

50376
1990
253

50376
1990
253

T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

mention : Biologie et Physiologie Végétales

par

IBRAHIM GHALEB ABDEL MOHSIN

LE CYCLE SEXUE IN VITRO DE
BOTRYOTINIA FUCKELIANA (De Bary)
FORME PARFAITE DE *BOTRYTIS*
CINEREA (Pers.):

- Déterminisme
- Optimisation des conditions d'obtention.

Soutenue le 18 Décembre 1990 devant la Commission d'Examen

Président : SANCHOLLE Michel, Professeur, Université Lille 1

Rapporteurs : BARRAULT Gérard, M. de conférences, Institut National Polytechniques (INP Toulouse)

FARETRA Francesco, Ingénieur d'Etudes, Université de Bari (Italie)

LACOSTE Louis, Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris

Examineurs: VASSEUR Jacques, Professeur, Université de Lille 1

VIDAL Gérard, M. de conférences, Université de Lille 1

REMERCIEMENTS

C'est un grand plaisir pour moi d'exprimer tout d'abord ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur L. LACOSTE, directeur du laboratoire de Cryptogamie au Museum National d'Histoires Naturelles de PARIS. Après m'avoir accueilli dans son ancien laboratoire à l'université de LILLE 1, il a toujours su me faire profiter de ses grandes connaissances et de ses précieux conseils. Je le remercie pour la confiance témoignée et je le prie de bien vouloir accepter l'expression de ma très vive reconnaissance.

J'adresse mes plus chaleureux remerciements à Monsieur le Professeur M. SANCHOLLE qui malgré ses nombreuses charges depuis sa récente nomination à LILLE a accepté de reprendre la direction scientifique de cette thèse. Il m'a apporté une aide importante dans la rédaction de ce mémoire. Sa bonne humeur teinte parfois de colère à ses remarques judicieuses et pertinentes ont beaucoup contribué à l'épanouissement de ma recherche.

Il m'est agréable de retrouver dans ce jury, Monsieur F. FARETRA que j'ai eu l'occasion de rencontrer lors d'une visite de son laboratoire de Phytopatologie à BARIE en Italie. Je lui suis très reconnaissant d'avoir bien voulu m'honorer de sa présence malgré l'éloignement et les difficultés du voyage.

Monsieur G. BARRAULT, maître de conférences à l'Institut National Polytechniques de TOULOUSE, a accepté d'examiner ce travail et je le remercie pour l'intérêt porté à cette thèse en acceptant de la juger.

Je voudrais manifester ma gratitude à Monsieur le Professeur J. VASSEUR du laboratoire de Physiologie Végétale à LILLE, de l'honneur qu'il me fait d'être présent dans ce jury. Je le remercie très sincèrement d'avoir bien voulu participer à l'examen de cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur G. VIDAL, maître de conférences à LILLE, qui m'a consacré un temps précieux en m'apportant son aide scientifique et en participant au jury.

Je ne pourrais oublier Monsieur B. DEHORTER, maître de conférences à LILLE, ainsi que Monsieur G. BOUDART, chargé de recherche CNRS, qui ont guidé mes premiers pas dans ce travail avec gentillesse et compétence.

J'adresse mes très sincères remerciements à Madame JANEX FAVRE, maître de conférences à PARIS VI, que j'ai eu l'occasion d'apprécier lors de mon DEA, et qui m'a apporté une aide précieuse pour effectuer le travail cytologique.

Madame M. DUMONT et Monsieur A. DIOP, techniciens du laboratoire de Cryptogamie au Museum de PARIS, ont effectué tous les travaux photographiques en microscopie électronique à balayage avec efficacité au cours de l'analyse cytologique de la différenciation sexué Je les en remercie sincèrement.

La dactylographie a été assurée avec efficacité et bonne humeur par Madame M. MAETIE, qu'elle en soit remerciée.

Je suis reconnaissant à tous ceux qui de près ou de loin, m'ont aidé au cours de ce travail en particulier N. CHAUDORGE, P. ESTRADA, E. KALINOWSKI, P. VANACKER, et Ph. BERTO.

INTRODUCTION

Chez les champignons comme dans les autres grands groupes végétaux, la structure des organes sexués est à la base de la classification, et c'est pourquoi l'obtention en culture pure in vitro de la forme parfaite du micro-organisme présente un très grand intérêt. De plus, le passage par l'état de maturité sexuelle fait partie de la vie normale du champignon et au cours des études physiologiques, on perd parfois de vue cet aspect biologique important.

Certes de très nombreux champignons "imparfaits" présentent uniquement des formes de multiplication végétative et la vie, pour eux, n'implique pas nécessairement l'existence de phénomènes de reproduction sexuée (comme c'est le cas pour le *Botrytis cinerea*). Cependant la possibilité de fructifier correspondant à un état d'équilibre biologique dépend d'un très grand nombre de facteurs.

Tous les auteurs s'accordent pour distinguer d'une part les facteurs spécifiques ou génétiques, d'autre part les conditions externes de nature physique ou chimique et enfin, celles d'origine interne : ensemble des phénomènes physiologiques et métaboliques mis en jeu dans les hyphes mycéliennes.

Des phénomènes d'incompatibilité entre souches ont été mis en évidence chez plusieurs espèces et en particulier avec le *Botrytis cinerea* (Groves et Loveland 1953, et Faretra 1988). Cependant, les phénomènes d'incompatibilité ne peuvent être bien étudiés que si l'on connaît bien les conditions de la reproduction sexuée.

Nous avons décidé d'étudier les conditions externes qui influencent de près ou de loin la reproduction sexuée et de suivre avec précision les diverses étapes de ce processus afin de comprendre les interactions entre les facteurs du milieu et la différenciation sexuée.

Ce travail se compose de deux parties :

1) La première partie : Mise en culture du *Botrytis cinerea*

Définition des conditions de culture optimales pour l'obtention du cycle in vitro.

2) La seconde partie: Réalisation du cycle "in vitro" du *Botryotinia fuckeliana*.

Etude de l'intervention des divers facteurs participant au cycle sexué de l'organisme étudié.

SOMMAIRE

1ère PARTIE : MISE EN CULTURE DU BOTRYTIS CINEREA

CHAPITRE I.- PRESENTATION DU BOTRYTIS CINEREA

I.- POSITION SYSTEMATIQUE.....	1
II.- DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES GENERALES.....	5
III.- CYCLE <i>IN VIVO</i>	9

CHAPITRE II.- ORIGINE DES SOUCHES UTILISEES.ETUDE IN VITRO

I.- ORIGINE ET COMPORTEMENT DES SOUCHES.....	15
II.- DESCRIPTION DU CYCLE DE <i>BOTRYOTINIA FUCKELIANA</i> IN VITRO.....	21

CHAPITRE III.- DEFINITION DES CONDITIONS DE CULTURE OPTIMALES POUR L'OBTENTION DU CYCLE IN VITRO

I.- ETUDE DES CONDITIONS PHYSIQUES ENVIRONNANTES.....	27
A - INFLUENCE DES CONDITIONS THERMIQUES ET LUMINEUSES SUR LA CROISSANCE DE 3 SOUCHES DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	27
B - EFFET DE 2 FACTEURS SUPPLEMENTAIRES SUR LA PRODUCTION DE MICROCONIDIIES: L'HUMIDITE AMBIANTE ET LE CONTENU DU MILIEU.....	31
C - CONCLUSION.....	35
II.- CLASSIFICATION DES SOUCHES UTILISEES.....	37
III.- CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE.....	38
A - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	38
B - CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE GENERAL.....	45
1) Milieux favorables à la production de sclérotés.....	45
2) Milieux classiques permettant une bonne production de microconidies.....	47
C - ESSAIS D'AMELIORATION DE CE MILIEU.....	49
1) Influences de la nature des sources de carbone et de leurs concentrations.....	50
2) Influence de la nature de la source azotée et de sa concentration.....	59
3) Effets du rapport C/N.....	67
4) Effets des éléments minéraux.....	70
5) Effets de la thiamine.....	77
6) Effets des différents pH du milieu de culture.....	79
D - CONCLUSION.....	85

2ème PARTIE : REALISATION DU CYCLE IN VITRO DE B. FUCKELIANA

CHAPITRE I.- LES MICROCONIDIES ET LEUR ROLE

I.- MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE.....	93
II.- MODE DE FORMATION DES MICROCONIDIES.....	95
A - ETUDE CYTOLOGIQUE MICROSCOPIE OPTIQUE.....	97
1) Formation des microconidies à partir des conidies....	97
2) Formation des microconidies par le mycélium végétatif	98
3) Formation des microconidies par un microconidiophore.	98
4) Formation des microconidies sur les sclérotés.....	100
5) Formation des microconidies par des ascospores et des paraphyses.....	101
B - ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.....	103
III.- PROPRIETES DES MICROCONIDIES : ESSAIS DE GERMINATION.....	104

CHAPITRE II.- ABOUTISSEMENT DU GAMETOPHYTE : LA SPERMATISATION L'ASCOGONE ET LA FECONDATION

I.- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	109
II.- ESSAIS DE FECONDATION PAR DES SYSTEMES DIVERS.....	111
a) Essais de spermatisation.....	111
b) Résultats.....	111
III.- SIGNIFICATION DE LA SPERMATISATION.....	114
1) Protocole expérimental.....	114
2) Résultats.....	115
IV.- DETERMINATION DU MOMENT DE LA FECONDATION ET DE LA LOCALISATION ANATOMIQUE.....	117
A- Etude morphologique des ébauches et leur développement....	117
B- Etude du sclérote et localisation de l'ascogone.....	119
1) Les sclérotés.....	119
2) Structure des sclérotés.....	121
a) Sclérotés observés directement.....	121
b) Sclérotés après un séjours de 1 mois à 0°C.....	123
3) Effets du froid sur la structure interne des sclérotés.....	125
a) Protocole expérimental.....	125
b) Résultats.....	126
c) Conclusion.....	126
V.- CONCLUSION.....	127

<u>CHAPITRE III.</u> - LE SPOROPHYTE ET SON ENVIRONNEMENT : CARPOGENESE ET DEVELOPPEMENT DE L'APOTHECIE.....	129
I.- CHOIX DU MOMENT DE LA SPERMATISATION.....	131
A- PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	131
B- RESULTATS.....	133
C- DEFINITION DE LA METHODE DE PRODUCTION DES APOTHECIES....	133
II.- ETUDE CYTOLOGIQUE DES APOTHECIES.....	134
A- RAPPEL SUR LES TYPES APOTHECIENS.....	134
B- DEVELOPPEMENT ET STRUCTURE DES APOTHECIES DU <i>BOTRYOTINIA FUCKELIANA</i>	141
C - LES ASQUES.....	147
D- DISCUSSION.....	149
III.- ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA CARPOGENESE.....	152
A- Influence de la température.....	152
1) Effet des basses températures sur la formation des ébauches apothéciales.....	152
a) Protocole expérimental.....	153
b) Résultats.....	153
c) Conclusion.....	156
2) La survivance des sclérotés et leur capacité à la carpogénèse.....	156
a) Protocole expérimental.....	157
b) Résultats.....	157
c) Conclusion.....	161
3) Effets sur le taux de carpogénèse des conditions thermiques lumineuses sous lesquelles les sclérotés se sont formés.....	161
a) Protocole expérimental.....	161
b) Résultats.....	163
c) Conclusion.....	165
B - EFFETS DE LA LUMIERE SUR L'APPARITION DES EBAUCHES.....	165
1) Etude bibliographique.....	167
2) Protocole expérimental.....	168
3) Résultats.....	169
4) Conclusion.....	173
C - EFFETS DES CONDITIONS NUTRITIVES DANS LESQUELLES LES SCLEROTES ONT ETE PRODUITS.....	174
1) Protocole expérimental.....	175
2) Résultats.....	177
3) Conclusion.....	182

D - EFFETS DE DIFFERENTS SUPPORTS SUR LA PRODUCTION DES APOTHECIES.....	182
1) Etude biliographique.....	183
2) Protocole expérimental.....	184
3) Résultats.....	185
4) Conclusion.....	189
III.- DETERMINISME DE LA CARPOGENESE: LA FECONDATION.....	191
A - EFFETS DE L'AGE DE LA CULTURE SPERMATIENCE.....	191
1) Protocole expérimental.....	191
2) Résultats.....	191
B - EFFETS DES CONDITIONS LUMINEUSES SUR LA PRODUCTION DES SPERMATIES.....	192
1) Protocole expérimental.....	192
2) Résultats.....	193
C - EFFETS DE LA CONCENTRATION EN SPERMATIES.....	193
1) Protocole expérimental.....	193
2) Résultats.....	195
3) Conclusion.....	195
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	201
<u>ANNEXE 1</u> : MATERIEL ET METHODES.....	207
<u>ANNEXE 2</u> : BIBLIOGRAPHIE.....	219

1ère PARTIE

MISE EN CULTURE DU
BOTRYTIS CINEREA

CHAPITRE I

PRESENTATION DU BOTRYTIS CINEREA

Botrytis cinerea (Pers.) est une "moisissure" très courante dans la nature. On l'appelle "pourriture grise" car il développe sur les organes qu'il parasite un duvet blanc qui vire très rapidement au gris brun clair lorsque les conidies sont formées. On le rencontre sur les fruits les plus sucrés (fraises, figues, raisins, etc...) et il est particulièrement spectaculaire sur les boutons floraux de nombreuses plantes ornementales, surtout en automne. La présence de cette moisissure présente aussi parfois un aspect positif puisque les composés aromatiques dont l'apparition est liée à sa présence sur le raisin sont mis à profit dans la fabrication du vin de Sauternes; dans ce cas, on l'appelle d'ailleurs "pourriture noble".

A la fin de la phase de croissance gamétophytique, ce champignon forme des sclérotés sur les organes qu'il a parasités.

I- POSITION SYSTEMATIQUE

Le téléomorphe de *Botrytis cinerea* Pers. ex Pers. (1822) a reçu successivement plusieurs noms : Il s'agit de :

- = *Peziza fuckeliana* De Bary (1866).
- = *Sclerotinia fuckeliana* (De Bary) Fuckel (1870).
- = *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetzel (1945).

Botrytis cinerea Pers., champignon de l'embranchement des Fungi Imperfecti (Deutéromycotiniées) appartient à l'ordre des Hyphales de la famille des Mucédinaceae. Son téléomorphe, *Botryotinia fuckeliana*, est une Ascomycotinée de la classe des Discomycètes, ordre des Hélotiales, famille des Sclérotiniaceae.

SCLEROTINIACEAE

Whetzel (1945) a créé cette famille qui se caractérise par des apothécies se formant directement à partir des sclérotés ou des stromas. Les apothécies sont cupuliformes, pédicellées ou infundibuliformes; les stipes sont toujours brunâtres, les asques sont inoperculés et chaque asque contient 8 ascospores elliptiques ou ovales, hyalines et unicellulaires; les spermaties sont toujours globuleuses et parfois légèrement ovales. La forme des conidies est très variable.

Whetzel (1945) a utilisé la structure des organes de conservation (sclérotés) comme critère de différenciation des genres; il a pu ainsi établir deux types:

- 1- type *Botryotinia*
- 2- type *Sclerotinia*

BOTRYOTINIA (description de Jarvis 1977).

On peut distinguer le type *Botryotinia* des autres genres de la famille des *Sclerotiniacées* grâce à divers caractères:

- Le stroma a une forme variable peu définie.
- Les sclérotés sont noirs, de forme hémisphérique; leur surface est convexe. Ils sont toujours fixés sur la cuticule ou l'épiderme de l'hôte.
- Le cortex pseudoparenchymateux est noir, de structure palissadique. La médulle est formée d'hyphes lâches insérées dans une matrice hyaline et gélatineuse.
- Les microconidies sont globuleuses, incluses dans une couche de la matrice mucilagineuse.

- Les microconidiophores sont ramifiés; les conidiophores sont droits (comme ceux de *Botrytis cinerea*).
- Les apothécies sont brunâtres, cupuliformes.
- Les asques sont inoperculés, et contiennent 8 ascospores hyalines, unicellulaires.

Noviello (1962) a noté que *Botrytis cinerea* formait des sclérotés sur des feuilles de *Ficus elastica*. La matrice flexible et gélatineuse qui contient des hyphes de medulla se trouve dans les sclérotés de *Botryotinia* et n'existe pas dans ceux de *Sclerotinia*.

Whetzel (1945) a choisi *Botryotinia convoluta* comme type pour le genre *Botryotinia*. Buchwald (1949) a préféré utiliser l'espèce *Botryotinia fuckeliana* et a associé à toutes les formes sexuées leurs stades conidiens respectifs. *Botryotinia* a ainsi été subdivisé en deux sous-genres.

- Sous-genre *Eubotryotinia*: contient toutes les espèces pour lesquelles le stade conidien appartient au Sous-genre *Eubotrytis*.
- Sous-genre *Sphaerobotryotinia*: les conidies sont globuleuses.

La relation entre *Botryotinia* et *Botrytis*.

La relation entre *Botryotinia* et *Botrytis* sp a constitué le sujet de plusieurs articles. De Bary (1864) était convaincu que *Botrytis cinerea* et *Botryotinia fuckeliana* étaient génétiquement liés; il nomme la seconde espèce *Peziza fuckeliana* mais sans la décrire comme le stade parfait de *Botrytis cinerea*. Le champignon fut ensuite adjoint au genre *Sclerotinia* par Fuckel (1869) et enfin au genre *Botryotinia* par Whetzel (1945). Groves et Loveland (1953) ont obtenu des apothécies de *Botryotinia fuckeliana* en croisant des souches de *Botrytis cinerea* provenant de *Vitis* sp. de la vallée du Rhin et des souches provenant de pommes du Canada. Leurs résultats ont confirmé l'opinion de De Bary et l'identité spécifique entre *Botrytis cinerea* et *Botryotinia fuckeliana*.

LE GENRE BOTRYTIS.

Botrytis a été un des premiers genres de champignons décrits. Le nombre des espèces de *Botrytis*, d'abord réduit à 5 en 1801 par Persoon s'est considérablement accru dans la première moitié du 19^{ème} siècle. Des réductions notables sont ensuite intervenues par suite de transferts dans des genres assez voisins *Cladobotryum* et *Virgaria* par Nees (1817) ou la création d'autres genres.

Whetzel (1945), Buchwald (1949) et Hennbert (1973) ont redéfini le genre *Botrytis*. Buchwald (1949) a reconnu 23 espèces après avoir précisé les caractères généraux du genre *Botrytis*; il a proposé 3 nouveaux sous-genres.

- Sous-genre Eubotrytis divisé en deux parties:

1- *Macrosclerotiphora* à gros sclérotés.

2- *Microsclerotiphora* à petits sclérotés.

- Sous-genre Sphaerobotrytis contenant les espèces à spores globuleuses.

- Sous-genre Verrubotrytis contenant une seule espèce: *Botrytis geranii*

Les travaux de Ellis (1971) et Hennbert (1973) conduisent à admettre que parmi les Discomycètes Inoperculés la famille des Sclerotiniacées (selon Whetzel), ou *Botrytidacées* (selon Hennbert) comporte 4 genres:

1) *Botrytis*

2) *Streptobotrys*

3) *Amphobotrys*

4) *Verrucobotrys*

Ceux-ci ont en commun la capacité à produire, à la surface du substrat, des conidiophores érigés possédant un stipe généralement rigide et coloré. Pour les *Botrytis* l'axe du conidiophore se distingue des rameaux latéraux

peu nombreux, insérés sans ordre apparent. Chacun de ces rameaux porte de petites vésicules ovoïdes qui se hérissent simultanément de conidies monocellulaires globuleuses, ovales, ou elliptiques à paroi lisse, portées en grappe, insérées sur de très courts stérigmates. Ces spores sont brunâtres.

Ces précisions morphologiques sont indispensables pour distinguer les *Botrytis*. A l'heure actuelle on reconnaît 23 espèces dans le genre *Botrytis* (Coly - Smith 1980).

II- DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES GENERALES

Le *Botrytis cinerea* Pers. provoque une maladie très dangereuse et très répandue sous le nom de pourriture grise (grey mould). Il cause des dégâts économiques importants dans de nombreux pays.

Il se caractérise à la fois par une polyphagie remarquable et une adaptation assez exceptionnelle à des passages successifs de la vie saprophyte à la vie parasitaire. Ce n'est pas un champignon du sol mais il y persiste sous forme de sclérotés sur des fragments de végétaux en voie de décomposition. La polyphagie de *Botrytis cinerea* se manifeste aussi bien aux dépens du feuillage des organes floraux, des fruits que des parties ligneuses de la plante (Viennot - Bourgin 1949).

Il en résulte qu'un grand nombre de travaux ont été effectués sur la forme asexuée de *Botrytis cinerea*. Il faut citer entre autres les travaux de Hansen et Smith (1932) qui ont publié la première étude génétique sur la ségrégation chez différentes souches hétérotypes et homotypes de *Botrytis cinerea*. Ils ont signalé la coexistence entre deux groupes nucléaires dans la même cellule dans le type hétérocaryotique; ensuite la forme anamorphique du champignon est multinucléée.

Il y a toujours une grande variabilité génétique dûe aux échanges nucléaires par anastomose entre les cellules qui donnent des aspects différents.

Les travaux effectués sur la forme sexuée sont beaucoup moins nombreux que les travaux effectués sur la forme asexuée .

1) Travaux de De Bary (1864).

Une des premières études conduites sur le *Botrytis cinerea* a été réalisée par De Bary. Il a noté, en 1864, l'existence d'une relation entre la forme conidienne de *Botrytis cinerea* (la formation de sclérotés) et la forme ascosporee apothécies *Peziza fuckeliana* (De Bary) et enfin, en 1884, l'existence des spermaties.

2) Travaux de Groves et Drayton (1939)

Ils ont réussi pour la première fois à produire in vitro des apothécies de *Botryotinia fuckeliana* à partir de souches compatibles de *Botrytis cinerea* en utilisant la technique mise au point par Drayton (1937) pour produire les apothécies de *Botryotinia convoluta*.

Pour obtenir la formation des sclérotés, ils repiquent le champignon sur grains de blé stérilisés dans l'eau et laissent ces cultures se développer pendant 30 jours à l'obscurité à 14°C. Ils déposent ensuite ces sclérotés sur sable humide stérile et les transfèrent au froid à 0°C pendant 3 à 4 mois. Des spermaties en suspension dans des extraits de terre sont ensuite déposées sur les sclérotés. Les boîtes contenant les sclérotés spermatisés sont ensuite incubées à 5°C. pendant 5 semaines; au bout de cette période les primordia commencent à se former. Les boîtes sont alors transférées à 14°C en éclairnement alterné (12 h.lumière/12 h.obscurité).

Les travaux de Whetzel (1945), Buchwald (1949) et Groves et Loveland

(1953) ont aussi confirmé que la forme du *Botrytis cinerea* est bien l'anamorphe de *Botryotinia fuckeliana*.

3) Travaux de Polach et Abawi (1974 et 1975)
et travaux de Hill (1979)

Ces chercheurs ont réussi à obtenir des apothécies dans des conditions de plein champ et aussi au laboratoire, en utilisant un mélange de 10 cultures monoascospores. Le milieu de culture utilisé était un mélange de segments de tiges de céleri et de haricot vert.

4) Travaux de Lorenz et Eichhorn (1983)

Ceux-ci ont modifié la technique de Groves et Drayton (1939).

- a) Ils produisent les sclérotés en boîtes de Pétri sur malt-agar 2%, à 15°C à l'obscurité pendant 1 mois.
- b) Ils transfèrent les boîtes à 0°C pendant 1 mois et ensuite 2 semaines à 5°C à l'obscurité.
- c) Ils déposent alors les sclérotés stériles sur du sable humide en boîtes de Pétri en verre.
- d) Les spermatisations sont faites en ajoutant à chaque boîte de Pétri 10 ml de suspension très dense de macroconidies, de spermaties et de mycélium.
- e) Les boîtes sont maintenues à 15°C à l'obscurité pendant 1 mois puis transférées à 11°C sous éclairage alterné (12 h.lumière/24h).

5) Travaux de Faretra et Antonacci (1987).

Ils ont encore simplifié la technique de Groves et Drayton (1939).

- a) Ils produisent des sclérotés sur milieu malt-agar 2% pendant 1 mois à 15°C à l'obscurité en boîtes de Pétri

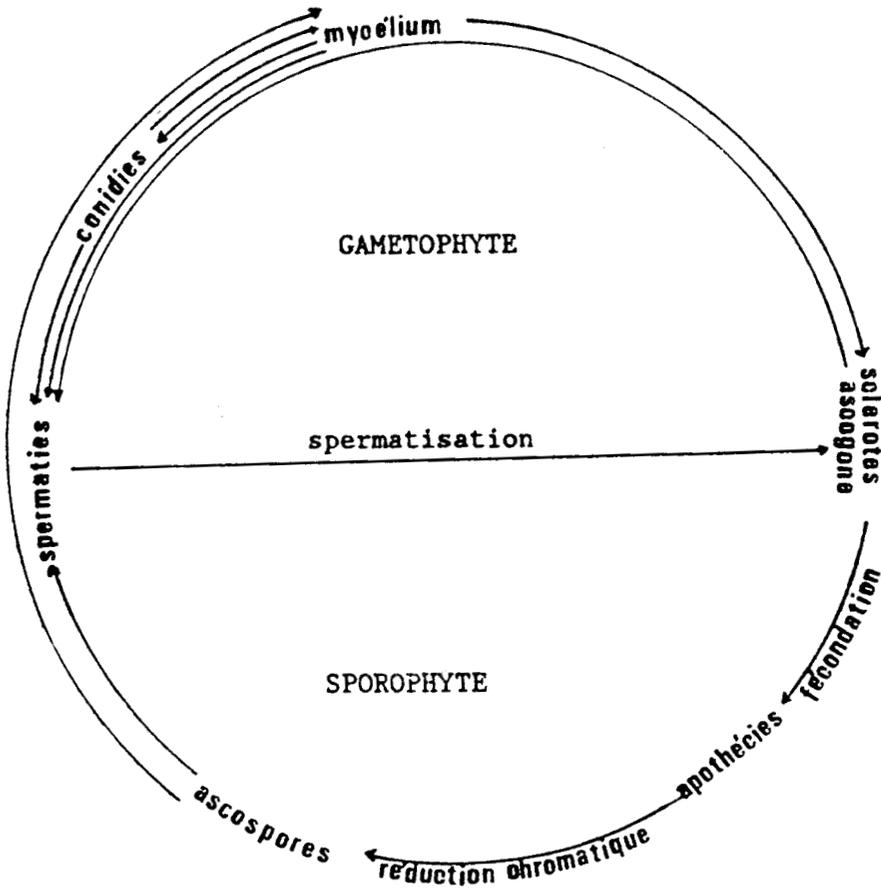


Schéma 1 : CYCLE DU BOTRYOTINIA FUCKELIANA
IN VIVO

- b) Puis ils transfèrent les boîtes à 0°C à l'obscurité pendant 1 mois.
- c) Les sclérotés sont ensuite déposés stérilement dans des tubes (200 x 24 mm) contenant 9 ml d'eau distillée stérile.
- d) Enfin la spermatisation est faite par une suspension de macroconidies, de spermaties et de mycélium provenant de toutes les souches (3 ml de cette suspension par tube).

Les tubes sont alors maintenus à 11°C à la lumière avec des périodes de 12 h. d'éclairement et 12 h. d'obscurité.

III- CYCLE IN VIVO ET CARACTERES GENERAUX DU BOTRYOTINIA FUCKELIANA

Ce champignon parasite ou semi - saprophyte se manifeste dans la nature sous plusieurs formes très différentes (schéma 1).

- 1- mycélium stérile ou "toile".
- 2- forme conidienne ou *Botrytis cinerea*.
- 3- sclérotés.
- 4- forme ascosporee (apothécies) ou *Botryotinia fuckeliana*.

1) La forme mycélienne (toile): (planche 4, photo 19).

Elle présente l'aspect d'une toile blanchâtre ou grisâtre de mycélium de *Botrytis cinerea* comprenant habituellement des filaments articulés brunâtres ou olivâtres, cylindriques, quelques fois vésiculeux au niveau de la cloison médiane, dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes (Viennot - Bourgin 1949).

Celles-ci rampent à la surface du milieu sur lequel elles forment le stroma (matrix) qui est une couche plus ou moins épaisse très serrée et très cloisonnée sous forme de pelotons. Quand ce mycélium devient fructifère il produit des touffes de conidiophores grisâtres (stade *Botrytis cinerea* = pourriture grise). Ce mode de multiplication peut, dans

certaines conditions, disparaître complètement et faire place à une prolifération mycélienne blanche correspondant à l'élongation d'hyphes grêles, hyalines ou très faiblement colorées qui se répandent sous forme d'un voile ou toile. La toile est une maladie des plantes bien connue et redoutée des horticulteurs. Elle se développe en serre ou sous chassiss aux dépens des semis et des boutures.

Cette forme "toile" de *Botrytis cinerea* est essentiellement favorisée par le développement du champignon en atmosphère confinée fortement chargée d'humidité où la température avoisine les 30°C. Elle dérive de la forme *Botrytis* et correspond en quelque sorte à une élongation anormale de la conidie sous forme de filaments (Beauverie 1899).

Beauverie et Guillermond (1903) qui ont étudié le développement mycélien de *Botrytis cinerea* ont observé en outre un grand nombre de formes intermédiaires entre la forme mycélienne stérile (toile) et la phase conidiogène normale (*Botrytis*).

On peut obtenir la forme toile à partir du stade *Botrytis*. Par contre la forme mycélienne stérile ne produit jamais, quelles que soient les conditions de milieu, la phase conidiogène normale.

2) La forme conidienne *Botrytis cinerea* ou polyactis :

Le développement fréquent du *Botrytis* se manifeste par la production de conidiophores dressés en touffes souvent étendues constituant un revêtement très fragile, gris brunâtre ou gris cendré.

Le conidiophore est ramifié à son sommet; il émet alors des diverticules latéraux disposés en croix ou obliquement et se terminant soit en pointe, soit souvent en une massue courte et peu colorée supportant les stérigmates qui apparaissent sous la forme de petites protubérances arrondies, disposées suivant une spire lâche (radule).

L'émission de conidies débute sur la partie terminale du conidiophore, elle s'étend ensuite aux rameaux latéraux. Quand la production de conidies est terminée la portion du conidiophore qui les portait se fane en se contractant et devient stérile; ce sont alors de nouvelles ramifications qui deviennent fructifères.

Les conidies de *Botrytis cinerea* sont ovoïdes ou sphériques, lisses, à paroi mince légèrement brunâtre. Elles mesurent $12.14 \times 8.18 \mu\text{m}$ ces dimensions sont cependant très variables suivant les conditions de milieu dans lesquelles le champignon se développe.

Le stade conidien de *Botrytis cinerea* est concomitant à la production des microconidies (ou spermaties) sur des microconidiophores peu différenciés portés par les filaments végétatifs; on les observe aussi bien dans la nature qu'en culture in vitro.

Les microconidies (ou spermaties) mesurent de 2 à 4 μm et ont une forme sphérique. Beauverie et Guillermond (1903), Ramsey (1925) et Hino (1929) pensent qu'elles ne jouent aucun rôle dans la vie des champignons du fait qu'elles ont perdu totalement leur pouvoir germinatif.

Drayton (1939), Groves et Loveland (1953) ont montré au contraire, que les spermaties jouaient un rôle indispensable dans l'apparition de la forme parfaite de *Botrytis cinerea*. Ils les considèrent comme les cellules mâles.

3) La forme sclérote

Dans certaines conditions de son développement le champignon est capable de produire des sclérotas. Ceux-ci sont toujours petits, arrondis ou ovales, aplatis à la surface du stroma (une couche compacte de mycélium). Ils mesurent de 0,2 à 1,5 cm. de longueur et de 0,1 à 0,5 cm de largeur.

Il faut mentionner que la taille des sclérotas et l'apparition de cette

phase dans la nature dépendent de la température, du milieu, de la lumière et du pH.

Ils sont d'abord blancs, puis ils brunissent et enfin noircissent. Par la suite leur surface est brillante et marquée de fines ponctuations régulières. L'activité du sclérote se manifeste naturellement au printemps (ou *in vitro* à 18°C sous lumière blanche) par la réapparition de la forme *Botrytis* avec des conidiophores dressés en touffes étendues qui deviennent directement fructifères.

4) La forme ascosporee: (photo 6, planche 3).

De Bary (1886) le premier, dit avoir obtenu, à partir des sclérotas de *Botrytis cinerea*, une fructification sexuée (apothécie ou discocarpe).

Ce sont des apothécies brunâtres, d'abord fermées en boule, s'ouvrant ensuite, pédicellées, avec un pied cylindrique de 0,5 à 1,5 cm. Celles-ci se développent finalement en cupules largement étalées et portent des asques cylindriques mêlés à des paraphyses filiformes un peu renflées à leur sommet.

Les ascospores (généralement 8 par asque), sont oblongues, elliptiques et mesurent 9.10 x 5.6 µm environ.

La production de la forme parfaite, à partir des sclérotas a été étudiée par Groves et Drayton (1939) qui l'ont obtenue par germination des sclérotas selon la méthode préconisée par Drayton (1937).

Mais il faut noter que l'apparition de la forme sexuée est assez rare dans la nature parce qu'elle a besoin de conditions difficiles et précises qui ne sont pas toujours réalisées au moment opportun; l'hétérothallisme du *Botrytis cinerea* est également à prendre en compte.

CHAPITRE II

ORIGINE DES SOUCHES UTILISEES
ETUDE IN VITRO

D'après les travaux de Paul (1929) et tous les successeurs, nous pouvons diviser les souches de *Botrytis cinerea* en 4 groupes selon leurs formes morphologiques de développement:

- 1) souches mycéliennes : ce sont des souches qui donnent uniquement une forte quantité du mycélium végétatif et peu de conidies.
- 2) souches conidiennes : ce sont des souches qui donnent un grand nombre de conidies avec une forte quantité de mycélium et forment très rarement des sclérotés.
- 3) souches sclérotiales : ce sont des souches qui forment un grand nombre de sclérotés et très peu de conidies.
- 4) souches microconidiennes : ce sont des souches qui donnent un grand nombre de microconidies, très peu de conidies et forment très rarement des sclérotés.

Cette classification des souches a facilité notre choix pour faire les croisements et les essais nécessaires.

I.- ORIGINE ET COMPORTEMENT DES SOUCHES.

Nous avons disposé, pour notre travail, de 2 ensembles de souches :

- Des souches provenant d'isolements monoascospores.
- Des souches "sauvages"¹ isolées au laboratoire.

1) Souches monoascospores.

- Nous avons utilisé 2 souches, S.A.S 405 et S.A.S 56 isolées d'un seul asque par FARETRA (ITALIE).
- Nous avons isolé 32 souches monoascospores à partir d'apothécies obtenues par croisement entre des sclérotés S.A.S 405 et des

1. Nous utilisons le terme "sauvage" pour désigner des souches provenant d'isolements par "rétrocultures" non monospores et non dans l'acceptation génétique du terme.

spermaties S.A.S 56. Ces souches sont numérotées : S.1; S.2; S.3; S.32. Les isollements ont été effectués avec un micromanipulateur de De Fonbrune, suivant la méthode décrite dans l'annexe "Matériel et Méthodes".

2) Souches "sauvages".

- Cinq souches isolées à partir de pommes sont numérotées B.81; B.428; B.69; B.450 et B.C.6.
- Deux souches isolées de fraises ont été notées : B.F1 et B.F2.

Les isollements ont été conduits suivant la technique décrite dans l'annexe "Matériel et Méthodes".

3) Obtention de souches compatibles

La plupart des isolats naturels et des souches monoascospores provenant de la forme parfaite de *Botryotinia fuckeliana* ne peuvent s'autoféconder. Groves et Loveland (1953) ont noté que des souches du même groupe, autostériles peuvent cependant être interfécondes. En effet le croisement entre ces souches et des souches de référence du type sexuel compatible peut donner naissance à une génération ascosporee.

Cet hétérothallisme, s'il est dominant dans la nature, n'est pas absolu. En effet, 16% des isolats naturels et 6% des descendants monoascosporés se sont avérés homothalliques capables de s'autoféconder. Ils peuvent en outre être fécondés par des souches complémentaires suivant le principe précédemment décrit (Lorenz et Eichhorn 1983 et Faretra 1988).

Faretra (1988b) a effectué des analyses portant sur 213 isolats naturels et 240 souches monoascosporées de *Botryotinia fuckeliana*. Il a montré que la compatibilité sexuelle chez ce champignon est contrôlée par un seul gène possédant deux allèles notés MAT 1-1 et MAT 1-2. La plupart des isolats

sont hétérothalliques du fait qu'ils ne peuvent pas s'autoféconder, mais sont capables de donner naissance à une génération ascosporee après croisement avec des souches de référence portant le type sexuel MAT 1-1 ou MAT 1-2.

Nous appuyant sur les résultats de Faretra (1988b), nous avons effectué un certain nombre de croisements afin d'obtenir des souches compatibles qui nous permettraient d'étudier les mécanismes d'induction des apothécies et leur développement.

La présence simultanée de ces deux types sexuels chez les isolats naturels sur différents hôtes et dans différentes régions d'Italie révèle que la reproduction sexuée et la recombinaison méiotique sont à l'origine d'une grande variabilité génétique chez ce champignon.

a) Protocole expérimental

D'après nos études sur le comportement des souches, nous avons choisi 4 souches produisant de grandes quantités de spermaties (3 souches monoascospores s.S.A.S 56, s.S.14, s.S.11 et une souche "sauvage" s.B.C.6). Ensuite nous avons cultivé séparément les 4 souches sur milieu grains de blé puisque ce milieu nous donne toujours une grande quantité de spermaties. (Les conditions optimales de production des sclérotés et des microconidies sont définies dans le chapitre III).

Nous avons cultivé les souches monoascospores et les souches sauvages séparément sur milieu malt-agar 2% pour produire des sclérotés à 18°C à l'obscurité.

Enfin, nous avons effectué des croisements dont les résultats sont consignés dans le tableau (I.1).

Tableau 1.1 : Compatibilité des souches monoasporées
et des souches "sauvages"

Souches	s.S.A.S 56	s.S.14	s.S.11	s.B.C.6	sans spermaties.
S.S.A.S 405	+	+	+	—	—
S.S.A.S 56	—	+	+	—	—
S.S.1	—	—	+	—	—
S.S.2	—	+	—	—	—
S.S.3	+	—	+	+	—
S.S.4	+	—	+	—	—
S.S.5	+	+	—	+	—
S.S.6	+	+	—	+	—
S.S.7	—	+	+	—	—
S.S.8	+	+	—	—	—
S.S.9	—	—	+	—	—
S.S.10	—	+	+	+	—
S.S.12	—	+	+	+	—
S.S.13	+	+	—	+	—
S.S.15	+	—	+	—	—
S.S.16	—	—	—	+	—
S.S.17	+	+	—	—	—
S.S.18	+	+	—	+	—
S.S.19	+	+	—	+	—
S.S.20	—	—	+	+	—
S.S.21	+	—	+	—	—
S.S.22	—	—	+	—	—
S.S.23	—	+	+	—	—
S.S.24	+	—	—	+	—
S.S.25	—	+	+	—	—
S.S.26	—	+	+	+	—
S.S.27	+	+	—	—	—
S.S.28	+	+	—	+	—
S.S.29	—	+	—	+	—
S.S.30	+	—	—	+	—
S.S.31	+	—	—	+	—
S.S.32	—	—	+	—	—
S.B.F1	—	—	—	—	—
S.B.F2	—	—	—	—	—
S.B.81	—	—	—	—	—
S.B.428	—	—	—	—	—
S.B 450	—	—	—	—	—
S.B 69	—	—	—	—	—

+ = compatibilité entre les 2 souches = formation d'apothécies.
 -- = incompatibilité
 S = sclerotes (souche femelle)
 s = spermaties (souche mâle)

b) Résultats

Nous avons obtenu un grand nombre de souches monoascospores compatibles (tableau I.1) mais les pourcentages de germination carpogénique étaient très variables d'une souche à l'autre. Les essais de compatibilité entre les "souches sauvages" ont montré que celles-ci n'étaient pas compatibles entre elles. La souche B.C.6 confrontée à des souches monoascosporées (sclérotés) s'est pourtant montrée compatible avec certaines d'entre elles. Nous n'avons pas obtenu d'apothécies sans effectuer la spermatisation.

4) Isolement des hyphes microconidiennes.

Dans certaines cultures, les hyphes microconidiogènes se forment en abondance et sont faciles à distinguer. En effet, elles sont blanches alors que les hyphes végétatives sont grises. Ceci nous a conduits à isoler des hyphes microconidiennes et à les mettre en culture sur milieu grains de blé. Après un certain nombre de repiquages, nous avons réussi à les isoler et à obtenir ainsi des cultures produisant presque exclusivement des microconidies, de cette façon nous avons pu disposer en permanence de microconidies (ou spermaties) nécessaires à la réalisation de nos croisements.

5) Conclusion

Nous avons disposé d'un grand nombre de souches compatibles (69 croisements compatibles), ce qui nous a permis d'effectuer nos expériences sur le cycle sexué. L'étude des potentialités de ces souches quant à la production préférentielle de sclérotés, de spermaties ou de conidies sera conduite dans le chapitre III, lorsque les conditions optimales de production respective de ces éléments du cycle auront été définies.

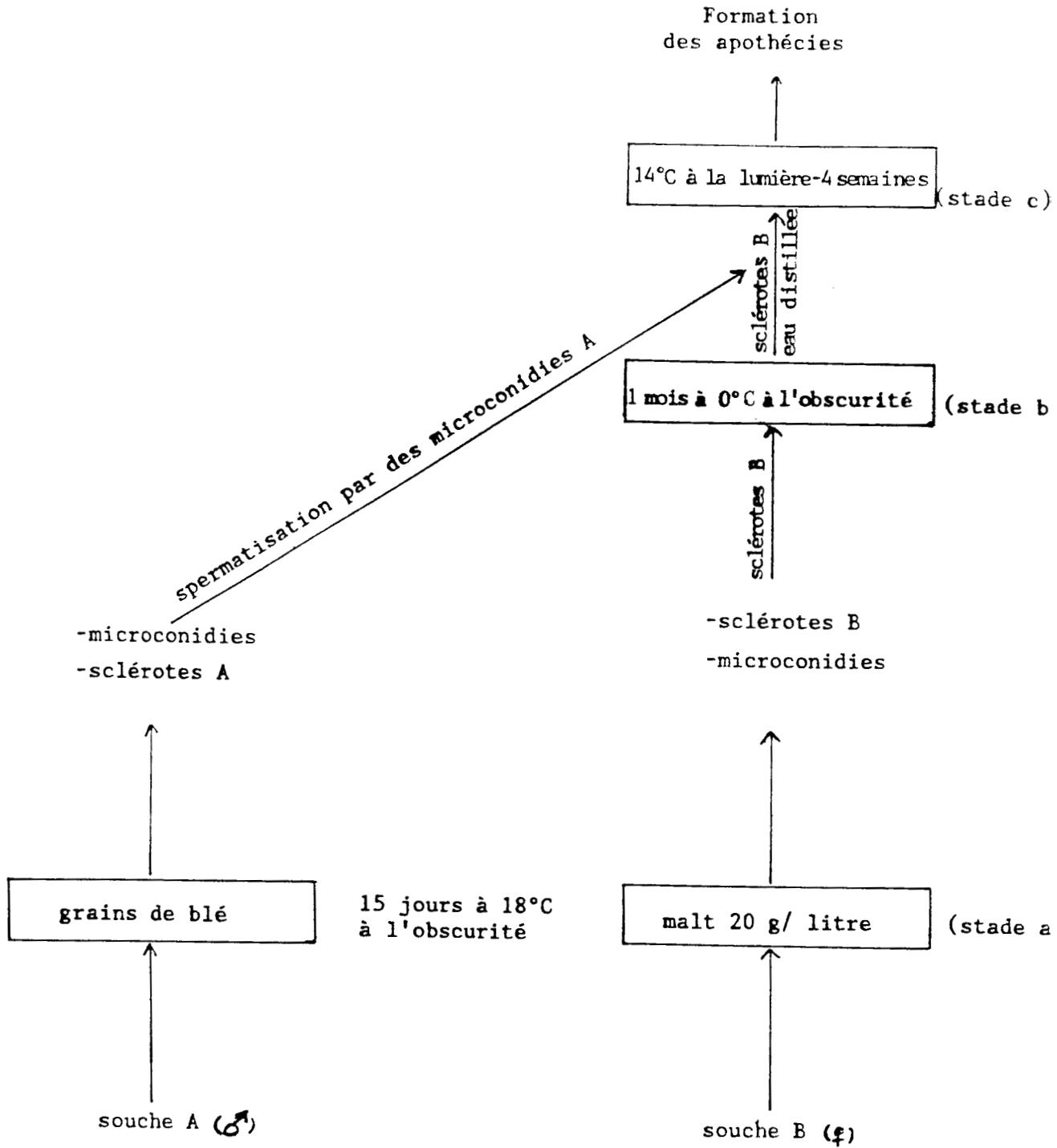


Schéma 2 : CYCLE DU BOTRYOTINIA FUCKELIANA IN VITRO

II.- DESCRIPTION DU DEVELOPPMENT DE BOTRYOTINIA FUCKELIANA IN VITRO

La possibilité de disposer de souches productrices de sclérotés et de souches productrices de microconidies a rendu possible l'obtention du cycle in vitro de *Botryotinia fuckeliana* que nous avons essayé de maîtriser. On peut constater que de grands progrès ont été accomplis dans l'obtention de la forme parfaite depuis les travaux de Groves et Drayton (1939). Les derniers en date correspondent aux travaux de Faretra et Antonacci (1987 et 1988a).

Nous avons commencé nos expériences en utilisant la méthode de ces derniers auteurs ; au fur et à mesure de l'avancement de nos essais nous avons essayé d'améliorer et de simplifier leur procédé.

Notre méthode d'obtention de la forme parfaite (schéma 2) comporte trois étapes :

- 1) Les souches sont cultivées sur milieu malt - agar 2 % pour produire des sclérotés en boîtes de Pétri à l'obscurité à 18°C (stade a). Après 15 jours dans ces conditions les sclérotés sont mûrs et leur structure interne est complète. Ils seront capables de former des apothécies après une période de conditionnement à 0°C (environ 30 jours).
- 2) Les sclérotés sont transférés stérilement dans des tubes (200 x 25 mm), nous mettons dans chaque tube 10 sclérotés et 9 ml de suspension de spermaties (stade b). Cette suspension a été obtenue en mettant dans l'eau distillée stérile des hyphes spermatiennes pures, puis en agitant pendant 5 minutes sur un agitateur magnétique pour séparer les spermaties de leur microconidiophores. Une filtration sur laine de verre stérile permet d'éliminer les restes d'hyphes.

Nous avons utilisé des tubes spéciaux (à rebord intérieur), afin

Tableau I.2 : Moyenne* du nombre d'apothécies par sclérote.

Essais	Sclérotés moins de 0,2 cm.	Sclérotés de 0,2 à 0,5 cm.	Sclérotés de 0,5 à 0,7 cm.
Lot 1	0,9	1,8	3,1
Lot 2	1,2	2,1	2,8
Lot 3	0,8	2,4	3,4

- chaque essai porte sur 150 sclérotés: 50 sclérotés de chaque taille
(10 sclérotés dans chaque tube).

* calculée sur 10 sclérotés.

d'assurer une bonne oxygénation tout en évitant la contamination qui provient du contact entre l'eau et le coton bouchant les tubes.

Enfin, les tubes sont transférés à 0°C pendant 30 jours à l'obscurité.

- 3) On dépose les tubes horizontalement dans des étuves à 12°C, recevant 12 heures de lumière par jour (2 lampes daylight SYLVANIA F20 T 12/D) de longueurs d'onde voisines de 450 nm (stade c).

A partir de la quatrième semaine, les sclérotés commencent à germer et donnent des primordia apothéciaux qui apparaissent au début comme des petites protubérances sur la surface des sclérotés. Elles se développent et donnent des stipes qui croissent jusqu'à une hauteur de 0,5 à 1,5 cm, et commencent à se renfler au sommet en formant les chapeaux des apothécies.

Nous avons observé que le nombre des apothécies apparaissant sur chaque sclérote et leur taille sont bien liés à la taille du sclérote qui les porte. (photo 10, planche 3).

Nos résultats (tableau I.2) montrent que les grands sclérotés portent un nombre d'apothécies beaucoup plus élevé que les petits, ce qui nous a conduits à choisir toujours pendant nos essais des sclérotés de même taille. Pourtant la taille du sclérote n'a aucun effet sur sa capacité à produire des apothécies; tous les sclérotés sont capables de produire des apothécies; la seule différence étant le nombre d'apothécies sur chaque sclérote en fonction de la taille de celui-ci.

Il faut noter aussi que nous nous sommes assurés de ne pas mettre d'hyphes spermatiennes dans les tubes pour deux raisons :

- Les hyphes se développent sur la surface de l'eau formant une couche de mycélium qui consomme rapidement une grande partie de celle-ci; ensuite elles commencent à produire des spermaties qui modifient les quantités de ces cellules dans les tubes.

- L'existence d'une couche mycélienne sur la surface des sclérotas retarde la différenciation des apothécies et diminue le pourcentage de germination carpogénique.

CHAPITRE III

DEFINITION DES CONDITIONS DE CULTURES
OPTIMALES POUR L'OBTENTION DU CYCLE
IN VITRO

I- DEFINITION DES CONDITIONS PHYSIQUES ENVIRONNANTES OPTIMALES

A - INFLUENCE DES CONDITIONS THERMIQUES ET LUMINEUSES SUR LA CROISSANCE DE 3 SOUCHES DE BOTRYTIS CINEREA

Dans une série d'expériences préliminaires conduite en cultivant les souches sur milieu malt-agar 2% couramment utilisé, nous avons essayé d'établir les conditions d'éclairement et de température qui semblaient optimales pour l'évolution de nos souches. Nous avons également essayé d'analyser les répercussions sur ces cultures, des modifications de ces facteurs. Les expériences ont été conduites sur 3 souches :

- Souches monoascospores. S.A.S 405 et S.A.S 56.
- Souche sauvage. B. 81.

Dans chaque cas, nous avons étudié respectivement : la croissance du mycélium, la production de sclérotés, de conidies et de microconidies. Le temps de maturation de sclérotés a été également pris en compte. Ces expériences préliminaires constituent une étude exploratoire, pour fixer les grands paramètres que nous allons utiliser au cours de la recherche d'un milieu de culture optimum pour le *Botrytis cinerea*.

1) Protocole expérimental

Les expériences ont été réalisées en utilisant un milieu gélosé malt-agar 2% dans des boîtes de Pétri 8,5 cm (25 ml de milieu par boîte). La moyenne du nombre de sclérotés présents par souche a été prise comme critère de comparaison entre celles-ci pour déterminer leur mode de production des sclérotés.

Tableau 1.3 EFFETS DE LA TEMPERATURE ET DE LA LUMIERE SUR
LE COMPORTEMENT DE 3 SOUCHES DU BOTRYTIS CINEREA

SOUCHES	7°C									
	Obscurité					Lumière.				
	1*	2*	3*	4*	5*	1*	2*	3*	4*	5*
S.A.S 405	0,4	33-35	52	2	0	0,5	30-32	47	3	0
S.A.S 56	0,4	33-35	45	1,5	0	0,5	30-32	49	1,5	0
B.81	0,4	33-35	59	2	0	0,5	30-32	56	2	0
10°C										
S.A.S 405	0,5	22-24	54	1,5	0	0,6	20-22	52	4,5	1
S.A.S 56	0,5	22-24	48	1	1	0,6	20-22	45	3	2
B.81	0,5	22-24	58	2	0	0,6	20-22	59	3	1
14°C										
S.A.S 405	0,7	18-20	53	2	1	0,8	16-18	49	13	2
S.A.S 56	0,7	18-20	55	1,5	2	0,8	16-18	46	9,5	5
B.81	0,7	18-20	62	2	1	0,8	16-18	57	12	3
18°C										
S.A.S 405	0,8	13-15	63	3	2	0,9	11-13	55	19	3
S.A.S 56	0,8	13-15	57	2	4	0,9	11-13	52	14	8
B.81	0,8	13-15	59	3,5	2	0,9	11-13	60	17	4
24°C										
S.A.S 405	0,9	10-12	36	6,5	1	1	9-10	30	24	3
S.A.S 56	0,9	10-12	34	6	3	1	9-10	29	18,5	6
B.81	0,9	10-12	46	7	2	1	9-10	42	23	3
30°C										
S.A.S 405	AUCUN DEVELOPPEMENT									
S.A.S 56	AUCUN DEVELOPPEMENT									
B.81	AUCUN DEVELOPPEMENT									

1* = moyenne de vitesse de la croissance mycélienne en cm/jour.

2* = moyenne du temps de maturation les sclérotés, en jours.

3* = moyenne du nombre de sclérotés par boîte .

4* = moyenne du nombre de conidies par ml.

5* = moyenne du nombre de microconidies par ml.

REMARQUE. les nombres des conidies et les microconidies doivent être multipliés par $4 \cdot 10^4$ /ml (chaque culture correspond à 100 ml de solution).

Nous avons effectué des cultures à différentes températures, à la lumière et à l'obscurité. La croissance du mycélium a été estimée quotidiennement par mesure directe de l'accroissement du diamètre de la colonie. Nous avons déterminé la maturation des sclérotés en suivant quotidiennement l'évolution de la mélanisation de leur cortex. La moyenne du nombre de conidies et de microconidies par souche a été déterminée, lorsque les cultures étaient âgées de 30 jours, par comptage à l'hématimètre. Les microconidies de chaque culture sont collectées dans 10 ml d'eau et le comptage est effectué sur cette solution suivant le protocole décrit dans l'annexe "Matériel et Méthodes".

Les sclérotés produits ont été classés en 3 groupes en fonction de leur taille :

a- sclérotés de moins de 0,2 cm.

b- sclérotés de 0,2 cm à 0,5 cm.

c-sclérotés de plus de 0,5 cm.

Nous avons choisi la gamme de températures suivante : 7°C, 10°C, 14°C, 18°C, 24°C et 30°C, l'éclairement en lumière blanche étant assuré par des tubes daylight (Sylvania F 20 T 12 /D) avec des longueurs d'onde voisines de 450 nm. Lors des expériences réalisées à l'obscurité, les cultures ont été recouvertes de papier noir et placées dans des enceintes obscures.

2) Résultats

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I.3. Nous pouvons constater que la température joue un rôle très important sur le comportement des trois souches, surtout sur la vitesse de croissance du mycélium et la formation des sclérotés. La vitesse de croissance augmente proportionnellement à la température: elle est maximale à 24°C (0,9 cm/jour) puis elle se ralentit très fortement jusqu'à 30°C

température à partir de laquelle il n'y a plus de développement.

L'influence de la lumière sur la vitesse de croissance est très faible: on n'observe qu'une très légère stimulation par rapport à l'obscurité et cela pour toutes les températures testées.

La maturation des sclérotés et la vitesse de croissance mycélienne étant liées, le champignon commence d'abord par développer une couche mycélienne (thalle) sur la surface du milieu pour former ensuite des sclérotés. Nous pouvons vérifier que la vitesse de maturation des sclérotés augmente en fonction de la température. Elle est maximale à 18°C (13 jours) et faiblement accélérée par la lumière (11 jours).

La moyenne du nombre de sclérotés produits par souche augmente faiblement de 7°C à 18°C avec un maximum à cette dernière température (63 sclérotés /boîte) puis elle diminue très rapidement pour des températures plus élevées. Aux basses températures (7°C à 10°C) la lumière est sans effet sur la formation des sclérotés produits alors que pour les températures plus élevées, elle la freine légèrement.

Mais si l'on augmente la température, le champignon produit essentiellement des conidies, surtout à la lumière; nous avons en effet trouvé que la lumière défavorisait faiblement la formation des sclérotés dans ce cas. Harada (1977) a indiqué que la lumière inhibait la formation des sclérotés dans la plupart des espèces Japonaises du genre *Monilinia*.

La conidiogenèse augmente lentement avec la température, elle est maximale à 24°C surtout à la lumière qui la stimule par rapport à l'obscurité (Tan 1973).

L'effet de la température et des conditions d'éclairement sur la microconidiogenèse n'était pas net car les microconidies ont été produites

en nombre trop faible. Nous avons remarqué que les températures élevées (18°C et 24°C) sont plus favorables pour la microconidiogenèse.

Townsend (1957) a noté que la lumière n'avait aucun effet sur la production des sclérotas. Il a trouvé que la souche de *Botrytis cinerea* donnait la même quantité de sclérotas à la lumière et à l'obscurité, et qu'à 25°C il n'y avait pas formation de sclérotas mais uniquement du mycélium et des conidies.

Vanev (1966) a trouvé que la meilleure température pour la formation des sclérotas correspondait à la gamme comprise entre 8 et 14°C.

Najim (1987) a noté que l'obscurité totale avait un effet stimulant sur la formation de sclérotas de *Monilinia fructigena* et que la lumière continue avait un effet inhibiteur.

Tous ces résultats paraissent plus ou moins contradictoires. Nos propres résultats montrent que l'obscurité stimule faiblement la production de sclérotas et que les températures supérieures à 18°C défavorisent leur production.

B - EFFET DE 2 FACTEURS SUPPLEMENTAIRES SUR LA PRODUCTION DE MICROCONIDIES: L'HUMIDITE DU SUPPORT ET LE CONTENU DU MILIEU:

L'importance des microconidies dans le cycle de *B. fuckeliana* et le fait qu'elle apparaissent toujours à la fin de celui-ci de manière concomitante nous ont conduits à essayer de rechercher toutes les conditions qui permettront de mieux en maîtriser la production.

L'étude préliminaire conduite ci-dessus nous a en effet montré combien cette étape de différenciation microconidienne était sensible aux facteurs physiques, la lumière et la température en particulier.

Nous avons voulu voir si les conditions liées au milieu de culture : nature de celui-ci et humidité relative jouent un rôle dans la microconidiogenèse. En effet, Townsend (1952) et Yoshihisa (1989) ont montré que l'humidité du support stimulait la germination conidiogène des sclérotés, alors que Brierley (1918) considère que l'humidité du support est sans effet sur la microconidiogenèse.

L'utilisation d'un même milieu respectivement liquide ou gélosé nous a semblé être un bon moyen pour déterminer l'influence de l'humidité de l'environnement du sclérote.

Pour cela nous avons essayé une série de milieux très simples faciles à utiliser sous les deux états.

1) Protocole expérimental

Nous avons préparé les milieux suivants à l'état liquide et à l'état gélosé (agar 1,5%) : malt 2%; malt agar 2%; PDA; PDB; eau distillée stérile; eau distillée gélosée.

Les grains de blé nous ont permis d'utiliser des quantités d'eau différentes dans un même volume. Nous en avons donc placé 8g dans 2 boîtes en ajoutant respectivement 25 et 35 ml d'eau distillée stérile.

Les cultures ont été conduites avec les paramètres physiques définis précédemment : 18°C et 12 heures d'éclairement sur 24 heures. Les incubations ont duré 60 jours, au bout desquels les microconidies produites ont été comptées à l'hématimètre après avoir été récupérées par lavage de la culture solide avec 100 ml d'eau distillée. Les cultures liquides ont été simplement complétées à 100 ml.

2) Résultats

Les résultats des différents comptages sont donnés dans le tableau I.4. Quel que soit le milieu considéré, la microconidiogenèse est fortement stimulée sur les milieux liquides, même dans le cas de l'eau distillée où le développement est très faible.

Les milieux grains de blé confirment s'il en était besoin, le rôle stimulant du facteur humidité du support puisque la production est pratiquement multipliée par un facteur 5 lorsque la quantité d'eau fournie passe de 25 à 35 ml, autrement-dit lorsque l'atmosphère des boîtes est fortement saturée en humidité.

Nos résultats contredisent donc ceux de Brierley (1918) quant au rôle de ce facteur sur la formation des microconidies.

Ce tableau montre que la nature du milieu joue également un rôle puisque, si nous comparons entre eux les divers milieux respectivement gélosés et liquides, nous pouvons voir que le PDB est plus favorable à la formation des microconidies que le malt. Les grains de blé restent néanmoins le meilleur milieu pour la production de microconidies, à condition qu'ils soient accompagnés de la plus grande quantité d'eau possible.

Nous avons ensuite voulu vérifier si les facteurs éclairément et température interféraient avec l'état physique du milieu. Pour cela nous avons conduit des cultures sur milieu de Huguenin respectivement liquide et gélosé à 1,5% en les plaçant à diverses températures (7, 10, 14, 18 et 24°C). Une série complète a été incubée en éclairément continu et une autre à l'obscurité totale. Un premier comptage dans les conditions habituelles a été effectué après 30 jours d'incubation, et un second après 60 jours.

Tableau I.4 : Effet de l'humidité sur la production des microconidies.

Milieux.	a*	b*	c*	d*	e*	f*	g*	h*
M.	56	17	141	654	85	478	27	312

M. = Moyenne des nombres de microconidies après 60 jours d'incubation à 18°C (elles doivent être multipliées par $4.10^4/ml$, chaque culture = 100 ml de solution). a* = Eau distillée stérile; b* = Eau gélosée; c* = Grains de blé (8 g + 25 ml d'eau distillée); d* = Grains de blé (8 g + 35 ml d'eau distillé); e* = P.D.A; f* = P.D.B; g* = Malt-agar 2%; h* = Malt liquide 2%.

Tableau I.5 : Effet de la lumière, de la température, de l'âge de la culture et de l'humidité sur la production des microconidies

T.	milieu solide				milieu liquide			
	lumière		obscurité		lumière		obscurité	
	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*
7°C	0	14	0	12	0	26	0	15
10°C	25	39	17	33	63	109	0	74
14°C	41	60	35	57	85	275	16	148
18°C	45	76	32	55	208	431	129	328
24°C	59	87	46	71	150	289	117	256

T = Températures d'incubation.

1* = Premier comptage après 30 jours (moyenne des nombres de microconidies)

2* = Deuxième comptage après 60 jours (moyenne des nombres de microconidies)

Remarque: Toutes les moyennes des nombres de microconidies doivent être multipliées par $4.10^4/ml$ (chaque culture = 100 ml de solution)

Les résultats sont rapportés dans le tableau I.5. Ils confirment l'influence du milieu liquide sur la production des microconidies ainsi que les conditions de température définies précédemment: 18°C est la température optimale pour la microconidiogenèse. La production est très stimulée par la lumière et cela dans tous les cas. Même dans les conditions les plus défavorables, la microconidiogenèse est toujours plus importante en conditions humides.

Il est également intéressant de noter que les mêmes différences entre séries respectives apparaissent au cours des 2 comptages successifs: 30 et 60 jours avec des valeurs évidemment plus faibles au premier comptage. Ceci montre donc que les facteurs humidité, température et à moindre degré éclairage, exercent leurs effets précocement dès le début de la production de microconidies.

C - CONCLUSION

Les résultats que nous venons de décrire, montrent qu'il est possible d'orienter sélectivement une culture dans le sens de la production de sclérotés ou de microconidies.

Nous définissons donc les conditions expérimentales que nous utiliserons pour toutes nos expériences :

- Pour la production de sclérotés
 - . Milieu : broyat de grains de blé.
 - . Température : 18°C
 - . Obscurité continue
 - . Durée d'incubation : 15 à 18 jours.

Tableau 1.6 : Comportement des souches monoascospores et des souches "sauvages"

SOUCHES	LUMIERE					OBSCURITE				
	1*	2*	3*	4*	5*	1*	2*	3*	4*	5*
S.1	0,9	15	42	875,000	0	0,8	15	51	25,000	0
S.2	"	"	38	3,125000	150,000	"	"	53	87,500	100,000
S.3	"	"	46	1,150000	57,500	"	"	60	50,000	50,000
S.4	"	"	54	307,500	112,500	"	"	53	137,500	62,500
S.5	"	"	49	325,000	0	"	"	56	162,500	0
S.6	"	"	45	2,400000	325,000	"	"	49	75,000	125,000
S.7	"	"	48	2,425000	0	"	"	47	150,000	0
S.8	"	"	50	3,350000	37,500	"	"	59	125,000	12,500
S.9	"	"	66	200,000	62,500	"	"	65	0	55,000
S.10	"	"	58	332,000	0	"	"	67	25,000	0
S.12	"	"	62	425,000	0	"	"	63	25,000	0
S.15	"	"	49	700,000	0	"	"	57	12,500	0
S.16	"	"	53	300,000	0	"	"	62	0	0
S.17	"	"	61	425,000	187,500	"	"	68	25,000	62,500
S.18	"	"	48	263,200	0	"	"	56	25,000	0
S.19	"	"	54	157,500	32,500	"	"	55	25,000	18,500
S.20	"	"	56	275,000	75,000	"	"	57	25,000	25,000
S.21	"	"	60	272,500	112,500	"	"	65	12,500	57,000
S.22	"	"	59	125,000	25,000	"	"	60	25,000	25,000
S.23	"	"	53	650,000	0	"	"	49	200,000	0
S.24	"	"	61	1,057500	0	"	"	63	37,500	0
S.25	"	"	56	700,000	0	"	"	61	25,000	0
S.26	"	"	49	900,000	25,000	"	"	55	62,500	12,500
S.27	"	"	55	725,000	37,500	"	"	64	50,000	25,000
S.28	"	"	63	532,500	0	"	"	62	50,000	0
S.29	"	"	57	450,000	12,500	"	"	69	12,500	0
S.30	"	"	62	165,000	25,000	"	"	71	0	25,000
S.31	"	"	53	290,000	12,500	"	"	68	25,000	0
S.32	"	"	57	400,000	25,000	"	"	64	37,500	0
S.11	"	0	0	75,000	4,750000	"	0	0	0	4,25000
S.13	"	0	0	37,500	4,000000	"	0	0	0	3,700000
S.14	"	0	0	200,000	3,400000	"	0	0	0	3,250000
E.C6	"	0	0	125,000	3,750000	"	0	0	50,000	3,000000
E.F1	"	15	42	3,500000	225,000	"	15	48	1,625000	150,000
E.F2	"	15	51	325,000	450,000	"	15	55	275,000	125,000
E.428	"	15	24	2,425000	332,000	"	15	27	1,800000	300,000
E.450	"	15	28	3,250000	157,000	"	15	32	2,850000	150,000
E.69	"	15	16	4,150000	75,000	"	15	23	3,425000	75,000

1* = moyenne de vitesse de la croissance mycélienne en cm/jour.
 2* = nombre de jours de maturation des sclérotos.
 3* = moyenne de nombre de sclérotos par boîte.
 4* = moyenne des nombre de conidies/ml (chaque culture = 100 ml de solution).
 5* = moyenne des nombre de microconidies/ml (chaque culture = 100 ml de solution).

- Pour la production de microconidies :
 - . Milieu : grains de blé (8 g) + eau distillée (35 ml)/boîte de Pétri.
 - . Température : 18°C
 - . Eclairage alterné (12h L./12h O.)
 - . Durée d'incubation : 60 jours

II. CLASSIFICATION DES SOUCHES.

En nous plaçant dans les conditions que nous venons de définir, nous avons étudié le comportement de 32 souches monoascospores (que nous avons déjà isolées) et de 6 souches sauvages. Les résultats que nous avons obtenus (tableau I.6) montrent tout d'abord que toutes les souches présentent la même vitesse de croissance. Dans tous les cas, la durée de maturation des sclérotés est identique. Les différences apparaissent nettement si l'on considère l'aptitude à produire des sclérotés, des conidies ou des microconidies.

La production de conidies peut varier d'un facteur 100 suivant les souches et celle de microconidies d'un facteur 200 pour les souches qui sont capables d'en produire. En effet, certaines souches ne produisent jamais de microconidies, ce qui nous conduit à faire une subdivision dans le groupe des souches productrices de sclérotés suivant qu'elles seront aptes ou non à former en même temps des microconidies.

D'après le tableau I.6, nous classerons donc nos souches en 3 groupes :

- 1) Souches conidiogènes : Ce sont des souches qui produisent en grande quantité du mycélium et des conidies et rarement des sclérotés (B.450; B.69; B.428).
- 2) Souches à sclérotés : Ce sont des souches qui produisent en grande quantité de sclérotés accompagnés ou non de microconidies :

- a) Souches produisant des sclérotés et très rarement de microconidies (S.1; S.5; S.7; S.10; S.12; S.15; S.16; S.18; S.23; S.24; S.25 et S.28).
- b) Souches produisant des sclérotés et des microconidies en même temps (S.2; S.3; S.4; S.6; S.8; S.9; S.17; S.19; S.20; S.21; S.22; S.26; S.27; S.29; S.30; S.31; S.32; S.A.S405; S.A.S56; B.F1; B.F2 et B.81).
- 3) Souches microconidiennes : Ce sont des souches qui produisent uniquement des microconidies (S.11; S.13; S.14 et B.C.6).

III- CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE.

Nous avons essayé d'établir les conditions nutritives les meilleures qui permettaient de produire sélectivement des sclérotés, du mycélium ou des microconidies.

A - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

Plusieurs travaux ont montré que les caractères morphologiques du genre *Botrytis* se modifient selon les conditions de l'environnement et les conditions nutritionnelles utilisées.

Paul (1929) qui a étudié le développement en culture de souches de *Botrytis cinerea* in vitro a montré que, en fonction du milieu, la production de mycélium, celle des conidies ou la formation de sclérotés peuvent être respectivement favorisées et devenir ainsi prépondérantes.

Dumont (1965) a rapporté que *Botrytis alii* ne forme pas de sclérotés à la lumière, mais il en forme abondamment à l'obscurité totale entre 3 et

15°C sur milieu P.D.A. Il a noté également que cette production de sclérotés plus abondante résulte probablement de l'augmentation de l'humidité .

Menzinger (1966 a) a rapporté que le fait de cultiver une souche de *Botrytis* sur milieux nutritifs différents pouvait induire des modifications considérables des caractères morphologiques de cette souche, comme la taille des conidies, la forme des sclérotés, la morphologie du mycélium et d'autres caractères sur lesquels la taxonomie des espèces a été basée. Il a recensé des variations morphologiques considérables sur 12 espèces de *Botrytis*, ces variations étant suffisamment importantes pour mettre en doute la taxonomie basée sur les caractères considérés.

Nonaka et Morita (1967) ont décrit 8 types de sclérotés à partir de 80 souches de *Botrytis cinerea* isolées de 56 hôtes différents. Pour la plupart de ces souches les sclérotés sont de types différents selon la température utilisée pour le développement.

Lauber (1971) a distingué des lignes physiologiques différentes chez 5 souches sauvages de *Botrytis cinerea*: il a montré que la taille des conidies dépendait du pH, du rapport C/N et des éléments nutritifs des milieux de culture.

Vanev (1972) a obtenu des changements dans la taille des conidies et les caractères des souches de *Botrytis cinerea* par de simples modifications de la température et des milieux de culture utilisés; il a constaté que les changements morphologiques étaient réversibles en replaçant les souches dans leurs conditions de développement initiales. Phillips (1987) a trouvé que la taille des conidies, le nombre et le volume des noyaux et leur pouvoir infectieux augmentaient en présence de fortes concentrations en glucose.

Tous ces résultats montrent la nécessité de standardiser les milieux de culture synthétiques et les conditions d'environnement (température, lumière et humidité) pour conduire de façon rationnelle les recherches morphologiques, physiologiques et taxonomiques sur le genre *Botrytis*. Cette standardisation devrait diminuer les problèmes de reproductibilité des résultats qui découlent de l'utilisation de conditions nutritives et culturelles différentes d'un laboratoire à un autre.

Les conditions physiques de l'environnement ont été déjà étudiées (Paul 1929, Peiris 1947, Townsend 1957, Natalyina 1963, Vanev 1966 et Tan 1973). La variabilité des résultats obtenus (Paul 1929, Hansen 1932 et Grindel 1979) nous a conduits à répéter les expériences avec nos propres souches afin de définir les conditions optimales que nous utiliserions par la suite.

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude de l'influence sur la croissance et la production de sclérotés de *Botrytis cinerea*, des différents éléments minéraux, des vitamines et des formes sous lesquelles étaient fournis le carbone et l'azote.

Peiris (1947) a trouvé que le nombre de sclérotés produits par une souche de *Botrytis cinerea* sur milieu glucose/peptone-agar augmentait proportionnellement à la concentration en glucose et que des concentrations plus élevées de peptone favorisaient la formation de conidies.

Townsend (1957) a fait plusieurs constatations intéressantes:

- Les sclérotés présentent des besoins nutritifs différents au cours des phases successives de leur évolution : initiation, développement, maturation.
- Les concentrations plus élevées en sucres et les faibles concentrations en azote dans le milieu, donc un rapport C/N élevé, favorisent l'initiation des sclérotés mais défavorisent leur maturation.

- Le milieu qui est favorable à la croissance du mycélium ainsi qu'à l'initiation de sclérotas n'est pas forcément favorable à leur maturation. La formation des ébauches dans les sclérotas est liée à la présence dans le milieu de quantités données de sucres et d'azote consommables, mais ces quantités ne sont pas forcément suffisantes pour leur maturation.
- Glucose, maltose, saccharose, lactose, fructose et amidon sont les meilleures sources de carbone.
- Peptone, asparagine et nitrate de potassium sont les meilleures sources d'azote.
- Les pH acides stimulent la formation de sclérotas.

Ces résultats ont été quelque peu complétés par ceux de Kamoen (1963 et 1964) qui ont noté que :

- La concentration en carbone a une influence sur la taille des sclérotas : un nombre plus élevé de gros sclérotas est formé avec des concentrations plus fortes sans modification du nombre total de sclérotas formés.
- Il y a également de fortes variations dans la formation des sclérotas, le plus grand nombre de gros sclérotas étant obtenu avec l'oxalate d'ammonium; les milieux de culture contenant du nitrate de potassium et du nitrate d'ammonium sont également favorables. Peu de sclérotas se forment sur sulfate d'ammonium.
- Le *Botrytis cinerea* se développe bien sur 7 sources de carbone (glucose, maltose, saccharose, galactose, fructose, lactose et raffinose).

- Le pH initial du milieu a peu d'influence. Pour des pH compris entre 2,5 et 7,5, cet auteur a noté que le développement mycélien était légèrement meilleur à pH = 4,5 et qu'un pH initial égal à 2,5 conduisait à une production de sclérotas en plus grand nombre.

Vanev (1966) a fait ses expériences en conditions de laboratoire mais aussi en conditions naturelles, il a constaté que:

- L'azote organique favorise beaucoup plus la formation de sclérotas que l'azote minéral et qu'un milieu pauvre en azote la stimule.
- L'addition dans le milieu de zinc, iode, bore, calcium, potassium, phosphate, manganèse, fer et molybdène dans les mêmes concentrations que dans le jus de raisin stimule la formation de sclérotas.
- Les pH acides défavorisent la formation des sclérotas.
- La germination mycélienne des sclérotas avec des pH acides est normale mais les pH alcalins inhibent le développement végétatif des sclérotas.
- Ce champignon (*Botrytis cinerea*) suit toujours le cycle asexué (sclérote -conidiophore -mycélium -conidiophore ou sclérote) sans parvenir à la forme sexuée car cette forme a besoin de certaines conditions spéciales (basse température et lumière) qui ne se trouvent pas facilement dans la nature. Ce champignon s'est adapté au cycle asexué court qui ne demande pas de conditions spéciales et la forme sexuée a disparu. Nous ne sommes pas d'accord avec l'hypothèse de cet auteur.

Willetts (1968) a étudié les conditions de production des sclérotas de *Sclerotinia fructicola*; il parvient aux conclusions suivantes:

- Le glucose, le fructose et le saccharose sont les sources de carbone les plus favorables pour la formation de sclérotas et les concentrations les plus élevées en donnent de grandes quantités.

- Des concentrations en peptone (seule source d'azote) supérieures à 5% stimulent la formation des sclérotos.
- Le pH optimum pour la formation des sclérotos est différent d'une souche à l'autre (pH 4 et pH 4,8) et c'est aussi le pH optimum pour le développement mycélien.

Zoberi (1980) a étudié les exigences de *Sclerotium rolfsii* pour assurer sa croissance et former des sclérotos; il a trouvé que:

- Une gamme étendue de sources de carbone stimule la formation des sclérotos : le glucose est nettement la source du carbone la plus efficace.
- Les sclérotos se forment avec toutes les sources d'azote testées (nitrate de sodium, sulfate d'ammonium, glycine, lysine, asparagine, thréonine, hydrolysate de caséine, peptone et extrait de levure), le meilleur rendement est obtenu avec le sulfate d'ammonium et le plus faible avec la lysine.
- *Sclerotium rolfsii* produit des sclérotos même sur des milieux dépourvus de vitamines.
- Les sclérotos ne se forment pas sur des milieux sans potassium.

Une étude bibliographique de la formation des microconidies montre que la plupart des recherches ont porté sur les différents modes de formation des microconidies et leur rôle dans le cycle sexuel des champignons. Par contre les recherches qui ont été effectuées sur les conditions générales de production des microconidies sont peu nombreuses. Il faut également préciser que les travaux de Brierley (1918) sur les conditions de production des microconidies de *Botrytis cinerea* et également Willetts (1968) sur *Monilinia fructicola* n'étaient pas des études quantitatives mais des études basées sur l'observation visuelle; elles manquaient donc de précision scientifique.

Tableau I.7 : Effets de la concentration du milieu en farine de blé sur la formation et l'évolution des sclérotés.

concentrations en g/l	1*	2*	3*	4*	5*
20	52	0	18	34	15
40	68	0	14	54	13
60	85	0	9	76	13
80	96	0	7	89	13
100	118	0	5	113	13

- 1* = Nombre total des sclérotés/boîte.
 2* = Moyenne du nombre de sclérotés de moins de 0,2 cm.
 3* = Moyenne du nombre de sclérotés de 0,2 à 0,5 cm.
 4* = Moyenne du nombre de sclérotés de plus de 0,5 cm.
 5* = Temps moyen de maturation des sclérotés (en jours).

Nous pouvons remarquer la très grande variabilité des résultats obtenus, aussi, nous avons été conduits à effectuer certaines vérifications pour bien déterminer, d'abord l'effet de tous les éléments nutritifs qui composent le milieu synthétique utilisé, et établir ensuite les meilleures conditions nutritives pour la production de sclérotas et de microconidies que nous utiliserons pour nos recherches sur le cycle sexuel de *Botrytis cinerea*.

B - CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE GENERAL

1) Milieus favorables pour la production des sclérotas.

a) Amélioration du milieu "grains de blé".

Le milieu "grains de blé" utilisé par Drayton (1934) présente des caractéristiques intéressantes:

- Il donne une forte quantité de sclérotas de taille volumineuse.
- Il conduit à une formation de sclérotas très rapide.

Par contre, les sclérotas formés sur ce milieu sont très durs (Faretra 1988a) ce qui est un inconvénient indiscutable.

Pour ces raisons nous avons essayé de l'améliorer. Nous avons broyé les grains de blé et utilisé la "farine" ainsi obtenue à diverses concentrations, 20, 40, 60, 80 et 100g/l d'eau distillée. Ce milieu est stérilisé à 0,5 atmosphère pendant 20 minutes.

D'après le tableau I.7 nous pouvons constater que les sclérotas de petite taille (0,2 cm) ont été éliminés totalement en utilisant ce milieu et le nombre des sclérotas de grande taille (plus de 0,5 cm) augmente d'une manière remarquable .

Tableau I.8 : Essais de milieux pour la production des sclérotés.

Souches	Milieu de Okamoen		Milieu de Huguenin	
	1*	2*	1*	2*
S.A.S 405	1,4	43	1,7	78
S.A.S 56	1,4	39	1,7	77
S.1	1,4	47	1,7	78
S.2	1,4	33	1,7	64
S.3	1,4	48	1,7	75
S.4	1,4	40	1,7	65
S.5	1,4	36	1,7	67
S.6	1,4	31	1,7	69
S.7	1,4	43	1,7	73
S.8	1,4	35	1,7	64

1* = Accroissement du diamètre de la colonie cm/jour.

2* = Moyenne de nombre de sclérotés par boîte.

De cette façon nous avons réussi à obtenir un milieu avec une surface régulière, et en même temps une grande quantité de sclérotas ayant presque la même taille, gros, granuleux et avec un cortex moins dur.

b) Choix d'un milieu synthétique.

Il est toujours aléatoire de conduire une expérimentation physiologique sur un milieu naturel. Pour cette raison, nous avons souhaité utiliser un milieu synthétique dont la composition est constamment connue. C'est pourquoi nous avons essayé des milieux synthétiques traditionnels. Nous avons choisi 10 souches monoascospores pour comparer leur comportement sur les milieux synthétiques utilisés respectivement par Kamoen (1963) et Huguenin (1970).

D'après le tableau I.8, nous pouvons remarquer que le nombre de sclérotas est beaucoup moins important sur le premier milieu que sur le deuxième. Cette différence revient à notre avis à la carence en éléments nutritifs dans le premier milieu qui défavorise la production des sclérotas et pousse les souches au développement mycélien. Pour cette raison nous avons préféré le milieu de Huguenin qui nous a semblé bien plus équilibré.

2) Milieux classiques permettant une bonne production de microconidies.

La plupart des souches de *Botrytis cinerea* produisent des microconidies mais elles en produisent des quantités toujours très faibles et très tardivement (30 à 45 jours). Nous avons essayé de trouver un milieu qui favorise et accélère la formation des microconidies pour en obtenir des quantités suffisantes en fonction de nos besoins.

Tableau I.9 : Moyennes des nombres des microconidies après 45 jours à 18°C

Souches	Lumière				Obscurité			
	a*	b*	c*	d*	a*	b*	c*	d*
S.A.S.405	183	140	84	57	157	132	66	71
S.A.S.56	266	202	173	156	225	176	152	158
S.1	132	145	69	83	115	90	78	54
S.2	168	150	88	75	147	145	71	48
S.3	111	95	74	50	103	67	49	38
S.4	175	193	81	97	95	72	75	51
S.5	125	106	65	78	116	83	69	66
S.6	178	163	92	86	164	150	58	69
S.7	82	54	61	68	95	62	50	44
S.8	139	108	77	60	126	118	58	67

a* = Milieu grains de blé; b* = Milieu P.D.B.

c* = Milieu malt-agar 2%; d* = Milieu czapek-agar.

Remarque: Moyenne de nombre de microconidies doivent être multipliées par $4 \cdot 10^4$ /ml (chaque culture = 100 ml de solution).

Nous avons choisi 4 milieux différents:

- a*) Grains de blé b*) P.D.B. (Potato Dextrose Broth)
 c*) Malt-agar 2%. d*) Czapek - agar.

Nous avons testé 10 souches monoascospores sur les 4 milieux. Les cultures ont été incubées à 18°C à l'obscurité et à la lumière; ensuite nous avons effectué un comptage de microconidies après 30 jours d'incubation en utilisant un hématimètre.

D'après le tableau I.9, nous pouvons constater que les milieux grains de blé et P.D.B. stimulent nettement la production des microconidies.

C - ESSAIS D'AMELIORATION DU MILIEU CHOISI

Les valeurs de certains éléments sont importantes dans un milieu de culture :

- Source carbonée.
- Source azotée.
- Eléments minéraux.
- Vitamines.
- pH.

Nous avons déterminé les influences respectives de chacun de ces facteurs sur la production préférentielle de mycélium, de sclérotés ou de microconidies. Pour cela, nous avons choisi deux souches: une souche mono-ascospore (S.A.S 405) et une souche sauvage (B.81). Les deux souches ont été cultivées dans des boîtes de Pétri (8,5 cm) en matière plastique contenant chacune 25 ml de milieu Huguenin solide et aussi sur milieu liquide (le même milieu) dans des fioles de Roux (100 ml par fiole). Le mycélium nécessitant une bonne oxygénation, celle-ci est obtenue en garnissant le fond des fioles avec 18 baguettes de verre plein de 6 mm de diamètre.

Nous avons effectué nos essais sur milieu solide et sur milieu liquide. La production de sclérotas a été identique dans les 2 cas. Par contre nous avons remarqué que le milieu liquide stimulait nettement la formation des microconidies.

Les cultures ont été conduites à l'obscurité à 18°C pendant 45 jours. Les conséquences induites par les modifications apportées au milieu de base utilisé (milieu de Huguenin) ont été appréciées en fonction de 5 critères, comme dans les expériences préliminaires :

- Nombre total de sclérotas.
- Taille des sclérotas.
- Vitesse de maturation de sclérotas.
- Vitesse de croissance du mycélium.
- Nombre de microconidies (après 60 jours d'incubation).

1) Influence de la nature des sources de carbone
et de leurs concentrations.

Le milieu de culture devant obligatoirement contenir une source carbonée et une source azotée, la source d'azote doit présenter une valeur et une forme d'apport constantes (choisies arbitrairement) pendant que l'on fait varier la source carbonée en qualité et quantité.

a) Conditions expérimentales.

La source azotée est fournie sous forme de nitrate de potassium à raison de 138 mg par litre (milieu de Huguenin).

Nous avons testé plusieurs formes d'apport du carbone : monosaccharides, disaccharides, polysaccharides et polyosides sous forme de maltose, glucose, lactose, xylose, saccharose, amidon, inuline, inositol, arabinose, sorbitol et mannitol à raison de 8 g de carbone par litre.

Afin de préciser l'influence de la concentration en carbone sur la croissance et la production de sclérotés, nous avons employé le glucose aux concentrations de 0,1; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 28 et 32 g de carbone par litre.

b) Résultats

D'après les tableaux I.10, I.10a, I.11 et I.11a qui montrent les résultats au bout de 45 jours, nous pouvons constater que la vitesse de la croissance mycélienne des deux souches et leur production de sclérotés sont satisfaisantes sur les milieux de culture contenant du glucose, du maltose, du lactose, du xylose, du saccharose et de l'amidon (de 67 à 96 sclérotés par boîte).

Par contre sur arabinose, mannitol, inuline, inositol et sorbitol, la vitesse de croissance est faible (tableau I.10a) par rapport aux autres sources utilisées. La production de sclérotés (tableau I.10) est complètement inhibée sur les trois premières sources et très faible sur les autres (de 13 à 25 sclérotés par boîte). Townsend (1957) a noté que l'inuline et le mannitol étaient des sources de carbone difficilement assimilables par le champignon, ce qui pourrait expliquer l'inhibition de la formation des sclérotés.

Glucose, maltose et xylose nous ont donné les plus fortes quantités de sclérotés ainsi que la plus forte production de gros sclérotés (de 12 à 16 sclérotés par boîte ont une taille de plus de 0,5 cm). La nature du sucre a un effet faible sur la quantité de gros sclérotés formés mais elle a un effet sensible sur le nombre total de sclérotés. Quelle que soit la forme sous laquelle le carbone est fourni, nous ne notons aucune modification significative dans la maturation des sclérotés. Par contre la vitesse de la croissance mycélienne est variable en fonction du sucre utilisé (tableau I.10a).

**Tableau I.10 : EFFET DE DIFFERENTES SOURCES DE CARBONE SUR
LA FORMATION DES SCLEROTES ET DES MICROCONIDIIES**

souches	S.A.S 405						B.81					
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	1*	2*	3*	4*	5*	6*
GLUCOSE	96	12	70	14	15	417	127	31	85	11	15	311
LACTOSE	75	3	56	16	13	428	84	7	62	15	13	289
MALTOSE	91	8	76	7	15	948	88	13	67	9	15	470
XYLOSE	85	4	72	9	15	610	80	10	66	4	15	352
AMIDON	67	6	54	7	15	529	89	12	67	10	15	280
SACCHAROSE	77	7	58	12	15	502	104	22	70	12	15	324
ARABINOSE	0	0	0	0	0	408	0	0	0	0	0	246
MANNITOL	0	0	0	0	0	436	0	0	0	0	0	295
INULINE	0	0	0	0	0	372	0	0	0	0	0	225
INOSITOL	13	9	4	0	17	357	14	9	5	0	17	278
SORBITOL	25	17	8	0	17	415	38	12	26	0	17	327

1* = Moyenne du nombre total de sclérotés par boîte.

2* = Moyenne du nombre de sclérotés de moins de 0,2 cm.

3* = Moyenne du nombre de sclérotés de 0,2 à 0,5 cm.

4* = Moyenne du nombre de sclérotés de plus de 0,5 cm.

5* = Temps moyen de maturation des sclérotés (jours).

6* = Moyenne de nombre de microconidies/ml (elles doivent être multipliées par $4 \cdot 10^4$ /ml, chaque culture = 100 ml de solution)

REMARQUE : dans tous les cas le sucre est en quantité suffisante pour correspondre à une concentration de 8 g/l de carbone dans le milieu l'azote (0,138 g N/l) est fourni sous forme de KNO_3 .

Tableau I.10a: EFFET LA NATURE DE LA SOURCE CARBONÉE SUR LA VITESSE DE CROISSANCE DU MYCELIUM

nature de la source carbonée	maltose		glucose		xylose		saccharose		lactose		mannitol		amidon		inuline		sorbitol		inositol		arabinose	
	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*
1	0,4	0,6	0,6	0,5	0,7	0,7	0,5	0,3	0,5	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3
2	1,5	1,8	1,7	1,8	2,1	2,0	1,5	1,2	1,8	1,4	1,1	1,0	1,6	1,8	1,0	1,2	1,4	0,9	1,3	1,1	1,4	1,2
3	3,8	3,6	4,1	3,9	4,2	4,0	3,3	2,7	3,4	2,9	1,9	1,8	3,1	3,2	2,4	2,1	3,5	2,0	3,0	2,0	3,0	2,7
4	5,7	5,6	6,0	5,9	6,1	5,9	5,6	4,0	5,7	4,9	3,6	3,2	4,9	5,0	3,9	3,6	5,0	3,7	4,4	3,5	4,8	4,3
5	7,8	7,9	8,1	8,0	8,3	8,2	7,6	5,8	7,0	6,7	5,3	4,8	6,5	6,5	5,5	5,0	6,7	5,5	5,9	5,0	6,6	6,2
6	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	7,6	8,5	8,1	6,9	6,6	8,0	8,2	6,7	6,3	8,3	6,8	7,4	6,5	8,1	8,0
7	---	---	---	---	---	---	---	8,5	---	8,5	8,3	7,9	8,5	8,5	8,5	8,2	8,5	8,3	8,5	8,0	8,5	8,5
8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	8,5	8,5	---	---	---	8,5	---	8,5	---	8,5	---	---

1* = Souche S.A.S 405

2* = Souche B.81

--- = Le mycélium envahit complètement la boîte de Pétri (8,5 cm).

REMARQUE : les valeurs correspondent à l'accroissement quotidien du diamètre de la colonie en cm : la croissance est exprimée en cm/jour.

**Tableau I.11 : EFFETS DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN CARBONE
SUR LA FORMATION DES SCLEROTES ET DES MICROCONIDIIES**

souches	S.A.S 405						B.81						
	concentration en carbone (g/l)	1*	2*	3*	4*	5*	6*	1*	2*	3*	4*	5*	6*
0,1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5		8	8	0	0	13	203	12	12	0	0	13	54
1		24	19	5	0	13	239	29	20	9	0	13	89
2		33	7	27	0	13	287	36	8	27	1	13	134
4		62	11	42	9	13	340	70	26	38	6	13	162
6		70	9	51	10	13	373	94	41	40	13	13	189
8		87	6	62	17	13	415	118	35	69	14	13	243
10		104	8	74	22	13	447	122	33	72	17	13	264
12		120	8	83	29	15	434	136	46	76	14	15	289
16		116	11	80	31	18	420	138	39	78	21	18	315
20		120	10	78	32	22	411	121	37	64	20	22	275
24		114	9	77	28	25	427	115	36	65	14	25	253
28		93	8	64	21	28	416	90	30	47	13	26	268
32		78	8	52	18	31	424	82	28	41	13	30	273

1* = Moyenne du nombre total de sclérotés par boîte.

2* = Moyenne du nombre de sclérotés de moins de 0,2 cm.

3* = Moyenne du nombre de sclérotés de 0,2 à 0,5 cm.

4* = Moyenne du nombre de sclérotés de plus de 0,5 cm.

5* = Temps moyen de maturation des sclérotés (jours).

6* = Moyenne de nombre de microconidies/ml (elles doivent être multipliées par 4.10^4 /ml, chaque culture = 100 ml de solution)

REMARQUE: le carbone est fourni sous forme de glucose et l'azote sous forme KNO_3 (0,138 g N/l).

D'après le tableau I.10 nous pouvons constater que les différentes sources de carbone utilisées permettent la formation des microconidies. Les meilleures sources de carbone sont le maltose, le xylose, l'amidon, le saccharose et le glucose.

Willetts (1968) a noté que *Sclerotinia fructicola* produisait des microconidies sans grandes variations quelle que soit la source de carbone. John Mass et Powelson (1972) ont trouvé que le maltose, le glucose, le saccharose et l'amidon étaient les meilleures sources de carbone stimulant la conidiogenèse de *Botrytis cinerea*. En nous référant aux résultats obtenus quant à l'influence des sources carbonées sur la production de sclérotés, nous pouvons donc dire que les sources de carbone qui stimulent la formation des sclérotés de *Botrytis cinerea* stimulent en même temps la microconidiogenèse et également la conidiogenèse. Par contre les sources de carbone qui ne sont pas favorables à la production de sclérotés (mannitol, inuline, sorbitol, inositol et arabinose) produisent presque normalement des microconidies.

La vitesse de croissance du mycélium (tableau I.11a) augmente proportionnellement à la concentration du carbone dans le milieu, elle atteint son maximum à 12 g C/l puis elle diminue légèrement malgré l'augmentation de la concentration en carbone. Wang et Le Tourneau (1971) ont trouvé que 12 g C/l était l'optimum pour le développement et la formation des sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum*. En général le milieu nutritif qui favorise le développement mycélien favorise aussi la formation des sclérotés .

La concentration du carbone dans le milieu (tableau I.11) a une influence remarquable sur la quantité de sclérotés formés; les concentrations plus fortes en carbone donnent un nombre de sclérotés plus élevé que les faibles concentrations. Le nombre de gros sclérotés augmente

Tableau I.11a: EFFET DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN CARBONE SUR LA VITESSE DE CROISSANCE DU MYCELIUM

concentration en 0,5 carbone (g/l)		1		2		4		6		8		10		12		16		20		24		28		32				
jours /		1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*			
1		0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,5	0,5	0,5	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3
2		0,7	0,5	0,9	0,8	1,1	1,1	1,3	1,2	1,6	1,4	1,9	1,7	2,1	1,9	2,0	2,0	1,8	1,7	1,5	1,3	1,6	1,5	1,4	1,4	1,1	1,1	
3		1,6	1,5	1,9	1,9	2,3	2,3	2,9	2,9	3,3	3,1	3,6	3,5	3,6	3,4	3,3	3,3	3,4	3,1	2,8	2,6	3,1	3,0	3,0	3,0	2,8	2,7	
4		3,0	3,0	3,7	3,5	3,9	3,8	4,7	4,5	5,5	5,2	5,8	5,7	5,9	5,8	5,7	5,7	5,5	5,3	4,5	4,5	4,8	4,8	4,6	4,5	4,3	4,2	
5		4,7	4,6	5,4	5,3	5,8	5,7	6,6	6,5	7,1	7,0	7,6	7,4	7,7	7,4	7,4	7,2	7,2	7,0	6,2	6,1	6,6	6,4	6,4	6,3	6,0	6,0	
6		6,3	6,3	7,2	7,0	7,7	7,6	8,3	8,3	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,0	7,8	8,2	8,0	8,0	7,8	7,5	7,5	
7		8,2	8,2	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	
8		8,5	8,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

1* = Souche S.A.S 405

2* = Souche B.81

--- = Le mycélium envahit complètement la boîte de Pétri (8,5 cm).

REMARQUE : les valeurs correspondent à l'accroissement quotidien du diamètre de la colonie en cm.; donc la croissance est exprimée en cm/jour.

aussi proportionnellement aux concentrations en carbone.

En comparant les deux souches nous pouvons voir que la souche "sauvage" B.81 se caractérise par la formation d'un grand nombre de petits sclérotés par rapport à la souche monoascospore S.A.S 405. De plus la nature du sucre a une influence sensible sur la taille des sclérotés, notamment pour la souche S.A.S 405, le maltose étant dans ce cas la meilleure source. Par contre, en ce qui concerne la souche B.81, c'est sur glucose que les gros sclérotés sont en plus grand nombre, comme le montre le tableau I.10.

Miranda et Leal (1979) ont effectué une analyse chimique des sclérotés. Ceux-ci se composent de 75% de glucides, 10% de protéines, 5% de chitine et 0,21% de lipides. Il semble donc que les sclérotés soient un lieu privilégié d'accumulation des composés glucidiques. La production de sclérotés est inhibée si la concentration en carbone est inférieure à 0,5 g C/l. Au-delà de 12 g C/l le nombre total de sclérotés diminue légèrement, ainsi que la proportion de gros sclérotés. Un pourcentage élevé de gros sclérotés se forme par une sorte d'anastomose entre deux ou trois petits sclérotés.

La stabilité du nombre total de sclérotés à partir de 10 g C/l jusqu'à 16 g C/l correspond, à notre avis, à une saturation du système. En effet la surface de la boîte de Pétri se présente à ce stade comme un tapis continu de sclérotés.

La maturation des sclérotés est remarquablement influencée par les concentrations en carbone; les faibles concentrations en carbone l'accélèrent tandis que des concentrations plus élevées la ralentissent. Un certain équilibre entre les concentrations en carbone et en azote est sans doute nécessaire à une bonne maturation des sclérotés. Les sclérotés qui se forment en utilisant des concentrations plus élevées en carbone ne peuvent pas arriver à maturité car la quantité d'azote présente dans le milieu

n'est pas suffisante. Cette constatation montre la nécessité d'étudier l'influence du rapport C/N sur les paramètres considérés (Tableau I.14).

D'après le tableau I.11 nous pouvons constater que le nombre de microconidies augmente lentement en même temps que la concentration en carbone jusqu'à 10 g C/l soit 2% de glucose par litre, concentration à partir de laquelle il tend à se stabiliser. Nous pouvons dire que la microconidiogenèse est stimulée par les concentrations moyennes en carbone.

Beauverie (1899) a obtenu la meilleure culture microconidienne sur milieu liquide contenant 1% de glucose par litre; Brierley (1918) et Willetts (1968) ont noté que les milieux pauvres étaient favorables à la formation des microconidies.

Nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus par Townsend (1957), Kamoen (1963 et 1964) et Vanev (1966) sur *Botrytis cinerea* et des résultats obtenus sur d'autres espèces voisines de la famille des *Sclerotiniacées*. Nous avons constaté qu'il y avait des différences entre ces divers résultats. Elles résultent à notre avis de deux raisons :

- La variation entre les souches utilisées: la grande différence entre leur capacité à utiliser diverses sources de carbone et également des sources d'azote variées donne toujours des résultats très divers. Cook (1969) avait une souche de *Sclerotinia sclerotiorum* qui se développait bien avec le mannitol comme source de carbone. Par contre les souches de Wang et Le Tourneau (1971) ne se développent pas sur ce sucre. Nous avons trouvé aussi des différences entre nos souches qui ne se développent pas bien sur l'arabinose et la souche de Townsend (1957) qui se développe bien sur ce même sucre.
- La différence entre les milieux de base utilisés: nous pouvons constater que toutes les recherches sur l'effet des différents éléments nutritifs sur le développement et la production de sclérotés

de *Botrytis cinerea* ont été réalisées des milieux très variés qui contenaient des éléments nutritifs très différents dans leur nature et leurs concentrations.

2) Influence de la nature de la source azotée et de sa concentration

L'auxotrophie des champignons par rapport à l'azote impose la présence de cet élément dans les substrats nutritifs où il paraît exercer une influence très importante sur la morphogénèse fongique.

a) Conditions expérimentales.

Dans ce cas, c'est la source carbonée qui est toujours fournie sous la même forme et à la même concentration; on fait alors varier les formes d'apport de l'azote et les concentrations en cet élément. Le milieu de Huguenin a été utilisé, le carbone a été fourni à la concentration de 8g/l sous forme de glucose. Nous avons essayé les sources d'azote suivantes:

- l'azote inorganique sous forme de nitrate de potassium, nitrate d'ammonium, sulfate d'ammonium, chlorure d'ammonium, nitrate de sodium, carbonate et oxalate d'ammonium, à la concentration de 138 mg d'azote par litre.
- l'azote organique sous forme de L.asparagine, L.alanine, L.tyrosine, L.serine, acide γ amino-butérique, L.cystine, L.cystéine, acide L.glutamique, peptone et hydrolysate de caséine à la dose 138 mg d'azote par litre.

Pour tester l'effet de la concentration en azote, nous avons utilisé le nitrate de potassium de façon à fournir 0,020; 0,030; 0,040; 0,050; 0,100; 0,138; 0,200; 0,250; 0,300; 0,400; 0,500; 0,600; 0,700; 0,800 et 1,400 g d'azote par litre .

Tableau I.12 : EFFET DE DIFFERENTES SOURCES D'AZOTE SUR
LA FORMATION DES SCLEROTES ET DES MICROCONIDIIES

souches / nature de la source d'azote	S.A.S 405						B.81					
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	1*	2*	3*	4*	5*	6*
KNO ₃	90	8	66	16	14	385	107	27	72	8	14	236
NaNO ₃	79	7	59	13	14	346	95	26	49	7	14	169
NH ₄ NO ₃	71	7	51	13	14	618	78	47	27	4	14	346
(NH ₄) ₂ SO ₄	7	3	4	0	16	98	10	4	6	0	16	43
NH ₄ Cl	5	0	5	0	16	0	11	5	6	0	16	0
oxalate d'ammonium	75	11	50	14	14	287	88	16	59	13	14	122
asparagine	74	5	55	14	14	456	89	22	58	9	14	315
alanine	72	7	56	9	14	394	74	18	49	7	14	230
peptone	95	10	66	19	14	462	112	24	74	14	14	357
hydrolysate de caséine	79	13	52	14	14	411	87	15	61	11	14	297
cystine	14	10	4	0	16	0	26	18	8	0	16	0
cystéine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
acide γ amino butyrique	72	13	46	13	14	434	90	25	54	11	14	275
acide												
glutamique	75	11	49	15	14	366	84	19	55	10	14	241
tyrosine	27	15	12	0	16	67	46	31	15	0	16	103
sérine	86	8	62	16	14	104	93	27	52	12	14	87

1* = Moyenne du nombre total de sclérotés par boîte.
 2* = Moyenne du nombre de sclérotés de moins de 0,2 cm.
 3* = Moyenne du nombre de sclérotés de 0,2 à 0,5 cm.
 4* = Moyenne du nombre de sclérotés de plus de 0,5 cm.
 5* = Temps moyen de maturation des sclérotés (jours).
 6* = Moyenne du nombre de microconidies/ml (elles doivent être multipliées par 4.10^4 /ml, chaque culture = 100 ml de solution)
 REMARQUE : le carbone est fourni sous forme de glucose (8 g C/l) et l'azote (0,138 g N/l).

b) Résultats

D'après le tableau I.12 nous pouvons constater que le champignon se développe bien sur un milieu contenant du nitrate de potassium, du nitrate de sodium, du nitrate d'ammonium ou de l'oxalate d'ammonium comme sources d'azote minéral, ainsi que de l'asparagine, de la peptone, de la sérine et de l'hydrolysate de caséine comme sources d'azote organique. La production de sclérotés est satisfaisante sur toutes les sources d'azote ci-dessus; elle est moyenne sur l'alanine, acide glutamique et acide γ aminobutyrique. Le chlorure d'ammonium, le sulfate d'ammonium, la tyrosine, la l.cystine et la l.cystéine ne sont pas des formes d'apport d'azote favorables à la production des sclérotés, ce qui n'est pas en accord avec les résultats de Townsend (1957) mais confirme ceux de Kamoen (1964) et Willetts (1969). Townsend (1957) a noté que l'effet des sels d'ammonium comme source d'azote était très variable et dépendait de l'acidité se développant dans le milieu consécutivement à la croissance. Il a noté que le sulfate et le chlorure d'ammonium étaient plus efficaces que le tartrate et l'oxalate d'ammonium tandis que le nitrate de potassium avait un effet intermédiaire entre les deux groupes.

Nos résultats montrent que la nature de la source azotée a une influence sensible sur la formation des sclérotés et la vitesse de croissance mycélienne (tableau I.12a), la peptone a engendré la vitesse maximum de croissance et la cystéine la vitesse minimum.

Démétriadés (1953) a noté que le *Sclerotinia sclerotiorum* se développait mieux sur l'azote nitrique que sur l'azote ammoniacal; Willis (1968) a trouvé que le *Sclerotinia trifoliorum* se développait mieux sur l'azote ammoniacal que sur l'azote nitrique. Par contre le *Sclerotinia sclerotiorum* se développe bien sur ces deux formes d'azote.

Tableau I.12a: EFFET LA NATURE DE SOURCE D'AZOTE SUR LA VITESSE DE CROISSANCE DU MYCELIUM

nature de la source d'azote	KNO ₃		NH ₄ NO ₃		NH ₄ Cl		NH ₄ SO ₄		oxalate d'ammonium		peptone		hydrolysat de caséine		asparagine		alanine		acide amino butyrique		tyrosine		cystéine		cystine			
	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*		
1	0,7	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,9	0,7	0,5	0,5	0,5	0,3	0,4	0,3	0,3	0,1	0,3	0,2	0	0	0	0		
2	2,4	2,0	2,2	1,9	2,1	2,0	2,0	0,9	1,8	1,6	2,7	2,6	2,4	2,2	2,1	1,7	1,9	1,8	1,5	1,1	1,6	1,5	0,1	0,1	0,1	0,1		
3	4,5	4,2	4,1	4,0	4,1	4,1	3,8	2,7	3,8	3,6	5,5	5,5	4,1	4,0	4,0	3,8	4,0	3,8	3,8	3,2	3,6	3,5	0,2	0,2	0,3	0,3		
4	6,3	6,0	5,7	5,5	5,5	5,3	5,4	4,5	4,8	4,7	7,5	7,3	5,7	5,7	5,7	5,6	5,2	5,1	5,3	4,9	5,2	5,0	0,6	0,6	0,9	0,8		
5	8,0	7,8	7,5	7,3	7,0	7,0	7,2	7,1	6,4	6,4	8,5	8,5	7,4	7,3	7,1	6,9	6,7	6,6	6,8	6,7	6,7	6,6	1,1	1,1	1,5	1,4		
6	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,3	8,2	---	---	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,3	1,7	1,7	2,2	2,1		
7	---	---	---	---	---	---	---	---	8,5	8,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	8,5	2,4	2,4	3,0	2,9		
8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3,2	3,1	3,8	3,7	
9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	4,0	4,0	4,6	4,5

1* = Souche S.A.S 405

2* = Souche B.81

--- = Le mycélium envahit complètement la boîte de Pétri (8,5 cm).

REMARQUE : les valeurs correspondent à l'accroissement quotidien du diamètre de la colonie en cm : la croissance est exprimée en cm/jour.

Townsend (1957) et Vanev (1966) ont indiqué que l'azote organique stimulait davantage la formation des sclérotés que l'azote inorganique, Kamoen (1964) a noté qu'il obtenait des sclérotés plus nombreux avec l'oxalate d'ammonium. Zoberi (1979) a eu le meilleur rendement pour *Sclerotium rolfsii* avec le sulfate d'ammonium. Wang et Le Tourneau (1972) ont trouvé que le développement mycélien et la formation des sclérotés étaient très faibles ou quasiment inhibés sur milieux contenant des acides organiques, Trevethick et Cooke (1971) ainsi que Wang et Le Tourneau (1972) ont confirmé que les acides aminés qui contiennent un groupe -SH sont des sources d'azote très pauvres; ceci nous explique les mauvais résultats obtenus avec la cystine et la cystéine sur la croissance et la production de sclérotés.

D'après le tableau I.12 nous pouvons constater que l'azote organique, sauf s'il est apporté sous forme de cystine ou de cystéine, stimule davantage la microconidiogénèse que l'azote minéral. On peut penser que le soufre contenu dans ces deux acides aminés est responsable de cet effet "dépresseur" .

L'azote nitrique est nettement plus favorable que l'azote ammoniacal puisque le chlorure d'ammonium est même totalement inhibiteur. Il faut noter que le nitrate d'ammonium est la source azotée sur laquelle les meilleurs résultats sont obtenus. Ceci traduit peut-être un phénomène de "synergie" entre les constituants de cette molécule .

Nous pouvons dire que toutes les sources d'azote qui stimulent la formation des sclérotés stimulent également la microconidiogénèse, et toutes celles qui défavorisent la formation des sclérotés, désavantagent la microconidiogénèse.

Willetts (1968) a noté que le chlorure d'ammonium, le nitrate d'ammonium et le nitrate de sodium inhibent la formation des microconidies.

Tableau I.13 : EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN AZOTE SUR LA FORMATION DES SCLEROTES ET DES MICROCONIDIES

souches	S.A.S 405						B.81					
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	1*	2*	3*	4*	5*	6*
0,020	0	0	0	0	0	91	0	0	0	0	0	14
0,030	17	4	13	0	13	122	24	16	8	0	13	54
0,040	31	5	24	2	13	167	39	21	17	1	13	67
0,050	39	7	28	3	13	213	53	23	27	3	13	102
0,100	57	9	42	6	13	327	82	26	50	6	13	157
0,138	84	10	62	12	13	387	109	24	77	8	13	195
0,150	86	10	62	14	13	370	114	27	76	11	13	243
0,200	94	9	61	24	13	396	131	32	84	15	13	306
0,250	98	11	60	27	13	406	139	27	98	14	13	323
0,300	102	8	76	38	13	375	133	31	77	25	13	264
0,400	118	9	73	41	14	363	136	27	86	23	13	253
0,500	103	7	67	29	16	388	122	23	79	20	16	224
0,600	95	10	57	18	18	371	117	22	77	18	18	238
0,700	82	10	56	16	21	352	105	17	73	15	21	184
0,800	71	8	50	13	25	334	89	13	62	14	23	167
1,400	68	9	50	9	29	327	77	15	51	11	28	195

1* = Moyenne du nombre total de sclérotés par boîte.

2* = Moyenne du nombre de sclérotés de moins de 0,2 cm.

3* = Moyenne du nombre de sclérotés de 0,2 à 0,5 cm.

4* = Moyenne du nombre de sclérotés de plus de 0,5 cm.

5* = temps moyen de maturation des sclérotés (jours).

6* = Moyenne du nombre de microconidies/ml (elles doivent être multipliées par $4 \cdot 10^4$ /ml, chaque culture = 100 ml de solution)

REMARQUE : le carbone est fourni sous forme de glucose (8 g C/l) et l'azote sous forme de nitrate de potassium.

Nos résultats (tableau I.12) montrent nettement que le nitrate d'ammonium est le sel minéral qui donne le plus fort nombre de microconidies, nous avons aussi obtenu des microconidies en utilisant le nitrate de sodium comme source d'azote; il semble donc que l'azote nitrique soit favorable à la microconidiogenèse.

D'après les tableaux (I.13 et I.13a) nous pouvons voir que les concentrations les plus élevées en azote stimulent la vitesse de croissance mycélienne et la formation des sclérotés, mais ce résultat est lié à la concentration en carbone qui se trouve dans le milieu. La taille des sclérotés est influencée aussi par la quantité d'azote présente dans le milieu puisque le nombre de gros sclérotés augmente proportionnellement à celui-ci.

Les très fortes concentrations en azote retardent nettement la maturation des sclérotés à cause du déséquilibre entre la quantité d'azote et la quantité de carbone qui se trouvent dans le milieu.

Il nous a donc semblé judicieux de rechercher quel était le meilleur rapport entre ces 2 éléments.

D'après le tableau I.13 nous pouvons remarquer que le nombre de microconidies augmente proportionnellement à la concentration en azote jusqu'à 0,250 g /l, ensuite il diminue faiblement.

Beauverie (1899) a noté qu'il obtenait une forte concentration de microconidies sur milieux contenant de la peptone à 2% (presque 0,270 g N/l) et sur milieu bouillon de viande liquide après un mois de développement de *Botrytis cinerea*. Brierley (1918) et Willetts (1968) ont constaté que les milieux pauvres en azote stimulaient la formation des microconidies.

Beauverie (1899) et Willetts (1968) ont constaté que le champignon formait toujours des microconidies lorsque la valeur nutritive du milieu

Tableau I.13a: EFFET DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'AZOTE SUR LA VITESSE DE CROISSANCE DU MYCELIUM.

jours	concentrations en azote (g/l)																							
	0,05		0,1		0,138		0,2		0,25		0,3		0,4		0,5		0,6		0,7		0,8		1,4	
	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*
1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,5	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3
2	0,9	0,7	1,5	1,3	1,7	1,4	1,9	1,5	1,8	1,6	1,9	1,8	1,8	1,8	1,6	1,5	1,5	1,4	1,6	1,5	1,4	1,2	1,3	1,2
3	1,7	1,5	2,9	2,8	3,2	3,0	3,2	3,1	3,4	3,2	3,5	3,3	3,6	3,5	3,3	3,2	3,0	2,8	3,2	3,0	3,0	2,8	2,8	2,5
4	2,9	2,8	4,5	4,3	4,9	4,6	5,0	4,8	5,2	5,0	5,2	5,0	5,4	5,3	5,2	5,0	4,8	4,5	5,1	4,6	4,8	4,6	4,5	4,2
5	4,5	4,3	6,7	6,6	6,9	6,7	7,0	6,9	7,2	7,0	7,3	7,0	7,7	7,3	7,1	6,8	6,9	6,7	7,1	6,7	6,6	6,5	6,3	6,0
6	6,2	6,0	8,2	8,0	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,2	8,2	8,0	7,8
7	8,0	7,8	8,5	8,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	8,5	8,5	8,5	8,5
8	8,5	8,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

1* = Souche S.A.S405

2* = Souche B.81

--- = Le mycélium envahit complètement la boîte de Pétri (8,5 cm).

REMARQUE : les valeurs correspondent à l'accroissement quotidien du diamètre de la colonie en cm : la croissance est exprimée en cm/jour.

diminuait. Donc, selon ce résultat, le champignon devrait produire directement des microconidies sans former des sclérotés lorsque l'on utilise un milieu nutritif très pauvre. Mais nous avons trouvé que même en utilisant un milieu très pauvre le champignon commençait toujours par former une couche compacte de mycélium (de stroma) ensuite des sclérotés et finalement des microconidies. Il semble que le champignon donne toujours la priorité à la formation de mycélium et des sclérotés et qu'ensuite il y ait apparition des microconidies selon l'importance de chaque forme dans le cycle biologique du champignon. Le seul cas où le champignon forme directement des microconidies est celui de la souche microconidienne qui donne très rarement des sclérotés même si elle est cultivée sur un milieu nutritif riche.

3) Effets du rapport C/N.

Il est bien connu que la source azotée et la source carbonée doivent être dans un rapport précis (Cochrane 1958, Lilly et Barnett 1951) qui présente pour chaque organisme une valeur optimale. C'est cette valeur que nous avons essayé d'établir pour le *Botrytis cinerea*.

a) Conditions expérimentales.

- Première série d'expériences : dans cette série d'expériences le glucose est fourni successivement aux concentrations de 0,1; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 28 et 32 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 8 g par litre sous forme de glucose ; l'azote est fourni à raison de 0,020; 0,030; 0,040; 0,050; 0,100; 0,138; 0,200; 0,250; 0,300; 0,400; 0,500; 0,600; 0,700; 0,800 et 1,400 g d'azote par litre, sous forme de nitrate de potassium.

Tableau I.14: EFFET DU RAPPORT C/N SUR LA FORMATION DES SCLEROTES ET LEUR EVOLUTION.

1*	2*	3*	4*	5*	6*
0,5	0,138	3,6	9	13	0
1	0,138	7,2	16	13	1
2	0,138	14,4	35	13	3
4	0,138	29	61	11	8
6	0,138	43,4	87	11	15
8	0,138	58	98	13	22
10	0,138	72,4	115	13	25
12	0,138	87	126	14	28
16	0,138	116	123	18	24
20	0,138	145	122	23	17
24	0,138	174	116	25	11
28	0,138	201,7	90	28	10
32	0,138	231,8	78	32	7
8	0,050	160	40	12	0
8	0,100	80	75	12	6
8	0,138	58	92	12	9
8	0,200	40	104	12	13
8	0,250	32	111	12	17
8	0,300	26,6	120	13	25
8	0,400	20	124	13	26
8	0,500	16	117	16	21
8	0,600	13,3	102	18	13
8	0,700	11,5	96	22	11
8	0,800	10	82	24	9
8	1,400	5,7	80	29	6

1* = Concentration de carbone en g C/l.

2* = Concentration d'azote en g N/l.

3* = Rapport C/N.

4* = Moyenne du nombre total de sclérotés par boîte.

5* = Vitesse de maturation de sclérotés (jours).

6* = Moyenne du nombre de sclérotés plus de 0,5 cm (par boîte).

Remarque: le carbone était fourni sous forme de glucose et l'azote sous forme de KNO₃.

b) Résultats

Les résultats obtenus, reportés dans le tableau 1.14 nous permettent de faire plusieurs constatations en tenant compte simultanément des 3 critères d'appréciation précédemment définis :

- Les variations de concentrations en carbone ont un effet positif pour des valeurs comprises entre 8 g C/l et 12 g C/l soit pour des rapports C/N de 58 à 87. Les concentrations en carbone inférieures à 8 g C/l entraînent une diminution du nombre et de la taille des sclérotés sans influencer leur maturation. Les concentrations en carbone supérieures à 12 g C/l essayées (C/N croissant) retardent considérablement la maturation des sclérotés sans affecter notablement leur production.
- Les concentrations en azote sont plus favorables lorsque celles-ci sont comprises entre 200 mg/l et 400 mg/l soit dans des rapports C/N de 20 à 40.

La production de sclérotés est liée à la concentration de la source carbonée, alors que leur maturation dépend de celle de la source azotée.

Ces 2 phénomènes paraissent totalement indépendants des proportions relatives de ces 2 sources nutritives. En effet, pour la concentration en azote correspondant à la fois à une production satisfaisante de sclérotés et à une maturation rapide, le rapport C/N est compris entre 20 et 40 (nitrate de potassium = 0,2 à 0,4 g /l - glucose = 8 à 16 g/l). Par contre, si on fait varier l'azote, le carbone restant constant, les valeurs du rapport C/N qui autorisent la meilleure production de sclérotés (carbone = 10 à 20 g C/l pour azote = 0,138 g N/l) sont comprises entre 72,4 et 145.

Donc, puisqu'il n'y a pas recoupement des meilleures valeurs du rapport C/N dans l'un et l'autre cas, nous pouvons considérer que la valeur de ce

rapport n'influence pas directement la production des sclérotés ou leur maturation, pourvu que la source nutritive qui régit l'un ou l'autre de ces phénomènes soit présente en quantité satisfaisante.

Si nous nous plaçons dans des conditions sensiblement optimales par rapport à chacun de ces facteurs, le rapport C/N prend une valeur égale à 72 qui se situe dans le voisinage de chacune des deux zones d'influence respectives des concentrations en carbone et en azote sur notre tableau (I.14).

Nous avons donc choisi, pour la suite de nos expériences, de travailler avec une concentration en C = 10 g/l et une concentration en N = 0,138 g/l, soit un rapport C/N = 72,4.

4) Effet des éléments minéraux

Nous avons voulu étudier l'effet de divers éléments minéraux (macroéléments) qui composent le milieu synthétique (surtout le calcium, le potassium, le magnésium et le sodium) sur la croissance et la formation des sclérotés pour déterminer l'importance de leur présence dans le milieu.

a) Conditions expérimentales

Pour déterminer les influences respectives des ions potassium, magnésium, sodium et calcium dans le milieu nutritif nous avons remplacé :

- L'ion potassium (sulfate et nitrate de potassium) phosphates mono et dipotassiques) par du sulfate de sodium, du nitrate de sodium, des phosphates mono et disodique afin de déterminer l'effet de l'absence de potassium sur la vitesse de croissance mycélienne et la formation des sclérotés.
- Pour étudier l'effet de l'absence de sulfate de magnésium, nous avons testé différentes concentrations de l'ion magnésium (sous forme de sulfate de magnésium) : 0 g/l; 0,1 g/l; 0,25 g/l et 0,5 g/l.

- Nous avons également testé l'effet de l'absence de l'ion calcium (sous forme du chlorure de calcium) de la même manière en utilisant différentes concentrations : 0 g/l; 0,05 g/l; 0,1 g/l et 0,2 g/l.
- Le témoin de référence était constitué par un milieu de base (milieu de Huguenin).

b) Résultats

D'après le tableau I.15 nous pouvons constater que le calcium n'a aucun effet sensible ni sur la croissance mycélienne, ni sur la formation des sclérotés. Le milieu dépourvu de calcium produit des sclérotés normalement et la maturation des sclérotés est même stimulée par l'absence de cet ion.

Nous pouvons dire la même chose à propos du sodium car le milieu synthétique de Huguenin est dépourvu de cet élément et produit normalement des sclérotés mais la présence de sodium ne stimule ni la vitesse de croissance ni la maturation des sclérotés.

Si on remplace le potassium par du sodium dans le milieu, la formation des sclérotés est complètement inhibée (tableau I.16) alors que la croissance du mycélium n'est pratiquement pas affectée. On sait que le sodium n'est pas assimilé par les champignons, donc l'inhibition de la formation des sclérotés observée est bien provoquée par l'absence de potassium dans le milieu et cela induit la formation d'un stroma (couche compacte de mycélium qui se développe sur la surface du milieu de culture et sur lequel se forment habituellement les sclérotés) très clair et incapable de produire des conidies et des microconidies.

Nous avons également constaté que l'absence de magnésium dans le milieu synthétique, empêche le champignon de suivre les stades normaux de son cycle asexué, car la carence en cet élément inhibe la formation des sclérotés. Le tableau I.17 nous montre l'influence remarquable de cet ion

Tableau I.15: EFFETS DE L'ABSENCE DU CALCIUM SUR LA PRODUCTION DES SCLEROTES, DES MICROCONIDIIES ET LA VITESSE DE CROISSANCE DU MYCELIUM

Concentrations du Ca en g/l	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*
0	72	16	39	17	12	0,9	357
0,05	65	11	37	17	14	0,8	321
0,1	70	13	36	21	15	0,8	378
0,2	79	14	42	23	15	0,8	346

- 1* = Moyenne du nombre total de sclérotés par boîte.
 2* = Moyenne du nombre de sclérotés de moins de 0,2 cm.
 3* = Moyenne du nombre de sclérotés de 0,2 à 0,5 cm.
 4* = Moyenne du nombre de sclérotés de plus de 0,5 cm.
 5* = Temps moyen de maturation de sclérotés (jours).
 6* = Moyenne des valeurs correspondant à l'accroissement quotidien du rayon de la colonie en cm/jour.
 7* = Moyenne du nombre de microconidies/ml (elles doivent être multipliées par $4 \cdot 10^4$ /ml, chaque culture = 100 ml de solution).

Tableau I.16

EFFETS DE L'ABSENCE DU POTASSIUM SUR LA PRODUCTION DES SCLÉROTES,
DES MICROCONIDIÉS ET LA VITESSE DE CROISSANCE DU MYCÉLIUM.

Jours	Milieu sans K				Milieu témoin			
	1*	2*	3*	4*	1*	2*	3*	4*
		0	0	0		77	14	385
1	0,4				0,5			
2	1,0				1,3			
3	2,0				2,6			
4	3,2				4,2			
5	5,2				6,1			
6	7,0				8,5			
7	8,5				---			

- 1* = Vitesse de la croissance mycélienne quotidienne :
accroissement du diamètre de la colonie en cm/jour.
2* = Moyenne du nombre total de sclérotés par boîte.
3* = Temps moyen de maturation des sclérotés (jours).
4* = Moyenne du nombre de microconidiés/ml (elles doivent
être multipliées par $4 \cdot 10^4$ /ml, chaque culture =
100 ml de solution).
- Remarque: Le potassium a été remplacé par le sodium.

Tableau I.17: EFFETS DE L'ABSCENCE DU MAGNESIUM SUR LA PRODUCTION DES SCLÉROTES, DES MICROCONIDIES ET LA VITESSE DE CROISSANCE DU MYCELIUM

Concentrations du Mg en g/l	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*
0	7	4	3	0	18	0,9	310
0,1	32	8	24	0	16	1	353
0,25	57	11	38	8	15	1	340
0,5	77	14	47	16	15	1	368

1* = Moyenne du nombre de sclérotés par boîte.

2* = Moyenne du nombre de sclérotés de moins de 0,2 cm.

3* = Moyenne du nombre de sclérotés de 0,2 à 0,5 cm.

4* = Moyenne du nombre de sclérotés de plus de 0,5 cm.

5* = Temps moyen de maturation de sclérotés (jours).

6* = Moyenne des valeurs correspondant à l'accroissement quotidien du rayon de la colonie en cm/jour.

7* = Moyenne du nombre de microconidies/ml (elles doivent être multipliées par $4 \cdot 10^4$ /ml, chaque culture = 100 ml de solution).

sur la formation des sclérotés alors que les variations de concentration en cet élément n'affectent pratiquement pas la croissance du mycélium (l'accroissement quotidien du diamètre de la colonie passe de 1 à 0,9 cm/jour pour une déprivation totale en magnésium). Le nombre total de sclérotés produits par boîte se réduit corrélativement à la diminution de la concentration du milieu en magnésium puisqu'il passe de 77 sclérotés/boîte pour une concentration en magnésium égale à 0,5 g/l, à 7 sclérotés/boîte lorsque cet élément est totalement absent du milieu. Il faut également noter une diminution corrélatrice de la taille des sclérotés puisque le nombre de gros sclérotés est réduit de moitié quand la concentration en Mg passe de 0,5 à 0,25 g/l. Il n'y a plus du tout de gros sclérotés dès que cette concentration est de 0,1 g/l. Le nombre de sclérotés de taille moyenne suit la même évolution. Il faut également remarquer que l'absence de magnésium s'accompagne d'une mélanisation importante du mycélium et de la formation de sclérotés très petits (microsclérotés) qui sont difficiles à distinguer à l'oeil nu. La production de conidies n'est pas affectée par les carences en magnésium.

Le potassium et le magnésium sont des éléments minéraux indispensables à la formation des sclérotés. L'absence de potassium entraîne un faible ralentissement de la croissance mycélienne.

Zoberi (1980) a noté que le potassium était le seul élément minéral indispensable à la formation des sclérotés de *Sclerotium rolfsii* et que le calcium, le sodium et le magnésium étaient sans effet sur ce phénomène. Nos résultats relatifs à l'influence de ce dernier élément sont en totale contradiction avec ceux de cet auteur, puisque nous avons montré qu'il y avait une corrélation étroite entre le nombre de sclérotés produits et la concentration du milieu en chlorure de magnésium. Goujon (1968, 1969 et 1970) et Geiger et Goujon (1970) ont étudié l'effet de la déprivation en

Tableau I.18: EFFET DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE THIAMINE SUR LA PRODUCTION DE SCLEROTES ET LA VITESSE DE CROISSANCE DE MYCELIUM

souches	S.A.S 405							B.81						
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*
concentrations (mg/l)														
0,2	83	11	54	18	1,6	13	345	89	16	58	15	1,7	13	179
0,5	80	13	52	15	1,6	13	380	94	17	60	17	1,7	13	205
1	87	15	52	20	1,7	13	409	95	21	59	15	1,6	13	243
0 (temoin)	84	15	53	16	1,6	13	359	93	18	60	15	1,6	13	217

- 1* = Moyenne du nombre total de sclérotés par boîte.
- 2* = Moyenne du nombre de sclérotés de moins de 0,2 cm
- 3* = Moyenne du nombre de sclérotés de 0,2 à 0,5 cm.
- 4* = Moyenne du nombre de sclérotés de plus de 0,5 cm
- 5* = Moyenne de vitesse de la croissance mycélienne quotidienne/cm
- 6* = Temps moyen de maturation des sclérotés (jours)
- 7* = Moyenne du nombre de microconidies/ml (elles doivent être multipliées par 4.10^4 /ml, chaque culture = 100 ml de solution).

potassium sur la formation des sclérotés; ils considèrent que les enzymes de la synthèse protéique par lesquelles se forment les sclérotés deviennent inactives en l'absence de potassium. Même s'il y a développement mycélien, les sclérotés ne se forment pas sur un milieu dépourvu de potassium.

5) Effets de la thiamine

Certaines espèces fongiques sont auxotrophes vis à vis de la thiamine. Nous avons voulu connaître l'effet de cette vitamine sur la production des sclérotés, des microconidies et la vitesse de croissance mycélienne.

a) Conditions expérimentales

Le milieu de Huguenin que nous avons utilisé, contient de la thiamine. Pour vérifier si cette substance (vitamine B1) était indispensable pour la croissance du *Botrytis cinerea* et la production de sclérotés, nous avons utilisé les concentrations suivantes en vitamine (sous forme de chlorhydrate de thiamine) : 0; 0,2; 0,5 et 1 mg par litre.

b) Résultats

Les résultats rassemblés dans le tableau (I.18) montrent que le nombre moyen de sclérotés et celui des microconidies sont presque stables quelle que soit la concentration en thiamine utilisée. Ces résultats nous permettent de constater que la thiamine n'a pas d'influence sensible sur la croissance et la formation des sclérotés puisque leur nombre n'est pratiquement pas réduit lorsque cette vitamine est totalement absente du milieu de culture. Nos résultats confirment ceux de Townsend (1957) sur *Botrytis cinerea* et ceux de Zoberi (1980) sur *Sclerotium rolfsii*.

Tableau I.19 EFFETS DE DIFFERENTS pH SUR LA FORMATION DES SCLEROTES ET DES MICROCONIDIIES

souches	S.A.S 405						B.81					
	pH	1*	2*	3*	4*	5*	6*	1*	2*	3*	4*	5*
3,5	83	12	58	13	16	357	97	58	30	9	16	121
4,5	91	10	62	19	14	410	116	69	58	9	13	163
5,5	88	11	59	18	14	442	101	53	40	8	13	158
6,5	72	13	47	12	15	413	82	56	19	7	15	166
7,5	66	7	51	8	16	369	78	57	16	5	16	119
8,5	47	9	34	4	20	347	57	36	18	3	20	107
9,5	45	7	35	3	22	312	53	32	18	3	22	116

1* = Moyenne du nombre total de sclérotés par boîte.

2* = Moyenne du nombre total de sclérotés de moins de 0,2 cm.

3* = Moyenne du nombre de sclérotés de 0,2 à 0,5 cm.

4* = Moyenne du nombre de sclérotés de plus de 0,5 cm.

5* = Temps moyen de maturation des sclérotés (jours).

6* = Moyenne du nombre de microconidies/ml (elles doivent être multipliées par $4 \cdot 10^4$ /ml, chaque culture = 100 ml de solution).

REMARQUE : le carbone est fourni sous forme de glucose (8 g C/l) et l'azote sous forme de KNO_3 (0,138 g N/l).

6) Effets des différents pH.

Certains champignons sont sensibles au pH du milieu, il nous a donc paru opportun d'essayer de déterminer le pH le plus favorable au développement de *Botrytis cinerea* et à la production de sclérotés par cet organisme.

a) Conditions expérimentales

Nous avons étudié l'influence du pH en établissant la gamme de valeurs de pH suivante: 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5 sur milieu liquide, et sur milieu gélosé : pH 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5. Les valeurs des pH ont été ajustées en utilisant des solutions de HCl et NaOH avant la stérilisation du milieu de culture.

Afin de maintenir le pH à sa valeur initiale le plus longtemps possible, nous avons tamponné le milieu de culture en utilisant deux tampons différents, tampon phosphate de potassium (phosphate monopotassique 0,2 M + phosphate dipotassique 0,2 M) pour les pH initiaux compris entre 2,7 et 5,5 et tampon citrate (acide citrique 0,1 M + phosphate dipotassique 0,2 M) à partir de pH 6,5 et jusqu'à pH 7,7.

b) Résultats

D'après le tableau I.19a, nous pouvons constater que nos souches se développent bien sur une large gamme de pH : de 3,5 jusqu'à pH 9,5. Alors que, classiquement la plupart des champignons préfèrent les pH acides, les deux souches étudiées ont montré une certaine tolérance envers les pH très alcalins. Nous avons trouvé que les deux souches se développaient moins rapidement pour des pH extrêmes, surtout les pH les plus alcalins et qu'elles présentaient un développement normal pour des pH compris entre pH 4,5 et pH 5,5 mais à 5 jours, la différence du diamètre de la colonie n'est

Tableau I.19a: EFFETS DES DIFFERENTS pH SUR LA VITESSE DE CROISSANCE DU MYCELIUM

jours	pH 2,7		pH 3,5		pH 4,5		pH 5,5		pH 6,5		pH 7,5		pH 7,7	
	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*
1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2
2	0,8	0,7	1,2	1,1	1,3	1,2	1,6	1,5	1,4	1,3	1,1	1,1	0,9	0,8
3	2,3	2,2	2,7	2,7	3,0	2,8	3,4	3,3	3,2	3,2	2,8	2,7	2,6	2,4
4	4,5	4,4	4,7	4,7	5,1	4,8	5,3	5,1	4,9	4,7	4,5	4,5	4,3	4,2
5	6,4	6,2	6,8	6,7	7,1	6,8	7,3	7,1	6,8	6,6	6,4	6,2	6,0	6,0
6	8,1	7,9	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,2	8,0	7,7	7,5
7	8,5	8,5	---	---	---	---	---	---	---	---	8,5	8,5	8,5	8,5
8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

1* = Souche S.A.S 405

2* = Souche B.81

--- = Le mycélium envahit complètement la boîte de Pétri (8,5 cm).

REMARQUE : les valeurs correspondent à l'accroissement quotidien du diamètre de la colonie en cm : la croissance est exprimée en cm/jour.

que de 0,9 cm dans les pH acides et de 1,3 cm dans les pH alcalins.

Nous avons également suivi les variations de pH pendant le développement mycélien (tableau I.20) en mesurant régulièrement le pH du milieu pendant les deux premières semaines. Les expériences conduites sur milieu liquide et milieu gélosé nous ont montré que le pH optimum pour le développement mycélien de *Botrytis cinerea* était compris entre 5 et 6,5.

Les pH acides et alcalins ne sont pas favorables au développement, mais lorsque le champignon est placé dans des conditions de pH défavorables, il neutralise très rapidement le milieu pour tendre à se trouver dans les conditions de pH qui lui sont le plus favorables.

Il est remarquable de constater que *Botrytis cinerea* est capable soit d'acidifier, soit d'alcaliniser le milieu pour assurer sa survie et cela très rapidement (tableau I.20). Si le pH de départ est de 7,7, il passe à 5,3 après 2 semaines, et le pH de départ égal à 2,7 se stabilise après 2 semaines, à un pH de 4,3.

Vega et Le Tourneau (1970) ont rapporté que les champignons produisent certains acides organiques en relation avec le cycle des acides tricarboxyliques (T.C.A) et la formation de sclérotés; Khare, Bompeix et Basuchaudry (1981) ont rapporté que la chute du pH pendant le développement de *Sclerotinia minor* résultait probablement de la production d'acides organiques par ces deux champignons. Par contre, ainsi que nous l'avons dit plus haut, nous avons constaté que le pH du milieu augmentait pour devenir neutre ou légèrement alcalin, lorsque le milieu était acide au départ.

La production des sclérotés est nettement influencée par le pH (tableau I.19), nous avons constaté que le meilleur pH pour le développement mycélien (pH 5,6) est aussi le meilleur pour la formation des sclérotés. De plus, la production de sclérotés à des pH alcalins (45 pour la souche SAS 405 et 53 pour la souche B.81) est faible par rapport à ce qu'elle est pour

Tableau I.20 : Evolution du pH pendant le développement de la culture

LES pH de départ	S.A.S 405		B.81	
	1*	2*	1*	2*
pH 2,7	3,0	4,3	2,9	4,6
pH 3,7	4,4	4,8	4,8	5,0
pH 4,5	4,7	5,1	5,1	5,3
pH 5,5	5,6	5,3	5,5	5,4
pH 6,7	5,9	5,2	6,0	5,5
pH 7,5	6,4	5,2	6,6	5,5
pH 7,7	6,5	5,3	6,6	5,6

1* = Evolution du pH après la première semaine.

2* = Evolution du pH après la deuxième semaine.

des pH acides (83 et 58 pour les 2 mêmes souches respectivement). La formation des gros sclérotés est stimulée par les pH plutôt acides: 19 sclérotés > 0,5 cm sur 91 pour la souche SAS 405 à pH 4,5 alors qu'il y en a seulement 8 sur 66 à pH 7 pour cette même souche; les proportions sont les mêmes pour la souche B.81. La durée de maturation des sclérotés s'allonge nettement pour des pH très alcalins (22 jours au-lieu de 14 en conditions normales. L'effet est moins net pour les pH très acides: 16 jours pour un pH = 3,5 au-lieu de 14 pour un pH = 5,5.

Willetts (1968) a testé les modifications de pH après 7 jours de développement de *Sclerotinia fructicola* sur une large gamme de pH (2,5 à 8,5), il a trouvé que le pH se stabilisait entre 4 et 4,5 ce qui correspond au pH optimal à la fois pour le développement et la formation des sclérotés.

Wang et Le Tourneau (1971) ont rapporté que la diminution ou l'augmentation du pH du milieu pendant le développement de *Sclerotinia sclerotiorum* dépendaient de la concentration en carbone utilisée. Les faibles concentrations ou les sources carbonées pauvres augmentent le pH et les fortes concentrations font décroître le pH du milieu.

Sur le tableau I.20 nous pouvons dire que nos résultats confirment ceux de Willetts (1968), le champignon essaie d'améliorer le pH du milieu pendant son développement jusqu'à ce qu'il parvienne au pH optimal.

Marras (1961) a rapporté que *Sclerotinia minor* se développait bien sur une gamme étendue de pH (4 à 10). Le pH optimal est égal à 7. Par contre Khare, Bompeix et Baushaudry (1981) ont obtenu par ce même organisme un très faible développement à pH 8; ils ont noté que le pH optimal était compris entre 3,4 et 4,5.

D'après le tableau I.19 nous pouvons voir que *Botrytis cinerea* produit des microconidies dans une large gamme de pH, il a une large tolérance aux

pH acides comme aux pH très alcalins, mais les pH plutôt acides stimulent un peu mieux la microconidiogenèse. Le meilleur pH pour la production des microconidies se trouve entre pH 3,5 et pH 5,5 (les moyennes des nombres des microconidies sont optimales à pH 4,5 : 442 pour la souche S.A.S405 et 158 pour la souche B.81). Le pH optimum pour la formation des sclérotés est presque le même que celui qui est favorable à la production des microconidies.

La production de microconidies commence faiblement après un mois d'incubation, ensuite elle s'accroît rapidement. Après 90 jours, les variations entre les nombres de microconidies produites à différents pH sont faibles; cette précarité résulte de deux faits:

- En étudiant l'effet des différents pH sur la formation de sclérotés, nous avons constaté que les pH évoluent après une semaine d'incubation, pour se rapprocher pendant la deuxième semaine d'un pH plus adapté au développement du champignon .
- Nous avons constaté également que la formation des microconidies ne commence pas avant la troisième semaine, donc le pH a déjà atteint la valeur optimale pour le développement du champignon .

Les cultures plus âgées sont capables de produire des microconidies plus abondamment que les cultures moins âgées. Donc l'effet du pH ne peut être perceptible du fait qu'il n'est pas possible de maintenir celui-ci constant, même en milieu tamponné, jusqu'à ce que la microconidiogenèse commence.

Willettts (1968) a noté que les différences entre les nombres de microconidies de *Sclerotinia fructicola* formées à différents pH ne sont pas significatives.

D - CONCLUSION

- Les résultats que nous avons obtenus montrent que le pH du milieu, la nature et la concentration des sources carbonée et azotée dans le milieu, qui sont optimales pour la croissance mycélienne, sont également les meilleures pour la formation des sclérotés et des microconidies. Les concentrations en carbone et en azote présentent dans nos expériences *in vitro* des valeurs optimales proches de ce qu'elles sont dans la nature. En effet, les biotopes naturels de ce champignon (fruits) correspondent à des substrats relativement riches en sucres et moins riches en azote.

- Glucose, maltose, xylose, saccharose et lactose sont les meilleures sources carbonées pour la croissance mycélienne, la production de sclérotés et de microconidies. L'augmentation dans une certaine limite de leurs concentrations dans le milieu de culture, à condition de maintenir l'équilibre avec la concentration d'azote utilisée, stimule la croissance mycélienne et augmente le nombre total de sclérotés ainsi que la proportion de gros sclérotés. Une quantité de glucose correspondant à une concentration en carbone de 10 à 12 g/l donne le maximum de sclérotés et de microconidies en utilisant 138 mg d'azote par litre. Pour des concentrations en carbone supérieures à 12 g/l, la quantité d'azote du milieu restant inchangée, on provoque un déséquilibre du rapport C/N et en conséquence le nombre total de sclérotés diminue et leur durée de maturation s'allonge nettement.

Le *Botrytis cinerea* préfère nettement les sucres simples ou les polymères du glucose. En effet il ne se développe pas ou très peu, sur les polyols ou l'inuline. Ces préférences peuvent expliquer la fréquence des attaques de *Botrytis cinerea* sur beaucoup de fruits mûrs où la concentration en sucres simples est plus élevée. En outre, les baies vertes contiennent vraisemblablement des substances inhibitrices pour le champignon.

- Le nitrate de potassium, la peptone, l'asparagine, l'hydrolysate de caséine, la sérine, le nitrate et l'oxalate d'ammonium sont les meilleures sources d'azote. La capacité à utiliser les différentes sources d'azote est très variable d'une souche à l'autre et aussi d'une espèce à l'autre. Nos résultats montrent que les deux souches avec lesquelles nous avons travaillé, se développent sur quelques sources d'azote inorganique aussi bien que sur quelques autres sources d'azote organique. Nous ne pouvons pas dire que l'azote organique soit plus souhaitable que l'azote inorganique parce qu'il y a un grand nombre d'acides aminés qui ne sont pas favorables à la formation des sclérotas. L'azote organique sauf s'il est apporté sous forme de cystine ou de cystéine stimule la microconidiogenèse mieux que l'azote minéral. L'azote ammoniacal est défavorable et totalement inhibiteur lorsqu'il est sous forme de chlorure d'ammonium. Néanmoins, c'est la forme nitrate d'ammonium qui donne les meilleurs résultats.

L'augmentation de la concentration en azote jusqu'à 250 mg/l stimule la formation des microconidies.

- La valeur nutritive du milieu n'est pas un élément déterminant de la formation des microconidies car *Botrytis cinerea* les produit sur des milieux différents riches ou pauvres. Mais il faut préciser que le champignon commence toujours par former une couche mycélienne sur la surface du milieu, puis il produit des sclérotas et à la fin, des microconidies. Cet ordre de priorité est toujours bien respecté par nos souches non microconidiennes. Par contre dans nos souches microconidiennes la formation des microconidies suit immédiatement la formation de la nappe mycélienne, car celles-ci forment rarement des sclérotas.

- La zone optimale des valeurs du rapport C/N correspond à des concentrations en C de 8 à 10 g/l pour 0,138 mg N/l (en tenant compte du nombre total de sclérotas et de leur vitesse de maturation). Même si

l'influence du rapport C/N sur la maturation des sclérotés est faible, ce processus peut être nettement retardé lorsque ce rapport prend des valeurs extrêmes.

- L'absence de potassium ou de magnésium dans le milieu synthétique inhibe complètement la formation des sclérotés et diminue légèrement la vitesse de croissance mycélienne; par contre l'absence de sodium ou de calcium n'a pas d'effet sensible. L'absence de calcium accélère néanmoins légèrement la vitesse de maturation des sclérotés. L'absence de potassium inhibe également la production des microconidies. Par contre l'absence de calcium, de magnésium ou celle de sodium sont sans effet sur ce phénomène.

- Une gamme très étendue de pH (3,5 jusqu'à 9,5) est convenable pour la production de sclérotés mais les pH légèrement acides (4,5 et 5,5) sont les plus favorables. Etant donné qu'après 1 semaine de culture, les différents pH testés évoluent spontanément pour se stabiliser dans une zone comprise entre 3,5 et 5,5, il est difficile d'attribuer à ce facteur une influence sur la formation des microconidies d'autant plus que celle-ci ne débute qu'après 4 semaines de culture.

- L'absence de thiamine n'a d'effet ni sur la croissance mycélienne ni sur la production de sclérotés et de microconidies, donc *Botrytis cinerea* n'est absolument pas auxotrophe par rapport à cette vitamine

- Nous retiendrons donc pour nos expériences les conditions de culture suivantes:

- . Milieu: Huguenin liquide avec glucose (24 g/l) et nitrate de potassium (1 g/l)
- . pH = 5,5
- . Température d'incubation : 18°C
- . Obscurité pour la production de sclérotés.
- . Eclairage nyctéméral pour la production de microconidies.

2ème PARTIE

REALISATION DU CYCLE *IN VIVO*
DE *BOTRYOTINIA FUCKELIANA*

CHAPITRE I

LES MICROCONIDIES ET LEUR ROLE

I.- MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

On peut rappeler du point de vue historique que les microconidies des *Sclerotinia* ont été décrites pour la première fois avec beaucoup de précision par Tulasne (1853).

De Bary (1884) a signalé l'existence, pour le *Botryotinia fuckeliana*, d'une forme microconidienne qu'il a appelée "spermaties": cette forme a été rencontrée chez beaucoup de *Pezizes* et plus particulièrement chez celles qui composent les groupes très voisins des *Sclerotinia* et *Stromatinia* comme *Sclerotinia tuberosa*, *Sclerotinia bolaris*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia trifoliorum* et *Sclerotinia convoluta*. Il n'a pas pu obtenir la germination de ces spermaties, dénommées à tort "sporidies" par De Bary.

Lindner (1887) le premier, a remarqué la formation de microconidies dans les vieilles cultures de *Botryotinia fuckeliana*. Des microconidiophores portent les microspores en chaînettes sur des microphialides.

Smith (1903) a trouvé des microconidies dans des cultures de *Botrytis cinerea* sur la surface du milieu gélatiné; elles se trouvent dans une matière d'aspect cireux.

Les microconidies sont des microspores de forme sphérique de 2 à 4 μm de diamètre; elles contiennent une grande vacuole recélant un grand nombre de granules métachromatiques et aussi du glycogène. Le cytoplasme forme une couche très fine et le noyau apparaît comme une petite masse homogène dans le cytoplasme contenant un petit nucléole (Beauverie 1903).

Beauverie et Guilliermond (1903) ont obtenu la formation de microconidies sur bouillon de peptone et même sur eau distillée. Ils ont également constaté la formation de microconidies endocellulaires. Régulièrement la formation de microconidies se fait par la germination des conidies de *Botryotinia fuckeliana*.

Istvanffi (1905) a obtenu la formation de microconidies sur de la glycérine et aussi l'apparition d'autres types microconidiens différant de la forme classique par leur mode de formation.

Brooks (1908) a observé que les microconidies se formaient sur milieu pauvre (10% de gélatine) beaucoup mieux que sur milieu riche. En effet, dans ce cas, c'est la formation des conidies qui prend le dessus.

Brierley (1918) a publié un article bien documenté sur la formation et la biologie des microconidies de *Botryotinia fuckeliana*: la température, la lumière, l'humidité et la nutrition n'ont pas un effet net sur la formation de microconidies ; par contre l'âge de la culture est l'élément dont le rôle est prépondérant. Cet auteur a également noté que les microconidies étaient capables de germer dans l'eau.

Massey (1928) a réussi à obtenir un fort pourcentage de microconidies sur milieux P.D.A et glucose - peptone - agar, mais il n'a pas réussi à les faire germer.

Drayton (1932, 1934a et 1934b) sur *Sclerotinia gladioli*, puis sur *Botryotinia convoluta* (1937), Groves et Drayton (1939) et Groves et Loveland (1953) sur *Botryotinia fuckeliana*, ont montré que les microconidies ont un rôle sexuel (spermaties) et il les considèrent comme les cellules mâle. Drayton (1932) a noté que les microconidies peuvent germer mais en très faible pourcentage.

Willetts (1968) a étudié la formation des microconidies de *Monilinia fructicola*; il a noté que le pH du milieu de culture était sans effet sur leur formation. La température non plus ne joue pas un rôle déterminant, les microconidies se forment sur une gamme étendue de températures de 14°C jusqu'à 25°C. Elles se forment mieux sur milieux pauvres en azote mais elles ne se forment pas sur milieux contenant du NH_4Cl , NH_4NO_3 et NaNO_3 .

Cet auteur a enfin noté que la concentration et la nature des sources de carbone n'ont pas d'influence sur la formation des microconidies.

Calonge (1970) a étudié l'ultrastructure des microconidies de *Sclerotinia sclerotiorum*; il a noté que la microconidie possède un grand noyau et un globule lipidique très gros qui occupe la plus grande partie de la cellule, très peu de mitochondries (une ou deux par cellule) et enfin, un réticulum endoplasmique dispersé. Les organites cellulaires sont bien entourés par une membrane qui se compose de deux très fins feuillettes (0,06 μm).

Grindle (1979) a confirmé la germination des microconidies, mais seules germaient celles qui provenaient d'une seule des 8 souches dont il disposait.

II. - MODE DE FORMATION DES MICROCONIDIES (Fig. 1).

Les microconidies de *Botrytis cinerea* peuvent avoir plusieurs origines et se former après les autres mécanismes de dissémination (ascospores, sclérotés et conidies), c'est-à-dire, en fin de cycle biologique. Elles sont produites par des structures différentes des structures conidiogènes.

Il faut noter que les structures productrices de microconidies (microphialides) peuvent se développer à partir de tous les autres mécanismes de dissémination (sclérotés, conidies, mycélium, ascospores). Nous pensons que cette surabondance peut-être reliée au fait que les microconidies jouent le rôle de spermaties dans le cycle sexuel de *Botryotinia fuckeliana*.

D'après des travaux antérieurs aux nôtres (Lindner 1887, Smith 1903, Beauverie et Guilliermond 1903, Istvanffi 1905, Brierley 1918, Drayton 1932, et Grindle 1979), on peut dire que les hyphes et les conidies sont

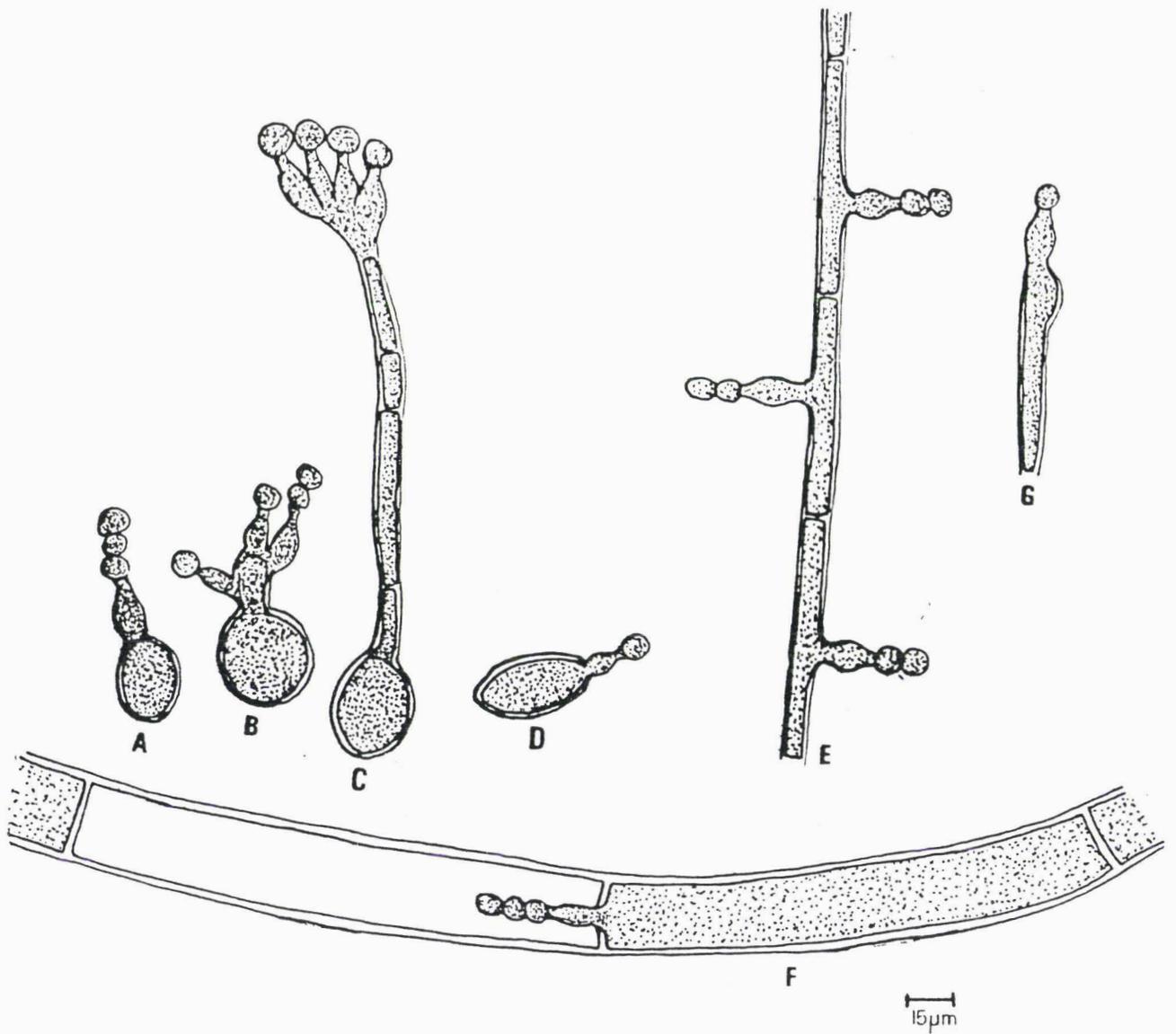


Figure 1 :

Modes de formation des microconidies:

- A, B et C = Par germination des conidies.
- D = Par germination des ascospores.
- E et F = Par modification des hyphes végétatives à l'intérieur et à l'extérieur.
- G = A partir des paraphyses.

capables de produire des microconidies sous différentes conditions. Nous avons constaté aussi la formation des microconidies à partir des sclérotes, des ascospores et des paraphyses.

Il faut mentionner que le mode habituel de formation des microconidies est un conidiophore provenant d'un mycélium végétatif dans les conditions normales de développement; mais sous conditions inhabituelles, les microconidies sont produites par les autres formes de ce champignon.

A - ETUDE CYTOLOGIQUE EN MICROSCOPIE OPTIQUE

1) Formation de microconidies à partir des conidies (fig. 1, A, B et C)

Les conidies normales en taille sont capables de former des microconidies sous des conditions précises.

Au cours des essais que nous avons effectués sur la germination des conidies de *Botrytis cinerea* nous avons constaté que les conidies étaient capables de germer dans l'eau distillée stérile, sur les milieux pauvres liquides ou gélosés très humides, à une température inférieure à 15°C soit à l'obscurité soit à la lumière. 4 à 7 jours plus tard, ces germinations produisent des microconidies.

Les conidies commencent à devenir un peu plus grosses; cette augmentation de taille est accompagnée par l'apparition d'une ou deux protubérances qui donnent, un peu plus tard, de petits tubes germinatifs qui ressemblent, au début, à un tube germinatif normal. Dès que ce tube atteint 10 - 15 μm de longueur sa croissance s'arrête et il se renfle au sommet prenant la forme d'une bouteille et commence alors à fonctionner comme une phialide. Le sommet de cette phialide se renfle petit à petit donnant à la fin, naissance à une petite microconidie qui se sépare directement de celui-ci ou s'en éloigne par la formation d'une autre

microconidie intermédiaire (figure 1A, 1B et planche 4, photo 14).

Il peut aussi arriver que le tube germinatif se divise en deux longues cellules qui se séparent par formation d'une cloison. La cellule du sommet se transforme en une phialide et la cellule de base commence à former un autre phialide en position latérale. On n'observe jamais qu'une seule phialide par cellule.

On peut aussi trouver des cas un peu plus compliqués que les précédents: la cellule du sommet porte plusieurs phialides qui donnent finalement une masse de microconidies. Parfois le tube germinatif peut continuer son développement et devenir une longue hyphe de 6 à 7 cellules; la cellule du sommet se renfle et forme plusieurs phialides (figure 1C).

Nos résultats confirment ceux de Harrison et Hearngreaves (1977) sur les conidies de *Botrytis fabae*; celles-ci germent aussi dans l'eau et donnent des microconidies pourvu que la température soit inférieure à 30°C et supérieure à 15°C.

Les conidies d'autres espèces du genre *Botrytis* donnent aussi des microconidies; tel est le cas de *Botrytis tulipae* (Coley-Smith 1980).

2) Formation des microconidies par le mycélium végétatif

Nous avons constaté que les différentes zones du mycélium végétatif sont capables de produire des microconidies sous des conditions précises. Le taux d'humidité surtout joue un rôle très important.

Après essais sur divers milieux nous avons constaté que le mycélium végétatif était capable de produire des microconidies de différentes façons dans l'eau ou sur un milieu nutritif solide à 100 % d'humidité et aussi dans les milieux liquides.



On peut voir facilement la formation de phialides latérales sur un mycélium. Il y a toujours une seule phialide sur chaque cellule (figure 1E et planche 4, photo 16). On peut aussi voir sur le mycélium végétatif plus âgé (3 - 4 mois) des microconidies se former sur un très court microconidiophore qui sort directement d'une cellule. Ce microconidiophore porte plusieurs phialides qui donnent une grande masse des microconidies.

On peut encore voir la formation des phialides sur l'apex arrondi d'un mycélium végétatif.

Des microconidies endocellulaires peuvent se former (Lindner 1887, Beauverie 1899 et Brierley 1918) dans de vieilles hyphes (3 - 4 mois) dans des conditions de forte humidité et aussi dans le jeune mycélium qui se développe dans l'eau ou dans les milieux liquides. Le processus débute par l'apparition d'une phialide ou deux sur la paroi intercellulaire (figure 1F). Les microconidies qui se forment sur ces phialides restent à l'intérieur de la cellule et sont libérées ultérieurement par destruction de la vieille paroi. Dans le mycélium âgé les phialides endocellulaires se forment toujours au contact d'une cellule pleine de cytoplasme vivant et se développent de l'autre côté du septum dans une cellule presque vide.

Parfois la phialide ne donne pas directement des microconidies mais se développe à partir de la cellule et forme une petite hyphe composée de 3 à 5 courtes cellules; ensuite apparaissent plusieurs phialides sur la cellule terminale de cette hyphe.

3) Formation des microconidies par un microconidiophore

Dans les conditions normales de développement les microconidies sont portées par un microconidiophore (planche 4, photo 18).

Le mycélium végétatif de *Botrytis cinerea* (planche 4, photo 19) se développe et se ramifie donnant une hyphe très grêle qui se compose de deux parties :

- Dans la partie supérieure, la paroi des cellules est très mince, remplie d'un contenu cellulaire très dense. La cellule terminale se renfle puis devient hémisphérique, pleine de protoplasme dense et granulaire. Ensuite on remarque la formation de petites protubérances qui évoluent en petites phialides produisant directement un grand nombre de microconidies. Cette hyphe qui porte le microconidiophore est incapable de donner une prolifération végétative.
- Dans la partie inférieure, la paroi des cellules est épaisse; leur contenu est hyalin, vacuolisé et le protoplasme n'est pas dense. Ces cellules sont capables de former des microconidies de deux façons :
 - . microconidies endocellulaires.
 - . formation d'une protubérance latérale qui donne ensuite plusieurs phialides sur lesquelles les microconidies prennent naissance.

4) Formation des microconidies sur les sclérotés

Cette méthode de production de microconidies est à notre avis biologiquement très importante parce qu'elle implique directement l'organe (sclérote) à partir duquel va se développer l'apothécie.

Lors de nos expériences sur la production des apothécies, nous avons constaté, après avoir effectué plusieurs prélèvements dans des tubes contenant des sclérotés n'ayant pas subi de spermatisation préalable, que ceux-ci contenaient un grand nombre de spermaties dont nous avons essayé de connaître l'origine.

Willettts et Wong (1980) ont trouvé des spermaties sur les hyphes végétatives qui couvrent la surface extérieure des sclérotés de *Sclerotinia trifoliorum* et *Sclerotinia sclerotiorum* mais ils n'ont pas observé la présence de microconidiophores provenant de l'intérieur du sclérote.

Lorenz et Eichhorn (1983) ont, eux aussi, trouvé des microconidiophores sur la surface de sclérotés de *Botrytis cinerea*: ces microconidiophores sont très courts et peu nombreux.

Au cours du travail de cytologie que nous avons fait sur les sclérotés nous avons observé que plusieurs microconidiophores sortaient de l'intérieur de ceux-ci (planche 4, photo 17). Les microconidiophores sont très courts, ils percent les cellules noires du cortex, se renflent et ensuite donnent plusieurs phialides pour produire des microconidies. Mais ils ne se développent pas au-delà de la surface du sclérote. Notre travail par la microscopie électronique à balayage a confirmé cette observation.

5) Formation des microconidies par des ascospores et des paraphyses

Arnaud et Barthelet (1936) ont noté que les ascospores du *Monilia* sont capables de produire des microconidies soit après la formation de phialides, soit directement .

Les ascospores du *Botryotinia fuckeliana* sont également capables de produire des microconidies dans des conditions précises.

Au cours de nos recherches sur la germination des ascospores nous avons montré que celles-ci, après 36 à 48 h. (dans l'eau distillée stérile à des températures situées entre 4°C et 15°C, à la lumière ou à l'obscurité) commencent à germer et donnent un ou deux tubes germinatifs composés d'une seule cellule courte portant une phialide qui forme des microconidies (planche 4, photo 15). Parfois les ascospores forment directement une ou deux phialides (figure 1D).

On peut voir aussi le tube germinatif se développer en donnant un long tube composé de quatre ou cinq longues cellules; chacune de ces cellules constitue une phialide latérale et la cellule terminale se renfle au sommet

et forme deux ou plusieurs phialides. On a donc ainsi un bouquet de phialides sur l'ascospore.

Les ascospores, en milieu nutritif liquide ou sur milieu gélosé, ont un comportement différent de celui qu'elles montrent dans l'eau. En effet dans ces conditions, elles perdent leur capacité à produire des microconidies et germent, donnant des hyphes végétatives de la forme polyactis qui peuvent plus tard produire des microconidies.

Il faut préciser que les ascospores de *Botryotinia fuckeliana*, produisent toujours des microconidies après formation des phialides, mais par contre nous n'avons jamais vu se former des microconidies directement sans phialides comme chez le *Monilia* (Arnaud et Barthelet, 1936).

La formation des microconidies commence par l'apparition d'une ou deux protubérances qui donnent un peu plus tard des phialides. L'apex de celles-ci s'arrondit et il s'y accumule un cytoplasme dense. La zone sub-apicale s'élargit en entonnoir, l'apex augmente son volume, devient de plus en plus sphérique, puis se sépare de la phialide par une cloison; ensuite une autre microconidie se forme sous la première et repousse celle-ci vers l'extérieur (Brierley 1918).

D'après Le Gal et Mangenot (1960), cité par Chadefaud (1965) les asques et les paraphyses du *Mollisia benesuda* (Discomycète) sont capables de produire des microconidies.

Nous avons aussi constaté, en observant des préparations réalisées par écrasement d'apothécies, que les paraphyses produisaient des microconidies uniquement dans les apothécies âgées 45-60 jours après la formation des apothécies (figure 1G et planche 4, photo 13).

B - ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Le but de notre travail par la microscopie à balayage est d'étudier la surface du sclérote et de suivre le développement des initiales apothéciales puis la formation des apothécies.

Cette étude nous a permis de voir la formation des microconidiophores par des sclérotés. Nous avons photographié des microconidiophores sortant directement de l'intérieur du sclérote en perçant le cortex (planche 1, cliché 4).

Il faut préciser aussi que, même avec le microscope à balayage, il n'était pas facile de mettre en évidence les microconidiophores qui sortent de l'intérieur du sclérote. En effet ils sont tellement petits qu'ils ne peuvent être distingués que grâce à la microconidie qu'ils portent à leur extrémité et ils ont presque la même apparence que le cortex, mais pas la même couleur que les microconidiophores qui se développent sur la surface du milieu.

Nous avons aussi observé la présence d'un mycélium végétatif se développant sur la surface du sclérote et portant de longs microconidiophores. Ce mycélium provient probablement du milieu de culture sur lequel les sclérotés se sont formés dans les boîtes de Pétri

En microscopie photonique, nous avons observé la présence d'un ou plusieurs petits disques de mycélium se développant à la surface des apothécies âgées. La microscopie à balayage (planche 1, cliché 13) montre que ces disquettes mycéliennes proviennent de la germination des ascospores sur la surface de l'apothécie donnant des bouquets de phialides productrices de microconidies (planche 1, cliché 3). Il faut noter que ce phénomène se produit uniquement dans l'eau stérile ou en présence d'un fort pourcentage d'humidité qui favorise la germination des ascospores après la

déhiscence des asques; l'humidité stimule également la formation de phialides, productrices de microconidies, à partir des paraphyses.

Ramsey (1925) et Cohin (1979) ont noté que les ascospores de *Botryotinia fuckeliana* et *Sclerotinia sclerotiorum* germent sur la surface des apothécies en présence d'eau.

Après avoir trouvé une forte concentration de ribosomes dans des coupes de paraphyses de *Sclerotinia sclerotiorum* Kosasih et Willetts (1975a) ont attribué à celles-ci un rôle physiologique. Cette constatation vient à l'appui de nos observations relatives à la formation des microconidies à partir des paraphyses. Ces auteurs considèrent les paraphyses comme une source d'énergie pour la formation des asques et des ascospores. Ceci a été suggéré par la présence de fortes quantités de glycogène dans les paraphyses de *Sclerotinia sclerotiorum*.

III.- PROPRIETES DES MICROCONIDIES: ESSAIS DE GERMINATION

Le problème de la germination des microconidies a été longtemps discuté: s'agit-il de spermaties, gamètes mâles non germinatifs ou de microconidies pouvant jouer le rôle de gamètes ou de spores asexuées ?

Brierley (1918), Drayton (1932) et Grindle (1979) indiquent qu'un très faible pourcentage des spermaties du *Botrytis cinerea* germent. En outre, les spermaties de la plupart des souches sont totalement incapables de germer. Terui et Harada (1971) ont fait les mêmes constatations avec *Sclerotinia sclerotiorum*.

D'après ces auteurs, les spermaties germent dans l'eau ou dans les milieux nutritifs après 24 - 48 heures à une température de 17°C - 23°C ; elles grossissent puis émettent un petit tube germinatif qui se développe en mycélium portant un conidiophore de type polyactis.

Du fait que certains de ces éléments dénommés "spermaties" par les auteurs précités sont capables de germer, nous pensons que le terme "microconidies" serait préférable.

Au cours de notre travail nous avons essayé plusieurs fois d'obtenir la germination des microconidies provenant de plusieurs souches.

Nous en avons préparé 4 suspensions pures et aseptiques, à partir des souches microconidiogènes S 11, S 14, B.C6, et S.A.S 56 suivant le procédé original décrit dans l'annexe "Matériel et Méthodes".

Nous avons jugé souhaitable de vérifier si les spermaties qui se trouvent sur les structures génératrices d'ascogones, autrement-dit, les sclérotés, sont soumises à une stimulation de leur germination. Pour cela, nous avons choisi les 4 souches précédentes pour étudier la germination des spermaties qui, d'après nos résultats, paraissaient compatibles avec d'autres souches.

Nous avons repiqué les spermaties sur plusieurs milieux : malt-agar 2 %, malt liquide 2 %, grains de blé. Nous avons aussi utilisé la chambre (ou cellule) de VAN TIEGHEM pour observer la germination en microscopie photonique, toutes les 24 heures, à différentes températures: 4°C, 10°C, 14°C, 18°C, et 24°C. A la lumière non plus qu' à l'obscurité, nous n'avons obtenu aucun développement mycélien à partir de ces spermaties.

Posant pour hypothèse que les spermaties germent en présence des sclérotés et donnent un tube germinatif pour féconder la cellule ascogonale, nous avons effectué plusieurs prélèvements dans tous les tubes de sclérotés donnant des apothécies. Les prélèvements furent effectués successivement après la spermatisation du sclérote puis toutes les 24 heures jusqu'à la fin de la formation des apothécies. L'observation en microscopie photonique n'a révélé la présence d'aucune spermatie en germination.

Enfin, ayant émis l'hypothèse que les spermaties pouvaient germer sur la surface du sclérote après spermatisation, en utilisant la microscopie électronique à balayage, nous avons balayé la surface des sclérotés pris 3 jours, 7 jours, 15 jours, 21 jours, 28 jours après le dépôt des spermaties. Nous avons trouvé un grand nombre de spermaties sur la surface des sclérotés mais pas une seule n'était en germination.

Nos résultats confirment ceux de Massey (1928) sur *Sclerotinia gladioli* et les résultats de Drayton (1932, 1934) sur *Botryotinia fuckeliana* et *Sclerotinia gladioli*.

D'après les résultats que nous venons d'annoncer, nous préférons utiliser le terme "spermatie" qui correspond mieux à ce type de comportement plutôt que celui de "microconidie".

CHAPITRE II

ABOUTISSEMENT DU GAMETOPHYTE:

La spermatie, l'ascogone et
la fécondation

I.- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DU ROLE DES SPERMATIES

Drayton (1934) a confirmé la nécessité de la spermatisation après qu'il eut obtenu la forme sexuée de *Sclerotinia gladioli*. Transférant les spermatis sur les primordia apothéciaux, il a appelé cette opération "spermatisation", et la considère comme nécessaire pour obtenir la phase dicaryotique.

Drayton (1937), Groves et Drayton (1939), Bergquist et Lorbeer (1972) font la même constatation pour *Botryotinia convoluta*, *Botryotinia fuckeliana*, *Botryotinia squamosa*.

Par contre (Norton 1923; Bijorling 1951; Saito 1973; Kosasih et Willetts 1975b) ont constaté que la spermatisation n'était pas indispensable chez *Sclerotinia sclerotiorum* et *Sclerotinia trifoliorum* pour avoir la phase dicaryotique qui provient directement d'une hyphes végétative.

Heuberger (1934) d'après ses études cytologiques sur *Sclerotinia fructicola*, a noté que la phase dicaryotique résultait d'un échange nucléaire direct entre des hyphes végétatives.

Holly (1974) a prétendu avoir obtenu la phase dicaryotique de *Sclerotinia trifoliorum* par plasmogamie entre une spermatis et l'extrémité d'un mycélium végétatif.

Kharbush (1927) a étudié l'évolution nucléaire chez *Botryotinia fuckeliana* et constaté que la présence des hyphes ascogènes dans l'hyménium provenait d'une anastomose entre les hyphes qui forment le sous-hyménium. Ensuite elles forment les asques et les ascospores. Donc selon cet auteur la spermatisation n'est pas indispensable et les sclérotés sont capables de former les primordia apothéciaux sans spermatisation, comme dans les cas de *Sclerotinia sclerotiorum* et *Sclerotinia trifoliorum*. Au cours de notre

Tableau 11.1 : Effet sur la formation des apothécies d'une spermatisation par des spermaties, des conidies ou du mycélium

Souches	1*	1**	2*	2**	3*	3**	4*	4**
S. S.A.S 405 s. S.A.S 56	++++	4	++	6	0	0	0	0
S. S.A.S 56 s. S.A.S 405	++++	4	++	6	0	0	0	0
S. S.5 s. S.A.S 56	++++	4	++	6	0	0	0	0
S. S.8 s. S.A.S 56	++++	4	++	6	0	0	0	0
S. S.17 s. S.A.S 56	++++	4	++	6	0	0	0	0
S. S.18 s. S.A.S 56	++++	4	++	6	0	0	0	0
S. S.28 s. S.A.S 56	++++	4	++	6	0	0	0	0

S. = femelle (sclérotés); s. = mâle (spermaties); 1* = microconidies (spermaties); 2* = conidies; 3* = mycélium; 4* = sans spermatisation; (1**, 2**, 3** et 4**) = temps d'apparition des initiales apothéciales en semaines.

++++ = presque 100 % de fécondation;

++ = environ 50 % de fécondation

0 = pas d'apothécies .

travail nous avons essayé de répondre à deux questions essentielles:

- 1- Est ce que la spermatisation est indispensable pour la formation des apothécies ? A quel moment du cycle ce phénomène se situe-t-il ?
- 2- Quel est le rôle des spermaties dans le cycle ?

II.- ESSAIS DE FECONDATION PAR DES SYSTEMES DIVERS

1) Réalisation des croisements

Pour répondre à ces deux questions nous avons utilisé le protocole suivant :

Nous avons séparé les spermaties, les conidies, et les mycéliums de 2 souches monoascospores (souches mâles = S.A.S 56 et S.A.S 405) suivant le procédé original de préparation des suspensions de spermaties décrit dans l'annexe "Matériel et Méthodes". Nous avons ensuite choisi 7 souches monoascospores compatibles (souches femelles = sclérotés = S.A.S 56; S.A.S 405; S.5; S.8; S.17; S.18 et S.28) ensuite nous avons croisé les souches par des spermatisations effectuées selon le tableau II.1.

2) Résultats

D'après le tableau II.1 nous pouvons constater que nos résultats permettent d'établir deux ensembles :

- Lots dans lesquels aucun développement d'apothécies n'est observé

Dans les lots spermatisés par du mycélium végétatif et également dans les lots sans spermatisation, nous n'avons obtenu ni apothécies ni initiales apothéciales. Ceci confirme que le mycélium végétatif est incapable de féconder les cellules ascogoniales. La spermatisation est donc indispensable pour avoir le stade parfait de ce champignon. Nos souches ne sont donc pas homothalliques mais

hétérothalliques. Ces résultats confirment ceux de Faretra (1988); mais pas ceux de Kharbush (1927). Donc, la spermatisation est indispensable pour avoir la phase dicaryotique, indubitablement pour les souches homothalliques, mais sans doute également dans le cas de souches hétérothalliques. Cette phase ne se produit pas par anastomose entre hyphes végétatives ainsi que l'a indiqué Kharbush (1927).

Nous avons déjà constaté que le mycélium végétatif était capable de produire des spermaties dans l'eau distillée, on peut donc penser que des hyphes utilisées pour les essais de spermatisation produisent d'abord des spermaties qui seraient fécondantes. Or nous n'avons obtenu aucune fécondation dans ces conditions. Les hyphes ne sont capables de produire des spermaties que si elles sont âgées (2 à 3 mois). Cette observation conduit à se poser la question de la simultanéité de la présence dans un état fonctionnel des deux constituants de la fécondation et explique peut-être l'hétérothallisme observé. Egalement dans le quatrième lot (sclérotés dans l'eau distillée sans spermatisation), nous avons obtenu la production de spermaties en grand nombre, mais pas de développement d'apothécies. Ce fait confirme donc l'hétérothallisme des souches utilisées.

- Apothécies développées

a) Lots spermatisés par des spermaties :

Dans les tubes spermatisés par des spermaties, le développement des apothécies commence à partir de la quatrième semaine et le pourcentage de production est proche de 100%. Donc, nous pouvons affirmer que la spermatisation est nécessaire au développement des apothécies.

b) Lots spermatisés par des conidies

Dans les lots spermatisés par des conidies, nous avons obtenu des germinations carpogéniques de sclérotés et ensuite des apothécies fertiles (après vérification par le microscope photonique en écrasant des apothécies sur une lame porte-objet) mais le pourcentage de formation était faible (50%).

Après plusieurs prélèvements effectués sur tous les tubes spermatisés par des conidies, nous avons constaté que lorsque des apothécies se développaient, les conidies avaient d'abord commencé par produire des spermaties. Lorsque cette production de spermaties n'a pu lieu, aucune apothécie ne se développe. La présence de la spermatie semble donc être indispensable pour conduire le développement des apothécies. Mais l'apparition des primordia apothéciaux est toujours tardive (pendant la sixième semaine). Ce retard correspond au temps nécessaire pour la production des spermaties. Cette constatation confirme donc ce que nous avons affirmé dans le paragraphe précédent.

Ces observations indiquent donc que :

- . Le développement des apothécies implique sans doute une fécondation préalable au sens strict du terme.
- . Les spermaties sont aptes à assurer cette fécondation directement après leur différenciation, au bout de quelques heures.
- . Les conidies sont incapables de participer directement à un processus de fécondation : elles sont capables de produire des spermaties qui assureront cette fécondation.

III.- SIGNIFICATION DE LA SPERMATISATION

Les résultats de Kharbush (1927) nous ont conduits à essayer de savoir si les spermaties avaient un effet enzymatique ou un effet chimique qui conduit les sclérotés à former les stipes puis à développer la phase dicaryotique des apothécies.

1) Protocole expérimental

Pour réaliser ces essais nous avons utilisé la technique suivante.

Nous avons choisi 3 souches monoascospores spermatiennes (souches mâles = S.A.S 56; S.14 et S.11), et 2 souches monoascospores sclérotiales compatibles (souches femelles = S.A.S 405 et S.18), puis nous avons croisé les 5 souches après avoir soumis les suspensions de spermaties à 4 traitements différents. Ceci devrait nous permettre de comprendre si les spermaties ont un effet chimique ou enzymatique sur la carpogénèse:

- spermatisation de sclérotés par des spermaties autoclavées à 0,5 atmosphère pendant 10 minutes.
- spermatisation de sclérotés par des spermaties traitées par les ultrasons qui déchirent la paroi cellulaire et nous permettent d'avoir les enzymes en bon état ainsi que le contenu cellulaire. Nous avons utilisé un générateur à ultrasons au maximum d'intensité pendant 3 minutes.
- spermatisation des sclérotés par des spermaties traitées par le Triton X-100 qui nous permet d'extraire les enzymes.
- spermatisation des sclérotés par du filtrat d'hyphes dans l'eau stérile suivant la méthode de Beauverie (1903). L'eau stérile présente en effet l'avantage de n'apporter aucun composé chimique autre que ceux provenant du champignon.

- spermatisation des sclérotés par des spermaties n'ayant subi aucun traitement (tubes témoins).

2) Résultats

D'après le tableau II.2 nous pouvons constater que :

- La spermatisation effectuée par des spermaties autoclavées (le premier lot) nous a donné des résultats négatifs. Ces résultats à notre avis sont normaux car l'autoclavage tue les spermaties et détruit leurs enzymes. Les spermaties ainsi traitées n'ont pas stimulé la formation des primordia apothéciaux.
- Le traitement des spermaties par du triton X-100 et également le traitement par les ultrasons (lot 2 et lot 3), nous ont donné des résultats négatifs. Nous n'avons pas non plus obtenu d'initiales apothéciales. On peut donc penser que la fécondation nécessite l'intégrité cellulaire de la spermatie.
- La spermatisation effectuée par du filtrat d'hyphes donne également des résultats négatifs et nous n'avons pas obtenu de primordia apothéciens. Ces résultats nous confirment que toutes les enzymes qui sont synthétisées pendant le développement de *Botrytis cinerea* et également pendant la production des conidies et des spermaties sont sans effet sur la carpogénèse et n'ont pas d'effet stimulant sur la formation des initiales apothéciales.
- Les résultats positifs dans le cinquième lot nous montrent que la spermatisation est indispensable pour la fécondation des cellules ascogoniales.

Donc nous pouvons dire que la spermatisation n'est ni une réaction enzymatique ni une réaction chimique mais c'est un acte biologique conduisant à la fusion de deux noyaux vivants et compatibles qui induit en conséquence la formation des initiales apothéciales et des apothécies.

Tableau II.2 : Effet de divers traitements appliqués aux spermaties sur la formation des apothécies.

Souches	1*	2*	3*	4*	5*
S.S.A.S405 s.S.A.S56	0	0	0	0	+
S.S.A.S405 s.S.14	0	0	0	0	+
S.S.18 s.S.14	0	0	0	0	+

1* = spermaties autoclavées; 2* = spermaties traitées par du triton-100;
 3* = spermaties traités par les ultrasons; 4* = filtrat d' hyphes spermatiennes se développant dans l'eau stérile; 5* = suspension de spermaties; S. = femelle (sclérotés); s. = mâle (spermaties);
 0 = pas d'apothécies; + = formation d'apothécies.

IV.- DETERMINATION DU MOMENT DE LA FECONDATION
ET DE SA LOCALISATION ANATOMIQUE

Puisque la spermatisation est indispensable au développement des apothécies et que la fécondation ne peut, ainsi que nous l'avons montré, être assurée que par des spermaties, cette dernière correspond bien au gamète mâle. La fécondation implique la présence d'un organe femelle, ascogone des Ascomycotins, que nous allons essayer de mettre en évidence.

Si nous parvenons à déterminer à quel moment et à quel endroit a lieu la fécondation, nous pourrions localiser cet ascogone plus facilement.

Sur *Botryotinia squamosa* Lorbeer et Bergquist (1972) ont pu stimuler la formation des initiales apothéciales en traitant les sclérotas par des extraits cellulaires de souches compatibles. Mais, les stipes qui se développaient ne parvenaient pas au stade apothécie.

Ces résultats conduisent à penser que la fécondation nécessaire à l'apparition du sporophyte, ne se produit qu'après la formation des initiales apothéciales, puisque de simples extraits cellulaires suffisent à stimuler cette dernière alors que la fécondation implique, par définition, la présence d'un noyau efficace. Pour vérifier si le processus était similaire chez *Botryotinia fuckeliana*, nous avons effectué une étude de l'évolution des ébauches en utilisant le microscope à balayage, puis nous avons essayé de déterminer les conditions d'environnement qui étaient les plus favorables à l'induction du développement des apothécies.

A - ETUDE MORPHOLOGIQUE DES EBAUCHES ET DE LEUR DEVELOPPEMENT

En suivant les différents stades du développement des initiales apothéciales jusqu'à la formation des apothécies (planche 1, clichés 6, 7, 8, 11 et 12); nous pouvons constater que les primordia ont un cortex extérieur qui se compose de cellules brunâtres très serrées dont la

structure s'oppose à la pénétration des spermaties et à fortiori des conidies.

Même au début de la formation des apothécies nous avons constaté que les sommets des primordia étaient bien fermés par des hyphes un peu grosses. Ces sommets commencent à se gonfler progressivement pour former les disques apothéciens. Ce gonflement est bien suivi par la formation d'un orifice apical au sommet de l'apothécie. Cet "ostiole" est fermé par un voile membraneux très fin qui empêche la pénétration des spermaties et protégera plus tard les asques des changements de climat extérieur surtout des températures élevées. En effet ce voile se déchire uniquement après la formation des apothécies pour permettre la libération des ascospores. Donc, la pénétration des spermaties ne se fait pas au niveau du disque apothécien.

Tu (1982) a décrit la formation d'un voile membraneux sur la surface des apothécies de *Sclerotinia sclerotiorum*, mais dans ce cas-là, la formation de ce voile n'interfère pas avec la pénétration des spermaties puisque la phase dicaryotique se produit par anastomose entre hyphes végétatives et que la spermatisation n'est donc pas indispensable. Par contre dans le cas de *Botryotinia fuckeliana* où la spermatisation est indispensable pour avoir la phase dicaryotique, la formation d'un voile membraneux est une preuve de ce que la fécondation se produit avant la formation des primordia. Il semble donc que nous puissions affirmer que la fécondation ne se produit jamais après la formation des initiales apothéciales mais avant celle-ci.

B - ETUDE DU SCLEROTE ET LOCALISATION DE L'ASCOGONE

En étudiant la surface des sclérotés, nous avons constaté l'existence des cellules corticales détruites ou brisées et également de petits espaces intercellulaires suffisants pour permettre la pénétration des spermaties. La fécondation pourrait avoir lieu à l'intérieur du sclérote. Kosasih et Willetts (1975a) ont d'ailleurs trouvé des spermaties à l'intérieur des sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum*

Les observations précédentes conduisent à penser que la fécondation chez *Botryotinia fuckeliana* se réalise au niveau du sclérote. C'est donc sans doute dans celui-ci que se trouve la cellule femelle. Nous avons donc, par une étude cytologique des sclérotés soumis à diverses conditions d'environnement, essayé de mettre les ascogones en évidence et de voir s'il s'agissait d'une structure gamétophyte simple ou d'un véritable ensemble gamétique.

1) LES SCLEROTES

La formation des sclérotés du *Botrytis cinerea* a été étudiée par Istvanffi (1905) sur un milieu naturel (la vigne); il a décrit quatre modes de formation des sclérotés :

- A partir d'un petit peloton isolé d'hyphes fortement enroulées sur elles-mêmes (des petits sclérotés se forment uniquement).
- A partir d'une palissade homogène et dense d'hyphes plus ou moins parallèles située sous la surface de l'hôte.
- A partir d'une palissade homogène d'hyphes contenant une couche de pelotons, qui fusionnent par la suite..
- A partir d'une palissade d'hyphes qui contient plusieurs pelotons dispersés.

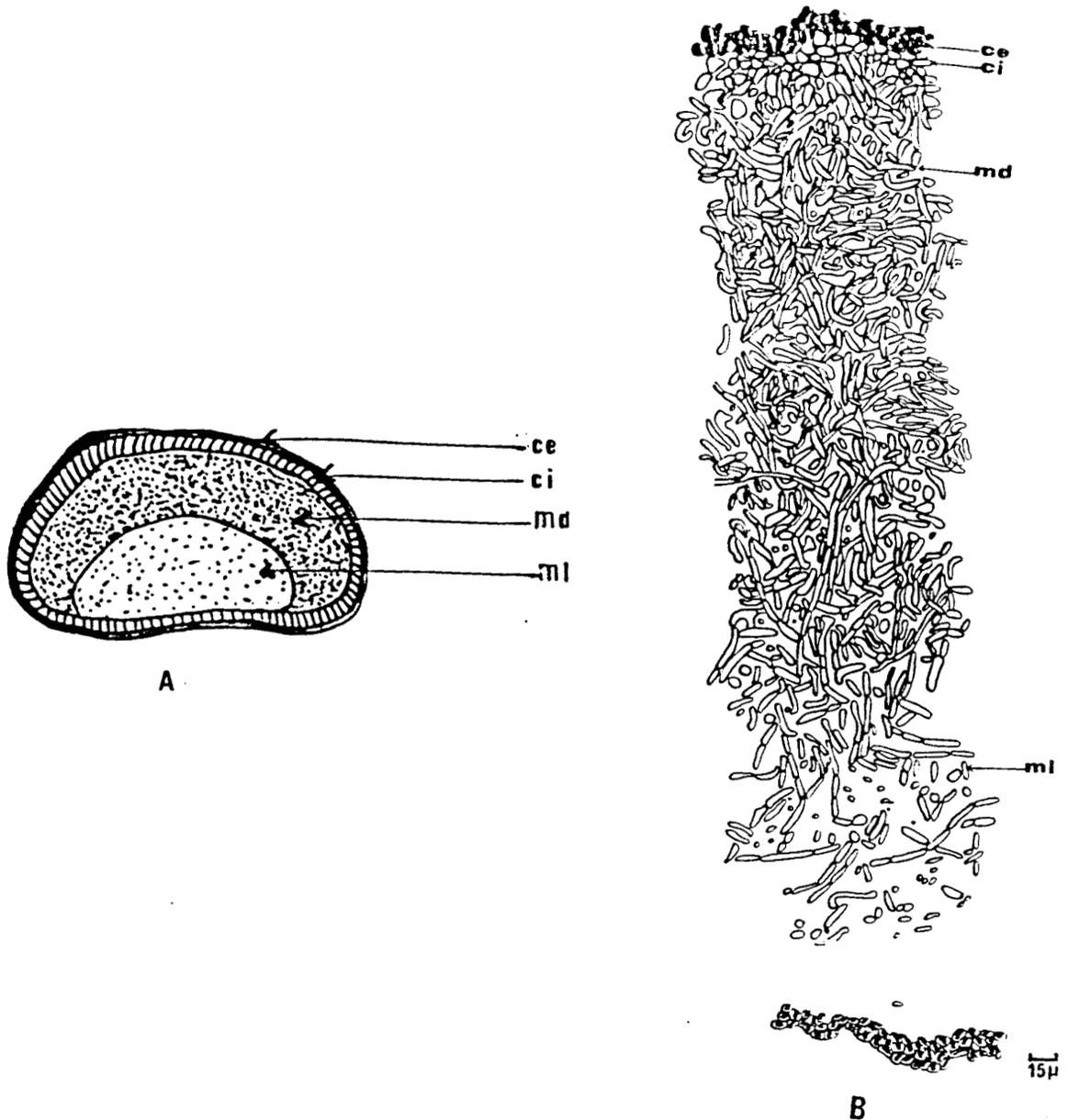


Figure 2 :

A- Structure des sclérotes : ce, cortex externe; ci, cortex interne; md, médulle dense; ml, médulle lâche.

B- Coupe longitudinale dans un sclérote du *Botrytis cinerea* avant la période de conditionnement au froid : ce, cortex externe; ci, cortex interne; md, médulle dense; ml, médulle lâche.

D'après Townsend et Willetts (1954), ces divers types de formation représentent des stades tardifs. Chez le *Botrytis alii* le sclérote se forme à partir d'une hyphe végétative qui s'allonge sous la surface du milieu en se ramifiant à son extrémité et produit, par dichotomies successives, un massif d'hyphes distinctes puis, après coalescence de ces dernières un tissu cohérent. Au terme de la croissance, un cortex composé d'hyphes à parois épaisses et colorées se différencie à la surface de cette structure en formation (Butler 1966).

2) Structure des sclérotés.

a) Sclérotés observés directement.

La structure des sclérotés a déjà été bien étudiée chez différentes espèces du genre *Botrytis* par De Bary (1884), Beauverie et Guilliermond (1903), Istvanffi (1905), Reidemeister (1909), Townsend et Willetts (1954), Hennebert et Groves (1963), Willetts (1968 b et c et 1972), Hennebert (1973), Leal, Blanco et Gomez Miranda (1979), et Blullack, Willetts, Ashford (1980).

D'après ces observations les sclérotés matures se composent de deux parties différentes: le cortex et la médulle que nous avons également pu distinguer chez *Botrytis cinerea*.

(1) Le cortex. (fig. 2A et 2B).

le cortex se divise en deux parties.

*) Le cortex externe.

Cette couche est toujours mince, composée de deux à trois couches de cellules à section circulaire, très serrées, à parois épaisses et noires du fait de l'accumulation de mélanine; cette dernière confère aux cellules superficielles une certaine solidité et un rôle de protection vis à vis des structures internes.

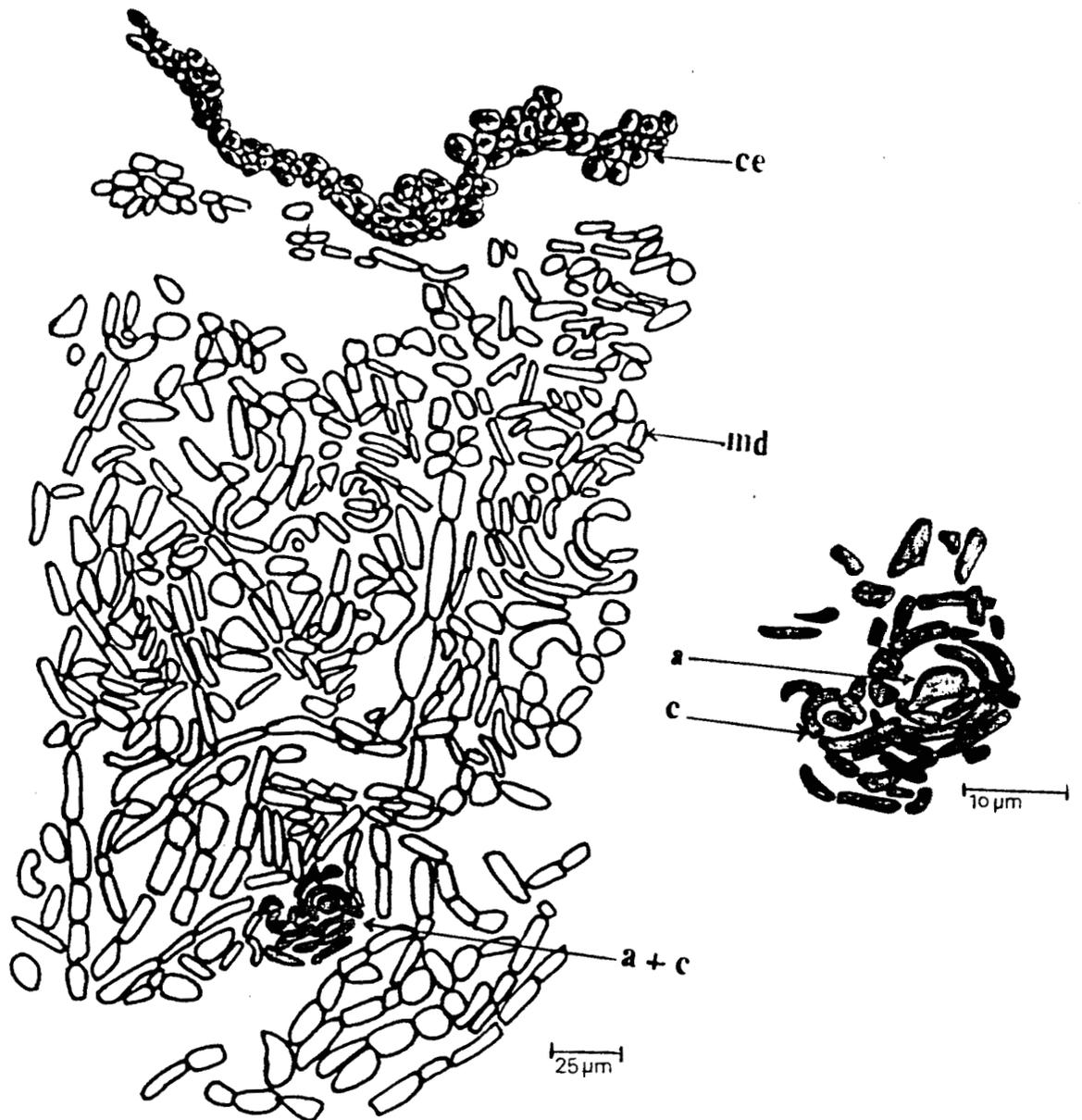


Figure 3 :

Stade (1) du développement des apothécies du *Botryotinia fuckeliana* : jeune ébauche .

ce, cortex externe; md, médulle dense; a + c, carpocentre; a, cellules ascogoniales; c, cellules du plexus carpocentral.

**) Le cortex interne.

Le cortex interne, situé sous le cortex externe, est un peu plus épais que la zone précédente, et se compose de trois à quatre couches de petites cellules rondes également très serrées et sans espaces intercellulaires.

(2) La médulle.

Elle constitue la partie centrale du sclérote. Elle se compose d'hyphes filamenteuses qui se développent dans toutes les directions et se répartissent en deux zones distinctes.

*) La médulle dense.

Située immédiatement sous le cortex interne, elle se compose d'hyphes hyalines très longues à cellules elles-mêmes allongées, serrées, et incluses dans une matière gélatineuse; les espaces intercellulaires sont peu visibles.

***) La médulle lâche.

C'est une couche plus interne et beaucoup moins importante que la médulle dense. Elle est composée d'hyphes courtes à cellules également moins longues et entremêlées de façon plus lâche.

Il faut préciser que, d'après nos observations qui confirment des observations antérieures, la taille des sclérotés est différente selon le milieu, la température et l'éclairage utilisés lors de leur production. Les proportions respectives des deux parties sont liées à la taille du sclérote.

b) Sclérotés après un séjour de 1 mois à 0°C

Induction de la formation de la cellule ascogoniale

Lorsque les sclérotés ont séjourné pendant un mois à une température de 0°C, on peut observer quelques modifications dans leur structure (fig. 3). Il apparaît en effet au sein de leur médulle dense, ou parfois un peu moins

Tableau II.3. Différents traitements suivis par les sclérotés.

Essais	Traitements successifs.			
	0°C	-10°C	-20°C	Spermatisation
Lot 1	0	0	0	+
Lot 2	30	0	0	-
Lot 3	30	0	0	+
Lot 4	0	30	0	+
Lot 5	0	0	30	+

Les chiffres correspondent au nombre de jours pendant lesquels les sclérotés ont été exposés à la température correspondante.

+ = Spermatisation effectuée

- = Pas de spermatisation

profondément, du côté de la face supérieure du sclérote, de petits massifs de cellules éosinophiles. Ceux-ci sont formés de filaments minces (c), étroitement enroulés en peloton autour d'une ou plusieurs cellules plus grosses, sans raison apparente. Ces cellules présentent tout à fait le caractère classique des cellules ascogoniales (Fayret, 1975). Il n'a hélas pas été possible d'observer le trichogyne qui normalement surmonte les ascogones. Nous pouvons néanmoins affirmer que la cellule femelle fécondable se trouve bien dans le sclérote et que c'est donc au sein de ce dernier que le sporophyte prendra naissance.

Ces résultats montrent en outre qu'un conditionnement par le froid est nécessaire à la différenciation des cellules ascogoniales à l'intérieur du sclérote.

3) Effets du froid plus intense sur la structure interne des sclérotés

Nos études sur l'effet des basses températures sur le pourcentage de carpogénèse montrent que le séjour des sclérotés pendant 1 mois à des températures basses (-10°C et -20°C) a un effet défavorable par rapport à des sclérotés qui ont été conservés pendant 1 mois à 0°C . Nous avons voulu en connaître les raisons et essayer de voir si les basses températures induisaient des changements dans la structure interne des sclérotés.

a) Protocole expérimental.

Pour effectuer ces essais, nous avons fixé des sclérotés, provenant de 5 lots différents, tous les 7 jours. Ces sclérotés ont été traités par le froid puis spermatisés et ensuite portés à 12°C selon les modalités reportées dans le tableau (II.3). Enfin nous avons effectué des coupes en utilisant la technique décrite dans l'annexe "Matériel et méthodes" pour repérer et compter les ébauches apothéciales qui se forment dans les sclérotés.

b) Résultats.

L'étude cytologique que nous avons effectuée montre que l'abaissement de la température à moins de 0°C provoque certains changements dans la structure interne des sclérotés. Ceux-ci sont probablement en partie responsables du retard observé pour la formation des ébauches apothéciales et leur évolution, et également de la diminution du pourcentage de carpogénèse.

Deux étapes dans les changements de structure liés à la température utilisée ont été observées.

- Première étape (planche 3, photo 9)

Sclérotés incubés à -10°C pendant 1 mois: la couche corticale supérieure conserve sa structure mais devient plus épaisse tandis que la couche médullaire s'amincit, la médulle lâche disparaissant et laissant place à une couche de cellules vides, mortes.

- Deuxième étape. (planche 3, photo 8)

Dans les sclérotés incubés à -20°C pendant 1 mois, la couche médullaire est encore plus mince, prenant une forme hémisphérique au centre du sclérote et laissant les bords presque vides d'hyphes. Ensuite se constitue une nouvelle couche corticale inférieure, à la limite de la couche de cellules mortes dérivées de la médulle lâche.

c) Conclusion.

D'après ces résultats nous pouvons établir que l'exposition prolongée des sclérotés à des températures inférieures à 0°C provoque certains changements dans leur structure interne et entraîne ensuite une diminution de leur taux de carpogénèse.

V.- CONCLUSION

D'après tous ces résultats nous pouvons constater que :

- La spermatisation est indispensable pour obtenir le stade parfait de *Botryotinia fuckeliana* que les souches soient homothaliques ou hétérothaliques.
- Les conidies ne sont pas capables de féconder les cellules ascogoniales directement mais elles doivent d'abord produire des spermaties par l'intermédiaire desquelles elles pourront féconder. Les spermaties formées directement sont capables de féconder les ascogones.
- La spermatisation de *Botryotinia fuckeliana* n'est ni une réaction enzymatique ni chimique, c'est un acte biologique aboutissant à la fusion de deux noyaux vivants et compatibles, qui donne ensuite la phase 2N.
- Nous avons mis en évidence la présence de la cellule ascogonale au sein du sclérote. Un séjour du sclérote à une température de 0°C induit l'individualisation de la cellule ascogonale.

CHAPITRE III

LE SPOROPHYTE ET SON ENVIRONNEMENT : Carpogénèse et développement de l'apothécie

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que le sporophyte prenait naissance dans le sclérote après la fécondation. Ce sporophyte va donner les asques dont l'apothécie est le support. Nous allons donc étudier le développement de ces apothécies.

I.- CHOIX DU MOMENT DE LA SPERMATISATION

Il nous a semblé que le moment auquel la spermatisation était effectuée pouvait améliorer la production des apothécies.

Nous avons donc apporté quelques modifications au protocole expérimental décrit dans le chapitre I de la première partie (spermatisation des sclérotés ayant séjourné 1 mois à 0°C. Cette spermatisation est effective avec une suspension de spermaties provenant d'une culture spermatienne pure.

A - Protocole expérimental

La spermatisation est effectuée après la maturation des sclérotés (2 semaines à 18°C et 3 semaines à 14°C après le repiquage des souches) et avant la période d'exposition au froid. Dans cette méthode nous avons placé des sclérotés après leur maturation directement dans des tubes 25 x 200 mm (tubes à rebord intérieur). Dans chaque tube nous avons mis 10 ml de suspension spermatienne et 10 sclérotés. Ensuite nous avons conservé les tubes à 0°C pendant 1 mois à l'obscurité. Enfin, nous avons transféré les tubes à 14°C à la lumière (12 h. de lumière /24 h).

Tableau II.4 : Sclérotés spermatisés après la période de maturation et avant de période de 0°C.

Essais	1*	2*
S.S.A.S405 s.S.A.S56	24	3,3
S.S.A.S405 s.S.14	21	3,1
S.S.18 s.S.14	22	3,4

1* = Temps moyen d'apparition des initiales (en jours).
2* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote

Tableau II.5. Sclérotés spermatisés après la période à 0°C

Essais	1*	2*
S.S.A.S405 s.S.A.S56	28	2,7
S.S.A.S405 s.S.14	33	2,9
S.S.18 s.S.14	29	2,9

1* = Temps moyen d'apparition des initiales (en jours).
2* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote.

Remarque Nous avons utilisé 50 sclérotés dans chaque essai, de taille comprise entre 0,5 et 0,7 cm.

B - Résultats

D'après les tableaux II.4 et II.5, nous pouvons constater que la spermatisation effectuée directement après la maturation des sclérotés accélère la formation des stipes et augmente aussi légèrement le nombre d'apothécies par sclérote.

Ces résultats expliquent pourquoi nous avons choisi d'effectuer la spermatisation avant le conditionnement des sclérotés à 0°C. Le contact précoce entre les spermaties et les cellules ascogoniales permet d'accélérer la formation des initiales. Nous pensons aussi que le transfert des sclérotés dans l'eau pendant un mois permet d'amollir leur cortex externe, ce qui en facilite la traversée par les initiales apothéciales. Le séjour des spermaties pendant un mois à 0°C n'a aucun effet défavorable sur l'activité des spermaties, leur viabilité et leur capacité à féconder les cellules ascogoniales.

C - DEFINITION DE LA METHODE DE PRODUCTION DES APOTHECIES

Nous utiliserons donc le protocole suivant pour la production des apothécies:

- Spermatisation des sclérotés mûrs par une suspension pure de spermaties.
- Séjour des sclérotés spermatisés à 0°C pendant 30 jours.
- Incubation de ces sclérotés à 14°C en conditions d'éclairage alterné (12h de lumière/24h).

II.- ETUDE CYTOLOGIQUE DES APOTHECIES

A - RAPPEL SUR LES TYPES APOTHECIENS

Il nous semble utile de rappeler la définition des différents types d'apothécies chez les *Discomycètes* tels qu'ils sont définis par Chadeaud (1982). Dénommées "discocarpes" les apothécies sont les fructifications à asques des *Discomycètes*, lesquels forment un groupe complexe et polyphylétique. Ces fructifications sont largement ouvertes à maturité, sauf toutefois chez les *Tubérales*.

Boudier (1907) a utilisé les caractères des asques comme base de classification des *Discomycètes*. On distingue les *Discomycètes Operculés*, dont les asques s'ouvrent par l'intermédiaire d'un opercule apical, et les *Discomycètes Inoperculés* chez lesquels ils s'ouvrent, en principe par un pore apical.

Chadeaud (1960) a utilisé les types de développement des discocarpes, comme base de classification pour les *Discomycètes*. On distingue les *Discostromiens*, dont la paroi dérive directement du gynocarpe et est stromatoïde et les *Discopodiens*, chez lesquels au contraire l'hyménium est porté par un discopode (terme créé par Corner en 1930), dérivé du gynocarpe.

Bellemère (1968) a établi que la nature ontogénique de la cupule fertile permettait de mieux définir les types apothéciaux des *Inoperculés*. Celle-ci reflète dans une large mesure, l'ontogénie de l'apothécie toute entière car elle est largement en rapport avec la nature des filaments interascaux. Il a distingué 2 types d'apothécies :

Les apothécies Discostromiennes : l'apothécie ne comporte aucune ébauche d'appareil parathécial. Elles peuvent être en effet :

- Stromatiques : si le stroma lui-même forme tout ou partie de la cupule.
- Pseudodiscopodiennes : si c'est seulement une excroissance du stroma qui participe à la formation de la cupule. Dans ce cas l'apothécie est stipitée et son pédicelle stromatique est un pseudodiscopode.
- Conceptaculaire : lorsque les éléments stromatiques de la cupule se réduisent à un conceptacle.

Les apothécies discostromiennes se divisent en deux groupes :

- a) Le type Discostromien : il peut être subdivisé en :
 - *) Lenticulaires : l'ébauche apothéciale est caractérisée par sa forme lenticulaire et aussi par l'importance et la prédominance de sa croissance marginale.
 - ***) Non-Lenticulaires : la croissance marginale de l'ébauche apothéciale a perdu une partie de son importance et par suite cette ébauche ne prend plus aussi nettement la forme d'une lentille; son carpocentre tend à demeurer plus ou moins globuleux.
- b) Les types Discostromiens évolués : ces types sont évolués car tous sont pourvus de paraphyses vraies et sont des Non-Lenticulaires. De plus, ils présentent une ébauche d'appareil parathécial plus ou moins rudimentaire. Selon l'importance de ce dernier on peut distinguer les types *Pré-parathécien*; *Proto-parathécien* et *Sub-parathécien*.

Les apothécies Parathéciennes : leur cupule est formée uniquement par l'appareil parathécial. Par suite aucune d'entre elles n'est du type stromatique. On peut distinguer 3 types (fig. 4A) :

- a) Le type Lécanorien : il est caractérisé par une grande abondance de paraphyses primaires, un développement relativement réduit du manchon parathécioïde qui ne constitue pas un stipe et aussi par un parathécium assez court.

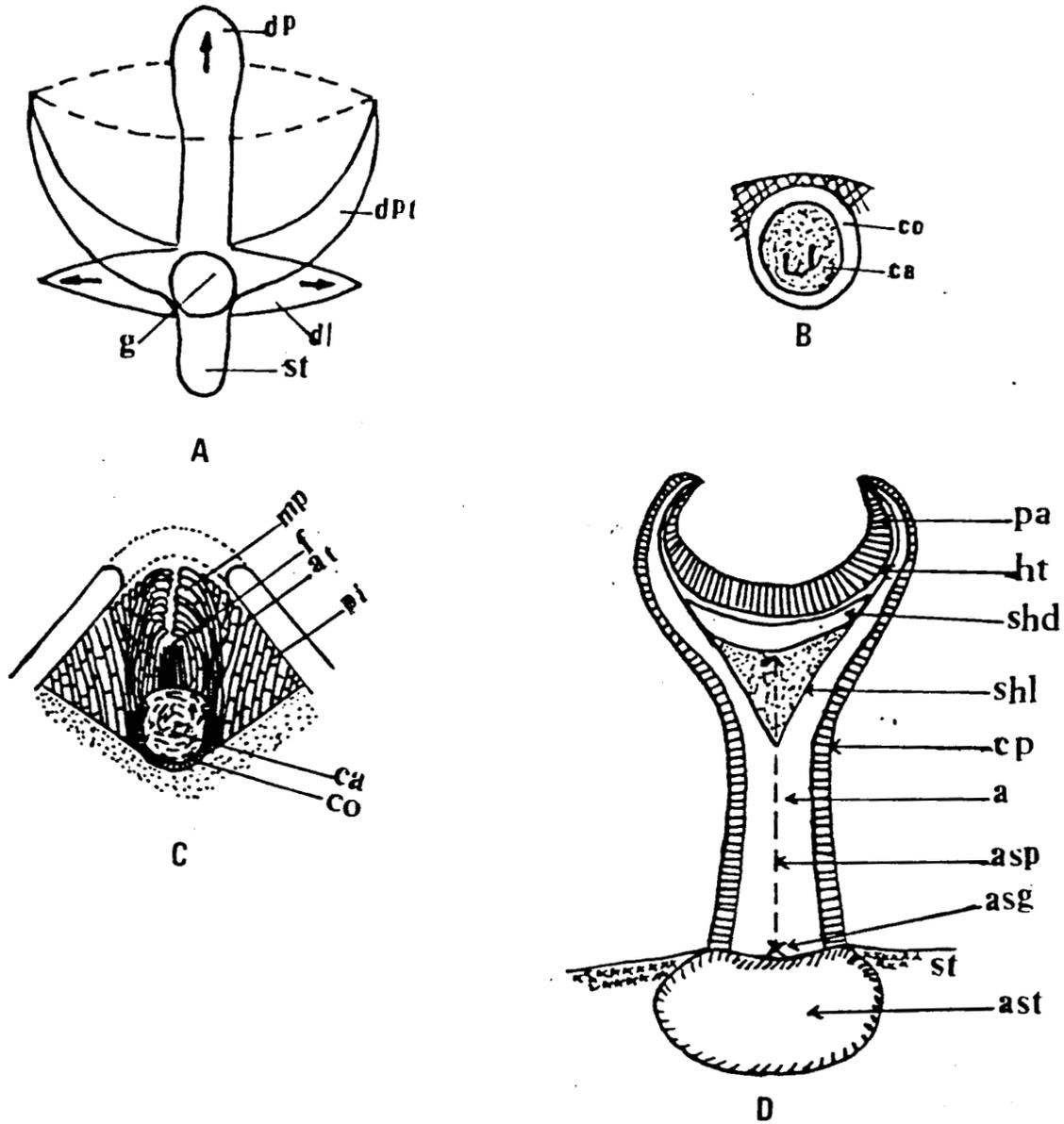


Figure 4 :

A- Types fondamentaux de discocarpes (schémas) : g, gynocarpe; dp, discocarpe discopodien; dl, discocarpe lenticulaire; dpt, discocarpe parathécien; st, stipe.

B, C, D- Evolution des discocarpes chez les Discopodiens cupulés stipités : ca, carpocentre; co, conceptacle; mp, manchon parathécial; f, faisceau d'hyphes épacentrales; at, amphithécium; pi, palissade endostromatique; p, paraphyses; ht, hypothécium; shd, sous-hyménium dense; shl, sous-hyménium lâche; cp, cortex pleuridioïde; a, colonne axiale; asp, colonnette centrale d'hyphes asco-sporophytiques (disparus); asg, situation de l'ascogone (disparu); ast, ascostroma; st, stroma. (d'après CHADEF AUD, 1982).

- b) Le type Subdiscopodien : il est caractérisé par des paraphyses primaires nombreuses, mais où le manchon parathécioïde bien développé et dressé participe à la constitution du stipe de l'apothécie.
- c) Le type Discopodien : il est caractérisé par un appareil parathécial développé formant la cupule d'un discopode dont le stipe, plus ou moins important, est constitué par le manchon parathécioïde et le podium hypocentral. Les paraphyses parathéciales sont nombreuses et les paraphyses primaires moins abondantes que dans les types Lécanorien ou Subdiscopodien.

La jeune ébauche ne comporte qu'un carpocentre et un conceptacle (ou stroma) qui en tient lieu, la texture du conceptacle stromatique est généralement homogène; c'est d'ordinaire un paraplectenchyme dont les cellules ont des parois épaisses et pigmentées. Le carpocentre se subdivise en deux complexes superposés :

- *) Le complexe inférieur dans lequel se rassemble l'appareil sporophytique.
- ***) Le complexe supérieur de nature paraphysoïde et d'importance variable.

Le développement du carpocentre conduit à la formation d'un complexe paraphysoïde aux dépens de la partie supérieure. La formation de la cavité apothéciale résulte de la rupture des filaments du carpocentre au voisinage de la face inférieure du toit du conceptacle. Enfin des paraphyses carpocentrales sont engendrées par la partie inférieure du carpocentre; ces paraphyses ne se forment pas dans les Discostromiens lenticulaires.

Les formations secondaires comprennent d'abord le manchon parathécioïde et le revêtement amphithécioïde, ensuite l'appareil parathécial et ses annexes. Peu ou pas développées chez les Discostromiens, un peu mieux

représentées chez les Pseudiscopodiens, elles prennent toute leur importance chez les *Discopodiens* où elles constituent l'essentiel du discopode. Le manchon parathécioïde apparaît dans la région de contact entre le carpocentre et le conceptacle et pendant son apparition les cellules de la face externe du flanc du conceptacle s'allongent et se disposent en files contiguës. Orientées vers le haut et l'extérieur, elles forment ainsi le revêtement amphithécioïde qui se développe progressivement. L'appareil parathécial peut se réduire à une couronne parathéciale ou bien comporter un parathécium, ou manchon parathécial et ses dépendances. Quand ce dernier est très développé, il constitue l'essentiel du discopode des *Discopodiens* qui peut être plus ou moins longuement stipité.

L'apothécie du *Botryotinia fuckeliana* se rattache morphologiquement au type *Discopodien* Cupulé - stipité. Il s'agit d'un discopode au sens de Chadeffaud (1960 et 1982) et Bellemère (1968).

Les études ontogéniques concernant la formation des apothécies des *Sclerotiniacées* ne sont pas nombreuses: Mattiolo (1882) sur *S. sclerotiorum*, Hennebert et Groves (1963) sur *B. calthae*, *B. ficariarium* et *B. ranunculi*, Saito (1973) sur *S. sclerotiorum* et Kosasih et Willetts (1975a) sur *S. sclerotiorum*.

- Mattiolo (1882) a bien étudié la formation des apothécies de *S. sclerotiorum*. Chez cette espèce, le réceptacle stromatique est un sclérote. Les carpocentres se forment sous le cortex de celui-ci, donc en position inférieure (fig. 4B); ils sont globuleux et pourvus d'une enveloppe péricentrale rudimentaire. Chacun d'eux est entouré d'une palissade endostromatique incluse entre la moelle du sclérote et son cortex. Les cellules de la moelle développent d'abord une masse prosoplectenchymateuse sphérique, dont la partie interne devient le carpocentre, tandis que la

couche périphérique forme l'enveloppe péricentrale (fig. 4C). Par la suite, chaque carpocentre se comporte à la façon d'un appareil paraphysogène. Son sommet, sur lequel l'enveloppe demeure fermée, engendre en effet un faisceau d'hyphes épacentrales. Soit l'enveloppe elle-même, soit à travers celle-ci, la partie sous-jacente du carpocentre génère des hyphes d'un manchon parathécial garni d'un revêtement amphithécial; ce manchon prend la forme ogivale d'un obus (fig. 4D). Le développement du manchon et de la palissade endostromatique a pour effet de soulever puis crever le cortex du sclérote et c'est à l'extérieur de celui-ci que se poursuit alors le développement de l'apothécie.

Au cours de ce développement le manchon parathécial à cavité pratiquement nulle, se développe en stipe cylindrique, puis son sommet s'évase et prend la forme d'une cupule; il donne ainsi naissance à un discopode stipité et cupulé. Extérieurement ce discopode est entièrement recouvert par le revêtement amphithécioïde. Intérieurement, la cupule est garnie d'un hyménium.

- Les asques permettent de distinguer, parmi les Discomycètes, cinq groupes principaux, dont l'un correspond aux "Operculés", les quatre autres aux "Inoperculés" : Lecanoriens (archaeascées), Hélotiens (annellascés typiques), Leotiens (annellascés hémi-operculés), Pezizéens (annellascés operculés), Caliciens (de type aberrant) (Chadefaud 1960).

Botryotinia fuckeliana se rattache au groupe des Hélotiens et à l'ordre des Hélotiales. Leurs asques sont cylindriques et généralement pourvus d'un anneau apical amyloïde et souvent d'une coiffe présentant dans certains genres des variantes, les uns encore annellascés, les autres frustes.

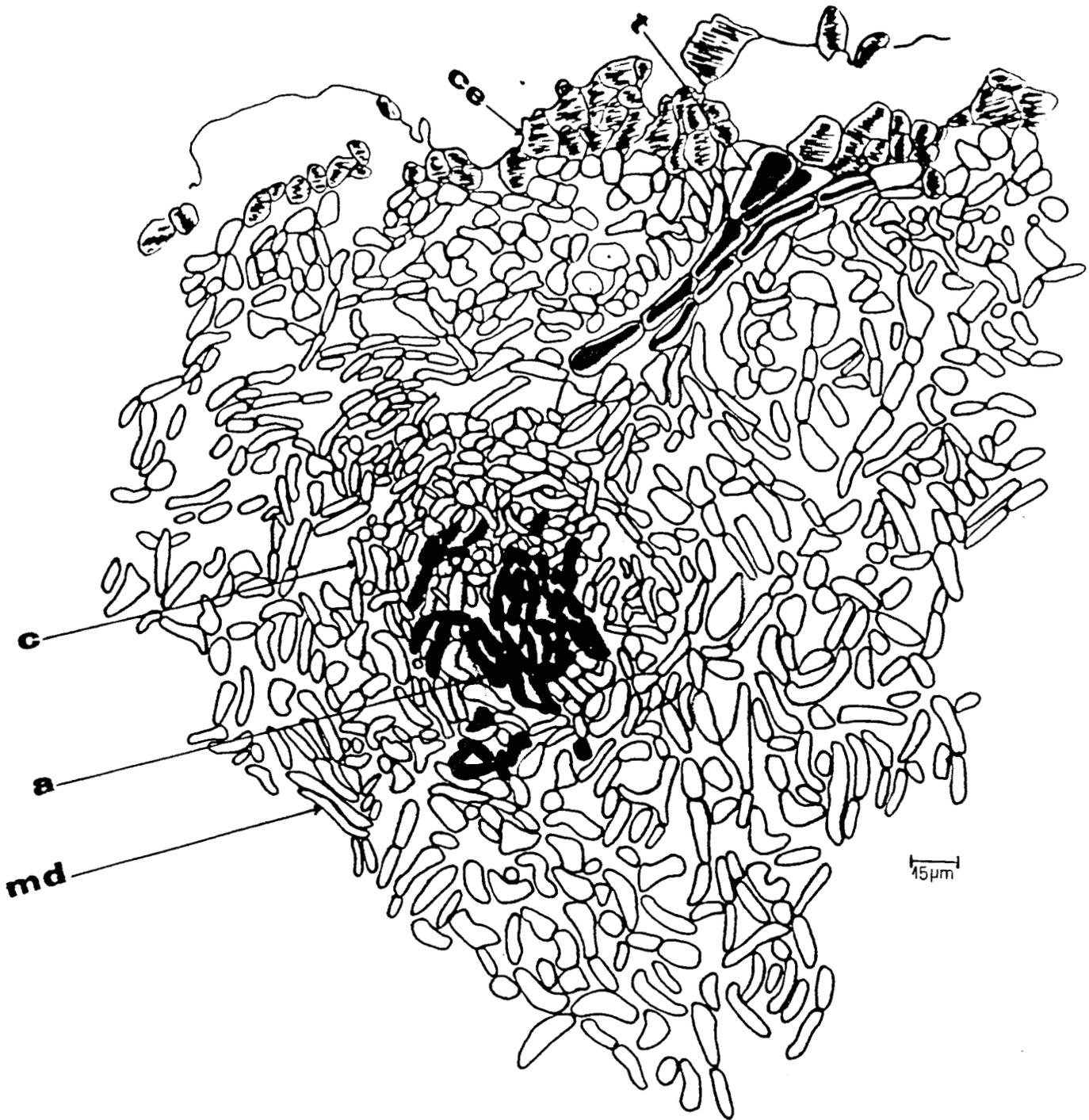


Figure 5 :

Stade (2) du développement des apothécies du *Botryotinia fuckeliana* :
croissance du carpocentre .

ce, cortex externe; a, cellules ascogoniales; c, cellules du plexus
carpocentral; t, portions d'hyphes ressemblant à un trichogyne; md, médulle
dense.

B - DEVELOPPEMENT ET STRUCTURE DES APOTHECIES DU *Botryotinia fuckeliana*

Plusieurs stades du développement des apothécies ont été observés; nous les décrirons successivement selon l'ordre chronologique.

Stade 1 (Fig. 3 et photo 1 de la planche 2)

Ce stade correspond au moment de la fécondation. Il a été décrit dans le chapitre II et défini comme la cellule ascogoniale. Les relations de ces cellules avec celles du peloton n'ont pu être précisées, ni dans l'espace, ni dans le temps, de sorte que le type du primordium n'a pu être identifié. Le développement ne se poursuit qu'après la spermatisation et le transfert des sclérotas à 12°C.

Stade 2 (Fig. 5 et photo 2 de la planche 2)

A ce stade l'ébauche apothéciale est plus volumineuse (d'un diamètre allant jusqu'à 250 µm), de forme sphérique ou sub-sphérique; la croissance s'affiche principalement vers la face supérieure du sclérote, dans la médulle dense et le cortex. L'ébauche se compose de deux types de cellules, toujours fortement éosinophiles, dont l'ensemble représente un carpocentre.

- a) Cellules ascogoniales (a), plus nombreuses et formant un système de filaments ramifiés;
- b) Cellules du plexus carpocentral (c), toujours minces, entremêlées avec les cellules ascogoniales; l'enroulement initial en peloton se perd progressivement. Les hyphes situées en périphérie sont directement en relation avec le sclérote, elles ne forment pas d'enveloppe péricentrale, autour du carpocentre.

Dans plusieurs cas, sont visibles des portions d'hyphes éosinophiles (t) dépassant le carpocentre et dirigées vers le

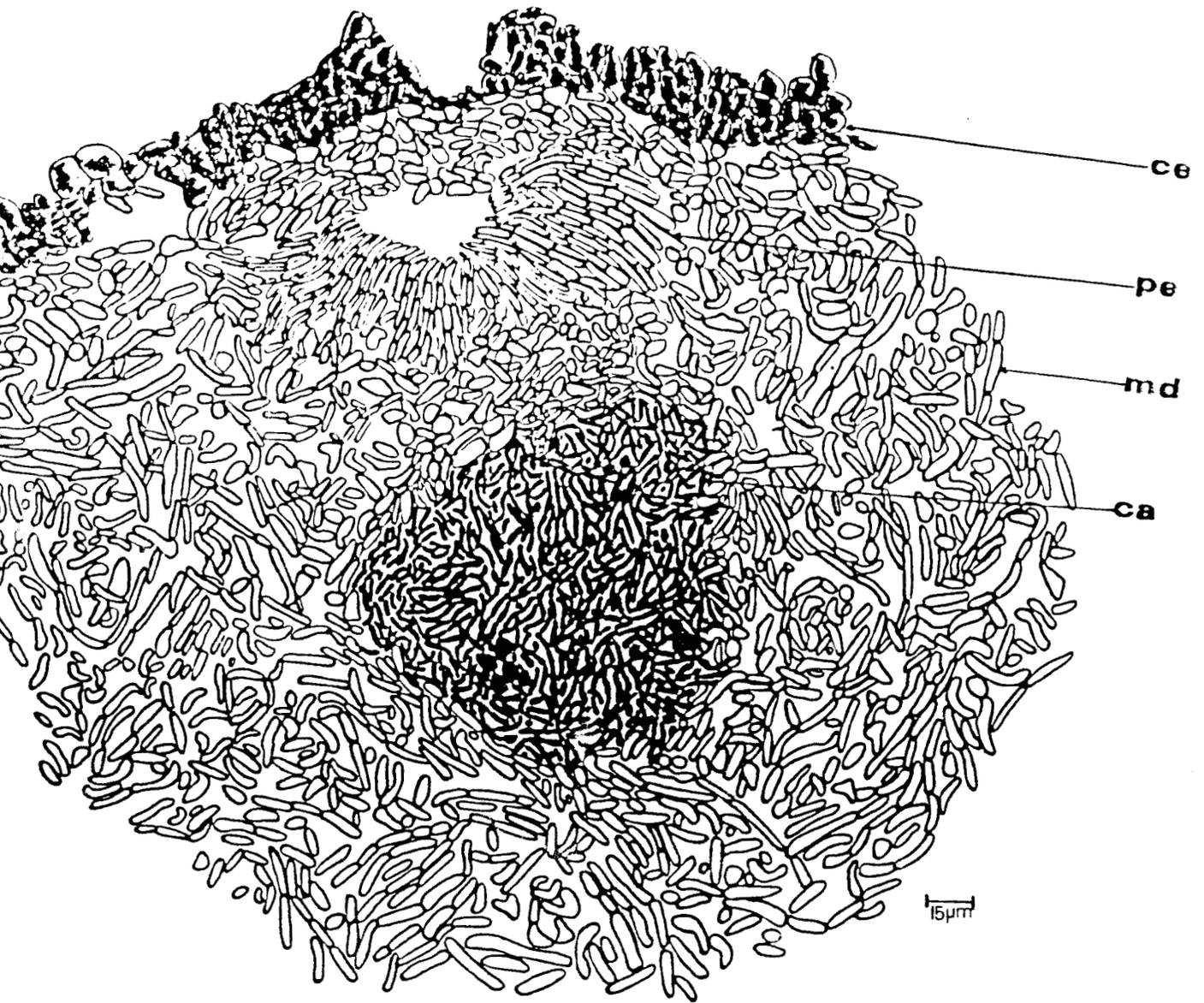


Figure 6 :

Stade (3) du développement des apothécies du *Botryotinia fuckeliana* :
initiation du parathécium .

ce, cortex externe; pe, palissade des filaments épiciontraux; ca,
carpocentre; md, médulle dense.

cortex, à la façon de trichogynes. Mais aucune d'elles n'a pu être observée traversant le cortex pour saillir à la surface du sclérote, comme c'est le cas pour des trichogynes fonctionnels assurant la réception des spermaties (fig. 6). Ainsi, bien que les spermaties soient indispensables pour l'induction des apothécies sur le sclérote, elles n'ont pas forcément un rôle fécondant direct par l'intermédiaire de trichogynes.

Stade 3 (Fig. 6 et photo 3 de la planche 2)

A ce stade, l'ébauche apothéciale se compose de deux parties nettement distinctes: le carpocentre, dont le volume et la structure sont pratiquement inchangés, et, au-dessus, une palissade de filaments épicaux (pe). Cette palissade se superpose au carpocentre sans zone de jonction bien différenciée par rapport au reste du sclérote. Sa formation entraîne le soulèvement du cortex, qui dessine alors un léger dôme, puis se rompt lorsque la poussée interne s'accroît. Ce stade d'évolution est visible en microscopie électronique à balayage (cliché 10 de la planche 1) où l'on note la présence de larges filaments superficiels de nature indéterminée.

La nature de la palissade épicaux n'est pas clairement identifiable, car elle n'est pas un élément habituel du développement d'une ébauche apothéciale. D'après la suite du développement, il pourrait s'agir des premières formations secondaires, qui constitueraient ultérieurement l'ensemble du stipe. Habituellement initiées sous forme d'une couronne et d'un manchon parathécial, les formations secondaires du *B. fuckeliana* prendraient initialement la forme d'un coussinet épicaux.

Stade 4 (Fig. 7 et photo 4 de la planche 2)

L'ébauche forme un dôme sub-cylindrique proéminent. A la base le carpocentre tend à se réduire tandis que les filaments épicaux

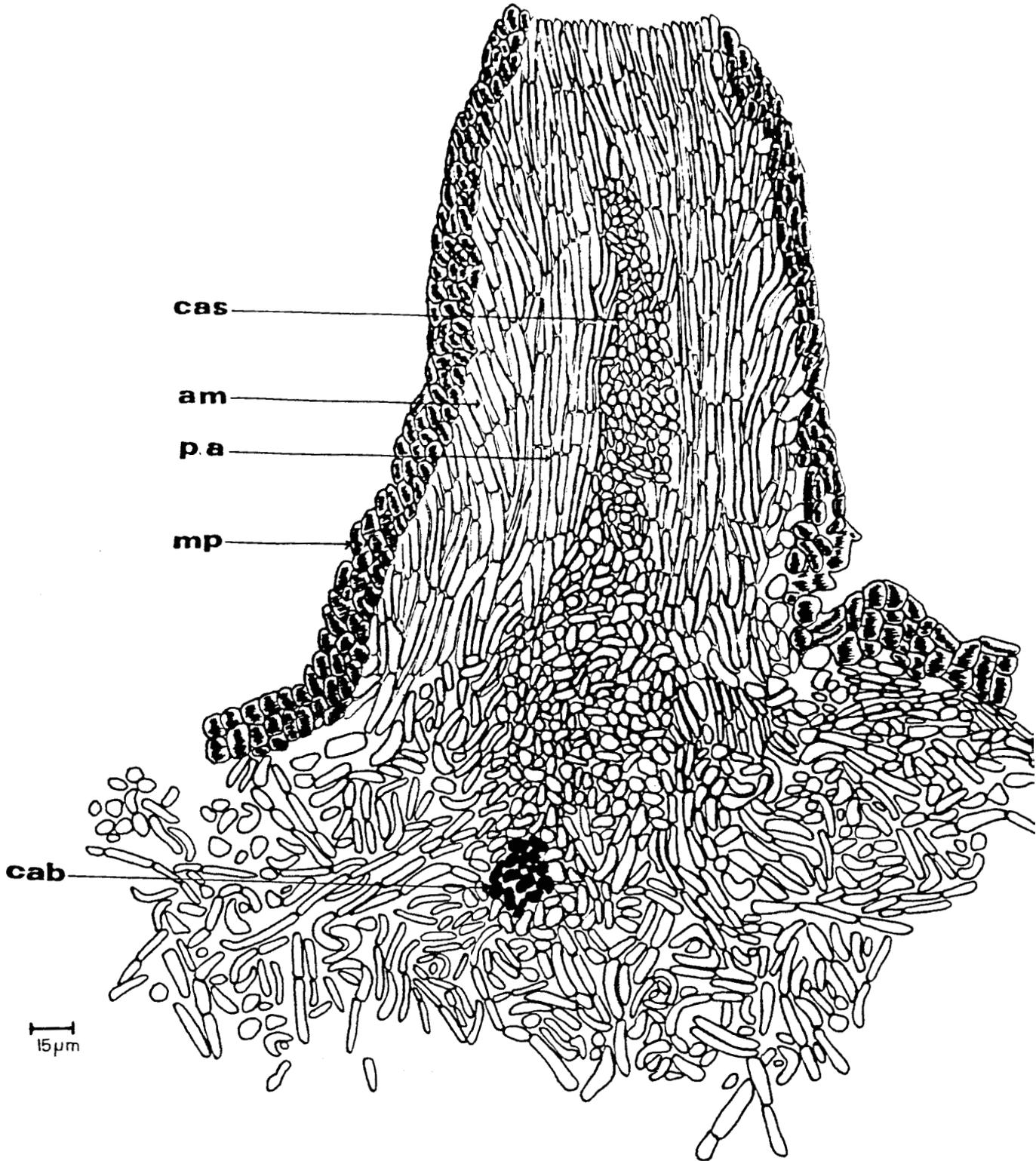


Figure 7 :

Stade (4) du développement des apothécies du *Botryotinia fuckeliana* :
initiation de la colonne axiale .

cas, carpocentre secondaire; cab, carpocentre basal; pa, parathécium;
mp, manchon pleuridioïde; am, amphithécium.

s'allongent et se disposent en une colonnette qui s'individualise de plus en plus nettement à la surface du sclérote (clichés 7, 8, 9, 11 et 12 de la planche 1).

Dans l'ébauche figurée, la colonnette est essentiellement constituée de files parallèles de cellules, dont les extrémités sont incurvées vers l'extérieur, tout au long de la colonnette. Cette disposition est celle d'un appareil parathécial avec le manchon (pa), les hyphes amphithéciales (am) et la couronne sommitale. Cette dernière n'est pas visible sur la coupe mais apparaît sur les clichés réalisés en microscopie électronique à balayage où l'on observe les hyphes superficielles convergeant vers le sommet aplati de la colonnette et réunies entre elles par un voile, probablement muqueux.

Dans la partie axiale de la colonnette, est visible sur la coupe un ensemble de cellules fertiles de forme ogivale, en rapport avec le carpocentre basal (cab). Il se produit ainsi une invasion des formations secondaires en développement par des éléments fertiles qui constituent un carpocentre secondaire (cas)(=deutéroc centre, selon CHADEF AUD, 1965).

Stade 5 (photo 5 de la planche 2 et clichés 5, 6 et 14 de la planche 1)

A ce stade la colonnette atteint sa longueur définitive, se renfle progressivement à son extrémité et s'organise en une apothécie stipitée.

Lorsque le sommet de la colonnette commence à se renfler (photo 5 de la planche 2), il présente une dépression plus marquée qu'au stade précédent, avec un voile plus étendu et plus épais. Par la suite, le renflement s'accroît puis il s'ouvre à son sommet selon un pore circulaire bordé par les hyphes de la couronne parathéciale. Cette couronne est ensuite repoussée au cours du développement radial du disque hyménial et constitue finalement le rebord apothécial. La surface hyméniale est revêtue par le voile, bien visible en microscopie électronique à balayage qui se résorbe

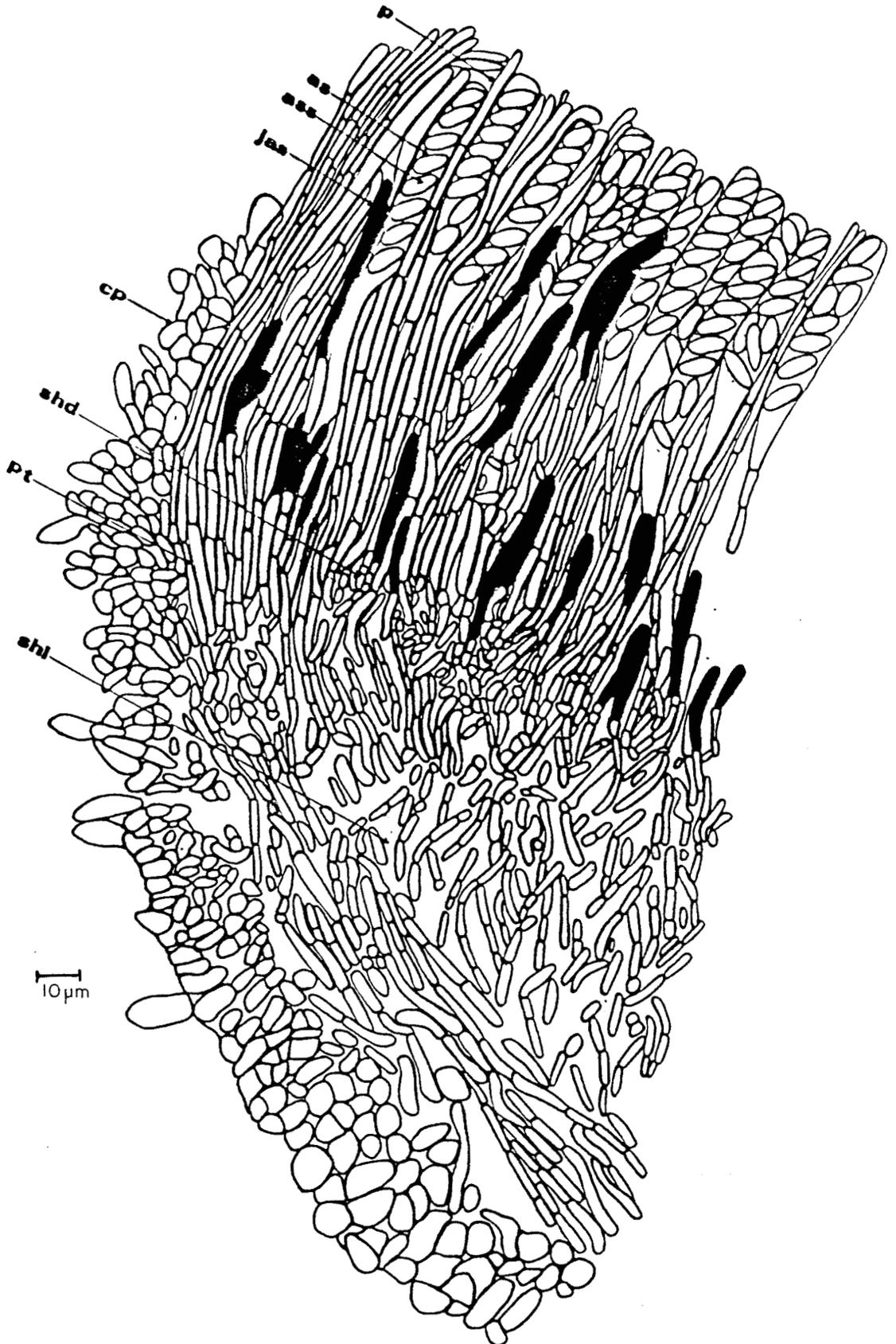


Figure 8 :

Stade (6) du développement des apothécies du *Botryotinia fuckeliana* :
marge d'une apothécie adulte.

p, paraphyses; as, asques; ass, ascospores; jas, jeune asque; cp,
cortex pleuridioïde; shd, sous-hyménium dense; shl, sous-hyménium lâche;
pa, parathécium.

pendant la maturation de l'apothécie.

Stade 6 L'apothécie adulte (Fig.8 et 9)

La figure (9) représente, en coupe longitudinale axiale, une apothécie adulte. Son stipe est formé des filaments parallèles du manchon parathécial et entouré d'un revêtement amphithécial dont les filaments, courts, soudés les uns aux autres, forment un "cortex" paraplectenchymateux. Vers le haut, le manchon s'évase et forme la partie externe de la cupule apothéciale, dont le centre est occupé par une "médulle" à texture prosenchymateuse lâche. L'hyménium qui tapisse la cupule est composé de paraphyses cylindriques étroites pluricellulaires et d'asques, à divers stades de développement; le sous-hyménium est mince. Les asques mûrs contiennent huit ascospores unicellulaires; des ascospores libérées par suite de la déhiscence des asques sont visibles à la surface de l'hyménium. La marge de l'apothécie est très mince, formée par le sommet du manchon et son revêtement amphithécial, constitué à ce niveau d'hyphes distinctes.

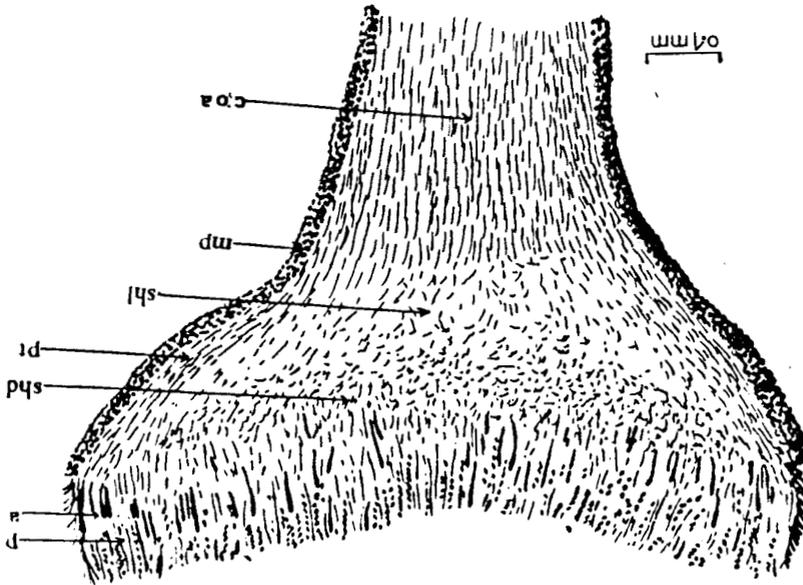
Ç- LES ASQUES. (photo 7 de la planche 3 et photo 11 de la planche 4)

Le jeune asque (fig.10) formé à l'extrémité d'une hyphe ascogène à anse latérale présente une forme cylindrique qu'il conserve au cours de la phase de développement qui suit sa formation (fig.10a); il présente alors un contenu homogène, granuleux et une paroi d'épaisseur régulière. Ensuite, l'asque s'élargit (fig. 10b) un peu plus fortement dans sa partie sommitale, qui forme une appareil apical; cet appareil est relativement volumineux chez le jeune asque puis régresse fortement et rapidement, et contient un seul anneau amyloïde.

Plus tard, les ascospores se différencient, au nombre de huit dans chaque asque (fig. 10c) et elles se répartissent dans l'asque. Corrélativement la partie sporogène de l'asque se dilate de sorte que

Coupe longitudinale dans une apothécie adulte du *Botryotinia fuckeliana* : p, paraphyses; a, asques; shd, sous-hyménium dense; shl, sous-hyménium lâche; pt, parathécium; coa, colonne axiale. mp, manchon parathécial; ram, revêtement amphithécial.

Figure 9 :



celui-ci présente de nouveau à ce stade une forme cylindrique (longueur 10.5-16.5 μm ; diamètre 4.5-8.5 μm), les ascospores (planche 1, cliché 2) sont elliptiques-fusiformes, hyalines, mesurant environ (110 μ x 6.5 μm), unicellulaires et devenant parfois bicellulaires avant la germination. Les ascospores mûres sont multinuclées (fig. 10d). Les paraphyses qui accompagnent les asques dans l'hyménium (fig. 10e) sont filiformes, non ramifiées et légèrement renflées au sommet.

D - DISCUSSION

Les observations que nous venons de rapporter montrent que le développement apothécial du *B. fuckeliana* se déroule globalement comme celui des autres espèces du même genre: l'ébauche commence à se différencier à l'intérieur du sclérote puis se développe à l'extérieur sous forme d'une colonnette cylindrique, qui s'allonge et se transforme finalement en une apothécie cupulée-stipitée.

En comparant l'organisation des différents stades, il apparaît toutefois que le stade 3 que nous décrivons, montrant l'origine du stipe, n'a jamais été observé. A un stade un peu plus avancé une figure très intéressante est donnée par MATTIROLO (1882) pour le *Sclerotinia sclerotiorum*: il s'agit d'une ébauche en forme de courte colonnette, composée (comme celle du stade 4) d'un carpocentre et d'une formation épacentrale superposée. Le carpocentre est partiellement entouré d'une enveloppe et la formation épacentrale est composée de deux parties emboîtées:

- (i) une partie externe, creuse à la base et percée axialement d'un canal, formée d'hyphes convergentes que CHADEF AUD (1965) interprète comme une formation parathéciale; elle produit ultérieurement le stipe de l'apothécie (=discopode sensu CHADEF AUD

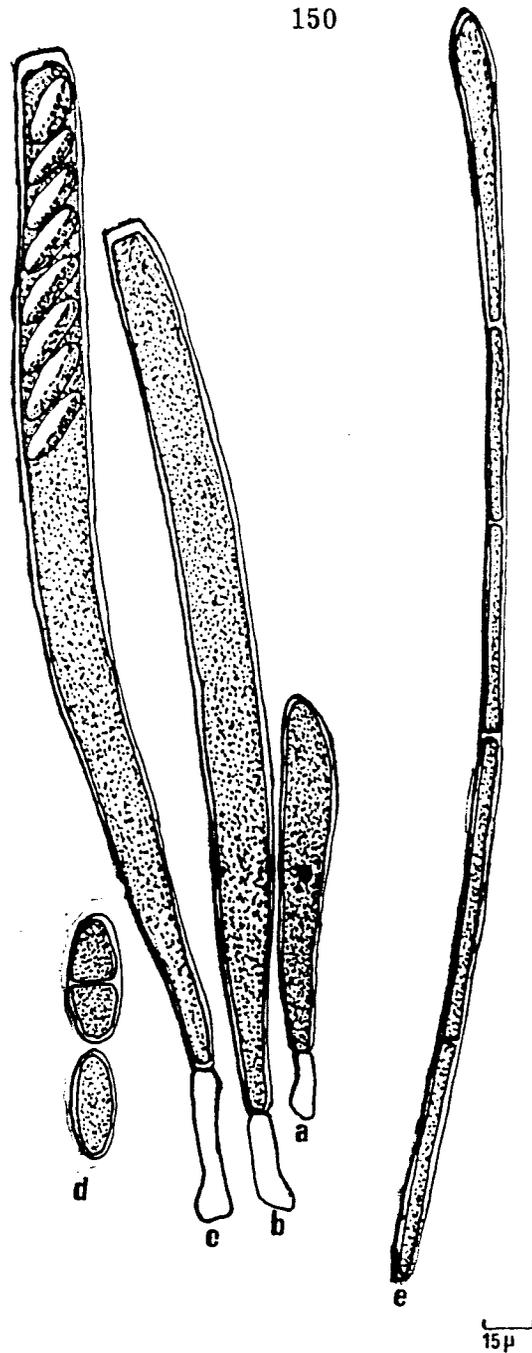


Figure 10 :

Asques, ascospores et paraphyses :

- a, b et c = Trois stades différents du développement des asques.
- d = Ascospores unicellulaires et bicellulaires.
- e = Paraphyses.

et BELLEMERE);

- (ii) une partie interne, de faible volume, englobée dans la base de la précédente et formée de filaments dressés; elle produira ultérieurement, selon un processus qui n'a pas été observé, l'ensemble de l'hyménium. D'après nos observations, tous les filaments épicontraux sont équivalents (cf. stades 3 et 4), le manchon parathécial ne se creuse pas d'un canal et c'est secondairement qu'il est envahi, dans sa partie axiale, par les éléments des carpocentres secondaires.

Le cas du *Sclerotinia gladioli*, étudié par DRAYTON (1932) est sensiblement différent. Chez cette espèce, en effet, les sclérotés sont apparemment inaptes à produire des apothécies. Il existe par contre des stromas qui se développent en culture ou sur les graines de plantes et produisent, indépendamment de toute spermatisation, des colonnettes appelées "corps récepteurs", qui peuvent se transformer en apothécies après spermatisation compatible. Pour cela, un complexe ascogonial se développe dans la partie centrale du corps récepteur (et non dans le stroma ou le sclérote); il est formé de vésicules plurinuclées qui produisent des hyphes ascogènes à noyaux appariés. Le sommet, légèrement déprimé, du corps récepteur, est formé d'une couronne de filaments infléchis vers l'intérieur, que l'on peut homologuer à une formation parathéciale.

Ainsi chez les divers *Sclerotinia* étudiés, l'appareil parathécial présente un développement important et précoce (dont l'origine exacte reste à déterminer). Cette double particularité de l'appareil parathécial est, selon BELLEMERE (1967) qui a étudié de nombreux Discomycètes Inoperculés, caractéristique des apothécies discopodiennes à long stipe (notamment le *Cyathicula coronata*) qui se trouvent ainsi former un ensemble homogène bien défini.

En ce qui concerne l'organisation de l'apothécie elle-même, rappelons que le voile membraneux qui recouvre l'hyménium au cours de son développement a également été observé par TU (1982) qui lui attribue chez *Sclerotinia sclerotiorum*, un rôle de protection des ascques contre la perte d'humidité avant la libération des ascospores. Par ailleurs, l'organisation de la marge apothéciale qui, selon HENNEBERT et GROVES (1963) contribue à caractériser les diverses espèces, rapproche le *B.fuckeliana* des *B.ranunculi* et *B.calthae*.

III. - ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA CARPOGENESE

A - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

1) Effets des basses températures sur la formation des ébauches apothéciales

Comme *Botrytinia fuckeliana* la plupart des espèces de la famille des Sclerotiniacées (*S.sclerotiorum*, *S.squamosa*, *S. gladioli*, *S.narcissi* et *S.convoluta*) ont besoin d'une période de conditionnement au froid afin que leurs sclérotés puissent développer la forme sexuée. Mais la durée de cette période ainsi que la température sont différentes d'une espèce à l'autre et même d'une souche à l'autre. Faretra (1988) avait certaines souches de *Botrytis cinerea* qui donnaient la forme parfaite sans aucun traitement à basse température et d'autres qui ne donnaient cette forme qu'après un long séjour au froid.

Drayton (1934 et 1937) et Groves et Drayton (1939) ont confirmé la nécessité de conditionner les sclérotés de *B.gladioli*, *B.convoluta* et *B.cinerea* par une période de froid et ils ont choisi une gamme de températures pour les traiter:

Période (a) 30 jours à 0°C.

Période (b) 15 jours à 5°C.

Période (c) 15 jours à 15°C.

Saito (1977) a testé l'effet des basses températures (4°C à sec; 4°C avec de l'eau; -10°C et -20°C) pendant 1 mois, il a aussi utilisé des sclérotés produits à 15°C sans traitement au froid. Il a trouvé que le traitement des sclérotés à 4°C avec de l'eau stimulait la carpogénèse. Par contre un traitement des sclérotés à 4°C ou à 15°C à sec n'a aucun effet, ni stimulant, ni inhibiteur sur la formation des apothécies. Enfin, les températures très basses (-10°C et -20°C) ont un effet inhibiteur sur la production des apothécies.

Faretra (1988) a utilisé la même méthode que Drayton, mais il a trouvé que les deux périodes (b) et (c) (schéma 2) n'avaient pas d'effet sensible sur le pourcentage de carpogénèse. Par contre la période (a) est indispensable à la germination des sclérotés. En conséquence il a modifié la méthode de Drayton en utilisant la période (a) uniquement.

Le rôle important de la période induction dans le cycle de ces champignons nous a conduits à étudier de manière approfondie son effet sur la formation des ébauches apothéciales.

a) Protocole expérimental

Pour effectuer ces essais nous avons choisi des sclérotés produits sur malt-agar 2% à 18°C, âgés de 15 jours et de même taille 0,5 cm.

Nous les avons traités par le froid puis spermatisés et portés à 12°C selon les modalités reportées dans le tableau II.3.

b) Résultats.

Les deux tableaux II.6 et II.7 montrent que l'incubation des sclérotés à basse température stimule nettement la formation d'ébauches apothéciales.

Tableau II.6. Nombre d'ébauches apothéciales formées au cours du temps dans les différents lots.

Essais	Nombre de jours après la spermatisation												
	3	7	10	14	21	28	35	42	48	55	62	68	75
Lot 1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	5	5	5
Lot 2	0	0	3	6	10	12	13	13	13	13	13	13	13
Lot 3	0	0	4	9	11	13	14	14	14	14	14	14	14
Lot 4	0	0	0	0	0	2	4	6	9	9	9	9	9
Lot 5	0	0	0	0	0	0	2	3	5	5	5	5	5

Lot 1 = S.S.A.S405 x s.S.A.S56; Lot 2 = S.S.18 x s.S.14

Lot 3 = S.S.A.S405 x s.S.14; Lot 4 = S.S.18 x s.S.A.S56

Lot 5 = S.S.2 x s.S.14

Tableau II.7 Moyennes des nombres d'apothécies par sclérote en fonction des traitements utilisés

Essais	1*	2*
Lot 1	62	0,5
Lot 2	0	0
Lot 3	28	3,6
Lot 4	48	1,3
Lot 5	55	0,7

1* = Temps moyen d'apparition les initiales apothéciales (en jours) .

2* = Moyenne du nombre d'apothécies mûres par sclérote

Remarque Nous avons répété le même essai trois fois, chaque essai portant sur 250 sclérottes, à raison de 10 sclérottes par tube .

Lot 1 = S.S.A.S405 x s.S.A.S56; Lot 2 = S.S.18 x s.S.11;

Lot 3 = S.S.A.S405 x s.S.14; Lot 4 = S.S.18 x s.S.A.S56;

Lot 5 = S.S.2 x s.S.14

Cette stimulation est maximale à 0°C (lots 2 et 3; 14 ébauches/sclérote), tant pour le nombre total d'initiales formées que pour le temps nécessaire à l'apparition des premières ébauches puisque celles-ci commencent à se former dès le 14^{ème} jour, avec un maximum à 28 jours.

La stimulation est moindre à -10°C, avec un nombre total d'initiales apothéciales plus faible et l'apparition des premières ébauches plus tardive: 2 ébauches/sclérote après 28 jours avec un maximum de 9 à 48 jours (lot 4). Si l'on abaisse davantage la température du lot 5 (-20°C), il ne se forme plus que 5 ébauches/sclérote au maximum et il y a apparition des initiales après 35 jours, mais seulement 2 ébauches sont formées à cette période.

Nous considérons que dans le cas où des ébauches apothéciales se forment dans les sclérotés sans une incubation à basse température, il y eu une stimulation des sclérotés au cours de leur incubation à 12°C après la spermatisation. En effet à 18°C, les sclérotés sont incapables de former des ébauches apothéciales même après spermatisation.

Les ébauches qui se forment dans chaque sclérote ne se développent pas toutes en apothécies, le développement des premières inhibe celui des autres ébauches.

Le comportement du lot 2 (conditionné à 0°C mais non spermatisé) montre que la spermatisation n'influence pas la formation des initiales apothéciales. On peut, en effet voir sur le tableau II.6 que les ébauches apparaissent en nombre aussi important et aussi précocement que dans le lot 3 qui a subi le même conditionnement mais qui a été en outre spermatisé. Par contre, l'absence totale d'apothécies dans le lot 2 (tableau II.7) montre que la

spermatisation est indispensable à l'évolution ultérieure des ébauches en apothécies.

c) Conclusion

- Les basses températures stimulent la formation d'ébauches apothéciales ; cette stimulation atteint le maximum à 0°C et elle est moindre si l'on abaisse davantage la température.

2) La survivance des sclérotés et leur capacité à la carpogénèse

Le sclérote est l'organe de résistance. Parmi les autres organes il est toujours considéré comme l'organe ayant une plus grande capacité à survivre chez la famille des Sclerotiniaceae . Cette survivance résulte de sa structure qui lui permet d'être moins affecté par les conditions défavorables de l'environnement (température, lumière et humidité). Il est muni d'une couche corticale fortement mélanisée qui se compose de cellules très serrées sans espaces intercellulaires.

Plusieurs travaux effectués sur la survivance des sclérotés en conditions naturelles ont été publiés par Gregory (1941) sur *Botrytis polyblastis* , Coley-Smith et Jarved (1977) sur *Botrytis tulipae* , Ellerbrock et Lorbeer (1977) sur *Botrytis squamosa* et Harrison (1979) sur *Botrytis fabae*.

Par contre les travaux effectués sur la survivance des sclérotés in vitro sont très limités: Townsend (1952) a étudié l'effet de hautes températures sur la survivance des sclérotés de *Botrytis cinerea* et a constaté que des températures élevées en atmosphère humide tuent beaucoup plus rapidement les sclérotés que les mêmes températures en atmosphère sèche. Un fort pourcentage de sclérotés survit un an à des températures de -70°C jusqu'à +25°C, mais cet auteur a noté qu'à 30°C ils perdent plus rapidement leur capacité de survie. Ceci indique que

les sclérotés résistent plus facilement au froid qu' à la chaleur.

Nous ne nous sommes pas intéressés uniquement à la survivance des sclérotés mais aussi à la conservation de leur capacité à engendrer le sporophyte.

Les travaux effectués sur la carpogénèse sont très limités, surtout in vitro, Coley-Smith (1977) a noté que les sclérotés perdent leur capacité à la carpogénèse après 9 à 12 mois et qu'ils donnent uniquement des apothécies stériles. ceci montre la fragilité des ascogones et la nécessité de leur intégrité pour participer à la fécondation et donner naissance au sporophyte.

a) Protocole expérimental

Nous avons incubé des sclérotés âgés de 30 jours dans des boîtes de Pétri à 3 températures différentes 7°C, 0°C et -20°C pendant des périodes plus ou moins longues (15, 30 jours, 3, 6, 9, 12 et 18 mois) en effectuant la spermatisation au fur et à mesure (selon le tableau II.8) avec des spermaties âgées de 1 à 2 mois en utilisant notre technique de spermatisation. Nous avons ensuite placé les tubes à 14°C à la lumière (12 heures de lumière/24 heures).

Nous avons également repiqué des sclérotés sur milieu malt-agar 2% pour vérifier leur capacité au développement mycélien après un très long séjour à basse température. Par chaque expérience 10 sclérotés de chaque souche ont été choisis au hasard.

b) Résultats

D'après le tableau II.8 nous pouvons remarquer que :

- Un court séjour (15 jours) des sclérotés à basse température (-20°C) diminue leur capacité à la carpogénèse puisqu'il y a toujours moins d'apothécies par sclérote et qu'elles apparaissent en moyenne 2 semaines plus tard que sur les sclérotés qui ont été conservés à

Tableau II.8

Effet de la température à laquelle les sclérotés ont été conservés sur leur survie et la formation des apothécies

Essais	15 j		30 j		3 mois		6 mois		9 mois		12 mois		18 mois	
	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*
7°C														
Lot 1	1,6	6	2,7	5	2,9	4	3,2	3	3,0	3	2,9	3	1,9	4
Lot 2	1,9	6	3,1	5	3,2	4	3,4	3	3,3	3	3,4	3	1,7	4
Lot 3	2,2	6	2,0	5	3,1	4	2,6	3	2,7	3	3,1	3	2,3	4
0°C														
Lot 1	1,8	5	3,2	5	3,1	5	2,7	5	3,3	5	3,4	5	1,4	5
Lot 2	2,6	5	3,0	5	3,3	5	3,1	5	3,3	5	3,0	5	1,8	5
Lot 3	2,1	5	2,9	5	3,4	5	2,9	5	3,1	5	3,1	5	1,9	5
-20°C														
Lot 1	1,1	7	0,8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lot 2	1,8	7	0,6	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lot 3	1,9	7	1,1	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote.

2* = Première semaine d'apparition des initiales apothéciales.

Lot 1 = S.S.A.S 405 x s.S.A.S 56

Lot 2 = S.S.A.S 56 x s.B.C6

Lot 3 = S.S.18 x s.S 14

0°C ou à 7°C. Après 30 jours à -20°C, les taux de carpogénèse sont extrêmement faibles, donc la congélation détériore très rapidement les capacités carpogéniques des sclérotés puisque la carpogénèse est totalement inhibée lorsque les sclérotés sont restés 3 mois à -20°C. Ces altérations peuvent s'expliquer en partie par les changements dans la structure interne des sclérotés que nous avons observés.

- Les sclérotés séjournant à 0°C peuvent conserver leur capacité à la carpogénèse au moins 18 mois. En même temps ils donnent le même pourcentage de carpogénèse après un long séjour au froid. A 0°C la plupart des réactions enzymatiques et biologiques sont fortement ralenties et les sclérotés restent à l'état de dormance sans aucun changement de structure interne, c'est pourquoi ils se conservent longtemps.

Un séjour de 15 jours à 0°C accélère la vitesse d'apparition des apothécies par rapport à un séjour de la même durée à 7°C (stimulation par le froid)

- La vitesse d'apparition des initiales apothéciales est d'autant plus rapide que la durée de séjour des sclérotés à 7°C est plus longue. La rapidité d'apparition des initiales apothéciales à cette température nous a conduits à étudier la structure interne des sclérotés en faisant des coupes après inclusion dans la paraffine. Nous avons constaté qu'à cette température les ébauches apothéciennes étaient présentes. Cette présence explique la rapidité d'apparition des initiales apothéciales après la spermatisation puisque le délai n'est que de 3 semaines alors qu'il est de 5 semaines dans le cas de sclérotés conservés à 0°C (tableau II.8).

- Coley-Smith (1977) a rapporté que les sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum* donnent des apothécies stériles après 9 à 12 mois. Nous

avons trouvé que les sclérotés de *Botryotinia fuckeliana* gardent leur capacité à la carpogénèse pendant 18 mois et toutes les apothécies obtenues sont fertiles.

La formation des apothécies résulte donc de la fécondation des cellules ascogoniales par des spermaties, les apothécies sont donc toujours fertiles et aucune apothécie n'apparaît sans la spermatisation. Nos souches de *Botrytis cinerea* étant hétérocaryotiques, nous ne pouvons pas obtenir d'apothécies stériles, car la phase 2N se produit avant la formation des stipes. Par contre des apothécies stériles peuvent exister dans les espèces qui forment directement des apothécies au sein desquelles la phase 2N se développe par anastomose entre les hyphes végétatives comme dans le cas de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Si l'ébauche tire son origine du pied des ascogones, elle est gamétophytique. Il est donc concevable que dans ce cas le sporophyte issu de la fécondation de l'ascogone ne participe pas à la formation de cette ébauche qui peut donc se développer avant la fécondation. Le sporophyte se développe ensuite au sein de cette ébauche préexistante à la fécondation.

- Les sclérotés conservés pendant 18 mois au-moins à -20°C perdent toute capacité carpogénique alors que ceux conservés à 0 et à 7°C pour un même séjour gardent cette capacité intacte. Cependant, tous développent un mycélium lorsqu'ils sont repiqués sur milieu nutritif. Ce mycélium n'est pas capable de produire des sclérotés mais il récupère sa capacité à en former après 2 ou 3 repiquages successifs. Ce fait illustre le rôle d'organe de conservation joué également par les sclérotés.

c) Conclusion

D'après ces résultats nous pouvons considérer que :

- Un court séjour (15 jours) à -20°C diminue la capacité des sclérotas à la carpogénèse sans l'altérer complètement. Par contre un séjour plus long (1 mois) l'altère très fortement, celle-ci est complètement inhibée lorsque la durée du séjour à cette température atteint 3 mois.
- Un séjour des sclérotas à 0°C ou à 7°C conserve leur capacité à la carpogénèse pendant à peu près 18 mois.
- La vitesse d'apparition des initiales apothéciales est d'autant plus rapide que la durée du séjour des sclérotas à 7°C est plus longue.
- Des sclérotas conservés à 7°C sont capables de former des ascogones.
- Les sclérotas sont capables de garder leur capacité au développement mycélien après un très long séjour (18 mois) à des températures basses (7°C , 0°C ou -20°C).

3) Effets sur le taux de carpogénèse des conditions thermiques et lumineuses sous lesquelles les sclérotas se sont formés.

Les conditions d'éclairage ou d'obscurité, dans les conditions de température normales ont-elles un effet sur la formation des sclérotas ? Ces sclérotas évoluent-ils différemment (en particulier en ce qui concerne leur aptitude à la carpogénèse) en fonction des conditions lumineuses (éclairage ou obscurité) et de température sous lesquelles ils se sont formés ?

a) Protocole expérimental

Pour répondre à cette question, nous avons produit des sclérotas à 5

Tableau II. 9. Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote en fonction de la température à laquelle ces sclérotés se sont formés, soit à la lumière soit à l'obscurité

Essais	7°c		10°c		14°c		18°c		24°c	
	L.	OB.	L.	OB.	L.	OB.	L.	OB.	L.	OB.
Lot 1-	2,6	2,5	2,7	3,2	1,8	3,1	1,2	2,6	0,8	1,4
Lot 2-	3,1	2,9	3,1	2,9	1,5	3,2	0,7	3,1	0,5	1,0
Lot 3-	2,7	3,3	2,3	3,2	2,6	2,6	1,2	2,8	0,7	1,1
Lot 4-	2,8	3,0	2,8	2,7	2,1	3,3	1,9	3,1	0,7	0,9

Remarque Au cours de la 5ème semaine les initiales apothéciales apparaissent, bien que les conditions d'éclairément et de température utilisées pour la production des sclérotés aient été très différentes.

Lot 1 = S.S.A.S405 x s.S.A.S56; Lot 2 = S.S.A.S56 x s.B.C.6

Lot 2 = S.S.18 x s.S.A.S56; Lot 4 = S.S.2 x s.S.14

températures différentes (7°C, 10°C, 14°C, 18°C et 24°C) en éclairnement alterné (12 h. de lumière par jour) et à l'obscurité totale. Ensuite nous avons suivi notre méthode de production des apothécies in vitro que nous avons expliquée au début de ce chapitre.

b) Résultats

D'après Townsend (1957) la lumière a un effet faible sur la formation des sclérotés. Par contre la température joue un rôle important sur la quantité de sclérotés produits et leur vitesse de formation, ce que confirment les résultats que nous avons obtenus.

D'après le tableau II.9 nous pouvons constater que la lumière et la température pendant la période de formation des sclérotés, ont une certaine influence sur leur pourcentage de germination carpogénique. La lumière a un effet très faible aux basses températures (7°C et 10°C). Nous pouvons constater que le pourcentage de germination présente peu de différences pour des sclérotés produits à la lumière ou à l'obscurité jusqu'à 10°C. Mais l'augmentation de la température est toujours suivie par une certaine diminution du taux de germination des sclérotés nettement plus importante pour les sclérotés produits à la lumière. Curieusement, le taux de germination est légèrement plus élevé pour des sclérotés qui se sont formés à 14°C et parfois même à 18°C que pour des températures plus basses, en conditions obscures. Harada et Watanabe (1974) ont noté que le taux de germination des sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum* augmentait proportionnellement à la température.

Cette réduction du taux de germination des sclérotés lorsque l'on augmente la température, correspond à une stimulation de la sporulation par élévation de la température, surtout lorsque les cultures sont éclairées (Tan et Epton 1973). Dans ces mêmes conditions, il y a réduction de la

capacité à former des sclérotés, celle-ci régressant avec l'augmentation de température. Il se forme toujours à haute température (24°C) des sclérotés petits, très minces et très fins, bien couverts par des hyphes et des conidiophores ce qui diminue leurs aptitudes à la carpogénèse. Par contre une diminution de température réduit la sporulation et augmente la capacité du champignon à former des sclérotés plus gros et charnus, ce qui augmente leur aptitude à la carpogénèse. Il est donc préférable d'utiliser des sclérotés produits à basse température et à la lumière.

Williams et Western (1965) ont trouvé que pour *Sclerotinia sclerotiorum* le meilleur pourcentage de germination était observé pour des sclérotés produits à l'obscurité sur milieu synthétique. Harada (1974) a étudié l'influence des différentes températures (10°C, 15°C, 20°C et 25°C) pendant la période de production des sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum* sur la carpogénèse; il a noté que :

- Les températures élevées accélèrent la formation et la maturation des sclérotés mais réduisent les quantités produites.
- Les températures élevées stimulent la carpogénèse, mais retardent la formation des apothécies. Nos résultats ne confirment pas les siens et en outre les sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum* n'ont pas besoin d'une période de conditionnement au froid.

Nous avons déjà indiqué que les sclérotés sont mûrs après 20 jours d'incubation à 14°C et après 15 jours à 18°C. Le nombre de sclérotés produits dans les deux cas est presque le même. D'après le tableau II.9 nous pouvons remarquer que le pourcentage de germination à 14°C et à 18°C à l'obscurité est approximativement stable. Nous avons donc préféré produire les sclérotés à 18°C à l'obscurité pour raccourcir le cycle de production des apothécies.

Drayton (1937) et Groves et Drayton (1939) ont utilisé des sclérotas produits à 14°C à l'obscurité, puis ils induisaient la carpogénèse en soumettant ces sclérotas à un séjour à 0°C à l'obscurité, mais ils ne montrent pas l'importance de l'obscurité pendant ces deux phases.

c) Conclusion

- L'éclairement continu pendant la période de formation des sclérotas a un effet défavorable sur leurs capacités carpogéniques. Cet effet s'accroît proportionnellement à la température. L'obscurité semble, au contraire, conférer de meilleures capacités carpogéniques lorsqu'elle est appliquée à des températures plus élevées.
- Les températures élevées (plus de 18°C) pendant la période de développement des sclérotas, diminuent la moyenne du nombre d'apothécies se formant par sclérote.

B.- EFFETS DE LA LUMIERE SUR LA FORMATION DES INITIALES
APOTHECIALES ET DES APOTHECIES

La lumière influence le développement de nombreux organismes fongiques et fait partie de cet environnement dont tous les éléments conditionnent de façon interdépendante leur physiologie. Des phototropismes et d'autres effets très différents de la lumière sur la croissance ainsi que les morphogénèses reproductrices et la germination des spores ont été mis en évidence dans tous les groupes fongiques ; les réactions sexuées à la lumière décrites par FAYRET (1975) sur *Gnomonia leptostyla* et DEHORTER sur *Nectria galligena* (1985) nous ont intéressés.

Les réponses aux irradiations lumineuses, quant à la production finale d'ascocarpes fertiles sont de 3 types :

- Photoinhibition : la lumière empêche la formation des ascocarpes fertiles.
- Photoindifférence : les espèces fongiques considérées différencient leurs ascocarpes en présence ou non d'éclairement.
- Photostimulation : la lumière entraîne une multiplication du nombre d'ascocarpes fertiles qui peuvent néanmoins être présents à l'obscurité continue.
- Photoinduction : la morphogénèse des ascocarpes est strictement tributaire de l'éclairement.

Pour les champignons à reproduction sexuée photoinduite, les exigences photiques varient :

- L'éclairement est nécessaire au déroulement complet du processus de fructification.
- La lumière n'est requise que pour certaines séquences morphogénétiques.
 - a) La lumière apparaît indispensable à la constitution des ébauches sexuées dont la maturation peut se réaliser à l'obscurité.
 - b) Chez d'autres champignons, la photodépendance se situe à la maturation des ascocarpes tandis que le début de leur différenciation s'accomplit à l'obscurité.
 - c) Enfin la lumière peut jouer un rôle dans les mécanisme de décharge des ascospores.
- Chez les champignons à reproduction sexuée photosensible, l'efficacité de l'éclairement requis est fonction de sa durée, de son intensité, de la qualité et du moment d'application.

1) Etude bibliographique

Ce sujet a été étudié sur plusieurs espèces de la famille des Sclerotiniacées. Ramsey (1925) et Henson (1940) ont constaté que les initiales apothéciales de *Sclerotinia sclerotiorum* pouvaient se former à la lumière et à l'obscurité, mais ils ont noté que la lumière était indispensable pour le développement des apothécies.

Letham (1975) a indiqué que la lumière stimulait la formation des initiales apothéciales de *Sclerotinia sclerotiorum* et accélérât aussi leur formation. Elliot (1965) a publié que la lumière n'était pas indispensable pour la formation des apothécies fertiles de *Ciboria acerina*. Bergquist et Lorbeer (1972) ont trouvé que les initiales apothéciales de *Botryotinia squamosa* pouvaient se former à la lumière et à l'obscurité mais que les apothécies ne se développaient qu'à la lumière. L'utilisation de lumière proche UV ou de lumière fluorescente donne des apothécies anormales.

Faretra (1988) a noté que l'utilisation de la lumière fluorescente avec la lumière incandescente donnait le même résultat. Honda et Yunok (1975) ont obtenu des apothécies fertiles de *Sclerotinia trifoliorum* sous lumière proche UV continue et des apothécies stériles sous lumière rouge et verte. Willetts et Harada (1984) ont constaté que la lumière n'était pas indispensable au développement des apothécies de *Monilia mali*. Enfin, Faretra (1988) a noté que la lumière n'avait pas un effet important sur la formation des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*.

Pour étudier l'effet de la lumière nous avons essayé de répondre à deux questions essentielles, dans le cas du *Botryotinia fuckeliana* :

- La lumière est-elle indispensable pour la formation des initiales apothéciales et des apothécies ?
- La qualité de la lumière a-t-elle un effet sur leur formation ?

2) Protocole expérimental

Pour répondre à la première question, nous avons soumis des sclérotés spermatisés à 12°C, à 4 différentes durées d'éclairement journalier (3 h., 6 h., 12 h. et 24 h. de lumière par jour) et aussi à l'obscurité totale pour déterminer l'importance de la lumière et les besoins minima en lumière pour la formation des initiales apothéciales et des apothécies.

Nous avons aussi essayé de connaître l'effet de différentes qualités de lumière (lumière rouge, lumière verte, lumière proche UV et lumière bleue) sur la formation des initiales et des apothécies. Nous avons effectué deux séries d'expériences :

- première série : éclairage alterné (12 h. de lumière par jour)
- deuxième série : éclairage continu (24 h. de lumière par jour)

suivant les caractéristiques données dans le tableau ci-dessous.

<i>Eclairement</i>		
<i>Qualité</i>		<i>Intensité (μwcm^{-2})</i>
1- Blanche		500
2- Rouge	600 < nm < 750	500
3- Verte	490 < nm < 600	500
4- Bleue	400 < nm < 500	500
5- proche UV	300 < nm < 400	500

3) Résultats.

Le tableau II.10 montre que l'apparition des ébauches se fait au même moment (5^{ème} semaine) dans toutes les séries par conséquent celle-ci n'est pas photodépendante. Par contre, l'évolution ultérieure des ébauches en apothécies est fortement influencée par la lumière, malgré la présence dans la série conduite en obscurité totale, d'un nombre d'ébauches sensiblement identique à celui trouvé dans les autres séries. Aucune apothécie ne se développe dans ces conditions. Un minimum de 3 heures d'éclairement sur 24 heures permet le développement des apothécies, mais le nombre est nettement meilleur si on passe à 6 ou mieux 12 heures d'éclairement. L'éclairement continu ne modifie pas beaucoup ces résultats par rapport aux séries placées en éclairage alterné. Il semble qu'il y ait néanmoins une légère spécificité en fonction des souches dans la réponse aux durées d'éclairement, mais toutes les souches ont besoin de lumière pour développer leurs apothécies et 3 heures d'éclairement semble être le minimum général.

Nous montrons également que dans toutes les séries, l'éclairement continu accélère l'apparition des apothécies: le délai n'est plus que de 7 semaines alors qu'il est de 8 pour l'éclairement alterné 12 heures/24 heures et, de 9 semaines pour des durées d'éclairement inférieures à 12 heures.

Nous avons constaté que les initiales apothéciales qui se forment à l'obscurité continuent à s'accroître jusqu'à 1,5 - 2,5 cm de longueur et cessent de se développer en donnant un long stipe brunâtre qui se termine en pointe (la longueur normale est dans les autres cas, entre 0,5 - 1,5 cm). L'énergie lumineuse semble donc être indispensable pour la différenciation des disques des apothécies.

Tableau II.10. Effet de différentes périodes de lumière et d'obscurité sur la formation des apothécies

Essais	Lot 1			Lot 2			Lot 3		
	1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*
Obs.totale	5	0	(1,8)	5	0	(2,0)	5	0	(2,4)
3h.L/21h.Obs.	5	9	2,4	5	9	2,1	5	9	2,7
6h.L/18h.Obs.	5	9	2,5	5	9	3,1	5	9	2,8
12h.L/12h.Obs.	5	8	3,0	5	8	2,7	5	8	2,9
24h.L/24h.	5	7	2,8	5	7	3,1	5	7	2,9

1* = Première semaine d'apparition des initiales apothéciales.

2* = Première semaine de formation des apothécies.

3* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote.

() = Moyenne du nombre des initiales apothéciales qui ne peuvent pas donner des apothécies à l'obscurité.

Lot 1 = S.S.A.S405 + s.S.A.S56

Lot 2 = S.S.A.S56 + s.B.C6

Lot 3 = S.S18 + s.S.A.S56

Ces résultats confirment ceux de Ramsey (1925), Henson (1940) et Letham (1975) sur *Sclerotinia sclerotiorum* et ceux de Bergquist et Lorbeer (1972) sur *Sclerotinia squamosa*. Par contre, ils ne correspondent pas à ceux de Elliot (1965) sur *Ciboria acerina* ni à ceux de Willetts et Harada (1984) sur *Monilia mali*.

Takahashi et Kagaya (1969) ont noté que le *Monilia mali* donnait à l'obscurité totale des apothécies fertiles mais uniquement à basse température (de 5°C à 10°C). A des températures plus élevées (15°C) la lumière est indispensable pour la différenciation des disques des apothécies.

La période d'apparition des initiales apothéciales est relativement courte (3 à 4 semaines) par rapport aux autres espèces comme *Sclerotinia sclerotiorum* (6 à 7 semaines). Tandis que le pourcentage d'apparition des initiales apothéciales est faible pendant la première semaine, il augmente ensuite pendant la deuxième semaine d'une façon très nette, puis devient très faible pendant la troisième.

Nous avons aussi constaté que les apothécies montrent un phototropisme positif.

Du tableau II.11 nous pouvons conclure que les apothécies de *Botryotinia fuckeliana* se forment quelle que soit la longueur d'onde de la lumière utilisée sous les quatre différentes qualités de lumière testées. Nous avons aussi constaté après certains prélèvements (écrasement des échantillons sur des lames porte-objet) que toutes les apothécies formées sous les quatre longueurs d'onde utilisées étaient fertiles. Ces résultats ne confirment pas ceux de Honda et Yunok (1975) sur *Sclerotinia trifoliorum* car contrairement à ces auteurs nous avons trouvé que la période d'éclairement n'avait aucun effet sur la fertilité des apothécies.

Tableau II.11. Effet de la qualité de la lumière utilisée pour la formation des apothécies.

Qualité de l'éclairement	12 h.L./ 12 h.Obs.			24 h.L./ 24 h.		
	1*	2*	3*	1*	2*	3*
L. blanche	5	3,1	8	5	3,2	7
L. rouge	5	2,8	11	5	2,7	11
L. verte	5	2,9	8	5	3,1	7
L. bleue	5	3,0	8	5	3,2	7
L. p.UV	5	2,1	8	5	1,7	7

1* = Temps moyen d'apparition des initiales apothéciales (en semaines).

2* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote.

3* = Temps moyen de formation des apothécies (en semaines).

La lumière proche ultra-violette défavorise la formation des apothécies et stimule la germination conidienne qui entraîne une diminution de la formation des apothécies. Par contre les trois autres qualités de lumière n'ont pas d'effets sensibles sur la production des apothécies. Leach (1962), Schlosser (1970) et Tan et Epton (1973) ont constaté que la lumière proche-UV et la lumière "noire" stimulaient la sporulation de *Botrytis cinerea* et que la lumière bleue l'inhibait.

La lumière rouge entraîne une nette diminution de la vitesse de maturation des apothécies par rapport aux autres qualités d'éclairement. Les stipes continuent à se développer et donnent à la fin des apothécies très longuement stipitées (2 à 2,5 cm de longueur) avec de petits "chapeaux" apothéciaux. Ceci montre la faible efficacité de la lumière rouge (longueur d'onde égale ou supérieure à 600 nm) et l'importance de l'énergie lumineuse pour la formation des apothécies. Les radiations vertes et bleues sont donc les plus favorables au développement et à la maturation des apothécies. Klein et Klein (1962) et Tan (1975) ont montré que la lumière rouge inhibait la conidiogénèse; elle n'est pas non plus, ainsi que nous l'avons montré, favorable à la reproduction sexuée du *Botryotinia fuckeliana*.

4) Conclusion

Nous pouvons résumer nos résultats sur l'effet de l'éclairement sur le cycle sexuel de *Botryotinia fuckeliana* en 4 points :

- . La durée journalière d'éclairement a un très faible effet stimulant sur la formation des initiales apothéciales et une influence très nette sur la vitesse de maturation des apothécies. La vitesse de formation des apothécies augmente proportionnellement à la durée journalière d'éclairement.

- . L'obscurité entraîne une réduction faible du nombre des initiales apothéciales mais elle inhibe complètement la formation des disques apothéciaux (les chapeaux des apothécies).
- . L'éclairage proche ultra-violet diminue le pourcentage de carpogénèse des sclérotés mais les radiations rouges, vertes et bleues n'ont pas d'influence sensible sur le taux de formation des apothécies. Par contre la qualité de la lumière peut avoir une influence sur la vitesse de formation des apothécies: la lumière rouge est le seul éclairage utilisé qui la ralentisse nettement.
- . La qualité de l'éclairement n'a aucun effet sur la fertilité des apothécies.

C.- EFFETS DES CONDITIONS NUTRITIVES DANS LESQUELLES LES SCLEROTES ONT ETE PRODUITS SUR LE TAUX DE CARPOGENESE ET LEUR STRUCTURE INTERNE.

Nous avons essayé de voir si le milieu de culture utilisé pour la production des sclérotés avait une influence sur le taux de germination carpogénétique des sclérotés. Dans la première partie de ce travail, nous avons constaté que le pourcentage de carpogénèse des sclérotés était bien lié à la taille des sclérotés produits sur le même milieu. Cette étude comprend 2 parties:

- a) Dans la première partie, nous avons essayé de savoir si les sclérotés produits sur milieux différents et ayant la même taille donnent le même pourcentage de carpogénèse.
- b) Dans la deuxième partie, nous avons voulu déterminer les effets respectifs des constituants du milieu de culture utilisés pour la production des sclérotés sur leur taux de carpogénèse.

1) Protocole expérimental

- Pour réaliser la première partie de cette étude, nous avons choisi quatre milieux de culture qui contiennent des éléments nutritifs différents pour produire des sclérotés.

- Malt-agar 2% (milieu 1)
- P.D.A (milieu 2)
- Czapek (milieu 3)
- Broyat de grains de blé (milieu 4)

Les cultures ont été incubées à 18°C à l'obscurité pendant 15 jours, les sclérotés étant choisis de taille égale à 0,5 cm. Nous avons ensuite suivi notre méthode de production des apothécies in vitro en utilisant les mêmes souches (S.56 et s.B.C6) et des sclérotés ayant été obtenus sur les quatre milieux respectivement.

- Nous avons ensuite essayé de déterminer l'influence de la nature des sources carbonées et des sources azotées sur la structure des sclérotés et leur évolution ultérieure. Le milieu de Huguenin a été utilisé comme milieu de base dans lequel les sources carbonées ont été incorporées à raison de 8 g de carbone par litre, sous forme de glucose, maltose, lactose, amidon, saccharose et xylose respectivement. L'azote est fourni sous forme de nitrate de potassium à raison de 138 mg par litre. Pour étudier l'influence de la source azotée, le besoin en carbone a été apporté sous forme de glucose à raison de 8 g de carbone par litre. Nous avons testé les sources d'azote suivantes à raison de 138 mg d'azote par litre: KNO_3 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , oxalate d'ammonium, asparagine, alanine, peptone, hydrolysate de caséine, cystine, acide amino butyrique, acide glutamique, tyrosine, sérine et broyat de grains de blé.

Tableau II.12 Effet de différents milieux de culture sur le pourcentage de carpogénèse des sclérotés

Essais	milieu 1		milieu 2		milieu 3		milieu 4	
	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*
Lot 1	3,1	4	1,9	4	2,7	4	3,5	4
Lot 2	2,2	4	2,7	4	2,8	4	3,4	4
Lot 3	2,6	4	2,4	4	2,0	4	3,0	4

1* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote.

2* = Temps moyen d'apparition des initiales apothéciales (en semaines).

Milieu 1 = Malt-agar 2%; Milieu 2 = P.D.A; Milieu 3 = Czapek

Milieu 4 = Broyat de grains de blé; Lot 1 = S.S.12 x s.S.14;

Lot 2 = S.S.13 x s.S.14; Lot 3 = S.S.17 x s.S.14

Remarque : Nous avons utilisé 200 sclérotés dans chaque essai, à raison de 10 sclérotés par tube.

2) Résultats

D'après le tableau II.12 nous pouvons constater que:

- La vitesse de germination des sclérotés produits sur milieux différents est presque stable.

Saito (1969), Willetts et Wong (1980) ont constaté que la vitesse de germination des sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro était plus grande pour des sclérotés produits sur milieu contenant des extraits végétaux que pour des sclérotés produits sur milieu synthétique. Dans notre cas, les différences ne sont pas significatives.

Faretra (1988) a trouvé que la carpogénèse des sclérotés produits sur milieu grains de blé était moins rapide que pour des sclérotés produits sur milieu synthétique. Il a précisé que les sclérotés produits sur milieu grains de blé avaient un cortex beaucoup plus épais qui retardait la carpogénèse.

- Le pourcentage de germination des sclérotés provenant des trois premiers milieux est relativement stable. Les résultats sont nettement meilleurs en ce qui concerne les sclérotés qui se sont formés sur milieu broyat grains de blé. Nous avons noté des différences de morphologie entre les sclérotés provenant des différents milieux: leur forme et leur volume sont différents. Les sclérotés formés sur les trois premiers milieux ont une forme un peu plate et mince. Par contre les grains de blé constituent un milieu riche en azote et en carbone. Ce milieu conduit à la production de sclérotés volumineux de forme granuleuse dont la surface est un peu plus grande, capables de produire un pourcentage de germination plus élevé.

Tableau II.13. Effets de la nature des sources de carbone pendant la période de production des sclérotés sur leur taux de carpogénèse.

Sources de carbone	1*	2*
amidon	2,6	4
maltose	2,9	4
saccharose	3,2	4
glucose	2,8	4
lactose	2,6	4
xylose	2,7	4
broyat de grains de blé	3,9	4

1* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote.

2* = Temps moyen d'apparition des initiales apothéciales (en semaines).

Ces résultats nous ont suggéré une possibilité de changement de la structure interne du sclérote en fonction de la composition nutritive du milieu utilisé pour leur production. Si ces modifications de structure existent, elles peuvent être tenues pour responsables de la différence des pourcentages de germination entre des sclérotés produits sur milieu broyat de grains de blé et des sclérotés produits sur les autres milieux.

Pour ces raisons nous avons effectué des coupes après inclusion dans la paraffine de sclérotés ayant la même taille (0,5 cm) et produits sur deux milieux différents (malt-agar 2% et broyat de grains de blé) afin d'étudier leur structure interne. Nous avons utilisé les techniques cytologiques décrites dans l'annexe Matériel et Méthodes. D'après la comparaison entre les différentes coupes effectuées, nous avons constaté qu'il n'y avait aucune différence dans les structures internes des deux catégories de sclérotés. En conséquence, nous pouvons supposer que les divers milieux composés d'éléments nutritifs très variés, donnent des sclérotés ayant des tailles et des formes très différentes mais une structure interne identique.

Les résultats reportés dans le tableau II.13 nous montrent que la nature de la source carbonée fournie pendant la phase de production des sclérotés, n'exerce pas un effet très important sur la carpogénèse. On peut noter un léger effet stimulant du saccharose (3,2 apothécies par sclérote). Ce sont néanmoins les sclérotés produits sur un milieu naturel (broyat de grains de blé) qui ont donné le meilleur pourcentage de carpogénèse (3,9 apothécies par sclérote). Par contre, la vitesse d'apparition des initiales apothéciales est identique dans tous les cas (fin de la quatrième semaine).

La source d'azote utilisée pendant la période de production des sclérotés (stade a, schéma 2) a une influence nette sur le pourcentage de

Tableau II.14. Effets de la nature des sources d'azote pendant la période de production des sclérotés sur leur taux de carpogénèse.

Sources d'azote	1*	2*
KN03	3,1	4
NaNO3	2,9	4
NH4NO3	3,2	4
(NH4)2SO4	0	0
NH4Cl	0	0
oxalate d'ammonium	2,0	4
asparagine	2,9	4
alanine	2,8	4
peptone	3,2	4
hydrolysate de caséine	3,1	4
cystine	0	0
acide amino butyrique	2,8	4
acide glutamique	3,0	4
tyrosine	0	0
sérine	2,9	4
broyat de grains de blé	4,2	4

1* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote.
 2* = Temps moyen d'apparition des initiales apothéciales (en semaines).

carpogénèse (tableau II.14), toutes les sources d'azote organique utilisées stimulent nettement la carpogénèse (de 2,8 à 3,2 apothécies par sclérote) à l'exception de la cystine et de la tyrosine qui l'inhibent. Par contre les sources d'azote minéral sont beaucoup moins efficaces pour la carpogénèse, à l'exception des sources d'azote nitrique qui favorisent la carpogénèse. Mais le meilleur pourcentage de carpogénèse (4,2 apothécies par sclérote) a néanmoins été obtenu avec des sclérotés produits sur milieu naturel (broyat de grains de blé).

Nos résultats ne confirment pas totalement les résultats obtenus par Saito (1969) sur *Sclerotinia sclerotiorum* car ils montrent que le nitrate comme source d'azote minéral est favorable pour la carpogénèse. En ce qui nous concerne, nous constatons que l'azote ammoniacal est totalement inhibiteur de la carpogénèse contrairement à l'azote nitrique, mais c'est l'azote organique qui reste malgré tout, la forme d'apport la plus favorable.

Si nous nous reportons aux résultats relatifs à l'influence des sources azotées et carbonées sur la production des sclérotés, nous constatons que les sources d'azote minéral et d'azote organique, qui stimulent la production des sclérotés, favorisent également leur carpogénèse. C'est malgré tout le milieu naturel (broyat de grains de blé) qui donne le plus grand nombre de gros sclérotés et ensuite le meilleur pourcentage de carpogénèse. Ceci montre que les conditions nutritives dans lesquelles les sclérotés ont été produits, ne sont pas sans influence sur leur évolution carpogénétique ultérieure.

3) Conclusion

D'après ces résultats nous pouvons constater que :

- Les milieux riches (avec azote et carbone) donnent des sclérotés plus volumineux que des sclérotés provenant des milieux pauvres. En conséquence ils conduisent à des taux de germination plus élevés.
- Les milieux qui ont des compositions nutritives différentes donnent des sclérotés de tailles et de formes différentes mais de même structure interne.
- les sources de carbone qui stimulent la production des sclérotés, favorisent la carpogénèse.
- Les sources d'azote minéral testées ne sont pas favorables si l'azote est apporté sous forme ammoniacale pour la carpogénèse. Par contre les différentes formes d'azote nitrique utilisées ont un effet légèrement stimulant. Mais l'azote organique stimule nettement mieux la carpogénèse que l'azote minéral.
- Le milieu naturel est nettement plus favorable à la carpogénèse que les milieux synthétiques.

D.- EFFETS DE DIFFERENTS SUPPORTS SUR

LA PRODUCTION DES APOTHECIES

Pour réaliser le cycle sexué de *Botryotinia fuckeliana*, nous utilisons deux milieux différents:

- a) Premier milieu : nous l'appelons "milieu de culture", pour avoir des sclérotés et également des microconidies (stade a, schéma 2).
- b) Deuxième milieu : nous l'appelons "support" ou "milieu de culture carpogénèse" pour avoir des apothécies (stade c, schéma 2).

Après avoir étudié l'effet des différents milieux de culture sur la production des sclérotés et sur leur carpogénèse, nous avons voulu connaître l'effet de différents supports sur la carpogénèse et le nombre d'apothécies produites par sclérote.

1) Etude bibliographique

Plusieurs types de "supports" ont été étudiés sur quelques espèces de la famille des *Sclerotiniacées*. Groves et Drayton (1939) et Groves et Loveland (1953) ont utilisé de la terre comme support pour la carpogénèse de sclérotés produits sur grains de blé. Ils ont démontré qu'en couvrant les sclérotés d'une couche très fine de terre la carpogénèse était favorisée alors qu'elle était inhibée par le sable. En effet les sclérotés produits sur grains de blé sont très durs et la dureté du cortex favorise plutôt une germination conidienne.

Polach et Abawi (1975) ont obtenu des apothécies dans les mêmes conditions en utilisant des sclérotés produits sur des branches de céleri et de haricot autoclavées. Lorenz et Eichhorn (1983) ont rapporté que la carpogénèse des sclérotés produits sur milieu gélosé n'était ni stimulée ni inhibée lorsqu'on les couvrait d'une très fine couche de terre. Faretra (1988) a noté que le nombre d'apothécies par sclérote diminuait quand il recouvrait les sclérotés de terre et il a précisé que les différences entre ses résultats et ceux de Lorenz (1983) étaient dues à l'utilisation de milieux de culture différents.

Jones et Groy (1973) ont rapporté que les sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum* formés sur milieu naturel donnaient des apothécies sur de la terre alors que les sclérotés provenant de milieux gélosés (culture pure) ne germaient pas sur la terre mais dans l'eau distillée.

Singh et Singh (1984) ont testé plusieurs supports pour la carpogénèse

(eau distillée, eau gélosée, sable, sable + terre, sable + extrait de terre, vermiculite et papier buvard) pour des sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum*, ils ont obtenu le meilleur pourcentage de carpogénèse sur l'eau distillée et le plus faible sur papier buvard. Polach (1975) a remarqué que les sclérotés de *Botryotinia fuckeliana* germaient aussi dans les champs de culture quand ils étaient partiellement submergés. Faretra (1988) a confirmé les résultats de Singh (1984) sur des sclérotés de *Botryotinia fuckeliana*.

Grogan et Abawi (1975), Duniway et Abawi (1977) et Morrall (1977) ont noté que la production d'apothécies de *Sclerotinia sclerotiorum* dans l'eau était nettement influencée par leur faible potentiel hydrique.

Teo et Morrall (1985) et Faretra (1988) ont montré la nécessité de l'aération qui stimule la carpogénèse des sclérotés.

2) Protocole expérimental

Nous avons voulu vérifier l'effet de différents supports pour la carpogénèse en étudiant le pourcentage d'apothécies par sclérote (sclérotés produits sur grains de blé et malt-agar 2%). Pour effectuer cette étude nous avons choisi des supports pour la carpogénèse qui nous ont semblé les meilleurs d'après la bibliographie, mais aussi les plus proches du milieu naturel dans lequel se développe notre champignon: 1* eau distillée. 2* sable. 3* terre. 4* terreau. Nous avons estimé que le terreau pouvait être considéré comme un support apportant des éléments nutritifs pour la carpogénèse.

Nous avons choisi 6 souches compatibles pour effectuer nos croisements en utilisant la technique de production des apothécies décrite dans le chapitre précédent. Des boîtes de Pétri en verre de 8,5 cm de diamètre sont autoclavées pendant 20 minutes à 0,5 atmosphère, nous introduisons 20 g de

milieu dans chaque boîte + 20 ml de suspension de microconidies.

3) Résultats

D'après le tableau II.15 nous pouvons remarquer que :

- Le terreau est le support le plus efficace parmi les quatre supports testés: il est celui sur lequel on obtient le plus fort pourcentage de carpogénèse avec 6,5 apothécies par sclérote contre 3,9 sur eau distillée et 3,5 sur sable.
- Sur terre nous n'avons pas obtenu d'apothécies, mais uniquement des stipes qui cessent de se développer après quelques jours, donc la terre peut être considérée comme un support très défavorable.
- Sur sable et sur eau distillée la formation des disques apothécieux est très lente (3 à 4 semaines) ; par contre sur terreau elle est très rapide (2 à 3 semaines).

Ces résultats ne correspondent ni aux résultats de Groves et Drayton (1939) sur *Botryotinia fuckeliana*, ni à ceux de Le Tourneau (1979) sur *Sclerotinia sclerotiorum*, ou de Singh et Singh (1984) sur *S.sclerotiorum*. Ils ne confirment pas ceux de Faretra (1988) sur *B.fuckeliana*. Ces auteurs ont noté que les supports pauvres (ceux qui ne contiennent pas d'éléments nutritifs) stimulaient les sclérotés dans le sens de la carpogénèse.

En ce qui nous concerne, nous avons eu le meilleur pourcentage de carpogénèse et la vitesse la plus rapide de maturation des apothécies sur le terreau qui est un support contenant des quantités non négligables de organiques. Les apothécies formées sur du terreau se caractérisent par des stipes courts (0,5 cm à 1,2 cm) sans doute à cause de la bonne valeur nutritive du terreau qui accélère leur vitesse de formation. Par contre les apothécies formées sur eau distillée ou sable ont des stipes longs (1,2 cm à 1,6 cm).

Tableau II.15. Effet des différents supports sur le pourcentage de carpogénèse des sclérotés.

Souches	Sclérotés (1)				Sclérotés (2)				
		1*	2*	3*	4*	1*	2*	3*	4*
S.S.A.S405	+	3,9	3,4	0	6,3	2,8	2,8	0	3,8
s.S.A.S56	++	3-4	4-5	4-5	2-3	3-4	4-5	4-5	2-3
S.S.A.S56	+	3,6	3,5	0	6,5	2,9	2,5	0	4,1
s.B.C.6	++	3-4	4-5	4-5	2-3	3-4	4-5	4-5	2-3
S.S.18	+	3,4	3,2	0	5,7	2,6	2,3	0	3,6
s.S.14	++	3-4	4-5	4-5	2-3	3-4	4-5	4-5	2-3

1* = Eau distillée; 2* = Sable; 3* = Terre; 4* = Terreau.

Sclérotés (1) = Sclérotés produits sur grains de blé.

Sclérotés (2) = Sclérotés produits sur malt-agar 2%.

+ = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote.

++ = Temps moyen d'apparition des initiales apothéciales (en semaines).

Les résultats de Harada (1969 et 1977) sur *Sclerotinia sclerotiorum* et nos propres résultats sur *B. fuckeliana* montrent que les sclérotés produits sur support riche en azote organique donnent le meilleur pourcentage de carpogénèse. Ceci indique que ces champignons ont besoin d'énergie pour effectuer la carpogénèse, c'est à dire former des apothécies. De même la plupart des espèces de la famille des *Sclerotiniacées* ont besoin d'énergie lumineuse pour former les disques apothéciaux.

Contrairement à nous Groves et Drayton (1939), Groves et Loveland (1953), Lorenz et Eichhorn (1983), Singh et Singh (1984) et Faretra (1988) ont obtenu des apothécies de *B. fuckeliana* sur terre ; nous pensons que cette différence dans les résultats provient de la qualité de la terre utilisée pour nos expériences et donc de sa composition chimique.

Le fait que le terreau (support riche) stimule nettement la carpogénèse nous a conduits à essayer de connaître l'effet de l'azote et du carbone sur la production des apothécies. Nous avons essayé 4 modifications d'un même milieu liquide que nous avons utilisé comme support:

- Milieu de Huguenin (complet) (A): (NO_3NH_4 + glucose).
- Milieu de Huguenin sans source d'azote (B).
- Milieu de Huguenin sans source de carbone (C).
- Milieu de Huguenin sans source de carbone et avec une source d'azote organique (l'acide glutamique 138 mg N/l) (D).
- L'eau distillée (témoin) (E).

D'après le tableau II.16 nous constatons que :

- a) Nous n'avons obtenu d'apothécies ni sur milieu A ni sur milieu B car la présence de sucre dans le milieu de carpogénèse stimule le développement mycélien ce qui inhibe complètement la carpogénèse.

Tableau II.16 : Effets de l'azote et du carbone dans le milieu de culture de carpogénèse (support) sur le taux d'apparition des apothécies.

Souches	A		B		C		D		E	
	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**
S.S.A.S405										
s.S.A.S56	0	0	0	0	4-5	3,2	4-5	3,4	4-5	2,9
S.S.A.S56										
s.B.C.6	0	0	0	0	4-5	3,2	4-5	3,5	4-5	3,0

A = Milieu de Huguenin complet; B = Milieu de Huguenin sans source d'azote; C = Milieu de Huguenin sans source de carbone; D = Milieu de Huguenin sans source de carbone et avec une source d'azote organique; E = Eau distillée (témoin); * = Temps moyen d'apparition des initiales apothéciales (en semaine); ** = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote.

b) La présence d'une source d'azote seule induit faiblement la formation des apothécies (3,2 apothécies par sclérote pour l'azote minéral et 3,0 pour l'eau), mais elle n'a pas d'effet sur la vitesse de production des apothécies. Il faut noter que nous avons eu plusieurs sclérotés portant 2 apothécies sur le même stipe (planche 4, photo 12), ce sont des apothécies normales qui ne ressemblent pas aux apothécies anormales (tétratogènes) obtenues par Yosasih et Willetts (1975 b) et Faretra (1988). Par contre la présence d'une source d'azote organique stimule un peu mieux la carpogénèse que l'azote minéral (3,5 apothécies par sclérote pour le milieu contenant de l'azote organique et 3,2 pour l'azote minéral).

4) Conclusion

De ces résultats nous pouvons retenir que :

- a) Le terreau est le meilleur support pour la carpogénèse des sclérotés.
- b) Un milieu contenant une source d'azote notamment de l'azote organique utilisé comme support stimule la formation des apothécies.
- c) La présence d'une source de carbone simple (sucre) dans le support inhibe complètement la production des apothécies et conduit les sclérotés à un développement mycélien.

Tableau II.17.

Effets l'âge de la culture spermatienne
sur la formation des apothécies

Essais	15 jours		30 jours		45 jours		3 mois		6 mois		9 mois		12 mois	
	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*
S.S.A.S405 s.S.A.S56	2,4	4	2,6	4	2,1	4	1,5	4	2,2	4	1,8	4	2,9	4
S.S.2 s.S.14	1,8	4	2,3	4	1,9	4	2,4	4	3,1	4	2,6	4	2,7	4
S.S.5 s.S.14	2,8	4	2,0	4	2,7	4	2,9	4	2,4	4	3,2	4	1,6	4

1* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote

2* = Date d'apparition des initiales apothéciales (en semaines)

IV.- DETERMINISME DE LA CARPOGENESE: LA FECONDATION

Au cours du cycle sexuel de *B. fuckeliana* comme de celui des espèces semblables, la carpogénèse se produit par contact entre l'organe femelle (sclérote) et l'organe mâle (spermatie). L'évolution du sclérote et donc indirectement la carpogénèse semblent être placées sous l'influence d'un certain nombre de facteurs que nous avons voulu étudier.

L'âge, la concentration des spermaties et les conditions dans lesquelles elles ont été produites nous ont semblé être les plus importants parmi ces facteurs.

A.- EFFETS DE L'AGE DE LA CULTURE SPERMATIENNE

1) Protocole expérimental

Nous avons repiqué les souches productrices de spermaties s.S.A.S 56 et s.B.C 6. sur milieu grains de blé. Les croisements ont été réalisés en utilisant toujours des sclérotés âgés de 15 jours et produits à 18°C à l'obscurité (souches S.S.A.S 405 et S.S.A.S 56). Nous avons ensuite suivi notre méthode de production des apothécies in vitro en utilisant des cultures spermatiennes d'âges différents (15, 30, 45 jours, 3, 6, 9 et 12 mois). Il faut noter que ces souches spermatiennes étaient conservées à 7°C afin de les garder longtemps en bon état. En effet les cultures ne peuvent pas survivre longtemps à haute température car elles se déshydratent.

2) Résultats

- Nos résultats (tableau II.17) montrent que la vitesse de germination des sclérotés est stable et elle ne change pas en fonction de l'âge de la culture dont les spermaties proviennent.

Donc comme nous l'avons déjà noté, la vitesse de germination est bien liée à la durée de séjour des sclérotés au froid, l'âge de la culture spermatienne n'a aucun effet sur ce phénomène.

- Les spermaties sont capables de survivre pendant 1 an en bon état et de garder leur capacité à féconder des cellules ascogoniales. Drayton (1937) a noté que les spermaties de *Botrytis squamosa* perdent leurs capacités fécondantes au bout de 5 mois. Celles de *Botryotinia fuckeliana* sont donc nettement plus résistantes.
- Les spermaties se forment à partir de 15 jours après le repiquage et elles sont capables de féconder. Massey (1928), Drayton (1934, 1937 et 1939), Groves et Loveland (1953) et Grindel (1979) ont montré que les spermaties se forment sur des cultures âgées de 30 à 45 jours .
- Le pourcentage de carpogénèse des sclérotés est relativement stable malgré la différence dans l'âge des cultures.

B. - EFFET DES CONDITIONS LUMINEUSES SUR LA PRODUCTION DES SPERMATIES ET LE TAUX DE CARPOGENESE

1) Protocole expérimental

Pour tester l'effet des conditions lumineuses sur la production des spermaties et sur la carpogénèse, nous avons produit des spermaties en conditions d'éclairement alterné (12 h. de lumière/12 h. d'obscurité à 18°C) et des spermaties à l'obscurité totale; les deux lots de spermaties ainsi obtenus ont été utilisés à l'âge de 45 jours pour effectuer des spermatisations.

2) Résultats

D'après le tableau II.18 nous pouvons constater que:

- Les conditions lumineuses dans lesquelles les spermaties utilisées ont été produites n'ont aucun effet sur la vitesse de la carpogénèse.
- Le taux de germination des sclérotés mis au contact de spermaties produites à la lumière est relativement plus élevé que lorsque des spermaties produites à l'obscurité sont utilisées.

Nous pouvons dire que l'énergie lumineuse a un certain effet sur les spermaties, celles qui ont été produites à la lumière paraissent plus actives et plus efficaces pour la fécondation. Nous avons déjà montré que les conditions lumineuses avaient une certaine influence sur la vitesse et le taux de germination des sclérotés.

C.- EFFET DE LA CONCENTRATION EN SPERMATIES SUR LE TAUX DE CARPOGENESE

Pour effectuer cette étude nous avons posé deux questions :

- La concentration des spermaties a-t-elle un effet sur le taux de carpogénèse ?
- Quelle est la concentration minimale de spermaties à utiliser pour obtenir le maximum de carpogénèse ?

1) Protocole expérimental

Nous avons préparé une suspension de spermaties bien concentrée (solution mère). A partir de cette suspension nous avons préparé 8 concentrations différentes en diluant la solution mère avec le volume nécessaire d'eau distillée stérile. La spermatisation a été effectuée en

Tableau II.18.

Pouvoir fécondant des spermaties en fonction des conditions d'éclairement dans lesquelles elles ont été produites

Essais	spermaties produites à la lumière*		spermaties produites à l'obscurité totale	
	1*	2*	1*	2*
S.S.A.S405 s.S.A.S56	3,4	4	2,8	4
S.S.2 s.S.14	2,7	4	1,9	4
S.S.5 s.S.14	2,2	4	2,4	4

1* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote

2* = Temps moyen d'apparition des initiales apothéciales (en semaines).

* = 12 h. lumière / 12 h. obscurité.

ajoutant 3 ml de la suspension spermatienne et 6 ml d'eau distillée stérile dans chaque tube (200 /25 mm) et 10 sclérotés par tube.

2) Résultats

- Les résultats décrits dans le tableau II.19 montrent que les initiales apothéciales apparaissent toujours à partir de la 4^{ème} semaine, quelle que soit la concentration de la solution de spermaties utilisée. Nous pouvons donc dire que la concentration en spermaties n'a aucun effet sur la vitesse de carpogénèse.

- Les concentrations spermatiennes les plus fortes donnent des taux de germination un peu plus élevés que les concentrations faibles (2 à 2,9 apothécies par sclérote), cette différence n'est pas très significative. Nous avons constaté que les cellules ascogoniales peuvent se former même en l'absence des spermaties. Donc cette différence de taux de germination entre les fortes et les faibles concentrations des spermaties semble pouvoir être interprétée comme une augmentation de la possibilité de contact entre les spermaties et les cellules ascogoniales. Les spermaties n'ont pas d'effet sur la formation des ascogones, le nombre en étant relativement limité par la taille et la forme du sclérote.

3) Conclusion

D'après ces résultats nous pouvons constater que :

- L'âge des spermaties n'a aucun effet sur la vitesse et le taux de carpogénèse.
- Les spermaties de *Botrytis cinerea* se forment à partir du 15^{ème} jour après le repiquage et elles sont capables de féconder les ascogones pendant à peu près 12 mois.
- L'énergie lumineuse a un certain effet stimulant sur les spermaties

Tableau II.19.

Effets de différentes densités de population des spermaties sur la formation des apothécies

N.	2250000 s/ml	1125000 s/ml	562500 s/ml	281250 s/ml	140625 s/ml	70312 s/ml	35156 s/ml								
Essais	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*	
S.S.A.S405 s.S.A.S56	2,7	4	2,2	4	3,0	4	2,4	4	2,8	4	1,7	4	2,0	4	
S.S.2 s.S.14	3,2	4	2,7	4	2,5	4	3,3	4	2,1	4	2,3	4	2,3	4	
S.S.5 s.S.14	2,9	4	2,7	4	2,3	4	1,9	4	2,4	4	2,5	4	1,7	4	

N = Nombre de spermaties /ml; s = Spermaties 1* = Moyenne du nombre d'apothécies par sclérote
 2* = Première semaine d'apparition des initiales apothéciales

produites à la lumière. Elles paraissent plus actives et plus efficaces pour la fécondation.

- La concentration en spermatozoïdes n'a aucun effet sur la vitesse de carogénèse. Par contre les concentrations plus fortes donnent des pourcentages de germination plus élevés que les concentrations faibles.



CONCLUSIONS
GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

L'étude de la reproduction sexuée in vitro du *Sclerotinia fuckeliana*, démontre la complexité du cycle de ce champignon qui se compose de 3 longues étapes :

- 1) Production de sclérotés et de microconidies (15 jours à 18°C à l'obscurité).
- 2) Conditionnement de sclérotés (1 mois à 0°C à l'obscurité).
- 3) Production des apothécies (1 mois à 14°C à la lumière).

La production des apothécies dépend de l'influence simultanée et optimale de nombreux facteurs :

- Facteur génétique: elle résulte de la compatibilité génétique des souches.
- Facteurs externes : la production de sclérotés (période A) peut être obtenue sous une large gamme de températures, elle est optimale à 18°C. Le conditionnement des sclérotés (période B) effectué à partir de 0°C jusqu'à 7°C donne les meilleurs résultats; par contre les basses températures -10°C et -20°C induisent des changements dans leur structure interne, sans doute responsables du retard dans la production des apothécies. La formation des apothécies (période C) se réalise pour des températures comprises entre 10°C et 15°C. Les températures supérieures ou inférieures l'inhibent.

La lumière est indispensable pour la formation des apothécies (période C photoindépendante), et elle n'a pas d'effets sensibles sur la production

de sclérotés. La lumière rouge ralentit nettement la vitesse de maturation des apothécies et la lumière proche UV diminue le pourcentage de germination des sclérotés. Cette diminution résulte de l'effet stimulant de la lumière proche UV sur la conidiogenèse.

Ce cycle nécessite des conditions nutritives équilibrées, soit sous forme de certains substrats naturels (broyat de grains de blé), soit fournies par un milieu synthétique dont certains macroéléments (K et Mg) jouent un rôle particulier. L'absence de potassium ou de magnésium dans le milieu synthétique inhibe la formation des sclérotés. Les mêmes formes d'apport du carbone, de l'azote et également les mêmes concentrations en ces éléments dans le milieu favorisent la formation des sclérotés et celle des microconidies. Les milieux naturels et les milieux synthétiques riches en carbone et en azote stimulent la production de mycélium, de sclérotés et de microconidies. Mais le champignon produit chaque forme selon la priorité et l'importance de chacune dans le cycle biologique. Celui-ci commence toujours par la formation de mycélium, ensuite celle de sclérotés et enfin celle de microconidies. Cet ordre ne change pas même si les facteurs externes sont modifiés. Il n'y a que des variations quantitatives de production pour chaque forme, seul le facteur génétique modifie cette priorité.

Le terreau, substrat utilisé comme support riche en carbone et azote organiques et en éléments minéraux, stimule et accélère la formation des apothécies beaucoup mieux que les milieux pauvres précédemment cités comme les meilleurs.

L'âge de la culture spermatienne et le nombre moyen de spermaties utilisées ainsi que la manière dont les spermaties utilisées pour la spermatisation sont produites, n'ont pas d'effet sensible sur le pourcentage de carpogenèse; par contre la spermatisation très précoce

(après la maturation du sclérote directement) stimule et accélère la carpogénèse.

Une humidité élevée stimule la formation des microconidies, de même le bas potentiel hydrique diminue ou inhibe la carpogénèse.

L'ensemble de ces exigences démontre l'antagonisme entre l'évolution sporophytique concrétisée par la formation des ascocarpes fertiles et le développement gamétophytique du champignon dont la croissance mycélienne et la formation de sclérotés et de microconidies peuvent s'accomplir dans un environnement très différent de celui qui est nécessaire à sa sexualisation.

Ces résultats ont permis de définir cytologiquement les principales étapes de l'ontogénie sexuée de ce champignon.

La spermatisation est indispensable pour avoir la phase $2N$. Les spermaties sont capables de féconder les cellules ascogoniales directement après leur formation. Ainsi la fécondation de ces cellules se produit à l'intérieur du sclérote et par suite l'apparition des initiales apothéciales a toujours lieu après la spermatisation. Les conidies ne sont pas capables de féconder directement les cellules ascogoniales, mais un passage obligatoire à l'état spermatien est indispensable pour effectuer la fécondation. Il faut également noter que nous n'avons pas réussi à faire germer les microconidies soit dans l'eau soit sur des milieux nutritifs, donc nous considérons qu'elles n'ont pas de rôle autre que celui qui est habituellement attribué aux spermaties.

Le mycélium, les sclérotés, les conidies, les ascospores et les paraphyses sont capables de produire des spermaties dans l'eau à des températures basses (12°C jusqu'à 4°C).

Les sclérotés gardent leur capacité à la carpogénèse après une longue période de conservation à 0°C et à 7°C . Par contre ils la perdent après un

court séjour à des températures très basses -10°C et -20°C , mais ils restent capables de donner naissance à un mycélium. On peut dire que la congélation est létale pour les ascogones et que celles-ci sont très fragiles.

Enfin, nous tenons à préciser que la longue durée de ce cycle sexuel (environ 3 mois) et le manque d'étuves climatisées nous ont empêché de mettre en évidence quelques points qui nous ont paru intéressants surtout l'effet du froid sur la formation des cellules ascogoniales et l'évolution nucléaire chez ce champignon.

ANNEXE 1

I.- MATERIEL ET METHODES UTILISES

A.- Milieux de culture

1) milieu grains de blé (Drayton 1937).

8 g de grains de blé + 25 ml d'eau distillée sont introduits dans une boîte de Pétri en verre, et autoclavés à 0,5 atmosphère. Ce milieu donne des sclérotés ayant des tailles différentes et un cortex dur qui retarde la carogénèse par rapport aux autres milieux.

2) milieu broyat de grains de blé

320 g de broyat de grains de blé dans un litre d'eau distillée, autoclavés pendant 20 minutes à 0,5 atmosphère, et répartis dans des boîtes de Pétri (25 ml par boîte).

3) milieu Pomme de terre.

200 g de pulpe de pomme de terre finement broyée sont mis à bouillir dans un litre d'eau distillée pendant 10 minutes. Après refroidissement la pulpe est filtrée sur de la laine de verre et le volume du filtrat est ramené à sa valeur initiale par addition d'eau distillée. Gélosé à 2% et autoclavé à 0,5 atmosphère pendant 20 minutes, ce milieu est réparti dans des boîtes de Pétri (25 ml par boîte).

4) milieu P.D.A. (Potato Dextrose Agar)

Ce milieu se compose de milieu pomme de terre + 20g de dextrose/litre.

5) milieu P.D.B. (Potato Dextrose Agar)

Ce milieu se compose de milieu pomme de terre sans gélose.

6) milieu malt-agar 2%

20 g d'extrait de malt + 15 g de gélose dans un litre d'eau distillée, autoclavés pendant 20 minutes à 0,5 atmosphère, et repartis dans des boîtes de Pétri (25 ml par boîte).

7) milieu Botrytis cinerea separation agar.

Ce milieu contient les éléments suivants :

- Glycerol -----	5 g	KCl -----	1 g
- Sorbose -----	2,5 g	KH ₂ PO ₄ -----	0,15 g
- Hydrolysate de		NaNO ₃ -----	3 g
caséine -----	5 g	MgSO ₄ -----	0,5 g
- Extrait		Agar -----	20 g
de levure -----	3 g	Eau distillée -----	1 litre

5) milieux synthétiquea) milieu Czapek-agar

Ce milieu contient les éléments suivants :

- NaNO ₃ -----	3 g	FeSO ₄ ,7H ₂ O -----	0,01 g
- K ₂ HPO ₄ -----	1 g	Sucrose -----	20 g
- MgSO ₄ ,7H ₂ O -----	0,5 g	Agar -----	15 g
- KCl -----	0,5 g	Eau distillé ---	1 litre

b) milieu synthétique utilisée par Kamoen (1963)

Le milieu minéral de base contient les éléments suivants:

- NH₄ NO₃ ----- 0,800 g - Fe Cl₃,6H₂O ----- 2,703 mg
- KH₂ PO₄ ----- 1,361 g - Cu Cl₂,2H₂O ----- 0,170 mg
- Mg SO₄.7H₂O --- 0,616 g - Mn Cl₂,4H₂O ----- 0,198 mg
- Na Cl ----- 0,058 g - Zn Cl₂ ----- 0,136 mg
- Na₂.MoO₄,2H₂O --- 0,242 mg - Eau distillée --- 1 litre.
- Co Cl₂,6H₂O ----- 0,119 mg

On ajoute ensuite du glucose (20 g / litre) et de l'agar-agar (15 g / litre), le pH est ajusté à 5,5.

c) milieu Huguenin (1970).

- Mg SO₄,7H₂O --- 0,5 g - Fe SO₄,7H₂O ----- 0,5 mg
- K₂ SO₄ ----- 0,5 g - Zn SO₄,7H₂O ----- 0,5 mg
- Ca Cl₂ ----- 0,2 g - Cu SO₄,5H₂O ----- 0,02 mg
- K₂HPO₄ ----- 0,1 g - Mn Cl₂,7H₂O ----- 0,02 mg
- KH₂PO₄ ----- 0,8 g - Ti SO₄,5H₂O ----- 0,02 mg
- KNO₃ ----- 1 g - Mo₇(NH₄)₆,4H₂O-- 0,2 mg
- Glucose ----- 20 g - Thiamine ----- 0,2 mg
- Agar-agar ----- 15 g - Eau distillée -- 1 litre.
- pH ----- 5,5

B.- Méthodes utilisées pour l'isolement des souches.

1) Isolement des souches monoascospores:

Nous avons utilisé la méthode suivante pour isoler les ascospores:

- écraser aseptiquement une partie d'une apothécie adulte dans une goutte d'eau stérile, sur une lame porte-objet.

- utilisation d'un micromanipulateur (De Fonbrune) pour isoler les ascospores séparément en utilisant une chambre à huile avec quelques gouttes du milieu P.D.B.
- incuber les chambres à huile pendant 2 semaines à 18°C pour que les ascospores puissent se développer rapidement.
- dès que les hyphes résultant du développement des ascospores sont visibles à l'oeil nu, on les transfère sur des morceaux de carotte autoclavés en tubes.

2) Isolement des "souches sauvages":

Pour les isoler nous avons utilisé la technique suivante:

- Trempage des fragments végétaux support pendant 2 minutes dans l'alcool éthylique à 96°,
- Désinfection de ces fragments par passage pendant 2 minutes dans une solution contenant 15 g/l d'hypochlorite de calcium,
- Rinçage par passage dans l'eau distillée pendant 10 minutes.

L'isolement s'effectue en réalisant des coupes très petites de quelques millimètres d'épaisseur qui sont déposées aseptiquement sur milieu Botrytis cinerea separation agar (Miloslav 1978) en boîtes de Pétri.

C.- Méthode utilisée pour préparer des suspensions microconidienne, conidienne.

Après avoir préparé une suspension globale constituée de mycélium, de macroconidies et de microconidies dans l'eau stérile, nous l'avons placée en agitation rotative pour séparer les hyphes, les microconidies et les conidies. Par filtration sur laine de verre stérile nous avons éliminé les hyphes. Ensuite en effectuant un passage à travers un filtre 0,45 µm nous

avons séparé les macroconidies des microconidies.

D.- Les techniques cytologiques utilisées.

1) Observation directe et photographie.

Les échantillons sont maintenus à l'état humide; les observations morphologiques directes sont effectuées à l'aide d'une loupe binoculaire: Les photographies ont été réalisées avec un appareil OLYMPUS sur films ILFORD (PANF 135).

2) Techniques utilisées pour la microscopie photonique.

a) Préparation par écrasement, coloration.

Des préparations par écrasement ont permis d'étudier la morphologie et la structure des composants de l'hyménium des apothécies: paraphyses et surtout asques et ascospores. Elles sont réalisées à partir des fragments d'apothécie dans une goutte d'eau ou d'un réactif colorant.

Les colorants usuels ont été utilisés :

- Bleu coton acétique, colorant en bleu la callose, contenu dans la paroi du champignon. Dénué de spécificité étroite, le colorant se fixe également sur le noyau et divers constituants cytoplasmiques.
- Lugol, qui colore en bleu les composés amyloïdes des parois ascales et en brun le glycogène.

b) Fixations, coupes à la paraffine, colorations.

L'étude précise de la structure du sclérote et des apothécies et du développement de ces dernières a été effectuée à partir de coupes sériées à la paraffine.

- plusieurs mélanges fixateurs ont été utilisés dans un but comparatif; leur choix s'est fait également en fonction des colorations prévues. Nous avons choisi des sclérotés mûrs sans spermatisation, des sclérotés spermatisés, des sclérotés portant des ébauches d'apothécies, et des apothécies.

Les échantillons sont fixés par immersion dans les liquides fixateurs. Ils ne sont pas passés sous vide, ce qui pourrait empêcher la réussite de l'inclusion. La fixation se poursuit à la température ambiante pendant un temps qui varie selon les fixateurs. Toute trace de fixateur est ensuite éliminée par rinçage (à l'eau ou à l'alcool selon le fixateur).

Les méthodes de fixation suivantes ont été utilisées :

*) Fixation selon WESTBROOK (1935)

Formule : formol neutre.....	6,5 ml
acide acétique cristallisable.....	2,5 ml
alcool éthylique à 50°.....	100 ml

Temps de fixation : 18 heures.

***) Fixation selon HELLY (in LANGERON, 1949)

Formule :

solution (1)	
bichromate de potassium ..	7,5 g
sulfate de sodium	3 g
eau distillée	100 ml

30 ml de solution (1) additionnés au moment de l'emploi de :

bichlorure de sodium 7 %	70 ml
formule neutre	5 ml

Temps de fixation : 3 à 4 heures.

Lavage : à l'eau.

- La fixation est suivie d'une déshydratation par l'alcool éthylique (alcool à 70°: 2 fois 15 minutes, alcool à 95°: 2 fois 30 minutes, alcool absolu: 3 fois 30 minutes, puis une nuit). On effectue ensuite une imprégnation par l'essence de cèdre, solvant de la paraffine, puis par la paraffine elle-même à 56°C (3 bains successifs répartis sur 3 jours).

L'inclusion définitive se fait dans la paraffine à 56°C: les échantillons y sont soigneusement orientés, de façon à obtenir des coupes perpendiculaires à la surface du sclérote ou des apothécies.

Les coupes de 7 mm d'épaisseur sont exécutées à l'aide d'un microtome de JUNG, collées sur des lames porte-objet, enduites d'eau albumineuse puis séchées à l'étuve .

Après séchage, elles sont déparaffinées (3 bains de toluène, 3 bains d'alcool à 95°), puis rincées à l'eau courante, et enfin colorées.

- Plusieurs colorations ont été utilisées. La plus fréquente est la double coloration hématoxyline ferrique-éosine.

Cette coloration est effectuée sur coupes de matériel fixé selon les deux méthodes utilisées. Les coupes sont immergées pendant 3 à 4 heures dans une solution aqueuse à 6 % d'alun de fer et d'ammonium qui permet le mordantage de la coloration par l'hématoxyline. Elles sont ensuite rincées et placées dans l'hématoxyline ferrique préparée selon la formule suivante :

hématoxyline	10 g
glycérine	100 ml
alcool absolu	100 ml
eau distillée	800 ml

Après 16 à 24 heures une régression de la coloration est obtenue par immersion des coupes dans une solution aqueuse à 3 % d'alun de fer et d'ammonium; cette régression est contrôlée pour chaque coupe sous le microscope et, en principe, s'appée lorsque les noyaux peuvent être repérés ou que les contenus cellulaires sont distincts.

Les coupes sont alors placées dans un bain d'éosine à 1 % dans l'eau distillée pendant 30 minutes, ce qui permet d'obtenir une coloration de fond facilitant l'observation.

Après coloration les coupes sont montées dans le baume du Canada et finalement observées à l'aide d'un microscope LEITZ. Pour l'étude ontogénique des apothécies la série complète des coupes d'une apothécie ou d'une ébauche en cours de développement est observée, mais les coupes axiales sont retenues pour être dessinées, à l'aide d'une chambre claire montée sur le microscope, ou photographiées (microscope LEITZ ORTHOLUX, films ILFORD, PANF 135 et Kodachrome, KR 135)

4) Techniques utilisées pour la microscopie électronique à balayage

L'étude précise de la surface des sclérotés et des apothécies a été effectuée en utilisant deux techniques différentes; la deuxième est très simple et moins longue, mais les deux techniques ont donné des résultats satisfaisants.

- Technique 1

a) Les échantillons sont fixés par imprégnation pendant 2 heures dans un mélange suivant :

glutaraldéhyde 7 % 1 vol.

eau distillée 2 vol.

Ensuite, on fait 3 lavages avec du tampon cacodylate, chaque fois 1 heure; les deux étapes sont effectuées sur glace (au réfrigérateur).

- b) Les échantillons sont post-fixés pendant 4 heures par l'acide osmique, ensuite rincés dans le tampon vernal 3 fois (chaque fois 10 minutes), et enfin rincés dans l'eau distillée pendant une nuit .
- c) La fixation est suivie d'une déshydratation par l'alcool éthylique (30°, 70°, 90°, et 100° absolu) chaque bain durant 10 minutes.
- d) Rinçage dans un bain d'alcool 100°.

- Technique 2

Ce technique a été mise au point par Robert A.Samson (1979).

- a) La fixation consiste en une imprégnation des échantillons pendant 5 heures par la glutaraldéhyde 7 % (sur glace).
- b) Rinçage dans l'eau distillée deux fois 10 minutes pour éliminer toute trace de fixateur.
- c) Déshydratation par le diméthoxy (2-2)propane pendant 10 minutes.
- d) Rinçage dans l'acétone 100 % deux fois 10 minutes.
- e) Imprégnation dans le diméthoxy (2-2)propane pendant une nuit .

Après la fixation, les échantillons sont passés au point critique et ensuite ils sont métallisés. Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (JEOL 840).

ANNEXE 2

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

- ARNAUD, G., et BARTHELET, J. 1936. - Les microconidies dans le genre *Sclerotinia*. Bull. Soc. Mycol. Fr. 52 : 63 - 79.
- BEAUVÉRIE, J., 1899. - Etudes sur le polymorphisme des champignons. Annales de l'Université de Lyon. Nouv. série. Fasc. 3
- BEAUVÉRIE, J., et GUILLIERMOND, A., 1903. - Etudes sur la structure du *Botrytis cinerea*. Zentr. Bakt. Parasitenkd., 10 : 275 - 281, 311 - 321.
- BELLEMÈRE, A., 1968. - Contribution à l'étude du développement de l'apothécie chez les Discomycètes Inoperculés. Thèse d'état. Faculté des sciences de Paris. N° 5967.
- BERGQUIST, R. R., et LORBEER, J. W., 1968. - Production of the perfect stage of *Botryotinia squamosa* under controlled environmental conditions. Phytopathology, 58 : 398.
- BERGQUIST, R. R., et LORBEER, J. W., 1972. - Apothecial production, compatibility and sex in *Botryotinia squamosa*. Mycologia, 64 : 1270 - 1281.
- BJÖRNLING, K., 1951. - Über die entwicklungsgeschichte, variabilität und pathogenität von *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. Phytopathol. Z. 18 : 129 - 156.
- BOUDIER, E., 1907. - Histoire et classification des Discomycètes d'Europe. Klincksieck édit., Paris.
- BRIERLEY, W. B., 1918 b. - The microconidies of *Botrytis cinerea*. Roy. Bot. Gard. Kew. Bull. Misc. Inform., 4 : 129 - 146.
- BROOKS, F. T., 1908. - Observations on the biology of *Botrytis cinerea*. Ann. Bot. (Lond.), 22 : 479 - 487.
- BUCHWALD, N. F., 1949. - Studies in the Sclerotiniaceae. I. Taxonomy of the *Sclerotiniaceae*, Arsskr. K. Vet. Landbohojsk. PP. 74 - 191.
- BUCHWALD, N. F., 1953. - *Botryotinia* (*Sclerotinia*) *globosa* sp. on *Allium ursinum*, the perfect stage of *Botrytis globosa* Raabe. Phytopathol. Z. 20 : 241 - 254.
- BULLOCK, S., ASHFORD, A. E., et WILLETTS, H. J., 1980. - The structure and histochemistry of sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger. II. Histochemistry of extracellular substances and cytoplasmic reserves. Protoplasma, 104 : 333.
- BUTLER, G. M., 1966. - Vegetative structures in the fungi, Vol. 2, PP. 83 - 112. New York and London : Academic press.

- CALONGE, F. D., 1970. - Notes on the ultrastructure of the microconidium and stroma in *Sclerotinia sclerotiorum*. Arch. Mikrobiol. 71 : 191 - 195.
- CHADEFAUD, M., 1960. - Les végétaux non vasculaires (Cryptogamie), Traité de Botanique. Masson édit., Paris.
- CHADEFAUD, M., 1965. - Sur le *Coryneum kunzei* corda. Bull. Soc. Mycol. Fr. 81 : 120 - 164.
- CHADEFAUD, M., 1982. - Les principaux types d'Ascocarpes. Cryptogamie, Mycologie. Volume 3; 103.
- COCHRANE, V. W., 1958. - Physiology of Fungi. Wiley New - York.
- COLEY - SMITH, J. R. et JAVED, Z. U. R., 1972. - Germination of sclerotia of *Botrytis tulipae*, the cause of tulip fire. Ann. Appl. Biol. 71 : 99 - 109.
- COLEY - SMITH, J. R., VERHOEFF, K. et JARVIS, W. R. 1980. - The biology of *Botrytis*. Academic press, London, pp. 318.
- COOKE, R. C., 1969. - Changes in soluble carbohydrates during sclerotium formation by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia trifoliorum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 53 : 77 - 86.
- CORNER, E. J. H., 1930. - Studies in the morphology of Discomycètes. Trans. Bri. Mycol. Soc. 15 : 107 - 134.
- DE BARY 1866. - Beitzage zur Morphol. Phys. Pilze. Reihe, 30.
- DE BARY 1869. - Ueber schimmel und hefa. In Virchow und Holtzendorf's samml. gemeinverst. Wiss. Vortr. Ser IV, 87, 1 - 78.
- DE BARY 1884. - Vergleichende, P. 263, Fig. 116.(cité par BEAUVÉRIE 1899).
- DE BARY 1886. - Ueber einige sclerotinien und sclerotienkrankheiten. Bot. Ztg. 44 : 377 - 387, 449 - 461, 465 - 474.
- DEMETRIADES, S. D., 1953. - Etudes sur la biologie du *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Masce. IV. L'utilisation de diverses sources d'azote. Ann. Inst. Phytopathol. Benaki, 7 : 27 - 35.
- DEHORTER, B., 1985. - Déterminisme et physiologie de la reproduction sexuée du *Nectria galligena*. Thèse doctorat ès sciences, Université des Sciences et Techniques de Lille. N° 628.
- DRAYTON, F. L., 1932. - The sexual function of the microconida in certain Discomycetes. Mycologia, 24 : 345 - 348.
- DRAYTON, F. L., 1934 a. - The sexual mechanism of *Sclerotinia gladioli*. Mycologia, 26 : 46 - 72.
- DRAYTON, F. L., 1934 b. - The gladiolus Dry rot caused by *Sclerotinia gladioli*. Phytopathology, 24 : 397 - 404.

- DRAYTON, F. L., 1937. - The perfect stage of *Botrytis convoluta*. Mycologia, 29 : 305 - 318.
- DRAYTON, F. L., et GROVES, J. W. 1952. - *Stromatinia narcissi*, a new, sexually dimorphic Discomycete. Mycologia, 44 : 119 - 140.
- DUMONT 1965. - M. Sc. thesis, cornell university - Ithaca, New York (cité par Coley-Smith 1980).
- DUNIWAY, J. M., STEADMAN, et ABAWI, G. S., 1977. - Influence of soil moisture on the production of apothecia by sclerotia of *Whetzelinia sclerotiorum*. Ann. Proc. Am. Phytopathol. Soc., 115.
- ELLERBROCK, L. A. et LORBEER, J. W., 1977. - Survival of sclerotia and conidia of *Botrytis squamosa*. Phytopathology, 67 : 219 - 225.
- ELLIS, M. B., 1971. - Dematiaceous Hyphomycetes. C. M. I., London. 608.
- ELLIOT. M. E., 1965. - Some factors in apothecium production of *Ciboria acerina* in darkness and light. Can. J. Bot. 43 : 641 - 645.
- FARETRA. F., et ANTONACCI, E., 1987. - Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. Phytopath. Medit. 26 : 29 - 35.
- FARETRA, F., ANTONACCI, E., et POLLASTRO, S., 1988. - Improvement of the method used for obtaining apothecia of *Botryotinia Fuckeliana* under controlled conditions. Annali di Microbiologia ed Enzimologia. 38. 29 - 40.
- FARETRA, F., ANTONACCI, E., et POLLASTRO, S., 1988. - Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, telemorph of *Botrytis cinerea*. J. G. Microbiol. 134, 2543 - 2550.
- FAYRET, J., 1975 - Etude du cycle de reproduction du *Gnomonia leptostyla*. Déterminisme et physiologie. Thèse Doct., Scien. Nat. Toulouse, n° 689.
- FUCKEL, K. W. G. L., 1869. - Symbolae mycologicae. Beiträge zur kenntnis der rheinischen pilze, wiesbaden. jahrb. Nassau. Ver. Naturk. 23 : 330.
- FUCKEL, K. W. G. L., 1870. - Symbolae mycologicae. Jahrbücher der Nassauischen Vereinus für Naturkunde. 23 - 24 : 330
- GEIGER, J. P., et GOUJON, M., 1970. - Mise en évidence dans les extraits de thalle d'un facteur morphogène responsable de l'apparition des sclérotos du *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi. C. R. Acad. Sci., Paris (Ser. D) 271 : 41 - 44.
- GOUJON, M., 1968. - Mise en évidence dans le mycélium du *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi, d'un facteur morphogénétique responsable de l'apparition des sclérotos. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris (Ser. D) 267 : 409 - 411.

- GOUYON, M., 1969. - Nature et synthèse du facteur morphogène responsable de l'apparition des sclérotés chez le *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi. C. r. hebdomadaire Séances Acad. Sci. Paris (Ser. D) 2195 - 2198.
- GOUJON, M., 1970. - Mécanismes physiologiques de la formation des sclérotés chez le *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi. *Physiol. Vég.* 8 : 349 - 360.
- GRINDLE, M., 1979. - Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* 111 : 109 - 120.
- GROGORY, P. H., 1941. - Studies on *Sclerotinia* and *Botrytis*. I. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 25 : 26 - 40.
- GROVES, J. W. et BOWERMAN, C. A., 1955. - *Sclerotinia borealis* in Canada. *Can. J. of Botany*, 33 : 591 - 594.
- GROVES, J. W., et DRAYTON, F. L., 1939. - The perfect stage of *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 31 : 485 - 489.
- GROVES, J. W., et LOVELAND, C. A., 1953. - The connexion between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 45 : 415 - 425.
- HANSEN, H. N., et SMITH, R. E., 1932 a. - An analysis of variation in *Botrytis cinerea* by single spore cultures. *Phytopathology*, 22 : 11.
- HANSEN, H. N., et SMITH, R. E., 1932 b. - The mechanism of variation in imperfect fungi : *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 22 : 953 - 964.
- HARADA, Y. et WATANABE, H., 1974. - Cultural studies on apothecial formation in *Sclerotinia sclerotiorum* (part I). *Bull. of the faculty of Agriculture. Hirosaki university.* N°. 22: 37 - 43
- HARADA, Y., 1977. - Studies on the Japanese species of *Monilinia* (*Sclerotiniaceae*). *Bull. faculty of Agriculture of Hirosaki university.* No. 17 : 80 - 109.
- HARRISON, J. G., et HEARGREAVES, A. J., 1977. - Production and germination of *Botrytis fabae* microconidia. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 69, 332 - 335.
- HARRISON, J. G., 1979. - *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72, 389 - 394 (cité par Coley -Smith 1980).
- HENNEBERT, G. L., et GROVES, J. W., 1963. - Three new species of *Botryotinia* on *Ranunculaceae*. *Can. J. Bot.* 41 : 341 - 365.
- HENNEBERT, G. L., 1973. - *Botrytis* and *Botrytis*- like genera, *Persoonia*, 7 : 183 - 204
- HENSON, L., et VALLEAU, W. D., 1940. - The production of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia trifoliorum* in culture. *Phytopathology*, 30 : 869 - 873.
- HEURBERGER, J. W., 1934. - Fruit - rotting sclerotinias. IV. A cytological study of *Sclerotinia fructicola* (wint.) Rehm. *Bull. Md. Agri. Exp. Stn.* 371.

- HILL, B. H. E., 1979. - Untersuchungen zur Resistenz von Reben gegenüber *Botrytis cinerea* Pers. Entwicklung einer Methode zur Resistenzprüfung. Diss. Univ. Hohenheim (cité par LORENZ et EICHHORN. 1983.).
- HINO, I., 1929. - Microconidia in the genus *Sclerotinia* with special reference to the conidial forms in the genus. Bull. Miyazaki, Coll. Agri. For. 1 : 67 - 90.
- HOLLY, L., 1974. - A *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. Mikrokonidiumainek kepzodese es szerepük az aszkogamiában. Agrobotanika, XV : 233 - 238.
- HONDA, Y. et YUNOK, K. T., 1975. - On spectral dependence for maturation of apothecia in *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 41 : 383 - 389.
- ISTVANFFI, G., 1905. - Etudes microbiologiques et mycologiques sur le rot gris de la vigne (*Botrytis cinerea* - *Sclerotinia fuckeliana*). Ann. Inst. Cent. Ampelol. R. Hong. 3 : 183 - 360.
- JARVIS, W. R., 1977. - *Botryotinia* and *Botrytis* species : taxonomy, physiology and pathogenicity. Res. branch Canada dep. agri., monograph No. 15.
- JOHN MASS et POWELSON, R. L., 1972. - Growth and sporulation of *Botrytis convoluta* with various carbon and nitrogen sources. Mycologia. 64 : 897 - 903.
- JONES, D., et GRAY, E. G., 1973. - Factors affecting germination of the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* from peas. Trans. Br. Mycol. Soc. 60 : 495 - 500.
- KAMOEN, O., 1963. - Influence of different concentrations of Carbo-Hydrates on sporulation and sclerotia - formation of two isolats of *Botrytis cinerea*. Verh. Rijkssta. PIZiekt. Gent. 18 : 1 - 16.
- KAMOEN, O., 1964. - Goei, sclerotienworming en sporulati van een *Botrytis cinerea* isolati uit vlsaad op culturbodems met verschillende N-bronnen en verschillende begin - pH. Verh. Rijkssta. PIZiekt. Gent 19 : 1 - 64.
- KHARBUSH, S., 1927. - Evolution nucléaire du *Sclerotinia fuckeliana* de Bary. Bull. Soc. Bot. Fr. 74 : 257 - 262.
- KHARE, K. B., BOMPEIX, G. et BASUCHAUDRY, K. C., 1981. - Factors affecting growth and sclerotial formation of *Sclerotinia minor* in vitro. Cryptogamie, Mycologie, Tome (2), 289 - 297.
- KLEIN, R. M. et KLEIN, D. T., 1962. - Interaction of ionizing and visible radiation in mutation induction in *Neurospora crassa*. Amer. J. of Botany, 49 : 870 - 874.
- KOSASIH, B. D., et WILLETTS, H. J., 1975 a. - Ontogenetic and histochemical studies of the apothecium of *Sclerotinia sclerotiorum*. Ann. Bot. 39 : 185 - 191.

- KOSASIH, B. D., et WILLETTS, H. J., 1975 b. - Types of abnormal apothecia produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycologia, 67 : 89 - 97.
- LAUBER, H. P., 1971. - Variabilität und kernverhältnisse bei *Botrytis cinerea*. Landwirtsch. Forsch. 10 : 1 - 64.
- LEACH, C. M., 1962. - Sporulation of diverse species of fungi under near - ultraviolet radiation. Can. J. Bot. 40 : 151 - 161.
- LEAL, J. A., BLANCO, B. et GOMEZ MIRANDA, B. 1979. - Ultrastructure of resting and germinated sclerotia of *Botrytis cinerea*. Trans. Br. Mycol. Soc. 72 (3) : 463 - 468.
- LE GAL et MANGENOT, F., 1960. - Contribution à l'étude des Mollisioïdées, III (2^e série). Revue de Mycologie, 25 : 135 - 214.
- LETHAM, D. B., 1975. - Stimulation by light of apothecial initial development of *Sclerotinia sclerotiorum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 65 : 333 - 335.
- LE TOURNEAU, D., 1979. - Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. Phytopathology, 69 : 887 - 889.
- LILLY V. G. & BARNETT H. L., 1951 - Physiology of Fungi. Mc Graw-Hill Book Comp. Inc. New-York, Toronto, London.
- LINDA M. KOHN 1979. - A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. Mycotaxon. IX (2) : 365 - 444.
- LINDNER, P., 1887. - Ueber Durchwachsungen an Pilzmycelien. (Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. Bd. V., P. 153
- LORENZ, D. H., et EICHHORN, K. W., 1983. - Untersuchungen an *Botryotinia fuckeliana* Whetz., dem perfektstadium von *Botrytis cinerea* Pers. Z. Pflkrankh. Pflschutz., 90 : 1 - 11.
- MARRAS, F. 1961. - *Sclerotinia minor jagger* parassita delle leguminose (pisello, lenticchio, cecee fagiolo) in Sardegna. Studi sassaresi, 9 : 13 pp.
- MASSEY, L. M., 1928. - Dry rot of *Gladiolus* corms. Phytopathology. 18 : 519 - 529.
- MATTIROLO, O. 1882. - Sullo sviluppo e sullo sclerozio della *Peziza sclerotiorum* (Lib.). Memoria del dott. oreste. Estratto dol nuvo Giornale Botanico Italiano, Vol. XIV, N. 3, Luglio 1882.
- MENZINGER, W., 1966a. - Zur variabilität und taxonomie von arten und formen der gattung *Botrytis* Mich. I. Untersuchungen zur kulturbedingten variabilität morphologischer eigenschaften von formen der gattung *Botrytis*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. 120 : 141 - 178.
- MILOSLAV REHCIGL, 1978. - Diets, culture media, food supplements. Section G. volum 3, culture media for microorganism plants. P. 439.

- MIRANDA - GOMEZ et LEAL, J. A., 1979. - Chemical composition of *Botrytis cinerea* sclerotia. Trans. Br. Mycol. Soc. 73 (1) : 161 - 164.
- MORRALL, R. A. A., 1977. - A preliminary study of the influence of water potential on sclerotium germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Bot. 55 : 8 - 11.
- NAJIM, L., 1987. - Contrôle morphogénétique de la différenciation des sclérotos de *Sclerotinia fructigena*, Cryptogamie, Mycol. 8 (3) : 209 - 217.
- NATALYINA 1963. - Cité par Vanev 1966.
- NEES 1817. - Cité par Viennot-Bourgin 1949.
- NONAKA, F., et MORITA, A., 1967. - *Botrytis cinerea* Persoon. I. On the cultural properties. Agric. Bull. Saga Univ. 24 : 93 - 107.
- NORTON, J. B. S., EZEKIELW. N., et JEHLE, R. A., 1923; - Fruit - rotting sclerotinia. I. Apothecia of brown rot fungus. Bull. Md. Agri. Exp. Stn. 256.
- NOVIELLO, C., 1962. - Una nuova malattia del ficus elastica causato da una *Botrytis* del tipo *cinerea*. Mycopathol. Mycol. App. 16 : 133 - 164.
- PAUL, W. R. C., 1929. - A comparative morphological and physiological study of a number of strains of *Botrytis cinerea* Pers. with special reference to their virulence. Trans. Br. Mycol. Soc. 14 : 118 - 135.
- PEIRIS, J. W. L., 1947. - The *Botrytis* disease of gladiolus together with a physiological study of certain *Botrytis* species, thesis ph.D. Univ. of London.
- PERSOON, C. H., 1801. - Synopsis methodica fungorum. H. Dieterich, Göttingen.
- PHILLIPS, D. J., MARGOSAN, D. A et MECKEY, B. E., 1986. - Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* after periods of conditioning in soil. J. Phytopathology, 116 : 246 - 258.
- PHILLIPS, D. J., MARGOSAN, D. A. et MECKEY, B. E., 1987. - Size, nuclear number and aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations, Phytopathology, 77 : 1606 - 1608.
- POLACH, F. J. et ABAWI, G. S., 1974. - The perfect stage of *Botryotinia fuckeliana* in New York bean fields and in culture. Proc. Am. Phytopathol. Soc. 1 : 41.
- POLACH, F. J. et ABAWI, G. S., 1975. - The occurrence and biology of *Botryotinia fuckeliana* on beans in New York. Phytopathology, 65 : 657 - 660.
- RAMSEY, G. B., 1925. - *Sclerotinia* species causing decay of vegetables under transit and market conditions. J. Agri. Res. 31 : 597 - 632.

- REIDEMEISTER, W., 1909. - Die bedingungen der sklerotien und sklerotienbildung von *Botrytis cinerea* auf künstlichen nährböden. Ann.Mycol. 7: 19 - 44.
- ROBERT, A. SAMSON. JOOST A. et WOUTER, V.1979. - A simplified technique to prepare fungal specimens for scanning electron microscopy. Cytobios, 24: 7 - 11.
- SAITO, I., 1969. - Effect of some nutritional conditions on the formation and germinability of sclerotia. Bull. of Hokkaido prefectural agricultural experiment station. No. 19.
- SAITO, I., 1973. - Initiation and development of stipe primordia in *Sclerotinia sclerotiorum*. Trans. Mycol. Soc. Japan, 14 : 343 - 351.
- SAITO, I., 1977. - Studies on the maturation and germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a causal fungus of bean stem rot. Rep. Hokkaido prefect. Agri. Exp. Stn. 26
- SCHLÖSSER, U. G., 1970. - Über förderung und erholtung der sporulation in einer kultursammlung parasitischer pilze von gramineen chersch langwelliges uv - licht. Phytopathologische Zeitschrift, 68 : 171 - 180.
- SINGH, U. P. et SINGH, R. B., 1984. - Effect of different substrata on the production of apothecia in *Sclerotinia sclerotiorum*. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz, 91 : 236 - 238.
- SMITH, L., 1903. - A disease of the gooseberry. J. Bot. XLI, 19 -23.
- TAKAHASHI, S., et KAGAYA, M., 1969. - Studies on the Monilia disease of the apple trees caused by *Sclerotinia mali* Takahashi. I. Effects of low temperature treatment of sclerotia on apothecial production. Bull. Akita fruit-tree. Exp. Sta. 1 : 21 - 46.
- TAN, K. K. et EPTON, H. A. S., 1973. - Effect of light on the growth and sporulation of *Botrytis cinerea*. Trans. Br. Mycol. Soc. 61 : 145 - 157.
- TAN, K. K., 1975. - Interaction of near-ultraviolet, blue, red and far red light in sporulation of *Botrytis cinerea*. Trans. Br. Mycol. Soc. 64 (2) : 215 - 222.
- TEO, B. K. et MORRAL, R. A. A., 1985. - Influence of matrix potentials on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. I. Development of an inclined box technique to observe apothecium production. Can. J. Plant. Pathol. 7 : 359.
- TEO, B. K. et MORRAL, R. A. A., 1985. - Influence of matrix potentials on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. II. A comparison of results obtained with different technique. Can. J. Plant. Pathol. 7 : 365.
- TERUI, M. et HARADA, Y., 1966. - Apothecial production of *Monilinia fructicola* on artificial media. Trans. Mycol. Soc. Japan. 7 : 309 - 311.

- TERUI, M. et HARADA, Y., 1971. - On the microconidia of the brown rot fungus *Monilinia fructicola* of fruit trees. Bull. of faculty of agriculture, Hirosaki university. No. 17 : 59 - 69.
- TOWNSEND, B., 1952. - The morphology and physiology of the sclerotia and rhizomorphs of certain fungi. Doctoral Thesis, University of Bristol.
- TOWNSEND, B. et WILLETTS, H. J., 1954. - The development of sclerotia of certain fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 37 : 213 - 221.
- TOWNSEND, B. 1957. - Nutritional factors influencing the production of sclerotia by certain fungi. Ann. Bot. (Lond.), 21 : 153 - 166.
- TREVETHIEK et COOK 1971. - Effet of metabolic inhibitors and sulphur-containing amino acids on sclerotium formation in *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium delphinii* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 57 (2).
- TU, J. C., 1982. - Membranous film on the developing apothecium of *Sclerotinia sclerotiorum* and its relationship to ascospore discharge. Can. J. Bot. 60 : 173 - 178.
- TULASNE, L. R., 1853. - (*Peziza benesuada*). Ann. Sci. Nat., 3^e série, 20.
- VANEV, S. 1966. - Bioekologie prouchvaniya vurkhu *Botrytis cinerea* Pers. prichinitel na sivoto gnienne na grozdeto. II. Formirane i prorastvane na sklerotsiite. Izv. Bot. Inst. Bulg. Akade. Nauk, 16 : 183 - 204.
- VANEV, S. 1972. - Morphological variability of *Botrytis cinerea* Pers. under different cultural conditions. Izv. Bot. Inst. Bulg. Akad. Nauk, 22 : 193 -201.
- VEGA, R. R., CORSINI, D. et LE TOURNEAU, D., 1970. - Nonvolatile organic acids produced by *Sclerotinia sclerotiorum* in synthetic liquid media. Mycologia, 62 : 332 - 338.
- VIENNOT - BOURGIN, G., 1949. - Les champignons parasites des plantes cultivées. P. 686 - 703.
- WANG, J. A. L., et LE TOURNEAU, D., 1967. - The effect of carbohydrates on mycelial growth and sclerotial production by *Sclerotinia sclerotiorum* (Abst.), Phytopathology, 57 : 1010.
- WANG, J. A. L., et LE TOURNEAU, D., 1971. - Carbon sources growth sclerotium formation and carbohydrate composition of *Sclerotinia sclerotiorum*. Arch. Mikrobiol, 80 : 219 - 233.
- WANG, J. A. L., et LE TOURNEAU, D., 1972. - Amino acids as nitrogen for growth and sclerotium formation in *Sclerotinia sclerotiorum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 59 (3), 509 - 512.
- WEBSTER, J., 1970. - Introduction to fungi. University Press, Cambridge. 549.

- WHETZEL, H. H., 1945. - A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae* a family of stromatic inoperculate Discomycetes. *Mycologia*, 37 : 648 - 714.
- WILLETTS, H. J., 1968 a. - Factors influencing the production of stromata and microconidia by *Sclerotinia fructicola*. *Ann. Bot.* 32 : 219 - 232.
- WILLETTS, H. J., 1968 b. - The development of stroma of *Sclerotinia fructicola* and related species, I. in culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 51 : 625 - 632.
- WILLETTS, H. J., 1968 c. - The development of stromata of *Sclerotinia fructicola*, II. in fruits. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 51 : 633 - 642.
- WILLETTS, H. J., 1969. - Structure of outer surfaces of sclerotia of certain fungi. *Arch. Mikrobiol.* 69 : 48 - 53.
- WILLETTS, H. J., 1972 - The morphogenesis and possible evolutionary origins of fungal sclerotia. *Biol. Rev.* 47, 515 - 536.
- WILLETTS, H. J., et WONG, J. A. L., 1980 - the biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia trifoliorum* and *Sclerotinia minor* with emphasis on specific nomenclature. *Bot. Rev.* 46 : 101 - 165.
- WILLETTS, H. J., et HARADA, Y., 1984 - A review of apothecial production by *Monilinia* fungi in Japan. *Mycologia*, 76 (2) : 314 - 325.
- WILLIAMS, G. H. et WESTERN, J. H., 1965. - The biology of *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. and other species of sclerotium - forming fungi, I. Apothecium formation from sclerotia. *Ann. Appl. Biol.* 56 : 253 - 260.
- WILLIS, C. B., 1968. - Effect of various nitrogen sources on growth of *Sclerotinia*. *Can. J. Microbiol.* 14 : 1035 - 1037.
- YOSHIHISA, S., 1989. - Environmental factors regulating tow germination modes of lateral - type sclerotia in *Botrytis cinerea*. *Trans Mycol. Soc. Japan*, 30 : 219 - 230.
- ZOBERI, M. H., 1980. - Some nutritional factors regulating formation of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Can. J. Bot.* 58 : 2484 - 2490.

PLANCHES

Planche 1

- Cliché 1 : microconidiogénèse (un microconidiophore). X 4300.
- Cliché 2 : surface d'une apothécie adulte. des asques (a), des ascospores (as) et des paraphyses (p). X 2700.
- Cliché 3 : surface d'une disquette (phialides microconidiogènes à la surface d'un apothécie). X 1000.
- Cliché 4 : formation des microconidies par des sclérotés. X 650.
- Cliché 5 : pore circulaire au sommet du stipe que vient de s'ouvrir (stade 5 du développement des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*). X 750.
- Cliché 6 : très jeune apothécie avec un voile membraneux recouvrant l'hyménium. X 1000.
- Clichés 7 et 8 : sommet d'un stipe (stade 4 du développement des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*). cliché 7, X. 850; cliché 8, X. 1200.
- Clichés 9 et 10 : début de la formation du stipe et l'apparition à la surface de sclérote (stade 3 du développement des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*). cliché 9, X. 450; cliché 10, X. 350.
- Clichés 11 et 12 : développement d'un stipe (stade 4 du développement des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*). cliché 11, X. 250; cliché 12, X. 180.
- Cliché 13 : disposition en disquettes des phialides sur la surface d'un apothécie. X. 33.
- Cliché 14 : début du renflement de l'extrémité du stipe (stade 5 du développement des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*). X. 170.

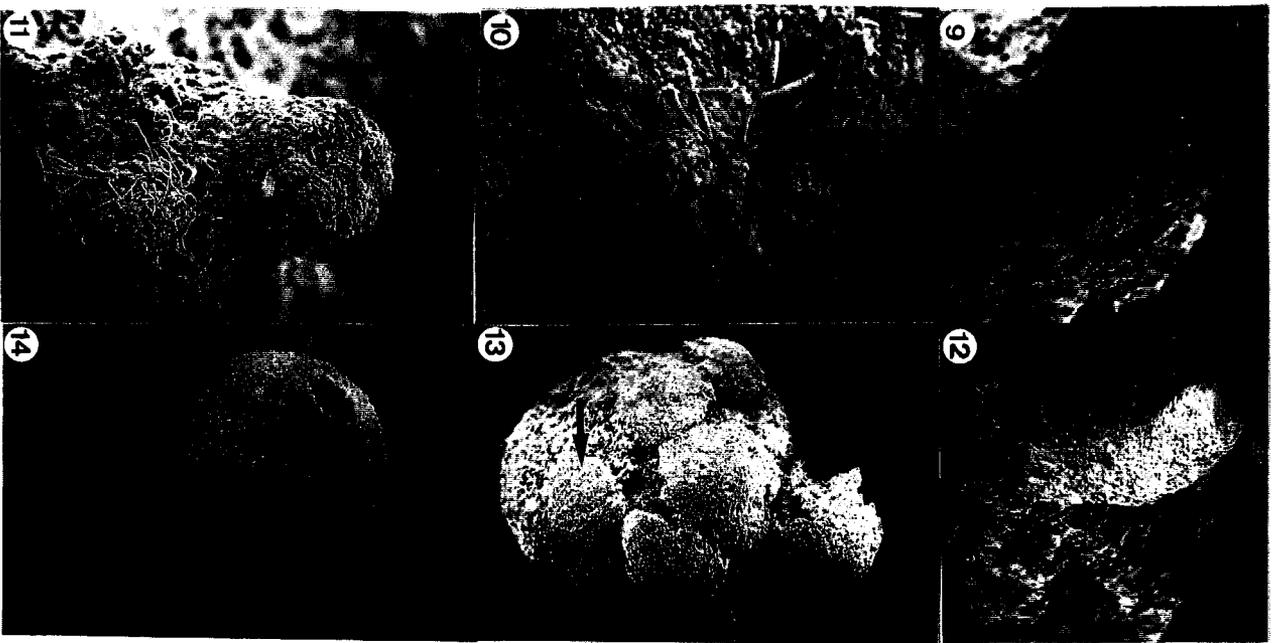
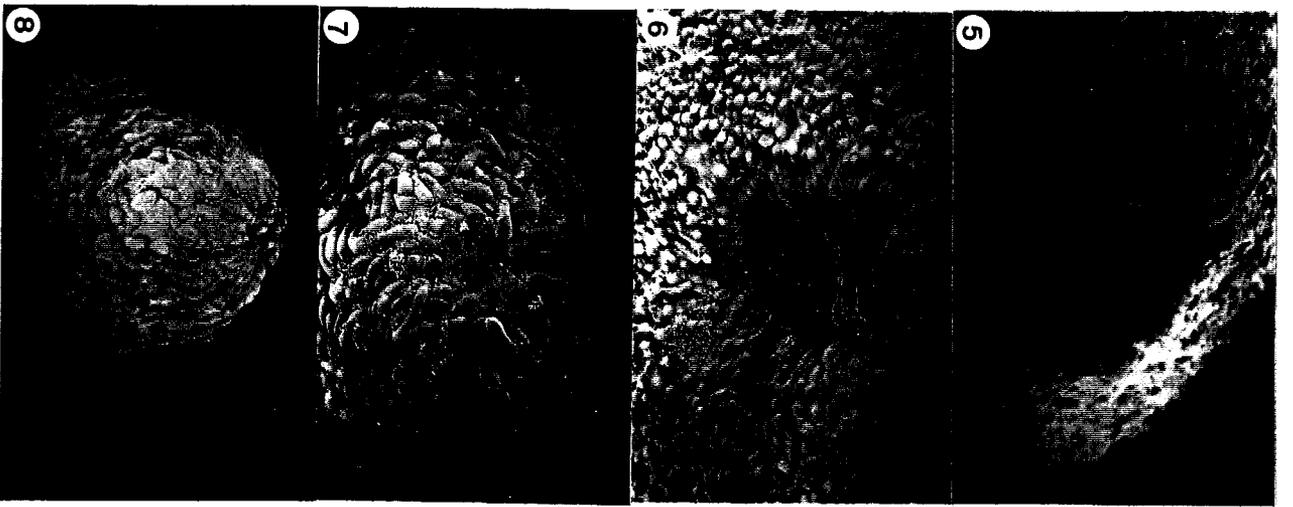
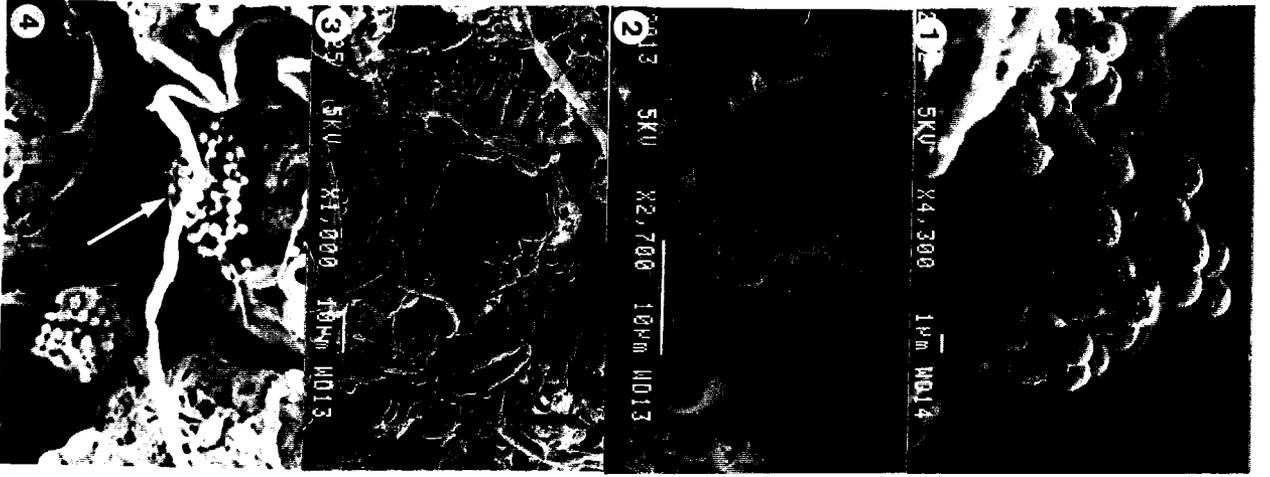
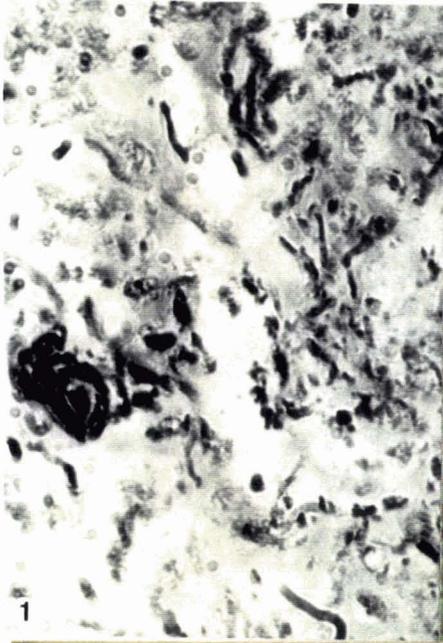


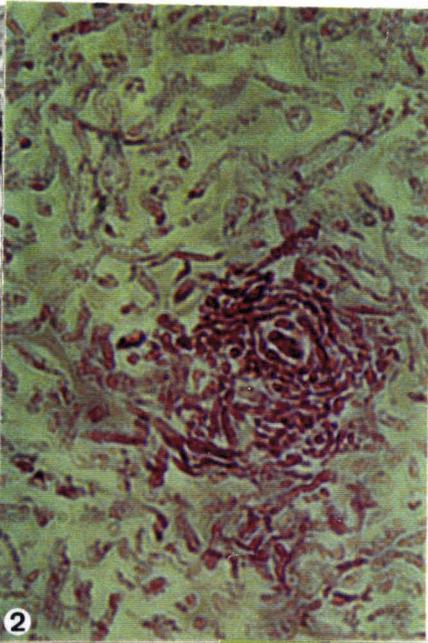
Planche 2

- Photo 1 : stade (1) du développement des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*. X. 1250.
- Photo 2 : stade (2) du développement des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*. X. 1250.
- Photo 3 : stade (3) du développement des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*. X. 1250.
- Photo 4 : stade (4) du développement des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*. X. 1250.
- Photo 5 : stade (5) du développement des apothécies de *Botryotinia fuckeliana*. X. 800.

BU
LILLE



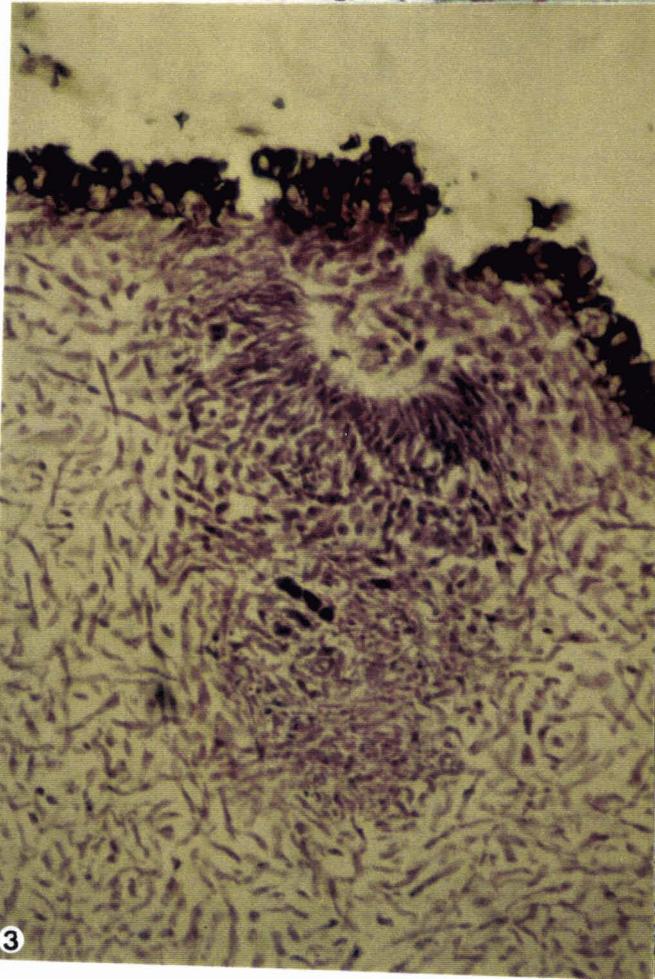
1



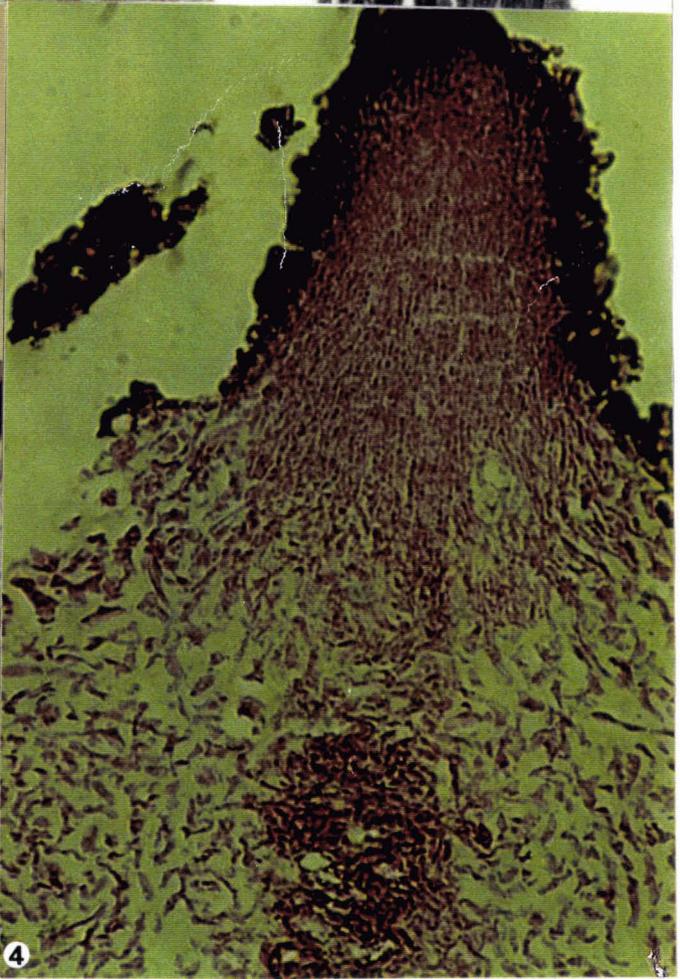
2



5



3



4

Planche 3

- Photo 6 : stade (6) du développement des apothécies de *Botryotinia fucheliana*
- Photo 7 : Asques; a et b deux jeunes asques; c, asque mûr avec 8 ascospores; d, asque vide. X. 500.
- Photo 8 : Coupe longitudinale d'un sclérote traité pendant 1 mois à -20°C; ce, cortex externe; md, médulla dense; f, film de cellules mortes; w, nouvelle couche corticale inférieure. X. 500.
- Photo 9 : Coupe longitudinale d'un sclérote traité pendant 1 mois à -10°C; ce, cortex externe; ci, cortex interne; md, médulla dense; t, médulla lâche après sa transformation en une couche médullaire dense; f, film de cellules mortes. X. 320.
- Photo 10 : Formation des apothécies dans un tube de culture.

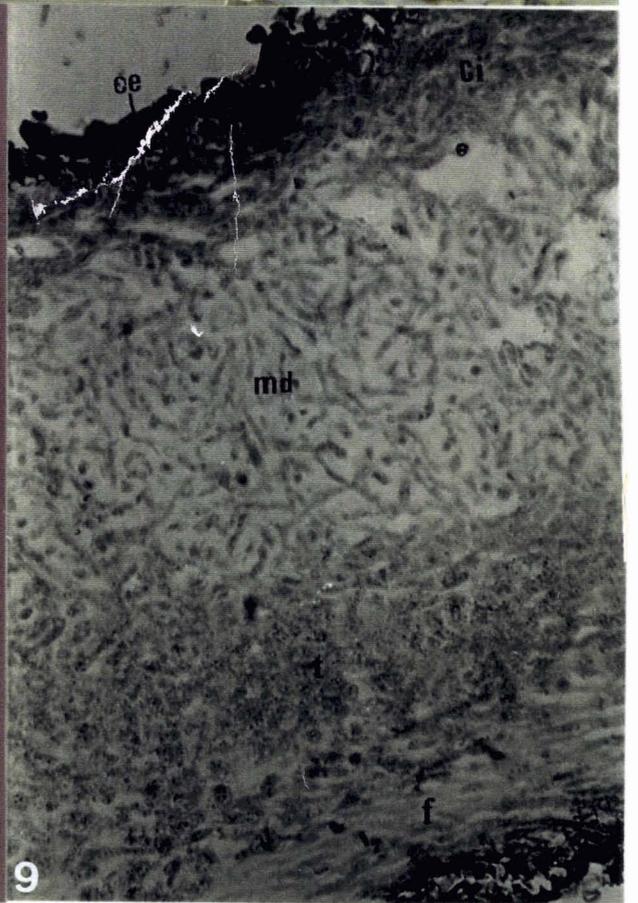
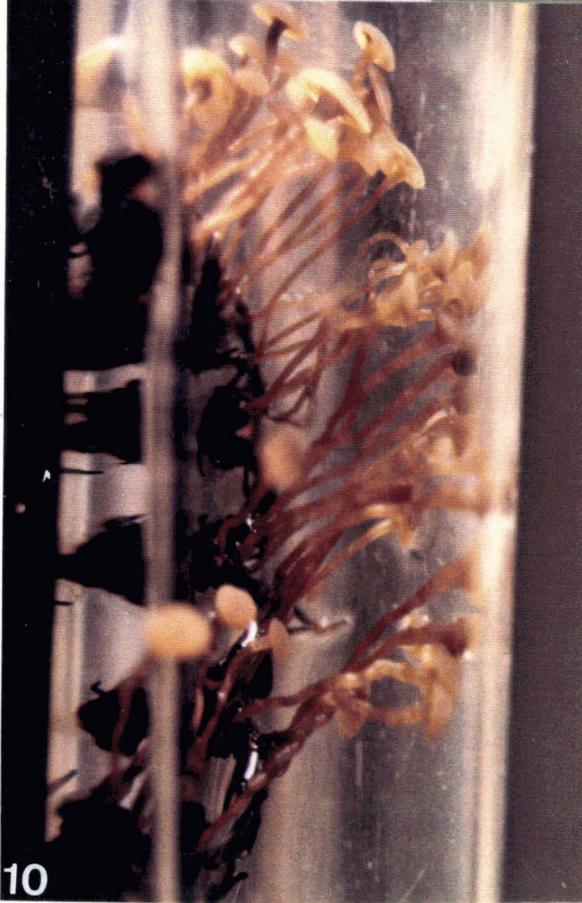
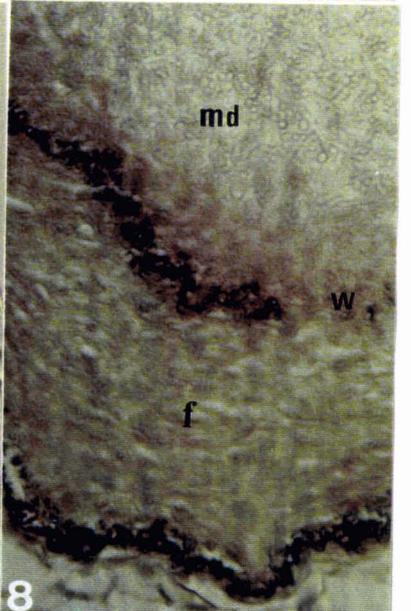
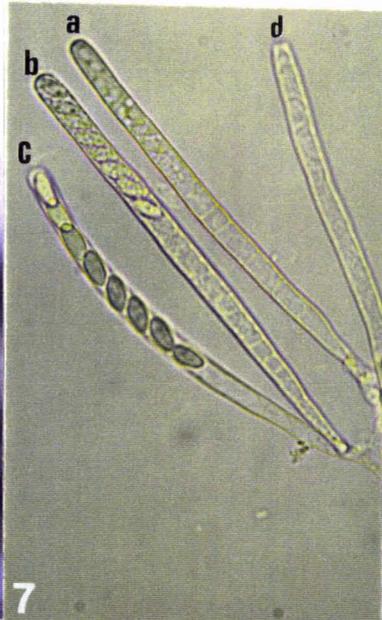
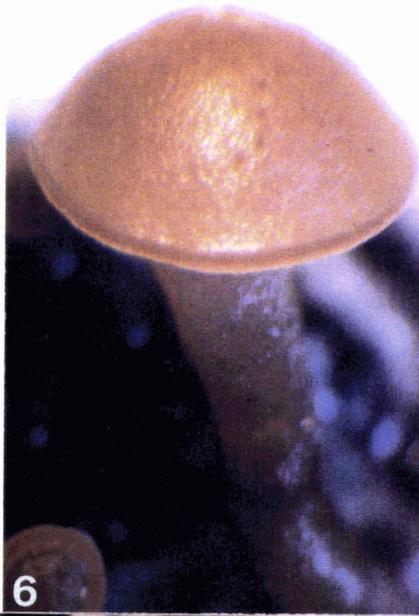
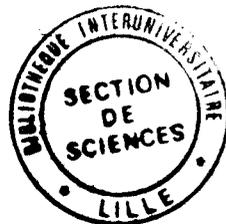
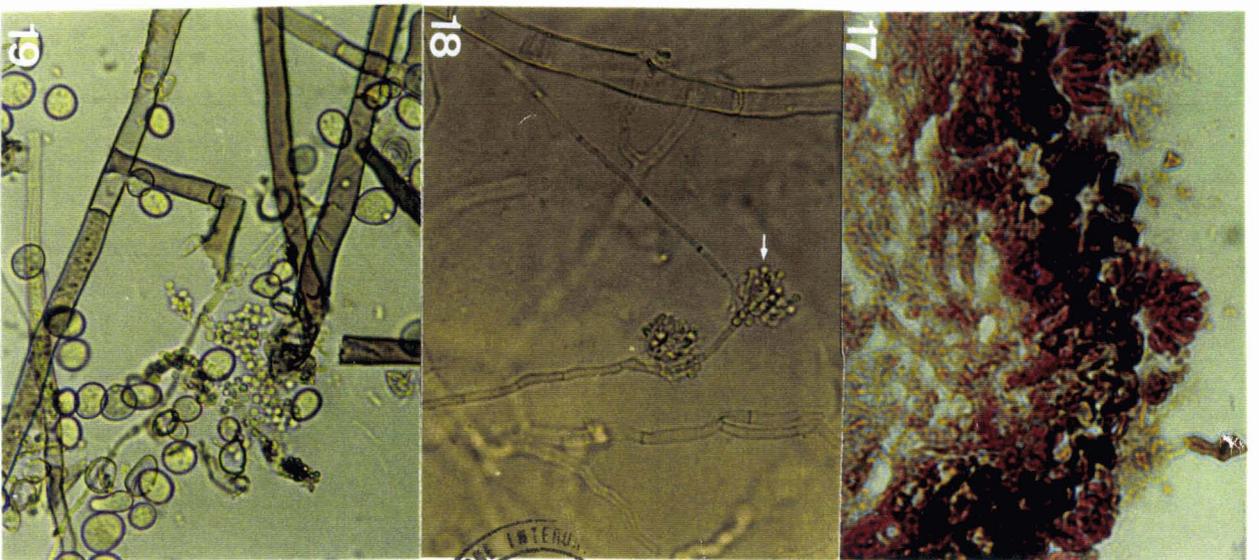
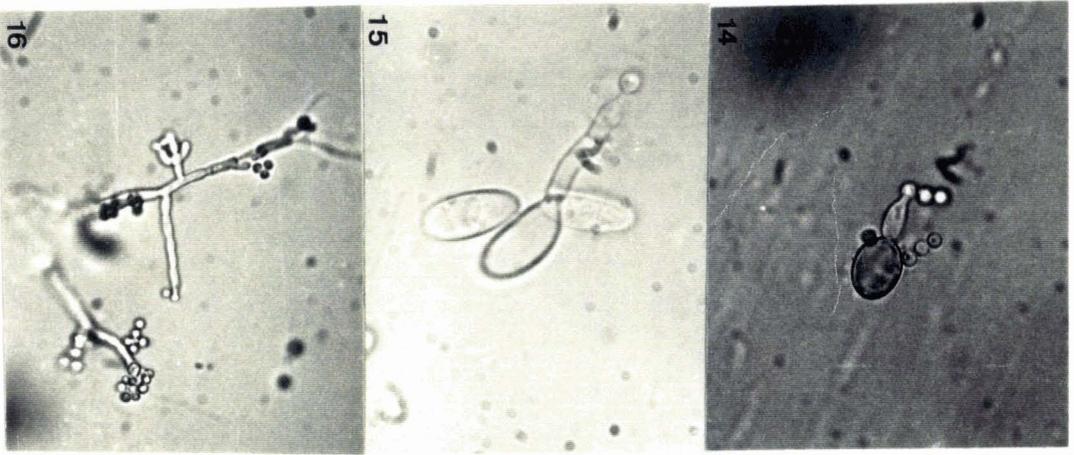
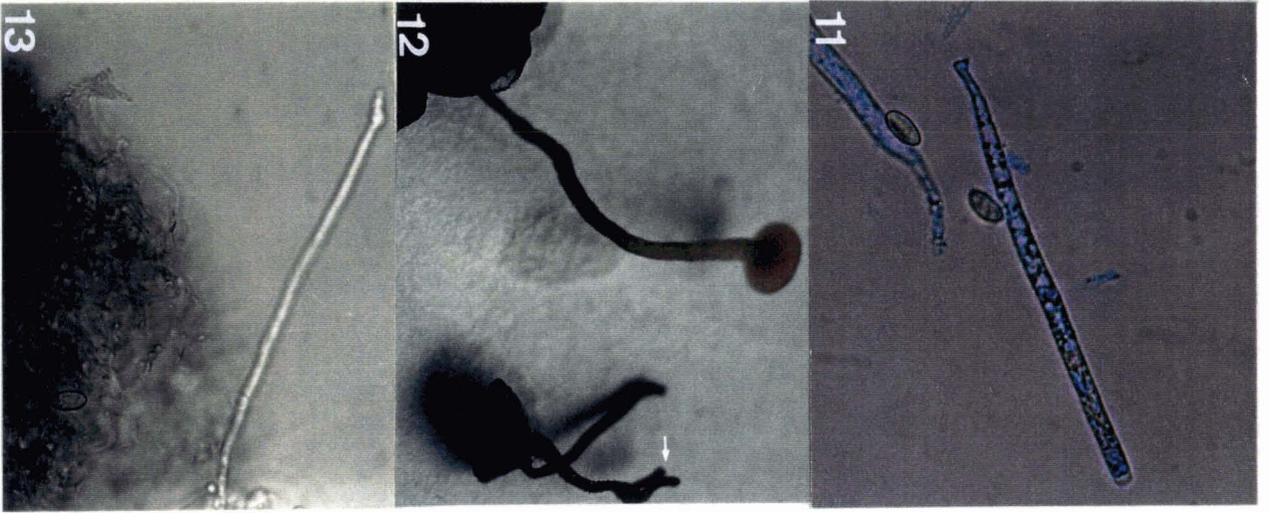


Planche 4

- Photo 11 : jeune asque avec son appareil apical. X. 320.
- Photo 12 : Formation de deux apothécies sur un seul stipe.
- Photo 13 : Formation de microconidies sur le sommet d'une paraphyse. X. 320.
- Photo 14 : Formation des microconidies par des conidies. X. 1250.
- Photo 15 : Formation des microconidies par des ascospores. X. 1250.
- Photo 16 : Formation des microconidies par du mycélium. X. 500.
- Photo 17 : Coupe d'un sclérote montrant des microconidiophores à la surface. X. 500.
- Photo 18 : Aspect d'hyphes microconidiennes portant des microconidiophores. X. 500.
- Photo 19 : Aspect général des hyphes microconidiennes mêlés à des hyphes végétatives de *Botrytis cinerea*. X. 500.





UNIVERSITÉ INTERNATIONALE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

Résumé

Le *Botrytis cinerea*, anamorphe du *Botryotinia fuckeliana* est l'agent de "la pourriture grise" de nombreuses plantes et de la vigne en particulier. Le cycle biologique de cet organisme implique une multiplication directe par conidies et un processus sexué dans lequel interviennent des sclérotés sur lesquels se forment des apothécies et des microconidies ou des spermaties assurant la fécondation.

Un recensement des connaissances acquises quant à ce cycle montre l'existence de grandes disparités entre les résultats rapportés. Nous avons essayé de définir les conditions optimales d'obtention des différents phases du cycle afin de mieux connaître la biologie de ce parasite.

L'ouvrage que nous présentons comporte essentiellement 2 parties :

- Dans la première partie, nous avons étudié différents milieux de culture sur lesquels le *Botrytis cinerea* est capable de se développer. Nous avons ensuite défini les modifications de la composition de ces milieux qui permettent d'obtenir préférentiellement du mycélium, des conidies, des sclérotés ou des microconidies.

Il existe des souches produisant préférentiellement des microconidies ou des sclérotés nous les avons utilisées spécifiquement afin d'étudier les processus d'initiation et de développement des apothécies.

- Dans la deuxième partie du travail, nous avons effectué en microscopie photonique et microscopie à balayage une étude cytologique approfondie des différentes étapes de la phase sexuée. Elle a permis d'établir le mode de formation des microconidies et de mettre en évidence la présence de l'ascogone à l'intérieur d'un sclérote.

Une étude approfondie de la reproduction sexuée du *Botryotinia fuckeliana*. Dans cette partie, nous avons étudié la nécessité de la spermatisation, et d'une vernalisation pour induire la formation des apothécies et leur développement.

Des expériences ont été tentées avec différentes fractions de l'organisme susceptibles de fournir des noyaux pour la fécondation des ascogones; elles ont montré que seules les spermaties étaient capables d'assurer la fécondation.

L'ensemble de l'ouvrage présenté correspond à une mise à jour et une homogénéisation des connaissances relatives au cycle sexué de *Botryotinia fuckeliana*.

MOTS CLES:

Spermatisation	Ascogone
Cycle sexué	Apothécies
Microconidiogenèse	<i>Botryotinia fuckeliana</i>