

SUR LE DÉTERMINISME DE LA FORMATION DU PÉRITHÈCE CHEZ *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld et von Schrenk f. sp. *gossypii*

par

J. C. FOLLIN

Phytopathologiste
Station Centrale de BAMBARI

Ce travail a été réalisé en 1968 au Laboratoire de Biologie Expérimentale de la Faculté des Sciences d'ORSAY (Service de Cryptogamie).

INTRODUCTION

Les différents types de *Glomerella* isolés du cotonnier présentent tout d'abord sur milieu artificiel une forme mycélienne parfois stérile, parfois portant la forme imparfaite *Colletotrichum*. La forme sexuée apparaît plus tard avec des périthèces groupés en glomérules donnant un aspect tout à fait caractéristique à la culture (figure n° 1).

L'analyse mono-ascospore révèle dans les glomérules trois types de périthèces. La majorité est constituée par des périthèces comportant des asques à 8 ascospores dont 4 ascospores redonnant le type sauvage et 4 ascospores à l'origine de cultures d'un type nouveau caractérisé par la présence de très nombreux périthèces isolés, généralement stériles; quelques périthèces ont des asques à 8 spores redonnant le type nouveau. Enfin, plus rarement, certains présentent des asques à 8 spores du type sauvage.

Une culture mono-ascospore du type sauvage redonne le même phénomène, le type nouvellement apparu reste par contre parfaitement stable.

La confrontation de ces deux formes donne une ligne de périthèces, hybrides pour la plupart (figures n° 2 et n° 3).

Ce phénomène a été décrit pour la première fois par EDGERTON (4) en 1912. L'analyse génétique entreprise par ce dernier, poursuivie par LUCCAS, CHILTON (5) et surtout WHEELER (10, 11, 12) a montré que l'apparition de ce type nouveau avait son origine dans la mutation d'un gène qui fut localisé dans un groupe de liaison déterminé.

De nombreuses analyses de glomérules ont toujours indiqué la présence de ces deux types de souches dans des cultures provenant de semis mono-ascospores et il semble bien que cette mutation soit nécessaire à l'accomplissement de la sexualité dans les conditions de culture *in vitro*.

Par analogie avec les travaux de BLAKESLEE (2) sur les mucorales, EDGERTON employa le mot « hétérothallisme » pour désigner ce phénomène, appliquant

pour la première fois ce terme à un ascomycète. Il s'agit en fait d'un hétérothallisme bien particulier car une forme dérive d'une autre et la situation est différente dans le cas d'un hétérothallisme vrai où les formes complémentaires + et - sont indépendantes, comme cela fut décrit pour la première fois d'une manière précise par DODGE en 1920 pour *Ascobolus magnificus*

L'apparition régulière de cette mutation chez un champignon fréquemment isolé de plantules, de tiges et de capsules de cotonnier amène à reposer ce problème de base pour la compréhension de l'action de ce parasite important, l'hypothèse de départ étant qu'il ne s'agit pas d'une mutation au sens classique du terme, mais d'un changement de fonctionnement dans la régulation du métabolisme et que ce changement peut être facilement déclenché par des agents mutagènes, éventuellement même par des agents non mutagènes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La souche utilisée infectait à l'état latent les feuilles cotylédonnaires d'une plantule; cette souche ne présente pas d'acervules sur milieu PDA ni sur milieu avoine. Des spores caractéristiques de la forme imparfaite sont produites par des éléments mycéliens non différenciés. Il est possible d'obtenir des acervules sur lima bean agar; les glomérules sont volumineux pouvant atteindre 5 mm, de nombreux sclérototes sont également présents (figure n° 1). Les formes mutantes présentent des périthèces en majorité stériles, certaines sont cependant autofertiles. Les différentes formes sont cultivées sur milieu avoine à la température de 26°C, à l'obscurité. Cette souche fut utilisée après un clonage mono-ascospore; il s'agit d'une lignée de type sauvage.

Les irradiations ultraviolettes à 2600 Å sont utilisées comme agent mutagène, les doses employées varient de 50 à 3000 ergs/mm²/s. Les thalles sont irradiés à l'âge de 8 jours: 14 thalles par dose.

L'action d'agents non mutagènes comporte des chocs de température à 80°C et des alternances -20° + 40° pendant 10 jours, la température changeant toutes les 12 heures.

L'apparition de la forme mutante est appréciée par l'analyse des glomérules formés. Un certain nombre de périthèces de ces derniers sont prélevés et éclatés au centre d'une boîte de Pétri sur milieu gélosé dans une goutte d'eau; les spores sont ensuite étalées et on note la présence ou l'absence de la forme recherchée.

RÉSULTATS

Action des radiations ultra-violettes

INFLUENCE DE LA DOSE

La figure n° 4, le tableau I et le graphique I donnent une idée précise de la relation entre la dose d'U.V. employée et l'augmentation du nombre des glomérules.

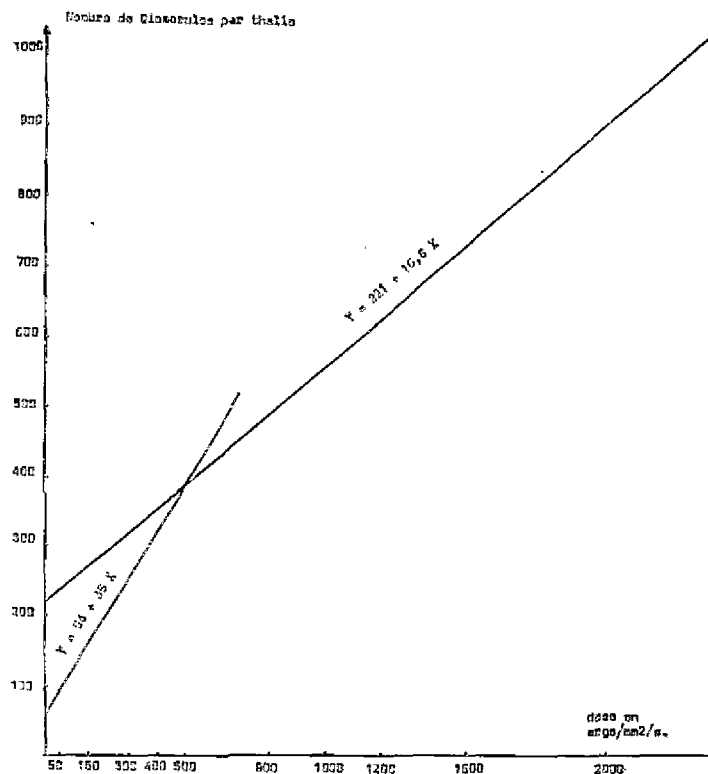
Il n'est pas possible de relier la courbe obtenue à une forme simple. Une analyse globale de régression linéaire ou curvilinéaire donne une image approximative des points situés après la dose de 500 ergs/mm²/s; par contre, si on analyse séparément les intervalles (50-500) et (500-2 000), on obtient deux droites de régression très bien ajustées à ces deux séries de points. Cette réponse différentielle est certainement due à la non-sensibilité des parties âgées du thalle aux doses faibles; en effet, jusqu'à 500 les glomé-

rules sont surtout répartis sur la périphérie alors qu'aux doses plus fortes la répartition est plus uniforme.

L'amortissement à 3 000 est lié à un problème d'espace, la culture est, en effet, pratiquement couverte de périthèces.

Tableau I. — Action de la dose d'U.V. sur le nombre de glomérules par thalle

Doses U.V. ergs/mm ² /s.	Nombre de glomérules par thalle
50	86
150	141
300	296
400	338
500	391
800	480
1000	560
1200	624
1500	740
2000	880
3000	1 020
Témoin	44



Graphique I. — Relation entre la dose de radiation U.V. (X) et le nombre de glomérules par thalle.

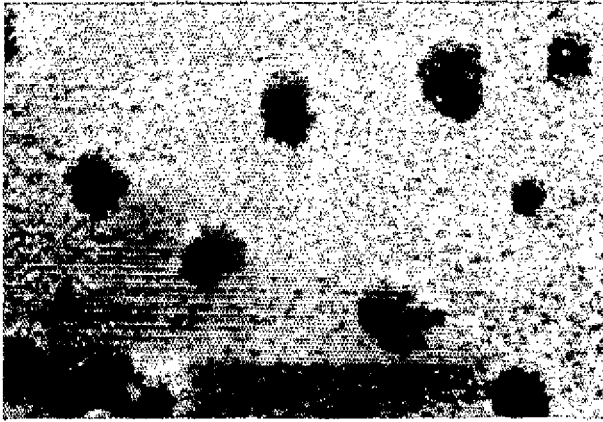


Fig. 1. - Glomérules de la forme sauvage, les points noirs minuscules représentant des sclérotés ($\times 5$ environ).

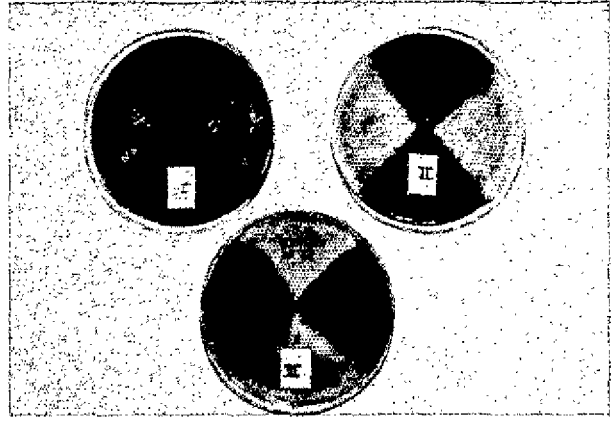


Fig. 2. - Croisement entre la forme sauvage et la forme mutante de différents types de *Glomerella* isolés du cotonnier.

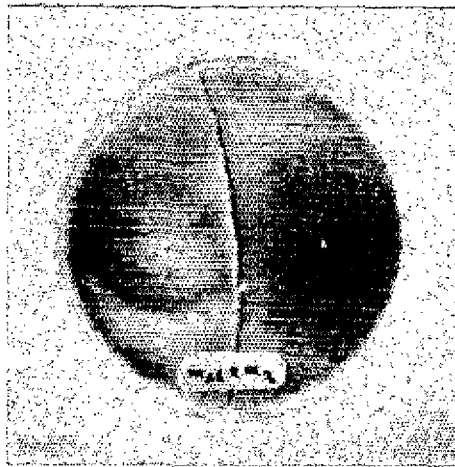


Fig. 5. - Formation de périthèces sur la ligne de confrontation des deux mutants artificiels, auto-stériles, obtenus à partir d'une souche mutante naturelle exceptionnellement auto-fertile.

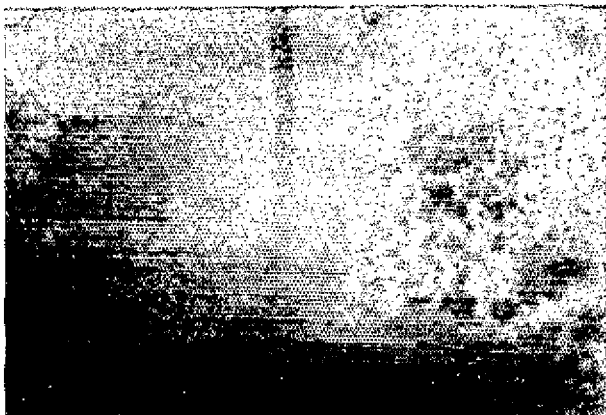


Fig. 3. - Détails de la photo n° 2; périthèces sur la ligne de confrontation des deux formes.

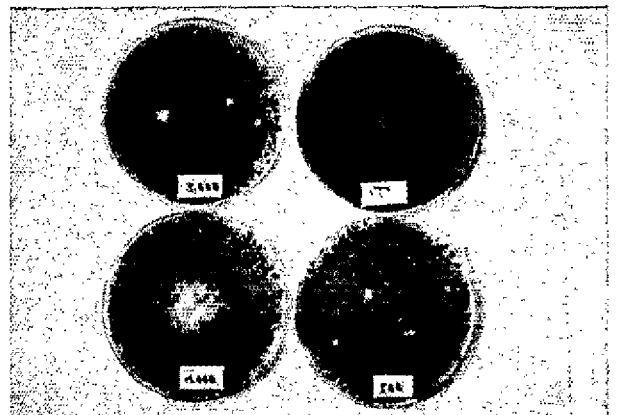


Fig. 4. — Action de différentes doses de radiation ultraviolettes sur le nombre de glomérules formés.

INFLUENCE DE L'ÂGE DE LA CULTURE

L'irradiation de thalles de 4 jours ayant encore un faible diamètre entraîne une augmentation du nombre de glomérules uniquement sur la partie irradiée, la partie se développant ultérieurement est semblable au témoin. Il se produit également une augmentation considérable du nombre des acervules sur une souche qui en est normalement dépourvue dans les conditions de cette étude; ce caractère n'est pas transmis par repiquage.

L'irradiation de thalles plus âgés (tableau 2) indique que très rapidement le thalle perd la faculté de différencier de nouveaux glomérules; il n'est pas encore possible de dire si cela est dû à une perte de sensibilité des noyaux aux U.V. ou à une impossibilité pour le thalle d'induire la formation de nouveaux périthèces passé un certain stade.

Tableau 2. — Influence de l'âge sur l'efficacité des irradiations par les U.V. (dose de 2 000 ergs/mm²/s)

Age de la culture	Nombre de glomérules par thalle
8 jours	880
11 jours	620
16 jours	72
Témoin	44

Tous les glomérules analysés étaient hybrides; il ne semble pas y avoir de différence ni dans la qualité, ni dans la quantité des colonies mutantes obtenues à différentes doses. En particulier, de nombreux glomérules ont été analysés pour les doses 150 et 3 000 et il n'a pas été noté de différences.

Action de la température

L'induction de cette forme mutante particulière par de très faibles doses de rayons U.V. a conduit à essayer l'action d'agent non mutagène, en l'occurrence celle de la température.

Des températures de 60° et 80°C pendant 5, 10, 20 et 30 mn n'ont pas provoqué l'augmentation du nombre des périthèces; par contre, les résultats ont été positifs après passage de thalles de 8 jours à des températures de -20° et +40°C avec alternance toutes les 12 heures pendant 10 jours. Les thalles après ce traitement n'ont pas évolué en ce qui concerne la croissance, mais, par contre, l'aspect en est très différent, caractérisé en particulier par une pigmentation brune très forte du mycélium. Après remise à l'étuve à 26°C pendant 15 jours, la croissance reprend et le nombre de glomérules est considérablement augmenté, la moyenne de 20 répétitions étant de 213 glomérules par thalle.

Tous les glomérules analysés étaient hybrides.

L'action d'antimétabolites comme l'actinomycine, l'actidione et la parafluorophénylalanine n'ont pas donné de résultats intéressants, si ce n'est l'observation de la très grande sensibilité du *Glomerella* à ces produits.

DISCUSSION

L'induction de la formation de périthèces chez *Glomerella cingulata* par les rayons U.V. est un phénomène connu; STEVENS (3) en fit une description précise dès 1930. De ses observations, il ressort: tout d'abord que l'on ne peut induire des périthèces que chez des souches en produisant normalement; ensuite, il rapporte l'obtention de deux mutants apparus après irradiation: un premier ne produisant jamais de périthèces quelles que soient les doses de rayons U.V., un second en produisant un nombre fixe quel que soit également le temps d'irradiation. STEVENS ne fit aucune analyse génétique des périthèces et constata seulement que les transformations concernant le nombre de périthèces n'étaient pas transmises héréditairement hormis les deux cas précités.

Cette mutation, nécessaire dans les conditions de culture à l'apparition de la forme sexuée, a été assimilée par les chercheurs précédents (WHEELER et al.) à une mutation génique classique. Effectivement elle en a les caractéristiques: apparition rare, nombre de glomérules par thalles peu élevé et assez constant (en moyenne 44 pour la souche utilisée); par ailleurs, la confrontation avec la forme sauvage donne des périthèces hybrides avec une ségrégation dans les asques indiquant une mutation monogénique.

L'étude précédente montre en réalité que le problème est plus complexe. Tout d'abord, l'induction de cette mutation par des doses très faibles de rayons U.V. et par des chocs de température est inhabituelle pour des mutations géniques proprement dites; par contre, la température est rapportée comme pouvant provoquer des mutations d'origine cytoplasmique; les principales études à ce sujet concernent: *Saccharomyces cerevisiae* (mutant petite, YCAS, 1956), *Aspergillus nidulans* (mutant nonsexuel et compact, ARLETT, 1960). Ensuite, il n'apparaît pas en culture de réversion vers la forme initiale ce qui serait facilement décelable, celle-ci ayant une vitesse de croissance supérieure à la forme mutante. Des irradiations de conidies par des rayons U.V., à la dose de 3 500 ergs/mm²/s, d'une souche mutante autofertile ont permis d'obtenir des mutants autostériles se complétant (figure n° 5), mais jamais la forme sauvage n'est réapparue. Il faut noter que ceci est en contradiction avec les résultats de CHILTON et WHEELER qui affirment que cette réversion est fréquente.

Enfin, cette mutation semble se produire à un moment déterminé; le thalle ne différencie des glomérules que pendant un laps de temps donné, comme le montrent d'ailleurs les irradiations sur cultures de différents âges. Il n'y a pas seulement une question de faculté pour le mycélium de se différencier car on n'obtient pas de formes mutantes par également de conidies quel que soit l'âge de la culture.

Ces résultats montrent en définitive que la cause initiale du développement du glomérule est complexe ; une mutation génique simple n'explique que peu de chose. À la vue de ces seuls résultats, on peut penser à un gène fonctionnant dans deux systèmes différents ou ne fonctionnant que dans un seul système ; le métabolisme de ces deux formes est en effet certainement très différent étant donné leur dissemblance morphologique : la forme sauvage peut se qualifier de mycélienne, sa croissance est rapide ; la forme mutante de périthéciale, sa croissance est beaucoup plus lente. Cette dernière est la seule stable.

Il est possible de penser que l'action des radiations U.V. à faible dose et de la température se traduit non plus au niveau génique mais au niveau de l'information entre le gène et les ribosomes par l'altération éventuelle d'un répresseur de ce dernier.

Le problème est cependant plus complexe si on se réfère à l'existence d'une forme mutante (plus B de WHEELER) *identique morphologiquement* à la souche sauvage, pouvant donner des glomérules non plus hybrides mais avec des ascospores redonnant tous la forme initiale mutante. Cette forme correspond vraisemblablement à celle décrite par STEVENS (1930) sur laquelle les rayons U.V. n'ont plus d'action ; dans ce cas, l'explication doit faire intervenir l'existence de gènes suppresseurs de la forme mutante « périthéciale ».

RÉSUMÉ - CONCLUSION

Dans les conditions de culture *in vitro*, *Glomerella cingulata* f. sp. *gossypii* ne différencie des périthèces associés en glomérule que si une mutation intervient. Cette mutation est facilement inducible par de très faibles doses d'U.V. et par des chocs de température indiquant qu'il ne s'agit pas d'une mutation génique simple mais d'un changement dans la régulation du fonctionnement d'un gène.

Ceci suggère de considérer la forme *Glomerella* comme une forme instable entre deux formes stables : la forme mutante « périthéciale » à croissance beaucoup plus lente éliminée dans la nature et la forme imparfaite *Colletotrichum* où une adaptation au parasitisme aurait entraîné une évolution de l'organisme et un blocage dans le fonctionnement d'un gène.

Une étude en cours fera le point sur l'écologie des différentes formes associées au cotonnier et sur la filiation qui peut exister entre les différents types de *Glomerella* parasites et la forme *Colletotrichum gossypii* South., seule réellement pathogène.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARLETT. — 1960. A system of cytoplasmic variation in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, XV, 377-388.
2. BLAKESLEE A.F. — 1904. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.*, XL, 305-319.

3. DODGE B.O. — 1920. *Mycologia*, XII, 115-134.
4. EDGERTON C.W. — 1912. Plus and minus strains in an ascomycete (Abs.). *Science*, XXXV, 151.
5. CHILTON S.J.P. et H.E. WHEELER. — 1949. Genetics of *Glomerella*. VII. Mutation and segregation in plus cultures. *Amer. J. Bot.*, XXXVI, 717-721.
6. EDGERTON C.W. — 1913. Plus and minus strains in the genus *Glomerella*. *Amer. J. Bot.*, I, 244-254.
7. STEVENS F.L. — 1930. The response to ultraviolet irradiation shown by various races of *Glomerella cingulata*. *Amer. J. Bot.*, XVII, 870-881.
8. STRUBLE F.B. et G.W. KEITT. — 1950. Variability and inheritance in *Glomerella cingulata* from apple. *Amer. J. Bot.*, XXXVII, 563-574.
9. WHEELER H.C. — 1950. Genetics of *Glomerella*. VIII. A genetic basis for the occurrence of minus mutants. *Amer. J. Bot.*, XXXVII, 304-312.
10. WHEELER H.C. et J.W. Mc GAHEN. — 1952. Genetics of *Glomerella*. X. Genes affecting sexual reproduction. *Amer. J. Bot.*, XXXIX, 110-119.
11. WHEELER H.C. — 1954. Genetic and evolution of heterothallism in *Glomerella*. *Phytopath.*, XLIV, 342-345.
12. YCAS M. — 1956. A hereditary cytochrome deficiency appearing in yeast grown at an elevated temperature. *Exptl Cell. Res.*, X, 746.

SUMMARY - CONCLUSION

Under in vitro cultivating conditions, Glomerella cingulata f. sp. *gossypii* becomes differentiated from *perithecia* grouped into glomerules only if a mutation occurs. This mutation is easily inducible with very low U.V. doses and by temperature shocks indicating that this is not a simple genic mutation but a change in the regulation of the gene working.

This suggests to consider the *Glomerella* form as an unstable form between two stable forms: the « perithecial » mutant form with a much slower growth eliminated in nature and the imperfect *Colletotrichum* form where an adaptation to parasitism would have induced an evolution of the organism and a blocking up in the working of a gene.

A study now in progress will take stock about the ecology of the various forms associated with cotton and about the filiation which may exist between the various types of *Glomerella* pests and the *Colletotrichum gossypii* South form, the only one that is pathogenic.

RESUMEN - CONCLUSIÓN

En las condiciones de cultivo *in vitro*, *Glomerella cingulata* f. sp. *gossypii* diferencia *peritecios* asociados en glomérule solamente si interviene una mutación. Esta mutación es fácilmente inducible por dosis muy débiles de U.V. y por choques de temperatura, indicando que no se trata de una mutación génica, sino de un cambio en la regulación del funcionamiento de un genes.

Esto sugiere considerar la forma Glomerella como una forma inestable entre dos formas estables: la forma mutante « peritecial » de crecimiento mucho más lento eliminada en la naturaleza y la forma imperfecta Colletotrichum en la cual una adaptación al parasitismo habría ocasionado una evolución del organismo y un bloqueo en el funcionamiento de un genes.

Un estudio en curso obtendrá conclusiones sobre la ecología de las diferentes formas asociadas al algodón y sobre la filiación que puede existir entre los diferentes tipos de Glomerella parásitos y la forma Colletotrichum gossypii South, única realmente patógena.