

Cah. ORSTOM, sér. Biol., n° 13 - novembre 1970.

ÉTUDE DU DÉTERMINISME DE LA DIFFÉRENCIATION DES ORGANES AGRÉGÉS CHEZ L'ASCOMYCETE *SPHAEROSTILBE REPENS* B. & Br.

PAR

J.-J. GUILLAUMIN *

RÉSUMÉ

L'ascomycète parasite tropical Sphaerostilbe repens B. et Br. constitue des organes agrégés mixtes, à la fois corémies et rhizomorphes, auxquels nous avons donné le nom d'unités agrégées. In vitro, ces organes apparaissent au cours d'une phase de différenciation dont la durée est limitée et qui fait suite à une phase juvénile qui ne donne naissance qu'à du mycélium indifférencié.

La différenciation n'est déclenchée que lorsque le thalle atteint une taille minimale, la phase juvénile pouvant être divisée en une période d'accumulation et une période d'incubation. Entre ces deux périodes prend place un événement qualitatif au-delà duquel l'évolution vers la différenciation est irréversible.

Les thalles ne se différencient que si la densité du mycélium est suffisante. Mais même si cette condition est remplie, certains facteurs du milieu (anaérobiose, présence de certaines sources d'azote) peuvent, tout en permettant une croissance mycélienne normale, s'opposer à l'apparition des unités agrégées. Par contre, la tyrosine semble favoriser cette apparition.

Un modèle faisant intervenir une substance morphogène « à seuil » a été proposé pour une première interprétation des résultats observés.

ABSTRACT

The tropical parasitic ascomycete Sphaerostilbe repens B. & Br. produces compound aggregated organs which are both coremia and rhizomorphs. We have called these organs « aggregated units ». In vitro, they appear during a differentiation stage following a juvenile stage when only undifferentiated mycelium is produced.

Differentiation occurs only when the thallus reaches a certain minimal size. The juvenile stage can be divided into a period of growth and a period of incubation. Between these two periods, an event occurs after which differentiation is irreversible.

The thalli do not aggregate if the density of the mycelium is insufficient. Even if this

* I.N.R.A., Station de Pathologie végétale. Clermont-Ferrand (Puy-de-Dôme).

is not the case, some environmental factors (such as lack of oxygen or presence of certain sources of nitrogen) can prevent differentiation although allowing a good mycelial growth. On the contrary, tyrosine seems to stimulate the production of aggregated units.

For a preliminary interpretation of these results, a model is proposed, based on the presence of a morphogenetic compound.

INTRODUCTION

Le *Sphaerostilbe repens* B. & Br. est un Ascomycète tropical de la famille des Nectriacées qui peut se comporter comme un agent de pourridié sur certaines plantes comme le théier, l'hévéa et le manioc. Dans la nature, il constitue des rhizomorphes qui sont l'organe infectant du parasite en même temps qu'une de ses formes de dissémination (Goos, 1962).

Dans une précédente communication (GUILLAUMIN, 1970), nous avons montré qu'en culture pure, les thalles de *S. repens* différenciaient des organes agrégés mixtes, à la fois corémies par leur partie aérienne et rhizomorphes par leur partie intramatrielle. Ces formations, que nous avons appelées « unités agrégées », naissent aux dépens du mycélium indifférencié à partir d'ébauches possédant une zone de multiplication active analogue à un méristème.

Le champignon constitue en outre trois types de spores asexuées : des conidies portées par les filaments aériens du mycélium indifférencié, des stilbospires portées par les corémies, et des chlamydo-spores.

Un thalle de *S. repens* en culture pure passe par trois phases : une phase juvénile pendant laquelle il ne se forme que du mycélium indifférencié, une phase de différenciation au cours de laquelle apparaissent les ébauches des unités agrégées et une troisième phase qui, comme la première, n'est pas rhizomorphogène. Pendant cette troisième phase, les structures agrégées initiées au cours de la phase précédente continuent à croître, mais le thalle ne différencie plus de nouvelles ébauches.

Le but du présent travail est une première analyse du déterminisme de la différenciation des unités agrégées : nous avons tenté d'avancer ou de retarder l'apparition des premières unités agrégées, voire même de supprimer totalement cette apparition.

Dans la première partie du travail, nous avons étudié l'influence de l'intensité de la croissance mycélienne sur la précocité et l'intensité de la différenciation. La seconde partie a porté sur le rôle de la nutrition azotée. Enfin, une troisième partie a été consacrée à l'étude de l'évolution, au cours de la phase juvénile, des potentialités d'agrégation du mycélium.

La souche que nous avons utilisée tout au long de cette étude a été isolée en juin 1968 à l'Anguédedou (Côte d'Ivoire) à partir d'un tronc mort d'hévéa. Sauf indication contraire, cette souche a toujours été cultivée en boîtes de Pétri, sur un milieu contenant 2% d'extrait de malt et 2% d'agar purifié, à l'obscurité et dans des conditions d'humidité saturante.

Première Partie

RELATION ENTRE DIFFÉRENCIATION ET CROISSANCE

Nous avons tenté de mettre l'intensité et la précocité de la différenciation en parallèle avec la vitesse de la croissance mycélienne. Pour faire varier la quantité de matière vivante synthétisée par unité de temps, nous avons procédé de deux façons : en agissant sur la température ; en agissant sur la richesse globale du milieu de culture, sans que soit modifié le rapport de ses divers constituants : nous avons utilisé à cet effet des concentrations variées d'un milieu à l'extrait de malt.

Dans ces deux expériences, les ensemencements ont été réalisés au moyen de spores isolées. Un troisième essai a été conduit dans des conditions standardisées de température et de milieu, mais en faisant appel à des boutures de tailles différentes. Le but de cet essai était de voir si la quantité de matériaux apportés par une bouture avait une influence sur le délai de différenciation et le nombre de structures différenciées par le thalle né de cette bouture.

A. Influence de la température.*1° Technique.*

Des cultures issues d'une spore unique ont été mises à incuber aux températures suivantes : 17,5°, 20°, 22,5°, 25°, 27,5° et 30 °C. Des enregistrements ont montré que l'amplitude des variations de la température dans les étuves utilisées ne dépassait pas 1 °C.

*2° Résultats.***a. TYPE DE RÉACTION.**

Les unités agrégées peuvent apparaître soit au centre du thalle, soit sur un ou plusieurs anneaux concentriques. On a observé au total 6 types de réactions, que schématise la figure 1. Le tableau I montre comment se répartissent ces types en fonction de la température.

TABLEAU I

Température	Nombre de thalles	Type de réaction					
		1 anneau	Centre + 1 anneau	Centre + 2 anneaux	Centre + 3 anneaux	2 anneaux	3 anneaux
30 °C	37	37	0	0	0	0	0
27,5 °C	52	52	0	0	0	0	0
25 °C	50	47	0	3	0	0	0
22,5 °C	36	7	14	15	0	0	0
20 °C	45	0	22	23	0	0	0
17,5 °C	32	0	0	13	11	6	2

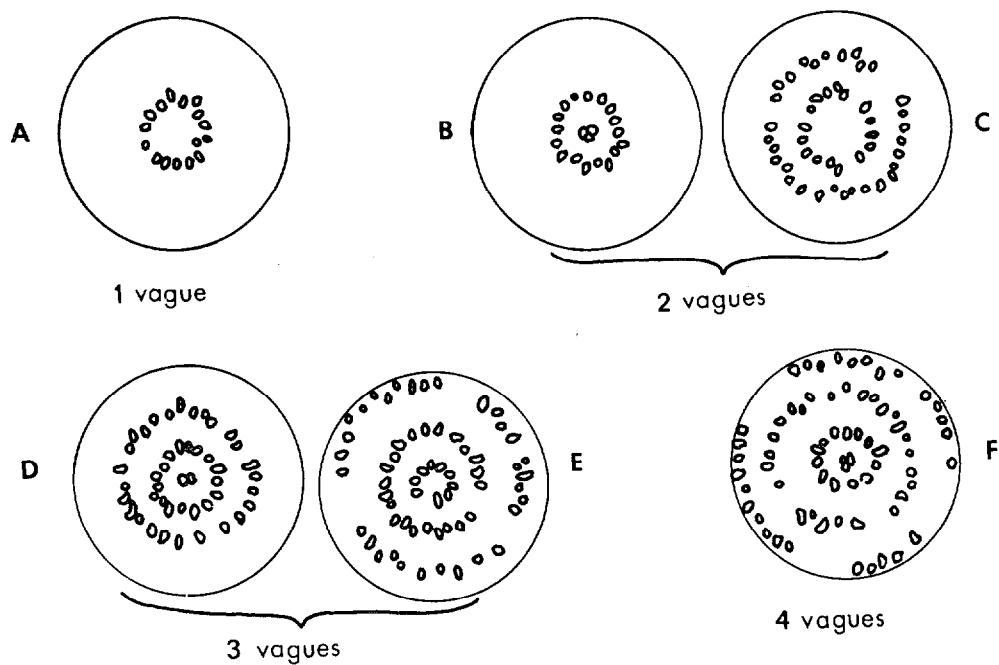


FIG. 1. — Types de réactions selon la température.

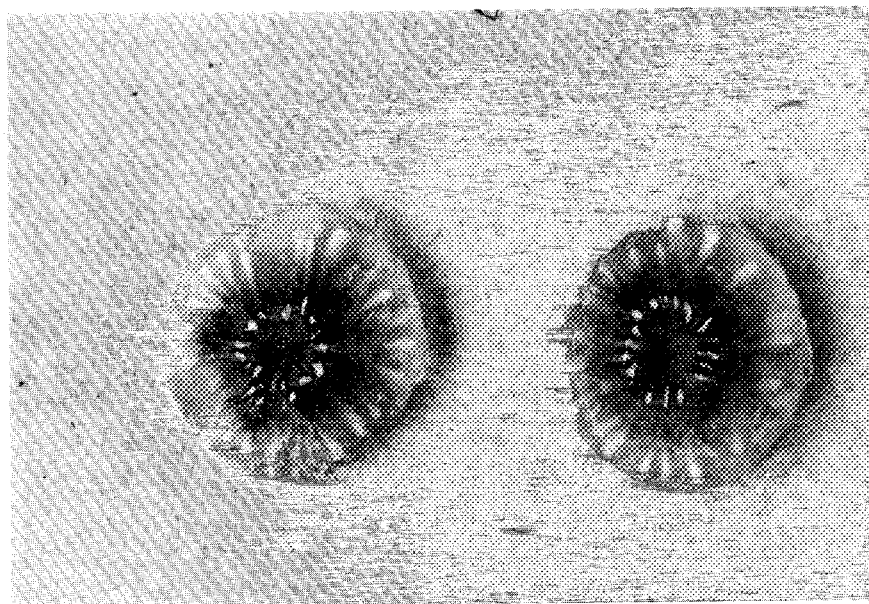


FIG. 2. — Localisation des unités agrégées à 27,5 °C et sur 2% d'extrait de malt.

La lecture de ce tableau permet de faire les remarques suivantes :

— Aux températures les plus élevées (27,5° et 30 °C), on observe la réaction « 1 anneau » dans 100 % des cas.

— A 22,5° et 20 °C, on obtient 2 vagues ou 3 vagues, avec apparition d'un petit nombre (1 à 4) d'unités centrales : ces formations centrales existent toujours à 20° et dans la majorité des cas à 22,5 °C.

— A 17,5 °C, les réactions sont très diversifiées, mais le nombre de vagues tend à augmenter et l'on constate fréquemment l'apparition d'un troisième anneau.

Il convient enfin de signaler la grande variabilité des résultats obtenus à 25° C. Alors que dans l'expérience relatée, on n'obtient sur un total de 50 thalles, que 3 thalles de type « 3 vagues », d'autres essais, réalisés dans les mêmes conditions, ont donné au contraire une majorité de thalles « 2 vagues » et « 3 vagues ». Aux autres températures, par contre, les résultats obtenus sont parfaitement reproductibles.

b. DÉLAI D'APPARITION DE LA PREMIÈRE UNITÉ AGRÉGÉE.

Les résultats sont donnés par le tableau II. Dans ce tableau, comme dans tous les suivants, on a utilisé les dixièmes et centièmes d'heures, plutôt que les minutes, de façon à simplifier les calculs.

TABLEAU II

Température	Nombre de thalles suivis	Délai d'apparition de la première unité agrégée $m \pm 2 sm$
30 °C	37	62,9 \pm 0,9 h
27,5 °C	52	67,0 \pm 0,9 h
25 °C	50	72,8 \pm 0,9 h
22,5 °C	36	83,9 \pm 1,6 h
20 °C	45	112,9 \pm 1,1 h
17,5 °C	32	Plus de 200 h

3° Conclusions.

a. Bien que nous n'ayons pas réalisé de mesures systématiques de la vitesse de croissance aux différentes températures, la vitesse de la croissance linéaire semble augmenter avec la température et présente un maximum à 30 °C. Or, à la lecture du tableau II, on constate que le délai nécessaire à la différenciation diminue quand la température augmente. Il semble donc que la précocité de la différenciation soit liée à la vitesse de croissance des thalles.

b. La durée de la phase de différenciation varie dans le même sens que le délai de différenciation : à 27,5° ou 30 °C, cette phase est réduite à quelques heures et les unités agrégées se répartissent sur un anneau unique. A 17,5 °C par contre, cette période s'étend sur près d'une semaine et les unités constituent trois ou quatre vagues.

Il apparaît donc que les températures « élevées », tout en raccourcissant le délai nécessaire à la différenciation, entraînent en même temps la mise en place précoce d'un

processus défavorable à cette différenciation. Deux types d'hypothèses pourraient rendre compte de ce phénomène. On pourrait penser que les températures de 27°-30 °C provoquent une accélération du métabolisme qui a pour effet de drainer les éléments nutritifs vers les centres de synthèse actifs que sont les apex des unités agrégées déjà formées. Ce serait donc un mécanisme d'inhibition corrélative par carence qui, comme chez l'*Armillariella* (GARRETT, 1953), s'opposerait à l'apparition de nouvelles ébauches. Une autre hypothèse supposerait l'existence d'une substance ou d'un groupe de substances morphogènes et thermolabiles, rapidement détruites par action enzymatique au-dessus de 27 °C.

B. Influence de la concentration en extrait de malt.

1° Technique.

On a utilisé les concentrations suivantes d'extrait de malt (maltéa Moser) filtré : 2 g, 5 g, 10 g, 20 g, 50 g et 100 g par litre. Tous ces milieux contenaient en outre 20 g d'agar par litre.

Les résultats de l'expérience précédente nous ont conduit à adopter pour cet essai la température de 27,5 °C de préférence aux températures plus basses pour lesquelles les réactions sont plus diversifiées.

2° Résultats.

a. TYPE DE RÉACTION.

Sur les boîtes contenant 2 g, 5 g et 10 g de malt par litre, on n'a observé aucune différenciation.

Sur les boîtes contenant 20 à 50 g de malt par litre, les unités agrégées sont apparues en un anneau unique.

Enfin, pour la concentration de 100 g par litre, on a observé une différenciation en deux anneaux concentriques.

b. DÉLAIS DE DIFFÉRENCIATION ET NOMBRE MOYEN D'UNITÉS AGRÉGÉES FORMÉES PAR THALLE.

Les résultats sont donnés par le tableau III.

TABLEAU III

Concentrations	Nombre de thalles suivis	Nombre moyen d'unités agrégées par thalle	Délai d'apparition de la première unité agrégée
20 g/l	55	17,2 ± 0,6	66,2 ± 0,7 h
50 g/l	59	25,4 ± 0,4	65,8 ± 0,7 h
100 g/l	40	43,6 ± 2,3 (1)	68,7 ± 0,8 h

(1) Total des deux anneaux.

c. DIAMÈTRE DE L'ANNEAU.

Pour les concentrations 20 g/l et 50 g/l, le diamètre de l'anneau d'unités agrégées a été mesuré à la loupe binoculaire. On a trouvé les valeurs moyennes de $3,6 \pm 0,8$ mm pour la concentration 20 g/l et $3,7 \pm 0,7$ mm pour la concentration 50 g/l.

Sur la figure 3, on a porté en abscisse les délais de différenciation, en ordonnée le diamètre de l'anneau correspondant. Les résultats concernant les concentrations 20 g/l et 50 g/l ont été réunis sur le même graphique. On voit que dans l'ensemble, il existe une relation entre délai de différenciation et diamètre de l'anneau : les thalles qui se différencient le plus rapidement sont ceux où les unités agrégées sont les plus proches du centre.

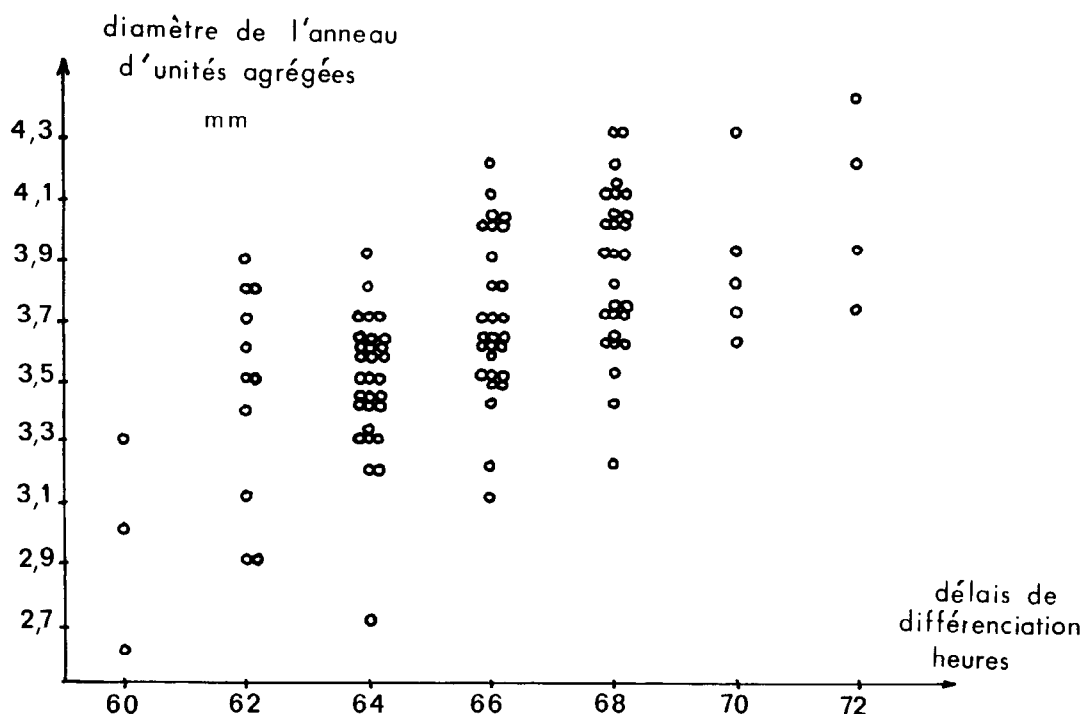


Fig. 3. — Corrélation entre délai de différenciation et diamètre de l'anneau d'unités agrégées.

d. CROISSANCE LINÉAIRE DES THALLES.

On a mesuré le diamètre des thalles après 68 heures de croissance, c'est-à-dire au moment où se manifeste la différenciation pour les concentrations les plus élevées.

Les résultats sont les suivants :

Concentration	2 g/l	diamètre moyen	8,04 mm
»	5 g/l	»	» 7,70 mm
»	10 g/l	»	» 6,87 mm
»	20 g/l	»	» 7,16 mm
»	50 g/l	»	» 6,53 mm

La croissance linéaire est donc du même ordre de grandeur aux différentes concentrations, et même légèrement plus forte pour la concentration la plus faible. Toutefois, la morphologie du mycélium est très différente : les thalles obtenus aux concentrations les plus faibles présentent un mycélium beaucoup plus diffus, les filaments aériens en particulier sont très raréfiés.

3° Conclusions.

a. La différenciation n'a lieu que si le milieu est suffisamment riche, la concentration limite se situant entre 1 et 2 % de malt. Aux concentrations les plus faibles, la croissance linéaire n'est pas ralentie, la carence se traduit par un renforcement de la dominance apicale : les ramifications deviennent beaucoup moins denses, et l'on assiste notamment à une raréfaction du mycélium aérien, les hyphes aériennes constituant un cas particulier de ramifications.

La non-différenciation semble donc, dans ce cas, liée à une insuffisante densité du mycélium.

b. Le nombre des unités agrégées formées augmente avec la richesse du milieu. Les unités apparaissent d'abord sur un anneau de faible diamètre, et si leur nombre est trop élevé, l'excédent se répartit sur un second anneau concentrique au premier.

Le diamètre du premier anneau est d'autant plus faible que la différenciation est plus rapide.

c. La longueur de la première phase du développement, que nous avons appelée phase juvénile, ne dépend pas de la concentration du milieu en métabolites. Il semble qu'il en soit de même pour la longueur de la seconde phase ou phase de différenciation, bien que ce paramètre n'ait pas fait l'objet de mesures systématiques : quelle que soit la concentration en malt, l'apparition d'unités agrégées nouvelles cesse environ 24 heures après le début de la seconde phase, ce qui signifie que sur milieu très riche (10 % de malt), les deux anneaux apparaissent presque simultanément.

C. Influence de la taille de la bouture.

1° Technique.

Les boutures ont été prélevées sur des thalles issus d'une seule conidie et cultivés sur milieu gélosé à 2 % et malté à 2 %, la température étant de 27,5 °C. Dans ces conditions, ces thalles avaient différencié des unités agrégées disposées suivant un anneau unique. L'âge des thalles au moment du prélèvement était de 7 jours, ils avaient donc subi l'ensemble des transformations qualitatives impliquées par la différenciation, y compris l'apparition de stilbospores.

Trois types de boutures ont été réalisés :

a. DES BOUTURES PONCTUELLES CONSTITUÉES PAR DES SPORES ISOLÉES.

Les deux types de spores asexuées portées par les thalles et de germination facile ont été utilisées : conidies (série A) et stilbospores (série B). Les deux catégories de spores ont été prélevées sur le même thalle.

b. DES APEX MYCÉLIENS sélectionnés sous le fort grossissement de la loupe binoculaire.

Ces apex ont été coupés à une longueur de 120 à 150 μ , c'est-à-dire un peu supérieure à celle de l'article mycélien apical (série C).

c. DES BOUTURES CARRÉES DE 2,5 MM DE COTÉ ne comportant que du mycélim indifférencié.

Ces boutures se répartissaient en trois séries : mycélium situé à l'intérieur de l'anneau d'unités agrégées (série D) ; mycélium situé à l'extérieur de l'anneau et à proximité de celui-ci (série E) ; mycélium de la marge en croissance (série F).

Ces 6 séries ont été repiquées sur milieu gélosé et malté à 2% et mises à incuber à 27,5 °C. Pour chacune d'elles, on a noté le délai moyen de différenciation (c'est-à-dire la longueur de la phase juvénile) ainsi que le nombre moyen d'unités agrégées par thalle.

2° Résultats.

TABLEAU IV

Types de boutures		Nombre de thalles	Délai de différenciation (heures)	Nombre moyen d'unités agrégées formées par thalle
Boutures ponctuelles	Série A Conidies	78	64,4 \pm 0,42	18,0 \pm 1,32
	Série B Stilbospores	104	63,0 \pm 0,42	18,5 \pm 2,04
Apex Mycéliens	Série C	46	54,2 \pm 0,54	18,4 \pm 1,68
Boutures de grande taille	Série D Intérieur de l'anneau	72	27,4 \pm 0,24	16,3 \pm 1,14
	Série E Extérieur de l'anneau	100	29,7 \pm 0,34	10,4 \pm 0,84
	Série F Marge en croissance	98	28,8 \pm 0,32	10,6 \pm 0,92

3° Conclusions.

a. On voit que le délai de différenciation diminue quand la taille de la bouture augmente. La différenciation n'a donc lieu que lorsque le thalle atteint une taille minimale et se produira d'autant plus tôt que cette taille sera atteinte plus rapidement. Ce fait peut être interprété de deux façons : ou bien une hypothétique « substance de différenciation » doit atteindre au sein du thalle un niveau suffisant pour qu'un événement

qualitatif ait lieu et que se déclenche la différenciation, ou bien il est nécessaire que le thalle puisse mettre à la disposition des ébauches une quantité suffisante de métabolites.

Toutefois, remarquons que la différence observée entre les délais de différenciation de la série C et des séries A ou B (une dizaine d'heures) correspond à peu près au temps qui est nécessaire au filament germinatif issu de la spore pour atteindre la longueur des articles bouturés dans la série C. De même, la différence entre les délais des séries A, B et D, E, F (35-40 heures) correspond au temps mis par un thalle issu d'une spore unique pour atteindre des dimensions voisines de celles de nos boutures mycéliennes. Ceci semble être en faveur de l'hypothèse purement trophique.

b. Le nombre moyen d'unités agrégées formées par thalle est très voisin pour les séries A, B et C. Il est plus faible pour les thalles issus de boutures mycéliennes, surtout pour les deux séries dont les boutures ont été prélevées à l'extérieur de l'anneau.

Ces différences sont d'interprétation plus délicate que celles concernant les délais de différenciation : en effet, pour les thalles issus de boutures de grande taille, il n'y a pas constitution d'un anneau, les unités apparaissent à la limite des boutures et du mycélium formé *de novo* ; l'existence de ces 2 types de mycélium d'orientation et d'âge différents doit provoquer des irrégularités dans les flux métaboliques et l'entraînement des substances nutritives vers des points privilégiés.

c. En ce qui concerne les boutures issues de spores, la nature de ces dernières semble sans influence tant sur la rapidité que sur l'intensité de la différenciation. En effet, la différence de 1,4 heure observée entre les délais moyens de différenciation des deux séries est du même ordre que les différences que l'on observe entre deux séries issues de conidies.

D. Conclusions.

Relations entre différenciation et croissance.

1° Un thalle ne peut se différencier qu'à partir du moment où il atteint une certaine taille — une « masse critique ». On peut faire en sorte que cette masse soit atteinte plus rapidement soit en utilisant des boutures de grande taille, soit en augmentant la température. Si la croissance est très lente, par exemple aux températures basses, la différenciation a cependant lieu lorsque le thalle atteint la taille minimale.

2° La différenciation ne se produit que si la densité du mycélium est suffisante. Sur un milieu contenant 1 % de malt, les thalles ne se différencient pas, même lorsqu'ils ont atteint des dimensions bien supérieures à la masse critique, vraisemblablement parce que des conditions de densité du mycélium ne sont pas remplies. Le disque formé de cellules à multiplication rapide qui semble être le point de départ d'une unité agrégée ne se formerait qu'à partir d'un feutrage mycélien suffisamment compact.

3° De même que celle de la phase juvénile, la durée de la phase de différenciation est sujette à variations. Les températures élevées la raccourcissent considérablement. A ces températures (27-30 °C), malgré l'accélération de la croissance, la transformation du mycélium indifférencié en ébauches agrégées ne peut se poursuivre au-delà d'une vingtaine d'heures.

4° Pour expliquer le caractère rythmique de la différenciation aux températures inférieures à 25 °C, on peut émettre deux hypothèses : ou bien le rythme est induit par

ces températures, ou bien, la différenciation est toujours rythmique, mais aux températures plus élevées, la durée de la phase de différenciation est trop brève pour que l'on puisse assister à l'apparition de la seconde vague et des suivantes.

Les résultats observés sur un milieu contenant 10 % de malt semblent militer en faveur de la seconde hypothèse : dans ce cas, la quantité de matériaux dont dispose le thalle étant plus élevée, la construction de la seconde vague suit immédiatement celle de la première, et malgré la brièveté de la phase de différenciation, on observe la formation de deux anneaux.

Seconde Partie

RELATIONS ENTRE DIFFÉRENCIATION ET MÉTABOLISME AZOTE

A. Influence de la nature de la source azotée.

1° *Technique.*

Nous avons utilisé comme milieu de base un milieu Czapeck gélosé à 2 % et contenant 30 g de saccharose par litre, milieu auquel nous avons ajouté diverses sources d'azote.

Initialement, l'expérience avait pour but d'étudier l'influence de la tyrosine, acide aminé phénolique dont l'oxydation est susceptible de conduire à la formation des mélanines qui imprègnent le cortex du rhizomorphe. L'action de la tyrosine a été comparée à celle de l'asparagine, source d'azote utilisée classiquement avec le milieu Czapeck. L'expérience a ensuite été étendue à d'autres sources d'azote. Au total, 6 composés ont été utilisés : nitrate d'ammonium, glyocolle, bêta-alanine, acide glutamique, asparagine et tyrosine.

2° *Première expérience.*

Nous avons obtenu un rapport C/N égal à 80 en utilisant les concentrations suivantes des substances azotées :

— nitrate d'ammonium	0,45 g/l,	pH du milieu gélosé = 6,9
— glyocolle	0,85 g/l	» » 7,0
— bêta-alanine	1,02 g/l	» » 7,0
— asparagine	0,85 g/l	» » 6,8
— tyrosine	2,17 g/l	» » 6,7
— acide glutamique	1,66 g/l	» » 4,1

Résultats.

a TYPES DE RÉACTION.

- sur bêta-alanine, aucun organe agrégé n'est apparu ;
- sur glyocolle, un petit nombre de thalles seulement se sont différenciés (23 sur 83). Ces 23 thalles portaient une seule unité agrégée, en position centrale ;
- sur les 4 autres sources d'azote, 100 % des thalles se sont différenciés ;

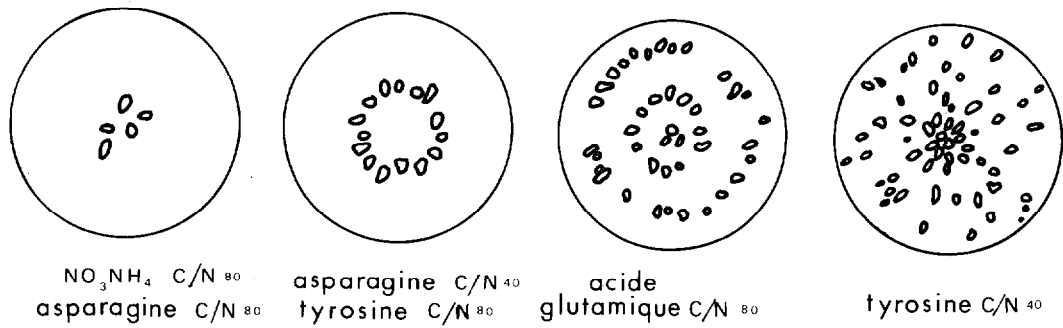


FIG. 4. — Types de réactions selon la source d'azote.

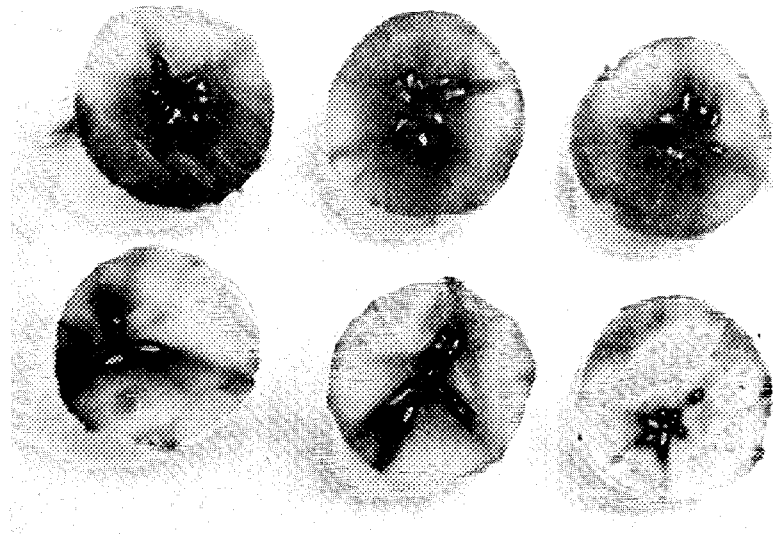


FIG. 5. — Thalles obtenus sur milieu Czapeck + asparagine (C/N = 80).

- sur nitrate d'ammonium et asparagine, on constate l'apparition d'un petit nombre d'unités agrégées concentrées dans la région centrale du thalle, disposées irrégulièrement ou tendant à s'organiser en un anneau incomplet ;
- sur tyrosine, il y a formation d'un anneau complet ;
- sur acide glutamique, on observe une réaction de type « 3 vagues » comportant quelques unités centrales et deux anneaux concentriques.

b. DÉLAIS DE DIFFÉRENCIATION ET NOMBRE MOYEN D'UNITÉS AGRÉGÉES FORMÉES PAR THALLE.

Les résultats sont donnés par le tableau V.

TABLEAU V

Sources azotées	Nombre de thalles suivis	Nombre moyen d'unités agrégées par thalle	Délai d'apparition de la première unité agrégée (heures)
Bêta-alanine	45	0	
Glycocolle	83	0,2	
NO ₃ NH ₄	68	5,6 ± 0,6	77,1 ± 0,5
Asparagine	57	5,8 ± 0,5	69,1 ± 0,5
Tyrosine	62	15,9 ± 0,8	84,6 ± 0,5
Acide glutamique	55	33,1 ± 1,1	56,4 ± 0,4

3° *Seconde expérience.*

Le rapport C/N a été porté à la valeur 40. Nous avons utilisé seulement trois sources azotées, aux concentrations suivantes :

Glycocolle	1,73 g/l
Asparagine	1,73 g/l
Tyrosine	4,86 g/l

La dose de tyrosine étant supérieure au seuil de solubilité dans l'eau de cet acide aminé, on a utilisé en fait une suspension de tyrosine.

Dans cette expérience, nous avons noté seulement le type de réaction des thalles et le nombre d'unités agrégées formées.

a. TYPE DE RÉACTION.

— sur glycocolle, même réaction que pour un C/N de 80 : 6 thalles sur 62 différencient une unité agrégée unique ;

— sur asparagine, les unités agrégées forment un anneau continu ;

— sur tyrosine, on observe la constitution d'un grand nombre d'unités agrégées, en même temps que la disparition totale du rythme : les unités se forment de façon anarchique sur toute la zone centrale de la colonie, leur apparition est étalée dans le temps et se prolonge au-delà de 150 heures.

b. NOMBRE D'UNITÉS AGRÉGÉES.

TABLEAU VI

Sources azotées	Nombre de thalles suivis	Nombre moyen d'unités agrégées par thalle
Glycocolle	62	0,1
Asparagine	61	14,3 ± 1,6
Tyrosine	43	74,3 ± 5,5

Sur tyrosine, on note d'importantes variations individuelles entre les thalles, les limites de l'intervalle de confiance de la moyenne sont de 63,3 unités et 85,3 unités, les valeurs extrêmes notées étant 27 et 129 unités.

4° Conclusions.

a. La figure 4 schématise les 4 types de réaction obtenus. Toutefois, il convient de mettre à part l'essai sur acide glutamique, effectué à $\text{pH} = 4,1$ alors que les autres milieux avaient un pH voisin de la neutralité. Si l'on ne tient pas compte de ce résultat, on voit que la disposition des unités agrégées sur un thalle est en rapport avec le nombre de ces unités :

Si ce nombre est faible, les quelques unités formées semblent réparties au hasard dans la région centrale du thalle.

Si ce nombre est moyen (entre 10 et 20), la réaction est la même que sur extrait de malt : il y a formation d'un anneau régulier de rhizomorphes et de corémies.

Si le nombre d'unités agrégées est très élevé, comme c'est le cas pour la plus forte concentration de tyrosine, les organes différenciés apparaissent de façon anarchique, recouvrant toute la partie centrale du thalle.

b. A dose d'azote égale, les diverses substances azotées dont on a étudié l'action se montrent d'une efficacité très variable. C'est ainsi que la bêta-alanine, tout en assurant une bonne croissance mycélienne, ne permet pas l'agrégation. Dans ce cas, il ne semble pas que la densité du mycélium soit à mettre en cause. Tout se passe donc comme si certaines sources d'azote exerçaient une action favorable à la différenciation, d'autres substances azotées orientant au contraire les synthèses vers la production de mycélium indifférencié.

c. Une augmentation de la dose d'azote (la concentration de la source glucidique n'étant pas modifiée) s'accompagne d'une augmentation du nombre d'unités agrégées formées (asparagine : 14,3 pour un rapport C/N égal à 40 contre 5,8 pour un C/N égal à 80 ; tyrosine 74,3 contre 15,9 dans les mêmes conditions).

B. Influence de l'aération.

1° Cultures en milieu liquide.

On a réalisé des ensemencements de spores isolées à la surface d'un milieu liquide constitué par 2 % de malt. Après incubation à 27,5 °C sont apparus des thalles qui ont différencié des unités agrégées analogues aux structures formées sur milieux solides. Ces unités se répartissaient sur un anneau de 3 à 4 mm de diamètre, leur délai d'apparition était du même ordre que sur les milieux gélosés : de 60 à 70 heures après ensemencement.

Des boutures formées de mycélium flottant à la surface du milieu ont également donné naissance à des unités agrégées, réparties de façon plus irrégulière.

2° Cultures en anaérobiose.

En lésant des boutures mycéliennes, on a fait croître des thalles en anaérobiose au fond du récipient de culture. Le champignon, cultivé dans ces conditions, a constitué

des boules de mycélium homogène dont le diamètre s'est accru régulièrement sans que l'on assiste à l'apparition d'organes agrégés.

Au bout d'un temps variable de croissance anaérobie (2 à 7 jours), on a rétabli le contact avec l'atmosphère en vidant partiellement le récipient de culture. Dans ces conditions, on a observé, au bout de 24 heures environ, l'apparition d'une ceinture d'unités agrégées à la limite du mycélium, de l'atmosphère et du milieu de culture.

3° Conclusions.

Le *Sphaerostilbe* manifeste un comportement très semblable à celui que l'on observe de façon courante chez l'*Armillariella mellea* : en anaérobiose, il est capable de croissance mycélienne mais non de différenciation. La présence d'oxygène semble donc être un facteur indispensable à la différenciation.

D'autre part, le mycélium formé en anaérobiose semble ne rien perdre de ses potentialités d'agrégation puisque si le contact avec l'oxygène est rétabli, la différenciation s'ensuit à bref délai.

C. Mise en évidence d'une activité phénoloxidasique chez le *S. repens*.

D'après les résultats des deux paragraphes précédents, il apparaissait d'une part que la tyrosine jouait un rôle particulier dans la différenciation, d'autre part, qu'un certain pouvoir oxydant était nécessaire. Il semblait donc possible qu'une activité tyrosine-oxydasique intervînt dans le phénomène étudié.

De plus, sur les milieux à base de tyrosine, on avait observé l'apparition, autour de chaque thalle de *S. repens*, d'une auréole de teinte rose vif, puis brune, et enfin noire, dont le diamètre augmentait avec l'âge du thalle. Cette réaction colorée précédait la différenciation. Le thalle de *S. repens*, cultivé sur un milieu riche en tyrosine, semblait donc être le siège d'une activité tyrosine-oxydasique. On a cherché à mettre également en évidence cette activité sur des thalles cultivés sur milieu dépourvu de tyrosine.

1° Technique.

On a utilisé la DOPA-réaction de LAIDLAW (référence dans LISON, 1960). Le champignon a été cultivé sur des disques de cellophane placés à la surface d'un milieu gélosé et malté à 2%.

Après 90 heures de croissance à 27,5 °C, les disques de cellophane portant le mycélium et quelques rhizomorphes ont été décollés du milieu, les thalles ont été fixés pendant 3 heures par du formol à 5%, puis placés dans une solution de dihydroxyphénylalanine tamponnée à pII = 7,4.

2° Résultats.

L'apparition d'une coloration brun-pourpre du mycélium a permis de mettre en évidence l'existence d'une activité catécholase. Deux régions du thalle ne se sont pas colorées : la partie la plus jeune, constituant une couronne hyaline autour du thalle coloré, et les rhizomorphes. Pour ces derniers, l'imperméabilité du cortex vis-à-vis du réactif est peut-être à mettre en cause.

D. Conclusion.

On pourrait interpréter ces résultats à la lumière de la théorie selon laquelle les polyphénoloxydases jouent le rôle essentiel dans la différenciation des rhizomorphes (JACQUES-FELIX, 1967) : sous l'action de ces enzymes, la tyrosine serait oxydée en quinones qu'une oxydation encore plus poussée polymériserait en pigments de type mélanines. Ces réactions exigeraient un potentiel d'oxydo-réduction bien particulier qui ne se rencontrerait que dans certaines régions du thalle. L'imprégnation des parois des cellules de ces zones par les mélanines constituerait le cortex du rhizomorphe, manchon rigide et imperméable dont la présence expliquerait, par simple action mécanique, tout le développement ultérieur du thalle : en effet, les métabolites contenus à l'intérieur du tube ainsi constitué, ne pouvant pas migrer à travers la paroi, ne bénéficieraient qu'à la partie distale du cylindre. Celle-ci se transformerait peu à peu en une zone pseudo-méristématique.

Dans cette optique, les autres sources d'azote ne seraient efficaces sur la différenciation que dans la mesure où elles seraient partiellement transformées en tyrosine.

Toutefois, dans le cas du *Sphaerostilbe*, cette explication ne rend pas compte de certains faits importants :

a. Le délai de différenciation est plus long sur tyrosine que sur asparagine ou nitrate d'ammonium, alors que ce devrait être l'inverse.

b. L'étude morphologique des jeunes ébauches des unités agrégées (GUILLAUMIN, 1970), montre que leur paroi est constituée par un massif de petites cellules isodiamétriques où l'on ne constate aucune différenciation entre un cortex externe et une medulla interne. Cette différenciation est donc postérieure à l'acquisition de la structure polarisée qui caractérise les unités agrégées.

Il est possible que l'intervention de la tyrosine se situe à un autre niveau. D'autre part, il est à noter que dans nos essais, la tyrosine a dû être stérilisée à l'autoclave et non par filtration comme les autres amino-acides ; elle a donc pu subir une dégradation partielle, et il n'est pas exclu que ce soient les produits de cette dégradation qui jouent le rôle principal.

Troisième Partie

MISE EN ÉVIDENCE D'UN ÉVÉNEMENT QUALITATIF INTERVENANT AU COURS DE LA PHASE JUVÉNILE

A. Influence de l'âge du thalle.

1° Technique.

On a réalisé six séries de boutures à partir de thalles d'âges différents :

Série A :	Boutures prélevées sur des thalles de	50 heures ;
Série B	»	»
Série C	»	»

Série D	»	»	»	168 heures ;
Série E	»	»	»	212 heures ;
Série F	»	»	»	288 heures.

Tous ces thalles étaient issus de spores isolées et avaient été cultivés à 27,5 °C sur 2 % de malt gélosé.

Les boutures ont été découpées de dimensions constantes (carrés de 2,5 mm de côté). Elles ne comportaient que du mycélium indifférencié mais, alors que les boutures A et B avaient été prélevées sur des thalles indifférenciés, celles des 4 autres séries étaient issues de thalles qui, dans nos conditions de culture, avaient constitué entre 60 et 70 heures un anneau d'unités agrégées.

Pour les séries A et B, étant donné la taille réduite des thalles, les boutures comprenaient une portion de la partie centrale de ces thalles. Les cellules des boutures de la série A étaient donc âgées de 0 à 50 heures, celles de la série B de 0 à 56 heures. Quant aux boutures des séries C à F, elles ont été prélevées sur la marge des thalles, l'âge de leurs cellules ne dépassait donc pas 50-60 heures. Au total, l'âge des cellules des boutures était approximativement le même pour les 6 séries. Le seul facteur variable de l'expérience était donc l'âge des thalles bouturés.

2° Résultats.

Ils sont donnés par le tableau VII.

TABLEAU VII

Désignation des séries	Age des thalles (heures)	Délai moyen de différenciation (heures)
A	50	25,6 ± 0,36
B	56	15,9 ± 0,29
C	90	28,8 ± 0,32
D	168	29,8 ± 1,48
E	212	22,4 ± 0,46
F	288	28,3 ± 1,14

3° Conclusions .

a. Les délais de différenciation des quatre séries issues de thalles déjà agrégés sont voisins ; en tous cas, ils n'augmentent pas avec l'âge des thalles que l'on repique. Donc le vieillissement des thalles n'entraîne pas de diminution dans leurs potentialités de différenciation. La perte du pouvoir de différenciation qui caractérise le passage de la seconde à la troisième phase du développement est un phénomène intéressant des masses mycéliennes de taille relativement élevée et non les cellules qui les constituent.

b. Les boutures issues de thalles de 50 heures manifestent le même comportement que celles qui sont issues de thalles différenciés : on ne constate pas de diminution du délai de différenciation de ces boutures par rapport à celles des séries C à F. Donc : ou bien l'évolution de certains points de ces thalles vers la constitution d'ébauches d'unités agrégées n'était pas encore entamée, ou bien le bouturage a provoqué un retour en arrière, une dédifférenciation de ces points privilégiés.

c. Au contraire, les boutures issues de thalles de 56 heures se différencient au bout de délais nettement plus faibles que celles qui sont issues de thalles déjà différenciés. Donc une partie de l'évolution menant à l'apparition des unités agrégées était déjà faite, au moins dans certains de ces thalles, et le bouturage n'a pas provoqué de retour en arrière : l'évolution commencée dans les thalles entiers s'est poursuivie dans les boutures.

Remarquons toutefois que le délai de différenciation total (c'est-à-dire calculé à partir du semis) est de $56 + 15,9 = 71,9$ heures, donc supérieur au délai correspondant à des témoins n'ayant subi aucun bouturage (qui est de 64 à 67 heures selon les séries). Donc ou bien le processus n'était enclenché que pour une fraction des thalles bouturés, ou bien le bouturage, s'il n'a pas entraîné un retour à zéro, a néanmoins ralenti l'évolution vers la différenciation. Ces deux explications ne sont d'ailleurs pas incompatibles.

B. Mise en évidence d'un événement qualitatif — Bouturage de thalles de 56 heures.

1° Technique.

L'expérience de bouturage des thalles de 56 heures a été refaite en utilisant un nombre de boutures beaucoup plus élevé (428). Pour chaque thalle, nous avons noté le délai de différenciation de la première unité agrégée apparue et le nombre total d'unités formées par thalle. De plus, nous avons distingué entre les unités agrégées initiées avant le bouturage et celles qui l'ont été après le bouturage : comme l'indique la figure 6, les unités initiées avant bouturage apparaissent sur la bouture elle-même, à l'emplacement qu'elles auraient occupé si l'on avait laissé l'évolution du thalle suivre son cours normal (par exemple sur un arc de cercle correspondant à une fraction de l'anneau si l'on a repiqué un secteur du thalle). Au contraire, les unités initiées après le bouturage apparaissent autour de la bouture ou à sa base.

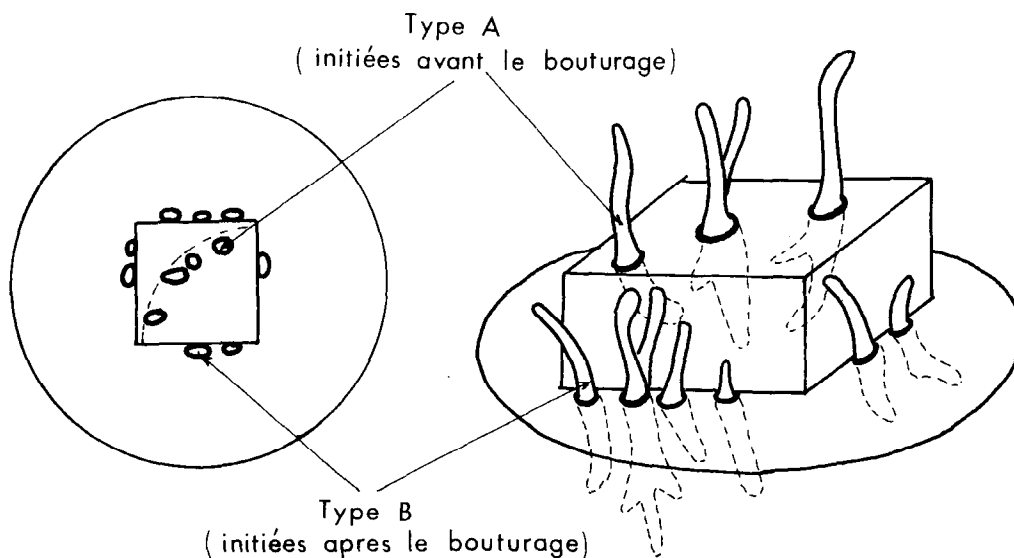


FIG. 6. — Expérience de bouturage de thalles de 56 heures. Localisation des unités agrégées de type A et de type B.

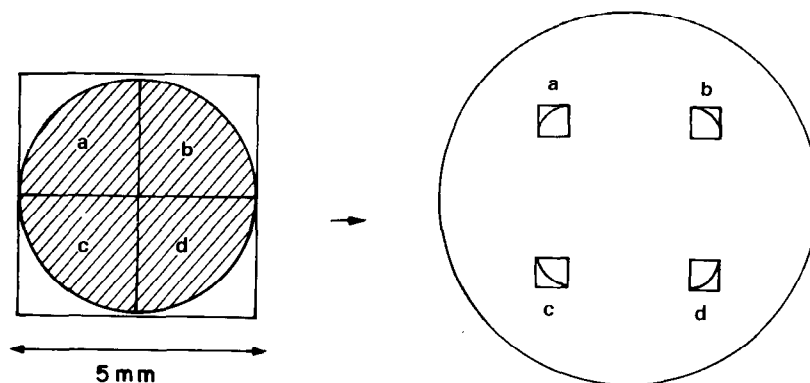


FIG. 7. — Expérience de bouturage de thalles de 56 heures. Disposition des boutures.

Les boutures ont été réalisées en découpant 107 thalles en 4 parties égales, ainsi que le montre la figure 7. Chaque bouture était constituée d'un secteur de 2,5 mm de rayon comprenant un quart du thalle original. Les 428 boutures ont été réparties sur 107 boîtes de Petri, les 4 boutures issues du même thalle étant repiquées sur la même boîte dans la position qu'indique la figure 7.

2° Résultats.

Ils sont donnés par les tableaux VIII et IX et les figures 8 à 10. On a appelé types A et B les unités agrégées initiées avant et après repiquage.

TABLEAU VIII

Délais de différenciation des thalles repiqués
après 56 heures de croissance

Délai de différenciation après bouturage (heures)	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
Délai à partir de l'ensemencement de la spore (heures)	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80	82	84	86
Nombre de thalles	5	26	86	57	49	27	37	37	24	32	26	10	5

3° Conclusions.

a. Les thalles se répartissent en deux catégories. Les 3/5 des thalles environ se comportent comme les thalles monospores témoins et se différencient entre 62 et 70 heures avec un maximum à 66 heures (fig. 8). Les autres thalles se différencient nettement plus tard, entre 74 et 84 heures, c'est-à-dire entre 18 et 26 heures après le repiquage. Il intervient donc vers la 56^e heure un événement qualitatif au-delà duquel l'évolution vers

TABLEAU IX

Nombre d'unités agrégées formées en fonction du délai de différenciation et distinction des 2 types A et B

Délais de différenciation (heures)	62-64	66	68	70	72	74	76	78	80	82	84-86
Nombre total d'unités agrégées	7,2	6,9	6,4	7,3	6,8	6,4	7,5	6,3	8,1	6,8	5,5
Unités de Type A	3,8	3,7	3	3	2,9	1,8	2	1,5	1,1	0,8	0,8
Unités de Type B	5,5	3,2	3,4	4,3	3,9	4,6	5,5	4,8	7	6	4,7
Rapport $\frac{A}{B}$	1,09	1,15	0,88	0,68	0,75	0,40	0,39	0,31	0,11	0,12	0,16
Proportion de thalles n'ayant que des unités de type B (%)	0	0	0	0	0	16	21	25	47	53	53

la différenciation est irréversible. Les thalles de la première catégorie avaient déjà subi cet événement, ceux de la seconde catégorie ne l'avaient pas encore subi, le simple hasard faisant qu'un thalle donné appartienne à l'un ou à l'autre groupe.

Une fois que cet événement qualitatif a eu lieu, le thalle entre dans une période d'incubation pendant laquelle son rajeunissement par bouturage n'est plus possible.

b. Le nombre moyen d'unités agrégées formées par un thalle ne varie pratiquement pas avec le délai de différenciation et se maintient entre 6 et 8.

c. Comme on pouvait s'y attendre, le nombre moyen d'unités agrégées initiées avant le bouturage décroît quand le délai de différenciation augmente. Le nombre total d'unités par thalle étant pratiquement constant, il en résulte que le nombre d'unités initiées après le bouturage croît, le rapport A/B passant de 1,15 pour les thalles différenciés à 66 heures à 0,1 pour les thalles différenciés à 80 heures.

Toutefois, on constate que même les thalles différenciés très tard (de 82 à 86 heures) continuent à porter des unités initiées avant le repiquage : 53 % seulement des colonies différenciées entre 82 et 86 heures ne possèdent pas d'unités de type A. Il semble que le bouturage ait provoqué sur certains thalles un allongement de la période d'incubation, entraînant une différenciation tardive d'unités agrégées pourtant initiées avant le bouturage.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° Il existe des conditions inhibitrices de la différenciation : il est possible, en agissant sur les conditions du milieu, d'empêcher l'apparition des unités agrégées, donc de prolonger indéfiniment la phase juvénile.

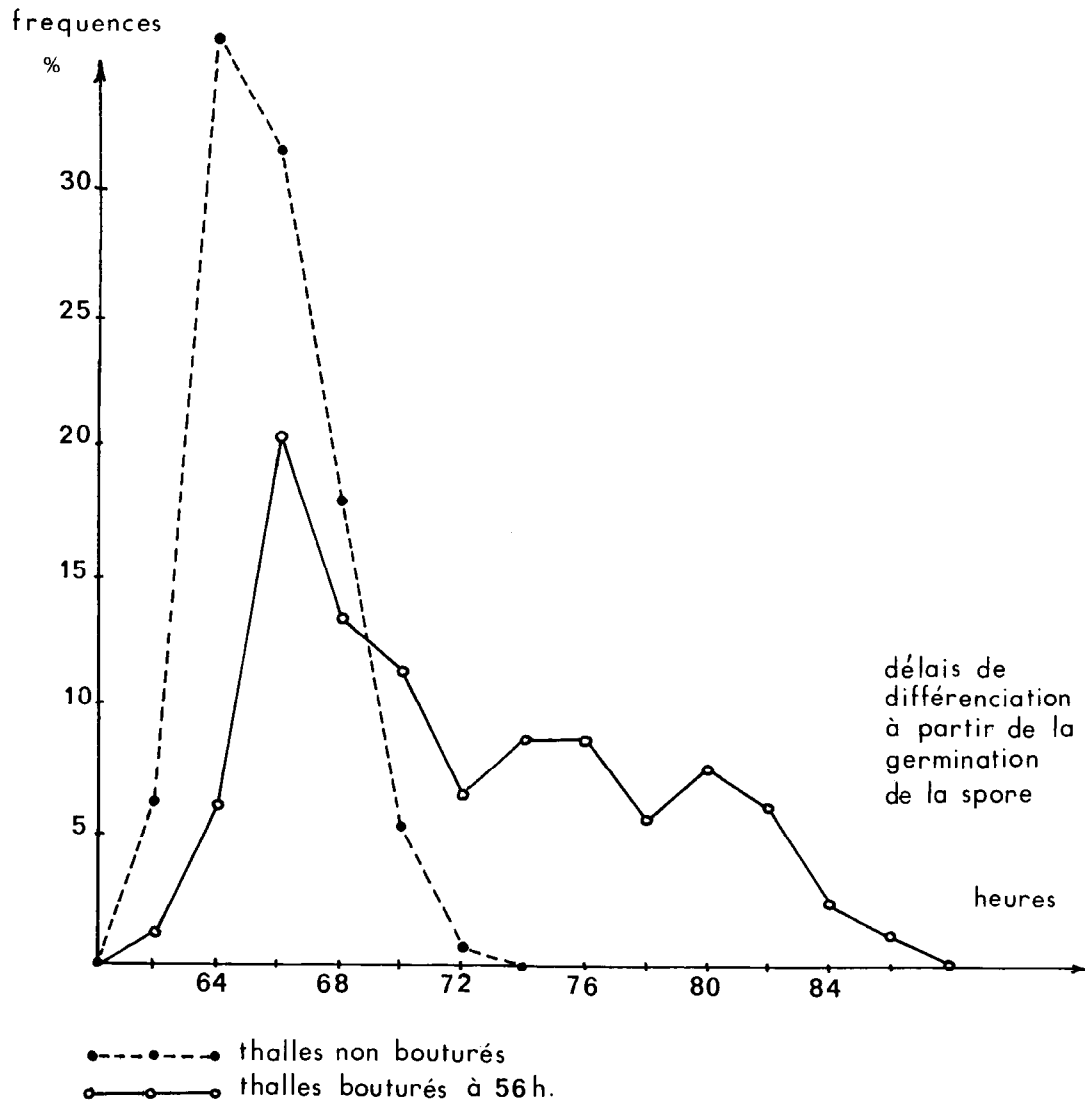


FIG. 8. — Délais de différenciation des thalles bouturés à 56 heures.

Nous avons vu que la différenciation pouvait être rendue impossible pour deux types de raisons :

a. Parce que la densité du mycélium est insuffisante : le disque pseudoméristématique que nous avons supposé être à l'origine des ébauches agrégées semble ne pouvoir se constituer qu'à partir d'un réseau mycélien suffisamment dense.

b. Parce que le métabolisme ne le permet pas : en anaérobiose ou en présence de certaines formes d'azote organique, le mycélium continue à croître avec une densité suffisante pour la différenciation, mais ne se différencie pas. Il existe donc des voies méta-

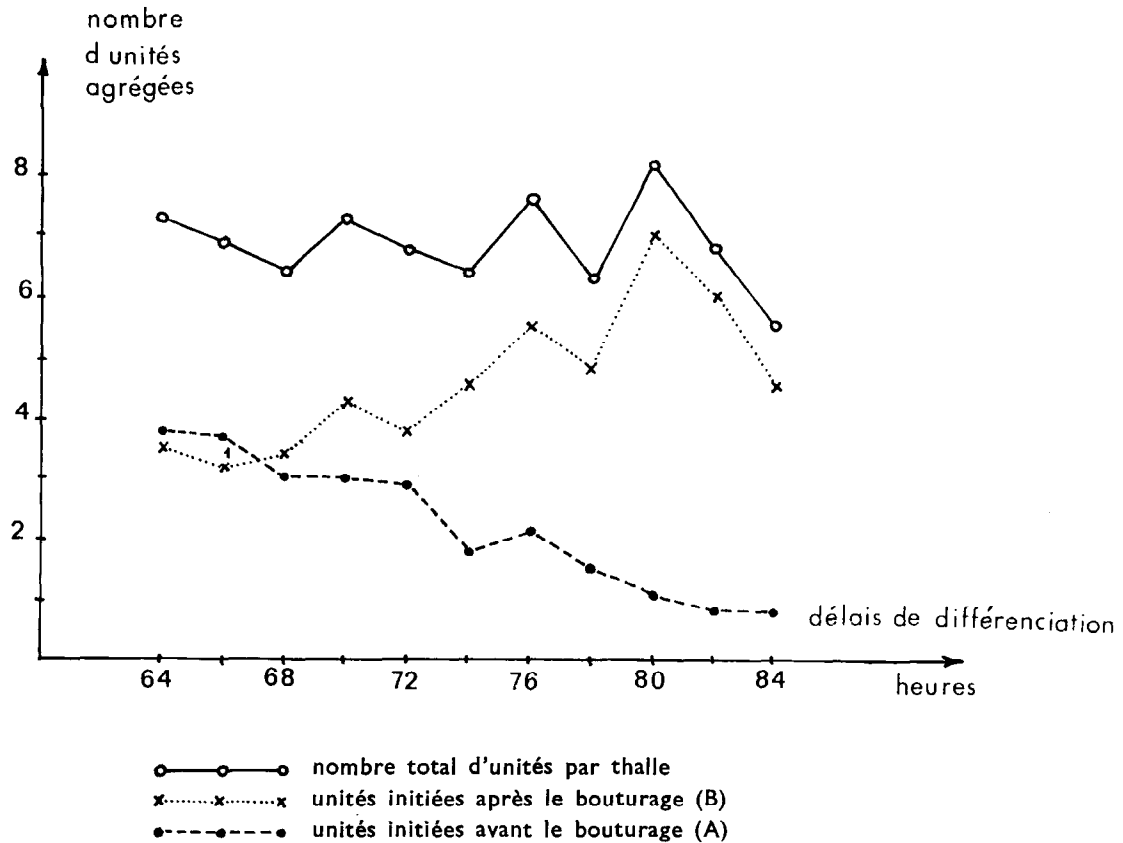


FIG. 9. — Expérience de bouturage des thalles de 56 heures. Nombre et type d'unités agrégées apparues.

boliques conduisant spécifiquement à la croissance indifférenciée et des voies menant à l'agrégation.

2° En conditions non inhibitrices, la phase juvénile peut être subdivisée en deux périodes : une période d'accumulation pendant laquelle il est possible de retarder la différenciation en réduisant la taille du thalle et une période d'incubation pendant laquelle l'évolution vers la différenciation est irréversible. Entre les deux prend place un événement qualitatif qui n'intervient que si le thalle a atteint des dimensions suffisantes.

On peut se demander si ce saut qualitatif ne correspond pas à un événement morphologique, qui pourrait être la formation du disque de cellules à multiplication rapide que nous avons supposé être le point de départ des unités agrégées. Bien que difficilement discernable à ce stade, ce massif cellulaire serait d'ores et déjà assuré d'une évolution autonome. Ce que nous appelons « période d'incubation » correspondrait alors simplement au temps qui est nécessaire au massif cellulaire originel pour constituer une ébauche visible.

3° Une conception purement trophique de la différenciation ne permet pas d'expli-

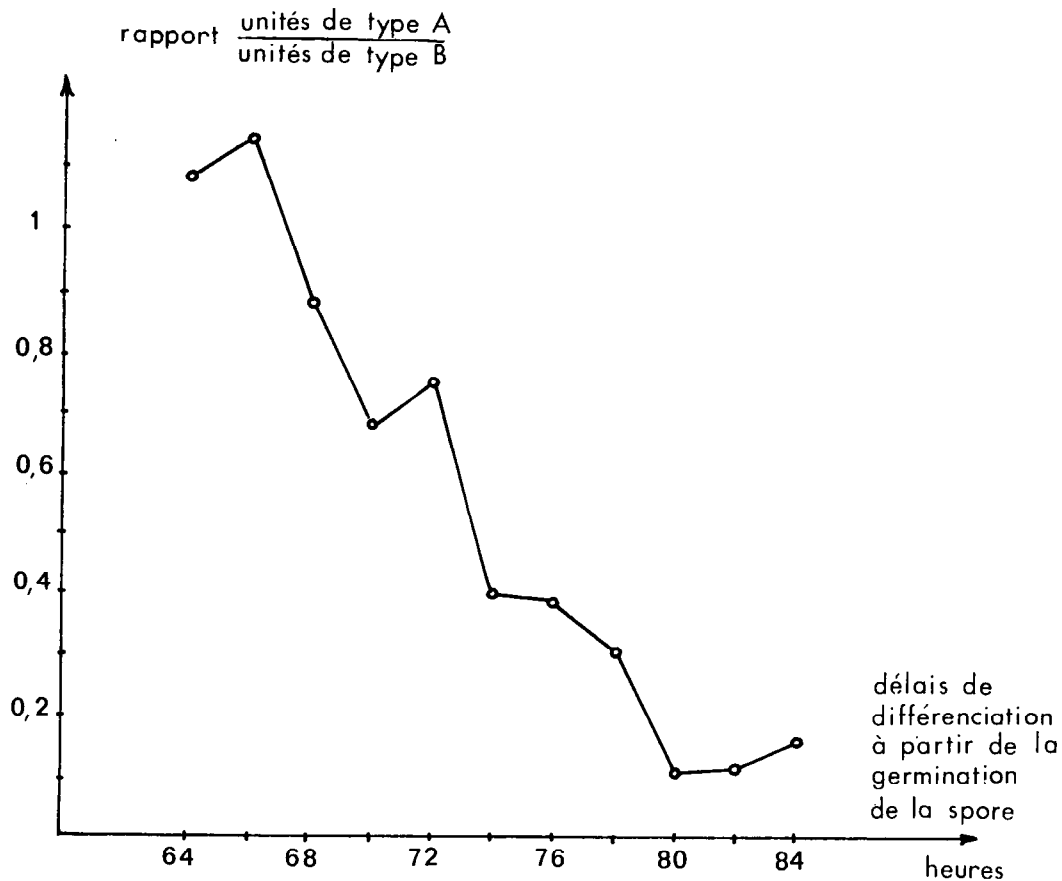


Fig. 10. — Evolution du rapport $\frac{\text{unités de type A}}{\text{unités de type B}}$ en fonction du délai de différenciation.

quer l'ensemble des résultats que nous avons observés (par exemple le rôle joué par les températures élevées ou encore l'action spécifique de la tyrosine). On pourrait émettre l'hypothèse d'un facteur à seuil qui pourrait être un corps dérivé de la tyrosine ; la différenciation serait induite dès que ce facteur atteindrait un certain niveau, et les unités agrégées apparaîtraient alors après une période d'incubation.

Le taux de synthèse de cette substance serait évidemment lié à l'intensité de l'activité métabolique, donc à la vitesse de croissance du mycélium.

Le rythme s'expliquerait par la mobilisation de la substance au niveau des unités agrégées : après la constitution de chaque vague, une nouvelle période de synthèse du facteur à seuil serait nécessaire pour la reprise de la différenciation. Lorsque la seconde vague apparaît avant que l'édification de la première vague ne soit terminée, comme c'est le cas sur 10 % d'extrait de malt et à 27,5 °C, cela pourrait correspondre à une synthèse très rapide de la substance.

D'autre part, une activité de destruction du facteur actif se développerait au fur et à mesure de son apparition, et beaucoup plus rapidement aux températures élevées.

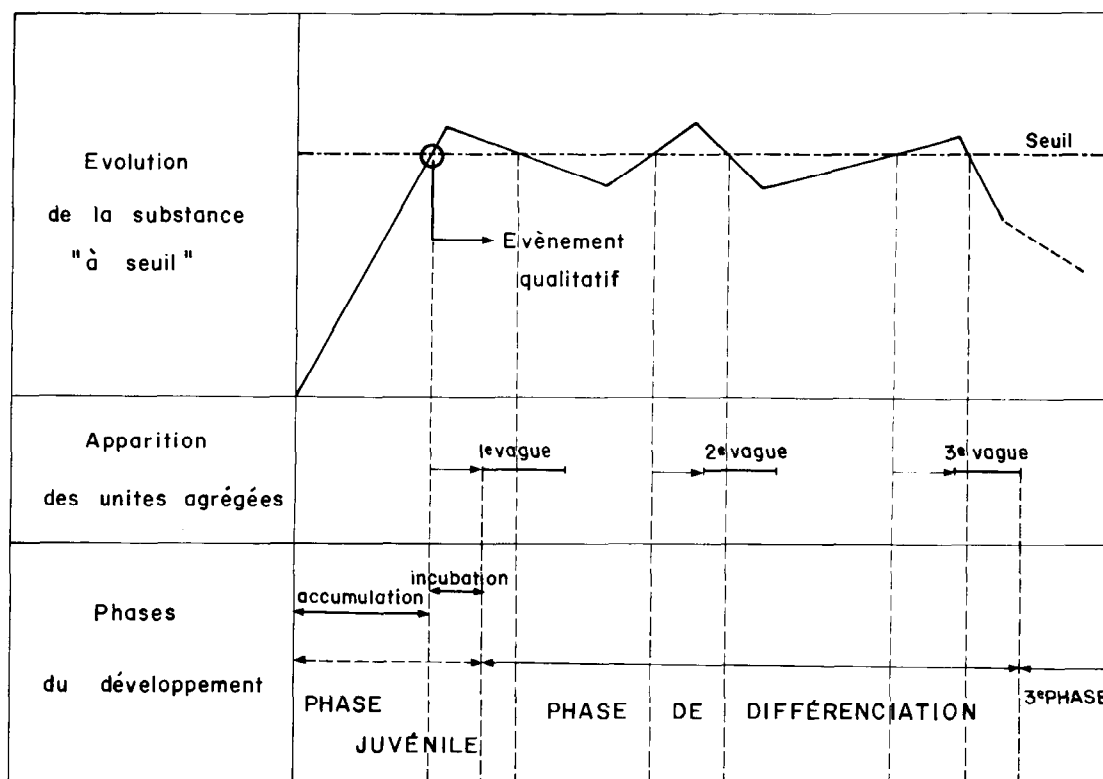


FIG. 11. — Essai d'explication schématique du mode d'apparition des unités agrégées dans le cas d'un thalle de type « 3 vagues ».

La figure 11 schématise l'ensemble de cette conception dans le cas d'un thalle de type « 3 vagues ».

Manuscrit reçu le 29 janvier 1970.

BIBLIOGRAPHIE

- BOIDIN (J.) — 1951 — Recherche de la tyrosinase et de la laccase chez les Basidiomycètes en culture pure. *Rev. Mycol.*, t. 16, p. 173.
- BOISSON (Cl.) — 1968 — Morphogénèse des structures agrégées de l'appareil végétatif du *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. *C. R. Acad. Sci.* **267**, p. 1578.
- CHEVAUGEON (J.), CLOUET (L.) — 1963 — Temps et lieu des deux événements aléatoires impliqués dans la modification extra-chromosomique du *Pestalozzia annulata*. *C. R. Acad. Sci.* **256**, p. 4068.
- CHEVAUGEON (J.) — 1963 — Une période d'incubation s'interpose entre deux événements impliqués dans la modification extra-chromosomique du *Pestalozzia annulata*. *C. R. Acad. Sci.* **257** : 217.
- GARRETT (S. D.) — 1953 — Rhizomorph behaviour in *Armillaria mellea* (Vahl) Quél. I. Factors controlling rhizomorph initiation by *A. mellea* in pure culture. *Ann. Bot. London N. S.* **17**, 65 : 63-79.

- GOOS (R. D.) — 1962 — The occurrence of *Sphaerostilbe repens* in central american soils. *Ann. J. Botany* 49 : 19.
- GOUJON (M.) — 1967 — Mise en évidence de trois phases distinctes dans le développement du *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi en ce qui concerne la formation des sclérotés. *C. R. Acad. Sci.* 264 : 2989.
- GOUJON (M.) — 1967 — Orientation et fonction des transferts de protoplasme chez le *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi. *C. R. Acad. Sci.* 264 : 261.
- GOUJON (M.) — 1968 — Mise en évidence dans le mycélium de *Corticium rolfsii* (Sacc.) d'un facteur morphogénétique responsable de l'apparition des sclérotés. *C. R. Acad. Sci.*, 267 : 409.
- GUILLAUMIN (J. J.) — 1967 — Recherches sur la structure et le fonctionnement de l'apex du rhizomorphe d'*Armillaria mellea* (Vahl) Quélet. *D.E.A. Clermont-Ferrand*.
- GUILLAUMIN (J. J.) — 1970 — Morphologie et anatomie des organes agrégés chez l'Ascomycète parasite *Sphaerostilbe repens* B. et Br.
- JACQUES-FELIX (M.) — 1968 — Recherches morphologiques, anatomiques, morphogénétiques et physiologiques sur des rhizomorphes de champignons supérieurs et sur le déterminisme de leur formation. II. Recherches sur la morphogénèse des rhizomorphes et télopodes en culture pure. *Bull. Soc. Mycol. Fr.*, 84, 2 : 161.
- JEREBZOFF (S.) — 1961 — Etude de phénomènes périodiques provoqués par des facteurs physiques et chimiques chez quelques champignons. *Thèse Fac. Sci. Univ. Toulouse* 495 : 1961.
- LARPEY (J. P.) — 1966 — Caractères et déterminisme des corrélations d'inhibition dans le mycélium jeune de quelques champignons. *Thèse Fac. Sci. Univ. Clermont-Ferrand* 53 : 1965.
- LINDBERG (G.), FAHRAEUS (G.) — 1952 — Nature and formation of phenol oxidases in *Polyporus zonatus* and *Polyporus versicolor*. *Physiol. Plant.* 5 : 277.
- LISON — 1960 — Histochimie et cytologie animales. Vol. 2 (description de la technique de LAIDLAW).
- MANACHERE (G.) — 1967 — Déterminisme endogène du rythme de fructification de *Coprinus congregatus* Bull. ex. Fr. en cultures éclairées. *C. R. Acad. Sci.* 265 : 1485.
- MARCOU (D.) — 1961 — Notions de longévité et nature cytoplasmique du déterminant de la sénescence, chez quelques champignons. *Thèse Fac. Sci. Univ. Paris Centre d'Orsay* 7.
- NGUYEN VAN (H.) — 1967 — Etude de rythmes internes de croissance chez le *Podospira anserina* Rhem. *Thèse Fac. Sci. Univ. Paris Centre d'Orsay*.
- SNIDER (P. J.) — 1959 — Stages of development in rhizomorphic thalli of *Armillaria mellea* (Vahl) Quélet. *Mycologia* 51, 5, 693.
- TOWNSEND (B. B.) — 1954 — Morphology and development of fungal rhizomorphs. *Trans. brit. Mycol. Soc.* 37, 3.