

Recherches sur la physiologie de la nutrition de *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx et Olivier et établissement d'un milieu synthétique minimum

Autor(en): **Gindrat, Daniel**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **75 (1965)**

PDF erstellt am: **21.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-52758>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Recherches sur la physiologie de la nutrition de *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx et Olivier et établissement d'un milieu synthétique minimum

Par *Daniel Gindrat*

Stations fédérales d'essais agricoles, Lausanne
et Institut de botanique générale, Université de Genève

Manuscrit reçu le 20 septembre 1965

Contenu: I. Introduction. – II. Matériel et méthodes; 1. Matériel biologique; 2. Méthodes de culture; 3. Evaluation de la croissance. – III. Résultats; 1. Influence du pH initial sur la croissance et le pH final; 2. Exigences vitaminiques; 3. Influence de la source de carbone sur la croissance; 4. Influence de la concentration en carbone sur la croissance; 5. Influence de la source d'azote sur la croissance; 6. Influence de la concentration en azote sur la croissance; 7. Influence de la durée d'incubation sur la croissance et le pH; 8. Proposition d'un milieu minimum optimum pour la culture en milieu liquide de *Gaeumannomyces graminis*. – IV. Discussion. Résumé. Zusammenfassung. Summary. Bibliographie.

I. Introduction

La recherche et l'établissement d'un milieu synthétique minimum pour la culture de *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx et Olivier (= *Ophiobolus graminis* Sacc. = *Linocarpon cariceti* B. et Br.), agent principal du piétin échaudage des céréales, n'ont encore jamais été réalisés malgré les nombreux travaux physiologiques effectués sur ce champignon Ascomycète de l'ordre des Diaporthales, famille des Gnomoniacées (von Arx et Olivier, 1952, Chadefaud, 1960).

En prévision d'études biologiques précises sur ce micro-organisme in vitro, nous devons posséder quelques données claires sur sa nutrition en milieu synthétique contrôlé. Nous disposons d'informations nombreuses mais de portée restreinte et obtenues avec des souches de *Gaeumannomyces graminis* différentes des nôtres et, par conséquent, pouvant comporter des exigences nutritives et des conditions de croissance quelque peu dissemblables.

C'est ainsi que les données sur les conditions de pH favorables à la croissance sont toutes contradictoires: les pH considérés comme optimaux par les auteurs (Kirby 1922, Davis 1925, White 1941) sont en effet fort différents. La nutrition carbonée est un peu mieux définie; on sait qu'en conditions chimiques optimales le glucose, le saccharose et le maltose sont d'excellentes sources de carbone pour *G. graminis*, mais leur efficacité n'est observée qu'en présence de sources azotées classiques (asparagine, KNO_3 , peptones, etc.) et, en définitive, on ne possède que des données éparses concernant la valeur nutritive de différents oses, oligoholosides, polyholosides et acides organiques (Fellows 1936, Gilpatrick et Henry 1949, Ward 1961). Les connaissances au sujet de l'influence de la source d'azote sont au contraire déjà mieux établies: en présence des vitamines adéquates - aneurine et biotine - *G. graminis* paraît assimiler convenablement asparagine, KNO_3 , sels d'ammonium, divers acides aminés et amides (Garrett 1940, White 1941, Gilpatrick et Henry 1949, Turner 1959). Nous avons également des renseignements sur la température exigée pour une croissance optimale (Krebs 1933, Russel 1934, Padwick 1936, Flück 1955), mais, comme ceux concernant la recherche du pH optimum, ils sont loin de concorder en raison, probablement, de l'utilisation de différentes races physiologiques.

Une contradiction plus grave surgit lorsqu'on compare les résultats des auteurs qui ont étudié l'effet des vitamines sur la croissance en milieu synthétique: en Australie, White (1941) constate que la biotine est rigoureusement indispensable à la croissance de *G. graminis* et que l'aneurine ne fait que la stimuler sans être nécessaire; en revanche, au Canada, Ward (1961), reprenant des travaux (Gilpatrick et Henry 1949) confirmant les résultats de White, arrive à la conclusion que la biotine et l'aneurine sont toutes deux indispensables à la croissance de *G. graminis*. Deux hypothèses sont à envisager qui tentent d'expliquer ces divergences: les deux auteurs ont travaillé sur des races physiologiquement différentes ou les milieux de culture utilisés par White n'étaient jamais absolument exempts d'aneurine (présence de cette vitamine dans les inocula).

Il est évident que les souches de *G. graminis* cultivées sur un milieu identique sont souvent fort dissemblables lorsqu'on les observe même superficiellement. Le mycélium varie considérablement dans sa coloration, son aspect général, la densité de son feutrage aérien, la rapidité de sa croissance, la présence ou l'absence de conidies, c'est-à-dire de la forme imparfaite *Phialophora radiculicola* Cain (Lemaire et Ponchet, 1963). Des différences intersouches apparaissent aussi lorsqu'on étudie la virulence des isolats (Henry et McKenzie 1959, Gindrat résultats non publiés), et de telles différences ressortent également à l'examen d'isolats dérivant des 8 ascospores d'un même asque (White et McIntyre, 1943).

Il ressort clairement de cette brève revue d'ordre bibliographique que toute nouvelle étude biologique sur *Gaeumannomyces graminis* devait être précédée d'une amélioration de nos connaissances concernant ses exigences nutritives et son comportement physiologique. C'est ce que nous avons entrepris dans la première phase de nos recherches dont les résultats ayant abouti à la mise au point d'un milieu synthétique minimum favorable à la croissance du parasite font l'objet du présent travail.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

La principale souche de *Gaeumannomyces graminis* utilisée (N° 375 de la mycothèque des Stations fédérales d'essais agricoles de Lausanne) a été isolée à partir d'ascospores libérées de périthèces formés sur blé d'automne, à Zurich en 1960. Cette souche ne différencie ni conidies, ni périthèces dans les conditions normales de culture sur milieux à l'agar-agar ou en milieux liquides. Accessoirement, des études comparatives ont été réalisées avec 4 autres souches: N° 374, isolée à partir de mycélium sur blé d'automne à Zurich en 1948, présentant la forme imparfaite *Phialophora radicumicola* Cain; N° 404, issue d'ascospores libérées de périthèces sur blé d'automne Francet à Landecy-Genève en 1964, non sporulante; N°s 404 α et 404 γ , issue chacune d'une ascospore unique obtenue de périthèces en culture pure de la souche 404.

Sur les milieux naturels (malt 2% - agar 2%, farine de pois 2% - agar 2%, poudre de pommes de terre 1,5% - agar 2%) de même que sur des milieux synthétiques (glucose ou saccharose 1% ou 2%, asparagine 0,2% ou KNO₃ à concentration égale d'azote, MgSO₄·7 H₂O 0,05%, KH₂PO₄ 0,1%, FeCl₃ 6 gouttes par litre d'une solution à 1%, oligo-éléments en traces, biotine 0,000005%, aneurine 0,0002%, agar 2%, eau distillée) la souche 375 présente un fin mycélium blanc-grisâtre, très régulier, lorsque l'incubation est réalisée entièrement à l'obscurité.

L'âge de la souche 375 au moment de nos expériences (4 à 5 ans) pouvait laisser supposer qu'elle avait perdu, en culture pure prolongée, quelques-unes de ses qualités naturelles: virulence, possibilité de différencier des périthèces, possibilité de présenter 2 types d'hyphes. Nous avons donc vérifié ces trois qualités:

a) Virulence: Un test de virulence est réalisé sur blé d'automne Probus selon une adaptation de la méthode de Plasman (1954) et démontre que cette souche est hautement agressive et même beaucoup plus pathogène que d'autres isolées plus récemment.

b) Différenciation des périthèces: *G. graminis* ne présentant que rarement des fructifications en culture pure sur milieu artificiel et la méthode de Weste et Thrower (1963) ne s'étant pas montrée efficace pour notre matériel biologique, nous mettons actuellement au point une méthode simple pour obtenir aisément des périthèces dans ces conditions. Des premiers essais d'application de cette méthode, il ressort que la souche 375 est tout à fait capable de produire des périthèces en grand nombre (plusieurs centaines pour une culture sur plaque de Petri).

c) Différenciation de 2 types d'hyphes: *G. graminis* présente habituellement 2 types d'hyphes: des filaments fins et hyalins, agressifs à l'égard des céréales, et des hyphes larges, mélanisés, souvent en faisceaux, recouvrant les tiges et les racines malades et semblant être à l'origine des filaments fins et hyalins virulents (Winter 1944). La souche 375 présente ces 2 types hyphaux sur les racines et la base des tiges des jeunes plantes infectées lors du test de virulence ainsi qu'en culture pure, sur différents milieux gélosés (malt 2%; décoction de racines et collets de blé + glucose 1% + asparagine 0,2%; etc.).

Les souches 374, 404, 404 α , 404 γ présentent les mêmes caractères de virulence et de différenciations sexuelles et végétatives.

2. Méthodes de culture

Les cultures sont effectuées dans des flacons Erlenmayer de 150 ml de capacité contenant chacun 50 ml de milieu liquide. Pour l'établissement d'un milieu de base dont nous puissions étudier différentes variations, nous nous sommes référés aux principaux travaux comportant des essais de culture de *G. graminis* en milieu liquide (Fellows 1936, White 1941, Gilpatrick et Henry 1949, Flück 1955, Zogg 1957, Turner 1959, Siegle 1961, Ward 1961, Weste et Thrower 1963) et avons établi que le milieu liquide suivant serait propre à une croissance satisfaisante: saccharose ou glucose 20 g, asparagine 1 g, KH_2PO_4 1,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, FeCl_3 (solution à 1%) 6 gouttes, oligo-éléments (solution selon Beadle et Tatum 1945) 1 ml, aneurine (A) 200 γ , biotine (B) 5 γ , eau distillée 1 litre. En remplaçant le saccharose ou le glucose par une quelconque source de carbone à la concentration de 2%, et l'asparagine par une quelconque source azotée impliquant le poids d'azote figurant dans 1 g d'asparagine (0,212 g d'azote = 1,53 g de KNO_3 par exemple), nous obtenons le milieu de travail utilisé dans nos recherches et que nous appellerons milieu de base AB en fonction des vitamines utilisées. Le pH est fixé généralement à 6,0 par KOH dilué (pH peu éloigné du pH optimum, voir fig. 1). Nous avons testé ce milieu sur la souche 375, ainsi que sur d'autres, et, dans tous les cas, il a fourni tous les éléments nécessaires à une bonne croissance.

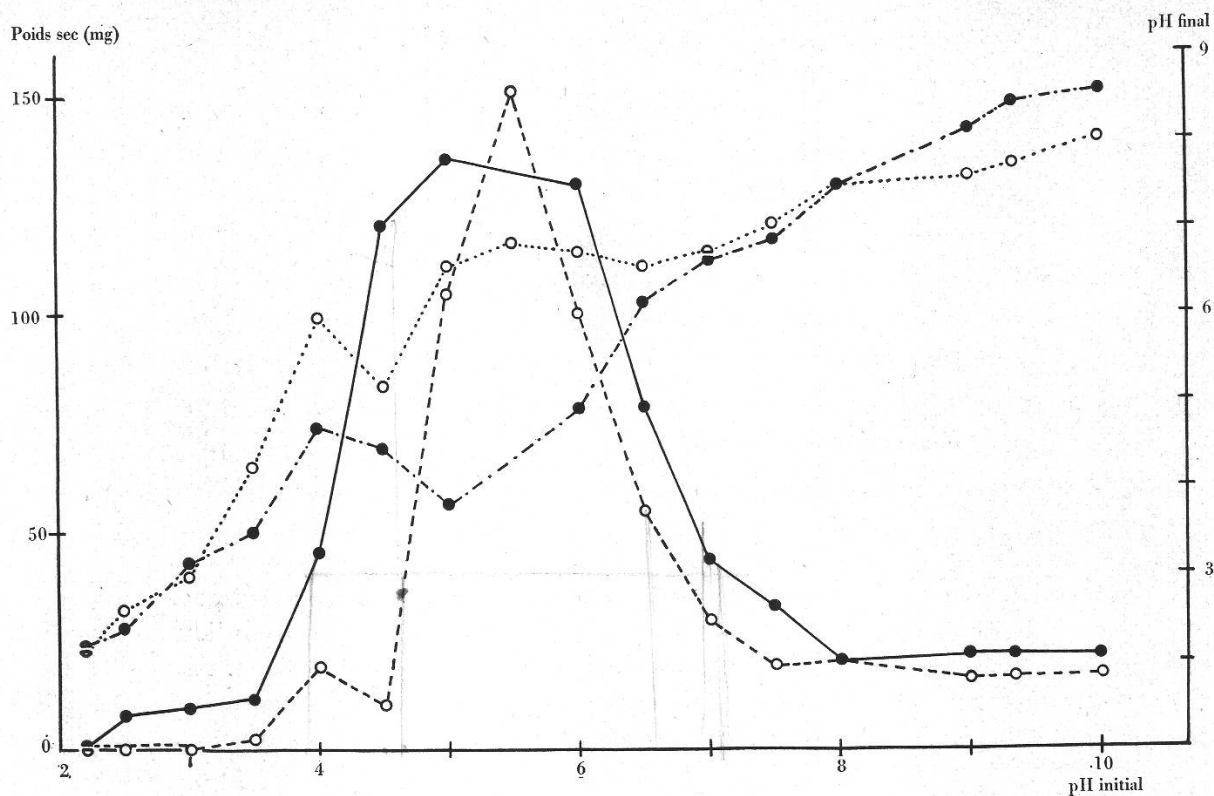


Figure 1

Influence du pH initial sur le poids sec et sur le pH final, après 21 jours d'incubation
Milieu de base AB avec saccharose 2 %. Source azotée à 0,212 g d'azote par litre

Poids secs

Ligne pleine: asparagine, ligne petits traits: KNO₃

pH finaux

Ligne trait-point: asparagine, ligne pointillée: KNO₃

La stérilisation des flacons est réalisée à l'autoclave: on chauffe lentement jusqu'à 120 °C et on éteint, afin d'éviter une caramélisation des hydrates de carbone (Langeron 1945) principalement en présence de fortes concentrations d'acides aminés.

L'inoculation est effectuée par de très petits fragments de mycélium prélevés à l'aide d'une fine aiguille de platine dans la zone frontale d'une culture de 6 jours sur plaque de Petri contenant le milieu de base AB (glucose - asparagine) additionné d'agar à 2 %. L'incubation des plaques est faite à l'obscurité à 23 °C. La très petite taille des inocula (un seul par flacon) évite une contamination chimique des milieux de culture liquides (par des vitamines ou des oligo-éléments par exemple). L'incubation des flacons (21 jours) a lieu dans une étuve réglée à 23 °C, cette température étant voisine des températures optimales pour la croissance d'un grand nombre de champignons phytopathogènes (Togashi 1949).

3. *Evaluation de la croissance*

Pour l'évaluation de la croissance, les cultures sont filtrées sur des papiers-filtres préalablement tarés, puis séchées quinze heures à 80 °C avant d'être pesées. Le pH du milieu à la récolte du mycélium est contrôlé pour chaque flacon. Chaque milieu de culture est distribué dans 6 flacons, et le poids sec est calculé en prenant la moyenne arithmétique des poids secs des 6 cultures. Nous avons établi au préalable qu'une variation standard de 27,5 % est tolérée, au-delà de laquelle les séries présentant de trop gros écarts internes dans le poids sec (dus à des différences de taille des inocula ou à des irrégularités dans la disposition du mycélium sur le milieu solide) sont éliminées et recommencées jusqu'à ce que leur poids sec moyen soit statistiquement valable.

Pour établir le degré de variabilité tolérable des résultats de nos pesées, nous avons procédé à 3 séries de cultures comportant chacune 60 flacons renfermant le milieu de base AB (saccharose - asparagine) et soumises strictement aux mêmes conditions. Les différences entre les poids secs des mycélia sont donc essentiellement dues à des facteurs intrinsèques des inocula parmi lesquels la taille joue certainement le rôle le plus important. Pour chacune des 3 séries, nous tenons compte de la moyenne arithmétique des poids secs, et des 2 extrêmes. Nous utilisons la formule suivante :

$$\frac{(M - E_1) + (E_{60} - M)}{2} \cdot 100 = V$$

M

M = moyenne arithmétique des poids secs = poids moyen

E₁ = poids sec extrême inférieur

E₆₀ = poids sec extrême supérieur

V = variabilité tolérable en pour-cent du poids sec moyen

Nous obtenons pour les 3 séries :

$$V_1 = 31,5 \%$$

$$V_2 = 16,0 \%$$

$$V_3 = 35,5 \%$$

La moyenne de ces 3 variations est de 27,5 %. Par conséquent, pour chaque série de 6 cultures « jumelles » nous pouvons tolérer, avec toutes les réserves dues aux lois de la statistique et aux différents milieux (certains milieux pouvant peut-être induire une concentration forcée des poids secs autour du poids sec moyen ou, au contraire, permettre une plus grande latitude), une variation dans les poids n'excédant pas $\pm 27,5 \%$ du poids sec moyen.

III. Résultats

1. *Influence du pH initial sur la croissance et sur le pH final*

L'étude porte sur la souche 375 en milieu de base AB avec saccharose 2 % et asparagine ou KNO₃ à 0,212 g d'azote par litre. Le saccharose est ici préféré au glucose parce que mieux utilisé par *G. graminis* (fig. 2 et 3) en présence de ces 2 sources d'azote. Les milieux ne sont pas tamponnés.

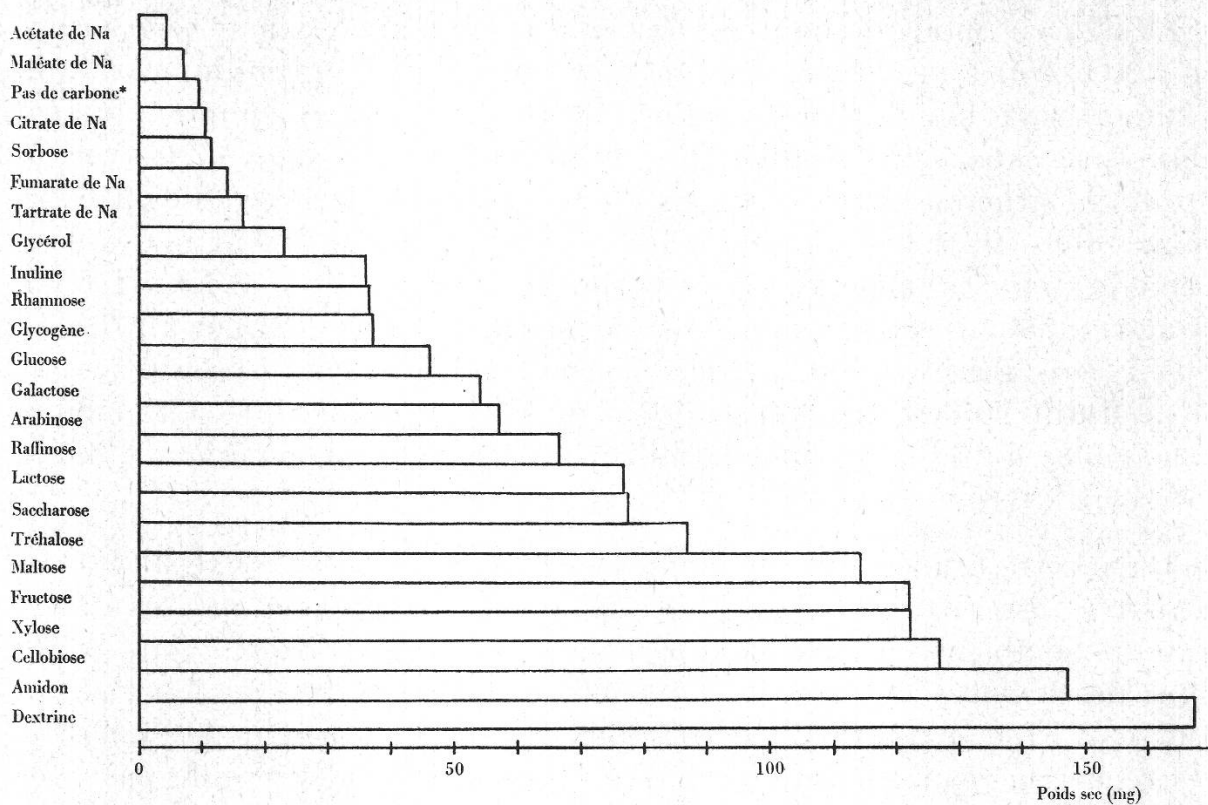


Figure 2

Influence de la source de carbone sur le poids sec après 21 jours d'incubation

Milieu de base AB avec asparagine à 0,212 g d'azote par litre

Concentration de chaque source de carbone : 2 %

Souche 375

* Il faut tenir compte des fonctions carbonées de l'asparagine

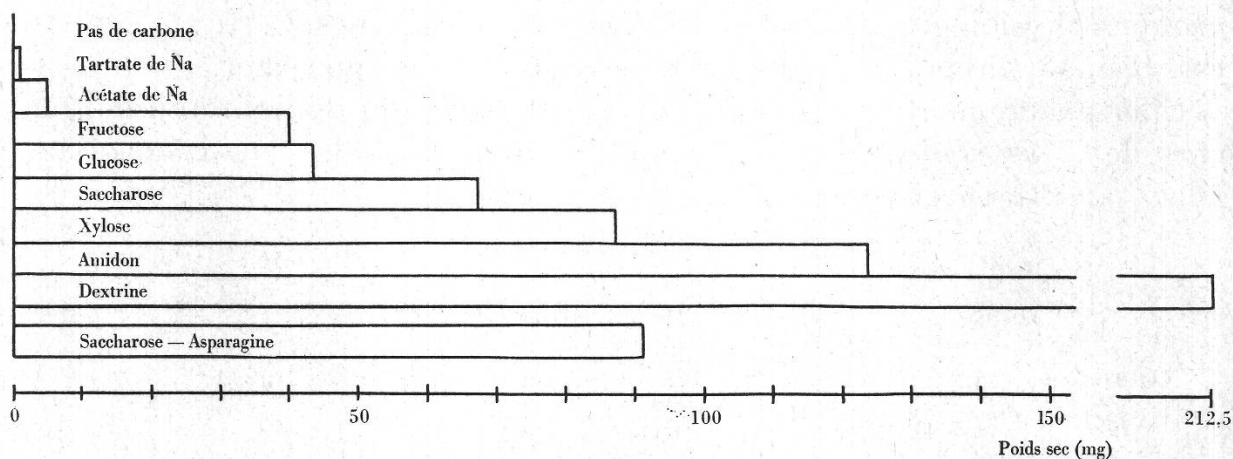


Figure 3

Influence de la source de carbone sur le poids sec après 21 jours d'incubation

Milieu de base AB avec KNO_3 à 0,212 g d'azote par litre

Concentration de chaque source de carbone : 2 %

Souche 375

La figure 1 montre que le pH initial d'un milieu contenant saccharose et KNO_3 doit être compris entre 4,6 et 6,8, avec un optimum à 5,5, afin d'obtenir une bonne croissance, et que pour un milieu comprenant saccharose et asparagine, le pH initial doit être fixé entre 3,9 et 7,1, avec un optimum situé aussi aux environs de 5,5. Dans les deux cas, des pH initiaux inférieurs à 3,9 ou supérieurs à 7,1 inhibent fortement le développement de l'organisme, et le pH optimum se situe vers 5,5. Le pH final, pour le milieu avec asparagine, est supérieur à 3,8 et inférieur à 6,7 lorsque la croissance, induite par un pH initial adéquat, est «suffisante» (c'est-à-dire traduite par un poids sec de plus de 40 mg). Dans les mêmes conditions, le pH final, pour le milieu avec KNO_3 , est supérieur à 6,0 et inférieur à 6,8.

Dans cette étude, il y a des différences notables avec les résultats enregistrés jusqu'ici: les valeurs de pH optimum obtenues par les divers auteurs semblent en général supérieures aux nôtres. Nous avons relevé dans des travaux antérieurs: 8,0 à 9,0 (Kirby 1922); 6,8 à 7,4 (Davis 1925); White (1941) travaille avec un pH de 6,7; Schmidt (1962), dans ses recherches sur les antagonistes de *G. graminis*, ne travaille pas avec des pH inférieurs à 6,5; antérieurement, dans un travail spécialement destiné à l'étude de l'influence du pH sur le développement de diverses souches de *G. graminis*, il est fait mention de pH optima variant de 4,9 à 7,4 (Webb et Fellows 1926).

Ces différences peuvent s'expliquer évidemment par la grande complexité des effets de pH en milieux divers, tamponnés ou non. Il faut toujours considérer de tels résultats dans le cadre limité de l'expérience envisagée en n'en tirant que des conclusions mesurées (Cochrane 1958). Une autre explication serait celle des races physiologiques, ou plutôt des groupes physiologiques à pH optimaux caractéristiques. Cette conception est, bien sûr, hypothétique, et il conviendrait de l'approcher, sinon de la vérifier exactement, en recherchant le pH optimum de nombreuses souches de *G. graminis* d'origines bien différentes, dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques et précises.

2. Exigences vitaminiques

Notre recherche sur l'apport des vitamines indispensables à *G. graminis* se divise en trois phases:

a) Expérimentation sur la souche 375 en milieu de base AB, avec ou sans vitamines, avec saccharose 2% et l'une des 5 sources azotées suivantes: KNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, tartrate d'ammonium, asparagine (1 g). Le contrôle est effectué en absence d'azote. Les résultats sont consignés dans le tableau 1.

Tableau 1

Exigences vitaminiques en présence de saccharose et de 5 sources d'azote différentes
Milieu de base AB avec ou sans vitamines, avec saccharose 2 % et une source azotée à 0,212 g
d'azote par litre. Aneurine = 200 γ /l, biotine = 5 γ /l
Souche 375. Les poids secs sont exprimés en milligrammes

Source d'azote	+ Aneurine	+ Biotine	+ Aneurine + Biotine	— Aneurine — Biotine
KNO ₃	138,0 (\pm 19,5)	21,5 (\pm 0,5)	121,0 (\pm 32,0)	21,0 (\pm 1,0)
NH ₄ NO ₃	127,0 (\pm 25,5)	27,0 (\pm 1,0)	147,0 (\pm 37,5)	26,5 (\pm 0,5)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	41,5 (\pm 10,0)	21,0 (\pm 2,5)	72,0 (\pm 5,0)	19,0 (\pm 2,0)
NH ₄ -tartrate	93,0 (\pm 24,0)	19,0 (\pm 1,5)	169,5 (\pm 30,0)	20,5 (\pm 3,0)
Asparagine	136,5 (\pm 11,0)	18,0 (\pm 1,0)	220,5 (\pm 25,0)	20,5 (\pm 3,0)
Pas d'azote	1,5 (\pm 0,5)	3,0 (\pm 1,0)	0,5 (\pm 0)	1,5 (\pm 0,5)

b) Expérimentation sur les souches 375, 404, 404 α et 404 γ . Milieu de base AB avec biotine 5 γ /l, glucose 2 %, asparagine à la concentration habituelle de 0,212 g d'azote par litre, aneurine 200 γ /l présente ou non. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2

Influence de l'aneurine sur le poids sec de 4 souches de *Gaeumannomyces graminis* après 21 jours d'incubation
Milieu de base AB avec glucose 2 %, biotine 5 γ /l et asparagine à 0,212 g d'azote par litre
Concentration d'aneurine: 200 γ /l
Les poids secs sont exprimés en milligrammes

Souche	+ Aneurine	— Aneurine
375	174,0 (\pm 38,0)	12,0 (\pm 0,5)
404	157,5 (\pm 26,5)	13,0 (\pm 1,5)
404 α	218,5 (\pm 8,5)	18,0 (\pm 2,5)
404 γ	230,0 (\pm 5,5)	20,5 (\pm 4,5)

c) Expérimentation sur la souche 404 en milieu de base AB avec biotine 5 γ /l, saccharose 2 %, KNO₃ à 0,212 g d'azote par litre, avec ou sans l'aneurine ou ses composants (thiazol et pyrimidine). Les résultats figurent dans le tableau 3.

Tableau 3

Effet de l'aneurine et de ses composants sur le poids sec après 21 jours d'incubation
Milieu de base AB, avec biotine 5 γ /l, saccharose 2 %, KNO_3 à 0,212 g d'azote par litre
Souche 404. Poids secs exprimés en milligrammes
Concentrations: aneurine 200 γ /l, thiazol 100 γ /l, pyrimidine 100 γ /l

— Aneurine ou ses composants	+ Aneurine	+ Thiazol	+ Pyrimidine	+ Thiazol + Pyrimidine
19,5 (\pm 1,0)	239,5 (\pm 21,0)	20,0 (\pm 1,5)	19,5 (\pm 1,0)	21,0 (\pm 2,0)

Le tableau 1 – concernant la souche 375 – révèle que :

1. l'absence de vitamines (biotine et aneurine) du milieu de culture empêche toute croissance normale;
2. la biotine n'apporte pas de stimulation de la croissance, en milieu de base AB, par rapport à ce qui est obtenu en l'absence de vitamines. Le milieu de base est ici saccharosé;
3. l'aneurine seule garantit une croissance suffisante;
4. l'aneurine et la biotine assurent la meilleure croissance, sauf si la source d'azote est KNO_3 . Dans ce cas, l'addition de biotine au milieu contenant l'aneurine seule ne provoque pas d'augmentation de la croissance mais une légère réduction.

Le tableau 3 – concernant la souche 404 – montre que le thiazol et la pyrimidine seuls (200 γ /l) ou mélangés (100 γ /l pour chaque constituant) ne sont pas utilisables. *G. graminis* requiert donc la molécule d'aneurine intacte pour sa croissance.

Le tableau 2 indique en outre que l'aneurine est indispensable au développement, en présence de glucose et d'asparagine, de 3 autres souches de *G. graminis* dont 2 sont des subcultures monospores de la première (404). Il est à noter que les souches monospores 404 α et 404 γ présentent une croissance plus grande que la souche mère 404 pour un même milieu et une même durée d'incubation (21 jours, incubation standard).

Ces résultats, différents de ceux de White (1941), de Flück (1955) et de Ward (1961), nous ont d'abord suggéré que l'aneurine utilisée dans nos recherches était souillée de biotine, ce qui expliquerait les données obtenues si *G. graminis* exigeait la biotine et l'aneurine pour sa croissance. Ainsi, nous avons testé notre aneurine sur *Neurospora crassa* pour lequel la biotine est nécessaire à la croissance (Butler, Robbins et Dodge 1941) en lui fournissant un milieu minimal (Westergaard et Mitchell 1947) exempt de biotine et additionné d'aneurine (500 γ /l et 1 mg/l). La

croissance de *N. crassa* en un tel milieu a été quasiment nulle, ne dépassant pas 10 à 15 % de celle obtenue sur milieu minimal complet. L'hypothèse de la présence de biotine dans l'aneurine utilisée est donc à écarter, et on est en droit de considérer les résultats obtenus sur *G. graminis* dans nos recherches comme valables, d'autant plus que des tests analogues avec le même résultat ont été également effectués sur *N. crassa* pour vérifier l'absence de biotine de la solution de FeCl_3 , de celle d'oligo-éléments, du saccharose et du glucose.

Comment expliquer alors ces discordances avec les résultats antérieurs, notamment ceux qui démontrent catégoriquement que biotine et aneurine sont également nécessaires au développement de *G. graminis* (Flück 1955, Ward 1961), que le mélange thiazol-pyrimidine est hautement utilisable et que la synthèse du thiazol par *G. graminis* est effective quoique assez réduite (Ward 1961) ? Il semble que si l'on admet que les méthodes d'investigation ont été de part et d'autre les plus précises possible, il faut envisager que les souches de *G. graminis* étudiées sont physiologiquement différentes, particulièrement dans l'importance du rôle des vitamines pour le développement végétatif. Ainsi, les souches 375, 404, 404 α et 404 γ de *G. graminis*, exigeant l'aneurine comme vitamine indispensable, semblent faire partie du groupe physiologique des champignons partiellement autotrophes à l'égard de la biotine, ne synthétisant pas l'aneurine ni ses deux composants qu'ils ne peuvent d'ailleurs pas coupler et comprenant *Tilletia tritici*, *Phytophthora* spp., *Ceratostomella fimbriata*, *Chalaropsis thielavioides*, *Cortinarius glaucopus*, *Trichophyton discoides* (Cochrane 1958). Par opposition, les souches étudiées par Ward au Canada appartiennent à un groupe physiologique comprenant les champignons hétérotrophes vis-à-vis de la biotine et de l'aneurine, mais synthétisant le thiazol et le couplant à la pyrimidine, tels que certains *Ceratostomella* (Cochrane 1958).

Un milieu synthétique minimum pour les souches de *G. graminis* étudiées dans le présent travail comportera donc de l'aneurine (200 γ /l) et, si l'on veut une croissance abondante (milieu minimum optimum), de la biotine (5 γ /l). Ces concentrations sont celles habituellement utilisées pour les champignons exigeant aneurine et biotine. Il convient de souligner qu'il s'agit de souches indigènes de *G. graminis* et que leur comportement à l'égard de ces deux vitamines est visiblement différent de celui de souches canadiennes (Ward 1961), australiennes (White 1941), et même de certaines suisses (Flück 1955).

3. Influence de la source de carbone sur la croissance

Nous utilisons la souche 375. Toutes les sources de carbone sont administrées à la concentration de 2 % ajoutées au milieu de base AB, en

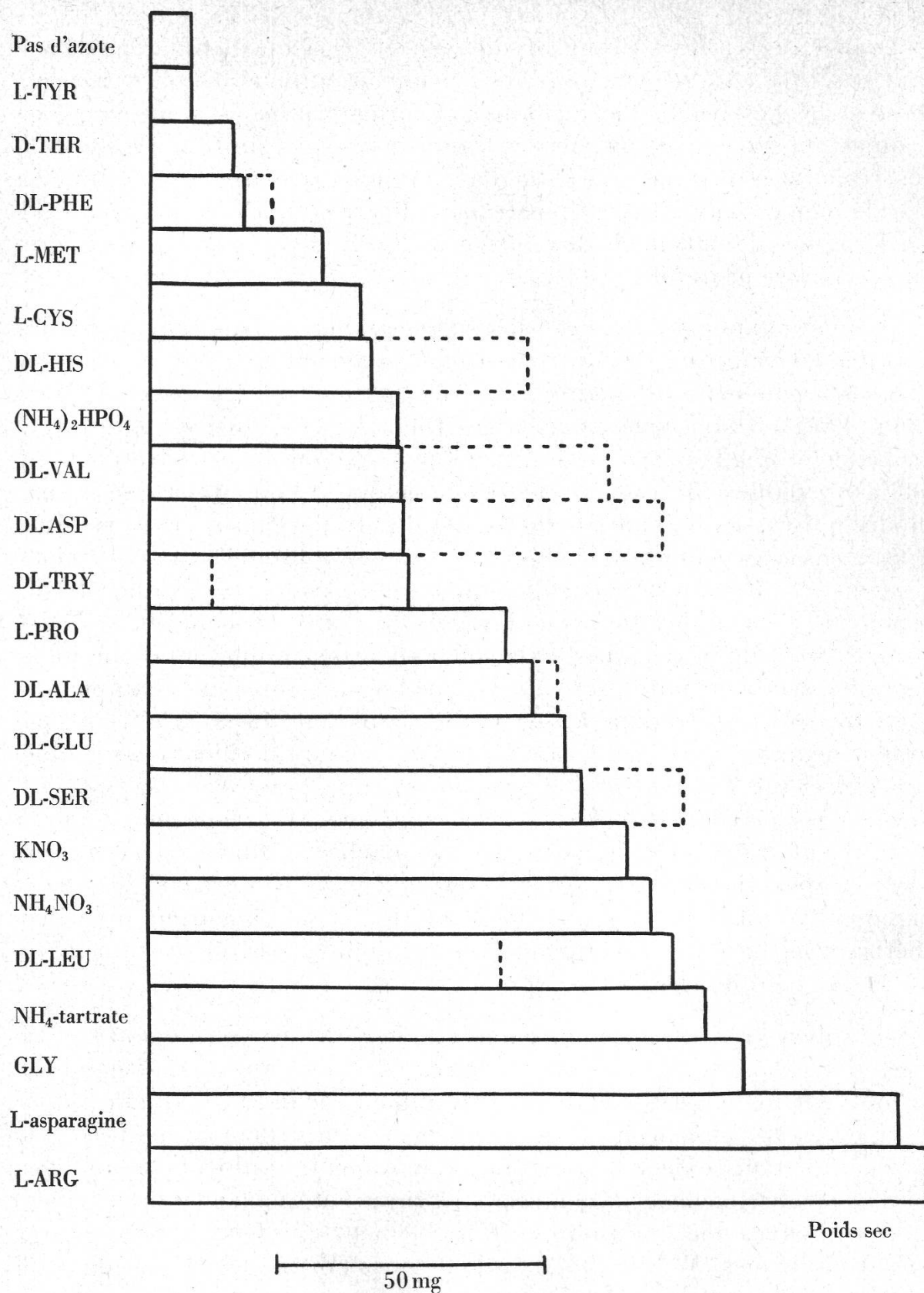


Figure 4

Influence de la source d'azote sur le poids sec après 21 jours d'incubation

Milieu de base AB avec saccharose 2%

Souche 375

Ligne pleine: 0,212 g d'azote par litre

Ligne pointillée: 0,414 g d'azote par litre (pour les acides aminés sous la forme DL)

Les abréviations utilisées correspondent à celles de la liste des sources d'azote présenté p.200

présence d'asparagine ou de KNO_3 fournissant 0,212 g d'azote par litre. La plus grande partie de cette étude est effectuée en milieu avec asparagine, cette amide étant une bien meilleure source d'azote que KNO_3 (fig. 4).

Les figures 2 et 3 montrent la croissance obtenue avec 23 sources de carbone en présence d'asparagine et, en sondage comparatif, avec 8 sources de carbone en milieu nitraté. Si l'on considère qu'un poids sec supérieur à 100 mg est, dans cette expérience, signe d'une excellente croissance, qu'un poids sec compris entre 40 et 100 mg est suffisant et qu'au-dessous de 40 mg la croissance est insuffisante, nous avons les trois catégories de sources de carbone suivantes: excellentes, suffisantes, insuffisantes.

	+ Asparagine	+ KNO_3
Excellentes sources:	Dextrine Amidon Cellobiose Xylose Fructose Maltose	Dextrine Amidon
Sources suffisantes:	Tréhalose Saccharose Lactose Raffinose Arabinose Galactose Glucose	Xylose Saccharose Glucose Fructose
Sources insuffisantes:	Glycogène Rhamnose Inuline Glycérol Tartrate de sodium Fumarate de sodium Sorbose Citrate de sodium Maléate de sodium Acétate de sodium	Tartrate de sodium Acétate de sodium

L'excellente utilisation des polyosides, excepté l'inuline et le glycogène, concorde avec de nombreux résultats obtenus avec un grand nombre de champignons (Cochrane 1958). Il en est de même pour le cellobiose et le maltose (Cochrane 1958) qui sont en général l'un et l'autre utilisés dans la même mesure du fait de leur analogie moléculaire. Le maltose est d'ailleurs déjà reconnu comme une excellente source de carbone pour *G. graminis* (Gilpatrick et Henry 1949). Le xylose est généralement, avec l'arabinose, le pentose le plus assimilable par les champignons, mais dans une moindre mesure que les hexoses (Lilly et Barnett 1951, Cochrane 1958). L'un et l'autre sont de bonnes sources

de carbone pour *G. graminis*, avec une préférence pour le xylose (D-xylose utilisé dans nos recherches). La grande valeur nutritive du xylose est constatée chez de nombreux champignons, parmi lesquels *Aspergillus oryzae* (Tamiya 1932), *Endoconidiophora moniliformis*, *Phymatotrichum omnivorum* (Moore 1937), *Aspergillus niger* (Steinberg 1942), *Blakeslea trispora*, *Mucor rammanianus*, *Phycomyces blakesleeanus* (Margolin 1942), *Lentinus lepideus* (Nord et Vitucci 1947), *Actinomucor elegans*, *Cunninghamella bertholletiae*, en présence de NH_4NO_3 (Sarbhoy 1962), *Fusarium aquaeductum* (Scheuring et Zehender 1962), *Pestalotia* spp., *Gloeosporium papayae*, *G. musarum*, *Phyllosticta cycadina*, en présence de KNO_3 (Tandon 1962).

Parmi les hexoses étudiés, le fructose est le meilleur en présence d'asparagine. Cette valeur nutritive supérieure à celle du glucose – vérifiée lors de plusieurs expériences – est un phénomène relativement rare. *Helminthosporium sativum*, *Mucor rammanianus*, *Sordaria fimicola* (Margolin 1942), *Stachybotrys atra* (Jermyn 1953), *Absidia orchis*, *A. ramosa*, *Mortierella indica* (Sarbhoy 1962) utilisent mieux le fructose que le glucose. Il est intéressant de relever que *Helminthosporium carbonum* race 11-3, en présence d'un hydrolysate de caséine – source azotée organique – assimile mieux le xylose et le fructose que le glucose (Malca et Ullstrup 1962), tout comme *G. graminis* en présence d'asparagine – source azotée également organique.

Pour *G. graminis*, le glucose et le galactose sont des sources carbonées de valeur nutritive moyenne et satisfaisante, tandis que le sorbose est tout à fait insuffisant. En présence de KNO_3 , le glucose se révèle légèrement supérieur au fructose (fig. 3).

Parmi les oligoholosides étudiés, il n'en est pas qui soit particulièrement mal assimilé par *G. graminis*. Nous avons fait mention plus haut de l'excellente utilisation du maltose et du cellobiose; le tréhalose, le saccharose, le lactose et le raffinose sont des sources de carbone suffisantes, supérieures au glucose en présence d'asparagine. Le tréhalose est en général assez bien assimilé par les champignons (Cochrane 1958), le lactose et le raffinose semblent être souvent plus ou moins mal utilisés (Lilly et Barnett 1951, Cochrane 1958, Tandon 1962, Yu-Sun 1964, Zehender et Böck 1964), mais ils peuvent être parfois de bonnes sources de carbone: le lactose est très bien utilisé par *Neurospora crassa*, après induction enzymatique (Landman 1954), par 2 races d'*Helminthosporium carbonum* et une race d'*H. turcicum* en présence d'un hydrolysate de caséine (Malca et Ullstrup 1962) sans être meilleurs que le glucose, par *Gloeosporium citricolum* auquel – en milieu nitraté – il convient mieux que le glucose, et par d'autres champignons phytopathogènes (Tandon 1962). *Absidia orchis*, *A. ramosa* et *Cunninghamella bertholletiae* utilisent

mieux le lactose et le raffinose que le glucose (Sarbhoy 1962), comme *G. graminis*, mais en milieu contenant NH_4NO_3 . Le raffinose, d'autre part, est très bien assimilé par *Pythium debaryanum*, *Sporotrichum* sp., *Phytophthora parasitica* (Volkonsky 1934), *Ustilago scabiosae* (Blumer et Schopfer 1940), *Helminthosporium carbonum* race 1-5 (Malca et Ullstrup 1962) et quelques *Mucorales* (Sarbhoy 1964). Quant au saccharose, il est en général une bonne ou une excellente source carbonée pour la plupart des champignons. Chez *G. graminis*, il est toujours légèrement supérieur au glucose en présence d'asparagine ou de KNO_3 et on est en droit de le considérer comme une source de valeur nutritive moyenne.

Les polyosides testés et plus ou moins mal utilisés par *G. graminis* sont le glycogène et l'inuline. Celle-ci s'est déjà révélée nullement profitable à *G. graminis* (Gilpatrick et Henry 1949), et cette mauvaise assimilation de l'inuline se retrouve chez *Penicillium digitatum* (Fergus 1952), *Allomyces macrogynus* (ex. *A. javanicus*) (McBeth et Scales 1913), *Ustilago violacea* (Blumer 1937), *Saprolegnia delica* (Bhargava 1945), *Chytridium* sp. (Crasemann 1954), *Ascobolus immersus* (Yu-Sun 1964). Le glycogène, tout comme l'inuline est en général bien accepté par les champignons; toutefois, certains, comme *G. graminis*, l'assimilent relativement difficilement: *Allomyces macrogynus* (ex. *A. javanicus*) (McBeth et Scales 1913) par exemple.

L'utilisation médiocre du rhamnose (méthylpentose) est également confirmée sur *Aspergillus oryzae* (Tamiya 1932), et sur la plupart des champignons auxquels il a été offert comme unique source de carbone, excepté quelques-uns tels que *Stachybotrys atra* (Jermyn 1953).

Le glycérol, mal assimilé par *G. graminis*, a une valeur nutritive très variable selon les champignons (Cochrane 1958). Les acides organiques non gras ou leurs sels de sodium sont également insuffisants pour assurer le développement de *G. graminis* s'ils sont offerts comme uniques sources de carbone. Ce phénomène est réalisé fréquemment chez nombre de champignons (Cochrane 1958, Tandon 1962, Sarbhoy 1962), mais l'acétate de sodium est souvent assez bien utilisé (Cochrane 1958, Yu-Sun 1964) alors qu'il est franchement inhibiteur de la croissance de *G. graminis*.

La cellulose, insoluble dans l'eau, a été testée de la manière suivante: le milieu de base AB exempt de source de carbone et comprenant 0,212 g d'azote par litre en asparagine ou KNO_3 , auquel on a ajouté 2% d'agar lavé plusieurs fois à l'eau distillée, est coulé dans des plaques de Petri. Une bande de papier-filtre (cellulose presque pure) est ensuite disposée aseptiquement au centre de chaque plaque, et l'inoculation, par frag-

ments d'une culture de 13 jours identique à celles utilisées aux fins d'inoculation des flacons Erlenmayer, est effectuée à quelques millimètres de la bande de cellulose. Après une semaine, un très fin mycélium rayonne autour de l'inoculum et atteint la bande de papier-filtre sur laquelle il différencie un épais feutrage aérien, alors qu'il reste extrêmement discret en dehors de cette zone riche en carbone et bien délimitée. On pourrait par conséquent conclure que *G. graminis* possède les enzymes nécessaires à l'attaque et à l'assimilation de la cellulose, comme plusieurs Basidiomycètes parasites (Nobles 1948), *Aspergillus* sp. (White, Siu et Reese 1948), *Pythiogeton* sp. (Cantino 1949), *Tricholoma* sp. (Norkrans 1950), *Stachybotrys atra* (Jermyn 1953) et *Macrochytrium botrydioides* (Crasemann 1954). Toutefois, l'attaque d'une bande de papier-filtre par un champignon ne prouve pas d'une manière absolue que l'organisme qui s'y développe est capable d'assimiler la cellulose, la préparation du papier-filtre ayant peut-être transformé partiellement le polysaccharide qu'elle a éventuellement enrichi en diverses substances. Cette expérience n'est donc qu'une indication d'une éventuelle activité cellulolytique de *G. graminis*.

4. Influence de la concentration en carbone sur la croissance

Le tableau 4 représente un sondage limité au glucose, source carbonée de valeur moyenne pour *G. graminis*, mais molécule essentielle dans le métabolisme du carbone chez tous les êtres vivants; c'est la raison pour laquelle nous l'avons préféré à d'autres holosides ou diholosides mieux assimilés par le champignon pour cette brève étude de l'influence de la concentration en carbone sur la croissance. Le milieu de base AB est utilisé, avec glucose en concentrations variables et asparagine ou KNO_3 à raison de 0,212 g d'azote par litre.

Nous voyons que le glucose, lorsqu'il est administré en milieu comportant de l'asparagine, est mieux utilisé, à toutes les concentrations envisagées, que s'il se trouve en présence de KNO_3 . L'optimum de concentration se trouve vraisemblablement entre 0,75 % et 4 % avec asparagine, et aux environs de 4 % avec KNO_3 , alors que des concentrations inférieures à 0,2 % sont nettement insuffisantes dans les 2 cas. La baisse du poids sec constatée entre 1 % et 2 % avec asparagine n'est pas expliquée et s'est trouvée confirmée par une répétition de l'expérience. Il semble donc que le glucose soit utilisable au maximum pour une concentration plus basse en présence d'asparagine qu'avec KNO_3 à concentrations égales d'azote (0,212 g/l). En faisant cette constatation, il ne faut pas oublier que, contrairement au nitrate, l'asparagine apporte, outre l'azote, un squelette carboné libérable sous forme d'acide aspartique utilisable et à potentiel de catalyseur du métabolisme oxydatif. Une autre observation est l'ab-

Tableau 4

Influence de la concentration en carbone (glucose) sur le poids sec après 21 jours d'incubation

Concentrations		Poids sec et pH			
Glucose	Carbone	KNO ₃		Asparagine	
%	%	Poids sec	pH	Poids sec	pH
0,00	0,0	1,5 (± 0,5)	6,25	17,0 (± 2,0)	6,20
0,0001	0,00004	0	6,20	21,5 (± 2,5)	6,25
0,001	0,0004	0	6,15	20,0 (± 4,0)	6,30
0,005	0,002	0	6,25	22,5 (± 5,5)	6,35
0,01	0,004	1,5 (± 0,5)	6,20	24,5 (± 5,0)	6,35
0,025	0,01	1,5 (± 0,5)	6,30	27,0 (± 6,5)	6,40
0,05	0,02	5,5 (± 1,0)	6,35	31,5 (± 5,5)	6,65
0,1	0,04	16,5 (± 4,0)	6,30	42,5 (± 3,0)	6,40
0,2	0,08	37,5 (± 8,5)	6,50	50,5 (± 13,0)	6,35
0,3	0,12	54,5 (± 3,0)	6,60	87,0 (± 6,5)	6,45
0,4	0,16	52,0 (± 9,0)	6,75	101,0 (± 16,0)	6,35
0,5	0,2	47,5 (± 8,5)	6,75	95,0 (± 12,5)	6,00
0,75	0,3	60,0 (± 12,0)	7,05	125,0 (± 26,5)	6,05
1,0	0,4	46,5 (± 12,0)	7,05	89,5 (± 21,5)	6,00
2,0	0,8	65,0 (± 16,0)	7,15	94,5 (± 24,5)	6,05
3,0	1,2	55,0 (± 14,5)	7,05	124,5 (± 11,5)	6,25
4,0	1,6	80,5 (± 15,0)	7,15	121,5 (± 29,0)	6,25
5,0	2,0	62,0 (± 3,5)	7,00	109,0 (± 14,0)	6,25
7,5	3,0	64,0 (± 7,0)	7,20	88,5 (± 23,5)	6,25
10,0	4,0	73,5 (± 10,0)	7,40	91,5 (± 10,0)	6,55

sence de dépression de la croissance aux plus hautes concentrations de glucose étudiées lorsque le milieu contient KNO₃, alors qu'une diminution du poids sec est manifeste en présence d'asparagine. On peut songer ainsi à l'accumulation de métabolites toxiques sous l'effet de l'asparagine et de fortes concentrations de glucose. Il est à remarquer également que les concentrations optimales obtenues dans nos essais ne le sont qu'en fonction d'un poids d'azote égal à celui contenu dans 1 g d'asparagine anhydre (0,212 g d'azote par litre) et que l'azote peut devenir limitant à de fortes concentrations d'hydrates de carbone (Cochrane 1958). En augmentant donc la concentration en azote, nous pourrions peut-être obtenir, à la place d'un plateau ou d'une dépression de croissance, une

augmentation plus ou moins régulière du poids sec jusqu'à un optimum supérieur à celui figurant dans le tableau 4.

5. Influence de la source d'azote sur la croissance

L'expérimentation porte sur la souche 375. Différentes sources d'azote sont testées en présence de saccharose (poids d'azote par litre égal à 0,212 g) dans le milieu de base AB. Les pH sont toujours ramenés à 6,0 par KOH dilué ou H₂SO₄ dilué. Les acides aminés sont particulièrement étudiés.

La figure 4 établit une classification de 21 sources d'azote étudiées en milieu saccharosé, ce diholoside étant plus propice à la croissance de *G. graminis* que le glucose (fig. 2 et 3) et le fructose s'altérant extrêmement vite sous l'effet de la stérilisation à l'autoclave. Ces essais s'étendent à 16 acides aminés, l'asparagine, 3 sources minérales, et le tartrate d'ammonium.

Si nous admettons que dans ces essais une croissance supérieure à 50 mg de poids sec est bonne et qu'au-dessous elle est mauvaise, nous pouvons classer les substances étudiées de la manière suivante, selon leur ordre d'efficacité:

Bonnes sources d'azote :

L-arginine (L-ARG)
L-asparagine (L-asparagine)
Glycine (GLY)
Tartrate d'ammonium
DL-leucine (DL-LEU)
NH₄NO₃
KNO₃
DL-sérine (DL-SER)
DL-acide glutamique (DL-GLU)
DL-alanine (DL-ALA)
L-proline (L-PRO)

Mauvaises sources d'azote :

DL-tryptophane (DL-TRY)
DL-acide aspartique (DL-ASP)
DL-valine (DL-VAL)
(NH₄)₂HPO₄
DL-histidine (DL-HIS)
L-cystéine (L-CYS)
L-méthionine (L-MET)
DL-phénylalanine (DL-PHE)
D-thréonine (D-THR)
L-tyrosine (L-TYR)

Les acides aminés se trouvant naturellement sous leur forme L, nous avons, dans une seconde série d'expériences, doublé la concentration des acides aminés à notre disposition sous leur forme DL afin que le poids d'azote offert au champignon sous une forme utilisable soit le même pour tous les amino-acides testés, dans la mesure, bien entendu, où les mélanges DL contiennent 50 % de chacune des deux formes et où *G. graminis* préfère exclusivement la forme D ou la forme L. Ces résultats se trouvent aussi dans la figure 4. On observe alors plusieurs modifications de la valeur nutritive des amino-acides soumis à *G. graminis*: ainsi, DL-histidine, DL-valine, DL-acide aspartique, mal utilisés à la concentration standard de 0,212 g d'azote par litre, deviennent de bonnes sources azotées en doublant cette concentration; l'assimilation de DL-phénylalanine, DL-

alanine et DL-sérine est également meilleure; par contre, DL-leucine et surtout DL-tryptophane deviennent nettement moins assimilables à 0,414 g d'azote total par litre (soit environ 0,212 g d'azote par litre utilisable par le champignon, en admettant que celui-ci refuse la forme D ou la forme L).

L'excellente assimilation de L-arginine par la souche de *G. graminis* utilisée n'est pas surprenante, puisque cet acide aminé s'est déjà révélé assez bien utilisable par *G. graminis* (Turner 1959). Toutefois, cet auteur trouve que la L-asparagine lui est nettement supérieure. De même, l'asparagine est la meilleure source d'azote pour la souche canadienne (Gilpatrick et Henry 1949), et est souvent utilisée par les auteurs qui cultivent *G. graminis* en milieu artificiel (Flück 1955, Ward 1961, Siegle 1961, Weste et Thrower 1963). La L-asparagine est en général une excellente source d'azote pour la plupart des champignons (Cochrane 1958), tandis que l'arginine convient sous sa forme L à *Venturia inaequalis* (Pelletier et Keitt 1954), sous sa forme D à *Ustilago scabiosae* (Blumer et Schopfer 1940), et à plusieurs Mucorales dans des mélanges de 4 acides aminés (Sarbhoy 1963).

La glycine est déjà reconnue comme une source azotée satisfaisante pour *G. graminis* (Zogg 1957, Turner 1959), et cette propriété s'étend à de nombreux champignons (Cochrane 1958).

Les sels d'ammonium, nitrate et tartrate, à l'exception du phosphate diammonique, sont de bonnes sources d'azote pour *G. graminis*, meilleures que KNO_3 à l'égard de notre souche. A noter que White (1941) utilise avec succès $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — avec glucose — dans ses travaux sur les besoins vitaminiques du même champignon. Le même auteur fournit NH_4NO_3 à *G. graminis*, dans un milieu glucosé également, pour des recherches s'étendant à d'autres organismes (White 1943). Nos résultats concernant la nutrition azotée minérale de *G. graminis* nous suggèrent que NH_3 + est mieux ou plus rapidement utilisé que NO_3^- , la mauvaise utilisation de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ s'expliquant par une acidification du milieu de culture due à la libération d'ions H_2PO_4^- — et inhibitrice de la croissance (pH finaux voisins de 3,0). Cependant, la figure 4 nous montre que KNO_3 est bien la source azotée utilisable de formule chimique la plus simple, et son assimilation relativement bonne est reconnue supérieure à celle de plusieurs acides aminés (Gilpatrick et Henry 1949).

La leucine sous sa forme DL à 0,212 g d'azote par litre est une très bonne source azotée, alors qu'à concentration double, c'est-à-dire à 0,212 g d'azote assimilable par le champignon dans la fraction D ou L, sa valeur nutritive baisse. Ce phénomène sera peut-être expliqué partiellement lorsqu'on sera mieux renseigné sur les affinités spécifiques de *G. graminis* pour les formes D et L des différents amino-acides. Turner considère

que cet acide aminé est une mauvaise source d'azote pour 2 variétés de *G. graminis* (dont *Ophiobolus graminis* var. *avenae*), de même que la proline qui se révèle assez bonne dans nos essais, alors que l'acide glutamique, bien assimilé par notre souche l'est également pour les siennes. L'alanine est acceptée de manière variable par les souches de Turner, assez bien par la nôtre, de même que la sérine (Turner 1959).

Parmi les champignons présentant des affinités comparables à celles de *G. graminis* pour ces acides aminés, citons brièvement:

- pour l'alanine: *Phycomyces blakesleeanus* (Leonian et Lilly 1940), *Venturia inaequalis* (Pelletier et Keitt 1954), *Ustilago scabiosae* (Blumer et Schopfer 1940), *Fusarium coeruleum* (Tandon 1962);
- pour la leucine: *Ustilago scabiosae* (Blumer et Schopfer 1940), *Trypophyton persicolor* (Cochrane 1958), *Pestalotia* spp., *Gloeosporium papayae*, *Colletotrichum papayae*, *Phyllosticta mortoni* (Tandon 1962);
- pour la sérine: *Ustilago scabiosae* (Blumer et Schopfer 1940), *Venturia inaequalis* (Pelletier et Keitt 1954);
- pour l'acide glutamique: *Phycomyces blakesleeanus* (Leonian et Lilly 1940), *Ustilago scabiosae* (Blumer et Schopfer 1940), *Aspergillus niger* (Steinberg 1942), *Pestalotia* spp., *Gloeosporium* spp., *Phyllosticta* spp. (Tandon 1962), *Helminthosporium carbonum* race 1 (Hale et Roane 1961), *Ascobolus immersus* (Yu-Sun 1964);
- pour la proline: *Ustilago scabiosae* (Blumer et Schopfer 1940), *Aspergillus niger* (Steinberg 1942).

Les acides aminés mal utilisés, voire toxiques à la concentration de 0,212 g d'azote par litre pour notre souche de *G. graminis* sont: DL-tryptophane, DL-acide aspartique (bon à double concentration), DL-valine (bon à double concentration), DL-histidine (bon à double concentration), L-cystéine, L-méthionine, DL-phénylalanine (mauvais à double concentration), D-thréonine et L-tyrosine. Nous confirmons les résultats de Turner (Turner 1959) en ce qui concerne les amino-acides suivants: valine, tryptophane, tyrosine, phénylalanine, thréonine et méthionine. Cet auteur a trouvé par contre que l'histidine exerce des effets variables sur la croissance selon les souches examinées, alors que l'acide aspartique est, comme l'asparagine, une excellente source d'azote; ce dernier point est intéressant puisque les utilisations de l'asparagine et de l'acide aspartique sont nécessairement liées si l'on admet que l'asparagine est assimilable en tant que source d'acide aspartique. Nos résultats montrent en outre que l'asparagine paraît posséder une valeur nutritive propre, indépendante de l'utilisation de l'acide aspartique, ce qui est déjà cons-

taté chez *Tricholoma imbricatum* (Norkrans 1950), *Piricularia oryzae* (Otani 1952), *Leptographium* sp. (Leaphart 1956), *Alternaria tenuis* (Tandon 1962). On peut donc penser que *G. graminis* préfère la fonction amide de l'asparagine à la fonction amine, ce qui tendrait à expliquer la valeur nutritive bien supérieure de cette molécule comparée à celle de l'acide asparatique: ce phénomène serait à rapprocher de celui observé chez *Piricularia oryzae* (Ishizu 1954).

D'autres acides aminés mal utilisés par *G. graminis*, même en double concentration lorsqu'il s'agit de la forme DL, le sont également par les organismes suivants:

– pour la cystéine: *Venturia inaequalis* (Pelletier et Keitt 1954);

Tableau 5

Influence de la concentration en KNO_3 , en présence de glucose ou de saccharose, sur le poids sec après 21 jours d'incubation

Milieu de base AB avec glucose ou saccharose 2 %

Concentration en KNO_3 %	Concentration en azote %	Glucose		Saccharose	
		pH	Poids sec	pH	Poids sec
0,00	0,00000	5,90	16,0 (± 4,0)	5,90	5,5 (± 1,0)
0,01	0,00139	6,10	38,0 (± 4,0)	5,95	50,0 (± 4,0)
0,05	0,00693	6,65	61,5 (± 8,0)	6,30	107,5 (± 28,5)
0,10	0,01386	6,85	85,5 (± 22,5)	6,65	130,0 (± 16,5)
0,15	0,02079	7,15	93,5 (± 20,0)	6,90	154,5 (± 32,0)
0,20	0,02772	6,80	79,0 (± 11,0)	6,85	123,0 (± 10,0)
0,25	0,03465	6,85	77,5 (± 20,5)	6,70	115,0 (± 24,0)
0,30	0,04158	6,65	62,0 (± 5,0)	6,70	123,5 (± 33,5)
0,35	0,04851	6,70	57,5 (± 8,0)	6,70	120,0 (± 24,5)
0,40	0,05545	6,75	64,0 (± 13,5)		
0,45	0,06238	6,50	53,5 (± 13,0)	6,70	128,0 (± 34,5)
0,50	0,06931	6,75	76,0 (± 19,0)	6,65	115,5 (± 25,5)
0,60	0,08317	6,20	47,5 (± 12,5)	6,70	112,0 (± 22,5)
0,80	0,11089	6,15	49,0 (± 8,5)	6,75	131,0 (± 20,0)
1,00	0,13861	6,30	57,0 (± 13,5)	6,60	110,5 (± 10,0)
2,50	0,34653	5,95	19,5 (± 5,0)	6,05	49,5 (± 13,0)
5,00	0,69307	5,95	20,0 (± 5,5)	6,05	23,0 (± 2,5)
7,50	1,03960	6,05	28,0 (± 3,5)		
10,00	1,38614	5,95	24,0 (± 6,0)	6,05	40,0 (± 3,0)

- pour la méthionine: *Trichophyton* spp. (Stockdale 1953), *Venturia inaequalis* (Pelletier et Keitt 1954);
- pour la phénylalanine: *Trichophyton* spp. (Stockdale 1953);
- pour la thréonine: *Venturia inaequalis* (Pelletier et Keitt 1954).

Il convient de relever que Turner montre que la cystéine est bien acceptée par ses souches virulentes à l'égard du blé, alors qu'elle ne convient pas du tout à *Ophiobolus graminis* var. *avenae* (Turner 1959). Nos résultats diffèrent des siens en ce sens que notre souche, virulente à l'égard du blé, assimile très mal la cystéine. Nous nous proposons d'étudier ultérieurement la virulence de la souche 375 à l'égard de l'avoine.

Tableau 6

Influence de la concentration en azote (asparagine et glycine) sur le poids sec après 21 jours d'incubation

Milieu de base AB avec glucose 2 %

Concentrations				Poids secs et pH finaux			
Milieu de base AB + asparagine		Milieu de base AB + glycine		Milieu de base AB + asparagine		Milieu de base AB + glycine	
Aspa-ragine %	Azote %	Gly-cine %	Azote %	Poids sec	pH	Poids sec	pH
0,00	0,00000	0,00	0,00000	5,0 (± 1,0)		8,5 (± 2,0)	5,80
0,01	0,00212	0,01	0,00187	34,0 (± 2,0)	5,70	31,0 (± 5,0)	5,80
		0,05	0,00933			78,0 (± 21,0)	5,70
0,10	0,02121	0,10	0,01867	79,0 (± 8,0)	5,50	111,0 (± 9,5)	5,85
0,15	0,03181	0,15	0,02800	81,0 (± 14,0)	6,10	110,0 (± 24,5)	5,80
0,20	0,04242	0,20	0,03733	81,5 (± 9,0)	6,05	124,5 (± 10,0)	6,15
		0,30	0,05600			130,0 (± 18,5)	6,40
		0,40	0,07467			106,5 (± 26,5)	6,40
0,50	0,10606	0,50	0,09333	98,0 (± 13,5)	6,75	110,0 (± 29,5)	6,45
		0,60	0,11200			111,0 (± 10,5)	6,60
		0,70	0,13067			125,0 (± 14,5)	6,55
		0,80	0,14933			135,0 (± 19,0)	6,55
		0,90	0,16800			113,5 (± 19,0)	6,45
1,00	0,21212	1,00	0,18667	140,5 (± 15,5)	6,95	123,0 (± 26,0)	6,60
		2,50	0,46667			49,0 (± 12,0)	5,85
5,00	1,06060	5,00	0,93333	130,0 (± 7,5)	7,10	23,0 (± 5,5)	5,70
10,00	2,12121	10,00	1,86667	32,0 (± 7,0)	6,15	40,5 (± 8,5)	5,25

Tableau 7

Influence de la concentration en azote (KNO_3) sur le poids sec de deux souches de *Gaeumannomyces graminis* après 21 jours d'incubation

Milieu de base AB avec glucose 2 %

Concentration en KNO_3 %	Concentration en azote %	Souche 375		Souche 374	
		pH	Poids sec	pH	Poids sec
0,00	0,00000	5,90	16,0 (\pm 4,0)	6,00	6,5 (\pm 2,0)
0,01	0,00139	6,10	38,0 (\pm 4,0)	6,05	38,0 (\pm 5,5)
0,05	0,00693	6,65	61,5 (\pm 8,0)	6,70	91,0 (\pm 24,5)
0,10	0,01386	6,80	85,5 (\pm 22,5)	6,65	89,0 (\pm 20,5)
0,15	0,02079	7,10	93,5 (\pm 20,0)	6,65	98,5 (\pm 17,0)
0,20	0,02772	6,80	79,0 (\pm 11,0)	6,65	95,0 (\pm 9,0)
0,25	0,03465	6,85	77,5 (\pm 20,5)	6,65	103,0 (\pm 12,5)
0,30	0,04158	6,65	62,0 (\pm 5,0)	6,45	72,5 (\pm 15,5)
0,35	0,04851	6,70	57,5 (\pm 8,0)	6,60	97,0 (\pm 24,0)
0,40	0,05545	6,75	64,0 (\pm 13,5)	6,60	108,5 (\pm 26,5)
0,45	0,06238			6,60	100,0 (\pm 24,5)
0,50	0,06931	6,75	76,0 (\pm 19,0)	6,60	100,5 (\pm 26,0)
0,60	0,08317	6,20	47,5 (\pm 12,5)	6,60	100,0 (\pm 27,0)
0,80	0,11089	6,15	49,0 (\pm 8,5)	6,70	118,0 (\pm 26,0)
1,00	0,13861	6,30	57,0 (\pm 13,5)	6,35	74,5 (\pm 19,5)
2,50	0,34653	5,95	19,0 (\pm 5,0)	6,10	30,0 (\pm 7,5)
5,00	0,69307	5,95	20,0 (\pm 5,5)	6,05	21,0 (\pm 2,0)
7,50	1,03960	6,05	28,0 (\pm 3,5)	6,00	28,5 (\pm 8,0)
10,00	1,38614	5,95	24,0 (\pm 6,0)	5,95	38,5 (\pm 2,5)

6. Influence de la concentration en azote sur la croissance

Les tableaux 5 et 6 indiquent les variations de croissance de *G. graminis*, exprimées en poids sec, sous l'influence de différentes concentrations en KNO_3 , asparagine et glycine en présence de glucose ou de saccharose à 2 % en milieu de base AB, l'essai portant essentiellement sur la souche 375. Une expérience supplémentaire est effectuée pour KNO_3 en présence de glucose sur la souche 374, sporulant sous la forme *Phialophora radicola* Cain. Cette expérience de contrôle est consignée dans le tableau 7.

a) KNO_3 -glucose: pour les deux souches étudiées, une bonne croissance est obtenue à partir d'une concentration de 0,1 % de KNO_3 , mais le développement est inhibé, pour la souche 375, dès 0,6 %, tandis qu'il l'est, pour la souche 374, dès 1 %. Cette petite différence, dans la mesure où

elle peut être significative, provient peut-être d'un comportement physiologique particulier à chacune des deux souches, puisque l'on sait déjà que diverses souches de *G. graminis* réagissent quelque peu différemment dans leur nutrition azotée (Turner 1959).

b) KNO_3 -saccharose: le saccharose, déjà reconnu plus favorable que le glucose dans le présent travail, ne fait qu'amplifier les effets de différentes concentrations de KNO_3 en présence de glucose, excepté une assimilation meilleure à 0,8% de KNO_3 en milieu de base AB glucosé.

c) Glycine-glucose, asparagine-glucose: l'une et l'autre de ces sources azotées doivent être administrées à *G. graminis* à plus de 0,5% pour que la croissance soit satisfaisante, alors que la glycine est toxique dès que l'on dépasse 1% et l'asparagine dès que la concentration est supérieure à 5% seulement.

Les concentrations optimales des trois sources azotées étudiées ici sur la souche 375 se trouveraient donc aux environs de 0,15% pour KNO_3 , 0,8% pour la glycine, 1% pour l'asparagine, en présence de glucose, ce qui représente les concentrations en azote respectives de 0,208 g/l, 1,493 g/l et 0,212 g/l. La glycine ne présente donc qu'une faible efficacité de promotion de la croissance de *G. graminis* comparée à celles, environ égales, du nitrate et de l'asparagine.

7. Influence de la durée d'incubation sur la croissance et sur le pH

Expérimentation sur la souche 375. L'influence du temps d'incubation sur le poids sec et le pH final du milieu de culture est étudiée pour les 4 milieux suivants:

Milieu de base AB + asparagine (0,212 g d'azote par l) + glucose 2%
Milieu de base AB + asparagine (0,212 g d'azote par l) + saccharose 2%
Milieu de base AB + KNO_3 (0,212 g d'azote par l) + glucose 2%
Milieu de base AB + KNO_3 (0,212 g d'azote par l) + saccharose 2%

Les pH initiaux sont fixés aux environs de 6,0 à 6,2. Les milieux ne sont pas tamponnés. Les résultats, consignés dans les figures 5 et 6, nous fournissent les données suivantes:

1. En milieu avec asparagine, la croissance présente 5 phases particulièrement visibles en présence de saccharose:

a) de l'inoculation aux environs du 12^e jour = phase stationnaire de croissance lente (c'est-à-dire peu détectable);

b) du 13^e jour aux environs du 26^e jour = première phase de croissance rapide;

c) des 26/28^{es} jours au 35^e jour (saccharose) ou au 46^e jour (glucose) = phase stationnaire avec de fréquentes baisses de poids sec ;

d) du 36^e jour aux environs du 50^e jour (saccharose) ou du 48^e jour au 56^e jour (glucose) = deuxième phase de croissance rapide ;

e) dès le 54^e jour (saccharose) ou le 59^e jour (glucose) = phase stationnaire.

La phase c est certainement intéressante du fait qu'elle représente un ralentissement de la croissance avec pertes de poids, par conséquent pertes de matière vivante. Ce stade, dans le développement des cultures, correspond vraisemblablement à une modification métabolique qui ne se reflète toutefois pas dans le pH du milieu. Ce changement pourrait être lié à l'épuisement d'une des deux fonctions azotées de l'asparagine et à l'attaque de la seconde sous l'effet d'une préférence enzymatique pour l'azote amido ou pour l'azote amino (cf. p. 203). La phase e (phase stationnaire) est probablement le stade final correspondant à l'arrêt progressif de la croissance et à un début d'autolyse, peu visible cependant dans la figure 5, dus à l'épuisement du milieu de culture ou encore à l'accumulation de métabolites toxiques (Cochrane 1958). Il est évident

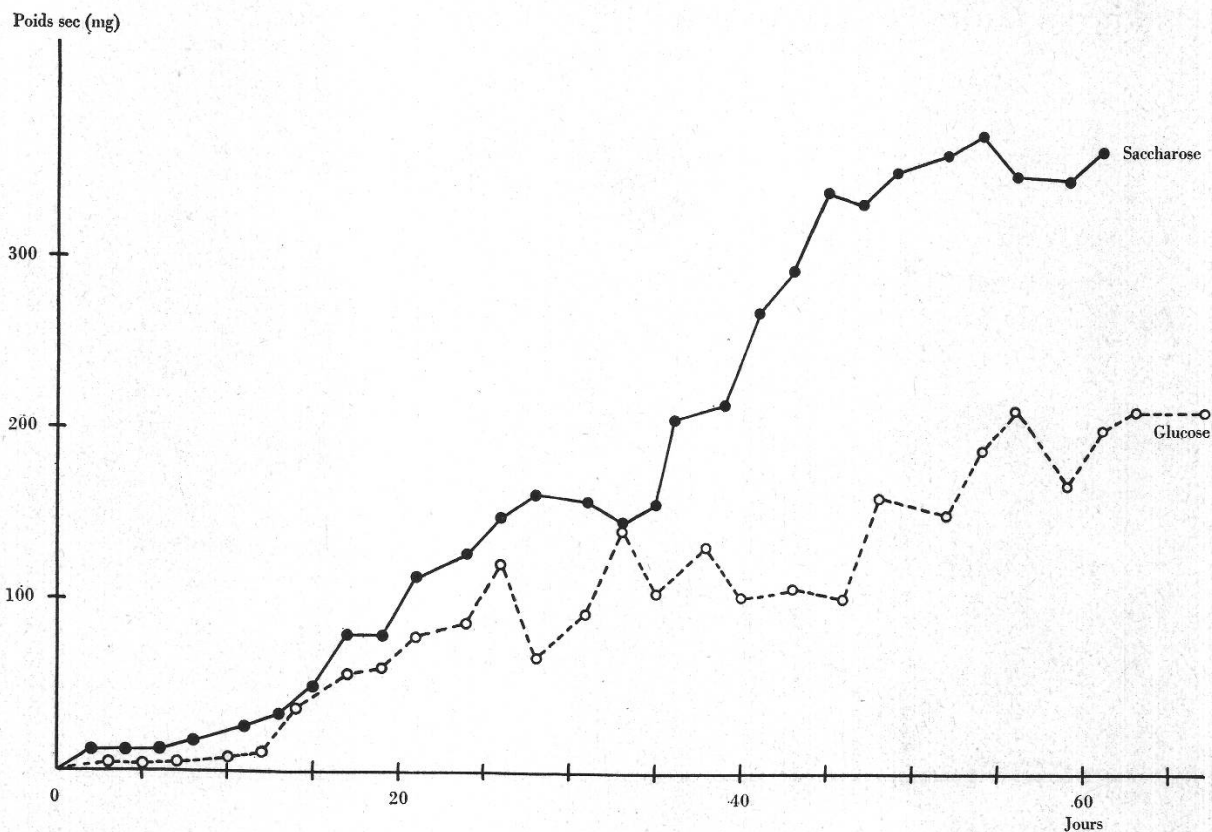


Figure 5

Influence de la durée d'incubation sur le poids sec en milieu avec asparagine
Milieu de base AB avec asparagine à 0,212 g d'azote par litre
Saccharose ou glucose à 2 %

qu'une prolongation du temps de culture et une analyse chimique des milieux utilisés par le champignon permettraient de mieux expliquer les différentes phases de croissance observées.

Les variations du pH sont difficilement interprétables. En milieu saccharosé – où la croissance est la plus grande – nous constatons une légère acidification finale due peut-être à la diminution du nombre des radicaux amines et amides de l'asparagine. Les pH initiaux étant de 6,20 (glucose) et 6,25 (saccharose), les finaux de 6,20 (glucose) et 5,95 (saccharose), il n'y a pratiquement pas eu de variations importantes au cours de la croissance du champignon.

2. En milieu avec KNO_3 , l'aspect de la croissance est plus conforme à ce que l'on observe d'ordinaire chez les autres champignons: il présente trois phases:

a) de l'inoculation au 13^e jour environ = phase de croissance lente (c'est-à-dire peu discernable);

b) des environs du 13^e jour à ceux du 35^e jour = phase de croissance rapide;

c) du 35^e jour au 61^e jour (dernière mesure) = phase stationnaire et tendance à la diminution du poids sec depuis le 57^e jour.

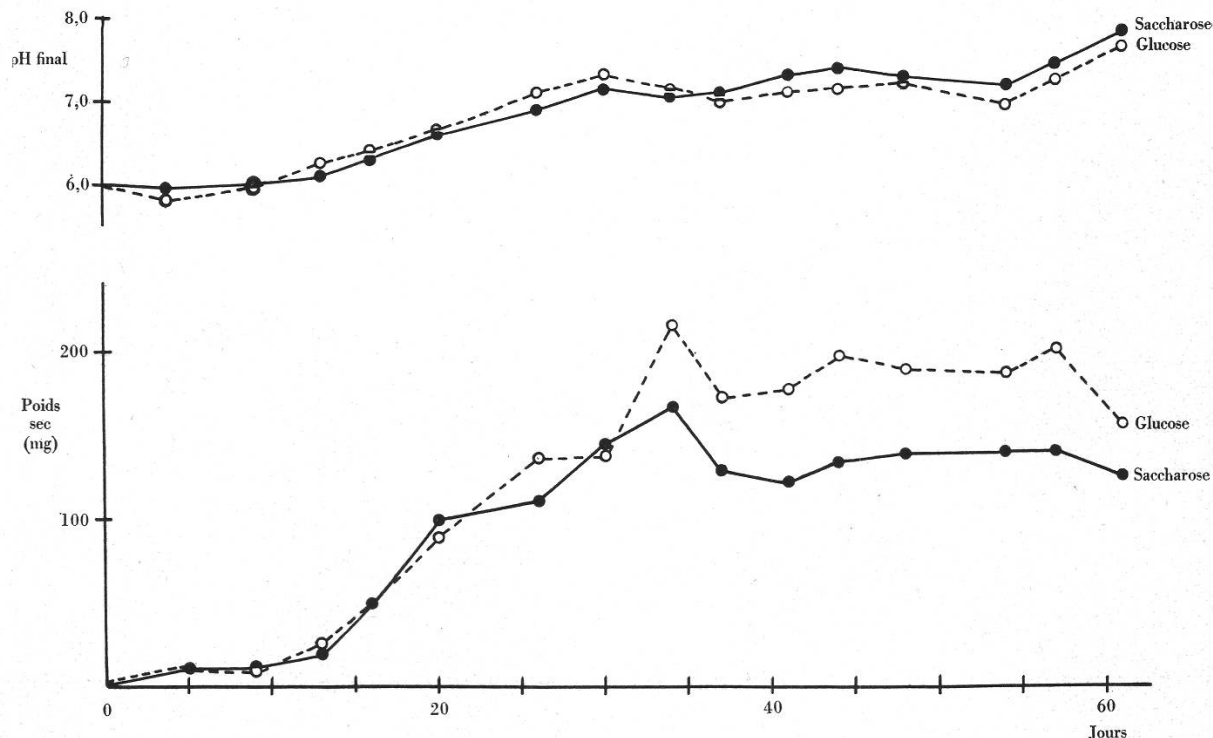


Figure 6

Influence de la durée d'incubation sur le poids sec et sur le pH final en milieu nitraté
Milieu de base AB avec KNO_3 à 0,212 g d'azote par litre
Saccharose ou glucose à 2 %

Ces trois stades sont bien visibles dans les deux milieux (glucose et saccharose) et sont expliqués depuis longtemps chez d'autres champignons (Cochrane 1958). L'absence des stades intermédiaires (voir plus haut) dans les milieux nitrates semble être due au fait que, contrairement à l'asparagine, KNO_3 n'a qu'une fonction azotée.

Le pH devient régulièrement plus alcalin et passe de 6,0 à 7,8 (saccharose) et 7,65 (glucose), ce qui s'explique par l'accumulation des ions K^+ dans le milieu à la suite de l'utilisation des ions NO_3^- .

On peut relever que jusqu'au 30^e jour, le glucose ni le saccharose ne semblent être plus favorables l'un que l'autre à la croissance de *G. graminis* en présence de KNO_3 , avec toutefois une petite différence en faveur du saccharose au 21^e jour, ce qui vérifie la meilleure utilisation de ce diholoside lors des essais exprimés dans la figure 3, tandis que dès le 33^e jour le glucose est mieux assimilé. Notons par contre qu'en présence d'asparagine, le saccharose s'est révélé continuellement meilleur que le glucose (fig. 5); ce fait très important sera discuté plus loin.

8. Proposition d'un milieu minimum optimum pour la culture en milieu liquide de *Gaeumannomyces graminis*

L'objectif initial de ce travail était non seulement de définir quelques points de la physiologie d'une souche de *G. graminis*, mais aussi d'établir un milieu synthétique minimum optimum pour la culture de cet organisme en vue de recherches biologiques précises.

En nous référant aux résultats obtenus, nous pouvons proposer le milieu suivant:

Glucose	20 g
KNO_3	1,5 g
KH_2PO_4	1,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
FeCl_3	6 gouttes (solution à 1 %)
Oligo-éléments	1 ml (solution selon Beadle et Tatum 1945)
Aneurine	200 γ
Biotine	5 γ
Eau distillée	1 l
pH fixé à 5,5	

IV. Discussion

La définition du milieu synthétique minimum optimum peut être la suivante: milieu dont tous les constituants, de formule chimique définie la plus simple possible, sont essentiels à la croissance et assurent un dé-

veloppement satisfaisant du micro-organisme par comparaison avec les résultats obtenus sur milieux naturels.

D'emblée il apparaît que notre milieu (cf. supra) comporte, au vu de nos résultats, un constituant non essentiel à la croissance de *G. graminis* (souches 374, 375, 404), la biotine. Le tableau 1 nous indique en effet que cette vitamine n'influence quasiment pas le développement du champignon en présence de KNO_3 . Toutefois elle l'augmente considérablement si le milieu contient NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, tartrate d'ammonium ou asparagine: si l'on remplace KNO_3 par l'asparagine, par exemple, la biotine augmentera la croissance de 61,5% (tableau 1), croissance qui sera cependant légèrement limitée, en incubation de 21 jours, par la valeur nutritive très moyenne du glucose. En conséquence et pour répondre à notre définition et objectif d'un milieu minimum optimum pour la croissance de *G. graminis*, nous avons maintenu la biotine dans le milieu proposé.

Le glucose est une source carbonée parfaitement assimilable par *G. graminis*, mais toutefois moins profitable que d'autres holosides (xylose, arabinose, galactose et fructose en présence d'asparagine; xylose et galactose en présence de KNO_3). Nous l'avons choisi pour notre milieu en raison de son importance dans le métabolisme de tout être vivant et de sa structure moléculaire simple. Il est évident qu'on peut le remplacer, si l'on veut obtenir une croissance plus considérable, par les holosides susmentionnés, ou encore par les hydrates de carbone mieux utilisables, à concentration égale, signalés dans les figures 2 et 3. La concentration de 2% est proche de concentrations assurant une très bonne croissance (3% et 4%, cf. tableau 4) et reste dans les limites habituelles.

KNO_3 n'est pas la meilleure source d'azote pour *G. graminis*, mais il est la plus simple chimiquement parmi celles assurant un développement satisfaisant du champignon. C'est la raison pour laquelle nous l'avons préféré à l'asparagine, à NH_4NO_3 , et aux autres sources d'azote plus utilisables se trouvant dans la figure 4 (en milieu avec saccharose). La concentration de 0,15% est la meilleure, en milieu glucosé, pour la souche 375 (tableau 5). La substitution du KNO_3 par une molécule azotée de formule moins élémentaire pourra renforcer la croissance (fig. 4).

La présence de KH_2PO_4 , MgSO_4 et FeCl_3 est indispensable: des cultures en milieu liquide synthétique minimum optimum carencé en l'un de ces corps ne permettent d'obtenir que des poids secs tout à fait insuffisants. Il est d'ailleurs reconnu depuis longtemps que K, P, Mg, S et Fe sont essentiels pour les champignons (Lilly et Barnett 1951). Il est possible de substituer FeCl_3 par un autre sel de fer, le chlore n'étant pas essentiel (Cochrane 1958), mais nous avons choisi FeCl_3 en raison de sa solubilité extrêmement grande aux pH utilisés.

Les oligo-éléments figurant dans notre milieu ne sont peut-être pas tous indispensables (Bo et Co en particulier), mais la grande difficulté d'obtenir une solution chimiquement pure de chacun d'entre eux et un milieu de culture exempt de tous les micro-éléments envisagés est un sérieux obstacle à des essais de contrôle. En l'absence de ceux-ci, on pouvait se baser sur le fait que Cu est indispensable à tous les champignons, que Zn et Mn le sont probablement aussi et que Mo l'est au moins pour l'utilisation du nitrate (Lilly et Barnett 1951, Cochrane 1958).

L'aneurine, le tableau 2 nous le montre bien, est indispensable au développement de nos souches de *G. graminis* à une concentration de 200 γ /l. Il est possible que des concentrations plus faibles soient suffisantes, mais celle que nous avons choisie représente une valeur moyenne compatible avec la composition d'un milieu minimum optimum.

Un pH de 5,5 représente la valeur optimale obtenue pour le milieu de base AB, saccharosé, avec KNO_3 (fig. 1), et nous pensons qu'il est justifié, après avoir consulté la figure 1, de fixer le pH entre 5,0 et 6,0 sans trop influencer le développement.

Finalement, nous tenons à rappeler que les données fournies par nos recherches ne doivent pas être interprétées d'une manière trop générale. En effet :

1. Nous n'avons travaillé qu'avec une seule souche de *G. graminis* et ces résultats ne sont donc strictement applicables qu'à elle, si l'on rappelle qu'il existe de nombreuses races physiologiques de cet organisme. Nous avons effectué quelques sondages à l'aide de souches différentes (tableaux 2 et 7), et leur comportement a été cependant sensiblement identique à celui de la souche 375, à quelques petites différences près. Une extension de ces données à d'autres souches est donc possible, mais en tenant compte des limitations d'ordre biologique qui peuvent éventuellement se présenter.

2. Le mode d'inoculation et l'interprétation statistique subséquente (cf. 11. Matériel et méthodes) sont adaptés au type particulier de matériel utilisé (absence de sporulation).

3. Le temps d'incubation, arbitrairement fixé à 21 jours, ne permet peut-être pas à l'organisme d'assimiler pleinement certaines molécules qui lui seraient éventuellement profitables dans un laps de temps plus long. Par exemple: la figure 3 montre qu'en présence de KNO_3 le glucose est relativement moins bien utilisé que le saccharose. Ce résultat n'est valable que pour un temps d'incubation de 21 jours et se trouve confirmé par la figure 6. Or, le même graphique révèle que *G. graminis* utilise mieux le glucose que le saccharose dès 33 jours environ. Par contre, en présence

d'asparagine, le saccharose est une meilleure source de carbone que le glucose à quelque temps d'incubation que ce soit.

Ces trois points montrent qu'on doit se garder de toute généralisation hâtive lors de l'interprétation de résultats de physiologie fongique.

Le présent travail constitue la première partie d'une thèse pour l'obtention du doctorat ès sciences biologiques de l'Université de Genève, sous la direction de M. Gilbert Turian, professeur de microbiologie générale auquel je tiens à exprimer ma gratitude pour les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigués.

Mes plus vifs remerciements vont au Dr H. Zogg qui m'a fourni les souches 374 et 375, de même qu'au professeur D. Bianchi et à M. R. Murbach pour leur aide dans les traductions anglaise et allemande du résumé, et à M. R. Pilloud pour son assistance technique.

Je remercie enfin MM. R. Gallay et M. Rochaix, directeurs des Stations fédérales d'essais agricoles de Lausanne, qui ont accepté ces recherches de thèse dans leur programme d'activité.

Résumé

Des recherches en milieu liquide synthétique sur la physiologie de la nutrition d'une souche de *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx et Olivier (= *Ophiobolus graminis* Sacc. = *Linocarpon cariceti* B. et Br.), agent principal du piétin échaudage des céréales, ont abouti aux principaux points suivants:

1. Le pH optimum pour la croissance est voisin de 5,5 (milieu avec saccharose et asparagine).

2. L'aneurine est indispensable au développement de *G. graminis*, au contraire de la biotine (vérification sur 4 souches) qui renforce toutefois la croissance (excepté en milieu nitraté).

3. Parmi 23 sources de carbone, les meilleures sont (en milieu avec asparagine) dextrine, amidon, cellobiose, xylose, fructose et maltose, et, en milieu nitraté, dextrine et amidon. Dans les deux cas, le saccharose et le glucose sont des sources de valeur nutritive moyenne (le glucose est cependant mieux utilisable que le fructose en présence de KNO_3), tandis que différents sels sodiques d'acides organiques (dont l'acétate), le sorbose, le glycérol et l'inuline sont insuffisants pour assurer le développement de *G. graminis*.

4. En présence d'asparagine ou de KNO_3 , la concentration de glucose garantissant une croissance minimale est de 0,2%, tandis qu'un développement optimal est assuré pour des concentrations de glucose de 0,75% à 4% avec asparagine et voisines de 4% en présence de KNO_3 . A 10% de glucose, une dépression de croissance n'est constatée qu'en milieu contenant de l'asparagine (0,1%).

5. De 21 sources d'azote étudiées à la concentration de 0,212 g d'azote par litre, dont 16 acides aminés, la L-arginine est la meilleure, en milieu saccharosé, suivie de la L-asparagine, la glycine et le tartrate d'ammonium. KNO_3 est une source moyenne et satisfaisante. *G. graminis* semble mieux assimiler l'ion NH_4^+ que l'ion NO_3^- . La L-cystéine, la L-méthionine, la DL-phénylalanine, la D-thréonine et la L-tyrosine sont mal assimilées par *G. graminis*.

6. Les concentrations optimales de 3 sources d'azote sont 0,15% pour KNO_3 (vérification avec saccharose et sur 2 souches en milieu glucosé), 0,8% pour la glycine (avec glucose) et 1% pour l'asparagine (avec glucose). La glycine «économise» moins bien l'azote que l'asparagine et KNO_3 .

7. L'effet de 4 milieux (glucose ou saccharose et KNO_3 ou asparagine) sur la croissance et le développement ainsi que sur les variations de pH est étudié à de courts intervalles pendant plus de 60 jours. Il apparaît 5 phases dans le développement des cultures en milieu contenant de l'asparagine. Chaque phase est caractérisée par une intensité de croissance particulière, principalement en présence de saccharose. En milieu nitraté, la croissance présente les 3 phases habituelles. Le pH ne présente pas de variations significatives, si ce n'est une tendance à l'alcalinisation en milieu nitraté.

8. Un milieu minimum assurant une croissance optimale est proposé pour la culture de *G. graminis*. Ce milieu contient: glucose 2%, KNO_3 0,15%, KH_2PO_4 0,15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05%, Cl_3Fe , oligo-éléments, aneurine 200 γ /l et biotine 5 γ /l.

Zusammenfassung

Ernährungsphysiologische Untersuchungen an einem Stamm von *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx et Olivier (= *Ophiobolus graminis* Sacc. = *Linocarpon cariceti* B. et Br.), dem Haupterreger der Getreidefusskrankheit, in flüssigen, synthetischen Medien haben im wesentlichen zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Der optimale pH-Wert für das Wachstum liegt um 5,5 (Medium mit Saccharose und Asparagin).

2. Aneurin ist für die Entwicklung von *G. graminis* unerlässlich, im Gegensatz zu Biotin (Prüfung an 4 Stämmen), welches jedoch eine Wachstumsverstärkung bewirkt (ausgenommen im Nitrat-Medium).

3. Unter 23 Kohlenstoffquellen erweisen sich die folgenden als die besten: im Asparagin-Medium: Dextrin, Stärke, Cellobiose, Xylose, Fruktose und Maltose; im Nitrat-Medium: Dextrin und Stärke. In beiden

Fällen sind Saccharose und Glukose Quellen von mässigem Nährwert (in Gegenwart von KNO_3 ist jedoch die Glukose der Fruktose überlegen), während verschiedene Natriumsalze organischer Säuren (worunter das Acetat) ferner Sorbose, Glyzerol und Inulin die Entwicklung von *G. graminis* nicht zu gewährleisten vermögen.

4. In Gegenwart von Asparagin oder KNO_3 beträgt die Glukosekonzentration, bei der noch ein minimales Wachstum stattfindet, 0,2%. Für ein optimales Wachstum beträgt die Glukosekonzentration in Gegenwart von Asparagin 0,75–4%, in Gegenwart von KNO_3 um 4%. Mit 10% Glukose wird eine Wachstumsdepression nur in 0,1%igem Asparagin-Medium festgestellt.

5. Von 21 Stickstoffquellen, worunter 16 Aminosäuren, die in einer Konzentration von 0,212 g Stickstoff pro Liter untersucht werden, ist L-Arginin in saccharosehaltigem Medium die beste, dann folgen L-Asparagin, Glyzin und Ammoniumtartrat. KNO_3 ist eine mässig gute, aber genügende Quelle. *G. graminis* scheint das NH_4 -Ion besser aufzunehmen als das NO_3 -Ion. Schlecht assimiliert werden: L-Cystein, L-Methionin, DL-Phenylalanin, D-Threonin und L-Tyrosin.

6. Die optimalen Konzentrationen der 3 folgenden Stickstoffquellen sind: 0,1% für KNO_3 (Prüfungen in saccharosehaltigem Medium und an 2 Stämmen in glukosehaltigem Medium); 0,8% für Glyzin (mit Glukose) und 1% für Asparagin (mit Glukose). Glyzin «spart» den Stickstoff weniger gut als Asparagin und KNO_3 .

7. Die Wirkung von 4 Medien (Glukose oder Saccharose und KNO_3 oder Asparagin) auf den Wachstumsverlauf und die Änderungen der pH-Werte wird während mehr als 60 Tagen studiert. In den Kulturen mit asparaginhaltigem Nährsubstrat zeichnen sich 5 Entwicklungsphasen ab. Eine besondere Wachstumstärke charakterisiert jede Phase, hauptsächlich in Gegenwart von Saccharose. In nitrathaltigem Medium zeigt das Wachstum die 3 gewöhnlichen Phasen. Das pH zeigt keine signifikanten Änderungen, ausser einer Tendenz des Zunehmens in nitrathaltigem Medium.

8. Es wird für die Kultur von *G. graminis* ein minimales Medium vorgeschlagen, das ein optimales Wachstum gewährleistet. Dieses Medium enthält: Glukose 2%, KNO_3 0,15%, KH_2PO_4 0,15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05%, Cl_3Fe , Oligoelemente, Aneurin 200 γ /l und Biotin 5 γ /l.

Summary

Researches in synthetic liquid medium on the nutritional physiology of one strain of *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx et Olivier (= *Ophiobolus graminis* Sacc. = *Linocarpon cariceti* B. et Br.), the principal agent of the take-all of the cereals, have resulted in the following important points:

1. The optimal pH for growth is near 5.5 (sucrose—asparagine medium).

2. Thiamine is necessary for the development of *G. graminis*, unlike biotin (verified with four strains) which increases the growth (except in nitrate medium).

3. Among 23 carbon sources, the best are dextrin, starch, cellobiose, xylose, fructose and maltose in asparagine medium, and dextrin and starch in nitrate medium. In both cases, sucrose and glucose are sources of average nutritive value. Glucose is more useful than fructose in presence of KNO_3 . Several sodium salts of organic acids (such as acetate), sorbose, glycerol and inulin are unable to assure the development of *G. graminis*.

4. In asparagine or KNO_3 medium, the glucose concentration assuring a minimal growth is 0.2%, while an optimal development is guaranteed by glucose concentrations of 0.75%–4% with asparagine, and approximately 4% with KNO_3 . At 10% glucose, a growth depression is found in asparagine (0.1%) medium.

5. Among 21 nitrogen sources studied at a concentration of 0.212 g/l nitrogen, L-arginine is the best of 16 amino acids, in sucrose medium, followed by L-asparagine, glycine and ammonium tartrate. KNO_3 is a moderate but satisfactory source. *G. graminis* appears to assimilate NH_4^+ better than NO_3^- . L-cysteine, L-methionine, DL-phenylalanine, D-threonine and L-tyrosine are poorly assimilated by *G. graminis*.

6. The optimal concentrations of three nitrogen sources are 0.15% for KNO_3 (verified with sucrose, and with two strains in glucose medium), 0.8% for glycine (glucose medium) and 1% for asparagine (glucose medium). Glycine is less efficient as a nitrogen source than asparagine or KNO_3 .

7. The effect of 4 media (glucose or sucrose and KNO_3 or asparagine) on growth and development as well on the variation of pH were studied at short intervals during more than 60 days. Five phases appeared in the development of the cultures in asparagine media. Each phase is characterized by individual growth rates, especially in presence of sucrose. In

nitrate media, the growth presents the three usual phases. The pH presents no significant variations, other than a tendency to the alcalinization in nitrate media.

8. A minimal medium, which assures an optimal growth, is proposed for the culture of *G. graminis*. This medium contains: glucose 2%, KNO_3 0.15%, KH_2PO_4 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.05%, FeCl_3 , trace elements, thiamine 200 γ /l and biotin 5 γ /l.

Bibliographie

- von Arx J.A. et D.L.Olivier 1952. The taxonomy of *Ophiobolus graminis* Sacc. Trans. brit. mycol. Soc. **55**, 29–33.
- Beadle G.W. et E.L.Tatum 1945. Neurospora. 11. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. Amer. J. Bot. **32**, 678–686.
- Bhargava K.S. 1945. Physiological studies on some members of family Saprolegniaceae. IV. Carbohydrates requirements. Lloydia **8**, 60–68.
- Blumer S. 1937. Untersuchungen über die Biologie von *Ustilago violacea* (Pers.) Fuck. I. Mitteil. Arch. Mikrobiol. **8**, 458–478.
- et W.H.Schopfer 1940. Beiträge zur Biologie und Wirkstoffphysiologie von *Ustilago scabiosae* (Sowerby) Winter. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **50**, 248–272.
- Butler E.T., W.J.Robbins et B.O.Dodge 1941. Biotin and the growth of *Neurospora*. Science **94**, 262–263.
- Cantino E.C. 1949. The growth and nutrition of Pythiogeton. Amer. J. Bot. **36**, 747–756.
- Chadefaud M. 1960. Traité de botanique systématique (av. L.Emberger), tome 1: Les Végétaux non vasculaires. 1018 p. Masson & C^{ie}, Paris.
- Cochrane V.W. 1958. Physiology of fungi. 524 p. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Crasemann J.M. 1954. The nutrition of Chytridium and Macrochytrium. Amer. J. Bot. **41**, 302–310.
- Davis R.J. 1925. Studies on *Ophiobolus graminis* Sacc. the take-all disease of wheat. J. agric. Res. **31**, 801–827.
- Fellows H. 1936. Nitrogen utilization by *Ophiobolus graminis*. J. agric. Res. **53**, 765–769.
- Fergus C.L. 1952. Mycologia **44**, 183–189, selon Cochrane 1958.
- Flück V. 1955. Untersuchungen über die Pathogenität von Erregergemischen bei Getreidefusskrankheiten. Phytopath. Zschr. **23**, 177–208.
- Garrett S.D. 1940. Utilization of nitrogen by *Ophiobolus graminis*. Nature **145**, 3664.
- Gilpatrick J.D. et A.W.Henry 1949. The effect of nutritional factors on the development of *Ophiobolus graminis* Sacc. Proc. canad. phytopath. Soc. **17**, 14.
- Hale M.G. et C.W.Roane 1961. The nutrition of Helminthosporium carbonum race 1 in relation to parasitism of corn. Phytopathology **51**, 235–240.
- Henry A.W. et R.McKenzie 1959. Note on the comparative activity of monosporous and mycelial isolates of *Ophiobolus graminis* Sacc. from the same source as wheat pathogens in natural and sterilized soil. Canad. J. Plant Sci. **39**, 405–407.
- Ishizu K. 1954. The utilization of asparagine by the rice-blast fungus. Yamaguchi J. Sci. **5**, 49–55. Dans Chem. Abstr. **48**, 12873, 1954.
- Jermyn M.A. 1953. Austr. J. biol. Sci. **6**, 48–69, selon Cochrane 1958.

- Kirby R.S. 1922. The take-all disease of cereals and grasses. *Phytopathology* **12**, 66–68.
- Krebs J. 1933. Der Einfluss der Bodentemperatur auf die Infektion von Weizenkeimlingen durch *Ophiobolus graminis*. *Schweiz. landw. Monatsh.* **11**, 285–291.
- Landman O.Z. 1954. Neurospora lactase. 11. Enzyme formation in the standard strain. *Arch. Biochem. Biophys.* **52**, 93–109.
- Langeron M. 1945. Précis de mycologie, 674 p. Collection des Précis Médicaux, Masson & C^{ie}, Paris.
- Leaphart C.D. 1956. *Mycologia* **48**, 25–40, selon Cochrane 1958.
- Lemaire J.M. et J. Ponchet 1963. *Philaphora radiculicola* Cain, forme conidienne du *Lino-carpon cariceti* B. et Br. *Compt. rend. Acad. Agric. France*, 16 octobre, 1067–1069.
- Leonian L.H. et V.G. Lilly 1940. Studies on the nutrition of fungi. IV. Factors influencing the growth of some thiamin-requiring fungi. *Amer. J. Bot.* **27**, 18–26.
- Lilly V.G. et H.L. Barnett 1951. *Physiology of the fungi*, 464 p. First edition, McGraw-Hill Book Company, Inc.
- Malca I. et A.J. Ullstrup 1962. Effect of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of two species of *Helminthosporium*. *Bull. Torrey bot. Club* **89**, 240–249.
- Margolin A.S. 1942. The effect of various carbohydrates upon the growth of some fungi. Thesis. West Virginia University.
- McBeth I.G. et F.M. Scales 1913. U.S. Dept. Agric. Bur. Plant Ind. Bull. **266**, 1–52, selon Cochrane 1958.
- Moore E.J. 1937. Carbon and oxygen requirements of root-rot organism *Phymatotrichum omnivorum* in culture. *Phytopathology* **27**, 918.
- Nobles M.K. 1948. Studies in forest pathology. VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Canad. J. Res., Sec. C* **26**, 281–431.
- Nord F.F. et J.C. Vitucci 1947. On the mechanism of enzyme action. XXX. The formation of methyl-p-methoxycinnamate by the action of *Lentinus lepideus* on glucose and xylose. *Arch. Biochem.* **14**, 243–247.
- Norkrans B. 1950. Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*. *Symbol. Bot. Upsal.* **XI**, 1, 2–126.
- Otani H. 1952. *Ann. phytopath. Soc. Japan* **27**, 9–15, selon Cochrane 1958.
- Padwick G.W. 1936. Biologic strains of *Ophiobolus graminis* Sacc. *Ann. appl. Biol.* **23**, 45–56.
- Pelletier R.L. et G.W. Keitt 1954. *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. VI. Amino acids as sources of nitrogen. *Amer. J. Bot.* **41**, 362–371.
- Plasman A. 1954. Note sur deux techniques d'inoculation de plantules de froment avec *Ophiobolus graminis* et application de l'une d'elles à un test de sensibilité de lignées de froment de printemps. *Parasitica* **X**, 43–50.
- Russel R.C. 1934. Studies of take-all and its causal organism, *Ophiobolus graminis* Sacc. *Canad. Dept. Agric. Bull.* **170**, 4–64.
- Sarbhoy A.K. 1962. Nutritional studies on six members of the Mucorales. 1. Utilization of carbohydrates. *Phyton, Argentine*, **19**, 59–64.
- 1963. Nutritional studies on some members of the Mucorales. 111. Utilization of mixtures of different amino acids. *Lloydia* **26**, 236–242.
- 1964. Nutritional studies on six members of the Mucorales. 11. 1. Utilization of oligo- and polysaccharides. *Path. microbiol.* **27**, 216–224.
- Scheuring L. et C. Zehender 1962. Untersuchungen zur Stoffwechselphysiologie des «Abwasserpilzes» *Fusarium aquaeductum* Lagh. Verwertung von Kohlenhydraten *Schw. Zschr. Hydrol.* **XXIV**, 152–171.

- Schmidt H. 1962. Antagonistische Beziehungen zwischen Actinomyceten und *Ophiobolus graminis* Sacc. und deren Bedeutung für die Schutzwirkung. Dissertation. Inst. Phytopath. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Siegle H. 1961. Über Mischinfektionen mit *Ophiobolus graminis* und *Didymella exitialis*. Phytopath. Zschr. 42, 305–348.
- Steinberg R.A. 1942. The process of amino acids formation from sugars by *Aspergillus niger*. J. agric. Res. 64, 615–633.
- Stockdale P. 1953. Requirements for the growth and sporulation of *Trichophyton persicolor*. J. gen. Microbiol. 8, 434–441.
- Tamiya H. 1932. Über die Verwendbarkeit von verschiedenen Kohlenstoffverbindungen im Bau- und Betreibstoffwechsel der Schimmelpilze. Studien über die Stoffwechselphysiologie von *Aspergillus oryzae*. Acta Phytochim. 6, 1–129.
- Tandon R.N. 1962. Physiological studies on some pathogenic fungi. U.P. sci. Res. Commit. monographs, 80 p.
- Togashi K. 1949. Biological characters of plant pathogens. Temperature relations. Meibundo, 478.
- Turner E.M. 1959. The effect of some amino acids on the growth of two varieties of *Ophiobolus graminis*. J. gen. Microbiol. 16, 531–533.
- Volkonsky M. 1934. Sur la nutrition de quelques champignons saprophytes et parasites. Ann. Inst. Pasteur 52, 76–101.
- Ward E.W.B. 1961. The vitamin requirements of *Ophiobolus graminis*. Canad. J. Microbiol. 7, 423–425.
- Webb R.W. et H.Fellows 1926. The growth of *Ophiobolus graminis* Sacc. in relation to hydrogen-ion concentration. J. agric. Res. 33, 845–872.
- Weste G. et L.B.Thrower 1963. Production of perithecia and microconidia in culture by *Ophiobolus graminis*. Phytopathology 53, 354.
- Westergaard M. et H.K.Mitchell 1947. Neurospora. V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. Amer. J. Bot. 34, 573–577.
- White N.H. 1941. Physiological studies of the fungus *Ophiobolus graminis* Sacc. 1. Growth factors requirements (thiamin, biotin). J. Counc. sci. ind. Res. Austr. 14, 137–146.
- 1943. Physiological studies of the fungus *Ophiobolus graminis* Sacc. 11. The effect of biotin and thiamin on the growth of fungi isolated from the lesioned roots of take-all affected wheat. J. austr. Inst. agric. Sci. 9, 36.
- et G.A.McIntyre 1943. The pathogenicity of single spore isolates of *Ophiobolus graminis* under field conditions. J. Counc. sci. ind. Res. Austr. 16, 93–94.
- White W.L., R.G.H.Siu et E.T.Reese 1948. Bull. Torrey bot. Club 75, 604–632, selon Cochrane 1958.
- Winter A.G. 1944. Der Einfluss partieller Sterilisation des Bodens auf die Entwicklung der Laufhyphen von *Ophiobolus graminis*. Phytopath. Zschr. 14, 204–302.
- Yu-Sun C.C.C. 1964. Nutritional studies of *Ascobolus immersus*. Amer. J. Bot. 51, 231 à 237.
- Zehender C. et A.Böck 1964. Wachstums- und Ernährungsbedingungen des Abwasserpilzes *Leptomitus lacteus* Ag. Ihre Bedeutung für sein Massenvorkommen in Vorflutern von Zellstoffabriken. Zentralbl. Bakt., 11. Abt., 117, 399–411.
- Zogg H. 1957. Studien über die biologische Bodenentseuchung. 1. Einfluss der Bodenmikroflora auf *Ophiobolus graminis* Sacc. (Methodik). Phytopath. Zschr. 30, 315 à 326.