

Etude de la formation des périthèces de *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) von Arx et Olivier en milieu artificiel et mise au point d'une technique d'immersion des cultures pour leur formation induite

Autor(en): **Gindrat, Daniel**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **76 (1966)**

PDF erstellt am: **10.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-53568>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Etude de la formation des périthèces de *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) von Arx et Olivier en milieu artificiel et mise au point d'une technique d'immersion des cultures pour leur formation induite

Par *Daniel Gindrat*

Stations fédérales d'essais agricoles, Lausanne, et Institut de botanique générale, Université de Genève

Manuscrit reçu le 8 mars 1966

I. Introduction

L'obtention, en culture pure et en milieu synthétique, des périthèces de *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) von Arx et Olivier (= *Ophiobolus graminis* Sacc. = *Linocarpon cariceti* B. et Br.), agent du piétin-échaudage des céréales, est, au moins, d'une quadruple utilité:

1. Réalisation de suspensions stériles d'ascospores en quantités suffisantes pour des inoculations artificielles ou des recherches de physiologie de la nutrition.
2. Etudes aisées de la cytologie de la morphogenèse des formes sexuelles.
3. Possibilités accrues de recherches d'ordre génétique.
4. Etude de la physiologie de la reproduction sexuée.

Les infections artificielles de grains de blé vivants donnent généralement lieu à une abondante formation de périthèces sur les racines et collets des plantules, et c'est là une méthode utilisée pour obtenir des ascospores destinées à des études de virulence ou de génétique (Garrett, 1939, Padwick, 1939, White, 1939, Brooks, 1964 et 1965).

Jusqu'à ces dernières années, lorsque les auteurs ont tenté d'obtenir rapidement et régulièrement des périthèces en cultures pures sur milieux gélosés, ils ont souvent échoué et n'ont observé que fort sporadiquement des formations sexuées, les fructifications apparaissant très irrégulièrement selon les souches utilisées. Relevons toutefois les succès de Davis (1925), Foëx et Rosella (1930), Russell (1934), Bussmann (1936), et prenons note des échecs de Défago (1942), Gilpatrick et Henry (1949), White et Zogg. Bussmann (1936) remarque une rapide dégénérescence de ses souches «fertiles» qui perdent, sur agar à la farine d'avoine, leur pouvoir de différenciation sexuelle spontanée en un mois à deux ans de culture.

Selon Henry (1961), F.R. Davies obtient dès 1932 des périthèces de *G. graminis* dans des cultures contaminées par une bactérie. Le même auteur et ses collaborateurs répètent et confirment cette expérience et démontrent que d'autres micro-organismes, dont certains champignons, détiennent, généralement en association, la propriété d'induire la formation de fructifications de *G. graminis* (Davies, Henry, Jackson et Gilpatrick, 1948).

Un grand progrès semblait avoir été réalisé lorsque Weste et Thrower (1963) démontrèrent que *G. graminis* différencie périthèces et microconidies en milieu synthétique gélosé défini, dans des conditions d'éclairage bien déterminées.

De surcroît, l'incubation de cultures pendant sept jours sur milieu à l'agar glucosé à la pomme de terre et exposées en alternance à la lumière ultraviolette proche et à l'obscurité (phases de douze heures) induit des fructifications (Leach, 1964). Brooks (1965) confirme ces observations.

Ces trois dernières références montrent bien que la lumière joue un rôle prépondérant dans l'apparition des périthèces de *G. graminis*.

Afin de tester la fertilité de souches ayant été l'objet de recherches physiologiques (Gindrat, 1965), de vérifier certaines données sur la sexualité et d'en établir éventuellement d'autres, nous nous sommes livrés à quelques sondages ayant pour but de déterminer quelle était la méthode la plus simple conduisant à l'obtention relativement rapide d'abondantes fructifications de *G. graminis* isolé en Suisse.

II. Matériel

Certaines souches utilisées ont été décrites précédemment (Gindrat, 1965) et sont désignées par les N^{os} 404 et 375. Dès l'obtention des périthèces de la seconde souche, celle-ci fut abandonnée dans ces recherches, et nous nous sommes alors bornés à l'emploi du N^o 404 dans la majorité de nos essais.

Pour vérifications accessoires, nous citerons plus loin les souches suivantes :

406: isolée d'ascospores provenant de blé d'automne Probelle en 1964 à Landecy (Genève).

410: isolée d'ascospores provenant de blé d'automne Cappelle en 1964 à Landecy (Genève).

412: isolée d'ascospores provenant de blé d'automne Probus en 1964 à Sézenove (Genève).

447: isolée d'ascospores provenant de blé d'automne Probus en 1965 à Bofflens (Vaud).

Les souches sont conservées sur un milieu à l'extrait de malt (Dr A. Wander, Berne) 2% - agar 2%, le pH étant fixé à 5,5.

L'inoculation des milieux sur lesquels la fertilité du champignon est testée s'effectue à partir de cultures en tubes à essais de quinze jours.

III. Résultats

1. Essais sur la plante-hôte

Des périthèces sont aisément obtenus en infectant des semences de blé selon la méthode décrite par Plasman (1954) (souches 375, 404, 406, 410, 412 et 447); les fructifications sont visibles sur les racines des plantules attaquées après trente jours de culture. De même, des cultures en flacons Erlenmayer de la souche 404 sur de la paille de blé Probus doublement stérilisée trente minutes à 120 °C à l'autoclave, et très légèrement humectée d'eau distillée stérile, présentent des périthèces sur les tiges et les feuilles en paille, ainsi que sur les parois des flacons, après quarante-cinq jours d'incubation aux conditions du laboratoire. Relevons que l'humidité des flacons joue un rôle important dans la vitesse de croissance du champignon : une humidité trop faible ou trop élevée inhibe tout développement.

Nous disposons ainsi d'une première méthode d'obtention stérile des périthèces de *G. graminis*, mais elle n'est guère avantageuse pour des études précises, le substrat étant chimiquement complexe et les fructifications peu aisément manipulables stérilement.

2. Essais en plaques de Petri en milieux semi-synthétiques

Nous n'avons jamais observé de périthèces (souches 375, 404 et 406) en incubant les cultures au laboratoire ou sous un dispositif offrant un éclairage et une température en accord avec ceux de Weste et Thrower (1963), c'est-à-dire de 700 à 2500 lux fournis par des tubes fluorescents Philips TL 40W/33, température fixée à 22 °C, que l'illumination soit permanente ou alternée avec des phases d'obscurcissement (phases de douze heures), dès l'inoculation ou après un séjour d'une semaine à l'étuve obscure (22 °C). Les milieux envisagés sont : malt-agar (voir plus haut), farine de pois 1% - malt 1% - agar 2%, extrait de pomme de terre (réalisé au laboratoire) 1% - glucose 1% - agar 2%. Le pH choisi est 5,5; il s'agit de la valeur optimale pour la croissance de *G. graminis*, telle que nous l'avons précisée antérieurement (Gindrat, 1965).

3. Essais avec une bactérie isolée de la rhizosphère du blé

Inspirée des résultats de Davies et al. (1948), cette expérimentation est menée avec la souche 412 de la manière suivante :

Lors de l'isolement de cette souche, des ascospores sont prélevées dans des périthèces recueillis sur des racines de blé malade et écrasés dans une goutte d'eau distillée stérile; elles sont donc souillées de spores bactériennes, éventuellement fongiques, présentes dans la rhizosphère de la céréale. Ces ascospores sont déposées individuellement sur un milieu malt-agar, dans des boîtes de Petri, et laissées en incubation aux conditions du laboratoire. Les spores germent extrêmement facilement et, après quelques jours, une légère tache mycélienne s'observe à leur emplacement. Toutefois, ce mycélium est le plus souvent accompagné de colonies bactériennes, parfois fongiques, issues des spores contaminant les périthèces primitifs d'isolement. Nous obtenons finalement des cultures mixtes de *G. graminis* et d'autres micro-organismes tels que des bactéries ou des champignons des genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, etc. Après une vingtaine de jours d'incubation, certaines plaques présentent de petites colonies bactériennes plus ou moins circulaires et donnant l'aspect de petites gouttes crémeuses à la surface du mycélium de *G. graminis*. L'observation de ces plages, où le champignon paraît être le commensal de la bactérie, à la loupe révèle de nombreux périthèces mûrs ou en voie de maturation, visibles d'ailleurs à l'œil nu (fig. 1), différenciés par des hyphes englués dans les colonies bactériennes. Il s'agit ici d'un phénomène se déroulant sous un effet de contact entre les deux micro-organismes. Les microconidies sont également présentes, mais réparties dans l'ensemble des cultures.

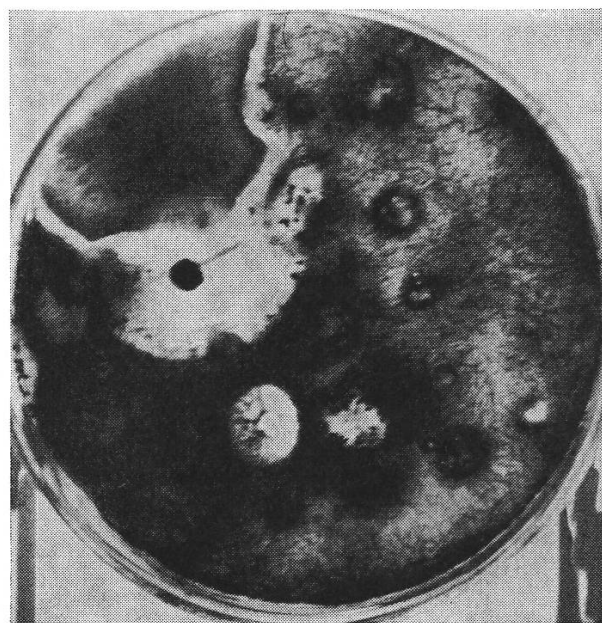


Figure 1

Plaque d'isolement de la souche 412, milieu malt-agar. Périthèces de *G. graminis* dans les colonies bactériennes. $x \sim 0,7$

Après isolement de la souche bactérienne (non identifiée), des cultures mixtes de *G. graminis* et de cet organisme sur malt-agar présentent des périthèces mûrs, au contact intime des deux colonies, cela après une vingtaine de jours. Il est à noter que sur ce milieu, l'inoculation fongique doit être réalisée très près de l'inoculum bactérien pour que ce dernier puisse se développer en colonie florissante. Aucune colonie ne se développe si la bactérie est inoculée seule. Il y a en quelque sorte utilisation du champignon par la bactérie en vue de son développement, puis utilisation de la bactérie par *G. graminis* pour la différenciation sexuelle de celui-ci. Des études plus poussées pourraient peut-être révéler un phénomène de symbiose partielle.

Des essais de conservation de la souche bactérienne en culture pure ont échoué sur les milieux utilisés à base de KNO_3 , de saccharose, de glucose, de peptone, d'extraits de levure et de malt.

4. Essais en boîtes de Petri sur milieu synthétique, avec traitement par la lumière

Nous basant sur les données fournies par Weste et Thrower (1963), nous avons tenté de répéter cette expérience sur la souche 404. Nous avons repris le milieu synthétique indiqué par ces auteurs, contenant 1% de glucose et 0,2% d'asparagine, et soumis les cultures aux conditions suivantes: dès l'inoculation, incubation des boîtes à l'obscurité à 22 °C jusqu'à ce que la surface totale du milieu soit recouverte par le champignon; nous désignerons ce stade de développement par la lettre M (stade de croissance linéaire Maximum). Les cultures sont ensuite soumises à l'éclairage auquel il est fait allusion plus haut (intensité de 1400 lux), alternant avec des phases d'obscurité (douze heures d'illumination, douze heures d'obscurité); la température est maintenue à 22 °C. Cette série est appelée O-L (Obscurité-Lumière). Une série de cultures est maintenue constamment à l'obscurité dès l'inoculation (O), une autre constamment à l'éclairage alterné (L). Vingt-cinq jours après le stade M, nous contrôlons les cultures:

Série O-L: quelques périthèces apparaissent au fond des plaques, à l'intérieur du milieu gélosé, les becs orientés vers la surface de la culture soumise à l'illumination. Trois plaques sur dix offrent ce phénomène, et nous n'observons guère plus de dix périthèces par plaque fertile. Le mycélium aérien, relativement bien fourni et recouvrant un mycélium prostré légèrement pigmenté de noir et différencié, par endroits, en faisceaux de larges hyphes de couleur foncée, présente une sporulation assez abondante des conidies de la forme imparfaite de *G. graminis*, *Phialophora radiccicola* Cain (Lemaire et Ponchet, 1963).

Série O : aucune fructification n'est observée. La sporulation micrococcidienne est nulle. Le mycélium est blanchâtre, exempt de toute pigmentation visible.

Série L : huit plaques sur dix présentent des cultures fertiles, et toutes sporulent. Les périthèces sont formés en quantités relativement faibles (moins de cent par boîte) au fond du milieu nutritif, les becs offrant le phototropisme positif signalé dans la série O-L. Mais un fait remarquable est observé : *Les couvercles des boîtes portent, sur leur face interne, des gouttelettes d'eau de condensation suspendues au-dessus des cultures; ces gouttes sont parfois tombées, sous l'effet de la pesanteur, sur le mycélium, ont écrasé les hyphes aériens, et ont laissé une empreinte bien visible sur les cultures. Des nids de périthèces parfaitement mûrs ont surgi dans la plupart de ces taches.* Il s'agit là du seul cas d'apparition de fructifications en surface dans cet essai (fig. 2).

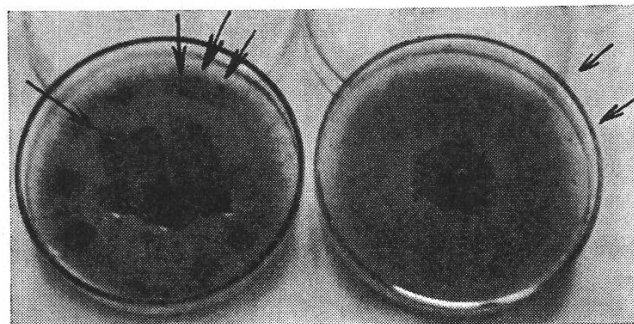


Figure 2

A gauche : périthèces développés en surface dans les taches d'humidité laissées par la chute de gouttes d'eau de condensation

A droite : témoin sans taches d'humidité. Périthèces en profondeur visibles. Pas de périthèces en surface. $x \sim 0,3$

L'induction de fructifications en surface peut être, dans cet essai, l'effet de l'humidification du mycélium par l'eau de condensation ou simplement une conséquence de la blessure mécanique des hyphes aériens par la chute des gouttelettes. Nous excluons cette seconde hypothèse, car une répétition de cette expérience avec administration de gouttes d'eau distillée stérile sur des cultures O-L au stade M provoque l'apparition de périthèces, tandis que l'aplatissement du mycélium de cultures jumelles par une spatule de verre stérile est absolument inefficace.

L'expérience de Weste et Thrower ne nous a donc pas donné entière satisfaction, dans les conditions de notre expérimentation bien entendu, puisque le nombre de périthèces apparus sous l'effet de la lumière seule (périthèces de profondeur) était insuffisant, et les fructifications difficile-

ment observables parce que dissimulées dans l'agar, et inatteignables sans de gros dommages pour les cultures (étude des stades de développement des périthèces, par exemple). Toutefois, l'effet favorable de l'humidification du mycélium nous a incités à examiner de plus près le rôle de l'eau dans l'induction des processus sexuels de *G. graminis*.

5. Induction de la morphogénèse périthéciale et microconidienne par immersion des cultures

L'observation de l'«accident» survenu dans l'expérience précédente et ayant abouti à la formation de fructifications de surface aisément observables et manipulables nous a suggéré d'appliquer à *G. graminis* un traitement inspiré de la technique d'induction de la conidiation d'*Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. mise au point par Billotte (1963) d'après une méthode utilisée avec *Alternaria solani* (Ell. et Mont.) Jones et Grout par Ludwig, Richardson et Unwin (1962). Cette méthode consiste à procéder au lavage des cultures à l'eau courante durant quelques heures et à la mise en dessiccation lente, les boîtes restant ouvertes et retournées, sur un panneau de bois. L'action favorable de l'immersion sur la sporulation et la fructification des Ascomycètes est connue depuis longtemps (Dodge, 1932, Dimock, 1937, Foster, McDaniel, Woodruff et Stokes, 1945, Hwang, Hansen et Snyder, 1947, Cappellini et Peterson, 1965).

Nous avons procédé de la manière suivante :

Des cultures en boîtes de Petri de la souche 404 γ monospore en milieu minimum optimum pour *G. graminis* (Gindrat, 1965), mais contenant 1% de glucose et 0,2% d'asparagine (Weste et Thrower, 1963) sont mises en incubation à l'étuve à 22 °C jusqu'au stade M (13 jours). Les couvercles ayant été retirés, elles sont alors plongées, sans précautions d'asepsie (Billotte, 1963) dans un bac de plastique contenant de l'eau du robinet (pH = 7,0) à 15 °C. Le bac est recouvert d'une plaque de verre destinée à protéger le dispositif de la poussière et laissé dans le laboratoire à la lumière du jour pendant quarante-huit heures. Les cultures sont alors rapidement égouttées et retournées sur un papier buvard reposant sur un plateau de bois croisé. Après six jours, sept cultures sur dix présentent, notamment dans une zone équivalant à une bande périphérique de 3 cm de largeur, des propérithèces de surface plus ou moins abondants. Après quinze jours, ces sept cultures fertiles ont différencié des périthèces mûrs dont la répartition et le nombre sont toutefois variables : de deux cents à plusieurs milliers de périthèces répartis uniformément sur toute la culture ou encore par nids (fig. 3). Nous observons également des formations sexuelles en profondeur, les becs étant cette fois orientés vers le fond de la plaque retournée et confirmant ainsi leur phototropisme posi-

tif. Les microconidies sont abondantes; des essais de germination ont toutefois toujours échoué.

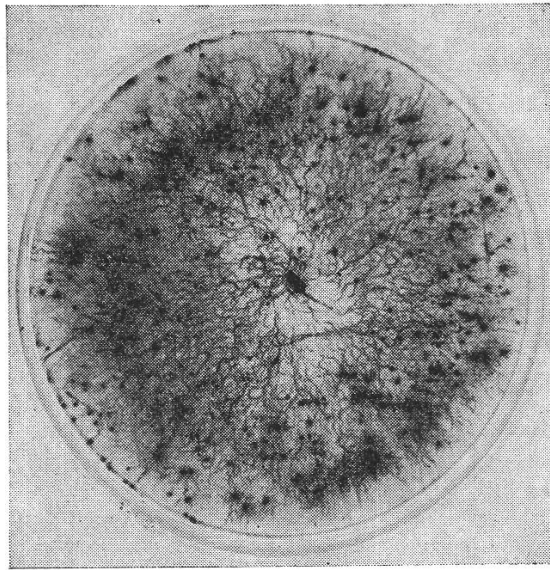


Figure 3

Périthèces de la souche 404 γ monospore à différents stades de développement, induits en milieu synthétique sous l'effet de l'immersion et de la dessiccation septiques. Jusqu'à l'immersion, obscurité totale; dès l'immersion, incubation à la lumière du laboratoire.

x \sim 0,6

Nous sommes ainsi en possession d'une méthode rapide d'obtention des périthèces de *G. graminis* en grandes quantités et aux conditions du laboratoire. Cette méthode se heurte toutefois à deux objections majeures:

1. Les cultures ne sont pas stériles et les fructifications pourraient avoir été induites par la présence d'autres micro-organismes, par exemple une bactérie semblable à celle dont il est question dans l'essai 3.

2. L'eau du robinet est chimiquement impure: son utilisation exclut la possibilité de recherches physiologiques précises.

En outre, l'irrégularité dans la quantité et la distribution topographique des périthèces est un phénomène qu'il conviendrait d'éclaircir pour obtenir d'une manière plus précise les formes sexuelles de *G. graminis*. Ce problème est soulevé dans la discussion du présent travail.

Pour répondre aux deux premières objections, nous avons réalisé l'essai suivant: six tubes à essais contenant des cultures de la souche 404 γ incubées à l'obscurité et parvenues au stade M sont emplis aseptiquement d'eau distillée stérile à 15 °C, rebouchés et laissés quarante-huit heures au laboratoire. Ils sont ensuite vidés de l'eau au moyen d'une seringue stérilisée, bouchés à nouveau et disposés au laboratoire pour des observations ultérieures. Dix jours après l'immersion, les initiales des périthèces

apparaissent dans la partie supérieure de chaque culture; quinze jours après cette observation, des périthèces sont à leur tour visibles dans l'agar, dans la partie médiane des cultures, et sur la paroi opposée au milieu nutritif (fig. 4). Un décomptage rapide indique une moyenne arithmétique de 75 périthèces (extrêmes inférieurs et supérieurs = 40 et 200) par tube à essai. Relevons d'autre part l'abondance de la sporulation sur toute la surface des cultures. Des tubes n'ayant pas subi l'immersion ne présentent aucune fructification, mais une légère sporulation. Ainsi, l'action de micro-organismes contaminants ou de corps chimiques apportés par l'eau d'immersion est exclue. Quantitativement, cette production de fructifications paraît faible; mais en admettant que le rapport des surfaces nutritives entre un milieu coulé dans un tube à essai et un milieu préparé dans une boîte de Petri est d'environ un huitième, 75 périthèces dans un tube correspondent à 600 fructifications en boîte de Petri, ce qui représente un nombre relativement important.

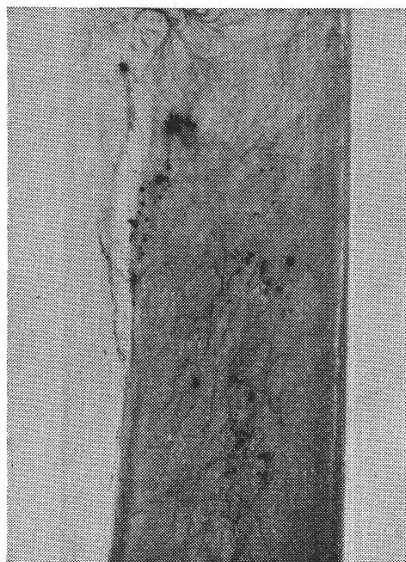
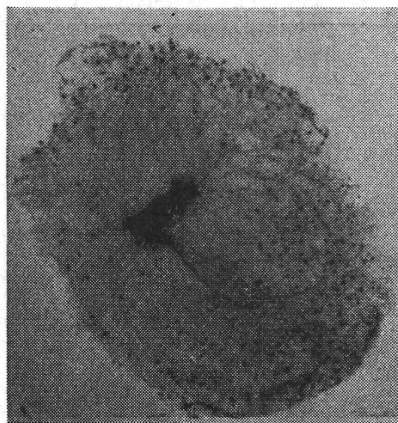


Figure 4

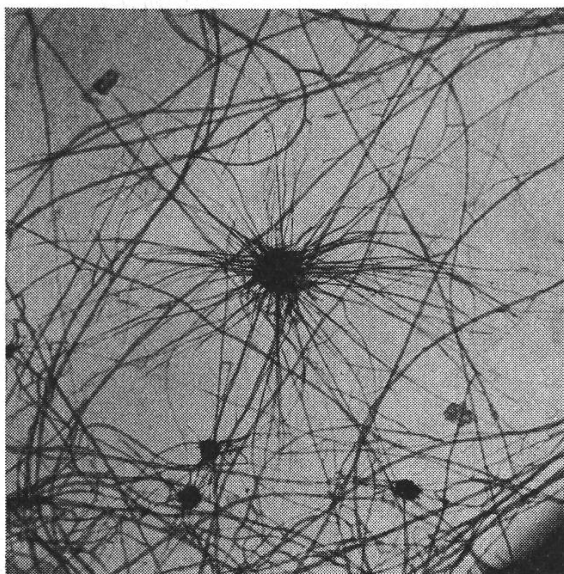
Périthèces de la souche 404 γ monospore à différents stades de développement, induits stérilement en tube à essai (milieu synthétique) sous l'effet de l'immersion et de la dessiccation lente. Incubation dès l'immersion à la lumière du laboratoire. Relever la présence de cristaux dans la partie supérieure du cliché. x 2,0

Cette technique d'immersion stérile des cultures peut être également utilisée en plaques de Petri. L'introduction de l'eau distillée stérile dans les plaques s'effectue alors à l'aide d'une seringue stérilisée, de même que son retrait. La dessiccation lente après immersion est réalisée sur des feuilles de papier buvard stérilisées. Les manipulations sont longues en raison des nombreux risques d'infections qui peuvent par ailleurs être contrôlés par l'utilisation simultanée de plaques «vierges» contenant le

a)



b)



c)

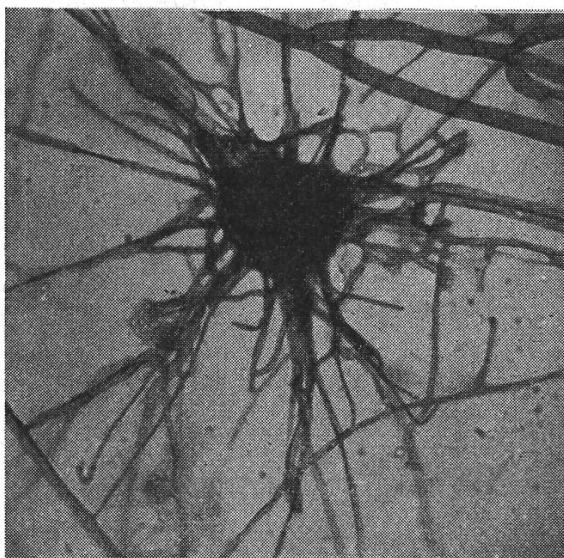


Figure 5

Propertithèces de *G. graminis* induits stérilement en cultures sur lames (milieu synthétique).
Souche 404 γ monospore.

- a) Culture vivante dix jours après la fin de l'immersion de quarante-huit heures. x 1,5
- b) Préparation montée cinq jours après la fin de l'immersion de quarante-huit heures. x 80
- c) Préparation montée cinq jours après la fin de l'immersion de quarante-huit heures; relever la présence de microconidies dans la proximité immédiate du propertithèce. x 336

milieu nutritif non ensemencé. L'eau stérile est administrée à 15 °C, des températures supérieures ralentissant la production de périthèces, tandis que des températures inférieures (étudiées jusqu'à 8 °C) ne l'augmentent pas sensiblement. Notons en outre que les microconidies sont abondantes sur toutes les cultures (404 γ et 412) immergées stérilement; leur présence n'est pas seulement décelée en surface, mais aussi dans le milieu gélosé. Cette double localisation est à rapprocher de celle des périthèces. Il est à relever que les mêmes essais d'induction à l'obscurité ont échoué.

6. Induction des formes sexuelles et des microconidies sur lames gélosées

Langeron recommande la technique des cultures sur lames gélosées pour l'étude morphologique des champignons filamenteux et des levures (1945). Nous avons adapté cette technique à nos recherches sur l'induction des périthèces de *G. graminis* en procédant de la manière suivante:

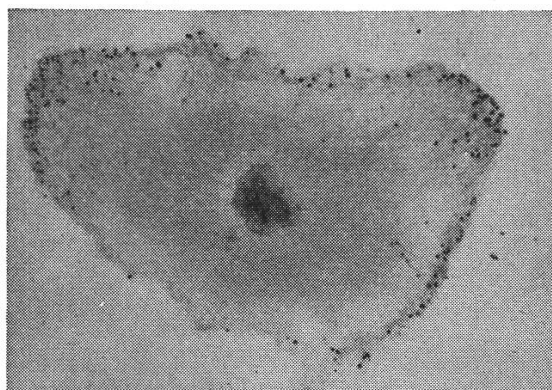
Des cultures de la souche 404 γ incubées cinq jours à l'obscurité sur lames en milieu synthétique (avec 1 % de glucose et 0,2 % d'asparagine), sont immergées quarante-huit heures soit dans l'eau courante, soit, aseptiquement, dans de l'eau distillée stérile, versée dans un cristalliseur (température = 15 °C), puis mises à nouveau en incubation, mais au laboratoire, afin de fournir dans cette phase finale un minimum de lumière au champignon. Après quatre jours d'incubation, les lames sont fixées, colorées au bleu coton acétique, puis montées (Langeron, 1945) pour l'observation microscopique. Le milieu de montage choisi est le produit Euparal (Flatters & Garnett Ltd., Manchester). Les préparations révèlent régulièrement des propérithèces à divers stades (fig. 5). Toutes les cultures sporulent en d'abondantes microconidies, et les arbuscules de conidio-phores sont particulièrement bien visibles (fig. 6).



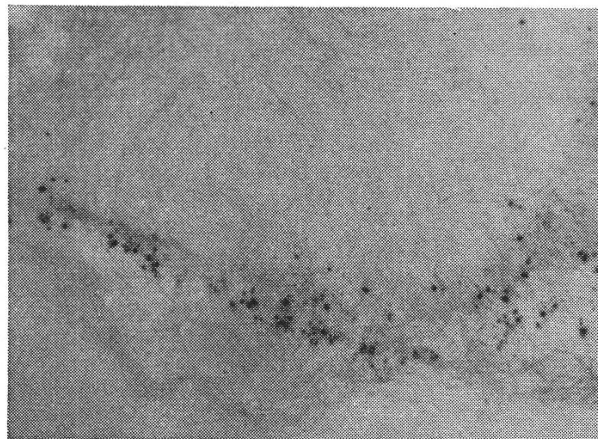
Figure 6

Microconidies de *G. graminis* observées sur une préparation de culture en milieu synthétique gélosé sur lame montée un jour après la fin de l'immersion de quarante-huit heures. Souche 404 γ . x 336

Jusqu'au montage, les cultures ont toujours été incubées en milieu relativement humide (3 ml d'eau distillée stérile recouvrant le fond des boîtes de Petri contenant les lames gélosées) pour prévenir le dessèchement. Si nous laissons les cultures incuber dans l'eau stérile, des périthèces se forment sur les lames immergées, accrochés dans le mycélium qui a pris un développement considérable (fig. 7). Les microconidies sont abondantes.



a) $x \sim 1,0$



b) $x \sim 2,6$

Figure 7

Périthèces en voie de formation dans le mycélium «aérien» d'une culture en milieu synthétique sur lame immergée depuis seize jours dans l'eau distillée stérile. Souche 404 γ

En étudiant d'une manière très élémentaire le rôle de la lumière dans la formation des périthèces et des microconidies de *G. graminis* cultivé sur lames gélosées, nous obtenons les résultats figurant dans le tableau 1 et concernant la souche 404 γ . La température ambiante est maintenue à 22 °C, tandis que l'intensité lumineuse est de 1100 lux.

Le tableau 1 indique que la lumière est indispensable à l'apparition des périthèces de *G. graminis* dans les conditions quelque peu particulières de notre méthode, mais qu'elle n'est finalement nécessaire que pendant l'incubation faisant suite à l'immersion (N° 6).

Tableau 1

Influence de la lumière blanche sur la formation des périthèces de *Gaeumannomyces graminis* induits par immersion stérile sur lames gélosées

Expérimentation sur cinq lames pour chaque série

Séries ¹	Périthèces ²	Microconidies	Pigmentation du mycélium
1. — — —	—	Présentes	Légère
2. — + —	—	Présentes	Prononcée
3. — + +	+ +	Présentes	Prononcée
4. + — —	—	Présentes	Prononcée
5. + — +	+ + +	Présentes	Prononcée
6. — — +	+ + +	Présentes	Prononcée
7. + + +	+ +	Présentes	Prononcée
8. + + —	+	Présentes	Prononcée

¹ — = obscurité

+ = lumière blanche (1100 lux) alternant avec l'obscurité (phases de douze heures)

Le premier signe correspond à l'incubation (six jours) précédant l'immersion, le second à la phase d'immersion (deux jours), le troisième à l'incubation (neuf jours) faisant suite à l'immersion

² — = pas de périthèce

+ = jusqu'à 20 périthèces par lame

+ + = jusqu'à 100 périthèces par lame

+ + + = plus de 100 périthèces par lame

Les souches 406, 410, 412 et 447 se sont également révélées fertiles lorsqu'elles ont été soumises à cette technique des lames gélosées.

Les figures 5 b et 5 c représentant divers stades primitifs dans l'évolution du périthèce de *G. graminis* divergent quelque peu de l'image habituelle de la morphologie sexuelle des Diaporthales telle que la rapporte Gäumann (1964), particulièrement en ce qui concerne les Gnomoniacées où cet organisme est placé (von Arx et Olivier, 1952). En effet, on ne retrouve pas, dans nos préparations, les figures typiques de l'autogamie évoluée attendue chez *G. graminis*, mais plutôt des formations propérithéciales et des microconidies ressemblant d'une manière frappante à celles que l'on observe chez certaines Sordariacées (Sphérialles) hétérothalliques à spermatisation telles que *Sordaria anserina* (Ames, 1934) ou *Bombardia lunata* (Zickler, 1937). Nous ne pensons pas prouver ainsi irréfutablement l'existence de modalités sexuelles de Sordariacées chez *G. graminis*, mais ces images peuvent nous suggérer qu'il pourrait éventuellement y avoir, chez cet organisme, simultanément autogamie classique extrêmement discrète (Jones, 1926) et spermatisation, représentant respectivement les deux tendances Diaporthales-Gnomoniacées et Sphérialles-Sordariacées. Cette différenciation sexuelle se superpose au caractère franchement

homothallique du champignon ainsi que le démontre la formation de périthèces fertiles sur des cultures issues d'une seule ascospore (souche 404 γ par exemple). La possibilité d'un rôle sexuel des microconidies est à envisager sérieusement, d'autant plus que ces spores uninucléées n'ont jamais germé dans nos essais (caractère de spermaties vraies) et que leur présence est toujours associée à celle des périthèces. Il est suggestif de relever que les propérithèces ne sont jamais apparus en l'absence de microconidies.

Nous poursuivons l'étude d'une éventuelle intervention de ces microconidies dans les processus sexuels de *G. graminis*.

IV. Discussion

Des différentes méthodes présentées dans ce travail, nous ne retiendrons que trois techniques d'obtention des périthèces de *G. graminis*. Nous leur accordons une importance pratique égale selon les expérimentations auxquelles elles permettent d'accéder.

1. La technique d'immersion septique en boîtes de Petri permet de tester facilement la fertilité de souches de *G. graminis* et, au besoin, d'identifier une culture purement végétative de cet organisme. En outre, elle est d'une aide précieuse pour les recherches de l'action inhibitrice, ou stimulante, de diverses sources nutritives, pour autant que l'on n'a pas à tenir compte des impuretés biologiques et chimiques de l'eau; en ce cas on utilisera la seconde technique.

2. La méthode par immersion aseptique en tubes à essais ou en boîtes de Petri conduit à l'obtention de fructifications, d'ascospores et de microconidies stériles. Ce procédé convient parfaitement à l'isolement de spores et à diverses recherches d'ordre génétique. De plus, il permet de tester diverses substances susceptibles d'influencer la morphogenèse périthéciale ou microconidienne dans la mesure où les impuretés de l'agar n'altèrent pas les résultats. Enfin, on peut aussi obtenir aisément des suspensions d'ascospores dans le but d'inoculer des liquides ou de procéder à des infections artificielles d'un sol ou d'une plante-hôte.

3. L'emploi de cultures aseptiques sur lames gélosées permet l'examen microscopique complet de la morphogenèse périthéciale. Il peut également faciliter les recherches sur divers facteurs (lumière, température, etc.) influençant la formation des fructifications lorsque ces études impliquent l'usage de matériel plus petit que les tubes ou les boîtes de Petri.

Qu'il s'agisse de cultures en tubes à essais ou en boîtes de Petri, lorsque nous avons utilisé les diverses techniques d'immersion, nous avons toujours constaté, avec la souche 404 γ , qu'une certaine proportion des cul-

tures (20 à 25 %) restait non fertile bien que présentant des microconidies. Nous avons relevé ce fait en présentant la série d'expérimentations 5. Les conditions restant les mêmes pour toutes cultures d'un même essai, nous pensons qu'il pourrait s'agir d'un phénomène génétique. Une explication serait que l'ascospore dont la culture servit de point de départ à la souche 404 γ contenait des «noyaux fertiles» et des «noyaux stériles», et que des hyphes renfermaient donc des «noyaux fertiles» et d'autres des «noyaux stériles»; par conséquent, les fragments mycéliens utilisés pour inoculer les différents essais étaient mixtes: au hasard des repiquages, certaines cultures d'expérimentation ne pouvaient donc contenir que des «noyaux stériles». D'autres explications génétiques peuvent évidemment être proposées: par exemple, le mycélium des subcultures de l'ascospore originale pouvait contenir des hyphes renfermant dans des proportions variables les deux sortes de noyaux, une certaine proportion de noyaux présumés «stériles» inhibant la formation des périthèces. Nous tentons actuellement d'examiner le bien-fondé de ces hypothèses d'ordre génétique.

Il ressort de nos études que la lumière et l'immersion sont deux facteurs extrêmement importants pour la reproduction sexuelle de *G. graminis*. Nous avons rappelé plus haut les diverses observations réalisées à ce jour sur le rôle apparemment indispensable de la lumière dans la morphogénèse périthéciale de ce champignon. Celui de l'immersion semble plus obscur. Agit-elle par effet d'anaérobiose momentanée? Par dissolution et élimination d'un facteur hydrosoluble? Par changement purement biochimique dans les processus du métabolisme consécutif à une hydratation brusque suivie d'une déshydratation progressive? Quelles sont les relations éventuelles entre les effets de l'immersion et ceux de l'exposition aux radiations ultraviolettes proches (Leach, 1964), ces deux techniques conduisant à l'apparition des périthèces? Ces problèmes d'ordre physiologique, actuellement à l'étude, seront abordés dans une prochaine note.

Ce travail constitue la deuxième partie d'une thèse pour l'obtention du doctorat ès sciences biologiques de l'Université de Genève, sous la direction de M. Gilbert Turian, professeur de microbiologie générale, que je remercie sincèrement de ses précieux conseils et encouragements.

J'exprime mes remerciements à M. M. Rochaix, directeur des Stations fédérales d'essais agricoles de Lausanne, qui a accepté d'introduire dans le programme d'activité de cet institut ces recherches de thèse entreprises sous le directorat de M. R. Gallay auquel va l'expression de ma profonde reconnaissance.

Ma vive gratitude s'adresse également au professeur D. Bianchi et à M. R. Murbach pour leur concours dans les traductions anglaise et allemande du résumé, de même qu'à M. R. Pilloud, collaborateur technique.

Résumé

Le présent travail décrit diverses tentatives et méthodes d'induction des périthèces de *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) von Arx et Olivier au laboratoire. Les fructifications sont facilement obtenues sur plantes vivantes de blé, sur paille, mais jamais en culture pure sur milieux gélosés semi-synthétiques (malt, farine de pois, pomme de terre-glucose) sous différentes conditions d'illumination à la lumière blanche.

Une culture mixte d'une bactérie isolée de la rhizosphère de blé atteint de piétin-échaudage et de *G. graminis* présente des périthèces du champignon à l'intérieur de la colonie bactérienne.

En milieu synthétique (glucose 1 %, asparagine 0,2 %) gélosé, quelques périthèces enfouis dans le substrat sont obtenus en incubant les cultures soit à la lumière blanche (1400 lux) alternant en phases de douze heures avec l'obscurité, soit à l'obscurité (jusqu'à ce que la culture ait recouvert le milieu) suivie d'éclairage alterné.

L'induction en masse de périthèces et de microconidies de *G. graminis* est réalisée en milieu synthétique gélosé en boîtes de Petri, en tubes à essais et sur lames en utilisant une méthode comportant trois phases: 1° incubation jusqu'à ce que la surface nutritive à disposition soit recouverte par le mycélium; 2° immersion septique ou aseptique de 48 heures dans de l'eau impure ou distillée; 3° incubation accompagnée de dessiccation lente. L'effet de la lumière blanche alternée avec des périodes d'obscurité sur la morphogenèse périthéciale est étudié dans les trois phases. De nombreuses fructifications sont également obtenues sur lames gélosées immergées stérilement aux conditions du laboratoire.

Il n'a jamais été obtenu de périthèces mûrs en l'absence de microconidies. Ce fait, associé à l'observation microscopique de cultures fertiles et montées (lames gélosées), suggère d'éventuels phénomènes de spermatisation chez *G. graminis*. En outre, il est possible qu'il existe une certaine ségrégation dans la potentialité sexuelle au niveau de l'ascospore.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt verschiedene Versuche und Methoden zur Auslösung der Perithezienbildung bei *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) von Arx et Olivier unter Laboratoriumsbedingungen. Die Fruchtkörper werden ohne Schwierigkeit auf lebenden Weizenpflanzen und auf Stroh erhalten, dagegen nie in Reinkultur auf halbsynthetischen Agarnährböden (Mais, Erbsenmehl, Kartoffelglukose) unter verschiedenen Belichtungsbedingungen bei Verwendung von weissem Licht.

In einer Mischkultur von *G. graminis* mit einem aus der Rhizosphäre von schwarzbeinigem Weizen isolierten Bakterium treten Perithezien des Pilzes im Innern der Bakterienkolonie auf.

Auf synthetischem Agarnährboden (Glukose 1%, Asparagin 0,2%) werden vereinzelte im Substrat eingeschlossene Perithezien erhalten, wenn auf die Kulturen während ihrer Entwicklung entweder abwechselungsweise zwölf Stunden weisses Licht (1400 lux) und zwölf Stunden Dunkelheit einwirken oder wenn sie zuerst im Dunkeln gehalten (bis die Kultur das Nährmedium überdeckt hat) und anschliessend einer periodisch unterbrochenen Belichtung ausgesetzt werden.

Die Massenproduktion von Perithezien und Mikrokonidien von *G. graminis* gelingt auf synthetischem Agarnährboden in Petrischalen, in Reagenzgläsern und auf Objektträgern nach einer Methode, die aus drei Phasen besteht: 1. Inkubation bis die verfügbare Nährfläche vom Mycelium überdeckt ist; 2. 48stündiges septisches oder aseptisches Eintauchen in ungereinigtes, beziehungsweise destilliertes Wasser; 3. Inkubation und gleichzeitiges langsames Trocknen. Es wird für jede der drei Phasen die Wirkung des periodisch mit Dunkelheit wechselnden, weissen Lichtes auf die Perithezienbildung untersucht. Zahlreiche Perithezien werden unter Laboratoriumsbedingungen ebenfalls auf mit Agartropfen versehenen, steril eingetauchten Objektträgern erhalten.

Bei Abwesenheit von Mikrokonidien wurden nie reife Perithezien erhalten. Diese Tatsache sowie Beobachtungen an mikroskopischen Präparaten fertiler Kulturen (Agartropfen auf Objektträgern) legen die Vermutung nahe, dass bei *G. graminis* Spermatisationsvorgänge stattfinden. Ausserdem ist die Möglichkeit einer gewissen Aufspaltung der sexuellen Potentialität auf der Ascosporenstufe nicht von der Hand zu weisen.

Summary

Several trials and methods for induction of perithecial formation in *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) von Arx et Olivier are described. Such fructifications are easily obtained on living wheat plants or wheat straw, but never in pure culture on semi-synthetic agar media (malt, pea meal, potato-glucose) under diverse conditions of white light illumination.

In a mixed culture of *G. graminis* and a bacterium isolated from the rhizosphere of take-all diseased wheat, the fungal perithecia are formed inside the bacterial colony.

In a synthetic agar medium (glucose 1%, asparagine 0,2%), a few perithecia embedded in the substrate have been produced during incubation of the cultures either in an alternating 12 hour light-dark regime

(1400 lux, white light) or in total darkness during mycelial extension followed by the alternate light-dark periods.

Mass induction of perithecia and microconidia of *G. graminis* is realized on the synthetic agar medium in Petri dishes, in growth tubes and on agarized slides. Our method includes three phases: 1st incubation until the mycelium completely covers the available nutritive surface; 2nd forty-eight hours of septical or aseptical immersion in impure or distilled water; 3rd incubation with slow dehydration. The effect of white light alternating with periods of darkness has been studied in the three above phases of perithecial induction. Numerous fructifications have also been obtained on agarized slides dipped in sterile water under laboratory conditions.

No mature perithecia have been obtained in the absence of microconidia. This fact and microscopical observation of fertile cultures on agar slides is suggestive of spermatization in *G. graminis*. Some data indicate the possibility of a segregation of fertility and sterility from the initial ascospore.

Bibliographie

- Ames L.M. 1934. Hermaphroditism involving self-sterility and cross-fertility in the Ascomycete *Pleurage anserina*. *Mycologia* 26, 392-414.
- von Arx J.A. et D.L.Olivier. 1952. The taxonomy of *Ophiobolus graminis* Sacc. *Trans. brit. mycol. Soc.* 55, 29-33.
- Billotte J.M. 1963. Une méthode d'induction de la sporulation de l'*Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. du colza en culture pure. *Compt. rend. Acad. Agric. Fr.*, 1056-1061.
- Brooks D.H. 1964. Infection of wheat roots by ascospores of *Ophiobolus graminis*. *Nature*, 203, 203.
- 1965. Root infection by ascospores of *Ophiobolus graminis* as a factor in epidemiology of the take-all disease. *Trans. brit. mycol. Soc.* 48, 237-248.
- Bussmann B. 1936. Untersuchungen über die Virulenz von *Ophiobolus graminis* Sacc. *Phytopath. Zschr.* 9, 571-581.
- Cappellini R.A. et J.L.Peterson. 1965. Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57, 962-966.
- Davies F.R., A.W.Henry, A.W.Jackson et J.D.Gilpatrick. 1948. Influence of saprophytic microorganisms on the sporulation of *Ophiobolus graminis* Sacc. *Proc. canad. phytopath. Soc.* 16, 12.
- Davis R.J. 1925. Studies on *Ophiobolus graminis* Sacc. and the take-all disease of wheat. *J. agric. res.* 31, 801-827.
- Défago G. 1942. Observations sur les piétins des céréales en Suisse romande. *Bull. Soc. bot. suisse* 52, 5-46.
- Dimock A.W. 1937. Observations on sexual relations in *Hypomyces ipomoeae*. *Mycologia* 29, 116-127.
- Dodge B.O. 1932. The non-sexual and the sexual functions of microconidia of *Neurospora*. *Bull. Torrey bot. Club* 59, 347-360.

- Foëx E. et E. Rosella. 1930. Recherches sur le piétin. *Ann. Epiphyties* 16, 51-82.
- Foster J.W., L.E. McDaniel, H.B. Woodruff et J.L. Stokes. 1945. Microbiological aspects of penicillin. V. Conidiospore formation in submerged cultures of *Penicillium notatum*. *J. Bacteriol.* 50, 365-368.
- Garrett S.D. 1939. Factors limiting infections by ascospores of *Ophiobolus graminis*. *Ann. appl. Biol.* 26, 47-55.
- Gäumann E. 1964. *Die Pilze*. 2. Auflage. 541 p. Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart.
- Gilpatrick J.D. et A.W. Henry. 1949. The effect of nutritional factors on the development of *Ophiobolus graminis* Sacc. *Proc. canad. phytopath. Soc.* 17, 14.
- Gindrat D. 1965. Recherches sur la physiologie de la nutrition de *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx et Olivier et établissement d'un milieu synthétique minimum. *Bull. Soc. bot. suisse* 75, 183-218.
- Henry A.W. 1961. The pathogenesis of root degeneration. *Recent adv. Bot. sect.* 5, 473-477.
- Hwang S.-W., H.N. Hansen et W.C. Snyder. 1947. Increased perithecium formation and hybridization in flooded cultures of a homothallic Ascomycete. *Mycologia* 39, 196-199.
- Jones S.G. 1926. The development of the perithecium of *Ophiobolus graminis* Sacc. *Ann. Bot.* 40, 607-629.
- Langeron M. 1945. *Précis de mycologie*. 674 p. Collection des Précis Médicaux, Masson & Cie, Paris.
- Leach C.M. 1964. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. *Canad. J. Bot.* 43, 185-200.
- Lemaire J.M. et J. Ponchet. 1963. *Phialophora radicola* Cain, forme conidienne du *Linocarpon cariceti* B. et Br. *Compt. rend. Acad. Agric. Fr.*, 1067-1069.
- Ludwig R.A., L.T. Richardson et C.H. Unwin. 1962. A method for inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. *Canad. Plant dis. survey* 42, 149-150.
- Padwick G.W. 1939. Note on the limitation of infection of wheat by ascospores of *Ophiobolus graminis* Sacc. A possible explanation. *Ann. appl. Biol.* 26, 823-825.
- Plasman A. 1954. Note sur deux techniques d'inoculation de plantules de froment avec *Ophiobolus graminis* Sacc. et application de l'une d'elles à un test de sensibilité de lignées de froment de printemps. *Parasitica* X, 43-50.
- Russell R.C. 1934. Studies of take-all and its causal organism *Ophiobolus graminis* Sacc. *Canad. Dept Agric. Bull.* 170, 4-64.
- Weste G. et L.B. Thrower. 1963. Production of perithecia and microconidia in culture by *Ophiobolus graminis*. *Phytopathology* 53, 354.
- White N.H. 1939. The sexuality of *Ophiobolus graminis* Sacc. *J. Counc. sci. ind. res. Austr.* 12, 209-212.
- Communication personnelle.
- Zickler H. 1937. Die Spermationbefruchtung bei *Bombardia lunata*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 55, 114-119.
- Zogg H. Communication personnelle.