CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU ROUGE CRYPTOLOGAMIQUE DU PIN SYLVESTRE DÛ AU *LOPHODERMIIUM* *PINASTRI* (SCHRAD) CHEV.

GERMINATION DES ASCOSPORES

L. LANIER

*Laboratoire de Pathologie,
Centre national de Recherches forestières, 54-Nancy
Institut national de la Recherche agronomique*

SOMMAIRE

Après projection sur un milieu gélosé, les ascospores du *Lophodermium pinastri* sont placées dans différentes conditions expérimentales faisant varier les facteurs physiques (température et humidité).

En même temps, des observations sont effectuées sur le caractère impérativement aérobie de la germination ; différents types de spores sont définis selon la forme de leur germination.

INTRODUCTION

Les spores du *Lophodermium pinastri* (SCHRAD) CHEV. présentent des caractéristiques qui permettent de les classer dans le groupe des Xénospores selon la nomenclature récente de GREGORY (1966) : chaque spore est formée d'une fraction délimitée du thalle, spécialisée dans la dispersion depuis le lieu d'origine — en l'occurrence l'asque dans l'hystérothécie —, à cloison mince, à survie limitée et germant habituellement bien lorsque les conditions lui sont favorables. L'originalité des spores du *L. pinastri* réside essentiellement dans leur forme effilée ($80 \mu \times 2,5 \mu$), dans la gaine mucila-

gineuse qui revêt leur paroi et dans les variations considérables du taux et des formes de la germination selon des conditions à la fois intrinsèques et externes.

Nous nous proposons d'analyser ici certains points de cette biologie particulière.

1. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. — Dispositifs

La dispersion des ascospores du *L. pinastri* se produit dans la nature selon un rite précis⁽¹⁾ exigeant une succession de conditions particulières et qui se résume en une projection à une hauteur ne dépassant pas 2 à 3 mm au-dessus des hystérothécies. Les ascospores peuvent alors être prises en charge par les courants aériens et déposées sur les supports les plus variés ; elles se fixent sur ceux-ci grâce à leur gaine mucilagineuse. Une fois qu'elles sont fixées, on ne peut que difficilement les transporter sans les léser ; aussi avons-nous choisi, pour l'essentiel de nos études sur les spores, une technique inspirée des travaux déjà anciens de HAACK (1911) et de Von TUBEUF (1913), reprise plus récemment par LANGNER (1933) et SCHÜTT (1960).

Des aiguilles de Pin portant des hystérothécies développées sont disposées après nettoyage préalable en surface⁽²⁾ à la face inférieure du couvercle de boîtes de Pétri. Elles sont soit fixées avec deux petits fragments de ruban adhésif, soit glissées dans les fentes d'un papier filtre stérile humidifié à l'eau stérile si l'on veut un état hygrométrique de 100 % (fig. 1 et 2). Les boîtes de Pétri sont remplies d'environ 10 cm³ de milieu au malt gélosé qui a les avantages suivants :

1. il peut être observé par transparence,
2. il permet des germinations rapides en période favorable,
3. il autorise des prélèvements aisés pour repiquages sans léser les spores, si l'on emporte un petit fragment de milieu sous-jacent.

FIG. 1 et 2. — Schémas des dispositifs-type utilisés pour la projection des ascospores.

A. Aiguille portant les hystérothécies mûres H, fixée au couvercle d'une boîte de Pétri de 11 cm par du ruban adhésif S ou glissée dans des fentes d'un papier filtre stérilisé humide PF.

Les ascospores se projettent sur le milieu gélosé au malt M.

(1) Décrit en détail dans une autre partie de la même étude.

(2) Une étude préliminaire a montré que le trempage dans une solution d'Hg Cl₂ à 0,1 % suivi de deux rinçages à l'eau de conduite et d'un rinçage à l'eau distillée éliminait la flore de surface sans diminuer le pouvoir germinatif des ascospores de *L. pinastri*.

De plus, il simule assez bien les conditions naturelles lorsqu'on laisse s'établir l'équilibre entre l'atmosphère qui le surmonte et les atmosphères où l'état hygrométrique est artificiellement fixé, c'est-à-dire qu'il autorise certains échanges — portant sur l'eau et les matières nutritives — tout en les ralentissant.

Une fois les spores projetées, on peut les étudier en masse dans leur boîte ou par petits groupes dans les différentes conditions que l'on veut leur faire subir.

Les techniques particulières seront décrites au cours de l'étude.

1.2. — Taux de germination — Définition

Le taux de germination est le plus souvent exprimé par les différents auteurs en pour cent du nombre de spores figurant dans un champ de microscope ou dans des fractions calibrées de ce champ. C'est d'ailleurs le seul point sur lequel ils s'accordent car les pourcentages indiqués varient considérablement. Pour RACK (1963), le taux varie de 0 à 38 % avec un maximum en octobre et cet auteur considère un pourcentage de 44 % sur une récolte comme exceptionnel. SCHÜTT (1960) donne le chiffre minimum de 0,05 % d'avril à juillet et n'indique pas de pourcentage maximum. HAACK (1911) note également des différences considérables dans le taux de germination selon l'origine des spores et les conditions externes mais ne fournit pas de pourcentage. LANGNER (1933) projetant les spores sur un milieu au malt gélosé à 0,3 % d'acide citrique affirme qu'après 5 jours *toutes* les spores ont commencé à germer. BOYCE Jr (1951) obtient des taux variables selon les essais avec un maximum de 24 % dans les meilleures conditions.

Il est probable que ces différences sont dues pour une part aux interactions entre spores qui se gênent manifestement au cours de la germination si elles sont projetées en masse. Dans ce cas, même si les débuts de germination intéressent parfois plus de 80 % des spores, la proportion de celles qui conduisent à un développement important est bien inférieure.

D'autre part il y a une certaine ambiguïté dans la définition de ce que chaque auteur entend par germination. Seul BOYCE Jr l'a définie en disant qu'il appelle spore germée toute spore ayant un tube germinatif aussi long que la largeur de la spore. Si l'on admet cette définition, pratiquement toute spore de *Lophodermium* qui commence à germer doit être considérée comme germée, compte tenu de sa largeur, qui même en incluant la gaine ne dépasse guère 3 à 4 μ .

Nous avons préféré considérer comme germée toute spore dont la longueur du tube germinatif ou la somme des longueurs des tubes germinatifs, lorsqu'ils sont plusieurs, était supérieure à la longueur de la spore (de l'ordre de 80 à 100 μ). On peut en effet supposer qu'à partir de ce stade, les échecs de la spore à perpétuer son espèce ne lui sont plus imputables mais sont dus à des conditions externes défavorables.

2. — RÉSULTATS

2.1. — Variations du taux de germination

2.11. Avec la température (fig. 3)

Les spores sont mises à projeter dans l'eau stérile à partir d'aiguilles fixées à des boîtes de Pétri, suivant la figure 1, et portées rapidement par pipetage sur d'autres boîtes de Pétri contenant le milieu au malt gélosé (5 répétitions à chaque fois). On s'arrange pour qu'un champ de microscope comporte une dizaine de spores bien séparées les unes des autres et les comptages sont faits sur 100 spores par boîte. Le taux de germination est jugé après 3 jours.

Une première série d'expériences porte sur les gammes 10 à 30°, de 5 en 5°, puis la zone qui semble optima est serrée par fraction de 2 en 2°. La figure 3 résume les résultats obtenus : l'optimum de température se situe vers 20°, c'est-à-dire à une

température fréquemment observée aux époques de dissémination (fin juillet à octobre).

FIG. 3. — Variations du taux de germination avec la température (explications dans le texte).

2.12. Avec l'état hygrométrique

Des appareillages plus ou moins complexes sont proposés au pathologiste pour réaliser des conditions expérimentales faisant varier l'état hygrométrique mais aucun ne réalise pratiquement ce qui se produit dans les conditions naturelles. On peut en effet, moyennant la précaution de laisser s'installer l'équilibre entre une solution saline et l'atmosphère, garantir l'état hygrométrique de l'air qui voisine une spore. Mais comment réaliser le support et toute son action à la fois sur la spore et l'air qui

FIG. 4. — Schéma du dispositif utilisé pour l'étude de l'influence de l'état hygrométrique.

Les ascospores *Sp* sont déposées sur milieu gélosé *M* dans une boîte de Pétri de 11 cm de diamètre BP 11. Cette enceinte est elle-même posée sur un support *Su* au-dessus d'une solution de sel *Ss* à l'intérieur d'une boîte de Pétri de 15 cm de diamètre BP 15, fermée hermétiquement par un anneau de mastic *Am* étanche.

l'entoure ? Le végétal respire et transpire tout près de cette spore et entretient ce que l'on pourrait appeler la « phylloatmosphère », différente de l'atmosphère plus lointaine.

On peut néanmoins expérimenter, compte tenu de ces réserves, et nous avons choisi pour cela une méthode inspirée de recherches en Entomologie (QUEDNAU, 1957) (fig. 4). Nous avons obtenu tant au Canada où dès l'abord la question de l'état hygrométrique nous a paru fondamentale, qu'en France, des résultats reproductibles, que résume le tableau 1.

TABLEAU 1
*Influence de l'état hygrométrique sur la germination
des ascospores de Lophodermium pinastri*

Solution saturée utilisée	Degré hygro- métrique en % à 25°	$\begin{matrix} a \\ \text{Projections de} \end{matrix}$		$\begin{matrix} b \\ \text{spores} \end{matrix}$		$\Sigma L = \% \text{ germination}$					Observations
		24 h	48 h	4 j	8 j	15 j					
1	2	3	4	5	6	7	8	9			
K ₂ SO ₄	95	80	6	0,5	30	95	98	*	* contamination par bactéries et levures.		
KCl	82	39	17	début de germination partout	25	80	90	*	id.		
NaCl	78	40	17		17,5	85	85	85	Longueur des tubes germinatifs stabilisée et plus faible que dans les deux premiers cas.		
NH ₄ NO ₃	67	23	16		22,1	66	66	66**	** pas de lyse bactérienne.		
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	50	23	46		5	60	60	60	Tubes germinatifs grêles.		
MgCl ₂ , 6H ₂ O	35	15	22	0	0	0	0				
CH ₃ COOK	20	33	85	0	2	2	2	2 à 3	Tubes très grêles		

Les résultats des colonnes 3 à 9 correspondent aux moyennes de 5 répétitions.

a) On compte le nombre de spores projetées après 24 h sur une surface constante. Echantillonnage pratique sur le dixième de la surface des boîtes de Pétri.

b) Après 24 h, on place certaines boîtes de Pétri dans une atmosphère saturée d'eau. Après 48 h, on procède au même échantillonnage que précédemment.

Ces essais montrent qu'on a encore un taux de germination élevé à 50 % de degré hygrométrique, alors qu'en dessous les germinations sont exceptionnelles.

2.13. Avec l'époque de l'année.

A partir de la période habituellement dangereuse, c'est-à-dire sous nos climats vers le mois de juillet, notre laboratoire fonctionne comme un dispositif d'avertissements agricoles. Nous recevons chaque semaine des aiguilles récoltées sur des tamis en forêt (LANIER, 1968) et parmi celles-ci, une certaine proportion porte des hystérothécies mûres. On provoque la projection des spores, le pourcentage de germination est observé après 48 h.

En accord avec certains résultats obtenus par RACK (1963), nous constatons en France *chaque année* une *brusque* augmentation du pouvoir germinatif qui se situe vers la *mi-juillet*.

Ainsi en 1966, le 16 juillet nous obtenions 8 % de pouvoir germinatif, le 18 juillet, 73 % et le 28 juillet, 90 %. Les pouvoirs germinatifs élevés se maintiennent jusque début novembre ; en décembre on a des difficultés à obtenir des projections.

En 1967, la progression s'est réalisée d'une façon tout à fait analogue avec des pourcentages de germination très faibles (moins de 5 %) les 19 juin, 23 juin et 3 juillet, puis de 5 % le 7 juillet, de 56 % le 17, de 68 % le 28, de 73 % le 3 août et encore de 53 % le 18 octobre et de 25 % le 22 novembre.

Bien entendu, ces chiffres ont une valeur surtout indicative car les conditions de température et d'état hygrométrique qui étaient celles du laboratoire au moment des mesures n'étaient pas contrôlées de façon très précise. Le but de ces essais est en effet de définir la période à partir de laquelle le taux de germination augmente brusquement de façon à pouvoir lancer l'ordre de traitement ; celui-ci s'effectue en 2 ou 3 fois, à intervalles de trois semaines, et couvre donc la période dangereuse.

2.2. — *Types de germination*

Les résultats présentés (fig. 5) concernent les différentes formes que peut prendre la germination selon, semble-t-il, l'origine des spores, l'époque de l'année et les conditions externes.

On peut distinguer trois types principaux de germination :

1. la spore émet un ou plusieurs tubes germatifs (jusqu'à 5) ayant sensiblement le même diamètre que la spore ; ils sont donc fins mais actifs, atteignant rapidement la longueur de la spore, en moins de 24 h après la projection, dans les meilleures conditions ;

2. après une période d'une douzaine d'heures sans réaction, la spore donne naissance le plus souvent au voisinage de son milieu à une sorte d'ampoule réfringente d'où naît un mycélium assez fort (3 à 5 μ), souvent granuleux ; les ramifications donnent ensuite un mycélium fin du type 1 ;

3. après une certaine période sans activité, la spore donne naissance à une formation — que SCHÜTT (1960) appelle en « marteau » — granuleuse, qui cesse bientôt tout développement.

On peut trouver les trois types de germination dans la même projection, mais dans la période de juillet à octobre et à partir des aiguilles dont les hystérothécies sont jeunes, on trouvera une proportion de 80 % du type 1, 15 % du type 2 et 5 % dont la germination s'arrête. Le type 3 atteindra des proportions de 60 à plus de 90 % sur des ascospores projetées à partir de vieilles hystérothécies et en particulier dans la période d'avril à juillet.

FIG. 5. — Types de germination.

Ceci peut expliquer que les pourcentages de germination indiqués par certains auteurs sont particulièrement faibles s'ils se sont adressés à ce type de spores. JONES (1935) en avait conclu qu'il était impossible d'obtenir le *L. pinastri* en culture pure, étant donné que les ascospores cessaient rapidement leur développement. Il est en fait relativement facile d'obtenir des cultures à partir d'ascospores à condition de s'adresser aux germinations de type 1 ou 2.

3. — DISCUSSION

Les résultats montrent que si l'on s'adresse à un même type de spores, température et état hygrométrique jouent un rôle fondamental dans la germination des ascospores du *L. pinastri*.

Si la température peut varier de 15 à 25°, en permettant un taux de germination de plus de 40 %, elle peut être un facteur limitant dans les zones froides et expliquer la faible importance du *L. pinastri* en haute montagne et dans les pays très septentrionaux. Il en est de même dans les zones constamment chaudes et le *L. pinastri* n'est pas un parasite sérieux sur les pins à deux feuilles des régions intertropicales.

Là où les températures estivales sont moyennes et assurent une bonne germination, l'état hygrométrique est le facteur limitant le plus net. Pour COCHRANE (1960), le système statique, que nous avons utilisé, dans lequel les spores sont mises à incuber dans un récipient clos au-dessus de solutions régularisant l'humidité, est plus sûr que d'autres systèmes réglant l'humidité par courants d'air. Ainsi nous avons pu montrer au Québec que l'on pouvait aisément obtenir des infections comme en Europe à condition d'enfermer des aiguilles portant des hystérothécies mûres dans des sacs plastiques humides entourant des rameaux entiers, alors que des rameaux témoins restaient sains. Ceci montre que le pouvoir pathogène du *L. pinastri* est étroitement lié aux conditions de l'hygrométrie. Des relevés météorologiques nous ont révélé qu'au Québec les périodes de plus de 48 h pendant lesquelles le degré hygrométrique restait supérieur à 66 % (limite du tableau 1 pour avoir des tubes germinatifs vigoureux), étaient très rares dans le courant de l'été. Ainsi les ascospores projetées ne trouvent qu'exceptionnellement les conditions nécessaires pour réaliser l'infection.

Un autre facteur très important, difficile à étudier quantitativement, est l'oxygène. Les spores ne germent pas en condition anaérobie, en suspension dans l'eau par exemple, au contraire elles y sont rapidement lysées, en 24 h d'après les observations de SCHÜTT (1967), en 36 h d'après nos observations. Elles germent très mal sur milieu sec, sur lame de microscope par exemple ou sur des aiguilles de pins non humectées. Ainsi BOYCE Jr (1951) a obtenu des pourcentages de germination très faibles même en atmosphère voisine de la saturation (tableau 2).

TABLEAU 2

	Nombre de spores utilisées		Pourcentage de spores germées	
Dans l'eau 100 %	4 111		6,3	
Solutions d'acide sulfurique sur support sec.				
98	1 236		4,9	
95	1 353		1,9	
90	1 480		1,0	
81	1 426		0,4	
70	1 481		0,9	
58	1 362		0,4

FIG. 6. — *Aspect d'une projection sur malt-agar*

FIG. 7. — *Germination après 18 heures. Ascospores de type 1.*

FIG. 8. — Germination avancée après 3 jours.
En a, germination avortée de type 3.

FIG. 9. — Germination après 18 heures. Ascospores de type 2.

FIG. 10. — *Influence d'un film liquide sur la germination.*

En haut, spores en début de germination après 24 heures. En bas, séparées par la ligne *L*, spores bien germées dans un film d'eau.

La germination la plus rapide est obtenue (fig. 10) sur support recouvert d'une mince couche liquide.

Le phénomène est lié au rôle très important de la gaine mucilagineuse qui entoure la spore. Pressée à la sortie de l'asque, la gaine perd son eau, continue à se dessécher au cours du vol de la spore, ce qui contribue à alléger cette dernière ; la gaine aide ensuite à sa fixation sur le support et si celui-ci est humide, elle gonfle à nouveau comme une éponge ainsi que le montrent les halos entourant les spores viables en germination. Il est probable qu'elle fournit à la spore des substances enzymatiques accélérant la germination ; si elle reste sèche (fig. 10) les spores germent mal.

CONCLUSION

D'après les résultats de nos observations et la discussion, on peut définir les conditions les meilleures pour la germination, qui représente le stade le plus délicat du cycle biologique du *L. pinastri* :

- température aux environs de 20°,
- état hygrométrique au voisinage de la saturation,
- support couvert d'un mince film liquide,
- période de l'année, de juillet à octobre, et spore provenant d'une hytsérothécie mûre, récemment formée.

Ces définitions, complétées par des études au piège à spores qui préciseront les conditions de la dissémination, permettent de cerner étroitement l'époque où il faudra déposer sur le pin un film anticryptogamique avec les meilleures chances de succès.

Reçu pour publication en mars 1968

SUMMARY

ELEMENTS FOR A STUDY ON *Lophodermium pinastri*
(SCHRAD) CHEV., SCOT PINE DISEASE : GERMINATION OF ASCOSPORES

The germination of the ascospores in the species *Lophodermium pinastri* appears to be an irregular phenomenon. It is the aim of this study to describe the optimum of some physical factors (temperature and moisture) and the reasons for irregular germination.

For this purpose the ascospores are thrown into Petri dishes on a nutrient-medium, then put in incubators at different temperatures or kept in enclosed spaces wide Petri dishes in which humidity is maintained by a saturated saline solution.

The results thus obtained allow us to determine the optimum temperature (20 °C) and humidity (90-95 %).

Other conditions are required for a quick and active germination : the presence of a liquid film on the supporting surface and a favorable biological state of the ascospore itself.

When all these conditions are fulfilled, germination rates of over 80 % can be obtained in less than 24 hours.

ZUSAMMENFASSUNG

BEITRAG ZU DEN STUDIEN ÜBER DIE KIEFERNSCHÜTTE : *Lophodermium pinastri*
(SCHRAD) CHEV. — KEIMUNG DER SPOREN

Die Keimung der Ascosporen von *Lophodermium pinastri* ist sehr komplexer Natur. Die vorliegende Untersuchung hat zum Ziel, das Optimum verschiedener physischer Faktoren (Temperatur, Feuchtigkeit) und die Ursachen der Unregelmässigkeiten der Keimung zu definieren.

Zu diesem Zwecke wurde eine Nährlösung in Petrischalen mit Ascosporen beimpft und in Brut-schränken bei verschiedenen Temperaturen oder in Kästen, in denen die Feuchtigkeit mit Hilfe von gesättigten Salzlösungen konstant gehalten wurde, aufbewahrt.

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben, ein Temperaturoptimum von 20° C und ein Feuchtigkeitsoptimum von 90-95 % zu definieren.

Um eine rasche und aktive Keimung zu erzielen sind jedoch zusätzliche Bedingungen erforderlich und zwar das Vorhandensein eines Flüssigkeitsfilms auf der Empfänger Oberfläche und ein günstiger biologischer Zustand der Ascosporen. Sind alle diese Bedingungen vereint, so kann ein Keimprozent von über 80 % in weniger als 24 Stunden erzielt werden.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOYCE J.S. Jr, 1951. *Lophodermium pinastri* and needle browning of Southern Pines. *J. Forest.*, **49**, 20-24.
- GREGORY P.H., 1966. The fungous spore : what it is and what it does. *8th Symp. Colston Res. Soc.*, March 28 th-Apr. 1st, 1966, 14 pp.
- HAACK O., 1911. Der Schüttepilz der Kiefer. *Z. Forst-u. Jagdw.*, **43**, 329-357, 402-423, 481-501.
- JONES S.G., 1935. The structure of *Lophodermium pinastri* (Schräd.) Chev. *Ann. Bot.*, **49**, 196, 699-728.
- LANIER L., 1968. Contribution à l'étude du Rouge cryptogamique du Pin sylvestre dû au *Lophodermium pinastri* (Schräd.) Chev. Etude phénologique sur la chute des aiguilles et sur la maturation des hystérothécies. *Ann. Sci. forest.*, 1968, 25 (2).

- LANGNER W., 1933. Über die Schüttekrankheit der Kiefernadeln (*P. silvestris* und *P. strobus*). *Phytopathol. Z.*, **6**, 625-640.
- QUEDNAU W., 1957. Über den Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf den Eiparasiten *Trichogramma cacoeciae* Marchal. *Mitt. aus der biolog. Bundesanstalt f. Land. u. Forstwirtschaft*, Berlin, Dalhem, **90**, 15 pp.
- RACK K., 1963. Untersuchungen über die Kiefernscütte. *Z. f. Pflanz en krankh.*, Stuttgart, **70**, 5, 257-272, **70**, 7, 385-398.
- SCHÜTT P., 1960. Beobachtungen zur Biologie der Kiefernscütte. *Nachricht. bl. d. deutsch. Pflanz. sch. dienstes*, **12**, 6, 85-87.
- SCHÜTT P., 1967. Experimentelle Ergebnisse bei Laborinfektionen von Kiefern mit *Lophodermium pinastri* Schrad. *Forstwiss. Cbl.*, **86**, 5, 295-300.
- TUBEUF C. von, 1913. Schüttekrankheit der Kiefer. *Naturw. Z. f. Forest-u. Landw.*, **11**, 369-396.
-