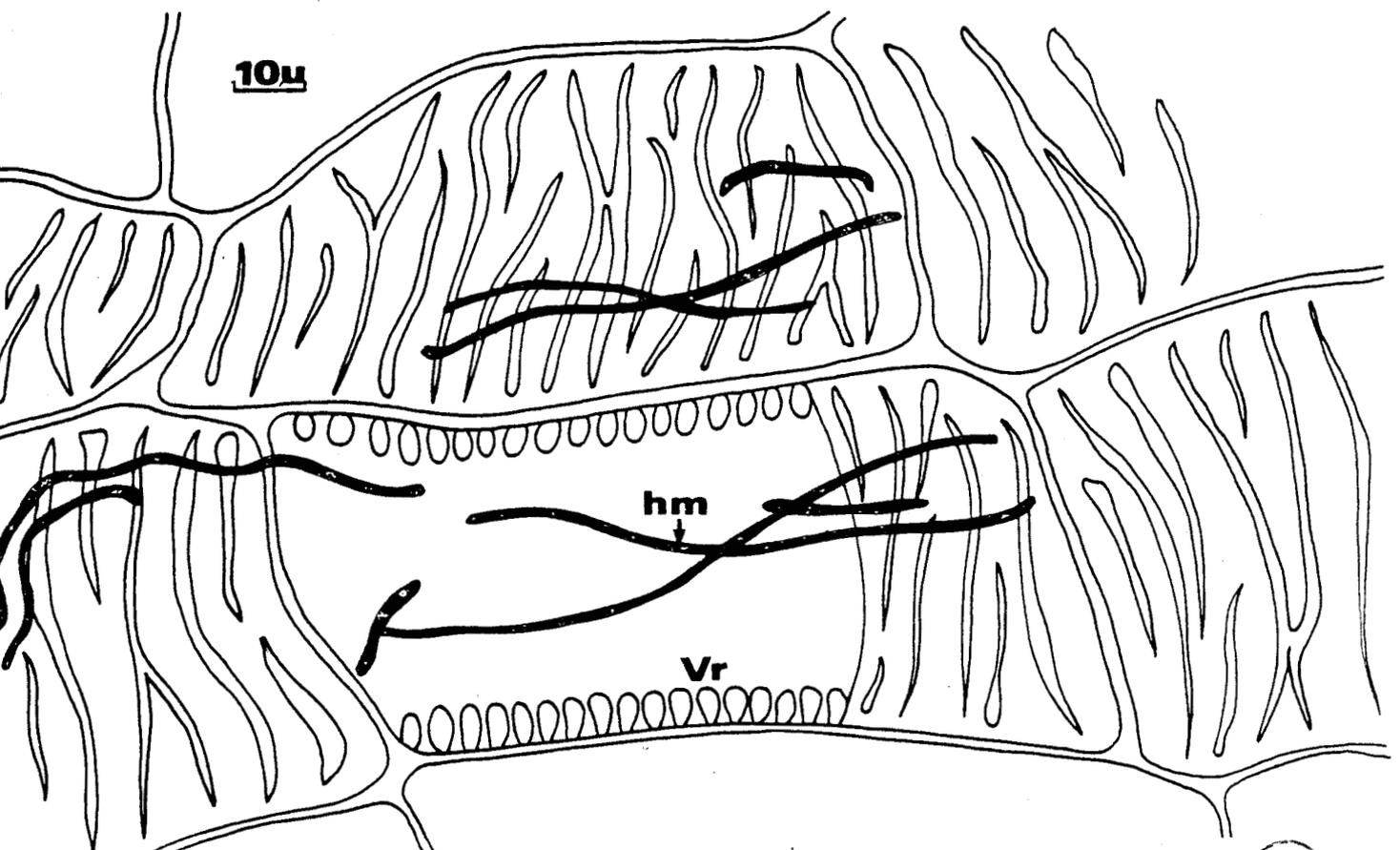
hyphes mycéliens (hm) ; inuline (i) dans les vaisseaux (vr)
rouge de Magdala, vert lumière.

B - COUPE LONGITUDINALE DANS UNE RACINE DE LAITUE INFECTEE PAR
LE *PYTHIUM TRACHEIPHILUM*

rouge de Magdala, vert lumière.



**Hyphes mycéliens, inuline dans les vaisseaux
(Coupe longitudinale de racine infectée)**



**Hyphes mycéliens dans les vaisseaux
(Coupe longitudinale de racine infectée)**

2) Résultats obtenus :

Les résultats des méthodes de coloration sont les suivants :

- a) les colorations au bleu coton acétique et au bleu lactique ont mis en évidence des hyphes mycéliens bleus dans les vaisseaux du bois, la paroi lignifiée des vaisseaux est jaune verdâtre (planche II, photo 1) ;
- b) la méthode bleu coton safranine colore en rougeâtre les éléments ligneux du xylème, le Champignon apparaît bleu violacé ;
- c) l'association rouge Magdala - vert lumière provoque une coloration rougeâtre du Champignon, les parois lignifiées apparaissent jaune rougeâtre, les parois cellulosiques vertes. Bien que le rouge de Magdala ne colore pas, de façon spécifique, les éléments fongiques, cette méthode met en évidence les zones infectées qui se colorent en rougeâtre (planche II, photos 3 et 4) ;
- d) la coloration brun Bismarck - violet de méthyle ne permet aucune différenciation entre les tissus de la racine et l'agent pathogène ; de plus elle détruit l'organisation des tissus de la racine ;
- e) la méthode thionine - vert lumière - orange G érythrosine nous a fourni les résultats suivants : le Champignon apparaît violet, la paroi lignifiée des vaisseaux verte et la paroi cellulosique rose.

Ces coupes permettent de préciser le détail des manifestations du parasite : celui-ci est présent dans les vaisseaux ligneux ; selon la gravité de l'attaque, les vaisseaux sont plus ou moins envahis par le mycélium qui se localise surtout dans les vaisseaux proches de l'assise génératrice libéro-ligneuse. En cas de forte attaque, le parenchyme médullaire est profondément désorganisé ; la cavité médullaire ainsi formée est colonisée par les hyphes du *Pythium tracheiphilum*.

Dans tous les cas, on observe une désorganisation au niveau des tissus malades et un brunissement intense de la zone des vaisseaux et des cellules parenchymateuses atteintes ; dans les vaisseaux du bois et dans les cellules du liber, on remarque la présence de substances dont la nature a été identifiée dans la suite de ce travail.

C H A P I T R E I I

MODIFICATIONS HISTOLOGIQUES CHEZ LA PLANTE-HOTE

Dans les racines des laitues atteintes par *Pythium tra-cheiphilum*, nous observons des modifications importantes des tissus :

- formation et accumulation de substances dans les vaisseaux des racines malades ;
- développement d'un anneau orangé-brunâtre au niveau des vaisseaux et du parenchyme ligneux.

Les travaux concernant les maladies vasculaires nous montrent que l'infection provoque souvent une réaction de gommose. Les substances obstruant les vaisseaux peuvent être des pectines, des gels, des gommes, des polysaccharides à haut poids moléculaire. PERESSE (1975) observe ce phénomène de gommose dans les racines et les tiges d'oeillet parasités par le *Phialophora cinerescens* (Wr) Van Beyma. Selon DIMOND et coll. (1949), de nombreux Champignons produisent des polysaccharides extracellulaires qui sont libérés dans les vaisseaux. Des gommes et des gels plus ou moins abondants selon les plantes atteintes envahissent les vaisseaux et le parenchyme ligneux (DIMOND, 1964).

I. IDENTIFICATION DES SUBSTANCES OBSTRUANT LES VAISSEAUX

Nous avons donc, dans un premier temps, utilisé les méthodes de détection des gommes dans les racines malades, afin de vérifier si

dans le cas particulier des racines de Laitues il pouvait s'agir de ces composés.

1) Méthodes de détection des gommés :

Nous avons remarqué précédemment que les substances obstruant les vaisseaux sont colorées en vert par le vert lumière, dans la méthode rouge Magdala - vert lumière. Ces substances sont mises en évidence par les méthodes suivantes :

a) *rouge de ruthénium* :

Les coupes, fixées à l'alcool, sont traitées pendant 30 minutes dans une solution aqueuse de rouge de ruthénium (JOHANSEN, 1940).

L'ensemble de la coupe se colore en rouge, seule la paroi des vaisseaux lignifiés n'est pas rouge. Les substances présentes dans les vaisseaux ne se colorent pas par cette méthode. Ce colorant souvent considéré comme spécifique des matières pectiques, met en évidence la présence de fonctions acide carboxylique que possèdent la plupart des substances pectiques et n'est de ce fait pas spécifique (CLOWES et JUNIPER, 1968).

b) *hématoxyline de Delafield* :

Cette méthode de coloration, spécifique des gommés, donne les résultats suivants : les parois lignifiées apparaissent brunâtres, le champignon se colore en violet, et les substances obstruant les vaisseaux ne sont pas colorées (planche III, photo 1).

c) *acide périodique Schiff* (A.P.S. JENSEN, 1962) :

Cette réaction permet de caractériser les polysaccharides, colorés en rouge par le réactif de Schiff.

- Principe : l'acide périodique, agent oxydant rompt les liaisons entre 2 carbones de certains groupes en faisant apparaître des aldéhydes, ces aldéhydes forment en présence de fuchsine basique décolorée par l'acide sulfureux (réactif de Schiff), un produit de condensation de couleur rouge.

Des coupes de racines saines et malades traitées par l'A.P.S. fournissent les résultats suivants :

- les parois lignifiées des vaisseaux non contaminés sont très peu colorées par l'A.P.S., par contre celles des vaisseaux infectés sont rouge vif ;
- la substance présente dans les vaisseaux prend une teinte rouge très intense ;
- la coloration est également importante au niveau de la cavité médullaire dans les cas de forte attaque (planche III, photo 2).

d) *test de soustraction des composés polysaccharidiques :*

Des tests de soustraction des composés polysaccharidiques ont été effectués avant la coloration à l'A.P.S., afin de vérifier la nature de ces composés. Après passage de quelques minutes dans une solution de soude, la coloration rouge, due à l'APS, au niveau des substances présentes dans les vaisseaux ne subsiste pas ; de même un passage de 12 heures dans une solution d'oxalate d'ammonium fait disparaître la coloration rouge.

e) *discussion et conclusion :*

Les différentes réactions cytochimiques que nous venons de décrire nous permettent de conclure que :

- les substances présentes dans les vaisseaux sont des substances de nature polysaccharidique : A.P.S. positif ;
- elles sont solubles dans l'eau, en effet le passage à l'eau de javel, la technique utilisée par l'utilisation du microtome à congélation, les tests de soustractions des composés polysaccharidiques les dissolvent ;
- ces substances ne sont cependant pas des gommes : la réaction "spécifique" est négative, de plus les gommes sont insolubles en milieu aqueux.

En outre, nous avons noté la présence de ces substances polysaccharidiques également dans le liber et sous forme d'amas dans le parenchyme cortical des racines malades ; leur présence est peu fréquente dans les racines saines.

Nous avons alors émis l'hypothèse que ces composés polysaccharidiques pouvaient être des cristaux d'inuline constituant des substances de réserve dans les racines de nombreuses Composées. Cette hypothèse a été vérifiée par différentes méthodes.

2) Caractérisation de l'inuline :

Cette substance est soluble dans l'eau.

Elle précipite sous forme de sphérocristaux en présence d'alcool : après passage dans le fixateur de Westbrook, on observe en coupe longitudinale et transversale des cristaux.

Vus entre nicols croisés, ces cristaux sont biréfringents et traversés par une croix noire (ligne neutre). Nous avons en outre effectué les réactions cytochimiques suivantes :

a) réaction de Molisch :

Les coupes sont placées dans une solution alcoolique d' α naphтол à 10 % sur la lame porte-objet ; nous ajoutons une goutte d'acide sulfurique concentré ; nous recouvrons la coupe d'une lamelle et chauffons légèrement. L'inuline présente dans les vaisseaux du bois, dans les cellules du liber, dans la cavité centrale de la moëlle se colore en violet foncé (planche III, photo 3).

Cette réaction caractéristique s'interprète ainsi : sous l'action de l'acide sulfurique concentré, l'inuline se transforme en dérivés du furfural ; la dégradation se poursuit et conduit à des aldéhydes inférieurs. Ces dérivés se condensent avec les phénols (α naphтол dans ce cas) et donnent des produits colorés caractéristiques des oses.

b) solution iodo-iodurée :

En présence d'iode, ces cristaux ne donnent aucune coloration.

c) réaction de Green (modification de la réaction de Sélivanoff) :

Les coupes sont traitées par une solution alcoolique d'orcinol puis chauffées dans l'acide chlorhydrique. La présence d'inuline est mise en évidence par une coloration rouge orangé.

Le mécanisme de la réaction est le suivant : en présence d'acide chlorhydrique, il se forme aux dépens du fructose, du 4-hydroxyméthylfurfural qui se condense avec l'orcinol en donnant un produit coloré.

d) réaction à la liqueur de Fehling :

Les oses réducteurs par leur fonction pseudoaldéhydiques ou pseudocétoniques donnent à chaud un précipité rouge brique d'oxyde cuivreux Cu_2O en présence de la solution alcaline d'hydroxyde cuivrique $\text{CuO H}_2\text{O}$. L'inuline ne réduit pas la liqueur de Fehling.

e) conclusion et discussion :

Ces réactions caractéristiques de l'inuline sont toutes positives. Cette substance est un composé dont la présence est normale dans les racines de Laitue. Les cristaux d'inuline deviennent beaucoup plus abondants après l'infection et se localisent principalement dans les éléments conducteurs : vaisseaux du bois, éléments du liber, ainsi que dans la cavité médullaire alors que pour les tubercules de dahlia et de topinambour, l'accumulation se fait dans le parenchyme ligneux ; dans ces végétaux l'hydrolyse de l'inuline conduisant au D-fructose et à une petite proportion de D-glucose se fait par une enzyme l'inulase.

Des questions se posent : pourquoi y-a-t-il accumulation d'inuline dans les éléments conducteurs des tissus malades ?

L'inuline n'est-elle plus transformée par l'inulase ?

Le Champignon agirait-il sur le système enzymatique de la plante ?

II. MISE EN EVIDENCE DE COMPOSES PHENOLIQUES

La présence du Champignon dans les tissus de la plante se manifeste également par une accumulation de substances brunes dans les cellules du parenchyme ligneux autour des vaisseaux envahis. Il en résulte que les parois lignifiées des vaisseaux atteints présentent une couleur différente de celle des vaisseaux sains.

Ce brunissement des vaisseaux et du parenchyme ligneux s'observe souvent dans les trachéomycoses et des hypothèses ont été formulées afin d'expliquer l'origine de ce phénomène.

Selon BERG (1964), la coloration des vaisseaux de tomates infectés par le *Verticillium* serait due à des dérivés phénoliques oxydés et polymérisés. De même DAVIS et coll. (1953) attribuent ce brunissement à l'oxydation et à la polymérisation des di-hydroxyphénols ; des pigments mélanoides se formeraient en raison de l'augmentation des substances phénoliques et de l'activité oxydative. Nous avons effectué des réactions plus ou moins spécifiques des composés phénoliques sur les racines saines et sur les racines malades.

1) Réaction au bichromate de potassium à 1 % dans l'eau distillée :

Cette réaction caractérise les tannins. Elle n'est pas spécifique; les polyphénols, les aminophénols, les polyamines, en position ortho ou para, répondent à ce test. Nous observons au niveau du cambium et des vaisseaux ligneux et libériens, une coloration jaune brunâtre à brun rouge, aussi bien avec les plantes saines qu'avec les plantes malades.

2) Bichromate et iodate de potassium alcalin en solution neutre (LISON 1960) :

Nous avons utilisé les réactifs suivants :

| | MULLER | REGAUD | LISON |
|-------------------------|--------|--------|-------|
| Bichromate de potassium | 2,5 g | 2,5 g | |
| Sulfate de sodium | 1 g | | |
| Iodate de potassium | | | 5 g |
| Formol | 10 ml | 20 ml | 10 ml |
| Eau distillée | 90 ml | 80 ml | 90 ml |

Résultats : les coupes saines présentent une coloration jaune clair, les racines malades par contre montrent une coloration jaune brunâtre à orangé au niveau des vaisseaux atteints et de l'assise génératrice libéro-ligneuse. Ce test est donc positif chez les plantes malades, ce qui permet de penser que la présence de composés phénoliques est bien une réaction pathologique de l'hôte

3) Réaction avec le perchlorure de fer :

Le perchlorure de fer à 10 % dans l'eau distillée donne une coloration vert-bleu avec les O-diphénols.

Les coupes malades traitées au perchlorure présentent une coloration brune plus accentuée qu'avec les coupes témoins saines, ce qui laisse supposer que les tissus des racines infectées contiendraient des alcaloïdes phénoliques en plus grande quantité que les tissus sains.

4) Discussion et conclusion :

Il paraît vraisemblable que le brunissement de la zone proche des vaisseaux infectés soit dû à l'oxydation de certains polyphénols. Cette oxydation pourrait être déclenchée soit à la suite d'une modification de l'équilibre acido-basique dans les cellules provoquée par la présence du parasite, soit par l'action des enzymes oxydatives produites par le parasite.

Dans le cadre de recherches futures, il conviendrait d'étudier qualitativement et surtout quantitativement l'action du Champignon sur la dégradation des parois lignifiées des vaisseaux, afin de mieux comprendre les modifications histologiques traduites par des réactions différentes en présence de ce parasite.

III. ACTION DU *PYTHIUM TRACHEIPHILUM* SUR LA DEGRADATION DES PAROIS LIGNIFIEES DES VAISSEAUX

L'aspect du bois, sa composition chimique sont affectés par le *Pythium tracheiphilum* dont l'activité, sans doute enzymatique, s'exerce sur les composants des parois.

Nous avons étudié qualitativement l'action de l'agent pathogène sur la lignification et la dégradation de la lignine dans les vaisseaux.

1) Méthode des colorations :a) *coloration des complexes lignifiants* :

Nous avons effectué les colorations suivantes sur les racines saines et sur les racines malades.

- réaction de Maïle (JOHANSEN, 1940) : les coupes sont traitées par une solution aqueuse à 1 % de permanganate de potassium, puis lavées à l'eau distillée ; elles sont ensuite immergées dans l'acide chlorhydrique à 25 % jusqu'à décoloration complète des tissus, puis soumises à l'ammoniaque.

Les composants ligneux des vaisseaux se colorent en rouge orangé, alors qu'ils sont brunâtres dans le cas de vaisseaux infectés.

- phloroglucine (JOHANSEN, 1940) : les coupes sont passées dans le phloroglucinol à 1 % dans l'alcool 95° pendant 5 minutes et montées dans le phloroglucinol additionné de quelques gouttes d'HCl. La paroi des vaisseaux sains est colorée en rouge cerise alors que celle des vaisseaux infectés est orange.

- fast green FCF : les coupes sont colorées pendant 30 minutes par une solution aqueuse de Fast green à 0,1 %. Les vaisseaux attaqués présentent des colorations vert-brun plus pâles que celles observées sur les vaisseaux sains.

- rouge de méthyle (JOHANSEN, 1940) : à une solution aqueuse à 0,01 % de rouge de méthyl, on ajoute de la soude afin de la rendre jaune. Traités par cette solution en présence d'HCl concentré, les tissus lignifiés des racines saines prennent une teinte rouge, les tissus malades se colorent en brun orangé.

b) composés pectiques :

Le rouge de ruthénium colore en rouge la membrane des vaisseaux sains et du parenchyme ligneux, les vaisseaux les plus attaqués prennent une coloration jaune orangé.

c) conclusion et discussion :

Des réactifs moins spécifiques, ainsi que le réactif de Maïle font apparaître des différences nettes d'intensité de coloration des vaisseaux attaqués ou non. Ces différences laissent supposer que le parasite agit sur la lignine, et peut être aussi sur les composants pectiques de la membrane.

De façon générale, les colorations plus claires traduisent un déficit en lignine des vaisseaux infectés, résultant soit de sa destruction par le parasite, soit de l'absence de synthèse par l'hôte.

2) Microscopie de fluorescence :

L'examen de la fluorescence naturelle ou celle induite par les fluorochromes a été faite au microscope Reichert à fluorescence, équipé d'une lampe à mercure avec filtre d'excitation BG 12/2 mm.

fluorescence induite ou secondaire :

Nous avons utilisé le "calcofluor white ST", fluorochrome, colorant vital, à la concentration de 0,0025 % dans le milieu de culture, pour la mise en évidence de la cellulose et des hémicelluloses ; nous avons observé une fluorescence bleue très intense au niveau du parenchyme cortical, du liber, de l'assise génératrice libéro-ligneuse et du contenu de certains vaisseaux du bois, lorsque la coupe est éclairée par une lumière ultra-violette à 350 nm.

Nous avons eu recours au bleu d'aniline en solution basique pour la recherche de la callose et nous avons observé une fluorescence localisée au niveau des vaisseaux du bois.

Les résultats fournis par la microscopie de fluorescence ne nous ont pas permis d'observer de différences dans la composition des parois au niveau des coupes, entre les racines saines et les racines envahies par le Champignon.

CONCLUSION

Les observations histologiques nous ont montré que le parasite est présent dans les vaisseaux du bois des racines malades sous forme d'hyphes mycéliens.

Nous avons mis en évidence la présence de composés phénoliques au niveau des cellules du parenchyme ligneux, au niveau des cellules de l'assise génératrice libéro-ligneuse.

La présence du Champignon dans les tissus de l'hôte s'accompagne de l'accumulation d'inuline dans les éléments conducteurs, tissus du liber et vaisseaux du bois.

Dans les cas de forte attaque, on observe la destruction et la désorganisation des tissus du parenchyme médullaire et on note l'accumulation d'inuline dans la cavité médullaire ainsi formée.

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

Pour comprendre les causes et l'évolution de la maladie du flétrissement de la Laitue due au *Pythium tracheiphilum*, nous avons entrepris une double expérimentation.

La première au laboratoire, pour isoler l'agent et, par sa culture *in vitro*, étudier l'ensemble des facteurs nutritionnels et physiques qui favorisent son développement.

La seconde, conduite en plein champ, était destinée à analyser les causes de l'infection puis l'évolution de la maladie sous des conditions naturelles.

Dans un premier temps, il a été établi que le *Pythium tracheiphilum* croît et se multiplie abondamment en présence de glucose, de fructose, de maltose, tandis que le ribose et le raffinose, bien que favorables à la formation des sporocystes, ne permettent qu'une croissance limitée. La reproduction sexuée aboutissant à la formation des zygotes se produit quelle que soit la nature des glucides utilisés mais est plus sensible à leur dose. Elle ne se produit que pour des taux de carbone compris entre 2,8 et 6 g par litre, tandis que la croissance et la formation des sporocystes sont encore actives entre 2 et 8 g par litre.

De la même manière, la croissance, la multiplication végétative et la reproduction sexuée de *Pythium tracheiphilum* sont dépendantes de la nature de l'aliment azoté.

A la dose de 150 mg par litre, l'azote du nitrate de potassium, de l'alanine, de l'asparagine convient très bien pour ces trois étapes essentielles du développement, alors qu'à la même dose, la leucine inhibe la formation des organes sexués.

Au cours d'expériences portant sur les effets des différentes doses d'azote, nous avons remarqué que cet organisme exige pour former ses zygotes des quantités d'azote plus élevées que pour croître et former ses sporocystes.

Il en résulte que les rapports carbone/azote compris entre 17 et 34 permettent une bonne formation des zygotes. Au-delà de ces valeurs, on peut avoir croissance et même une abondante formation de sporocystes alors que les zygotes ne se forment plus.

Comme pour de nombreuses autres Pythiacées, l'apport de stérol exogène est indispensable lors de la formation des oocystes et des spermatocystes ; ceux-ci sont produits sur des milieux à base de farine d'avoine non filtrée et sur milieux synthétiques complétés par des stérols. Nous avons montré que le cholestérol, le β -sitostérol, le 7-déhydrocholestérol, le palmitate de cholestérol induisent la reproduction sexuée du *Pythium tracheiphilum* ; par contre l'ergostérol est inefficace. Nous avons mis en évidence l'influence de composés de nature vraisemblablement stérolique présents dans les tissus de Laitue, sur la formation des zygotes du Champignon.

En ce qui concerne les facteurs physiques, des températures comprises entre 10 et 18°C favorisent à la fois la croissance, la multiplication et la reproduction sexuée. *Pythium tracheiphilum* fait partie des photoindifférents pour lesquels la lumière n'exerce aucun effet sur la reproduction sexuée.

Nous avons ensuite porté une attention particulière à la germination des sporocystes et des zygotes étant donné le rôle qu'ils peuvent jouer dans le déclenchement du processus infectieux.

La germination des sporocystes a lieu très aisément sur les différents milieux de culture par émission de 1 à 5 tubes mycéliens par sporocyste. Mais curieusement, nous n'avons jamais observé dans nos cultures les planoconidies décrites par MATTA à partir de racines de Laitues.

Des températures comprises entre 18°C et 24°C, des pH entre 5,5 et 7,5, un préséjour dans l'eau de 36 heures sont des conditions optimales pour la germination des sporocystes.

Enfin, le pouvoir germinatif des sporocystes est considérablement réduit si ceux-ci proviennent de cultures âgées de plus de 4 mois. Ces résultats conduisent donc à penser que le rôle des sporocystes est faible dans la conservation de la maladie d'une année à l'autre, tandis qu'ils auraient la possibilité de jouer un rôle important au cours des semis répétés sur un même champ, la même année.

Le rôle primordial des zygotes dans la conservation de la maladie d'une année à l'autre méritait une étude approfondie des facteurs déclenchant leur germination. Ceux produits par le *Pythium tracheiphilum* n'échappent pas au phénomène de dormance décrit par de nombreux auteurs. Pour obtenir la levée de cette dormance, nous avons appliqué les procédés classiques décrits notamment par SUSSMANN (1965), et utilisé de multiples conditions de milieux, de températures. Malgré nos efforts, aucun résultat positif n'a été obtenu sur ce point, perdant ainsi la possibilité de comprendre les conditions de germination de ces spores dans le sol.

Au cours de nos essais en plein champ, par la mise au point d'une méthode expérimentale précédemment testée avec succès sur des cultures axéniques de Laitues, nous avons pu reproduire les symptômes de la maladie et cerner les principaux facteurs de son évolution.

Ainsi, il apparaît que la plante est très sensible durant les jeunes stades de son développement mais la fonte de semis qui en

résulte passe inaperçue au sein d'une population considérable de jeunes Laitues dont la plupart seront éliminées au cours des opérations de sarclage. La forte humidité du sol, qu'elle résulte de pluies orageuses d'été ou d'arrosages excessifs, est le facteur primordial de la réussite de l'infestation.

Pour des contaminations plus tardives, vers le 28ème jour, ou dans des conditions moins favorables au développement de la maladie, le *P. tracheiphilum* s'installe dans les vaisseaux du bois comme nous le démontrons au cours de la dernière partie, et y détermine une trachéomyose plus ou moins grave. Le flétrissement de la Laitue, survenant 3 ou 4 jours avant la récolte, marque l'achèvement du processus d'obstruction des vaisseaux conducteurs.

Si l'obturation n'est pas complète, la maladie passe inaperçue, mais les racines atteintes présentent des nécroses des zones conductrices. Les zygotes qui s'y formeront maintiendront la maladie pour les années futures.

Enfin, quelle que soit la nature de l'inoculum dans le sol, siphons mycéliens, sporocystes ou zygotes, la décontamination des terres par le bromure de méthyl permet d'obtenir une culture de Laitue aux racines remarquablement saines. L'application de produits actifs contre les *Pythium* mais moins onéreux que le fongicide essayé ci-dessus devrait permettre de réduire le potentiel infectieux des sols.

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

- ADAMS P.B., 1971. - *Pythium ophanidermatum* oospore germination as affected by time, temperature and pH. *Phytopath. (abstract)*, 61 : 1149-1150.
- AGNIHOTRI V.P. et O. VAARTAJA, 1967. - Effects of amendments soil moisture contents and temperature on germination of *Pythium sporangia* under the influence of soil mycostasis. *Phytopath.*, 57 (10) : 1116-1120.
- AL HASSAN K.K. et C.L. FERGUS, 1973. - The effects of nutrients and environment on germination and longevity of oospores of *Pythium hydnosporum*. *Mycopath. mycol. appl.*, 51 (4) : 283-297.
- ALLARD C., 1970. - Recherches sur la biologie du mildiou du pois. *Ann. Phytopath.*, 2 (1) : 87-115.
- ASHOUR W.E., 1954. - Pectinase production by *Botrytis cinerea* and *Pythium de baryanum*. *Trans. brit. mycol. soc.*, 343-352.
- AYERS W.A. et R.D. LUMSDEN, 1975. - Factors affecting production and germination of oospores of three *Pythium* species. *Phytopath.*, 65 (10) : 1094-1100.
- BAINBRIDGE A., 1970. - Sporulation by *Pythium ultimum* at various soil moisture tensions. *Trans. brit. mycol. Soc.*, 55 (3) : 485.
- BANIHASHEMI Z., 1970. - A new technique for isolation of *Phytophthora* and *Pythium* species from soil. *Plant dis. Repr.*, 54 (3) : 261-262.
- BARKSDALE A.W., 1962. - Effect of nutritional deficiency on growth and sexual reproduction of *Achlya ambisexualis*. *Amer. J. Bot.*, 49 : 633-638.
- BARTON R., 1957. - Germination of oospores of *Pythium mamillatum* in response to excudates from livings seedlings. *Nature*, 180 : 613-614.

- BARTON R., 1958. - Occurrence and establishment of *Pythium* in soil. *Trans. brit. mycol. soc.*, 41 : 207-222.
- BARTON R., 1960. - Saprophytic activity of *Pythium mamillatum* in soils. I. Influence of substrate composition and soil environments. *Trans. brit. mycol. soc.*, 43 : 529-540.
- BIRAGHI A., 1940. - Un marciume della lattuga prodotto da "*Pythium*". *Boll. Staz. Stat. oeg. Roma*, 20 : 119-124.
- BLACKWELL E.M. et G.M. WATERHOUSE, 1943. - Spores and spore germination in the genus *Phytophthora*. *Trans. brit. mycol. soc.*, 294-310.
- BOUHOT D., 1975. - Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. VI. Quantification de la technique d'estimation du pouvoir infectieux dans les sols, terreaux et substrats infestés par *Pythium* sp. *Ann. Phytopath.*, 47 (2) : 147-154.
- BURR T.J. et M.E. STANGHELLINI, 1973. - Propagule nature and density of *Pythium aphanidermatum* in field soil. *Phytopath.*, 63 (12) : 1499-1501.
- CALDERONE R.A., 1968. - The utilization of D- and L-forms of leucine and aspartic acid by species of *Pythium* and *Phytophthora*. *West. Virginia Acad. of Science*, 55-60.
- CHILD J.J., G. DEFAGO et R.H. HASKINS, 1969. - The influence of carbon and nitrogen nutrition on growth and sterol induced sexuality of *Pythium* sp. PRL 2142. *Mycologia*, 61 : 1096-1105.
- CHILD J.J., G. DEFAGO et R.H. HASKINS, 1969. - The effect of cholesterol and polyene antibiotics on the permeability of the protoplasmic membrane of *Pythium* sp. PRL 2142. *Can. J. Microbiol.*, 15 : 599-603.
- CHILD J.J. et R.H. HASKINS, 1971. - Induction of sexuality in heterothallic *Pythium* sp. by cholesterol. *Can. J. Bot.*, 49 : 329-332.
- DEFAGO G., K.F. MENNEN et H. KERN, 1975. - Influence du cholestérol et des saponines sur le pouvoir pathogène du *Pythium parocandrum*. *Phytopath. Z.*, 83 : 167-184.
- DICK M.W., 1969. - Morphology and taxonomy of the oomycetes with special reference to *Saprolegniaceae*, *Leptomitaceae* and *Pythiaceae*. I. Sexual reproduction. *New phytol.*, 68 : 751-775.
- DIMOND A.E., 1972. - The origin of symptoms of vascular wilt diseases. In : "Phytotoxins in plant diseases". WOOD R.K.S., A. BALIO, A. GRANITTI (eds). 289-306, London, Academic Press.
- DRECHSLER C., 1952. - Production of zoospores from germinating oospores of *Pythium ultimum* and *Pythium de baryanum*. *Bull. Torrey botan. club*, 79 (6) : 431-450.
- ECKERT J.W. et P.H. TSAO, 1962. - A selective antibiotic medium for isolation of *Phytophthora* and *Pythium* from plant parts. *Phytopath.*, 52 : 771-777.
- ELLIOTT C.G., M.E. HENDRIE, B.A. KNIGHTS et W. PARKER, 1964. - A steroid growth factor required in a fungus. *Nature*, 203 : 427-428.

- ELLIOTT C.G., 1972. - Sterols and production of oospores by *Phytophthora cactorum*. *J. gen. Microbiol.*, 72 : 321-327.
- ERWIN D.C. et M. KATZNELSON, 1961. - Studies on the nutrition of *Phytophthora cryptogea*. *Can. J. Microbiol.*, 7 : 15-25.
- ERWIN D.C. et W.H. Mc CORMICK, 1971. - Germination of oospores produced by *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Mycologia*, 63 : 972-977.
- ESCHRICH W. et H.B. CURRIER, 1964. - Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. *Stain Technol. USA*, 39 : 303-307.
- FLOWERS R.A. et R.H. LITTRELL, 1972. - Oospore germination of *Pythium aphanidermatum* as affected by casein, gallic acid and pH levels in a selective agar medium. *Phytopath. (abstracts)*, 62 : 757.
- GARIBALDI A., 1969. - Osservazioni preliminari sulla resistenza cultivariale della lattuga al *Pythium tracheiphilum* Matta. C.R. 1er Cong. *Phytopath. mediterran.*, Avignon-Antibes, 193-196.
- GOMEZ-MIRANDA B. et J.A. LEAL, 1965. - Influencia del esteroles y fuente de nitrogeno en la reproduccion asexual de *Phytophthora* y *Pythium*. *Microbiol. Esp.*, 18 : 235-245.
- GOTTLIEB D., 1950. - The physiology of spore germination in fungi. *Bot. rev.*, 16 (5) : 229-257.
- HANLIN R.J., 1961. - Studies on the genus *Nectria*. I. Factors influencing perithecial formation in culture. *Bull. Torrey bot. club*, 88 (2) : 95-103.
- HARNISH W.N., 1965. - Effect of light on production of oospores and sporangia in species of *Phytophthora*. *Mycologia*, 57 : 85-90.
- HASKINS R.H., 1963. - Morphology, nutrition and host range of a species of *Pythium*. *Can. J. Microbiol.*, 9 : 451-457.
- HASKINS R.H., A.P. TULLOCH et R.G. MICETICH, 1964. - Steroids and the stimulation of sexual reproduction of a species of *Pythium*. *Can. J. Microbiol.*, 10 : 187-195.
- HASKINS R.H., 1965. - Sterol and temperature tolerance in fungus *Pythium*. *Science*, 150 : 1615-1616.
- HENDRIX J.W., 1964. - Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. *Science*, 144 : 1028-1029.
- HENDRIX J.W., 1965. - Influence of sterols on growth and reproduction of *Pythium* and *Phytophthora* spp. *Phytopath.*, 55 : 790-797.
- HENDRIX J.W., 1967. - Light-cholesterol relationship in morphogenesis of *Phytophthora palmivora* and *P. capsici* sporangia. *Mycologia*, 59 : 1107-1111.
- HENDRIX J.W., 1970. - Sterols in growth and reproduction of fungi. *Ann. Rev. Phytopath.*, 8 : 111-170.

- HENDRIX J.W., R.D. BENNETT et E. HEFTMANN, 1970. - Metabolism of cholesterol by *Pythium periplocum*. *Microbios*, 5 : 11-15.
- HENDRIX J.W., 1975. - Differential uptake and metabolism of sitosterol and cholesterol by *Achlya*, *Pythium* and *Phytophthora* species. *Can. J. Microbiol.*, 21 (6) : 735.
- HENDRIX J.W. et J.L. APPLE, 1964. - Fats and fatty acid derivatives as growth stimulated and carbon sources for *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopath.*, 54 : 987-994.
- HENDRIX F.F. et W.A. CAMPBELL, 1973. - *Pythiums* as plant pathogens, 77-98. (communication personnelle).
- HENRY A.W. et D. STELFOX, 1968. - Comparative behavior of the oospores and oogonia of *Phytophthora citricola* during germination on an artificial medium. *Can. J. Bot.*, 46 : 1419-1420.
- HO H.H., 1969. - Notes on the behavior of *Phytophthora megasperma* var. *sojiae* in soil. *Mycologia*, 61 : 835-838.
- HOPPE P.E., 1966. - *Pythium* species still viable after 12 years in dried muck soil. *Phytopath. (abstracts)*, 56 : 1411.
- HUGUENIN B. et B. BOCCAS, 1971. - Rôle de quelques facteurs dans la formation et la germination des oospores chez le *Phytophthora palmivora* Butl. *Ann. Phytopath.*, 3 : 353-371.
- KOFFI DONGO, 1971. - Etude des interactions entre le *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. et ses plantes hôte. *Thèse 3ème Cycle Sci., Orsay*, 85 p.
- KRAFT J.M. et D.C. ERWIN, 1967. - Stimulation of *Pythium aphanidermatum* by exudates from mung bean seeds. *Phytopath.*, 57 (8) : 866-868.
- KRAFT J.M. et D.C. ERWIN, 1968. - Effects of inoculum substrate and density on the virulence of *Pythium aphanidermatum* to mung bean seedlings. *Phytopath.*, 58 (10) : 1427-1428.
- LANGERON M., 1949. - Précis de microscopie. 7ème édition. *Masson et Cie, Paris*.
- LEAL J.A., 1964. - Sobre la fisiología de la reproducción sexual de los generos *Phytophthora* y *Pythium*. *Microbiol. espan.*, 17 : 63-64.
- LEAL J.A., J. FRIEND et J.P. HOLLIDAY, 1964. - A factor controlling sexual reproduction in *Phytophthora*. *Nature*, 203 : 545-546.
- LEAL J.A. et B. GOMEZ-MIRANDA, 1965. - The effect of light and dark ness on the germination of the oospores of certain species of *Phytophthora* on some synthetic media. *Trans. brit. mycol. soc.*, 48 : 491-494.
- LEAL J.A. et B. GOMEZ-MIRANDA, 1967. - Effects of amino-acids and organic acids on the sexual reproduction species of *Phytophthora* and *Pythium*. *Trans. brit. mycol. soc.*, 50 : 77-84.

- LEAL J.A., M.E. GALLEGLY et V.G. LILLY, 1967. - The relation of the carbon-nitrogen ratio in the basal medium to sexual reproduction in species of *Phytophthora*. *Mycologia*, 59 : 953-964.
- LEAL J.A., M.E. GALLEGLY et V.G. LILLY, 1971. - The value of 21 amino-acids as nitrogen sources for *Phytophthora cactorum* and *P. hevea*. *Can. J. Microbiol.*, 17 : 1319-1325.
- LENNEY J.F. et H.W. KLEMMER, 1966. - Factors controlling sexual reproduction and growth in *Pythium graminicola*. *Nature*, 109 : 1365-1366.
- LUMSDEN R.D., W.A. AYERS et R.L. DOW, 1975. - Differential isolation of *Pythium* species from soil by means of selective media, temperature and pH. *Can. J. Microbiol.*, 21 : 606-612.
- LUMSDEN R.D. et W.A. AYERS, 1975. - Influence of soil environment on the germinability of constitutively dormant oospores of *Pythium ultimum*. *Phytopath.*, 65 (10) : 1101-1107.
- LUMSDEN R.D., W.A. AYERS, P.B. ADAMS, R.L. DOW, J.A. LEWIS, G.G. PAPAVIDAS et J.G. KANTZES, 1976. - Ecology and epidemiology of *Pythium* species in field soil. *Phytopath.*, 66 : 1203-1209.
- LUNA L.V. et R.B. HINE, 1964. - Factors influencing saprophytic growth of *Pythium aphanidermatum* in soil. *Phytopath.*, 54 (8) : 955-959.
- MATTA A., 1965. - Una malattia della lattuga prodotta da una nuova species di *Pythium*. *Phytopath. mediterr.*, 4 : 48-53.
- MATTA A., 1966. - Prime indagini sulla patogenicità del *Pythium tracheiphilum* su alcune piante coltivate. *Atti 1er Congr. Un. Fitopat. mediterr.* I parte Bari-Napoli, 200-203.
- MAC KAY R., 1957. - The longevity of the oospores of the onion downy mildew *Peronospora destructor* (Berk.) Cosp. Sc. Proc. Roy. Dublin Soc. (ns), 27 : 295-307.
- MELLANO H.M., D.E. MUNNECKE et J.J. SIMS, 1970. - Relationship of pectic enzyme activity and presence of sterols to pathogenicity of *Pythium ultimum* on roots of *Antirrhinum majus*. *Phytopath.*, 60 : 943-950.
- MIDDLETON J.T., 1943. - The taxonomy host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Mem. Torrey bot. club.*, 20 : 1-171.
- POLICARD A., M. BESSIS et M. LOCQUIN, 1957. - *Traité de microscopie. Masson et Cie, Paris.*
- RAVISE A., 1968. - Etude expérimentale de l'incidence de la nutrition sur l'accomplissement du cycle des Pythiacées parasites de cultures tropicales. *C.R. Acad. Sc., Paris, Série D*, 267 : 1821-1824.
- RIBEIRO O.K., G.A. ZENTMYER et D.C. ERWIN, 1975. - Comparative effects of monochromatic radiation on the germination of oospores of three *Phytophthora* spp. *Phytopath.*, 65 : 904-907.

- ROBERTSON G.I., 1973. - Pathogenicity of *Pythium* spp. to seeds and seedlings roots. *New Zeal. J. Agric. res.*, 16 (3) : 367-372.
- SALVATORE M.A., F.A. GRAY et R.B. HINE, 1973. - Enzymatically induced germination of oospores of *Phytophthora megasperma*. *Phytopath.*, 63 (9) : 1083-1084.
- SAUVE R.J. et D.J. MITCHELL, 1977. - An evaluation of methods for obtaining mycelium-free oospores of *Pythium aphanidermatum* and *myriotylum*. *Can. J. Microbiol.*, 23 (6) : 643-648.
- SCHLOSSER E. et D. GOTTLIEB, 1968. - The effect of sterols on the metabolism of *Pythium* species. *Arch. für Mikrobiol.*, 61 : 246-253.
- SCHMITTHENNER A.F., 1972. - Effect of light and calcium on germination of oospores of *Pythium aphanidermatum*. *Phytopath. (abstracts)*, 62 : 788.
- SCHROTH M.N. et W.C. SNYDER, 1961. - Effect of host exudates on chlamydospore germination of the bean root rot fungus *Fusarium solani* F. *phaseoli*. *Phytopath.*, 51 : 389-393.
- SIDERIS C.P., 1932. - Taxonomic studies in the family *Pythiaceae*. II. : *Pythium*. *Mycologia*, 24 : 14-61.
- SIETSMA J.M. et R.H. HASKINS, 1967. - Further studies on sterol stimulation of sexual reproduction in *Pythium*. *Can. J. Microbiol.*, 13 : 361-367.
- SIETSMA J.M. et R.H. HASKINS, 1968. - The incorporation of cholesterol by *Pythium* sp. PRL 2142 and some of its effects on cell metabolism. *Can. J. Biochem.*, 46 : 813-818.
- SINGH R.S. et J.E. MITCHELL, 1961. - A selective method for isolation and measuring the population of *Pythium* in soil. *Phytopath.*, 51 : 440-444.
- SINGH R.S., 1965. - Development of *Pythium ultimum* in soil in relation to presence and germination of seeds of different crops. *Mycopath. mycol. appl.*, 27 : 155-160.
- SMOTT J.J., F.J. GOUGH, H.A. LAMEY, J.J. EICHENMULLER et M.E. GALLEGLY, 1958. - Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopath.*, 48 : 165-171.
- STANGHELLINI M.E. et J.D. RUSSELL, 1971. - Survival and germination of oospores of *Pythium aphanidermatum*. *Phytopath. (abstracts)*, 61 : 1324.
- STANGHELLINI M.E. et J.G. HANCOCK, 1971. - The sporangium of *Pythium ultimum* as a survival structure in soil. *Phytopath.*, 61 : 157-164.
- STANGHELLINI M.E., 1972. - Exogenous nutrient requirements for germination of *Pythium aphanidermatum* oospores. *Phytopath. (abstracts)*, 62 : 791.
- STANGHELLINI M.E. et J.D. RUSSELL, 1973. - Germination in vitro of *Pythium aphanidermatum* oospores and sporangia. *Phytopath.*, 63 : 133-167.
- STANGHELLINI M.E. et T.J. BURR, 1973. - Germination in vivo of *Pythium aphanidermatum* oospores and sporangia. *Phytopath.*, 63 : 1493-1496.

- STANGHELLINI M.E. et T.J. BURR, 1973. - Effect of soil water potential on disease. Incidence and oospore germination of *Pythium aphanidermatum*. *Phytopath.*, 63 : 1496-1498.
- SUSSMAN A.S. et H.O. HALVORSON, 1965. - Spores : Their dormancy and germination.
- THOMSON T.B., K.L. ATHOW et F.A. LAVIOLETTE, 1971. - The effect of temperature on the pathogenicity of *Pythium aphanidermatum*, *P. de baryanum* and *P. ultimum* on soy bean. *Phytopath.*, 61 : 933-935.
- TRUJILLO E.E. et R.B. HINE, 1965. - The role of papaya residue on papaya root rot caused by *Pythium aphanidermatum* and *Phytophthora parasitica*. *Phytopath.*, 55 : 1293-1298.
- TRUJILLO E.E. et M. MARCLEY, 1967. - Effect of soil temperature and moisture on survival of *Phytophthora parasitica* and *Pythium aphanidermatum*. *Phytopath. (abstracts)*, 57 : 9.
- TURNER P.D., 1963. - Influence of root exudates of cacao and other plants on spore development of *Phytophthora palmivora*. *Phytopath.*, 53 : 1337-1339.
- VANACHTER A., E. VAN WAMBEKE et C. VAN ASSCHE, 1970. - Investigations on the bromide concentration in belgian greenhouse lettuce. *Med. Rijks, Landbouwwet Gent*, 1085-1092.
- VIGOUROUX A., C. CASTELAIN et M. CONUS, 1969. - La guérison de la verticilliose chez l'abricotier. *Ann. Phytopath.*, I, h.s. : 230-236. 2ème Congrès de l'Union phytopath. médit.
- VIRANYI F., 1974. - Studies on the biology and ecology of onion downy mildew (*Peronospora destructor* (Berk. Fries) in Hungary. I. Factors affecting sporulation and conidium germination. II. Over wintering of the pathogen in onion bulbs. *Acta phytopathol. Acad. Sc. hungar.*, 2 (3-4) : 311-318.
- YANG C.Y. et J.E. MITCHELL, 1965. - Cation effect on reproduction of *Pythium* spp. *Phytopath.*, 55 : 1127-1131.
- YANG C.Y., 1970. - Enzyme induced germination of *Aphanomyces* oospores. *Phytopath. (abstracts)*, 60 : 1320.
- ZENTMYER G.A. et D.C. ERWIN, 1970. - Development and reproduction of *Phytophthora*. *Phytopath.*, 60 : 1120-1127.

ADDITIF A LA BIBLIOGRAPHIE

- BERG V.W., 1964. - Wechselwirkungen zwischen Parasit und Wirt bei Tracheomykosen. *Beitr. Biol. Pflanzen.*, 40 : 389-449.
- CLOWES F.A.L. et B.E. JUNIPER, 1968. - Plant cells. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*, 546 p.
- DAVIS D., P.E. WAGGONER et A.E. DIMOND, 1953. - Conjugated phenols in the *Fusarium* wiet syndrome. *Nature*, 172 : 950.
- LISON L., 1960. - Histochimie et cytochimie animales. *Principes et méthodes. Gauthier-Villars, Paris*.
- PERESSE M., 1975. - Relations hôte-parasite dans les trachéomycoses. Quelques-uns de leurs aspects dans le modèle oeillet *Phialophora cinereocens* (Wr) van Beyma. *Thèse, Brest*, 200 p.

PLANCHE I

PYTHIUM TRACHEIPHILUM MATTA

1 : Fragments mycéliens, sporocystes et zygotes : culture sur milieu gélosé.

1 cm représente 15 μm

2 : Figures de germination des sporocystes.

1 cm représente 15 μm

3 : Reproduction sexuée : Phénomène de cystogamie.

1 cm représente 10 μm

4 : Reproduction sexuée : Phénomène de cystogamie.

1 cm représente 8 μm

PLANCHE I

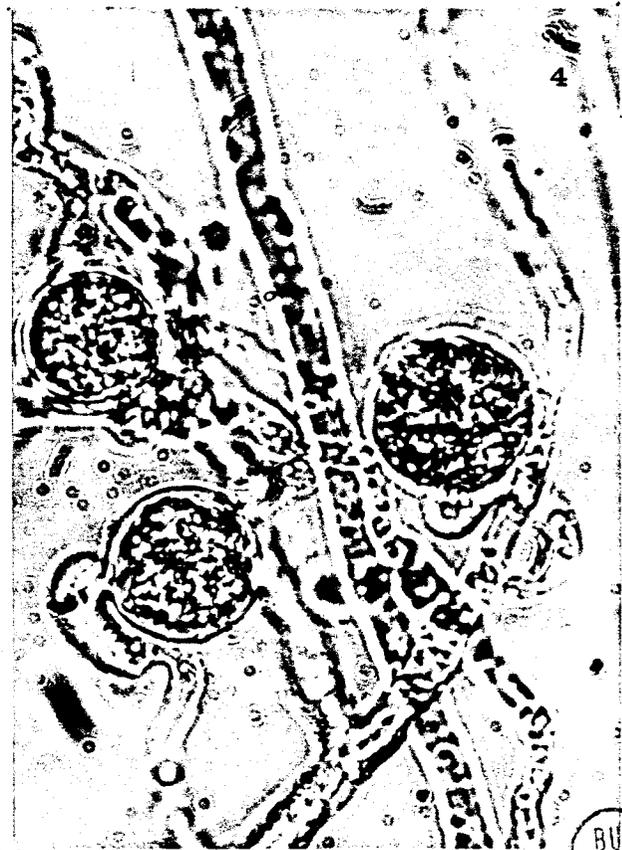
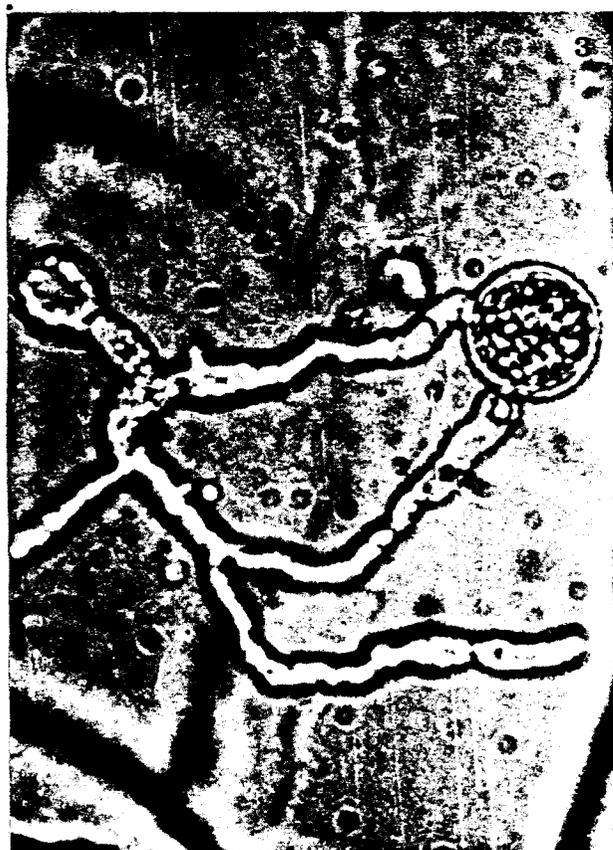
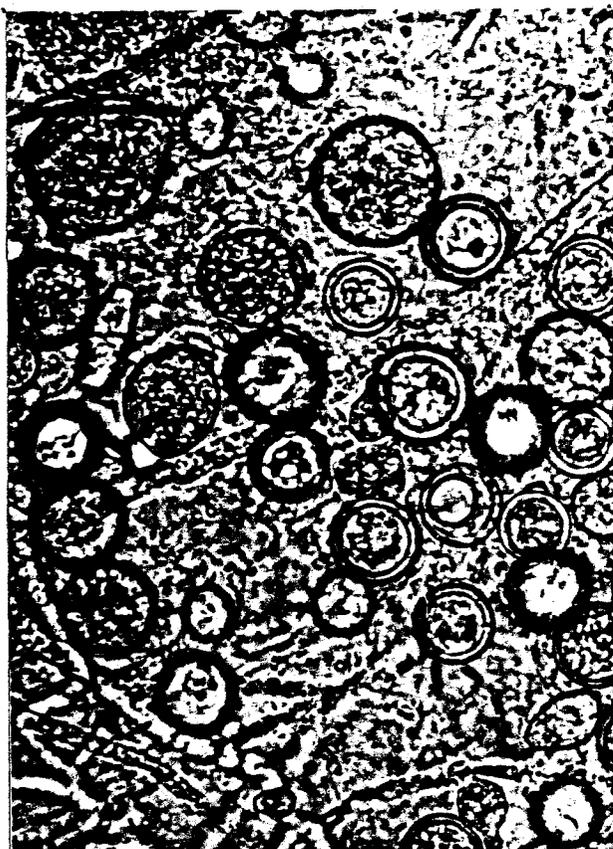


PLANCHE II

SYMPTOMES HISTOLOGIQUES DE LA TRACHEOMYCOSE DE LA LAITUE

- 1 : Coupe transversale dans une racine de Laitue infectée par *P. tracheiphilum* Matta.
Observer, dans les vaisseaux, les sections d'hyphes mycéliens et l'accumulation d'inuline.
1 cm représente 20 μ m

- 2 : Coupe transversale dans une racine saine de Laitue.
1 cm représente 25 μ m

- 3 : Coupe transversale dans une racine infectée par *P. tracheiphilum* Matta.
Observer les cristaux d'inuline dans les vaisseaux du bois.
1 cm représente 20 μ m

- 4 : Coupe longitudinale de racine infectée par *P. tracheiphilum* Matta.
Observer les hyphes mycéliens et les cristaux d'inuline dans les vaisseaux.
1 cm représente 25 μ m

PLANCHE II

