

INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA FORMATION ET LA GERMINATION *IN VITRO* DES CHLAMYDOSPORES DU *PHYTOPHTHORA PALMIVORA*

B. HUGUENIN

Office de la Recherche scientifique et technique Outre-Mer,
Laboratoire de Phytopathologie,
Centre de Brazzaville, B. P. n° 181 (République Populaire du Congo)

RÉSUMÉ

L'auteur analyse quelques facteurs susceptibles d'influer sur la formation des chlamydospores par une souche de *Phytophthora palmivora*. La température optimum de formation est ainsi de 18°C et le pH du milieu n'a qu'une influence minime entre pH 4,5 et 7,5. Le rôle le plus important est assigné au rapport C/N du milieu dans la mesure où il conditionne, par son influence sur la composition cytoplasmique de la spore, son comportement ultérieur au cours de la germination. Le taux de germination sur divers milieux est établi pour les chlamydospores de la souche testée.

INTRODUCTION

La compréhension des facteurs écologiques susceptibles d'influencer le déroulement de la phase saprophytique du cycle du *Phytophthora palmivora* est la clé de toute possibilité d'intervention à ce niveau. On se retrouve toujours, en effet, quelles que soient les souches parasites envisagées, confronté aux problèmes de survie du champignon en absence de la plante hôte et de son comportement face aux conditions de milieu qu'il rencontre. TSAO (1970), en regroupant les informations connues sur le comportement saprophytique du *Phytophthora parasitica*, a pu souligner le rôle important joué au cours de cette phase par les chlamydospores, considérées comme organes de résistance et de conservation et délimiter les lacunes de nos connaissances

sur cette forme sporale des *Phytophthora*. D'autres études avaient, par ailleurs, permis de mieux connaître certains aspects de la formation ou du comportement de ces organes chez d'autres espèces de *Phytophthora* (MIRCETICH et ZENTMYER, 1967-1970 ; TSAO, 1967 ; TSAO et BRICKER, 1968 ; RIOU et RAVISÉ, 1970).

Nous avons repris l'étude de certains aspects de la formation, du comportement et du devenir des chlamydospores chez le *Phytophthora palmivora* et ce sont les premiers résultats de ces études qui sont exposés ici.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

La souche utilisée au cours de cette étude (souche COB 148) a été isolée en 1968 d'un chancre d'Oranger greffé sur Mandarinier Cléopâtre à la station fruitière de Loudima (Rép. Pop. du Congo). Elle est représentative d'un des types morphologiques et parasitaires prédominant au Congo sur Agrumes. Par nombre de ses caractères elle apparaît comme intermédiaire entre les *Phytophthora palmivora* et *parasitica* typiques. Toutefois certains aspects physiologiques de son comportement (optimum thermique de croissance, production précoce de chlamydospores) ont conduit à l'identifier au *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL.

Toutes les cultures ont été réalisées sur le milieu minéral suivant :

PO ₄ HK ₂	0,2 g	SO ₄ Mg, 7 OH ₂	0,2 g	D-Glucose	10,0 g
PO ₄ H ₂ K	0,8 g	CO ₃ Ca	0,2 g	Thiamine	0,002 g
SO ₄ K ₂	0,5 g	NO ₃ K	1,0 g	β-Sitostérol	0,020 g

Une solution oligodynamique est ajoutée au milieu, calculée pour apporter, par litre de milieu définitif :

FeSO ₄ , 7 OH ₂	0,5 mg	MnCl ₂ , 7 OH ₂	0,02 mg
ZnSO ₄ , 7 OH ₂	0,5 mg	TiSO ₄ , 5 OH ₂	0,02 mg
CuSO ₄ , 7 OH ₂	0,02 mg	Mo ₇ (NH ₄) ₆ , 4 OH ₂	0,02 mg

Le stérol est apporté au milieu, avant autoclavage, en solution dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO) qui en assure une répartition homogène sous forme de suspension colloïdale.

Le milieu de base ainsi défini possède un rapport C/N de 28,9. Ce rapport a pu être modifié pour certaines études en modulant l'apport d'azote ou de glucose. Lorsque d'autres sources d'azote que le nitrate de potassium ont été utilisées, elles étaient calculées pour fournir 138,5 mg d'azote par litre de milieu, soit l'équivalent de 1,0 g de nitrate de potassium.

Pour l'étude du pH, ce milieu a été tamponné au mélange de McIlvaine : acide citrique 0,1 M et phosphate disodique 0,2 M, le pH étant ajusté avant autoclavage. Le milieu non tamponné a normalement un pH de 6,3.

Toutes les cultures, sauf exception signalée, ont été menées sur 25 ml de milieu en Erlenmeyers de 100 ml. Elles ont été maintenues à l'obscurité dans une chambre de culture réglée à 20°C, pour réduire l'interférence de la production de sporocystes. Toutefois le rôle de la température a été étudié, sur le même milieu gélosé à 15 g/l, dans une batterie d'étuves réglées à 0,5°C près.

A la fin de la période de culture, la totalité du mycélium, ou un aliquot de poids connu, est prélevé et broyé dans 10 ml d'eau formolée (ce qui permet une conservation indéfinie du broyat). Le nombre de chlamydospores par mm³ de broyat est ensuite estimé à l'hématimètre, vingt comptages étant menés à bien pour chaque répétition.

Après lavage du mycélium, broyage dans l'eau stérile et filtration du broyat sur un filtre métallique à mailles de 100 microns, il est possible de récupérer les chlamydospores à la micropipette pour les déposer sur un milieu gélosé. Cette technique a été utilisée pour estimer le pourcentage de germination des chlamydospores produites dans diverses conditions de culture.

Enfin la croissance du thalle a été estimée soit par détermination du poids sec, soit par dosage des protéines mycéliennes par la méthode de Lowry. Les ions nitriques ont été dosés dans le milieu de culture, soit par distillation après réduction au Dewarda, soit par la méthode colorimétrique de FISHER (1958) à la brucine.

RÉSULTATS

A. — *Chronologie de la chlamydogénèse*

Dans les conditions de culture utilisées, la chlamydogénèse débute précocement, dès le troisième jour, mais la courbe représentative des chiffres du tableau 1 (fig. 1, courbe 3) manifeste une phase d'accélération prolongée correspondant, en fait, à la période de croissance mycélienne active mise en évidence par l'évolution des protéines mycéliennes (fig. 1, courbe 2) et celle du substrat azoté du milieu de culture (fig. 1, courbe 1).

Ce n'est qu'à la fin de cette période trophique, soit vers le vingtième jour de culture, que se déclenche la phase exponentielle de la chlamydogénèse qui s'achève, vers le trente-cinquième jour, par une stabilisation du nombre de chlamydospires formées. Les processus de croissance active et la chlamydogénèse proprement dite apparaissent donc comme des phénomènes séparés dans le temps. Il semble ainsi probable que le nombre de chlamydospires formées puisse dépendre du niveau de croissance atteint par le mycélium au cours de la phase trophique ; et par conséquent être modifié par l'action des divers facteurs susceptibles d'influencer cette croissance mycélienne.

B. — *Influence des facteurs physiques sur la chlamydogénèse*1. *Température.*

Chez la souche étudiée, les températures optimales pour la formation des chlamydospires sont assez étroitement définies. Après vingt-deux jours de culture, le maximum de formation est en effet obtenu pour une température relativement basse, voisine de 18°C (tabl. 2). Au-dessus de 22°C la chlamydogénèse devient pratiquement nulle, alors que la production de sporocystes, si les conditions d'illumination sont suffisantes, devient prépondérante. De même, le nombre important de chlamydospires observé à 12°C manifeste l'indépendance relative de la chlamydogénèse et des processus de croissance mycélienne, ceux-ci étant, pour cette température, fortement ralentis.

Il convient de noter que, pour cette souche, l'optimum thermique de croissance se situe à 27°C (RAVISÉ et BOCCAS, 1970) qui correspond également à l'optimum de formation des sporocystes.

2. *Influence du pH sur la chlamydogénèse.*

En milieu tamponné au mélange de McIlvaine, après quinze et vingt-cinq jours de culture, les résultats du tableau 3 manifestent un optimum pour un pH initial voisin de 6, la demi-réponse étant étalée entre pH 4,5 et 7,0. Sur milieu non tamponné, après seulement cinq jours de culture, l'optimum se manifeste pour un pH initial

TABLEAU I

*Chlamydogénèse de la souche COB 148 en fonction du temps de culture.
Évolution des protéines mycéliennes et de l'azote nitrique du milieu de culture
(dosage à la brucine)*

Nombre de jours	Chlamydo-spores (nbre/mm ³ de broyat)	Protéines (µg/ml de broyat)	N résiduel (µg/ml de milieu)
0	—	—	138,5
2	—	7,3	—
3	2,5	—	—
5	3,7	—	133,0
6	—	8,3	—
8	4,0	11,2	—
9	5,0	—	—
10	—	12,1	97,0
11	6,8	—	—
13	7,8	—	—
15	11,5	—	57,0
16	—	34,1	—
17	13,0	—	—
18	—	37,5	—
20	14,0	37,8	35,0
22	—	42,1	—
24	—	46,8	—
25	22,2	—	28,0
26	—	43,6	—
30	57,6	—	28,0
35	68,9	—	—

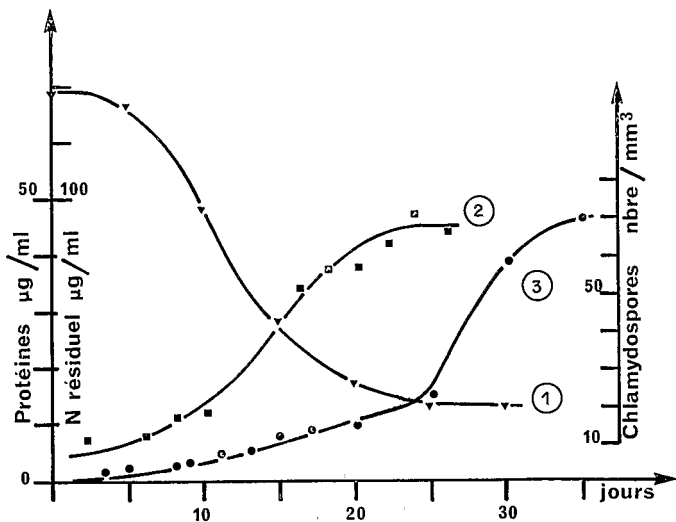


FIG. 1. — Évolution en fonction du temps de culture de l'azote nitrique du milieu (courbe 1), de la teneur en protéines mycéliennes (courbe 2) et du nombre de chlamydo-spores (courbe 3)
Culture stationnaire à 20°C sur 25 ml de milieu

de 6,3 alors que le pH réel du milieu à ce moment est de 5,0 (tabl. 3). Cependant le déclenchement lui-même de la chlamydogénèse apparaît, à trois jours sur ce même milieu non tamponné, comme relativement indépendant du pH entre les limites 4,0-7,0.

TABLEAU 2

*Influence de la température sur la chlamydogénèse de la souche COB 148
après 22 jours de culture
(milieu minéral gélosé à 15 g/l)*

Température (°C)	12	18	22	24	26	28	30	33
Chlamydospores (nbre/mm ³ broyat)	9,3	10,6	4,4	2,1	2,4	1,5	0,3	0,2

TABLEAU 3

Influence du pH du milieu de culture sur la chlamydogénèse de la souche COB 148

pH initial	Milieu de culture tamponné				Milieu de culture non tamponné			
	15 jours		25 jours		3 jours		5 jours	
	pH _r	Chlamyd.	pH _r	Chlamyd.	pH _r	Chlamyd.	pH _r	Chlamyd.
3,1	3,3	0	3,3	0	—	—	—	—
4,1	4,8	0,5	6,3	1,9	—	—	—	—
4,9	—	—	—	—	3,9	0,7	4,2	0,7
5,2	6,1	0,9	6,8	3,2	—	—	—	—
5,4	—	—	—	—	4,3	1,1	4,6	1,3
6,1	6,1	0,7	6,9	3,8	—	—	—	—
6,3	—	—	—	—	5,0	1,0	4,8	3,1
6,9	6,9	0,5	6,9	2,5	—	—	—	—
1,0	—	—	—	—	5,9	1,2	5,0	2,0
1,4	—	—	—	—	6,2	1,2	5,2	1,6

3. Influence de l'aération du milieu sur la chlamydogénèse.

En culture agitée, la production de chlamydospores par le *Phytophthora palmivora* reste toujours nulle, quel que soit le temps de culture. TSAO (1967) a, par ailleurs, montré que, chez le *Phytophthora parasitica*, la mise en semi-anaérobiose du mycélium entraînait le déclenchement de la chlamydogénèse. Toutefois CHEE (1973) n'a pu confirmer ce résultat chez une souche Hévée du *Phytophthora palmivora*.

Nous avons essayé de modifier les conditions d'aération du mycélium en augmentant l'épaisseur du milieu de manière à réduire la tension en oxygène des couches profondes. La souche COB 148 a donc été cultivée sur 100 ml de milieu, dans les mêmes

conditions que précédemment et nous avons estimé la croissance mycélienne par la variation du poids sec et la vitesse de disparition du substrat azoté.

Les chiffres du tableau 4 comparés à ceux du tableau 1, montrent que, dans ces conditions, la chlamydogénèse entre plus précocement en phase exponentielle (à partir du dixième jour de culture : fig. 2, courbe 3) et s'achève pratiquement en même temps que l'utilisation de l'azote du milieu (fig. 2, courbe 1) et les processus métaboliques de croissance tels que ceux manifestés par l'évolution du poids sec de mycélium (fig. 2, courbe 2).

TABLEAU 4

*Chronologie de la chlamydogénèse en culture sur milieu profond.
Évolution du poids sec du mycélium et de l'azote nitrique du milieu de culture
(dosage par distillation après réduction au Dewarda)*

Nombre de jours	Chlamydozoaires (nbre/mm ³ de broyat)	Poids sec du mycélium (mg)	N résiduel (µg/ml de milieu)
0	—	—	138,5
5	4,3	45,6	129,1
10	11,4	117,1	110,2
15	36,3	171,9	90,8
20	77,2	241,7	34,5
30	85,7	324,1	12,1

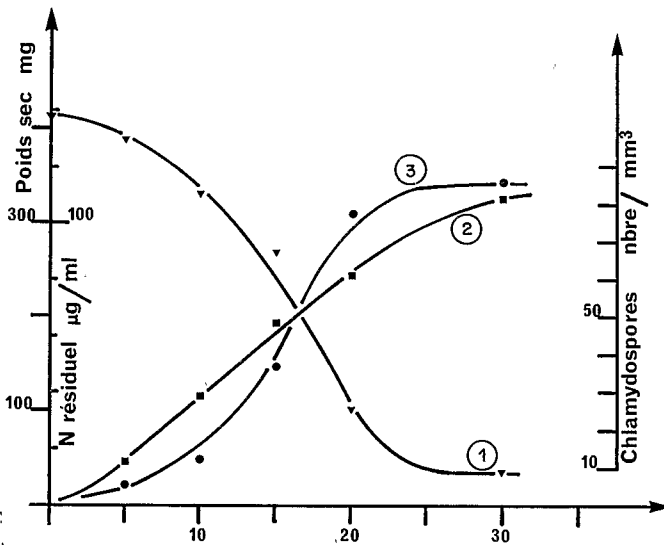


FIG. 2. — Évolution en fonction du temps de culture de l'azote nitrique du milieu (courbe 1), du poids sec du mycélium (courbe 2) et du nombre de chlamydozoaires (courbe 3)

Culture stationnaire à 20°C sur 100 ml de milieu (culture en milieu profond)

C. — Influence des facteurs chimiques du milieu sur la chlamydogénèse

1. Rôle des stérols.

On connaît bien actuellement (LILLY, 1966) la dépendance étroite des *Phytophthora* vis-à-vis des stérols, en ce qui concerne leur reproduction sexuée ou asexuée. Le développement mycélien, en revanche, apparaît comme indépendant d'un apport exogène de stérols, ce que manifeste aussi la tolérance des Pythiacées aux antibiotiques polyéniques.

Les chiffres du tableau 5 montrent que la souche testée présente, pour sa chlamydogénèse, une dépendance totale à l'égard des stérols, la faible formation résiduelle, en milieu sans stérol, étant explicable par le léger apport de l'inoculum.

TABLEAU 5

Influence des stérols sur la chlamydogénèse

Nombre de jours de culture		8	15	25	30	35	42
Chlamydospires (nbre/mm ³ de broyat)	Milieu + Stérol	4,0	11,5	22,2	57,6	68,9	—
	Milieu — Stérol	0,3	1,0	—	4,0	4,4	4,4

2. Influence de la nature de la source d'azote sur la chlamydogénèse.

Six sources d'azote différentes ont été testées, sur la base d'un rapport C/N de 28,9, le carbone apporté par les sources d'azote organique n'étant pas pris en compte pour ce calcul (l'influence de ce carbone additionnel reste toutefois faible et les C/N réels sont de 29,3 pour l'urée et 30,6 pour l'asparagine et l'hydrolysate de caséine).

Le tableau 6 montre, qu'après vingt-huit jours de culture, quatre substrats sont équivalents, en ce qui concerne la chlamydogénèse : nitrate de potassium, nitrate d'ammonium, L-asparagine et urée. Le sulfate d'ammonium apparaît comme néfaste en raison probablement de la toxicité de l'ion NH⁺, alors que l'hydrolysate de caséine apte à promouvoir une croissance mycélienne importante, se révèle comme la source azotée la plus favorable à une chlamydogénèse abondante.

TABLEAU 6

Influence de la nature de la source d'azote sur la chlamydogénèse à 28 jours de culture

Source d'azote dosée à 138,5 mg/l de N	Chlamydospires (nbre/mm ³ de broyat)
Nitrate de potassium	38,6
Sulfate d'ammonium	1,2
Nitrate d'ammonium	44,0
L-asparagine	46,7
Urée	48,4
Hydrolysate de caséine	108,0

3. Relation entre la chlamydogénèse et le rapport C/N du milieu de culture.

Pour un niveau donné d'alimentation azotée, sauf en ce qui concerne l'hydrolysate de caséine, la chlamydogénèse nous est apparue précédemment comme relativement indépendante de la source d'azote utilisée. Toutes les expériences précédentes ayant fait appel à un rapport C/N constant de 28,9, il était intéressant de voir si une modification du métabolisme du champignon, par le biais d'une altération du C/N du milieu, pouvait influencer sur la formation des chlamydo-spores. On sait, en effet (BRIDGE COOKE, 1968) que si un C/N de 10-12 est optimum pour la croissance et les synthèses azotées d'un champignon, au-dessus de 15 on assiste à une formation préférentielle de composés carbonés complexes et, en particulier, de composés à haut pouvoir énergétique (glucides complexes et lipides).

Dans le cas de la souche étudiée, si on module la source d'azote (nitrate de potassium) pour obtenir des C/N étalés entre 5 et 100, on constate (tabl. 7) que ce sont les C/N supérieurs à 15 qui sont apparemment les plus favorables à la chlamydogénèse. En particulier, si on considère le rendement de la chlamydogénèse par rapport à la consommation d'azote (nombre de chlamydo-spores formées par μg d'azote consommé) un optimum se dégage nettement, à vingt-cinq jours, pour un C/N voisin de 30 (fig. 3). Par ailleurs, un examen des chiffres du tableau 7 montre que, ici encore, la production exponentielle des chlamydo-spores suit l'épuisement en azote du milieu de culture, pratiquement réalisé en quinze à vingt jours.

TABLEAU 7

Influence du rapport C/N du milieu de culture sur la chlamydogénèse de la souche COB 148 à 15, 20 et 25 jours

C/N	N initial (mg/l)	N consommé P. 100 N initial			Chlamydo-spores					
		15 j	20 j	25 j	nbre/mm ³ de broyat			nbre/ μg N consommé		
					15 j	20 j	25 j	15 j	20 j	25 j
5,0	792	18,5	21,7	22,9	2	11,6	25,4	0,01	0,07	0,14
10,1	396	25,5	37,3	39,1	2,5	19,5	55	0,02	0,13	0,35
15,6	256	37,1	64,0	64,0	8,3	38,5	74,9	0,09	0,23	0,46
28,9	138	58,8	74,7	79,8	10,8	31,8	72,4	0,13	0,30	0,66
50,6	79	84,8	94,9	94,9	10,5	24,8	31,9	0,16	0,33	0,42
102,5	39	89,7	95	95	3,2	8,2	14,4	0,09	0,22	0,39

Les conditions de C/N du milieu jouent donc un rôle important dans les phénomènes de chlamydogénèse par suite des modifications qu'elles entraînent dans le chimisme du champignon. Leur étude permet de soupçonner un rôle dynamique de l'azote dans ces processus, rôle double d'élément limitant d'une part, le nombre de chlamydo-spores formées dépendant apparemment du niveau de développement mycélien atteint, d'élément déclencheur d'autre part, la fin de la consommation d'azote coïncidant avec le déclenchement de la chlamydogénèse. C'est ce dernier rôle qu'il nous reste à analyser.

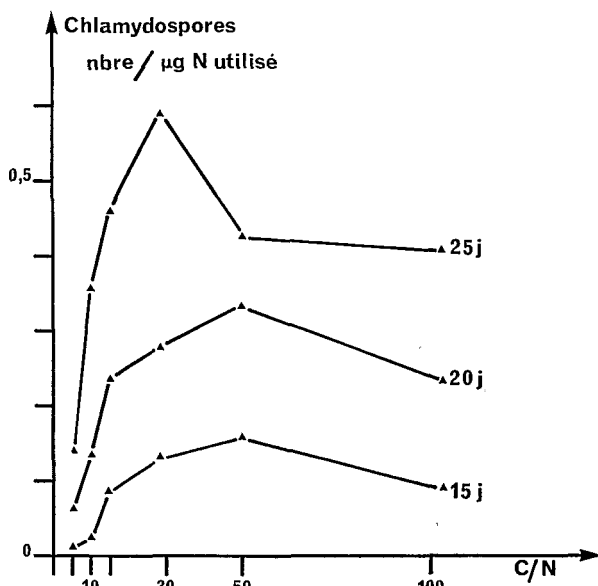


FIG. 3. — Influence du rapport C/N du milieu de culture sur le rendement en chlamydospores de la souche COB 148 par rapport à l'azote consommé après 15, 20 et 25 jours de culture

Culture stationnaire à 20°C sur 25 ml de milieu

4. Influence de la disparition de l'azote du milieu sur le déclenchement de la chlamydogénèse.

Nous avons, en culture sur 25 ml de milieu, remplacé après neuf jours de culture, le milieu initial soit par un milieu neuf normal, soit par un milieu neuf privé d'azote.

Dans le premier cas on observe un arrêt de la chlamydogénèse, la courbe de production présentant un palier qui correspond à un retard de cinq à six jours sur la courbe témoin (fig. 4, courbe 2). Ce retard correspond au temps nécessaire à une consommation de l'azote apporté jusqu'à un niveau identique à celui précédemment atteint. Il apparaît donc ici un antagonisme entre les chaînes métaboliques associées à la nutrition azotée et celles liées à la chlamydogénèse.

En revanche, si le milieu de remplacement est carencé en azote, on observe, toujours par rapport à la courbe témoin, une avance dans le temps de la chlamydogénèse, la phase exponentielle de production se déclenchant rapidement après la frustration en azote (fig. 4, courbe 3). Il faut noter cependant que, dans ce cas, le nombre de chlamydospores formé reste faible, en proportion du développement mycélien atteint au moment de la frustration (environ 30 p. 100 du nombre formé à trente jours en conditions de culture standard). Ce nombre reste d'ailleurs à peu près constant à partir du vingtième jour. Dans ce cas, la disparition de l'azote du milieu de culture ayant entraîné le blocage des chaînes métaboliques associées à la nutrition azotée, nous assistons à une reprise d'activité brutale de celles liées à la chlamydogénèse.

Mais nous avons vu précédemment que, dans le cas d'une culture sur milieu

profond (100 ml de milieu), la chlamydogénèse débute plus précocement que dans les conditions précédentes. Si, sur cette même culture, on supprime le substrat azoté du milieu (par remplacement de ce dernier à neuf jours par un milieu carencé en azote), on observe, contrairement aux résultats précédents, un ralentissement net de la courbe de formation (fig. 4, courbe 5) traduisant une baisse de rendement des processus de chlamydogénèse. Nous essayerons par la suite d'expliquer ces résultats en apparence contradictoires.

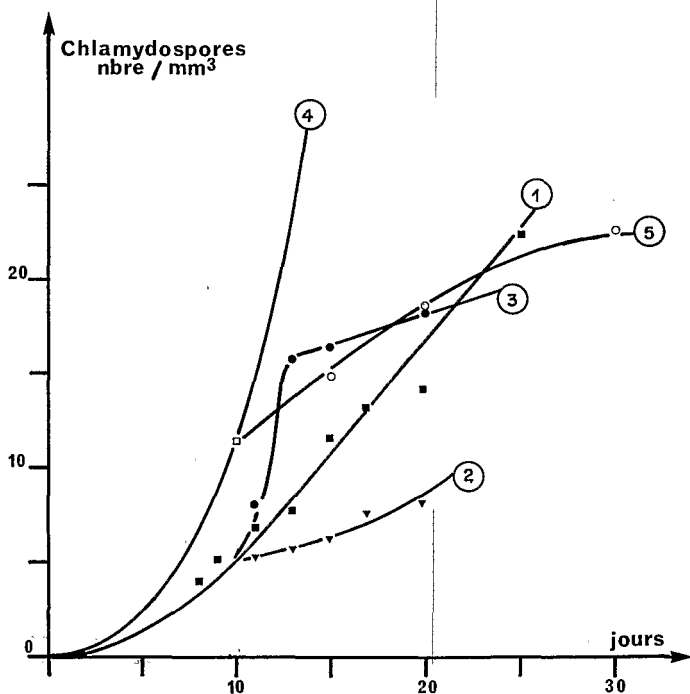


FIG. 4. — Influence sur la chlamydogénèse de la souche COB 148 d'une frustration en azote au 10^e jour de culture

- Courbe 1 : chlamydogénèse normale sur 25 ml de milieu complet.
 Courbe 2 : chlamydogénèse sur 25 ml de milieu complet renouvelé après les neuf premiers jours de culture.
 Courbe 3 : chlamydogénèse sur 25 ml de milieu complet durant les neuf premiers jours, puis sur milieu carencé en azote.
 Courbe 4 : chlamydogénèse normale sur 100 ml de milieu complet.
 Courbe 5 : chlamydogénèse sur 100 ml de milieu complet durant les neuf premiers jours, puis sur milieu carencé en azote.

D. — Influence des conditions de culture sur la germination des chlamydozoaires

Il nous est apparu précédemment que les facteurs chimiques du milieu de culture étaient susceptibles d'influencer fortement la chlamydogénèse. Il reste à voir si cette influence joue également sur le plan qualitatif et si les modifications du chimisme du champignon induites par celles du milieu de culture peuvent se répercuter sur la composition des chlamydozoaires et, partant, sur leur comportement

ultérieur. Par ailleurs, l'influence du milieu de germination lui-même se devait d'être étudiée pour pouvoir tenir compte des fluctuations qu'il est susceptible d'amener dans les taux de germination.

1. Influence du milieu d'étalement sur la germination des chlamydospores.

RIOU et RAVISÉ (1970) avaient obtenu, pour les chlamydospores de cette même souche COB 148, des taux de germination de 100 p. 100 après 24 heures sur un milieu complet (pois gélosé + lait de coco). Pour une autre souche du *Phytophthora palmivora*, sur eau gélosée, 45 p. 100 seulement des chlamydospores avaient germé après 48 heures. Nous avons, pour notre part, testé les milieux de germination suivants : eau gélosée, eau gélosée + thiamine, eau gélosée + L-asparagine, eau gélosée + L-asparagine + D-glucose. Les chiffres du tableau 8, relatifs à des chlamydospores formées sur un milieu de C/N 15, et prélevées à vingt jours de culture, montrent qu'elles sont capables de germer à 50 p. 100 en absence d'apport nutritif exogène. Un apport d'azote organique au substrat de germination se traduit par un abaissement important du taux de germination, ce qui correspond à un phénomène d'inhibition qu'il est cependant loisible de compenser par un apport simultané de glucose. Le taux de germination obtenu alors est identique à celui du témoin sur eau gélosée. Un test de χ^2 sur ces résultats montre que les traitements sont très significativement différents ($P < 0,001$).

TABLEAU 8

Germination à 48 heures des chlamydospores sur différents milieux
(Chlamydospores prélevées à 20 jours de culture sur milieu C/N 15)

Milieu de germination	Chlamydospores		
	Nbre testé	Nbre germé	Pourcentage de germination
Eau gélosée	1 063	546	51,3
Eau gélosée + Thiamine	441	217	49,2
Eau gélosée + Hydrolysate de caséine (350 p.p.m.-N)	1 585	307	19,6
Eau gélosée + L-asparagine $10^{-3}M$	539	185	32,4
Eau gélosée + L-asparagine $10^{-3}M$ + d-glucose (5 g/l) ..	496	257	51,8

2. Influence du C/N du milieu de production sur la germination.

Nous avons vu que les variations du rapport C/N du milieu de culture étaient aptes à provoquer des modifications de la composition des chlamydospores. RIOU et RAVISÉ (1970) étaient, par ailleurs, arrivés à la conclusion que la nature du milieu de culture n'exerçait aucune influence sur le comportement des chlamydospores. Mais les milieux qu'ils ont utilisés étaient le plus souvent des milieux naturels (pois

ou avoine gélosés) et leurs essais sur milieu minéral n'ont pas tenu compte des possibilités de variation de la composition de ce milieu.

Nous avons testé, à 48 heures, la capacité germinative sur eau gélosée de chlamydospores formées sur des milieux de C/N différents. Les meilleurs taux de germination ont été obtenus pour des C/N supérieurs à 15 (tabl. 9) et une analyse de χ^2 a montré que, si les traitements sont très significativement différents (P 0,001), il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus pour des C/N supérieurs à 15. Selon que le C/N du milieu de formation est supérieur ou inférieur à 15, les chlamydospores diffèrent donc par leur aptitude germinative, différence liée probablement à la nature ou à l'importance de leurs réserves énergétiques.

TABLEAU 9

Influence du rapport C/N du milieu de formation
sur la germination des chlamydospores à 48 heures sur eau gélosée

C/N	Taux de germination à 48 heures		
	Nbre testé.	Nbre germé	P. 100
5	188	84	44,7
15	1 063	546	51,3
30	196	154	78,6
50	103	85	82,5
100	101	74	74,0

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

De nombreux auteurs ont déjà souligné l'importance des facteurs physiques dans le déterminisme de la reproduction asexuée des *Phytophthora*. C'est ainsi que TSAO (1970) en distingue, pour des souches Agrume du *Phytophthora parasitica*, trois principaux au niveau du substrat sol : humidité, température, aération. Il définit l'optimum thermique de la chlamydogénèse, pour ces souches Agrume, comme notablement inférieur à celui de la croissance mycélienne ou de la reproduction par sporocystes. Cette action favorisante des températures basses joue tout particulièrement lorsque l'aération du mycélium est réduite, le plaçant ainsi en conditions de semi-anaérobiose (TSAO, 1967).

Les mêmes facteurs ont été étudiés par CHEE (1973) et KO et KADOOKA (1973) chez des souches de *Phytophthora palmivora* isolées respectivement d'Hévéa et de Papayer. Si les résultats des seconds sont en accord avec ceux de TSAO, CHEE, en revanche, a obtenu, pour sa souche Hévéa, des résultats opposés : stimulation de la chlamydogénèse par des températures élevées, influence défavorisante d'une semi-anaérobiose du milieu. Il semble donc que les exigences écologiques de la chlamydogénèse puissent varier, à l'intérieur d'une même espèce, selon l'origine géographique ou parasitaire des souches étudiées. Des études plus précises seraient toutefois nécessaires pour définir les limites exactes de cette variation en fonction de la spécialisation parasitaire et de l'origine géographique des souches.

Pour la souche Agrume du *Phytophthora palmivora* que nous avons utilisé, les exigences sont proches de celles des isolats de TSAO. L'optimum thermique de la chlamydogénèse, qui s'établit à 18°C, est bien inférieur à celui de la croissance mycélienne et de la reproduction par sporocystes (27°C selon RAVISÉ et BOCCAS, 1969) ou de la reproduction sexuée (20-25°C selon HUGUENIN et BOCCAS, 1971). L'effet stimulateur de la semi-anaérobiose sur la formation des chlamydospores est également net chez la souche que nous avons étudiée. Enfin, nous avons pu constater, en ce qui concerne l'action du pH que la chlamydogénèse proprement dite n'était que légèrement influencée, sur une gamme assez large, par les variations de ce facteur. L'optimum défini (vers pH 6,0-6,3) correspond en effet à celui de la croissance mycélienne et il semble probable, dans ces conditions, que la formation des chlamydospores dépende beaucoup plus de conditions endogènes du mycélium que des conditions de pH externes.

Lorsque les divers facteurs physiques ou physico-chimiques que nous venons d'évoquer se manifestent à leur optimum, le développement en culture de la souche testée présente les deux phases typiques définies par Bu'Lock (d'après TURNER, 1971) : une première phase, essentiellement trophique, au cours de laquelle on assiste à une croissance exponentielle du mycélium, correspondant à l'utilisation de l'azote du milieu et à la construction de l'architecture protéique du champignon, est suivie d'une seconde phase où se poursuit l'assimilation du carbone du milieu et, corrélativement, l'augmentation du poids sec. C'est au cours de cette phase que s'élaborent les produits carbonés complexes qui seront accumulés par le champignon et que débute le développement des chlamydospores. Celles-ci doivent donc refléter assez exactement, par leur composition chimique, les conditions de nutrition du mycélium. C'est ainsi que le rapport C/N du milieu, par l'orientation qu'il donne au métabolisme mycélien, influe assez fortement sur la production de chlamydospores. Nous avons vu que ce sont les C/N supérieurs à 15 qui sont les plus favorables à cette formation. On peut en déduire que les chlamydospores jouent probablement un rôle essentiel d'organes de réserves carbonées, leur teneur en protéines reflétant alors assez exactement, du point de vue quantitatif au moins, celle du mycélium qui leur a donné naissance. Le fait, par ailleurs, que les diverses sources azotées testées aboutissent à des productions équivalentes de chlamydospores, montre que la chlamydogénèse est relativement indépendante de la nutrition azotée. Dans cette optique, l'action stimulante de l'hydrolysate de caséine doit probablement être rapportée à l'apport, par cette source d'azote, d'acides aminés directement assimilables.

Ces considérations sur la formation et le rôle des chlamydospores trouvent une confirmation dans les résultats obtenus à propos de leur germination. MIRCETICH et ZENTMYER (1970), TSAO et BRICKER (1968), qui ont établi un schéma général de cette germination chez les *Phytophthora cinnamomi* et *parasitica*, ont montré que ces espèces requièrent, pour la germination des chlamydospores, une source exogène d'azote, sous forme d'acides aminés. Au contraire nous avons vu que, pour la souche COB 148 du *Phytophthora palmivora*, la présence d'acides aminés dans le milieu de germination se traduisait par une inhibition nette de la germination par rapport au témoin sur eau gélosée, cette inhibition pouvant cependant être levée par un apport de glucose dans le milieu. Il est probable que la présence d'acides aminés entraîne, en absence de carbone exogène et comme c'est le cas chez *Neurospora crassa* (COCHRANE, 1966), un blocage des synthèses protéiques associées à la germination. L'addition de glucose

au milieu permet, dans ce cas, le rétablissement de ces synthèses et une germination normale des chlamydo-spores. Le taux de germination obtenu alors étant identique à celui observé sur eau gélosée, il est clair que les chlamydo-spores de la souche étudiée sont aptes à germer sans apport nutritif exogène, résultat conforme à ceux de KADOOKA et KO (1973) et de CHEE (1973) relatifs à des souches isolées respectivement de Papayer et d'Hévéa.

On peut en conclure que les chlamydo-spores du *Phytophthora palmivora* comportent, dans leur cytoplasme, l'ensemble des réserves qui leur sont nécessaires pour faire face aux besoins énergétiques de la germination et aux premiers stades de développement ultérieur. Nous avons établi, par ailleurs, qu'une variation du rapport C/N du milieu entraînait, en modifiant l'orientation du métabolisme, une variation du nombre de chlamydo-spores formées. Les plus forts taux de germination étant liés, sur eau gélosée, à des C/N élevés des milieux de culture, il en résulte que c'est aux réserves carbonées plus importantes de ces chlamydo-spores qu'il convient d'accorder le rôle prééminent dans les processus de germination. Parallèlement à leur rôle de structures de conservation, les chlamydo-spores sont donc amenées à jouer celui d'organes de réserve et on comprend, dans ces conditions, pourquoi leur formation n'intervient massivement qu'après la modification profonde des processus métaboliques du champignon entraînée par l'épuisement de l'aliment azoté.

En effet, en culture normale sur 25 ml de milieu, une frustration brutale du mycélium en aliment azoté entraîne un déclenchement rapide de la phase exponentielle de la chlamydogénèse alors que si, au contraire, on renouvelle cet aliment azoté un délai supplémentaire intervient dans ce déclenchement. Par ailleurs, les courbes de la figure 1 montrent bien, qu'en conditions normales d'aération la chlamydogénèse ne débute qu'après l'épuisement presque total de l'aliment azoté du milieu. Ces faits nous permettent de mieux comprendre ce qui se passe en milieu profond lorsque le mycélium est placé en état de semi-anaérobie. La production de chlamydo-spores est alors plus précoce et débute bien avant l'épuisement de l'aliment azoté du milieu. Ceci suggère l'intervention, dans nos conditions expérimentales, d'un phénomène similaire à celui mis en évidence par WALKER et NICHOLAS (1961) chez le *Neurospora crassa* qui, dans les mêmes conditions, est capable de réduire les nitrates sans assimilation d'azote, l'ion nitrique jouant alors un simple rôle d'accepteur de protons autorisant ainsi, sous tension d'oxygène réduite, l'oxydation des substrats carbonés. Cette réduction non assimilatrice se traduirait, sur le plan métabolique, par un arrêt des synthèses protéiques sans blocage de l'assimilation carbonée, ce qui revient à se placer dans des conditions identiques à celles amenées par une frustration d'azote en milieu aéré. On sait d'autre part qu'en culture normale, l'augmentation du poids sec du mycélium est parallèle au déroulement de l'assimilation carbonée, se poursuivant bien après l'épuisement de l'aliment azoté et s'achevant pratiquement avec celui de l'aliment carboné. Pour la culture en milieu profond, au contraire, on constate que l'augmentation de poids sec reste parallèle à la consommation d'azote et s'achève en même temps qu'elle. Ce parallélisme se retrouve également pour la chlamydogénèse sur le même milieu. Il est donc vraisemblable que, dans ce cas, l'assimilation carbonée soit dépendante de l'utilisation, quelles que soient ses modalités, du substrat azoté du milieu, ce qui s'explique parfaitement par l'hypothèse que nous avons faite. Celle-ci permet également de comprendre pourquoi, quand on effectue une privation d'azote en milieu profond, on observe, par rapport au

témoin non modifié une diminution notable du nombre de chlamydospores : le champignon n'a, dans ce cas, aucune possibilité d'oxyder les substrats carbonés mis à sa disposition, l'ion nitrique accepteur de protons faisant défaut. Toute assimilation carbonée cesse ainsi que l'élaboration des matières de réserve. La formation de chlamydospores cessant aussi, elle apparaît, une fois de plus, comme directement liée à cette mise en place de matières de réserve carbonées. Cette hypothèse, qui permet une explication satisfaisante de l'ensemble des faits observés, reste cependant à contrôler sur le plan expérimental.

Quelles conclusions est-il possible de tirer, sur le plan écologique, de cet ensemble de résultats ? Parmi les facteurs dont nous avons étudié l'influence, on peut retenir, comme les plus susceptibles d'intervenir dans les substrats naturels, la température, l'aération, le pH et le rapport C/N. L'humidité du substrat, bien entendu, joue son rôle mais n'a pas été envisagée ici. Tous ces facteurs interviennent simultanément, et de manière complexe, sur le comportement dans le sol d'une souche de *Phytophthora palmivora*. La nutrition du mycélium, facteur déterminant de la sporulation, est influencée à la fois par le pH et le rapport C/N du milieu. Ce dernier facteur, par ailleurs, est susceptible d'intervenir dans le comportement ultérieur des formes sporales, en particulier des chlamydospores, par son influence sur la nature des réserves accumulées.

Si nous laissons de côté les facteurs purement physiques tels que la température ou l'humidité, l'intervention des facteurs chimiques ou physico-chimiques va se traduire par un développement mycélien plus ou moins abondant et une sporulation inégale. MIRCETICH et ZENTMYER (1968) ont déjà souligné la difficulté, voire l'impossibilité, d'interdire la germination des chlamydospores, éléments considérés par eux comme essentiels au maintien du potentiel infectieux d'un sol. Mais peut-être est-il possible d'intervenir plus tôt, au moment de la formation, en essayant de dévier, par des artifices cultureux, le métabolisme du champignon en voie de sporulation ? Il ne peut être question d'intervenir au niveau du pH du sol, la chlamydogénèse, nous l'avons vu, se faisant sur une gamme assez étendue de pH, d'autant qu'il est toujours loisible au champignon de trouver, au niveau de la microhétérogénéité de structure du sol, les conditions qui lui sont les plus favorables.

Une intervention au niveau du rapport C/N est, en revanche, peut être plus facile. Nous avons vu, en effet, que les rapports bas étaient relativement peu favorables à la chlamydogénèse, les spores formées ayant de plus des aptitudes germinatives affaiblies. En sols tropicaux, souvent caractérisés par des C/N relativement élevés, une accélération des processus de dégradation de la matière organique par d'autres organismes, que l'on sait provoquer par des artifices cultureux, aurait pour résultat une stabilisation plus rapide du C/N des couches superficielles du sol vers la valeur moyenne 10-12 et, par conséquent, une action directe sur la sporulation du champignon. TSAO (1970), dans un schéma général des interactions sol-champignon au cours de la phase saprophytique du *Phytophthora parasitica*, a déjà souligné l'importance, pour la mise en œuvre d'une lutte culturale efficace, de la connaissance des points faibles du cycle saprophytique du parasite. Il semble bien que le rapport C/N du substrat puisse constituer un de ces points faibles et qu'une intervention à ce niveau soit une des solutions à une lutte culturale contre les *Phytophthora* tropicaux.

SUMMARY

INFLUENCE OF CULTURAL FACTORS ON FORMATION OR GERMINATION *IN VITRO*
OF CHLAMYDOSPORES OF *PHYTOPHTHORA PALMIVORA*

The author studies some factors able to influence the formation of chlamydo-spores by a parasitic strain of *Phytophthora palmivora*. Optimum temperature was determined to be around 18°C and the medium pH has only a slight influence between pH 4,5 and 7,5. The most important action is assigned to the medium C/N ratio whose influence on cytoplasmic composition of the spore determines its behavior during germination. The germination rate is also established, on several media, for the chlamydo-spores of the studied strain.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BRIDGE COOKE W., 1968. Carbon/nitrogen relationships of fungus culture media. *Mycopathol. Mycol. appl.*, **34**, 305-316.
- CHEE K. H., 1973. Production, germination and survival of chlamydo-spores of *Phytophthora palmivora* from *Hevea brasiliensis*. *Trans. brit. mycol. Soc.*, **61**, 21-26.
- COCHRANE V. W., 1958. *Physiology of fungi*. John Wiley Edit., New York, 524 p.
- COCHRANE V. W., 1966. In MADELIN M. F., *The fungus spore*, Butterworths Edit., Londres, 201-213.
- FISHER F. L., IBERT E. R., BECKMAN H. F., 1958. Inorganic nitrate, nitrite or nitrate-nitrite rapid colorimetric determination of micrograms quantities in aqueous solutions. *Anal. Chem.*, **30**, 1972-1974.
- HUGUENIN B., BOCCAS B., 1971. Rôle de quelques facteurs dans la formation et la germination des oospores chez le *Phytophthora palmivora*. *Ann. Phytopathol.*, **3**, 353-371.
- KADOOKA J.-M., KO W. H., 1973. Production of chlamydo-spores by *Phytophthora palmivora* in culture media. *Phytopathology*, **63**, 559-562.
- LILLY V. G., 1966. In MADELIN M. F., *The fungus spore*, Butterworths Edit., Londres, 259-272.
- MIRCETICH S. M., ZENTMYER G. A., 1967. Production of oospores and chlamydo-spores of *Phytophthora cinnamomi* in roots and soil. *Phytopathology*, **57**, 100.
- MIRCETICH S. M., ZENTMYER G. A., 1970. In TOUSSOUN T.A., BEGA R.V., NELSON P.E., *Root diseases and soil borne pathogens*, Univ. Cal. Press, Berkeley, 112-115.
- MIRCETICH S. M., ZENTMYER G. A., KENDRICK J. B., 1968. Physiology of germination of chlamydo-spores of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **58**, 666-671.
- RAVISÉ A., BOCCAS B., 1969. Première liste annotée des Pythiacées parasites des plantes cultivées au Congo. *Cah. Maboké*, **7**, 41-69.
- RIOU S., RAVISÉ A., 1970. Étude des chlamydo-spores chez quelques espèces de *Phytophthora*. *Cah. Maboké*, **8**, 93-106.
- TSAO P. H., 1967. Production of chlamydo-spores of *Phytophthora parasitica* in liquid culture. *Ann. phytopathol. Soc. Japan*, **33**, 73.
- TSAO P. H., 1970. In CHAPMAN H., *1st int. Citrus Symp. Proc.*, Univ. Cal., 1221-1230.
- TSAO P. H., BRICKER J.-L., 1968. Germination of chlamydo-spores of *Phytophthora parasitica* in soil. *Phytopathology*, **58**, 1070.
- TURNER W. B., 1971. *Fungal metabolites*. Academic Press Edit. New York, 446 p.
- WALKER G. C., NICHOLAS D. J. D., 1961. An iron requirement for a dissimilatory nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Nature, London*, **189**, 141-142.

INFLUENCE DES CONDITIONS
DE CULTURE SUR LA FORMATION
ET LA GERMINATION *IN VITRO* DES CHLAMYDOSPORES
DU *PHYTOPHTHORA PALMIVORA*

B. HUGUENIN

*Office de la Recherche scientifique et technique Outre-Mer,
Laboratoire de Phytopathologie,
Centre de Brazzaville, B. P. n° 181 (République Populaire du Congo)*

Annales de Phytopathologie
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, 75007 Paris

10 JUIN 1976
O. R. S. I. O. M.
Collection de Référence
n° 8212 Phyto