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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 84 (1974)

Heft: 1

Artikel: Etude de la germination des pycnidiospores de Coniella diplodiella (Speg.) Pet. et Syd., agent du coître de la vigne. II. Etude du processus de la germination

Autor: Aragno, Michel

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-59249

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 17.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Ber. Schweiz. Bot. Ges. *84* (1), 53–72 (1974)

Etude de la germination des pycnidiospores de *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd., agent du coître de la vigne. II. Etude du processus de la germination.

par *Michel Aragno*

Laboratoire de Cryptogamie
Institut de Botanique de l'Université Neuchâtel

Manuscrit reçu le 12 novembre 1973

Introduction

Dans la première partie de ce travail (Aragno, 1973) nous avons montré que les spores de *C. diplodiella* ne germent bien qu'en présence d'acide L(+)tartrique; les acides D(+)malique et mesotartrique provoquent également la germination, mais inhibent la croissance apicale. Les conditions physicochimiques optimales de la germination *in vitro* correspondent bien à celles du milieu naturel, la pulpe des raisins en cours de maturation.

Nous tenterons ici, par une étude du processus de la germination, de mieux comprendre le mode d'action de l'acide tartrique.

Matériel et méthodes

Les souches, milieux et méthodes décrits dans le travail précédent (Aragno, 1973) sont repris ici. Toutefois, le milieu de germination devant être changé au cours de certaines expériences, nous avons usé d'une autre méthode, qui consiste à faire germer les spores sur membrane filtrante.

10 ml d'une suspension de spores dans une solution de NaCl 50 mM (5.10^4 spores/ml environ) sont filtrés sur membrane Sartorius, type SM 11.302, porosité 2 μ (selon Hagen-Poiseuille), diamètre 47 mm. Le filtre est ensuite placé sur le milieu, soit gélosé (8 ml par boîte de Petri

de 5 cm), soit liquide, imprégnant alors un tampon de cellulose. Pour changer de milieu, les filtres sont enlevés, placés sur le porte-filtre, lavés par passage de 50–100 ml d'une solution stérile 50 mM de NaCl, en aliquotes de 5–10 ml, et déposés enfin sur le nouveau milieu.

L'observation directe est malaisée, vu l'opacité du filtre. Celui-ci devient transparent lorsqu'il est plongé dans un milieu de même indice de réfraction (1,515). Aussi avons-nous procédé comme suit: on découpe, dans le filtre portant les spores, un carré de 1 cm de côté environ. On le colore 5 minutes par immersion dans une solution alcoolique de 0.5% de fuchsine basique, puis on le lave 3 fois à l'eau, on le déshydrate rapidement, on le place dans du toluène jusqu'à ce qu'il devienne complètement transparent, et on le monte au Caedax, entre lame et lamelle. Cette méthode a en outre l'avantage de conserver des témoins de chaque expérience.

Résultats

1. Cinétique de l'apparition du tube germinatif

Un des intérêts de l'étude de la germination des spores en général est qu'il s'agit souvent d'un phénomène assez bien synchronisé : idéalement, dans une population de cellules identiques, toutes dans le même état physiologique au départ (dormance), un traitement activateur a pour effet de déclancher, simultanément chez toutes les spores, une succession de phénomènes biochimiques transformant la cellule dormante en une cellule en état de vie active normale (activité métabolique, croissance). Théoriquement donc, si cette succession se faisait avec un synchronisme parfait dans toutes les spores, l'apparition de tous les tubes germinatifs devrait avoir lieu au même moment. En fait, ces conditions idéales ne sont jamais réalisées. La population des spores peut donc se répartir en fonction du temps nécessaire à l'apparition du tube germinatif, le graphe de cette répartition s'obtenant par dérivation de celui de la cinétique de germination.

En considérant la moyenne des résultats de plusieurs expériences, nous avons obtenu des courbes cinétiques moyennes de germination, à 27^{0}C, dans le moût (20% dans le tampon glycine – HCl 50 mM pH 3,5 : 7 expériences) et dans le milieu minimum (tampon tartrate 50 mM, pH 4,0 : 5 expériences).

Technique de germination: goutte pendante, en chambre humide. Les résultats individuels ont été multipliés par le facteur:

$$\frac{100}{\%\text{ de germination en 24 h}}$$

de façon à ne pas tenir compte de la proportion, variable d'une expérience à l'autre, de spores n'ayant pas germé en 24 h, que nous assimilons à des spores non viables.

Résultats: fig. 1. La dérivation graphique des courbes obtenues nous donnerait la répartition en fonction du temps de germination. Cette répartition peut être ramenée à une distribution normale de type:

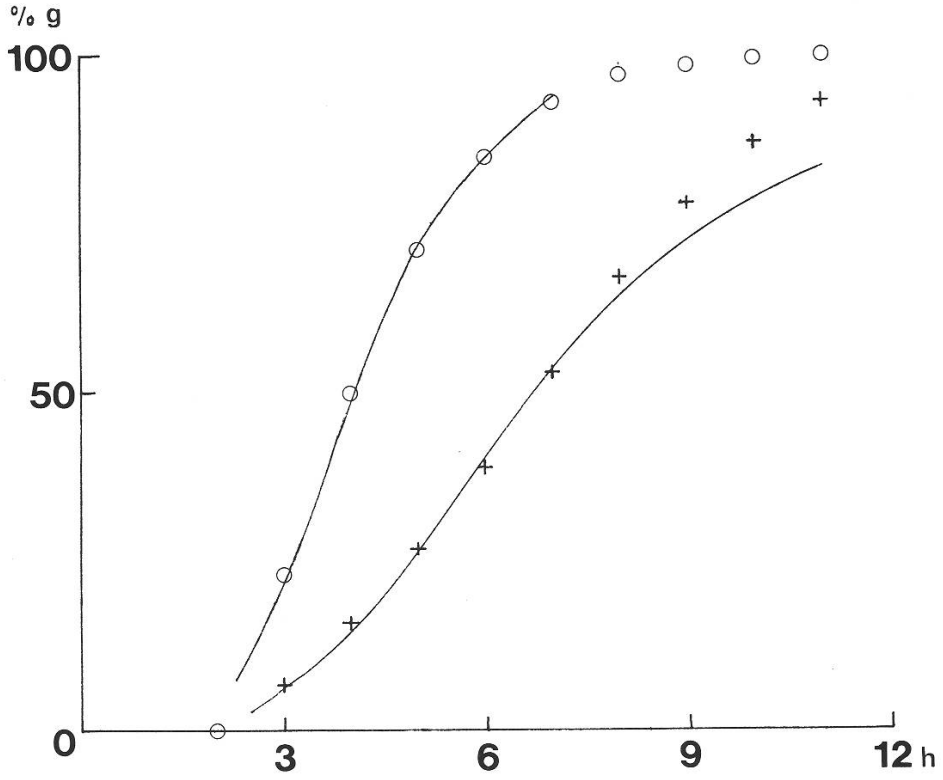


Fig. 1:

Cinétique de l'apparition du tube germinatif.

o: germination dans le moût 20%, tampon glycine-HCl 50 mM pH 3.5, moyenne de 7 expériences.

+: germination dans le milieu minimum (ac. tartrique – NaOH 50 mM, pH 4.0), moyenne de 5 expériences.

Les courbes en trait continu sont les graphes de la fonction (5) appliquée aux valeurs expérimentales.

(1) $$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{\sigma^2}} \quad \text{pour } x > a$$

et $f(x) = 0$ pour $x \leqslant a$

où: x = temps après le début de l'activation

μ = temps après le début de l'activation où la fréquence d'apparition des tubes germinatifs est maximale ($\neq$ temps moyen de germination).

σ = écart type de la distribution

a = temps nécessaire à l'apparition des premiers tubes germinatifs.

La cinétique de germination s'exprimerait alors par l'intégrale:

(2) $$\% \text{ germination} = 100 \int_a^x f(x) = 100\,(F(x) - F(a))$$

Eidg. Techn. Hochschule
INSTITUT FÜR SPEZIELLE BOTANIK
BIBLIOTHEK
8006 Zürich, Universitätsstr. 2

Une autre relation pouvant s'exprimer sous forme linéaire permet en général une assez bonne représentation de la cinétique de germination.

$$\text{Soit } G = \frac{\text{nombres de spores germées}}{\text{nombre de spores non germées}}.$$

On constate en général (McCormick, 1964) que le log de G varie à peu près linéairement avec le log du temps, soit:

(3) $\ln G = k \ln x - h$ qu'on peut exprimer:

(4) $G = e^{-h} x^{k}$

où k et h sont des constantes caractérisant l'allure de la courbe.

On a alors:

(5) $g(\%\text{ de germination}) = 100 \dfrac{e^{-h} x^{k}}{1 + e^{-h} x^{k}}$

Le temps après le début de l'activation où la fréquence d'apparition des tubes germinatifs est maximale (μ) s'obtient en posant: g" = O, d'où:

(6) $\mu = \sqrt[k]{\dfrac{k-1}{k+1} e^{h}}$

Soit m le temps moyen de germination. G(m) = 1, d'où:

(7) $\ln m = \dfrac{h}{k}$ soit $m = e^{\frac{h}{k}}$

Une mesure de la dispersion nous est donnée par s = temps nécessaire pour passer de G = 1 à G = e:

(8) $s = m(e^{\frac{1}{k}} - 1)$

En appliquant graphiquement nos résultats expérimentaux à la relation (3), nous obtenons les valeurs suivantes des paramètres:

a) Pour la cinétique de germination dans le moût:

k = 4,3 et h = 5,9
d'où nous tirons: m = 3,95 et s = 1,03

Le graphe de la fonction $g = 100 \dfrac{e^{-4,3 \times 5,9}}{1 + e^{-4,3 \times 5,9}}$

est représenté à la fig. 1 (trait continu).

b) Pour la cinétique de germination dans le tartrate:

k = 3,4 et h = 6,4
d'où nous tirons: m = 6,55 et s = 2,22

Le graphe de la fonction $g = 100 \dfrac{e^{-3,4 \times 6,4}}{1 + e^{-3,4 \times 6,4}}$

est représenté à la fig. 1 (trait continu).

2. L'activation

L'action de l'acide tartrique doit-elle s'étendre sur toute la durée de la germination, ou, au contraire, un traitement de plus courte durée suffit-il à assurer l'achèvement ultérieur du phénomène dans un milieu dépourvu de cet acide?

2.1 Cinétique de l'activation

Principe: On met des spores en présence d'acide tartrique pendant un temps t, puis on les place sur un milieu tamponné de mêmes pH et concentration, mais sans acide tartrique, pendant 24 h – t. On exprimera le % de germination en fonction de t.

Méthode de germination: sur membrane filtrante

Milieux de germination:
(1) acide tartrique – NaOH 50 mM pH 4.5 + agar 1,4%
(2) acide citrique – NaOH 50 mM pH 4.5 + agar 1,4%

Résultats: fig. 2. Dans cette expérience, 13% des spores ont germé sans activation et, en 24 heures dans le milieu au tartrate, 93% des spores ont germé. En ne tenant compte, ni des spores aptes à germer dans le citrate sans activation, ni des spores ne germant pas dans le tartrate en 24 h (7%), nous obtenons la courbe -o-, représentant la cinétique de l'activation par le tartrate.

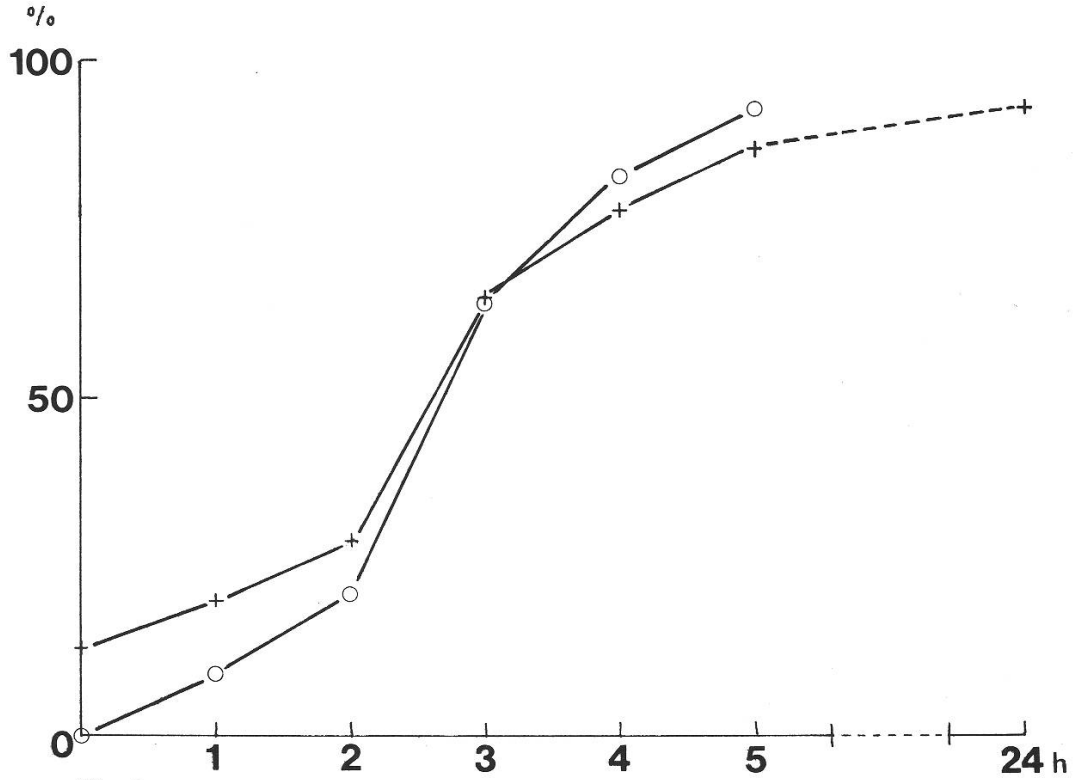


Fig. 2:

Cinétique de l'activation par l'acide tartrique.

-+-: % de germination en 24 heures au total, à 27° C, en fonction du temps d'activation dans l'acide tartrique.

-o-: % de spores activées par l'acide tartrique (24 h : 100%).

Le temps moyen d'activation (temps nécessaire à activer 50% des spores dormantes susceptibles de germer) est ici de 2,7 heures environ; il est bien inférieur au temps moyen de germination (6,7 heures, dans le même milieu).

Ce temps d'activation peut être considéré comme un „point de non retour" à partir duquel les spores sont à même de poursuivre leur développement en absence de tartrate. Nous verrons toutefois plus loin (p. 61) qu'à ce stade, les spores peuvent être désactivées par un traitement chimique.

Nous pouvons donc distinguer deux phases dans le processus de germination:

– une phase d'*activation,* d'une durée moyenne, dans ces conditions, de 2,7 heures, où la présence d'acide tartrique est nécessaire à assurer la germination.

– une deuxième phase, où la germination se poursuit même en absence d'acide tartrique, que nous qualifierons, pour cette raison et d'autres que nous verrons par la suite, de phase *prévégétative.*

2.2 Activation et anaérobiose

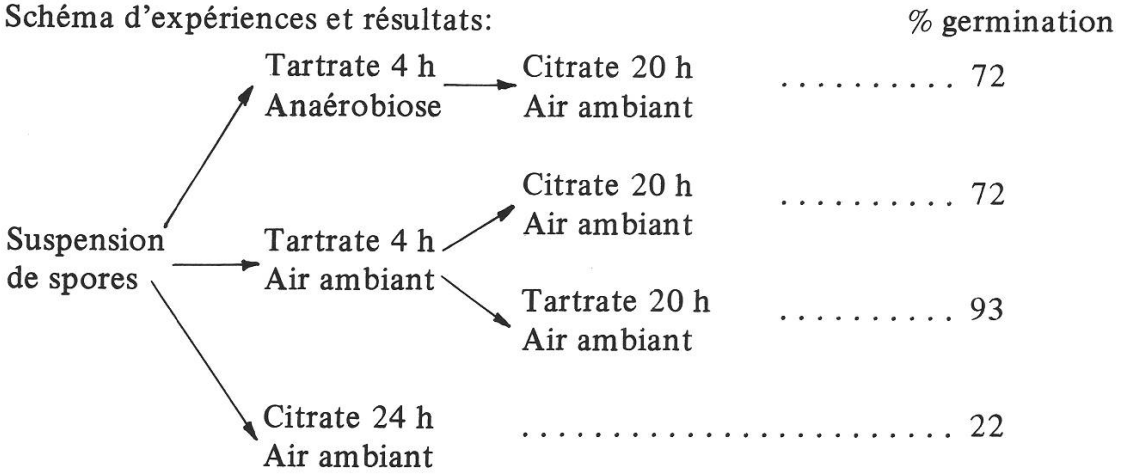
Nous avons montré (Aragno, 1973) que l'oxygène était nécessaire à l'achèvement de la germination. L'activation seule, comme chez *Mucor rouxii* et *M. hiemalis* (Sussman et Halvorson, 1966) ou chez les ascospores de *Neurospora* (Goddard, 1935) peut-elle se faire en l'absence d'O_2 ?

Principe: On met les spores en présence d'acide tartrique, en anaérobiose, pendant 4 heures. On les place ensuite sur un milieu non activateur à concentration et pH optima, à l'air ambiant, pendant 20 heures. Parallèlement, on fait germer des spores de la même population en aérobiose, respectivement 4 heures dans le tartrate puis 20 heures dans le citrate (témoin de l'activation en présence d'oxygène), 24 heures dans le tartrate (témoin de la germinabilité totale) et 24 heures dans le citrate (témoin de la germinabilité sans activation).

Technique de germination: sur membrane filtrante; la méthode pour la germination anaérobie est décrite dans la première partie de ce travail (Aragno, 1973).

Milieux de germination:
1) Solution d'acide tartrique 50 mM ramenée à pH 4.5 par NaOH
2) Solution d'acide citrique 50 mM ramenée à pH 4.5 par NaOH

Schéma d'expériences et résultats:



Conclusion: l'activation se fait normalement en anaérobiose. Seule la suite du processus de germination exige la présence d'oxygène.

2.3 Activation et inhibiteurs

Il suffit que l'une des réactions essentielles du processus de la germination soit bloquée pour que l'apparition du tube n'ait pas lieu.

Nous allons faire l'essai de plusieurs inhibiteurs usuels sur l'ensemble du phénomène. Nous tenterons ensuite de situer leur action, soit dans la phase d'activation, soit après seulement, dans la phase prévégétative.

Nous avons essayé des inhibiteurs de la chaîne respiratoire: KCN et NaN_3 (cytochrome-oxydase) et antimycine A (cytochrome b / cytochrome c); de la phosphorylation oxydative: 2,4 dinitrophénol; de la synthèse des protéines: cycloheximide; de la glycolyse: NaF et iodoacétate; du transport: acétate d'uranyle. Ces inhibiteurs ne sont en général pas absolument spécifiques d'une réaction métabolique, sauf peut-être l'antimycine A.

L'essai sur toute la durée de la germination va nous permettre de déterminer la concentration minimale d'inhibiteur annulant complètement l'apparition du tube germinatif.

Méthode de germination: agar double couche, env. 5.10^5 spores/ml dans la couche supérieure.

Milieu de germination: milieu minimum, pH 4.5, gélosé à 1,4%, + inhibiteur (ajouté après refroidissement de l'agar à 45°C).

Incubation: 24 h à 27°C; on mesure ensuite le % de germination, qu'on exprime en fonction de la concentration de l'inhibiteur.

Résultats: fig. 3. La sensibilité des spores de *C. diplodiella* à NaN_3 est très élevée. La concentration active est plus faible que celle utilisée pour des spores d'autres champignons (ex. 2,5 mM chez *Penicillium* et *Trichoderma* (Martin et Nicolas, 1970); 1 mM chez *Rhizopus* (Ekundayo, 1966) et chez *Helminthosporium* (Mathre, 1969). Il en est de même du dinitrophénol.

La cycloheximide, l'acétate d'uranyle et KCN sont actifs à des concentrations comparables à celles expérimentées chez d'autres champignons.

L'antimycine A n'inhibe pas la germination à la concentration la plus forte que nous ayons pu obtenir (2 μg/ml):

Antimycine A (μg/ml)	% germination en 24 h
2	89
1	89
0.5	90
0.2	90
0	96

La croissance du tube germinatif est par contre fortement inhibée à 2 μg/ml.

A la plus faible concentration bloquant complètement la germination, nous allons voir si les inhibiteurs ci-dessus agissent sur la phase d'activation, ou sur la phase prévégétative seule.

Milieu de germination: acide tartrique – NaOH 50 mM, pH 4.5, gélosé à 1,4%; acide citrique – NaOH 50 mM pH 4.5 gélosé à 1,4%. Inhibiteurs à la concentration indiquée.

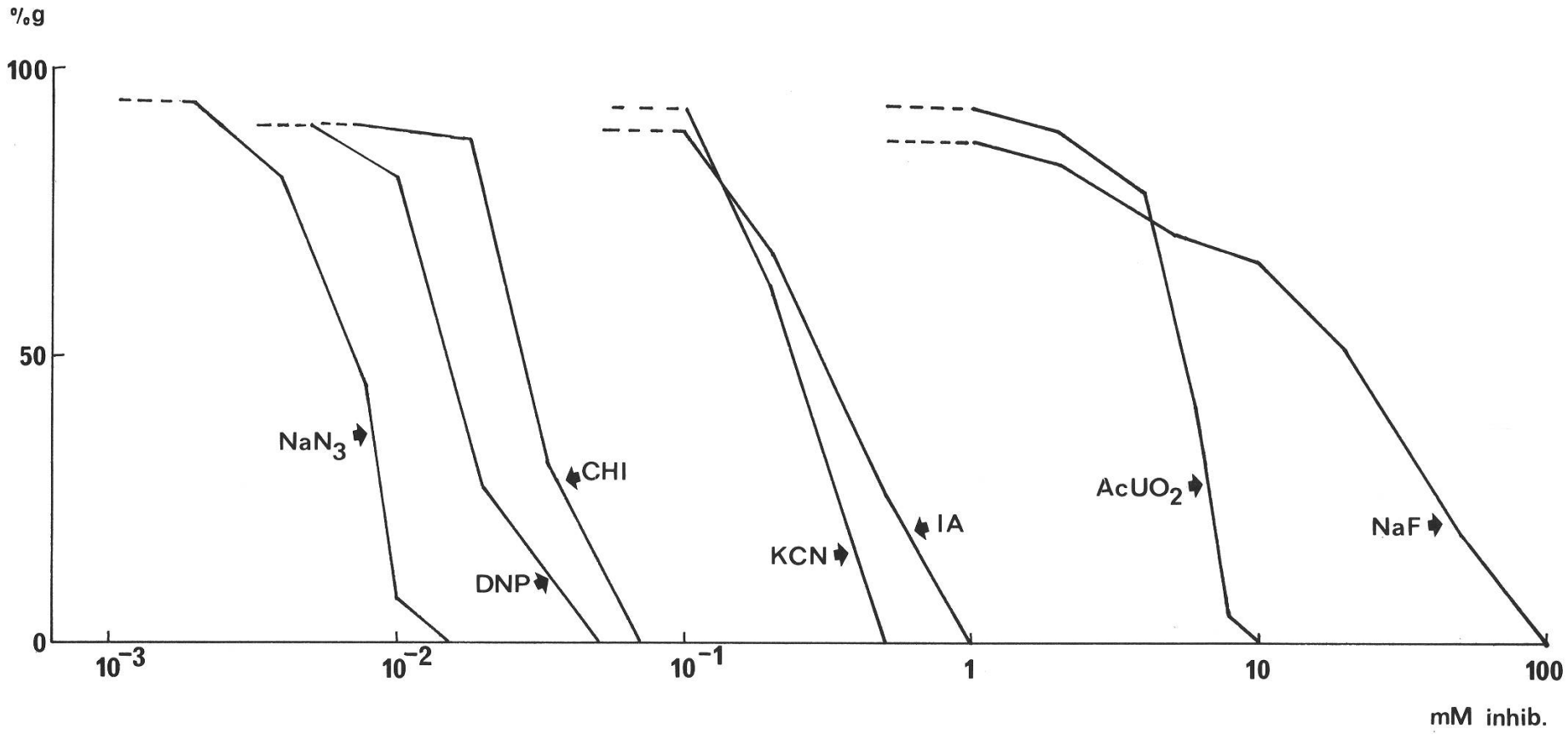


Fig. 3:

Germination en présence de différents inhibiteurs métaboliques.

% de germination en 24 heures à 27° C, dans le milieu minimum + inhibiteur, en fonction de la concentration de ce dernier (échelle semi-logarithmique). DNP: 2,4 dinitrophénol; CHI: cycloheximide; IA: iodoacétate de sodium; $AcUO_2$: acétate d'uranyle.

Technique de germination: sur membrane filtrante. 7 expériences en parallèle:

1) 4 h dans le milieu au tartrate + inhibiteur, puis 20 h dans le milieu au citrate, sans inhibiteur ($(T+I)_4 C_{20}$) : essai de l'inhibition de la phase d'activation.

2) 4 h dans le milieu au tartrate, puis 20 h dans le milieu au citrate + inhibiteur ($(T_4 (C+I)_{20})$: essai de l'inhibition de la phase prévégétative.

3) 4 h dans le milieu au tartrate + inhibiteur, puis 20 h dans le milieu au tartrate sans inhibiteur ($(T+I)_4 T_{20}$) : essai de l'effet sporicide de l'inhibiteur.

4) 24 heures sur milieu au tartrate + inhibiteur ($(T+I)_{24}$) : témoin de l'inhibition totale de la germination globale.

5) 4 h dans le milieu au tartrate + 20 h dans le milieu au citrate ($T_4 C_{20}$) : témoin de l'activation sans inhibiteur.

6) 24 h dans le milieu au tartrate (T_{24}) : témoin de la germinabilité totale.

7) 24 h dans le milieu au citrate (C_{24}) : témoin de la germinabilité sans activation.

Tableau 1:

Effet d'inhibiteurs sur les phases d'activation et prévégétative.
% de germination en 24 heures d'incubation totale. Explications: voir texte.

Inhibiteur	Concentration	$(T+I)_4C_{20}$	$T_4(C+I)_{20}$	$(T+I)_{24}$	$(T+I)_4T_{20}$	T_4C_{20}	C_{24}	T_{24}
NaN_3	15 µM	65	0	0	–	72	19	92
KCN	600 µM	62	0	0	90	76	14	91
$UO_2(CH_3COO)_2$	10 mM	63	0	0	–	78	18	91
NaF	100 mM	68	0	0	89	76	14	91
Iodoacétate	1 mM	21	0	0	87	78	21	94
Cycloheximide	71 µM	30	0	0	90	76	14	91
2,4 dinitrophénol	50 µM	16	0	0	82	76	14	91

Résultats: % de germination en 24 heures d'incubation totale, cf tableau 1. Aux concentrations utilisées ici, NaN_3, KCN, $UO_2(CH_3COO)_2$ et NaF n'inhibent presque pas la phase d'activation, alors que la germination globale est complètement bloquée. La cycloheximide inhibe fortement l'activation; l'iodoacétate et le 2,4 dinitrophénol, complètement. Toutes ces substances, dans ces conditions, bloquent la phase prévégétative. Le 2,4 dinitrophénol montre un léger effet sporicide.

2.4 Désactivation

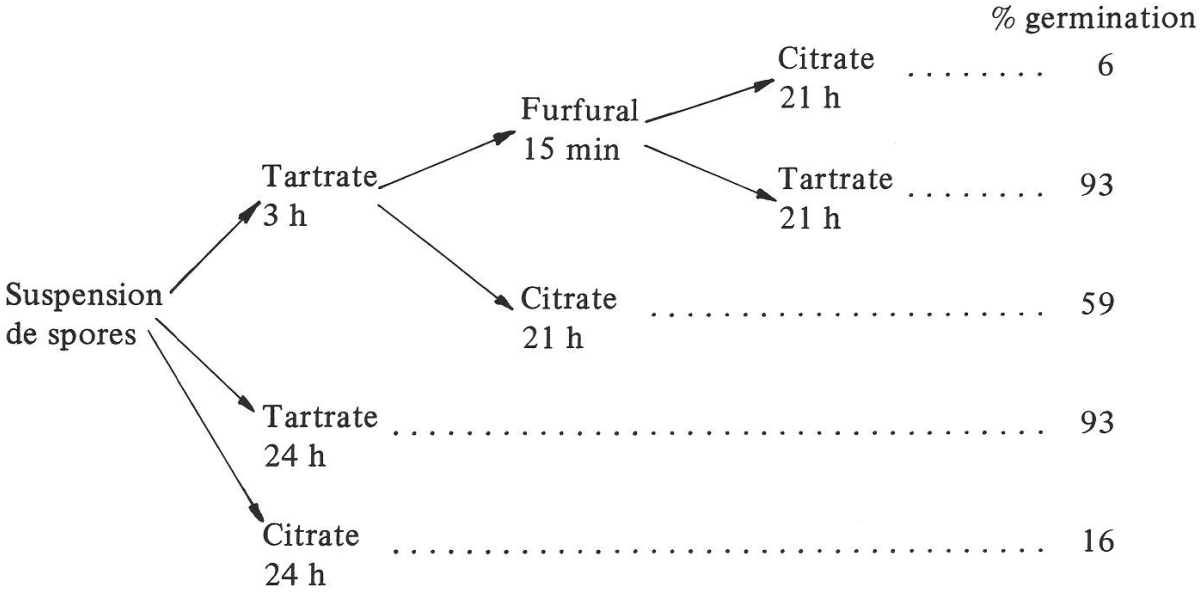
2.4.1 Effet d'un traitement au furfural

Lors d'essais infructueux d'activation avec le furfural (Aragno, 1973), nous avons observé que les spores normalement capables de germer sans tartrate étaient désactivées au contact de ce produit, à la concentration de 5 mM pendant 10 minutes. Le furfural est-il également à même d'annuler l'activation par l'acide tartrique?

Technique de germination: sur membrane filtrante

Milieux:
1) Ac. tartrique – NaOH 50 mM pH 4,5, agar 1,4%
2) Ac. citrique – NaOH 50 mM pH 4,5, agar 1,4%
3) Sol. furfural 5 mM imbibant un tampon de cellulose.

Schéma d'expériences et résultats:



Conclusion: le furfural, à une concentration de 5 mM et pendant 15 minutes, désactive presque complètement les spores de *C. diplodiella* préalablement activées par l'acide tartrique. Celles-ci ne sont toutefois pas tuées, et germent à nouveau si on les replace sur un milieu au tartrate.

2.4.2 Effet d'un séjour à 4°C

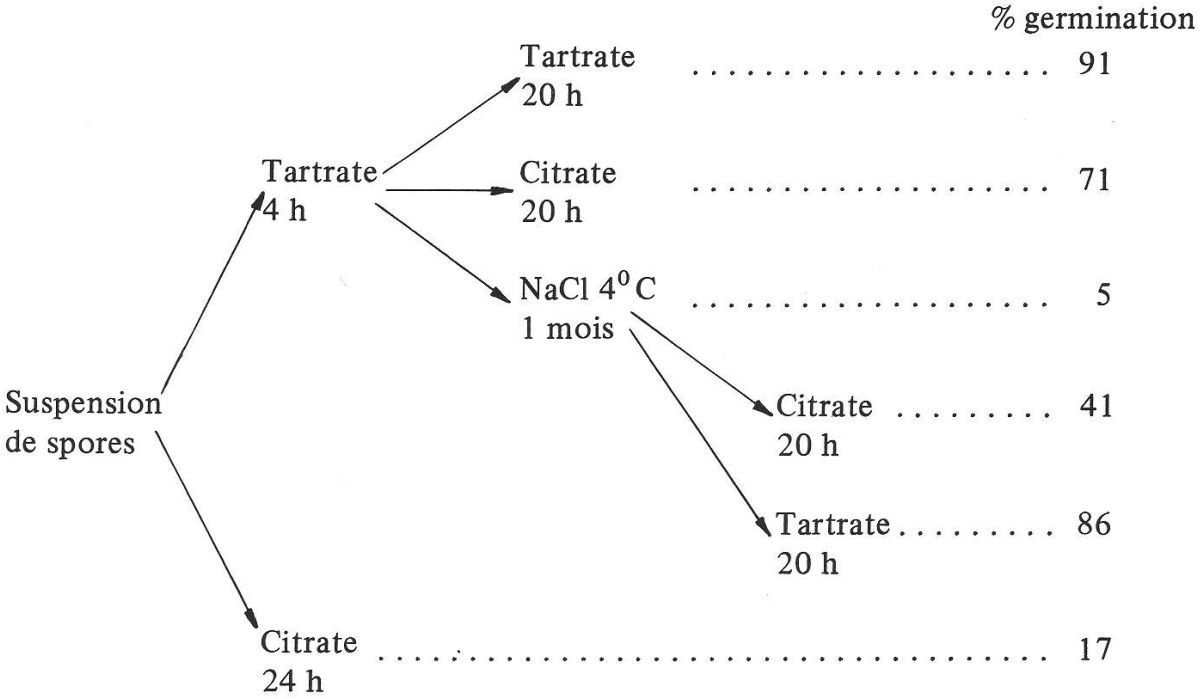
Chez les ascospores de *Neurospora tetrasperma* (Sun et Sussman, 1960), les sporangiospores de *Phycomyces blakesleeanus* (Halbsguth et Rudolph, 1959) ou les urédospores de *Puccinia graminis* (Bromfield, 1964), on peut annuler l'effet de l'activation par un séjour subséquent au froid ou dans un milieu ne permettant pas la poursuite de la germination. Cette désactivation peut être relativement rapide, elle est complète chez *Neurospora* en 48 heures. Qu'en est-il chez *Coniella diplodiella?*

Principe: On active des spores pendant 4 h en présence de tartrate. On les place ensuite 1 mois sur un milieu non activateur (NaCl 50 mM) à une température inhibant la germination (4° C), puis on les met à germer 20 h sur un milieu non activateur, mais dans des conditions optimales de température et pH. Parallèlement, on observe sur la même population de spores: la viabilité après le séjour de 1 mois à 4° C (germination subséquente: 20 heures sur milieu au tartrate), la germination après le séjour de 1 mois à 4° C sans incubation subséquente, l'activation après 4 heures sur milieu au tartrate, mais sans séjour à 4° C, la germinabilité totale et la germinabilité sans activation.

Technique de germination: sur membrane filtrante. Incubation à 27° C. Séjour de 1 mois à 4° sur milieu gélosé au NaCl.

Milieux:
1) **ac. tartrique – NaOH 50 mM pH 4.5, agar 1,4%**
2) **ac. citrique – NaOH 50 mM pH 4.5, agar 1,4%**
3) **NaCl 50 mM gélosé 1%**

Schéma d'expériences et résultats:



Conclusions: le séjour d'un mois à 4°C n'a désactivé qu'une partie des spores. Celles-ci conservent donc leur état d'activation beaucoup plus longtemps que les ascospores de *Neurospora* (Sun et Sussman, 1960). Ce séjour n'altère pas sensiblement la viabilité des spores, tout en bloquant la germination.

3. Effet de la dessication

3.1 Résistance des spores dormantes à la dessication

Pour survivre aux conditions d'un environnement défavorable, les spores de *C. diplodiella* doivent présenter une résistance élevée à la dessication. On sait (Faes et Staehelin, 1935) que les spores prélevées sur des grappes desséchées depuis 15 ans germent encore. Terrier (1949) en observe de même ayant survécu plus de 20 ans.

Des spores sont déposées, par filtration d'une suspension dans l'eau distillée, sur membrane Sartorius SM 11 302, puis placées 24 heures à température ambiante dans un dessicateur avec P_2O_5. Les filtres sont ensuite déposés sur le milieu de germination (acide tartrique – NaOH 50 mM, pH 4.5, gélosé à 1,4%). Incubation: 24 h à 27°C. Comme témoin, on met à germer dans les mêmes conditions des spores n'ayant pas subi de dessication.

Résultats:	% germination en 24 h
Spores préalablement desséchées	72
Spores non desséchées	86

Une grande partie des spores dormantes reste donc viable après dessication.

3.2 Modification de la résistance à la dessication au cours de la germination

Une résistance élevée à la dessication, bien connue chez de nombreuses espèces de champignons (Fletcher et Morton, 1970), est souvent l'apanage des spores dormantes, les cellules végétatives étant tuées par le déssèchement. C'est le cas chez *C. diplodiella.* A quel moment de la germination cette perte de résistance apparaît-elle?

Principe: les spores sont déposées sur des membranes filtrantes (Sartorius SM 11302) par filtration d'une suspension dans NaCl 50 mM. Les membranes sont ensuite déposées pendant 0, 1, 2, 3 et 4 heures sur le milieu de germination (acide tartrique – NaOH, 50 mM, pH 4.5, gélosé à 1,4%), puis les spores sont lavées par filtration d'eau stérile. On met les filtres pendant 24 heures dans un dessicateur avec P_2O_5, puis on les replace sur les milieux de germination à 27°C pendant 24 heures. On mesure alors le % de germination. Témoin: germination des spores non desséchées, en 24 heures à 27°C sur le même milieu.

Résultats: fig. 4. Le graphe -o- représente les valeurs mesurées, soit le % de germination en 24 heures, en fonction du temps d'activation avant la dessication. Nous avons représenté sur ce même graphique (graphe -x-) les résultats de la même expérience, exprimés en % de spores tuées par le sec à la suite de l'activation, soit: $100 - \%\ \text{germination} \times \frac{100}{72}$. La perte de résistance à la dessication est donc rapide, et atteint 50% en 2,2 heures.

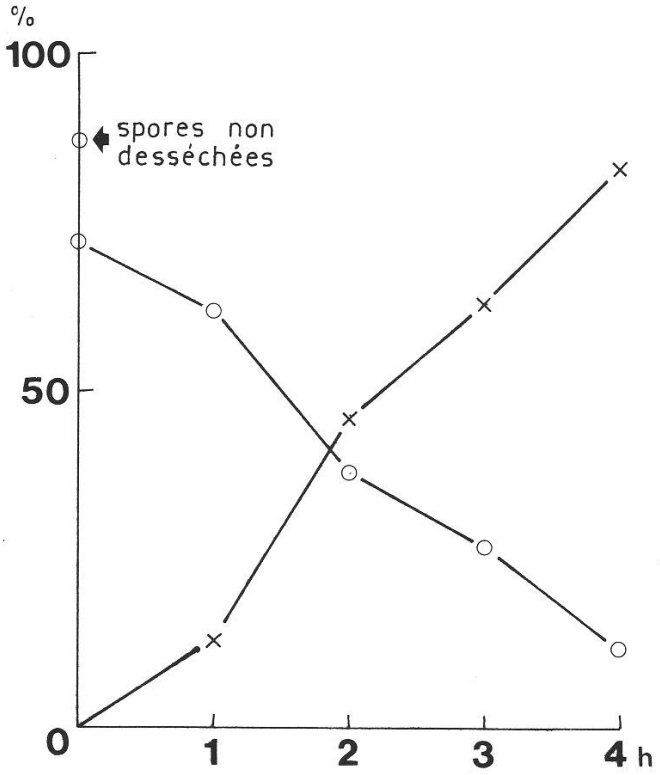


Fig. 4:

Perte de la résistance à la dessication au cours du processus de la germination, dans le milieu minimum à 27°C.

-o-: % de germination de spores mises à germer 1, 2, 3 et 4 heures dans le milieu minimum, puis séchées 24 h sur P_2O_5 et remises à germer 24 h dans le même milieu.

-x-: même expérience, résultats exprimés en % de spores ayant perdu leur résistance au déssèchement à la suite de l'activation.

Discussion

1. Type de dormance

Selon la définition de Sussman et Halvorson (1966), toute restriction du développement imposée par des facteurs en relation avec la structure ou des fonctions propres à la cellule doit être considérée comme une *dormance constitutive.* Ce type de dormance ne peut être levé que par un traitement qui n'est pas indispensable au développement végétatif de l'organisme.

A l'opposé, le seul traitement nécessaire à briser la dormance *environnementale* est le retour à des conditions permettant le développement végétatif.

On peut considérer la dormance des spores de *C. diplodiella* comme constitutive: la spécificité étroite pour l'acide tartrique et le mécanisme (encore inconnu) de l'activation sont en relation avec des facteurs propres à la cellule. Si le champignon n'a pas besoin de cet acide pour son développement végétatif, il est toutefois

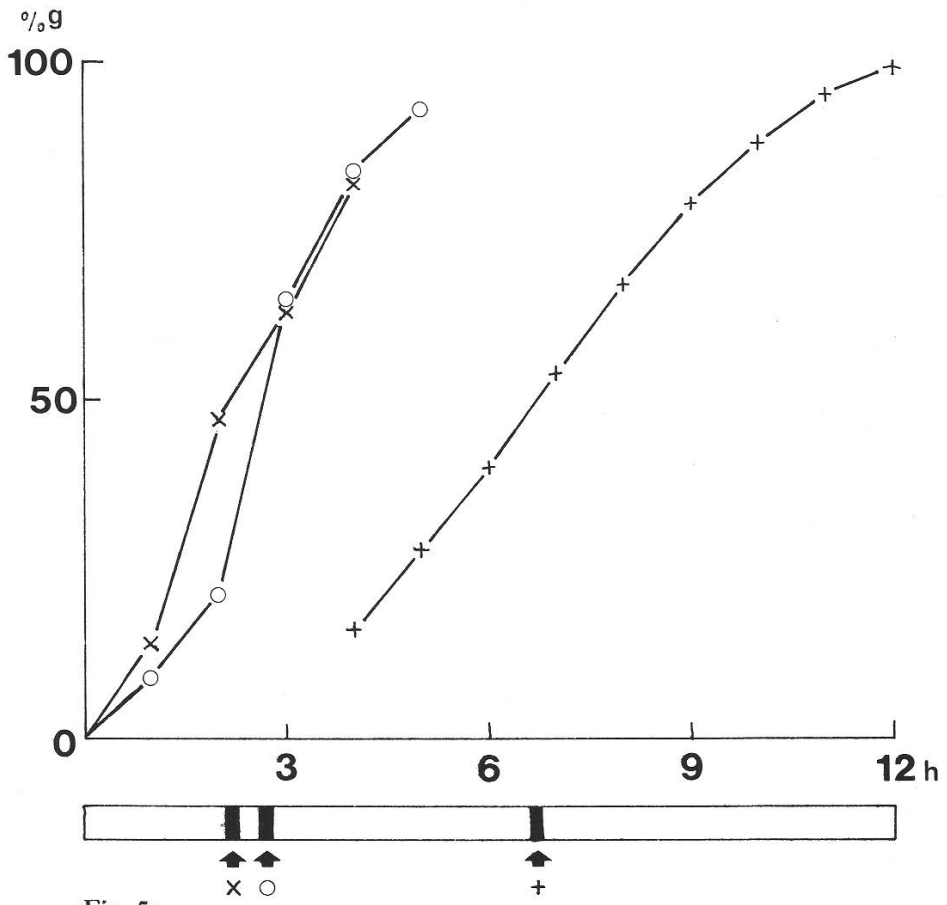


Fig. 5:

Représentation synoptique de différents événements survenant lors de la germination.

En haut: cinétiques.

-x-: Perte de la résistance à la dessication.
-o-: Fin de la phase d'activation.
-+-: Apparition des tubes germinatifs.

En bas: temps moyens, mêmes symboles.

capable de le métaboliser, et même de l'utiliser comme seule source de carbone (Terrier, 1948, *in* Turian et Staehelin, 1954). D'autre part, le retour au milieu naturel suffit à briser la dormance. Les définitions de Sussman et Halvorson (op. cit.) ne s'appliquent pas bien à *C. diplodiella,* qui serait un cas limite.

2. L'activation par l'acide tartrique

2.1 Les événements du processus de germination

Il est malheureusement impossible, en général, d'étudier dans une seule spore la succession des événements de la germination. On doit donc estimer leur durée dans une population.

La fig. 5 donne une représentation synoptique des différents événements survenant lors de la germination: perte de résistance à la dessication, fin de la période d'activation, apparition des tubes germinatifs.

La perte de résistance à la dessication précède de peu le moment où la spore n'a plus besoin d'une source exogène d'acide tartrique, les temps moyens étant respectivement de 2,2 et 2,7 heures dans nos essais. L'apparition du tube germinatif a lieu nettement plus tard, 6,8 heures en moyenne après le début du processus.

2.2 Particularités de l'activation

Comme nous l'avons vu p. 58, nous distinguons deux phases dans la germination des spores de *C. diplodiella* en présence d'acide tartrique: une phase d'*activation,* suivie d'une phase *prévégétative.* La phase d'activation se distingue nettement de la suivante par plusieurs caractéristiques physiologiques, que nous résumons dans le tableau 2.

L'insensibilité envers un inhibiteur peut être due à son absence d'action dans le processus d'activation, mais aussi à l'existence d'une barrière empêchant sa pénétration dans la spore au repos.

Tableau 2:

Comparaison des propriétés physiologiques des phases d'activation et prévégétative.

Phase d'activation	*Phase prévégétative*
Présence d'acide tartrique nécessaire dans le milieu pour assurer la germination	Les spores n'ont plus besoin d'acide tartrique pour germer
Anaérobie facultative	Aérobie stricte
Peu ou pas inhibée par:	Complètement inhibée par:
NaN_3 15 μM $UO_2(CH_3COO)_2$ 10 mM KCN 0.6 mM NaF 100 mM	
Les spores sont encore résistantes à la dessication	Les spores sont tuées par la dessication
Faible augmentation de volume	Plus forte augmentation de volume

Une caractéristique importante de l'activation est son indépendance envers l'oxygène. Elle peut expliquer l'insensibilité vis-à-vis des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (NaN_3, KCN, antimycine A). Pendant l'activation, les spores sont, par contre, sensibles au même point qu'en phase prévégétative au 2,4 dinitrophénol, à l'iodoacétate et, dans une moindre mesure, à la cycloheximide. Si l'action de ces inhibiteurs est ici la même que celle qu'on leur attribue généralement, alors la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative, la glycolyse (mais NaF n'est pas inhibiteur!) et éventuellement la synthèse des protéines sont impliquées dans l'activation.

L'existence d'une phase fermentative au début du processus de la germination a été constatée chez plusieurs espèces de champignons: *Phycomyces blakesleeanus* (Halbsguth et Rudolph, 1959; Rudolph, 1960 et 1961); ascospores de *Neurospora* (Sussman, 1961) et conidies de *Fusarium solani* (Cochrane et al, 1963). Chez les spores dormantes des deux premiers, les enzymes de la chaîne respiratoire sont présents, il manque en revanche ceux du cycle de Krebs.

L'effet de l'activateur est, d'autre part, rapidement annulé par le furfural 5 mM. Au contraire, un séjour à 4^0C ne désactive que lentement les spores. Ces faits sont difficiles à interpréter. Une substance formée en présence d'acide tartrique, et nécessaire à l'activation, pourrait être détruite par le furfural; une telle substance pourrait également être dégradée par la spore maintenue dormante à 4^0C, mais très lentement. En tous cas, nous constatons qu'il existe de grandes différences entre la physiologie des spores de *C. diplodiella* et de celles d'autres espèces, en particulier des ascospores de *Neurospora,* différences que nous résumons dans le tableau 3.

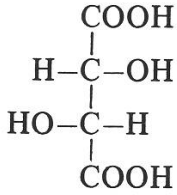
Tableau 3:

Comparaison des propriétés de l'activation chez C. diplodiella et Neurospora sp.

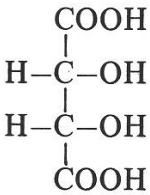
Coniella diplodiella	*Neurospora sp.* (ascospores)
L'acide L(+)tartrique, accessoirement les acides D(+)malique et mesotartrique, sont activateurs	?
Un choc thermique n'a pas d'effet activateur	Les ascospores sont activées par un choc thermique
Pas d'effet du phényl-éthyl-alcool 5 mM pendant 6 h	Le phényl-éthyl-alcool pendant 6 h active les ascospores
Le furfuraldéhyde 1 mM pendant 10 minutes n'a pas d'effet marqué. 5 mM pendant le même temps désactivent les spores activées par le tartrate.	Les ascospores sont activées par un traitement de 10 minutes au furfuraldéhyde 1 mM
Les spores ne sont que partiellement désactivées par un séjour d'un mois à 4^0C.	Les spores sont complètement désactivées par un séjour de 24 h à 4^0C.

2.3 Spécificité de l'activation

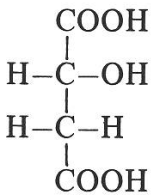
La structure des différents acides provoquant la germination et de leurs stéréoisomères est la suivante (projection de Fischer):



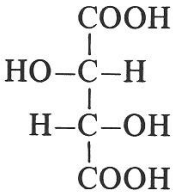
L(+)tartrique



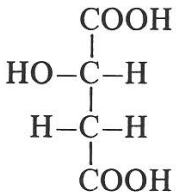
meso-tartrique



D(+)malique



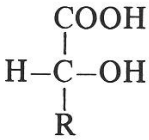
D(–)tartrique



L(–)malique

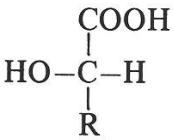
Les substances activatrices ont toutes la structure:

(a)



Les stéréoisomères non activateurs de ces substances ont par conséquent la structure opposée:

(b)



Les symboles L et D ne sont pas liés directement à ces structures, mais proviennent de la nomenclature des oses, ce qui entraîne une confusion regrettable (Vickery, 1957). En appliquant la nouvelle nomenclature (R, S) on devrait désigner comme suit les différents acides:

anciennement:	R, S
L(+)tartrique	2(R), 3(R) (+)tartrique
D(+)malique	R(+)malique
meso-tartrique	2(R), 3(S)tartrique
D(–)tartrique	2(S), 3(S) (–)tartrique
L(–)malique	S(–)malique

(d'après Adiaanse et Pilnik, 1969)

La structure (a) correspond alors à R.

Une spécificité aussi étroite, en relation, semble-t-il avec un groupement chimique défini, nous incite à penser que, lors de l'activation, intervient un enzyme dont l'acide tartrique serait le substrat principal.

Ainsi s'expliquerait la meilleure germinabilité des spores formées sur un milieu contenant cet acide (Aragno, 1973): l'enzyme responsable de l'activation ou un précurseur serait synthétisé lors de la formation ou de la maturation des spores. Cette synthèse serait stimulée par la présence du substrat agissant alors comme inducteur.

Sussman et Halvorson (1966) défendent l'idée d'une base enzymatique de la germination chez des spores activées par des métabolites, ou par des substances affectant le métabolisme. Ils relèvent pour cela les faits suivants:

1) Nature stéréospécifique de l'activation.
2) Dépendance de la température, comme un système enzymatique.
3) Blocage de la germination par certains poisons métaboliques.

Nous observons ces trois phénomènes chez *C. diplodiella.*

Il n'est toutefois pas absolument exclu que la paroi sporale intervienne dans la spécificité; on sait que des membranes dialysantes artificielles, présentant des groupements à carbones asymétriques, peuvent laisser passer sélectivement l'un des deux isomères de l'acide tartrique (Klingmüller et Gedenk, 1957).

2.4 Hypothèses sur le mode d'activation

L'acide tartrique pourrait intervenir de deux manières lors de l'activation: soit en tant que métabolite; soit, sans être utilisé directement dans une voie métabolique, comme inhibiteur, répresseur, inducteur, etc. d'une réaction enzymatique liée à la dormance ou à l'activation. Dans le premier cas, un mécanisme possible de l'activation serait celui représenté à la fig. 6.

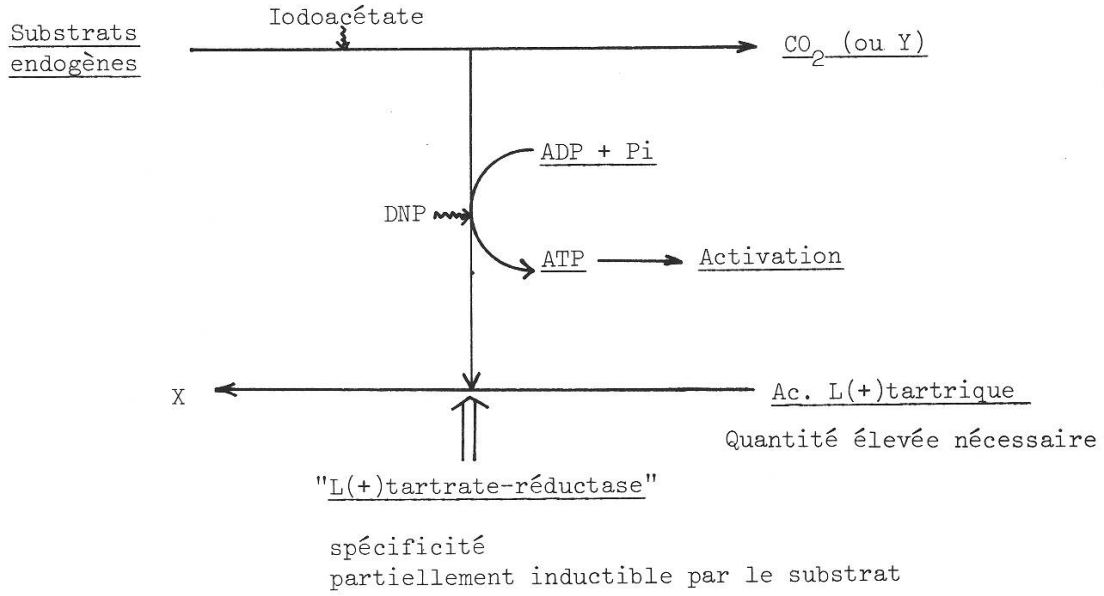


Fig. 6:

Mécanisme hypothétique de l'activation par l'acide tartrique.

L'acide tartrique fonctionnerait alors comme accepteur d'électrons, permettant l'écoulement du flux provenant de l'oxydation d'un substrat endogène. Ce flux serait couplé à une phosphorylation anaérobie, l'ATP formé étant la source d'énergie pour l'activation.

L'enzyme catalysant la réduction de l'acide tartrique serait alors le siège de la spécificité étroite pour l'agent activateur. L'acide D(+)malique agirait comme substrat accessoire, également susceptible d'être réduit.

Le découplage de la phosphorylation par le 2,4 dinitrophénol, ainsi que le blocage de la glycolyse par l'iodoacétate (au cas où les substrats endogènes seraient des glucides) auraient pour effet d'empêcher l'activation, le premier sans inhiber la réduction de l'acide tartrique, contrairement au second. Une étude plus poussée de la physiologie cellulaire de la spore pourrait être faite dans ce sens.

Autre explication possible de l'activation anaérobie: les spores, pendant cette période, ne feraient qu'accumuler de l'acide tartrique; l'activation proprement dite ne se produirait alors qu'après le retour à des conditions aérobies.

Nous avons vu (Aragno, 1973) que 10 pMoles d'acide tartrique par spore étaient nécessaires à assurer une bonne germination. Or, cette quantité d'acide cristallisée est trois à quatre fois plus volumineuse qu'une spore! Il semble donc difficile d'admettre que les spores puissent accumuler dans leur protoplasme une quantité suffisante d'acide tartrique. En outre, un tel besoin étaie l'hypothèse d'une participation métabolique anaérobie de l'acide tartrique dans le processus d'activation.

Résumé

L'auteur tente d'exprimer, par un modèle mathématique, des paramètres caractérisant la cinétique de l'apparition des tubes germinatifs.

Il distingue, dans le processus de la germination, une phase d'activation, où la présence d'acide L(+)tartrique est nécessaire, suivie d'une phase prévégétative, où elle est superflue. La phase d'activation peut se dérouler en anaérobiose et en présence de certains inhibiteurs de la chaîne respiratoire. Elle est bloquée par des inhibiteurs de la glycolyse, de la synthèse des protéines et de la phosphorylation oxydative.

L'effet de l'activation par l'acide tartrique est annulé rapidement par un traitement au furfural, beaucoup plus lentement et partiellement par un séjour à basse température.

La perte de la résistance à la dessication intervient très tôt dans le processus de la germination.

Les caractéristiques de la phase d'activation font supposer qu'elle implique une réaction enzymatique dont l'acide L(+)tartrique serait le substrat. Un modèle hypothétique du mécanisme de l'activation est proposé.

Summary

The author tries to express, by a mathematical model, parameters characterizing the kinetics of germ tube protrusion.

In the germination process, he distinguishes an activation phase, in which L(+)tartaric acid is necessary, followed by a prevegetative one, in which this acid is needless. The activation phase may occur in anaerobiosis and in presence of some inhibitors of respiratory chain. It is blocked by inhibitors of glycolysis, protein synthesis and oxidative phosphorylation.

The tartaric acid activation is reversed, rapidly by a treatment with furfural, very slowly and partially by a storage at low temperature.

The loss of resistance to dessication appears quickly in the germination process.

The characteristics of activation phase lead to suppose that it involves an enzymatic reaction, with L(+)tartaric acid as substrate. An hypothetical model of the activation mechanism is proposed.

Zusammenfassung

Der Autor versucht, die Kinetik der Sporenkeimung mit einem mathematischen Modell zu erfassen.

Er unterteilt den Keimungsprozess in eine Keimstimulationsphase, wobei L(+)Weinsäure notwendig ist, und eine vorvegetative Phase wozu L(+)Weinsäure nicht nötig ist. Die Keimstimulationsphase kann sich in Anaerobiose abspielen und mit gewissen Hemmstoffen der Atmungskette. Sie ist aber durch die Hemmstoffe der Glycolyse, der Proteinsynthese und der oxydativen Phosphorylation blockiert.

Die Keimstimulation durch Weinsäure ist durch eine Furfuralbehandlung schnell zerstört, viel langsamer und teilweise durch einen Aufenthalt in tiefer Temperatur.

Der Verlust des Widerstandes gegen die Austrocknung kommt sehr früh im Keimungsprozess vor.

Die Eigenschaften der Keimstimulationsphase geben zur Vermutung Anlass, dass eine enzymatische Reaktion stattfände, wobei L(+)Weinsäure das Substrat wäre. Es wird ein hypothetisches Modell des Mechanismus der Keimstimulation vorgeschlagen.

Bibliographie

Adiaanse A. et W. Pilnik 1969. Nomenclature of lactic, malic and tartaric acids. Ber. Wiss.-Tech. Komm. Int. Fruchtsaftunion *9*, 221–230.

Aragno M. 1973. Etude de la germination des pycnidiospores de *Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd., agent du coître de la vigne. I. Conditions de la germination. Bull. Soc. Bot. Suisse 83 (3), 223–251.

Bromfield K.R. 1964. Phytopathology *54*, 68–74.

Cochrane V.W., J.C. Cochrane, C.B. Collins et F.G. Serafin 1963. Spore germination and carbon metabolism in *Fusarium solani*. II. Endogenous respiration in relation to germination. Am. J. Bot. *50*, 806–814.

Ekundayo J.A. 1966. Further studies on germination of sporangiospores of *Rhizopus arrhizus*. J. Gen. Microbiol. *42*, 283–291.

Faes H. et M. Staehelin 1935. Le coître de la vigne *(Coniothyrium diplodiella)*. Progr. Agric. et Vitic. *56*, 108, 134, 158, 187, 258, 281.

Fletcher J. et A.G. Morton 1970. Physiology of germination of *Penicillium griseofulvum* conidia. Trans. Brit. Mycol. Soc. *54*, 65–81.

Goddard D.R. 1935. The reversible heat activation inducing germination and increased respiration in the ascospores of *Neurospora tetrasperma*. J. Gen. Physiol. *19*, 45–60.

Halbsguth W. et H. Rudolph 1959. Arch. Mikrobiol. *32*, 296–308.

Klingmüller V.O.G. et G. Gedenk 1957. Asymetric dialysis of racemates. Nature *179*, 367.

McCormick N.G. 1964. Biochem. Biophys. Res. Comm. *14*, 443–446.

Martin J.F. et G. Nicolas 1970. Physiology of spore germination in *Penicillium notatum* and *Trichoderma lignorum*. Trans. Brit. Mycol. Soc. *55*, 141–148.

Mathre D.E. 1969. Physiology of thick walled spores of soil borne plant pathogenic fungi. I. Respiration and germination of *Helminthosporium sativum* and *H. pedicellatum* spores. Can. J. Bot. *47*, 1513.

Rudolph H. 1960. Planta *55*, 424–437.

– 1961. Planta *57*, 284–312.

Sun C.Y. et A.S. Sussman 1960. Reversible deactivation of *Neurospora* ascospores by low temperature. Am. J. Bot. *47*, 589–593.

Sussman A.S. 1961. The role of trehalose in the activation of dormant ascospores of *Neurospora*. Quart. Rev. Biol. *36*, 109–116.

– et H.O. Halvorson 1966. Spores: their dormancy and germination. Harper, New York, 354 pp.

Terrier Ch. 1949. Le problème que pose la lutte contre le coître. Rev. romande Agric. Vitic. Arboric. *5*, 89–91.

Turian G. et M. Staehelin 1954. Nouvelles recherches sur le champignon du coître de la vigne (*Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.). Ann. Agr. Suisse *55*, 987–997.

Vickery H.B. 1957. Assignment of D and L prefixes to the tartaric acids. J. Chem. Educ. *34*, 339–341.

Michel Aragno
Institut de Botanique de l'Université
CH-2000 Neuchâtel 7