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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 83 (1973)

Heft: 3

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

Autor: Aragno, Michel

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-58451

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: 02.10.2025

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

Ber. Schweiz. Bot. Ges. *83* (3), 223–251 (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

par *Michel Aragno*

Laboratoire de Cryptogamie
Institut de Botanique de l'Université Neuchâtel

Manuscrit reçu le 3 août 1973

Introduction

La germination est l'ensemble des phénomènes transformant une spore, une graine, un sclérote dormants en cellules végétatives à activité métabolique élevée, dont les divisions vont reprendre et former, directement ou indirectement, un organisme semblable à celui qui leur a donné naissance. Une telle transformation se manifeste par des événements biochimiques, des modifications du métabolisme et de la structure cellulaire. Il s'agit en fait, chez les champignons, du premier pas de la morphogénèse.

Chez les champignons parasites, tout ou partie du cycle vital doit se dérouler en fonction de celui de l'hôte. La période d'infectabilité peut être très limitée dans le temps; les spores doivent être alors présentes et prêtes à germer.

Comme nous le verrons plus loin, la période d'infectabilité des raisins par *Coniella diplodiella* est très étroite. Pratiquement, elle comprend les douze heures qui suivent une chute de grêle, à l'époque de la maturation des raisins; suivant les régions, il peut ne pas grêler chaque année à un endroit donné!

Ajoutées aux implications de la survie des spores dans un environnement défavorable, celles de l'extrême étroitesse de la période d'infectabilité motivent l'intérêt d'une étude de la germination chez ce parasite, dont les pycnospores assument à elles seules les fonctions de multiplication, de transmission et de conservation de l'espèce. Sa culture est en outre aisée, et il fructifie abondamment en milieu synthétique.

A côté de l'étude en soi de la germination, nous nous sommes donc intéressé, dans ce travail, aux relations entre la germination et le parasitisme, condition particulière de la biologie et de l'écophysiologie de ce champignon.

Coniella diplodiella (Speg.) Pet. et Syd. (1926) [= *Phoma diplodiella* Speg. (1878), *Coniothyrium diplodiella* (Speg.) Sacc. (1884)] appartient aux *Deuteromycetes (Fungi imperfecti),* ordre des *Sphaeropsidales,* famille des *Sphaeropsidaceae.* C'est l'agent d'une maladie de la vigne, nommée suivant les régions et les auteurs, coître, maladie de la grêle, rot livide, rot blanc. Il forme, *in vivo* et *in vitro,* des pycnides typiques, glabres, à paroi mélanisée et pourvues d'un ostiole. Les spores, unicellulaires, sont produites en succession centripète à l'extrémité de conidiophores émergeant d'un massif de cellules au fond de la pycnide. Leur paroi est tout d'abord incolore, puis brunit par la suite. Elles apparaissent noires en masse.

Le coître, ou maladie de la grêle, est connu depuis longtemps dans le vignoble suisse romand. La première mention écrite est un chapitre de l'ouvrage de Reymondin (1798), intitulé *„De la maladie des raisins, suite de la grêle, et des moyens pour en diminuer les ravages".* A cette époque, l'agent de la maladie n'avait pas été étudié; ce n'est qu'en 1878 que Spegazzini décrit, en Italie, sous le nom de *Phoma diplodiella,* un champignon parasite des raisins auquel Dufour (1888) identifiera l'agent du coître. Par la suite, ce champignon a été signalé en France et aux Etats-Unis (Viala et Ravaz, 1888; Viala, 1893), en Hongrie (Istvanffi, 1902) etc.

Le premier, Dufour (1888) a expliqué la relation directe entre la grêle et l'apparition de la maladie. En ce temps-là, la lutte consistait surtout en l'ablation des parties malades. Les produits utilisés contre les autres parasites (sels de cuivre en particulier) étant à peu près inefficaces (Terrier, 1949), le vigneron était fort démuni dans sa lutte contre le coître; cela a suscité de nombreux travaux, en particulier à la station fédérale d'essais agricoles de Lausanne.

Faes et Staehelin (1922, 1923a, 1923b, 1935) étudient de façon plus approfondie la biologie de *C. diplodiella,* l'émission des spores, les conditions de germination et de croissance. Ils montrent, entre autres, l'action de la température, du pH et de la concentration en sucre sur la germination; ils indiquent que les spores germent rapidement et abondamment dans le jus de raisin, lentement et mal dans l'eau de pluie ou de fontaine. Ils entrevoient aussi, sans pousser plus loin leur étude, qu'une proportion suffisante d'acides organiques est utile à la germination et à la croissance.

La culture pure *in vitro,* sur milieux naturels, avait déjà été réalisée par Istvanffi (1902), mais Terrier (1949) a, le premier, réussi à cultiver et à faire fructifier *C. diplodiella* sur milieu synthétique. Ses travaux ont servi de base à toute une série de recherches sur la biologie et la lutte contre ce champignon.

Turian et Staehelin (1954) ont repris les travaux de Terrier; bien qu'orientant principalement leurs efforts vers la recherche de substances antiparasitaires, ils précisent les besoins nutritifs minima du champignon et étudient, par des modèles en laboratoire, la biologie du champignon dans le sol.

Turian (1954a) étudie plus en détail les besoins minima du parasite en facteurs de croissance, et en particulier les besoins de biotine, en relation avec la source d'azote.

Depuis cette époque, les travaux ont été consacrés à la recherche et à l'essai de fongicides, pour détruire les spores dans le sol – traitement préventif (Turian, 1954b; Turian et Leyvraz, 1954; Turian et Staehelin, 1955) ou sur les grappes, après la grêle – traitement curatif (Staehelin et al., 1956; Bolay et Corbaz, 1961; Bolay, 1963; Bolay et Simon, 1964).

Récemment, Locci et Quaroni (1972) ont publié une étude préliminaire sur des souches italiennes de *C. diplodiella.* Ils notent des différences sensibles avec les résultats obtenus par les auteurs suisses, en particulier sur la germination (elle se produit dans l'eau, les spores ne germent presque plus à pH 3,0). Toutefois, les conditions de cette étude, en particulier le milieu de culture, la maturité et la technique de préparation des spores, ne sont pas précisées; une comparaison rigoureuse est donc impossible.

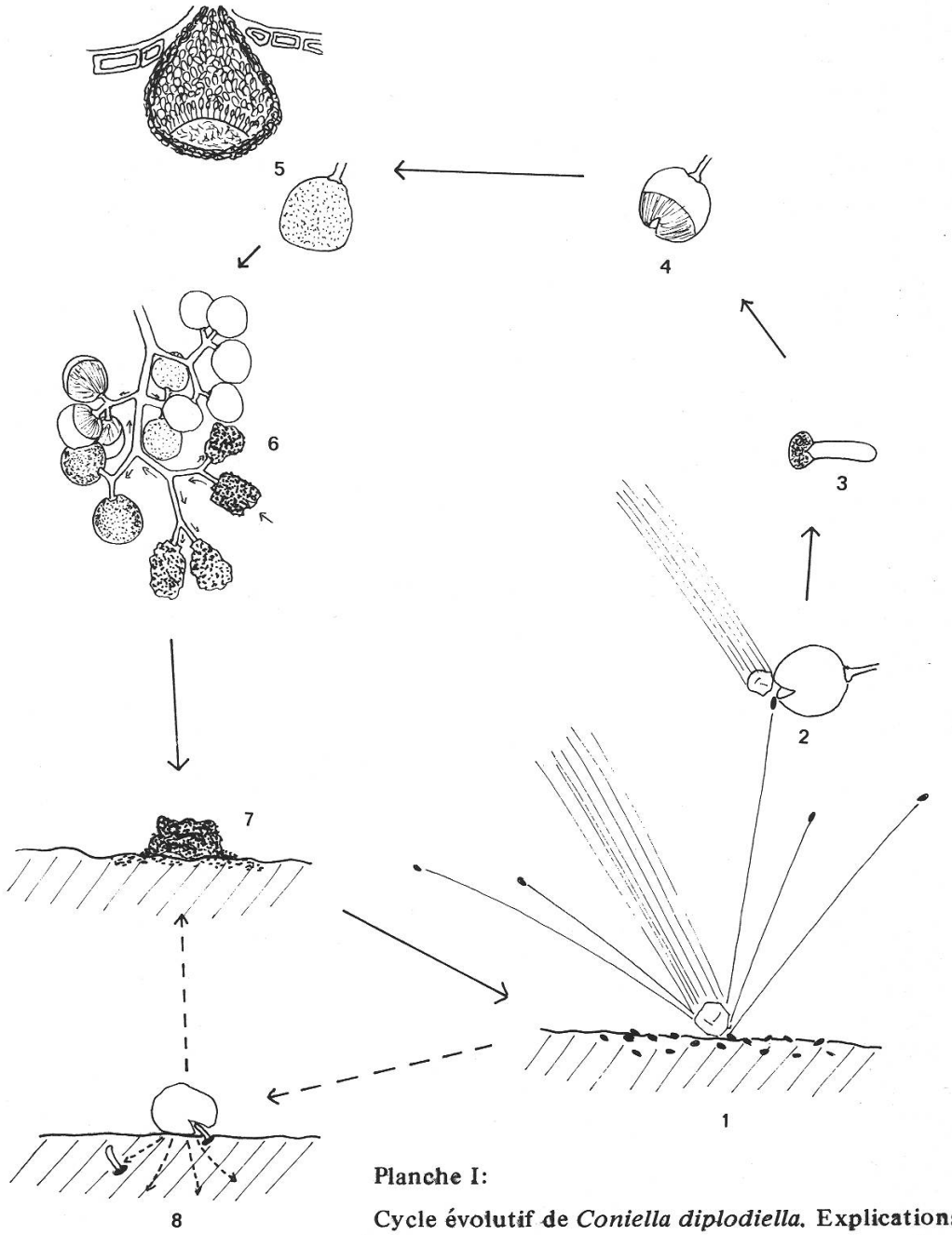

Planche I:

Cycle évolutif de *Coniella diplodiella.* Explications: cf texte.

Cycle évolutif de Coniella diplodiella

Les spores de *C. diplodiella* se maintiennent dormantes dans le sol des vignes. Suivant les conditions écologiques, on peut en trouver jusqu'à 2000 par g de terre (Turian et Staehelin, 1954).

Du sol, elles sont projetées par les éclaboussures, lors de précipitations (planche I, 1), sur les raisins. Le mycélium n'étant pas à même de percer la cuticule, la pénétration se fait par une blessure, dans la grande majorité des cas à la suite d'une chute de grêle (planche I, 2). D'autres causes, éclatement physiologique, blessures occasionnées par des oiseaux ou des insectes, peuvent donner lieu à des infections sporadiques (Staehelin et al., 1956).

Une fois en contact avec la pulpe du raisin, les spores germent (planche I, 3) et l'infection débute. 12 heures après, en moyenne, elle est irréversible. Le traitement doit donc être effectué dans cet intervalle.

Le mycélium envahit le grain (planche I, 4). Les pycnides apparaissent entre l'épiderme et la cuticule (planche I, 5 a et b). Par la rafle, le mycélium envahit peu à peu toute la grappe (planche I, 6). Il suffit donc d'un grain infecté pour détruire complètement cette dernière.

Les grains coîtrés se déssèchent précocement et tombent sur le sol dans lequel les spores se dispersent (planche I, 7).

La possibilité d'un développement saprophytique du champignon dans le sol a été évoquée par Terrier (1949) et Turian et Staehelin (1954). Il est concevable que des grains sains, tombés accidentellement, puissent s'infecter sur le sol et donner naissance à des pycnides. Toutefois, et contrairement à la supposition de Terrier, Turian et Staehelin (1954) ont montré que, dans les conditions normales, les spores de *C. diplodiella* ne germent pas dans le sol, sauf peut-être à proximité d'un grain tombé, suite à la diffusion de son jus (planche I, 8).

Le problème posé

Avant notre travail, les connaissances sur la physiologie de la germination des spores de *C. diplodiella* se résumaient à ceci:

1. Les spores germent dans la pulpe des grains de raisin; elles germent aussi dans le moût.

2. Les spores ne germent pas dans la terre, en l'absence de facteurs apportés par les grains de raisin (Turian et Staehelin, 1954).

3. Les spores germent peu ou pas dans l'eau de pluie ou de fontaine (Faes et Staehelin, 1935).

4. La germination, comme la croissance, est très lente au-dessous de 15^0C, atteint son maximum entre 24 et 27^0C, et s'arrête au-dessus de 34^0C (Faes et Staehelin, 1935; Terrier, 1949).

5. La germination est bonne de pH 2.9 à 5.9 dans du moût tamponné. Elle est nulle au-dessus de pH 6.6 (Faes et Staehelin, 1935; Turian et Staehelin, 1954).

6. Les spores peuvent être conservées au sec pendant 20 ans sans perdre leur pouvoir germinatif (Terrier, 1949).

Nous ne pouvons tenir compte ici des résultats de Istvanffi (1902), les conditions dans lesquelles cet auteur a travaillé n'étant pas suffisamment précisées. Il donne en revanche une bonne description morphologique de la germination.

Le champignon germant en présence de jus de raisin, mais pas dans le sol, on peut formuler deux hypothèses:

a) Le développement des spores dans le sol est bloqué par un facteur extérieur (dormance induite au sens de Sussman et Halvorson (1966): pH, agents fongistatiques diffus (Turian et Staehelin, 1954; Dobbs et Hinson, 1953).

b) Les spores présentent une dormance constitutive, au sens de Sussman et Halvorson (1966), et un ou plusieurs facteurs activateurs, présents dans la pulpe des raisins, sont nécessaires à la germination.

En d'autres termes, la dormance des spores dans le sol est-elle de nature *écologique* ou *physiologique?*

Dans un sol neutre ou alcalin, ou dans l'eau de pluie ou de fontaine, la dormance des spores peut s'expliquer par le pH trop élevé du milieu (Turian et Staehelin, 1954). Mais est-ce bien le seul facteur limitant?

Nous nous proposons, dans ce travail, d'étudier les causes de cette dormance, les conditions nécessaires à la germination des spores, et les relations de spécificité entre le parasite et son hôte lors de la germination.

Matériel et méthodes générales

Souche utilisée: Coniella diplodiella (Speg.) Pet. et Syd., souche NEU F 17 = Changins No 5, isolée d'un grain de raisin coîtré de la var. *chasselas,* ct. Vaud, vignoble du Dézaley, 1955, leg. H. Aebi. Cette souche, mise aimablement à notre disposition par le service de mycologie de la station fédérale de recherches agronomiques de Changins, a été utilisée pour l'ensemble de notre travail. Nous avons vérifié sa pathogénicité par essai d'infection de grapillons, en laboratoire.

Milieu de culture pour la croissance du champignon. Nous avons utilisé le milieu suivant, désigné plus loin par „milieu F-T". Il correspond à la formule de Fries, adaptée selon Turian (1954a) et complété d'acide tartrique.

Glucose	40	g
L-asparagine	2	g
KH_2PO_4	1	g
$MgSO_4 . 7\ H_2O$	0,5	g
$CaCl_2$	0.1	g
NaCl	0.1	g
Solution d'oligoéléments*	1	ml
Thiamine	500	µg
Biotine	10	µg
Acide L(+)tartrique	150	mg
Eau distillée qsp	1000	ml
Ramené à pH 4.5 par NaOH 1 N		
Agar (Oxoïd No 1)	14	g

* Solution d'oligoéléments:

$Na_2B_4O_7 . 10\ H_2O$	100	mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} . 4\ H_2O$	40	mg
$FeSO_4 . 7\ H_2O$	1	g
$CuSO_4 . 5\ H_2O$	400	mg
$MnSO_4 . H_2O$	60	mg
$ZnSO_4 . 7\ H_2O$	800	mg
Eau distillée	1000	ml

Le milieu est réparti en tubes de 18 mm de diamètre, à raison de 8 ml par tube. Il est ensuite tyndallisé (chauffé trois fois de suite à 24 heures d'intervalle, à 100° C pendant 30 minutes). Les tubes sont alors mis à refroidir en position inclinée, à 12° de l'horizontale.

Préparation des spores. Les cultures (pour chaque série d'expériences, au moins trois tubes d'une même série de repiquages) sont inondées par 2–3 ml d'une solution stérile de NaCl 50 mM, puis raclées légèrement au moyen d'une anse de platine stérilisée, de façon à mettre les spores en suspension. Celle-ci est ensuite filtrée sur une triple couche de gaze, pour éliminer les débris de pycnides et les morceaux d'agar, puis centrifugée à 400 g pendant 5 minutes. On jette le surnageant, on remet le culot en suspension dans 10 ml environ d'une solution stérile de NaCl 50 mM; on centrifuge à nouveau 5 minutes à 400 g. On répète une deuxième fois ce lavage. Le culot final et ensuite mis en suspension dans le milieu désiré, à la concentration voulue.

Les spores de *C. diplodiella* sont des myxospores; leur immersion n'exige donc pas de traitement préalable par un mouillant. Par contre, en suspension aqueuse, elles floculent après quelques heures ou se collent aux parois du récipient, rendant ainsi l'observation impossible. L'étude de la germination en milieu liquide agité a donc été abandonnée.

Germination en goutte pendante. Une goutte de suspension de spores (env. 5.10^5 spores/ml) dans le milieu adéquat est déposée au milieu d'un couvre-objet de 24 x 24 mm, préalablement lavé au mélange chromique, rincé trois fois à l'eau distillée, puis à l'alcool. La lame est placée, goutte en bas, sur une chambre humide, composée d'un cylindre de verre de 18 mm de diamètre intérieur et de 5 mm de haut, collé à l'araldite sur une lame porte-objets. L'étanchéité est assurée au moyen de vaseline blanche. Par cette méthode, l'observation directe est aisée; elle permet de travailler à n'importe quel pH. Elle a aussi des inconvénients:

1) La quantité de milieu est très faible, de l'ordre de 10 µl, et une trace d'impureté peut avoir des conséquences importantes.

2) Les spores tendent à se rassembler au centre de la goutte, rendant parfois difficile la lecture des résultats.

3) Il est impossible, sans un dispositif spécial, de modifier l'environnement gazeux à volonté.

Cette méthode a toutefois été utilisée avec profit quand les autres n'étaient pas applicables.

Germination sur agar, méthode de la „double couche". Le milieu de germination est préparé à une concentration égale aux 9/8 de la concentration finale désirée. Il est gélosé à 1,4% et, sauf spécification, ramené à pH 4.5 par NaOH ou HCl. On le distribue en boîtes de Petri de 5 cm, stériles (Millipore) à raison de 8 ml par boîte.

Les spores, lavées, sont suspendues à raison d'environ 5.10^5 par ml dans une solution de NaCl 50 mM, gélosée à 1%, fondue et maintenue liquide à 42° C. Cette suspension est coulée sur les milieux de germination, 1 ml par milieu.

Par cette méthode, les inconvénients de la goutte pendante sont évités; les spores restent en place, et le volume total du milieu de germination est beaucoup plus élevé, ce qui minimise les conséquences d'une souillure. En outre, la boîte peut être placée ouverte dans un récipient où l'on peut créer l'environnement gazeux désiré.

Cette méthode permet aussi d'avoir toutes les spores presque au même niveau dans le champ du microscope. Pour éviter la formation de buée lors de l'observation, on dépose sur l'agar une lamelle couvre-objet.

Les inconvénients sont:

1) Les substances actives du milieu de germination doivent diffuser dans la couche supérieure, et le temps de germination est un peu prolongé.

2) La présence d'agar, qui pourrait avoir des effets imprévus.

Lecture des résultats. Pour chaque essai, le pour-cent de germination est établi sur un total d'au moins 200 spores. Toutes les spores présentes dans un champ microscopique sont comptées, sauf celles qui, manifestement, sont mortes (spores brisées, ou optiquement vides).

L'observation se fait à un grossissement de 400 fois.

Nous considérons comme germée toute spore dont la paroi mélanisée est rompue par le gonflement. Pour les spores non mélanisées, le critère est l'apparition nette du tube germinatif.

Sauf indication contraire, chaque résultat exprimé dans ce travail est la moyenne de trois essais, effectués simultanément dans les mêmes conditions, avec la même population de spores.

Nous définissons le *temps moyen de germination* comme le temps nécessaire pour que la moitié des spores susceptibles de germer aient rompu leur paroi mélanisée, et *la vitesse moyenne de germination* comme l'inverse de ce temps (en h^{-1}).

L'analyse statistique de la répartition des résultats de chaque expérience (en % de germination) autour de la moyenne des trois essais nous a permis d'établir les différences significatives minimum ($p \geqslant 0{,}99$) entre deux résultats expérimentaux, moyennes de trois essais chacun:

a) différence d'au moins 7% entre les résultats de deux expériences, s'ils sont inférieurs l'un et l'autre à 25% germination.

b) différence d'au moins 12% entre les résultats de deux expériences, si l'un au moins est compris entre 25 et 75% germination.

c) différence d'au moins 6% entre les résultats de deux expériences, s'ils sont supérieurs l'un et l'autre à 75% germination.

Résultats

1. Essais préliminaires

Quelques essais préliminaires vont nous permettre de préciser le problème posé et l'orientation ultérieure de ce travail. Faut-il rechercher une inhibition de la germination par le sol, ou une activation par la pulpe de raisin?

On fait germer, en chambre humide, des spores d'une culture âgée de 1 mois. Incubation: 24 heures à 27° C.

Milieu:	% germination:
Moût de raisins 20%, pH 3.5	98
Eau distillée	0
NaCl 0.9%	0
Tampon glycine – HCl 50 mM, pH 3.5	2
Tampon citrate 50 mM, pH 4.0	3

Conclusions: les conditions extérieures (pH, inhibition par des agents fongistatiques du sol) ne suffisent pas à expliquer la dormance des spores. Celles-ci doivent trouver dans le jus de raisin un ou plusieurs facteurs responsables de leur activation.

2. Conditions physicochimiques externes de la germination

Dans la nature, la pulpe des raisins blessés est le substrat où s'effectue la germination des spores de *C. diplodiella.* Expérimentalement, le moût de raisin, même dilué et stérilisé, permet une excellente germination. Aussi est-ce dans un tel milieu, à base de jus de raisin de la var. *chasselas,* que nous allons étudier l'influence des facteurs physicochimiques externes, ou écologiques, sur la germination, pour déterminer les conditions optimales de celle-ci.

2.1 Le pH

Nous avons étudié l'effet du pH sur la germination, en chambre humide, avec 20% de moût de raisin dans les tampons 50 mM suivants:

de pH 1,4 à pH 2,65	:	HCl – KCl
de pH 2,65 à pH 3,6	:	Glycine – HCl
de pH 3,6 à pH 5,65	:	Citrate – phosphate
de pH 5,65 à pH 7,4	:	Phosphate

La cinétique a été établie pour chaque valeur de pH étudiée, ce qui permet d'estimer la vitesse moyenne de germination (fig. 1).

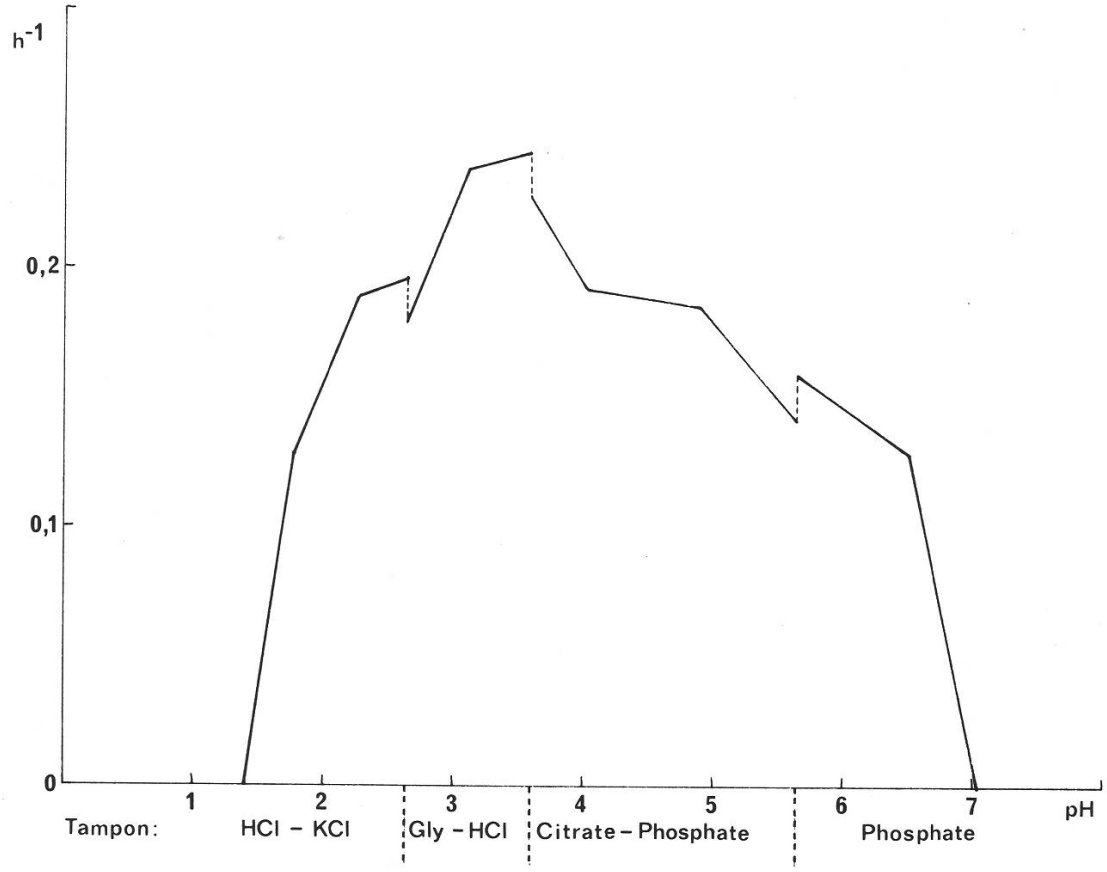

Fig. 1:

Effet du pH sur la germination dans le moût dilué.
Vitesse de germination (en h^{-1}) en fonction du pH.

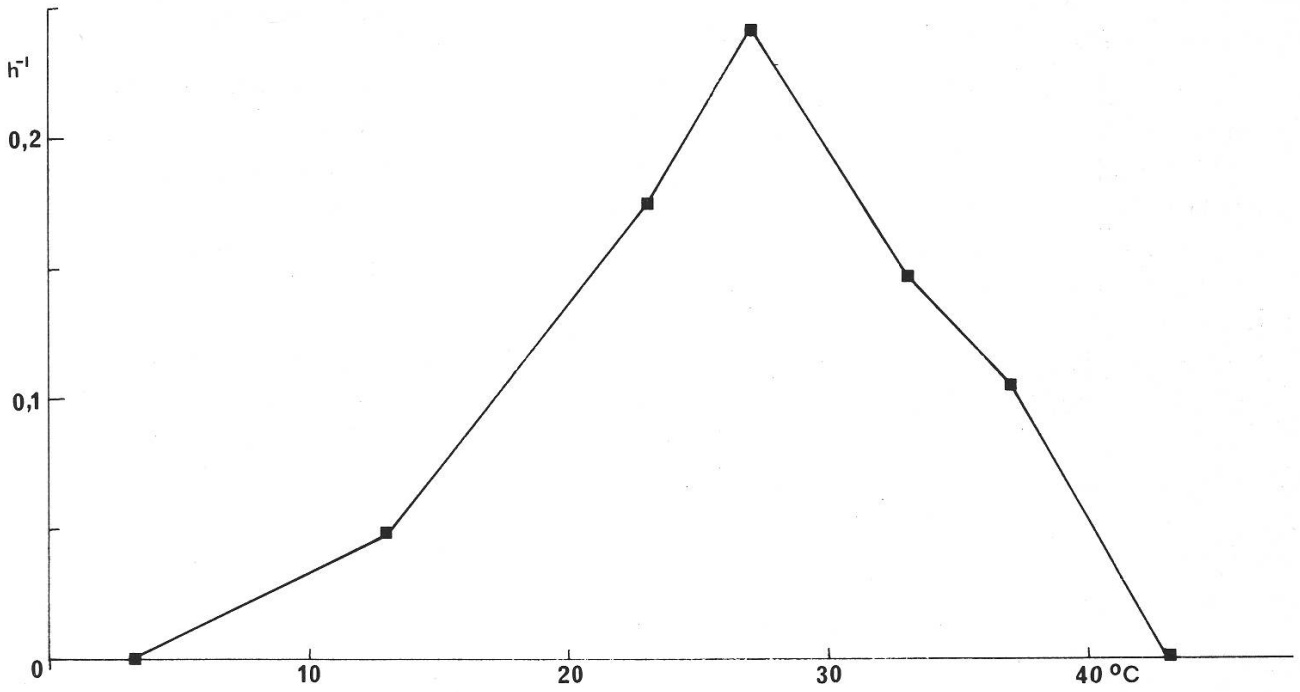

Fig. 2:

Effet de la température sur la germination.
Vitesse de germination (en h^{-1}) en fonction de la température.

La plus grande vitesse moyenne est atteinte, dans ces conditions, aux pH 3,1 et 3,6. De pH 2,2 à pH 4,9, la vitesse est presque aussi élevée, et ne descend pas au-dessous de 0,18 h^{-1}. Les spores ne germent plus à pH 1,4 et au-dessus de pH 7,02.

L'optimum comprend le domaine de pH du milieu naturel (environ pH 2,2–2,4 à fin juillet, et pH 3,1–3,4 à l'époque de la vendange). Il s'étend au-delà jusqu'à pH 5. A la neutralité, toutefois, la germination est bloquée. Ces résultats confirment, en les précisant, ceux obtenus par Faes et Staehelin (1935) et par Turian et Staehelin (1954).

2.2 La température

La température a une grande importance dans les conditions naturelles. Selon Terrier (1949), à l'époque de la maturité des raisins, quand les dégâts dûs au coître sont moindres, le facteur limitant du développement de *C. diplodiella* est la température, non la teneur en sucre. Nous avons donc étudié la germination, dans du moût dilué, des spores de *C. diplidiella* à différentes températures.

Milieu employé: moût 20% + tampon glycine-HCl 50 mM, pH 3,5.
Technique de germination: goutte pendante, en chambre humide.

Résultats: fig. 2. L'optimum est ici très marqué, à 27° C, ce qui confirme les résultats de Terrier (1949). A 37° C, la germination a encore lieu, si l'on considère comme germée une spore dont la paroi mélanisée est rompue par le gonflement. Mais il n'y a plus, à cette température, de différenciation du tube germinatif; la croissance apicale est bloquée.

Enfin, à 3° C comme à 43° C, les spores ne germent plus en 48 h. Toutefois, ces températures ne sont pas létales.

2.3 La pression osmotique

On sait (Terrier, 1949) que *C. diplodiella* est capable de se développer sur des raisins mûrs à de fortes concentrations de sucre, 170 g/l par exemple, ce qui, compte tenu des autres substances en solution, correspond à une pression osmotique de 25 atmosphères env. Avant la maturité, la pression osmotique est plus basse. Par exemple, sur la base de la composition des raisins *chasselas* en sucres, acides tartrique et malique, en 1935 (Benvegnin et al., 1947) on peut l'estimer à 12 atm. environ le 19 août, et à 25 atm. à maturité (10 octobre). Les spores exigent-elles pour germer une pression osmotique élevée, ou y sont-elles simplement tolérantes?

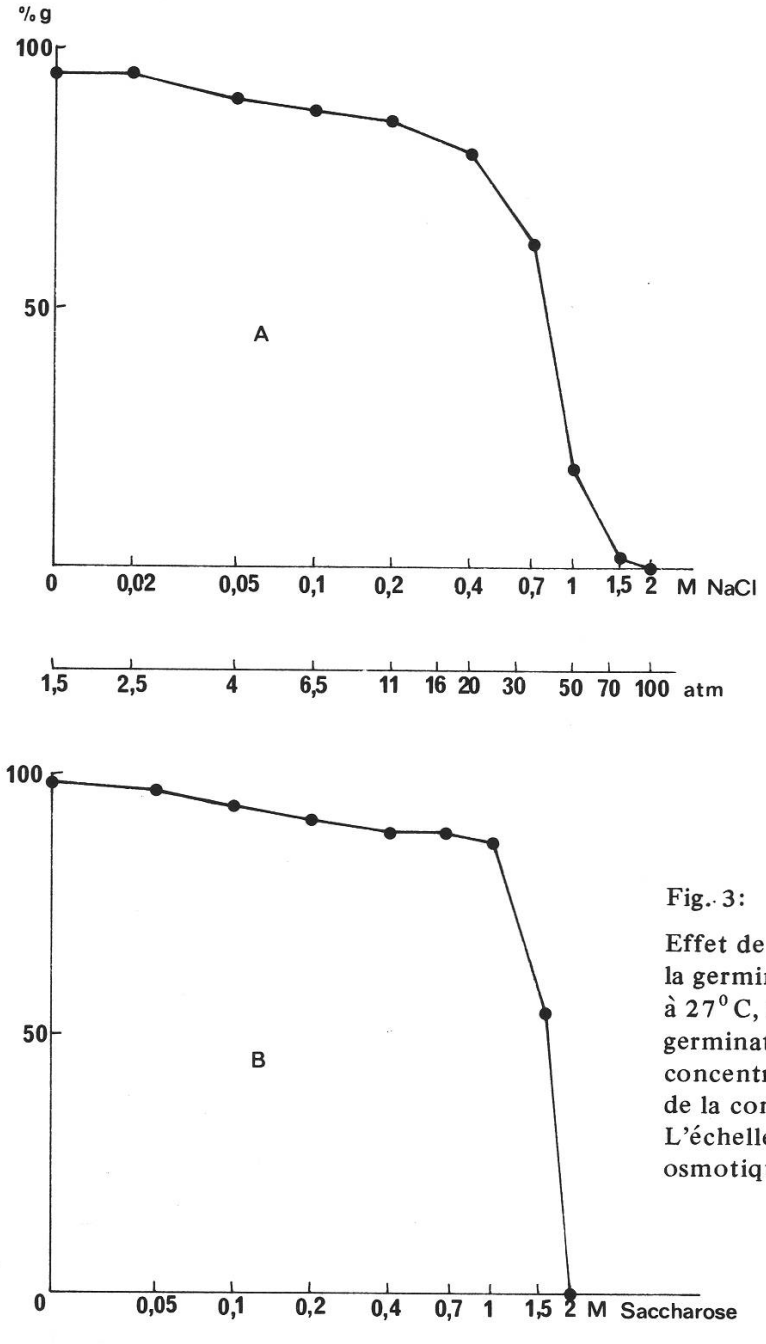

Fig. 3:

Effet de la pression osmotique sur la germination. % de germination en 24 h, à 27° C, dans le milieu minimum de germination. A: en fonction de la concentration de NaCl; B: en fonction de la concentration de saccharose. L'échelle médiane indique les pressions osmotiques correspondantes.

Milieu employé: acide tartrique – NaOH 50 mM pH 4,0, + NaCl ou saccharose à la concentration voulue. Nous avons utilisé ici le milieu minimum décrit plus loin, de façon à avoir une pression osmotique minimale la plus faible possible, ici 1,5 atm. environ.

Technique de germination: goutte pendante, en chambre humide. On mesure le % de germination en 24 heures, à 27° C.

Résultats: fig. 3, A et B. Une pression osmotique élevée n'est pas nécessaire à la germination des spores de *C. diplodiella.* Celle du milieu minimum suffit.

La germination en 24 heures est abaissée à 50% par une concentration de NaCl de 800 mM environ, et par une concentration de saccharose de 1,6 M environ, ce qui correspond à la même pression osmotique théorique. Il semble donc bien que ce soit ce phénomène qui limite ici la germination, et non un effet inhibiteur propre à l'une ou l'autre de ces substances.

La pression osmotique est nettement inhibitrice au-dessus de 25 atm. environ. Celle des raisins *chasselas,* sous nos climats, correspond donc au maximum tolérable pour assurer une bonne germination.

2.4 Composition de l'environnement gazeux

Dans l'air, deux gaz principalement sont susceptibles d'être utilisés par *C. diplodiella:* l'oxygène et l'anhydride carbonique. Nous allons donc essayer de faire germer les spores en l'absence de l'un ou l'autre de ces gaz.

2.4.1 Germination en anaérobiose

Chez de nombreux champignons, l'oxygène est absolument nécessaire à la germination, ou au moins à son achèvement. Toutefois, les spores de certaines espèces germent aussi bien en anaérobiose (Lin, 1940). Dans d'autres cas, l'achèvement de la germination n'est pas possible en anaérobiose, mais certaines phases du phénomène ne nécessitent pas la présence d'oxygène, comme chez *Mucor rouxiana* et *M. hiemalis* (Sussman et Halvorson, 1966). C'est aussi le cas des ascospores de *Neurospora tetrasperma* (Goddard, 1935; Sussman et al., 1966).

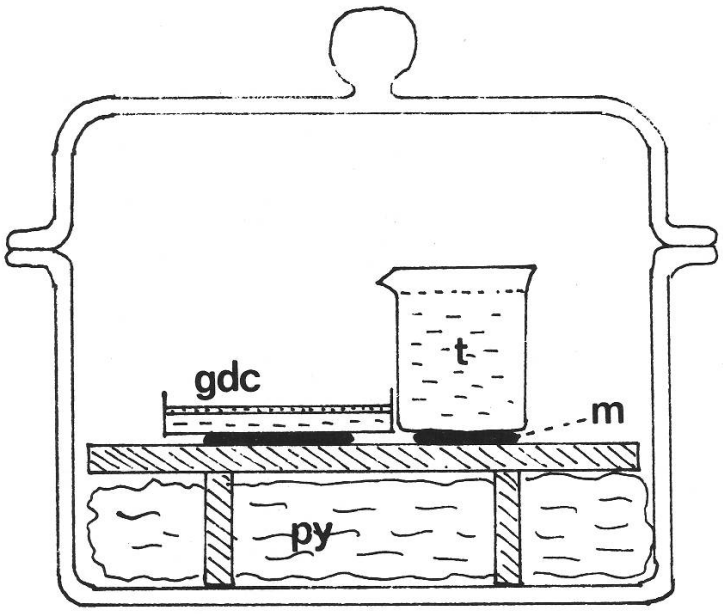

Fig. 4:

Schéma du dispositif pour l'étude de la germination en anaérobiose. gdc: système de germination en double couche, milieu = NaCl 50 mM gélosé, 5.10^5 spores/ml dans la couche supérieure; t: solution de tampon acide tartrique – NaOH 50 mM, pH 4.5; m: mastic; py: coton imbibé de pyrogallol + K_2CO_3.

Sussman et Halvorson (1966) insistent sur une difficulté technique de cette étude: dans un appareil à cultures anaérobies, l'oxygène ne peut être enlevé instantanément. Aussi les tous premiers stades de la germination se déroulent en présence d'une quantité décroissante, mais non négligeable, de ce gaz. Nous avons alors procédé comme suit (fig. 4):

Les spores ont été placées, selon la méthode „agar double couche", sur une base gélosée ne contenant que NaCl 50 mM. La boîte ainsi préparée (gdc) est placée dans le récipient à culture anaérobie, maintenue au fond par un peu de mastic (m). A côté, on place, maintenu de la même manière, un petit becher rempli de milieu de germination (t), dans nos essais une solution d'acide tartrique 50 mM ramenée à pH 4.5 par NaOH (voir plus loin).

Le milieu de germination est versé sur les spores, en inclinant le récipient, après le temps nécessaire à l'établissement de l'anaérobiose.

Celle-ci a été obtenue par deux méthodes: pyrogallol + K_2CO_3, et méthode de Brewer (où l'oxygène est éliminé par réaction avec l'hydrogène, en présence d'un catalyseur au Pd) au moyen des appareils Gaspak (BBL) (Brewer et Allgeier, 1966).

Incubation: à 27° C. Lecture des résultats: 24 heures après l'introduction du milieu de germination.

Résultats:	% de germination en 24 h	
	en anaérobiose	à l'air ambiant
Méthode au pyrogallol:	31	94
Méthode de Brewer:	15	85

Il y a donc, dans ces conditions, une nette inhibition du phénomène global.

2.4.2 Germination en absence de CO_2

L'anhydride carbonique est nécessaire à la germination des spores de certains champignons, comme *Aspergillus niger* (Yanagita, 1957).

Ici, encore plus que pour l'anaérobiose, il est difficile d'assurer l'absence complète de CO_2 dans le milieu. Ce gaz est un produit de la respiration des spores; il est possible qu'elles le réutilisent immédiatement, avant qu'il n'ait été éliminé dans la phase gazeuse.

Technique de germination: comme pour l'anaérobiose. On fait passer à travers le récipient, muni de deux tubulures opposées, un courant d'air débarassé de CO_2 sur KOH conc. et saturé d'humidité. Une solution de $Ba(OH)_2$ nous permet de contrôler l'absence de CO_2 dans le courant d'air.

Le milieu est versé sur les spores 1 h après la mise en marche de l'appareil. Lecture des résultats: 24 heures après l'introduction du milieu de germination. Un essai parallèle est fait à l'air ambiant.

Résultats:	% de germination en 24 h
Air sans CO_2	98
Air ambiant	98

Les spores peuvent donc germer en absence de CO_2 dans la phase gazeuse. Mais on ne peut savoir si elles réutilisent immédiatement celui qu'elles produisent par la respiration.

3. Recherche d'un milieu minimum de germination

Des essais préliminaires nous ont montré que, outre des conditions physico-chimiques externes favorables, un ou plusieurs facteurs présents dans le moût de raisins étaient nécessaires à la germination des spores de *C. diplodiella*.

En nous basant sur la composition du moût en sucres et en acides organiques (Kliewer, 1966) ainsi que sur celle du milieu F-T, nous avons préparé un milieu synthétique (tableau 1) dans lequel nous avons essayé de faire germer les spores de *C. diplodiella* (goutte pendante en chambre humide).

Ce milieu synthétique a, comme le moût, la propriété de faire germer la quasi totalité des spores de *C. diplodiella* (fig. 5). La germination est un petit peu plus lente, mais les graphes de cinétique sont assez voisins pour qu'on puisse supposer que le ou les facteurs nécessaires à la germination des spores de *C. diplodiella* et présents dans le moût le sont aussi dans le milieu synthétique.

Tableau 1:

Milieu synthétique pour la germination

Glucose	20 g
Fructose	20 g
Saccharose	0.2 g
Raffinose	0.2 g
Melibiose	0.02 g
Galactose	0.02 g
Acide L(+)tartrique	0.8 g
Acide DL malique	0.8 g
Acide citrique	0.1 g
Acide oxalique	0.04 g
Tartrate d'ammonium	0.6 g
Asparagine	0.3 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0.5 g
NaCl	0.1 g
$CaCl_2$	0.1 g
$Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$	100 µg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$	40 µg
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 mg
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	400 µg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	60 µg
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	800 µg
Thiamine.HCl	100 µg
Biotine	1 µg
Acide p-aminobenzoïque	10 µg
Riboflavine	10 µg
Pantothénate de Ca	40 µg
Nicotinamide	40 µg
Inositol	40 µg
Acide folique	1 µg
Acide ascorbique	1 mg
Acide β-indolyl-acétique	20 µg
Tampon Glycine – HCl	50 mM, pH 3.5
Eau distillée	ad 1000 ml

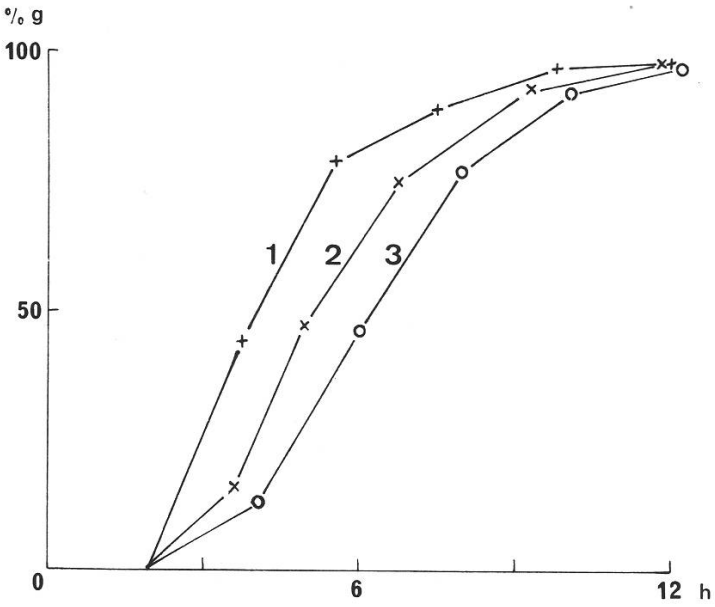

Fig. 5:

Cinétique de germination dans différents milieux. 1: moût 20%, tampon glycine-HCl 50 mM, pH 3.5; 2: milieu synthétique (cf tableau 1); 3: acide tartrique 50 mM + NaOH ad pH 4.0.

En éliminant successivement les substances dont l'absence ne diminue pas l'activité sur la germination, nous avons déterminé celle qui, à elle seule, induit la germination: c'est l'acide L(+)tartrique.

La cinétique de germination, dans une solution 50 mM d'acide L(+)tartrique ramenée à pH 3.5 par NaOH (fig. 5) se rapproche beaucoup de celle obtenue dans le milieu synthétique complet.

L'acide L(+)tartrique est un des composants majeurs des raisins. Il est en outre hautement spécifique de la vigne, car on ne le rencontre que chez de rares autres groupes de végétaux (*Pelargonium,* par ex.).

Il est donc vraisemblable que cet acide est le principal responsable, dans les raisins, de l'activation des spores de *C. diplodiella.*

Le mélange acide tartrique-tartrate de sodium possède un excellent effet tampon entre les pH 2,3 et 5. Nous choisirons donc, comme milieu synthétique minimum de germination, une solution de tampon tartrate, dont il reste à définir la concentration et le pH.

3.1 Concentration en tartrate

La teneur en acide tartrique des baies de raisins est d'environ 6–12 g/l, soit 40–80 mM, suivant l'état de maturation (Benvegnin et al., 1947). Une concentration aussi élevée est-elle nécessaire à la germination des spores de *C. diplodiella,* ou l'acide tartrique agit-il comme inducteur, à très faible concentration?

Milieu de germination: acide L(+)tartrique x mM + tampon citrate 50 mM, pH 4.0. Nous utilisons un tampon, pour maintenir le pH constant quelle que soit la concentration de tartrate; le tampon citrate a été choisi ici, car l'acide citrique n'est pas activateur, et sa composition élémentaire est plus simple que celle de la glycine.

Méthode de germination: goutte pendante, en chambre humide. Concentration des spores: 8.10^5/ml.

Résultats: fig. 6.

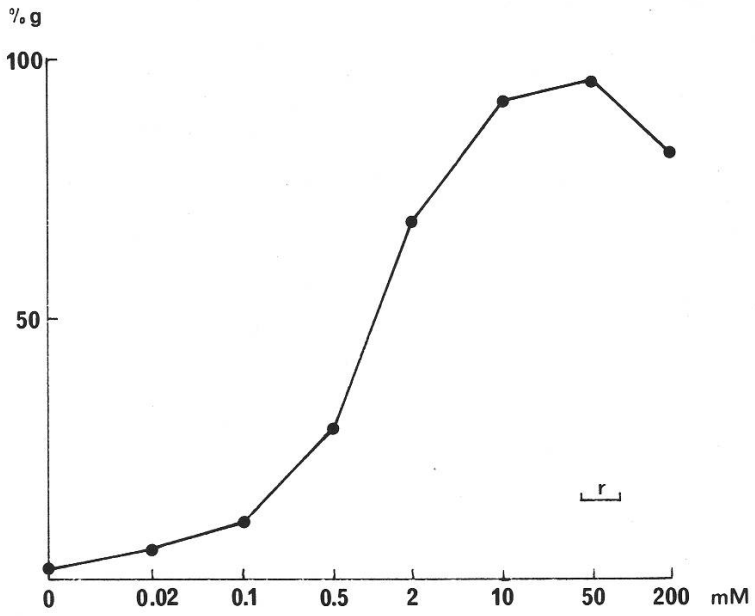

Fig. 6:

Germination en fonction de la concentration en tartrate dans une suspension de 8.10^5 spores/ml. % de germination en 24 heures. r: domaine de concentration de l'acide tartrique dans les baies de raisin.

La germination n'est bonne qu'au dessus de 2 mM d'acide tartrique. Elle est optimale à 50 mM. Une concentration de 200 mM est légèrement inhibitrice de la germination, mais la croissance du tube germinatif est fortement ralentie.

L'optimum observé correspond donc à la teneur en acide tartrique du milieu naturel. Mais une concentration 20 fois plus faible suffit à provoquer une bonne germination.

3.2 pH du milieu minimum

Les valeurs cardinales de pH pour la germination dans le tartrate (acide L(+)tartrique 50 mM, pH ramené aux valeurs désirées par NaOH) sont comparables à celles obtenues dans le moût. La germination est très bonne dans tout l'intervalle de pH 2,2 à 5,0. La vitesse maximum est atteinte ici entre pH 3,4 et 4,7. Le % de germination en 24 heures est maximum entre pH 2,7 et 5,0.

* * *

D'après ces résultats, nous pouvons établir comme suit la composition du *milieu minimum de germination:*

Acide tartrique 50 mM
NaOH ad pH 3,4–4,7.

3.3 Spécificité

L'acide L(+)tartrique est-il le seul à provoquer la germination des spores de *C. diplodiella?*

Nous avons essayé un certain nombre d'autres substances, soit de structure voisine de celle de l'acide tartrique, soit des métabolites éventuels de cet acide.

Milieu de germination: substance essayée 10 mM, tampon glycine-HCl 50 mM, pH 3.5.
Technique de germination: goutte pendante, en chambre humide.

Résultats: tableau 2.

Tableau 2:

Pour-cent de germination en présence de différents acides organiques

	% germination en 24 h
Acide L(+)tartrique	95
Acide D(+)malique	78
Acide DL-malique	80
Acide meso-tartrique	49
D-glucose	20
Acide D(−)tartrique	1
Acide L(−)malique	0
Acide citrique	4
Acide α-cétoglutarique	0
Acide succinique	2
Acide fumarique	2
Acide oxaloacétique	3
Acide glyoxylique	0
Acide tartronique	0
Acide DL glycérique	9
Acide 2-phosphoglycérique	1
Acide 3-phosphoglycérique	2
Acide dihydroxyfumarique	1
Acide DL-lactique	4
Acide acétique	2
Acide pyruvique	4
Acide oxalique	4
Acide glycollique	5
Acide L-aspartique	2
Acide D-aspartique	3
L asparagine	3
D asparagine	3
Acide L-glutamique	3
Acide D-glutamique	2
L-glutamine	5
D-glutamine	3
Acide L-mandélique	3
Acide D-mandélique	3
Acide ascorbique	0

Les acides L(+)tartrique, D(+)malique, DL malique et meso-tartrique, provoquent une bonne germination des spores de *C. diplodiella*. Toutefois, dans les acides D(+)malique et mésotartrique, le tube germinatif formé reste très court, le plus souvent à l'état d'ampoule germinative (planche II, 1, 2, et 4).

Le glucose possède un médiocre pouvoir activateur, tandis qu'aucune des autres substances essayées ne provoque la germination, en particulier les acides D(−)tartrique et L(−)malique (planche II, 3 et 5). Un seul des deux stéréoisomères des acides tartrique et malique agit donc sur les spores de *C. diplodiella*.

Dans le jus de raisin, on trouve, à une concentration relativement élevée, les acides L(+)tartrique et L(−)malique. Ce dernier est l'isomère naturel, qui ne provoque pas la germination des spores de *C. diplodiella*. Les acides meso-tartrique

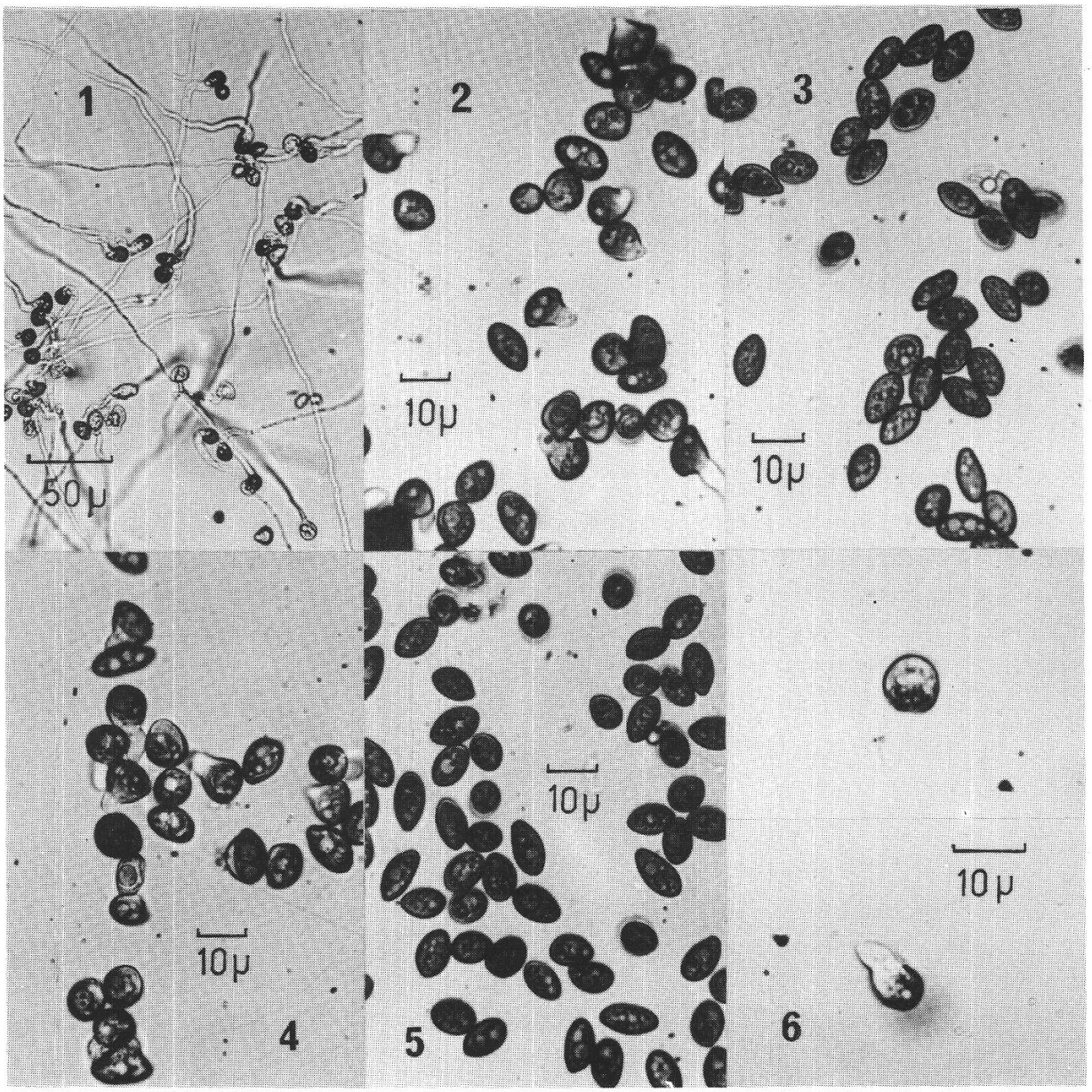

Planche II:

Germination des spores de *C. diplodiella*, après 24 h à 27°C, en présence de:
1: acide L(+)tartrique. 2: acide mesotartrique. 3: acide D(−)tartrique.
4: acide D(+)malique. 5: acide L(−)malique. 6: acide L(+)tartrique + acide D(+)malique.

et D(+)malique sont des isomères de synthèse. Le promoteur principal de la germination des spores de *C. diplodiella* est donc l'acide L(+)tartrique. Les acides D(+)malique et meso-tartrique n'existent pas dans le milieu naturel, mais sont également activateurs.

Le médiocre développement du tube germinatif en présence de ces derniers serait-il dû à une inhibition de la croissance par ces acides, ou au défaut de substrat carboné métabolisable dans le milieu? Les quelques essais suivants vont nous permettre d'y répondre.

Germination: en double couche; les milieux sont ramenés à pH 4,5 par NaOH, puis gélosés à 1,4%; on mesure le % de germination en 24 h à 27°C.

Milieux et résultats:

1) L(+)tartrate 50 mM : 96% (planche II, 1)
2) D(+)malate 50 mM : 72% (planche II, 4)
3) L(+)tartrate 50 mM + D(+)malate 50 mM : 85% (planche II, 6)

Même en présence de L(+)tartrate, la croissance du tube germinatif est inhibée par le D(+)malate. Ceci ne doit pas nous surprendre. Cet acide a été souvent reconnu comme un inhibiteur de certains enzymes du cycle de Krebs, notamment de la L-malate-déshydrogénase.

4. Autres traitements

D'autres traitements: thermiques (4^0 C pendant 24 h et 2 mois, -10^0 C pendant 24 heures, 42^0 C et 46^0 C pendant 15 et 60 min, 50^0 C pendant 5 et 15 min) et chimiques (furfuraldéhyde 0,2, 1 et 5 mM pendant 10 min; phényl-éthyl-alcool 1, 5 et 20 mM pendant 6 h) ont été essayés. Aucun n'a eu d'effet activateur sur les spores de *C. diplodiella.*

5. Facteurs internes de la germination

Indépendamment des conditions extérieures de germination (température, pH, substance activatrice), certains facteurs internes, propres aux spores ou au champignon, peuvent modifier ses caractéristiques de germination.

La maturité des spores, que nous étudierons dans un travail ultérieur, est l'un de ces facteurs. Nous verrons ici l'effet d'une concentration élevée de spores, puis l'influence de la composition du milieu de croissance du champignon sur les caractéristiques de germination.

5.1 Influence de la concentration des spores

Dans les pycnides, les spores ne germent pas. Il en est de même des spores sorties des pycnides et groupées autour de celles-ci à la surface du milieu de culture. Un phénomène d'autoinhibition se manifeste-t-il lorsque la concentration des spores est élevée?

Nous allons tout d'abord étudier la germination en fonction de la concentration des spores.

Méthode de germination: goutte pendante, en chambre humide.
Milieux de germination: a) acide tartrique 50 mM, acide citrique 50 mM, NaOH ad pH 4.0.
b) acide tartrique 1 mM, acide citrique 50 mM, NaOH ad pH 4.0.
Mesure de la concentration des spores: 3 comptages, au moyen d'un hémacytomètre de Thoma, dans un volume de 0,1 mm^3 de la suspension la plus concentrée. Les suspensions moins denses sont obtenues par dilution de 5 fois en 5 fois de la suspension initiale.

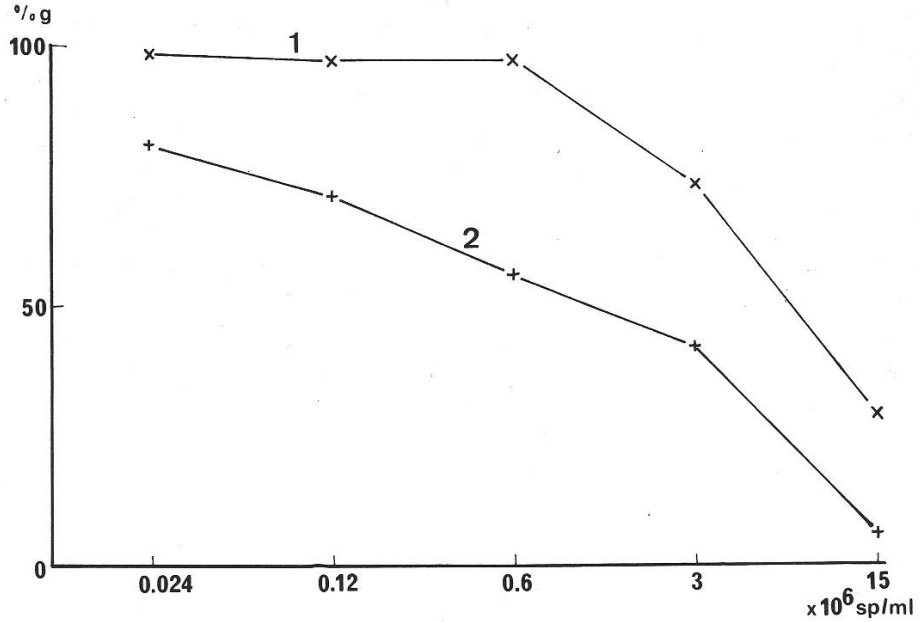

Fig. 7:

Effet de la densité de la suspension de spores sur la germination. % en 24 h à 27° C, en fonction du nombre de spores par ml de suspension. 1: dans 50 mM d'acide tartrique + 50 mM d'acide citrique, NaOH ad pH 4.0. 2: dans 1 mM d'acide tartrique + 50 mM d'acide citrique, NaOH ad pH 4.0.

Résultats: fig. 7. Jusqu'à 6.10^5 spores/ml, dans le tartrate 50 mM, la concentration de spores n'a pas d'effet sur la germination. Il n'en est pas de même dans le tartrate 1 mM, où le % de germination en 24 h dépend de la concentration des spores, même lorsque celle-ci est faible.

Plusieurs phénomènes peuvent expliquer une variation de la germination en fonction de la densité de la suspension de spores:

1) *Compétition* pour l'acide tartrique. La quantité d'acide disponible par spore est inversément proportionnelle à la quantité de spores présentes.

2) *Autoinhibition:* émission par les spores d'une substance inhibant leur germination, dont la concentration est fonction de la densité de la suspension.

3) *Modification de la composition de la phase gazeuse* dans la chambre humide, à la suite de l'activité métabolique des spores en atmosphère confinée. L'expérience suivante nous montrera si une telle modification a une influence sur la germination.

Technique de germination: goutte pendante, en chambre humide. Au fond de celle-ci, on dépose trois gouttes d'une suspension de 5.10^7 spores/ml dans du tampon acide tartrique-NaOH 50 mM à pH 4.0. La goutte pendante contient 5.10^5 spores/ml dans le même milieu.

Résultats:	% germination en 24 h
avec 3 gouttes de suspension concentrée	93
sans 3 gouttes de suspension concentrée	93

Il n'y a donc aucune différence, et on peut écarter l'hypothèse de l'effet d'une modification de la phase gazeuse.

Revenons à l'expérience précédente. La fig. 8 exprime les mêmes résultats, mais en fonction de la quantité de tartrate disponible par spore (rapport $\frac{\text{concentration tartrate}}{\text{concentration de spores}}$) exprimée en pMoles/spore (1 pMole = 10^{-12} Moles).

En admettant la seule hypothèse de la compétition, les deux courbes, à 1 mM et 50 mM, devraient théoriquement se confondre dans ce graphique. En fait, pour une quantité de tartrate disponible de 8,33 pMoles/spore, par exemple, la proportion de spores germées à une concentration de $1{,}2.10^7$ spores/ml est nettement plus faible que pour une quantité de tartrate disponible inférieure (1,66 pMole/spore) à une concentration de $6{,}0.10^5$ spores/ml (resp. 29% et 56%).

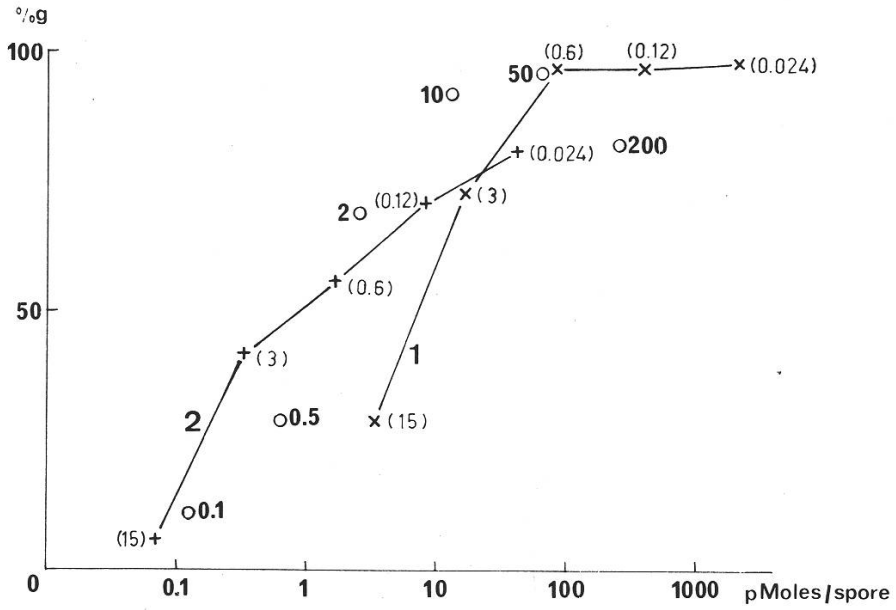

Fig. 8:

Effet de la quantité d'acide tartrique à disposition de chaque spore sur la germination. 1(x): dans 50 mM d'acide tartrique + 50 mM d'acide citrique, NaOH ad pH 4.0. 2(+): dans 1 mM d'acide tartrique + 50 mM d'acide citrique, NaOH ad pH 4.0 (la valeur entre parenthèses indique le nombre de spores (x 10^6 par ml). o: résultats de l'expérience représentée également à la fig. 6 p. 237; la densité de spores est constante (0,8 x 10^6 sp/ml), le nombre en gras à côté du cercle indique la concentration d'acide tartrique dans le milieu.

Nous avons également reporté sur ce graphique les résultats de l'expérience (p. 236 et fig. 6) de germination en fonction de la concentration en tartrate.

De l'ensemble de ces résultats, il apparaît que, pour assurer une bonne germination, une quantité de 10–100 pMoles d'acide tartrique par spore est nécessaire.

Dans des suspensions diluées (au-dessous de 6.10^5 spores/ml), la concentration des spores n'abaisse le % de germination qu'en présence d'une faible concentration en acide tartrique (1 mM par exemple): compétition.

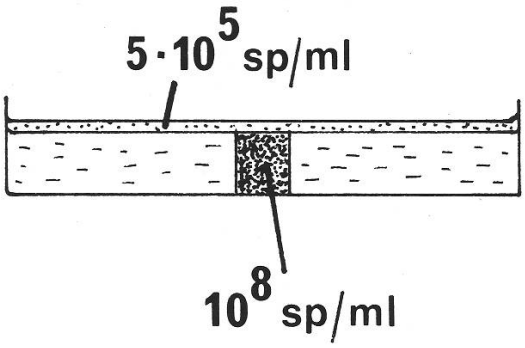

Fig. 9:

Technique de germination pour l'étude de l'autoinhibition. Méthode du „cylindre de spores".

Au-dessus de 6.10^5 spores/ml, l'effet de la concentration en spores se manifeste quelle que soit la concentration d'acide tartrique: autoinhibition, en plus de la compétition.

En conclusion, les deux phénomènes (compétition et autoinhibition) régissent la diminution de la germination en fonction de la concentration des spores.

5.2 L'autoinhibition

Les spores semblent donc diffuser un „principe" autoinhibiteur actif dans une suspension dense. Les expériences suivantes nous permettront de préciser son effet.

Méthode du „cylindre de spores": dans une boîte de Petri de 45 mm, on coule 8 ml de tampon acide tartrique – NaOH 50 mM, pH 4.5, gélosé à 1,4%. On perce dans ce milieu solidifié un trou cylindrique (fig. 9) de 5 mm de diamètre, que l'on remplit d'une suspension de 10^8 spores/ml dans le même milieu. Après solidification, on coule par dessus 1 ml d'une suspension de 5.10^5 spores/ml dans NaCl 50 mM gélosé à 1%, qu'on étale uniformément. On mesure, après 24 heures à 27° C, le % de germination des spores de la couche supérieure en fonction de la distance au bord du „cylindre de spores".

Résultats: fig. 10. L'inhibition, nette au voisinage immédiat de la suspension concentrée, diminue rapidement avec la distance. A 1 mm, il y a encore une légère diminution du % de germination, et plus aucune action au delà. Il semble donc que l'inhibiteur diffuse très peu dans l'agar.

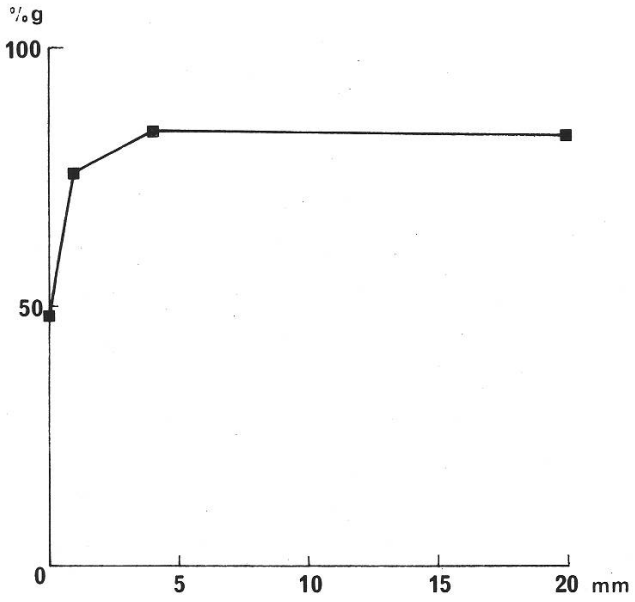

Fig. 10:

Mise en évidence de l'autoinhibition par une suspension dense de spores. Méthode du „cylindre de spores". % de germination en 24 heures, à 27° C, en fonction de la distance au bord du cylindre.

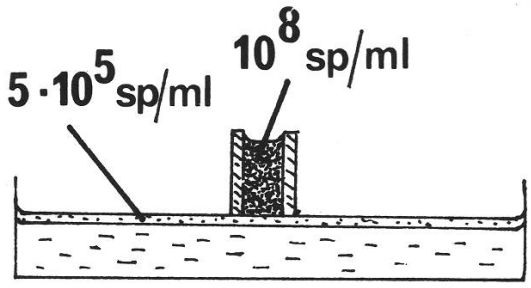

Fig. 11:

Technique de germination pour l'étude de l'autoinhibition. Méthode du tube de Heatley.

Méthode du tube de Heatley: représentée à la fig. 11. Couche inférieure: 8 ml de tampon acide tartrique-NaOH, pH 4,5, gélosé à 1,4%. Couche supéreure: 1 ml d'une suspension de 5.10^5 spores/ml dans NaCl 50 mM, gélosé à 1%. On dépose sur ce milieu un cylindre de verre de 5 mm de diamètre intérieur et 10 mm de haut (tube de Heatley) qu'on remplit d'une suspension dense de spores (10^8 spores/ml) dans NaCl 50 mM. Incubation: 24 h à 27° C. Lecture des résultats: on enlève le cylindre, on lave délicatement la surface de l'agar, et on dépose une lamelle à l'endroit où était posé le cylindre. On mesure le % de germination des spores de la couche supérieure, à l'endroit où celle-ci était en contact avec la suspension dense. Un témoin sans cette dernière est mis à germer parallèlement.

Résultats:	% germination en 24 h
Germination sous la suspension dense	32
Témoin	95

En interposant, dans la même expérience, une membrane filtrante (Millipore GSWP 0,22 μ) entre le cylindre et l'agar, on obtient les résultats suivants:

	% germination en 24 h
Germination sous la suspension dense	50
Témoin	95

La substance autoinhibitrice est capable de traverser la membrane filtrante, mais ce mince obstacle suffit à en diminuer sensiblement les effets.

Mise en évidence de l'autoinhibition après diffusion du principe responsable dans l'agar (fig. 12): dans un tube de 8 mm de diamètre, on introduit 0.5 ml de l'un des milieux gélosés:

A: acide tartrique-NaOH 50 mM pH 4.5, agar 1,4%
B: NaCl 50 mM, agar 1,4%

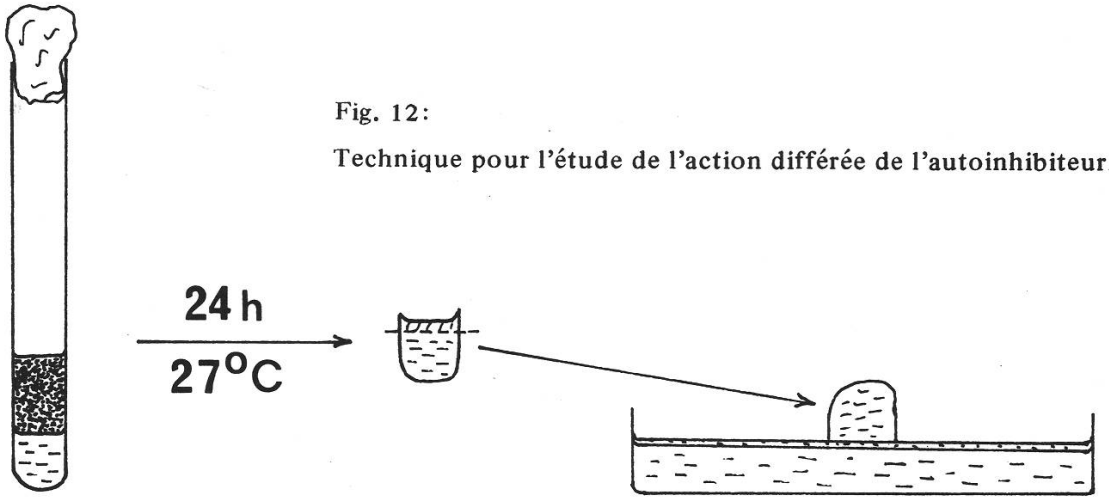

Fig. 12:

Technique pour l'étude de l'action différée de l'autoinhibiteur.

Après solidification de la gélose, on verse par dessus 1 ml d'une suspension de 10^8 spores/ml dans:

sur milieu A: acide tartrique – NaOH 50 mM pH 4.5
sur milieu B: NaCl 50 mM

On met à incuber à 27° C pendant 24 heures. On vide alors la suspension de spores, on casse le tube, on coupe le bloc d'agar de façon à avoir une surface plane, et on le dépose sur un milieu de germination double couche; couche inférieure: 8 ml ac. tartrique – NaOH 50 mM pH 4,5, gélosé à 1,4%; couche supérieure: 1 ml NaCl 50 mM gélosé à 1%, avec 5.10^5 spores/ml. Lecture des résultats: mesure du % de germination en 24 heures à l'emplacement du bloc d'agar. Un témoin sans bloc d'agar est mis à germer parallèlement.

Résultats:	% germination en 24 h
Témoin	90
Bloc d'agar = milieu A (tartrate)	70
Bloc d'agar = milieu B (NaCl)	56

Conclusion: la substance inhibitrice est produite aussi bien (sinon mieux) par les spores au repos que par les spores dans un milieu activateur. Est-elle produite aussi par le champignon dans le milieu de culture?

Sur milieu F-T (12 ml coulés en boîte de Petri de 9 cm), on place un filtre Millipore GSWP (o,22 μ) et on dépose sur le filtre un inoculum de *C. diplodiella.* On met en incubation à 27° C pendant 10 jours. On enlève alors le filtre portant la culture et on découpe dans l'agar sous-jacent des disques de 1 cm de diamètre. On prépare des milieux de germination en double couche, avec milieu minimum gélosé dans la couche inférieure, et 5.10^5 spores/ml dans NaCl 50 mM gélosé à 1% dans la couche supérieure; on dépose les disques au centre de ces milieux. Incubation: 24 heures à 27° C. Témoins: germination en double couche, sans disque de milieu de culture.

Résultats:	% germination en 24 h
sous le disque de milieu de culture	93
sans le disque de milieu de culture	92

On n'observe pas, dans ces conditions, d'inhibition par le milieu de culture. Il semble donc que seules les spores diffusent une substance inhibitrice de la germination.

5.3 Effet de la présence d'acide tartrique dans le milieu de croissance sur la germination

C. diplodiella pousse et fructifie normalement sur le milieu F-T *sans* acide L(+)tartrique. Toutefois, les spores produites par une telle culture germent moins bien dans le milieu minimum que celles provenant d'une culture sur le milieu F-T complet (contenant 150 mg/l d'acide tartrique), ainsi qu'il apparaît dans l'expérience suivante:

On établit la cinétique de germination, dans le milieu minimum, de spores de *C. diplodiella* provenant, d'une part de cultures sur milieu F-T complet, d'autre part de cultures sur le même milieu sans acide tartrique.

Technique de germination: agar „double couche", 5.10^5 spores/ml dans la couche supérieure.

Milieu de germination: acide tartrique – NaOH 50 mM, pH 4.5, gélosé à 1,4%.

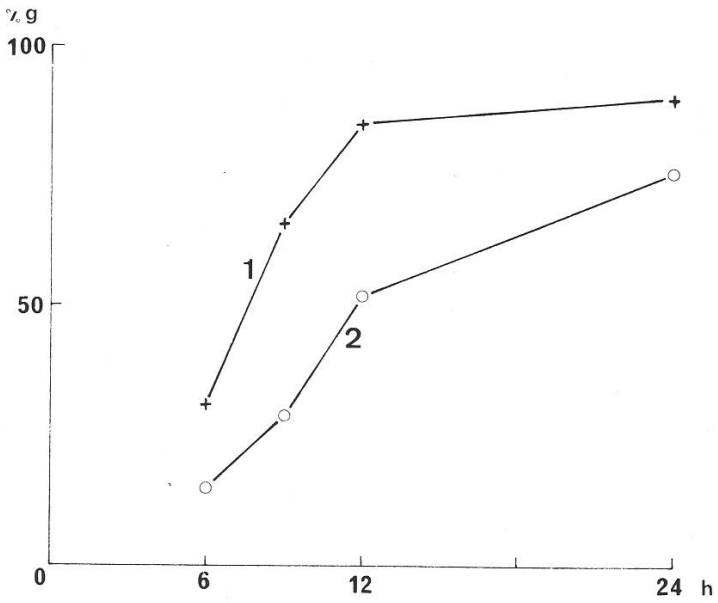

Fig. 13:

Cinétique de germination, dans le milieu minimum, à 27° C, de spores provenant de cultures sur milieu F-T complet (1) et sur le même milieu sans acide tartrique (2).

Résultats: fig. 13. La germination est plus lente chez les spores provenant de cultures sur milieu dépourvu d'acide tartrique, et elle est moins complète.

L'expérience suivante nous permettra d'évaluer la concentration minimum en acide tartrique dans le milieu de culture, nécessaire pour assurer une bonne germination des spores qui s'y sont formées.

On cultive *C. diplodiella* sur des milieux F-T avec différentes concentrations d'acide L(+)tartrique. Après plus de 30 jours de culture, on mesure le % de germination, en 24 heures, des spores provenant de chacun des milieux, dans le milieu minimum de germination, et dans un tampon non activateur.

Milieux de germination: a) acide tartrique – NaOH 50 mM pH 4.5, agar 1,4%
b) acide citrique – NaOH 50 mM pH 4.5, agar 1,4%
Technique de germination: agar double couche, 5.10^5 spores/ml dans la couche supérieure.

Résultats: fig. 14. 0.1 mM d'acide tartrique dans le milieu de culture suffisent donc à assurer ensuite une bonne germination dans le milieu minimum. Cette concentration est insuffisante pour la germination des spores (fig. 6, p. 237).

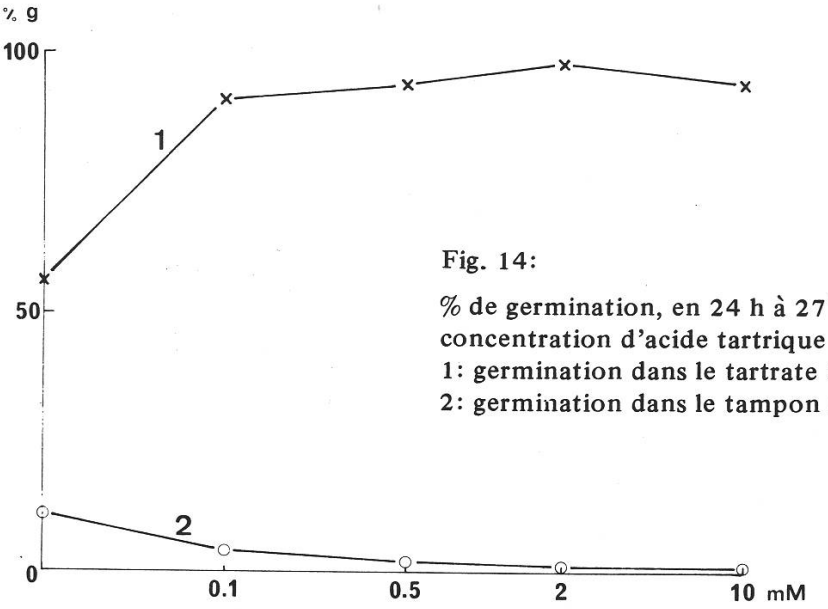

Fig. 14:

% de germination, en 24 h à 27° C, en fonction de la concentration d'acide tartrique dans le milieu de croissance.
1: germination dans le tartrate 50 mM pH 4.5;
2: germination dans le tampon citrate 50 mM pH 4.5.

Discussion

Adaptation du champignon au parasitisme

L'étude écophysiologique des pycnidiospores de *C. diplodiella* nous montre à quel point, et par quels moyens, le champignon est adapté au parasitisme.

La période pendant laquelle il peut se développer végétativement est limitée à l'époque de la maturation des raisins, soit en général de juillet à fin septembre. Durant les neuf mois restants, le champignon se maintient dans le sol sous forme de spores qui doivent conserver leur pouvoir germinatif.

En outre, l'infection n'a lieu en général qu'après une chute de grêle, ce qui ne se produit pas toujours chaque année au même endroit. Aussi, les spores doivent-elles être capables de survivre dans le sol plusieurs années de suite.

Le champignon est incapable de percer la cuticule des raisins, ou de pénétrer par des orifices naturels. Seule une blessure lui permet d'entrer en contact avec les tissus internes de l'hôte. Ici, le degré d'adaptation parasitaire est faible. *C. diplodiella* est un parasite de blessures, au sens de Gäumann (1946).

Une fois en contact avec la pulpe, la germination doit s'effectuer rapidement, avant que la cicatrisation ne dresse une nouvelle barrière contre l'infection.

Comment le champignon répond-t-il à ces exigences écologiques?

Tout d'abord, les spores sont dormantes et ne peuvent pas, en général, germer dans le sol. Elles gardent longtemps leur vitalité (Terrier, 1949) et ne peuvent être activées ni par un séjour à basse température, ni par un choc thermique. Les froids hivernaux, pas plus que les chaleurs estivales, ne lèveront de ce fait leur dormance. Dans le sol, deux facteurs au moins empêchent la germination: l'absence de l'agent activateur spécifique (L(+)tartrate) et le pH généralement trop élevé.

D'autre part, les exigences du champignon pour sa germination correspondent bien au milieu offert par la pulpe des raisins qui est à la fois activateur et substrat pour le développement:

Milieu naturel (pulpe des raisins)	*C. diplodiella* (conditions de germination *in vitro*)
pH: 2,2–3,4	optimum à pH 2,2–4,9
température estivale	13^0C min. 27^0C opt. 37^0C max.
p. osmotique: 12–25 atm.	p. osmotique max. tolérable: 25 atm.
conc. élevée d'acide L(+)tartrique: 40–80 mM	ac. L(+)tartrique nécessaire à l'activation, concentration optimale: 50 mM

Nous avons vu que la présence d'acide tartrique dans le milieu de croissance était nécessaire pour assurer une bonne germinabilité des spores. Dans les conditions naturelles, le champignon ne se développe que sur des raisins, et les spores sont formées sur un substrat contenant cet acide. Expérimentalement, toutefois, une concentration 500 fois plus faible (0,1 mM) suffit.

Si les propriétés de résistance, de dormance, les valeurs cardinales de pH, température et pression osmotique observées ici sont en accord avec les conditions naturelles, elles peuvent aussi bien se rencontrer chez des espèces non parasites, et ne sont pas le reflet d'une adaptation très poussée.

Par contre, l'action spécifique de l'acide tartrique sur l'activation montre une adaptation étroite du parasite à son hôte. De cette propriété résultent des avantages sélectifs évidents: la dormance est maintenue aussi longtemps que la spore n'est pas en contact avec un milieu contenant cet acide; dans la nature, cette condition n'est remplie qu'au niveau des blessures occasionnées aux grains de raisin. Ainsi, la longue survie à l'état dormant, associée au maintien de cet état hors du milieu naturel, permet la conservation des spores du champignon dans une région, par exemple, où les chutes de grêle sont très sporadiques.

C. diplodiella est-il un parasite obligatoire ou facultatif? Il croît, *in vitro,* sur de nombreux milieux naturels et synthétiques. Dans la nature, on ne le rencontre à l'état végétatif que comme parasite de la vigne. Des champignons isolés du sol et de l'air hors des zones viticoles (Mathur et Thirumalachar, 1959; Mme J. Nicod, communication personnelle) et considérés comme des *C. diplodiella* par Petrak (1960) et Sutton (1969) ont en fait des caractères physiologiques bien différents. Ils sont incapables, entre autres, de se développer dans des raisins blessés expérimentalement.

Coniella diplodiella doit donc être considéré comme un parasite *obligatoire dans les conditions naturelles,* mais non lié nécessairement à des tissus vivants. Ses exigences pour la croissance et la sporulation sont assez limitées: une source de carbone organique (ex: glucose), des sels minéraux, de la thiamine, et de la biotine si la source d'azote n'est pas l'asparagine (Turian et Staehelin, 1954; Turian, 1954a). C'est donc lors de la germination, et peut être aussi par la faculté d'envahir les tissus de l'hôte, que se manifeste le mieux le caractère parasitaire du champignon. Nous sommes tenté de considérer *C. diplodiella* comme un parasite jeune, c'est-à-dire peu différencié par rapport à d'hypothétiques ancêtres saprophytes.

Résumé

Les pycnidiospores de *C. diplodiella* germent bien dans le moût de raisin à pH 3.5. Elles ne germent pas dans l'eau distillée, ni dans les tampons usuels à pH 3.5. La germination est optimale entre pH 2,2 et 4,9, à 27^{0}C et pour une pression osmotique inférieure à 25 atm. L'oxygène est nécessaire à la germination, contrairement à l'anhydride carbonique.

La substance responsable de l'activation des spores dans le moût est l'acide L(+)tartrique. Deux autres acides de structure voisine (D(+)malique et meso-tartrique) provoquent également la germination. Ils bloquent toutefois la croissance apicale du tube germinatif.

La germination est inhibée par une concentration élevée de spores. L'auto-inhibition et la compétition pour l'acide tartrique concourent à cet effet.
Le champignon pousse et fructifie bien en absence d'acide tartrique, mais les spores produites dans ces conditions germent mal.

Zusammenfassung

Pyknosporen von *C. diplodiella* keimen gut in Traubenmost bei pH 3.5, dagegen nicht in destilliertem Wasser oder in den gewöhnlichen Puffern bei pH 3.5. Die Keimung ist optimal zwischen pH 2.2 und 4.9, bei einer Temperatur von 27°C und einem osmotischen Druck von weniger als 25 atm. Sauerstoff ist für die Keimung unerlässlich, Kohlendioxyd aber nicht.

L(+)Weinsäure ist für die Keimstimulation verantwortlich. Zwei andere Säuren mit ähnlicher Struktur (D(+)Apfelsäure und meso-Weinsäure) können auch die Keimung einleiten, hindern aber das weitere Wachstum des Keimschlauchs.

Die Keimung wird durch eine hohe Sporendichte gehemmt; diese Unterdrückung rührt von der Selbsthemmung und von der Konkurrenz der Sporen für Weinsäure her. Der Pilz ist im Stande, sich in Abwesenheit von Weinsäure gut zu entwickeln und Fruchtkörper zu bilden, aber die in diesen Fruchtkörpern erzeugten Sporen keimen schlecht.

Summary

Pycnidiospores of *C. diplodiella* germinate well in grape juice at pH 3,5. They fail to germinate, neither in distillated water, nor in usual buffers of pH 3,5. Optimal conditions for germination are: pH between 2,2 and 4,9; temperature 27°C; osmotic pressure lower than 25 atm. Oxygen is necessary for germination, carbon dioxide is not.

The substance responsible for activation of the spores in grape juice is L(+)tartaric acid. Two other acids, resembling in structure (D(+)malic and meso-tartaric) lead to germination, although they inhibit apical growth of the germ tube.

Germination is reduced by a high concentration of spores. Self-inhibition and competition for tartaric acid contribute to this inhibition. Although the fungus grows and fructifies well without tartaric acid, spores produced under these conditions germinate poorly.

M. le professeur Ch. Terrier nous a accueilli dans son laboratoire, et a toujours su nous conseiller judicieusement, tout en nous laissant une grande liberté d'action. Nous lui exprimons notre profonde gratitude.

Notre reconnaissance va également à M. le professeur G. Turian, de Genève, pour l'intérêt constant qu'il a manifesté à l'égard de notre travail, et pour ses précieux conseils et encouragements.

M. le professeur P.A. Siegenthaler nous a reçu dans son laboratoire et nous a fait bénéficier de son expérience en physiologie cellulaire. Nous tenons à l'en remercier ici.

Bibliographie

Benvegnin L., E. Capt et E. Piguet 1947. Traité de vinification. Payot, Lausanne. 575 pp.

Bolay A. 1963. Le coître de la vigne. Agr. romande II(6), sér. A, 60–62.

– et R. Corbaz, 1961. Nouvelles recherches dans le domaine de la lutte contre le coître de la vigne (*Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.). Ann. Agr. Suisse *62,* 239–248.

– et J.-L. Simon, 1964. La lutte contre le coître de la vigne. Agr. romande III (7–8) sér. A, 68–71.

Brewer J.H. et D.L. Allgeier, 1966. Safe Self-contained Carbon Diloxide – Hydrogen Anaerobic System. Appl. Microbiol. *14,* 985–988.

Dobbs C.G. et W.H. Hinson, 1953. A Widespread Fungistasis in Soils. Nature *172,* 197–199.

Dufour J. 1888. Notice sur quelques maldies de la vigne: le black-rot, le coître et le mildiou des grappes. Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat. *23,* 97–113.

Faes H. et M. Staehelin, 1922. Le coître de la vigne *(Coniothyrium diplodiella)* ou maladie de la grêle. Ann. Agr. Suisse 1922.

– et – 1923a. Nouvelle contribution à l'étude du coître de la vigne *(Coniothyrium diplodiella)* ou maladie de la grêle. Ann. Agr. Suisse 1923.

– et – 1923b. Troisième contribution à l'étude du coître de la vigne *(Coniothyrium diplodiella)* ou maladie de la grêle. Ann. Agr. Suisse 1923.

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

Gäumann E. 1946. Pflanzliche Infektionslehre. Birkhäuser, Bâle. 611 pp.

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.

Istvanffi G. 1902. Etudes sur le rot livide de la vigne *(Coniothyrium diplodiella).* Ann. Inst. Centr. Ampél. Hongr. *2,* Pallas, Budapest. 288 pp.

Kliewer W.M. 1966. Sugars and organic acids of *Vitis vinifera.* Plant Physiol. *41,* 923–931.

Lin C.K. 1940. Cornell Univ. Agr. Exp. Stn Mem. *233,* 3–33.

Locci R. et S. Quaroni, 1972. Studies on *Coniothyrium diplodiella.* I. Isolation, cultivation and identification of the fungus. Riv. Patol. Veg. Ser. IV, *8,* 59–82.

Mathur P.N. et M.J. Thirumalachar, 1959. Studies on some Indian soil fungi. I. Some new or noteworthy Sphaeropsidales. Sydowia *13,* 143–147.

Petrak F. 1960. Ergebnisse einer Revision der Grundtypen verschiedener Gattungen der Ascomyceten und *Fungi imperfecti.* Sydowia *14,* 347–354.

– et H. Sydow, 1926. Die Gattungen der Pyrenomyzeten, Spaeropsideen und Melanconieen. I. Die phaeosporen Sphaeropsideen und die Gattung *Macrophoma.* Rep. Sp. Nov. Reg. Veg. *42* (1) 551 pp.

Reymondin, 1798. L'art du vigneron, pour servir de direction aux propriétaires de vignes. Lausanne.

Saccardo P.A. 1884. *Coniothyrium diplodiella.* Sylloge Fungorum *3,* 310.

Spegazzini C. 1878. Ampelomiceti Italici, ossia enumerazione, diagnosi e storia dei principali parassiti della vite. Riv. Vitic. Enol. Ital. ser. II, *2,* 339–342.

Staehelin M., H. Aebi et A. Bolay, 1956. Essais de lutte contre le coître de la vigne (*Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.). Ann. Agr. Suisse *57,* 555–560.

Sussman A.S., J.R. Distler et J.S. Krakow, 1956. Metabolic aspects of *Neurospora* activation and germination. Plant Physiol. *31,* 126–135.

– et H.O. Halvorson, 1966. Spores: Their Dormancy and Germination. Harper, NY. 354 pp.

Sutton B.C. 1969. Type studies of *Coniella, Anthasthoopa* and *Cyclodomella.* Can. J. Bot. *47,* 603.

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

Turian G. 1954a. „Effet d'épargne" de l'asparagine vis-à-vis de la biotine chez *Coniella diplodiella.* Phytopath. Z. *19,* 211–214.

– 1954b. Récents progrès dans la lutte contre le coître de la vigne. Rev. Romande Agric. Vitic. Arboric. *10,* 12–14.

– et H. Leyvraz 1954. Une nouvelle arme chimique contre le coître de la vigne. Rev. Romande Agric. Vitic. Arboric. *10*, 97–98.
– et Staehelin, 1954. Nouvelles recherches sur le champignon du coître de la vigne (*Coniella diplodiella* (Speg.) Pet. et Syd.). Ann. Agr. Suisse *55*, 987–997.
– et – 1955. Essais de lutte chimique contre les spores du champignon du coître de la vigne dans le sol. Ann. Agr. Suisse *56*, N.S. *4*, 799–808.
Viala P. 1893. Les maladies de la vigne. 3e éd. Masson, Paris et Coulet, Montpellier. 595 pp.
– et L. Ravaz 1888. Le Black Rot et *Coniothyrium diplodiella.* Les maladies de la vigne, 2e éd. p. 77.
Yanagita T. 1957. Biochemical aspects on the germination of conidiospores of *Aspergillus niger.* Arch. Mikrobiol. *26*, 329–344.

Michel Aragno
Laboratoire de Cryptogamie
Institut de Botanique
11, rue E.-Argand
CH-2000 Neuchâtel 7