

Étude de la pycnogenèse chez *Phomopsis mali* (SCHULTZ et SACC.) ROB.

I. EMMANOUILIDIS et G. CORNIC*

Laboratoire de Phytopathologie, Institut National Agronomique, Alger, Algérie

Arrivé le 9 Février 1973

Pycno genesis in *Phomopsis mali*

Abstract. Light induces the formation of pycnidia in *Phomopsis mali*. The induction caused by light can be conserved in darkness. The size and quantity of pycnidia vary with the illuminance. Under low and high illuminances physiologically different pycnidia appear. *Phomopsis mali* cultivated in darkness in the presence of other microorganisms (fungi or bacteria) can fructify and produces pycnidia similar to those formed under low illuminance and in natural conditions. Our experiments indicate the presence of a pycnogenesis-inducing substance that can exists in different forms and induces the formation of the different pycnidia.

L'importance de la lumière sur la vie des champignons a été soulignée par de nombreux auteurs; ce facteur influence aussi bien la croissance que la fructification (CARLILE 1965). La lumière proche U.V. s'est révélée rapidement la longueur d'onde la plus efficace, et son influence sur la fructification a été très tôt mise en évidence sur des espèces différentes (STEVENS 1928, JOLY 1962, LEACH 1962a et 1962b).

La plupart des études faites sur la fructification portent sur les *Adelomycètes*. Cependant il semble que dans la plupart des cas étudiés, il y ait peu de distinction entre la formation des conidiophores et pycnides d'une part, et les conidies et pycnosporos d'autre part. Pourtant il apparaît que ces deux processus sont bien distincts; ils réclament en effet des conditions thermiques ou lumineuses différentes (TRIONE et LEACH 1969, ONESIROSAN et BANTTARI 1969, VARGAS et WILCOXSON 1969, ZIMMER et McKEEN 1969, EMMANOUILIDIS 1970). Il semble donc qu'il faille séparer l'étude de l'induction des pycnides de celle des pycnosporos.

Les résultats présentés ci-dessous concernent uniquement la formation des pycnides chez *Phomopsis mali*. On examinera leur induction à la lumière et à l'obscurité.

* Adresse actuelle: Laboratoire Ecologie Végétale, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France.

Materiel et Méthodes

Nous avons utilisé une souche de *Phomopsis mali* isolée à partir de la mycoflore de bourgeons apparemment sains de figuier de l'I.N.A. d'Alger.

Les cultures sont faites dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre contenant 20 ml de malt gélosé à 2 %. Elles sont placées dans une salle de culture à une température de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ sous un éclairage maximum de 1 500 lx donné par des tubes fluorescents « lumière du jour ». On peut réaliser au niveau de chaque boîte de Petri différents niveaux d'éclairement en les plaçant dans des sacs faits avec une épaisseur différente de papier blanc. L'obscurité totale est obtenue à l'aide de sacs faits de papier noir.

Résultats

A — Influence de la lumière sur la formation des pycnides

1) Influence des différents niveaux d'éclairements

L'influence des différents niveaux d'éclairements sur la pycnogenese a déjà été étudiée (RICHARDS 1951, CALPOUZOS et LAPIS 1970); il a été montré que l'augmentation du niveau d'éclairement provoque une augmentation de l'intensité du phénomène jusqu'à l'apparition d'un plateau. On a obtenu sur *Phomopsis mali* des résultats analogues.

La fig. 1 présente les résultats obtenus dans deux expériences différentes, résultats qui ont été identiques. Une série de 4 boîtes de Petri dans chaque condition est mise 3 jours à l'obscurité, puis exposée respectivement pendant 15 jours sous 7 éclairagements différents : 0 (obscurité), 25, 50, 100, 250, 500 et 1 500 lx. On constate que la quantité totale des pycnides augmente avec le niveau d'éclairement. Aux faibles intensités se forment de grosses »pycnides« dont le mode du diamètre est de 0,9 mm environ, elles se trouvent à la surface du milieu de culture. Aux plus forts éclairagements se forment de »petites pycnides« dont le mode du diamètre est de 0,1 mm environ, elles se trouvent enfoncées dans le milieu de culture.

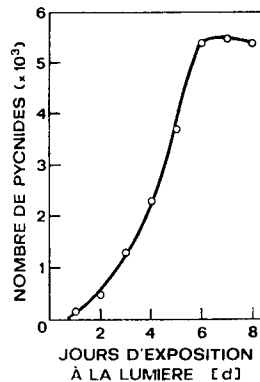
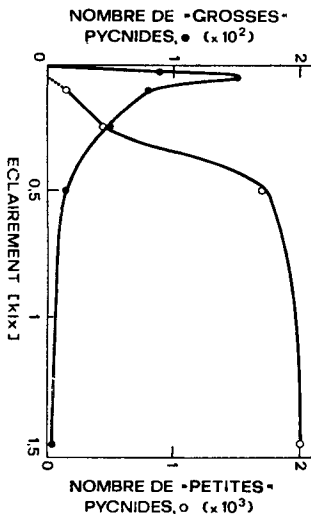


Fig. 1. Variation du nombre de pycnides par boîtes de petri en fonction du niveau de l'éclairement.
Fig. 2. Variation du nombre de pycnides compté en fin de période expérimentale par boîte de petri, en fonction de la longueur de la période d'exposition à la lumière.

Les courbes de la fig. 1 montrent que la proportion de l'une et de l'autre forme de pycnides varie en fonction de l'énergie reçue. La quantité des grosses pycnides passe par un maximum pour un éclaircissement de 50 Lux puis disparaît complètement sous un éclaircissement de 1 500 lx. Les »petites pycnides« n'apparaissent que lorsque l'éclaircissement est d'environ 100 lx et augmente pour atteindre un plateau vers 1 500 lx.

La lumière a donc au moins deux effets sur la pycnogenèse; d'une part son augmentation provoque l'accroissement de l'intensité du phénomène, d'autre part faibles et forts éclaircissements provoquent l'apparition de deux formes distinctes de pycnides physiologiquement différentes; en effet dans les conditions thermiques de notre salle de culture, nous avons observé en fin de croissance des spores et des cirrhes chez les »grosses pycnides«, mais non chez les »petites pycnides«.

On a vérifié, par ailleurs, dans d'autres expériences que toutes les cultures faites sous un éclaircissement inférieur à 50 lx présentaient exclusivement des »grosses pycnides« et celles faites sous 1 500 lx uniquement des »petites pycnides«.

2) Effets de périodes lumineuses de longueurs différentes appliquées dès le début de la croissance sur la pycnogenèse

On a cherché à savoir le temps minimum pour que se réalise l'induction de la pycnogenèse par la lumière. Quarante boîtes de Petriensemencées sont placées 3 jours à l'obscurité; après cette période on les répartit en 10 lots: un lot conservé continuellement à l'obscurité et neuf lots subissant respectivement 8 h, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 jours de lumière (1 500 lx). À la fin de cette période lumineuse, les boîtes sont replacées à l'obscurité jusqu'à la fin des manipulations.

La fig. 2 illustre les résultats obtenus. On constate qu'une longueur minimale située entre 8 et 24 h d'éclaircissement est nécessaire pour que se réalise l'induction de la pycnogenèse. Après ce temps le nombre des pycnides formées augmente avec la durée de l'exposition à la lumière pour atteindre un plateau.

Les boîtes ayant subi 1 et 2 jours d'éclaircissement ne présentaient au moment de leur remise à l'obscurité de pycnide; ces dernières apparaissent après quelques jours. Le processus induit à la lumière conduisant à la pycnogenèse, se maintient donc à l'obscurité.

3) Effets de photopériodes différentes sur la pycnogenèse

Quatre lots de 4 boîtes éclairées à 1 500 lx sont soumis à 4 photopériodes différentes: 4, 8, 16, 24 h. Dans tous les cas les boîtes de Petri sont placées 3 jours à l'obscurité après le repiquage du mycelium.

La fig. 3 montre que plus la photopériode est grande, plus le nombre des pycnides qui apparaît est important. Un éclaircissement continu est donc dans le cas de *Phomopsis mali* favorable à la plus grande production de pycnides. L'effet de la photopériode a été déjà noté et il est généralement admis qu'une photopériode de 12 h favorise la fructification de la plupart des champignons de la flore parasite des semences (NEERGAARD 1971).

En tenant compte de la surface du mycelium à un moment donné et de la longueur de la photopériode, on a calculé le nombre des pycnides formées

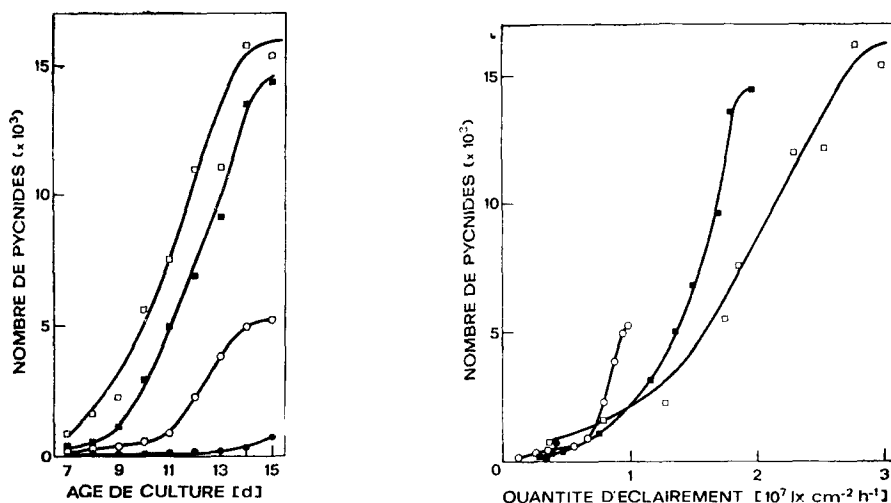


Fig. 3. Evolution du nombre de pycnides par boîtes de petri en fonction du temps chez des cultures exposées sous différentes photopériodes:

● — 4 h de lumière, 20 h d'obscurité; ○ — 8 h de lumière, 16 h d'obscurité; ■ — 16 h de lumière, 8 h d'obscurité; □ — 24 h de lumière.

Fig. 4. Evolution du nombre de pycnides en fonction de la quantité d'éclairement reçue par le mycelium ($\text{lx cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) chez des cultures exposées sous différentes photopériodes: ● — 4 h de lumière, 20 h d'obscurité; ○ — 8 h de lumière, 16 h d'obscurité; ■ — 16 h de lumière, 8 h d'obscurité; □ — 24 h de lumière.

en fonction de la quantité de l'éclairement reçu aux différents moments de la croissance dans les quatre conditions de cultures. La fig. 4 montre l'évolution du nombre des pycnides formées en fonction de la quantité de l'éclairement reçu. On constate que la relation obtenue est différente dans les 4 conditions étudiées. Cette observation suggère que chaque photopériode a une action spécifique sur la pycnogénèse.

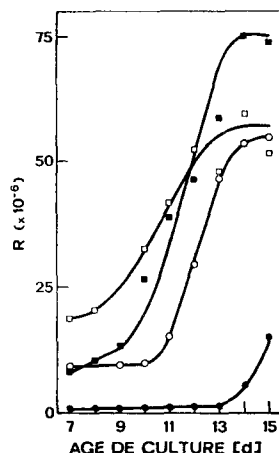


Fig. 5. Evolution du rendement de l'éclairement pour la formation des pycnides « R » (= nombre de pycnides/quantité d'éclairement) en fonction du temps chez des cultures exposées sous des photopériodes différentes:

● — 4 h de lumière, 20 h d'obscurité; ○ — 8 h de lumière; 16 h d'obscurité; ■ — 16 h de lumière, 8 h d'obscurité; □ — 24 h de lumière.

On a calculé le rendement (Quantité des pycnides formées/Energie reçue), dans chaque condition au cours de la croissance. La fig. 5 représente les résultats obtenus. On constate que le rendement dans les premiers jours de la croissance (jusqu'au onzième jour) est d'autant plus grand que la photopériode est longue. En fin de croissance le rendement de la photopériode de 24 h égalise celui de la photopériode de 8 h. A partir du douzième jour la vitesse des réactions impliquées dans la pycnogenèse est la plus grande en 16 h, tout apport d'énergie supplémentaire est alors perdu; ceci implique une baisse de rendement en lumière continue.

B — Induction de la pycnogenèse à l'obscurité

Dans les conditions expérimentales *Phomopsis mali* en culture pure et en absence de lumière ne réalise pas la pycnogenèse. Cependant lorsqu'il se trouve en culture mixte avec certains microorganismes, champignons ou bactéries, il peut réaliser sa pycnogenèse.

Nous avons cultivé dans les mêmes boîtes de Petri *Phomopsis mali* avec *Sterigmatocystis nigra*, *Penicillium italicum*, *Phoma* sp. et deux Bactéries de la flore banale de l'eau de la ville d'Alger. Ces champignons sont capables de fructifier en obscurité. Dans tous les cas nous avons constaté après un mois de culture en obscurité la formation de «grosses pycnides» superficielles p accées de préférence dans la zone de contact entre les deux microorganismes. Durant ce même temps les lots témoins ne donnent pas des pycnides. On a constaté encore que *Sterigmatocystis nigra* est le plus efficace pour réaliser l'induction à l'obscurité de la pycnogenèse de *Phomopsis mali*.

Il est bien connu qu'il ne se forme pas d'anastomoses entre champignons d'espèces différentes (LANGERON et VANBEREUSEGHEM 1952). Nous avons de plus cherché des anastomoses entre ces espèces en culture mixte, mais nous n'avons pas pu en décéler.

Tout se passe donc comme si une substance diffusant à partir du mycélium capable de fructifier en obscurité, passait dans le milieu de culture, puis dans le mycélium de *Phomopsis mali* pour provoquer sa pycnogenèse.

Lorsque de telles cultures mixtes de *Phomopsis mali* et *Sterigmatocystis nigra* sont exposées à la lumière, il se forme de «grosses pycnides» et de «petites pycnides» sur le mycélium de *Phomopsis mali*. Cependant une zone entourant les «grosses pycnides» s'en trouve totalement dépourvue. Il apparaît donc que la présence des «grosses pycnides» inhibe la formation des «petites pycnides».

Conclusion et discussion générales

Les résultats ci-dessus mettent en évidence l'importance de la lumière dans la pycnogenèse de *Phomopsis mali*; en effet cultivé seul et en obscurité il ne forme pas de pycnides; il a besoin de la lumière pour son induction. Ce champignon se comporte à cet égard comme *Ascochyta pisi* (LEACH 1962b), *Trichoseptoria fructigena* (EMMANOULIDIS 1970), *Septoria nodorum* (CALPOUZOS et LAPIS 1970), *Septoria tritici* (COOK et GARETH 1970) et *Diplodia natalensis* (EMMANOULIDIS et CORNIC, résultats non publiés).

L'influence de l'intensité lumineuse déjà étudiée par d'autres auteurs (RICHARDS 1951, CALPOUZOS et LAPIS 1970), a permis ici de distinguer la formation de deux sortes de pycnides induites à des niveaux d'énergie lu-

mineuse différents: des »grosses pycnides« et des »petites pycnides«. Les »grosses pycnides« sont analogues à celles que le champignon forme habituellement dans son habitat naturel. Ces deux sortes de pycnides sont physiologiquement différentes; en effet les »grosses pycnides« sporulent dans les conditions de notre salle de culture alors que les »petites pycnides« dans les mêmes conditions ne sporulent jamais.

L'expérience décrite par la fig. 2 suggère que la lumière induit dans le mycélium des modifications qui préparent un processus conduisant à la pycnogenèse, et que ces modifications se conservent à l'obscurité; il semble donc que la lumière provoque dans le mycélium une modification durable du métabolisme (CARLILE 1965).

D'autre part nos résultats montrent également qu'il est possible d'obtenir la pycnogenèse chez *Phomopsis mali* à l'obscurité en présence d'autres microorganismes champignons ou bactéries. Dans ce cas les pycnides formées sont semblables à celles qui apparaissent sous faibles éclairagements. Etant donné que les mycéliums d'espèces fongiques différentes ne forment pas d'anastomoses entre eux on est amené à supposer l'existence d'une substance inductrice de la pycnogenèse émise par les champignons fructifiant à l'obscurité et remplaçant le rôle joué par la lumière. D'après nos expériences il est évident qu'une telle substance ne serait pas spécifique d'une espèce fongique ni même des champignons seulement.

Il est donc probable que la lumière puisse modifier le métabolisme par l'intermédiaire d'une substance particulière dont elle provoquerait la synthèse. TRIONE *et al.* (1966), par ailleurs, ont isolé une substance chez plusieurs champignons avec un pic d'absorption caractéristique à 310 nm; cette substance appelée »P310« se formerait dans le mycélium éclairé et dans quelques champignons sporulant à l'obscurité. Cependant cette substance ne diffuse pas dans le milieu de culture; de plus VARGAS et WILCOXSON (1969) utilisant »P310« n'obtiennent aucune fructification chez *Helminthosporium dictioides*. Il semble qu'il faille d'autres recherches avant que la nature exacte des substances inductrices soit bien connue.

L'étude des photopériodes de longueurs différentes indique l'action spécifique de chaque photopériode utilisée; de plus elle montre que le rendement de la lumière augmente progressivement avec la longueur de la photopériode; vers la fin de la croissance elle atteint un maximum dans la photopériode de 16 h. Pour des durées journalières d'éclairément supérieures à 16 h, la lumière n'est plus utilisée avec la même efficacité. On peut supposer qu'alors, une réaction couplée à la réception de l'énergie tend à devenir limitante.

Il est vraisemblable que le récepteur de l'énergie lumineuse absorbe préférentiellement dans les proches U.V.; en effet les effets de ces longueurs d'ondes sur la sporulation des champignons sont bien connus (LEACH 1963, 1964 et 1968).

Enfin au cours de ces manipulations on a pu constater qu'un traumatisme du mycélium favorisait la formation des »grosses pycnides« sur la zone laissée du mycélium favorisait la formation des »grosses pycnides« sur la zone laissée sous fort éclairément. La proximité d'une paroi favorise également la production des »grosses pycnides«.

Ces études soulignent l'importance de la lumière dans la pycnogenèse de *Phomopsis mali*, et montre qu'il est vraisemblable qu'elle implique l'intervention d'une substance spécifique induisant la formation des pycnides.

Cependant ces études demandent à être complétées, en effet dans quelle mesure la substance mise en évidence ici correspond à »P310« décrite par TRIONE *et al.* (1966) et quelle serait sa nature. D'autre part dans quelle mesure la différence physiologique observée sur les pycnides concernant la sporulation se traduit-elle sur le plan anatomique? Doit on, enfin envisager des substances inductrices différentes, induisant les différentes formes des pycnides?

Bibliographie

- CALPOUZOS, L., LAPIS, D. B.: Effects of light on pycnidium formation, sporulation and tropism by *Septoria nodorum*. — *Phytopathology* **60** : 791–794, 1970.
- CARLILE, M. J.: The photobiology of fungi. — *Annu. Rev. Plant Physiol.* **16** : 175–202, 1965.
- COOK, B. M., GARETH JONES D.: The effect of near ultraviolet irradiation and agar medium on the sporulation of *Septoria nodorum* and *Septoria tritici*. — *Trans. Brit. mycol. Soc.* **54** : 221–226, 1970.
- EMMANOULIDIS, I.: Induction de la formation des pycnides et des spores chez *Trichoseptoria fructigena* MAUBL. en milieu de culture artificielle. — *Bull. Soc. Mycol. France* **86** : 269–275, 1970.
- JOLY, P.: Recherches sur les genres *Alternaria* et *Stemphylium*. III, Action de la lumière et des Ultraviolets. — *Rev. Mycol.* **22** : 1–16, 1962.
- LANGERON, M., VANBEREUSEGHEM, P.: Précis de Mycologie. — Masson Ed., Paris 1952.
- LEACH, C. M.: Sporulation of diverse species of fungi under near ultra-violet radiation. — *Can. J. Bot.* **40** : 151–161, 1962 (a).
- LEACH, C. M.: The quantitative and qualitative relationship of ultra-violet and visible radiation to the induction of reproduction in *Ascochyta pisi*. — *Can. J. Bot.* **40** : 1577–1602, 1962 (b).
- LEACH, C. M.: The qualitative and quantitative relationship of monochromatic radiation to sexual and asexual reproduction of *Pleospora herbarum*. — *Mycologia* **55** : 151–153, 1963.
- LEACH, C. M.: The relationship of visible and ultra-violet light to sporulation of *Alternaria chrysanthemi*. — *Trans. Brit. mycol. Soc.* **47** : 333–344, 1964.
- LEACH, C. M.: An action spectrum for light inhibition of the "terminal phase" of photosporogenesis in the fungus *Stemphylium botryosum*. — *Mycologia* **60** : 532–546, 1968.
- NEERGAARD, P.: Detection of seed-borne pathogens, Lecture Notes. — Institut of seed pathology for developing countries, Copenhagen 1971.
- ONESIROSAN, P. T., BANTTARI, E. E.: The effect of light and temperature upon sporulation of *Helminthosporium teres* in culture. — *Phytopathology* **59** : 906–909, 1969.
- RICHARDS, G. S.: Factors influencing sporulation by *Septoria nodorum*. — *Phytopathology* **41** : 571–578, 1951.
- STEVENS, F. L.: Effects of ultra-violet radiation of various fungi. — *Bot. Gaz.* **86** : 210–225, 1928.
- TRIONE, E. J., LEACH, C. M., MUTCH, J. T.: Sporogenic substances isolated from fungi. — *Nature* **212** : 163–164, 1966.
- TRIONE, E. J., LEACH, C. M.: Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. — *Phytopathology* **59** : 1077–1083, 1969.
- VARGAS, J. M., JR., WILCOXSON, R. D.: Some effects of temperature and radiation on sporulation by *Helminthosporium dictyoides* on agar media. — *Phytopathology* **59** : 1706–1712, 1969.
- ZIMMER, R. C., MCKEEN, W. E.: Interaction of light and temperature on sporulation of the carrot foliage pathogen *Alternaria dauci*. — *Phytopathology* **59** : 743–749, 1969.

I. EMMANOULIDIS, G. CORNIC, Laboratoř fytopatologie INA. Alžír: Tvorba pyknidií u *Phomopsis mali*. — *Biol. Plant.* **16** : 50–56, 1974.

Světlo indukovalo tvorbu pyknidií u *Phomopsis mali*. Tato indukce se udržovala i ve tmě. Podle intensity světla se měnil tvar a množství pyknidií i jejich fyziologické vlastnosti. Při kultivaci ve tmě v přítomnosti jiných mikroorganismů (hub nebo bakterií) *Phomopsis mali* vytvářela pyknidie podobné jako při nízkém osvětlení. Pokusy prokázaly existenci různých faktorů indukujících tvorbu pyknidií, a to pyknidií různého charakteru.