

Nouvelles observations sur les spores d'*Epichloe typhina* (Fr. ex Tul.), Clavicipitacée pathogène des graminées

C. LEYRONAS* et G. RAYNAL**

*Unité de pathologie végétale, INRA, UR 407, Domaine Saint Maurice,
BP 94, 84143 Monfavet Cedex, France

**UMR Epidémiologie végétale, INRA-INA P.G.,
78850 Thiverval-Grignon, France

Résumé – *Epichloe typhina* est un champignon ascomycète phytopathogène possédant 3 types de spores : spermaties, ascospores et conidies issues d'ascospores. Toutes ces spores sont produites par la phase épiphyte du champignon qui s'exprime sous la forme de manchons mycéliens enserrant les inflorescences des graminées de type Pooideae. L'implication de chacune de ces spores dans les processus infectieux est mal connue. Leur germination sur milieu artificiel et milieu naturel a été étudiée. Les spermaties ont une germination bipolaire et leur rôle semble limité à celui de gamète mâle. Les ascospores forment des tubes germinatifs pour la production de mycélium ainsi que des conidiophores qui produisent une nouvelle génération de spores asexuées : les conidies. Ces spores, bien que morphologiquement identiques aux spermaties, forment un tube germinatif et un conidiophore qui produit une nouvelle génération de conidies. Nous décrivons pour la première fois une trame mycélienne formée par l'accolement des ascospores d'*E. typhina*, produisant une quantité importante de conidies en conditions humides.

***Epichloe typhina* / *Neotyphodium typhinum* / germination / trame mycélienne / conidiation itérative**

Abstract – *Epichloe typhina* is an ascomycete and phytopathogenic fungus with 3 types of spores: spermatia, ascospores and conidia. All these spores are produced by the epiphytic stage of the fungus that forms mycelial stroma choking the inflorescences of Pooideae grasses. The role of each spore in infection processes is not well known. Spore germination on artificial and natural media was studied. Spermatia germinate bipolarly and their role seems to be limited to that of male gametes. Ascospores form germ-tubes for mycelial production and also conidiophores that produce a new generation of asexual spores. Although these spores are morphologically identical to spermatia, they not only form a germ-tube but also a conidiophore producing a new generation of conidia. We describe for the first time a mycelial net formed by aggregation of ascospores, producing a huge quantity of conidia under wet conditions.

***Epichloe typhina* / *Neotyphodium typhinum* / germination / mycelial net / iterative conidiation**

* Correspondence and reprints: christel.leyronas@avignon.inra.fr

INTRODUCTION

Les champignons du genre *Epichloe* (Ascomycètes, Clavicipitacées) peuvent se trouver sur tous les continents, particulièrement dans les zones tempérées. Ils provoquent au printemps et en début d'été la formation de manchons mycéliens (quenouilles) sur les inflorescences de certaines graminées fourragères (Pooideae) et les stérilisent.

E. typhina (Fr. ex Tul.), qui a pour hôte *Dactylis glomerata* L., est un *Epichloe* de type 1, ou antagoniste (Schardl, 1996 ; White *et al.*, 1993), c'est-à-dire que chaque thalle infecté produit un manchon mycélien. Le champignon stérilise la plante et forme ses structures de reproduction aux dépens de cette dernière. Pendant la phase végétative du dactyle, *E. typhina* se trouve sous forme endophyte (*Neotyphodium typhinum* (Morgan Jones & Gams) Glenn Bacon & Hanlin) : son mycélium colonise les tissus végétaux sans symptôme sur la plante. Il est à noter que certains anamorphes du genre *Neotyphodium* (anciennement *Acremonium*) tels que *N. lolii* Latch, Christensen & Samuels (de *Lolium perenne* L.) et *N. coenophialum* Morgan-Jones & Gams (de *Festuca arundinacea* Schreber) sont des endophytes stricts, c'est-à-dire qu'ils ont perdu la faculté de reproduction sexuée. Ils procurent à la plante une résistance accrue aux stress biotiques et abiotiques et se disséminent grâce à ses semences. Une caractéristique notable de ces associations est la production de toxines pouvant être dommageables pour les Vertébrés. Contrairement aux endophytes stricts, les *Epichloe* formant des quenouilles ne produisent pas de mycotoxines (Leuchtman *et al.*, 2000). Ainsi, au moment de la montaison, le mycélium d'*E. typhina* se multiplie fortement et enserre l'ébauche d'inflorescence jusqu'à produire un manchon mycélien de plusieurs centimètres de longueur. Dans un premier temps le manchon est blanc et produit de petites spores réniformes typiques des *Neotyphodium* ($4.9 \pm 0.4 \times 2.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$) (White, 1993) issues de la reproduction asexuée, appelées spermaties. Celles-ci sont transportées par des Diptères Anthomyiides qui se nourrissent et pondent sur les quenouilles (Bultman *et al.*, 1995). Le champignon étant hétérothallique, lorsqu'une spermatie est déposée sur un stroma de type sexuel opposé, celui-ci s'épaissit, se creuse de loges périthéciales et devient orange. Lorsque la quenouille est mûre et en conditions de forte humidité, les ascospores sont activement éjectées et dispersées par le vent (Raynal, 1991). Ces spores filiformes multiseptées particulièrement typiques mesurent $176 \pm 34.3 \times 1.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (White, 1993). Les ascospores produisent une nouvelle génération de conidies, morphologiquement identiques aux spermaties.

Afin de mieux comprendre la biologie et le rôle de chaque type de spores dans les processus infectieux, leur germination a été étudiée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Spermaties

Des stromas blancs indemnes d'hyperparasites récoltés fin avril sont placés dans des tubes à essai contenant de l'eau stérile. La surface des stromas est frottée à l'aide d'une spatule afin de libérer les spermaties. Les suspensions de spermaties sont étalées sur milieu nutritif (Potato Dextrose Agar, PDA).

Ascospores

Des quenouilles orange dépourvues d'hyperparasites prélevées à la mi-juin sont rendues turgescentes en plongeant l'extrémité de la tige quenouillée dans de l'eau. Les manchons mycéliens sont placés à température ambiante au dessus de boîtes de Petri contenant du PDA, ou de tissus végétaux de dactyle ou des lames de verre (sans source nutritionnelle extérieure). Les quenouilles ainsi disposées éjectent de nombreuses ascospores pendant plusieurs heures.

Conidies issues d'ascospores

Des ascospores sont récoltées sur PDA en boîtes de Petri. Celles-ci sont stockées en chambre climatisée 24 heures à 24 °C afin de permettre aux ascospores de produire des conidies. Après ce temps, de l'eau stérile est versée sur le PDA, la surface est raclée à l'aide d'une spatule afin de libérer les conidies enchâssées dans le milieu gélosé, puis la suspension est filtrée sur toile à bluter (diamètre des pores : 33 µm) afin d'éliminer les ascospores recueillies lors du raclage. Les conidies récoltées sont replacées sur PDA.

Tout le matériel ayant reçu des spores est placé à 24 °C en lumière continue. L'état germinatif des spores est enregistré au bout de 24 heures. Tous les types de spores sont observés au microscope optique, les ascospores productrices de conidies font également l'objet d'observations au microscope électronique à balayage.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Spermaties

Après 24 h sur milieu de culture, la grande majorité des spermaties ont développé deux tubes germinatifs (Fig. 1). Ces spores issues de la reproduction

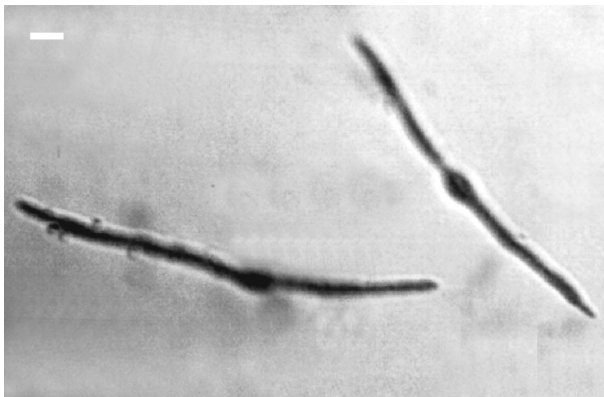


Fig. 1. Germination bipolaire de spermaties de manchons mycéliens blancs, issues de la reproduction asexuée d'*E. typhina*. Echelle : 10 µm.

asexuée ne présentent pas d'autres particularités. L'observation de leur germination, la période de leur production par rapport au cycle du dactyle, ainsi que des résultats négatifs obtenus lors d'inoculations artificielles (Leyronas, 2005) laissent penser qu'elles n'interviennent pas dans l'infection des tissus végétaux mais seulement en tant que gamètes mâles pour la fertilisation des stromas de type sexuel opposé et le déclenchement de la reproduction sexuée.

Ascospores

En conditions humides, des conidiophores se développent perpendiculairement à l'axe de chaque ascospore déposée sur milieu nutritif ou surface inerte (verre) (Fig. 2A). Ces conidiophores sont identiques à ceux observés sur le mycélium de culture pure ou sur les stromas blancs : ils mesurent une vingtaine de micromètres et sont formés d'une seule cellule conidiogène (phialide) effilée à son extrémité. Contrairement à ce qu'avaient observé Bacon & Hinton (1988), les ascospores d'*E. typhina* peuvent également produire des tubes germinatifs classiques qui s'allongent pour donner du mycélium (Fig. 2B).

Lorsque les ascospores sont déposées en nombre à la surface de tissus végétaux ou d'une surface inerte telle que le verre, une trame se forme par leur accollement. Au bout de 24 heures, l'assemblage des ascospores forme des filaments de grande taille dans lesquels les ascospores ne sont plus discernables (Fig. 3). Ces filaments s'organisent en boucles assez régulières (Fig. 3 et 4) qui créent une trame mycélienne plaquée à la surface du végétal. En conditions humides la trame se hérissé de conidiophores produisant ainsi une quantité importante de conidies (Fig. 4 et 5). La microscopie électronique à balayage (MEB) permet de voir que les conidies nouvellement produites, d'abord verticales sur le conidiophore, adoptent une forme en T caractéristique lorsqu'elles sont mûres, avant d'être libérées.

Les mécanismes permettant la formation de la trame et son maintien n'ont pas été élucidés. Nous pouvons cependant émettre des hypothèses quant à la fonction de la trame pour le champignon : elle pourrait augmenter la résistance des ascospores à la chaleur, la dessiccation ou les UV, puis permettre la production d'importantes quantités de conidies à la faveur de conditions favorables de température et d'humidité.

Des résultats d'inoculations artificielles réalisées avec des ascospores d'*E. typhina* sur différents organes du dactyle, laissent penser que les semences peuvent être contaminées en surface par les ascospores émises au champ. De plus, les jeunes talles à la base des plantes sont susceptibles d'être contaminées lors de la récolte et peut-être après, par les multiples conidies produites en conditions humides par les trames d'ascospores (Leyronas, 2005).

Conidies issues d'ascospores

Après avoir différencié un tube germinatif, les conidies issues d'ascospores forment un conidiophore (Fig. 6). Au bout de ce conidiophore se forme une nouvelle génération de conidies identiques aux premières. Ce phénomène est appelé conidiation microcyclique ou itérative : de nouvelles spores sont formées sans l'intervention de structures mycéliennes. Ce phénomène existe chez d'autres champignons mais généralement en conditions stressantes. Chez *E. typhina* il semble se produire naturellement, même en présence de conditions favorables.

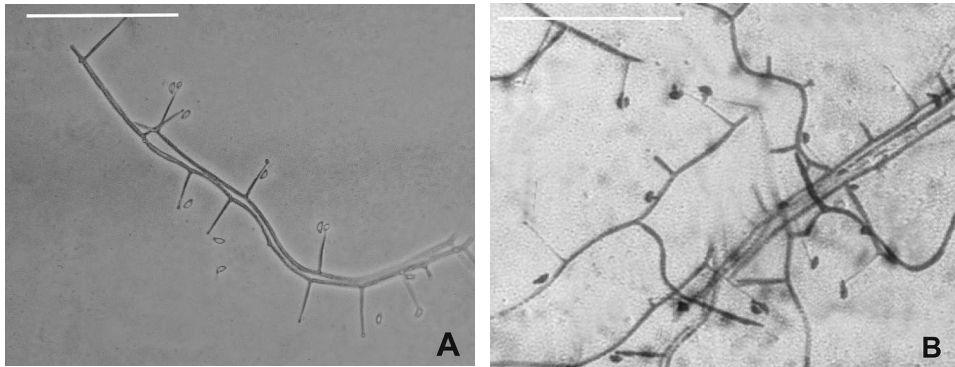


Fig. 2. **A** : Ascospores d'*E. typhina* récoltées sur des stromas orange. Chaque ascospore porte plusieurs conidiophores produisant des conidies réniformes typiques. Echelle : 50 μm . **B** : Les ascospores portent des conidiophores mais également des ramifications issues de l'élongation de tubes germinatifs. Ces ramifications donnent naissance à du mycélium. Echelle : 50 μm .

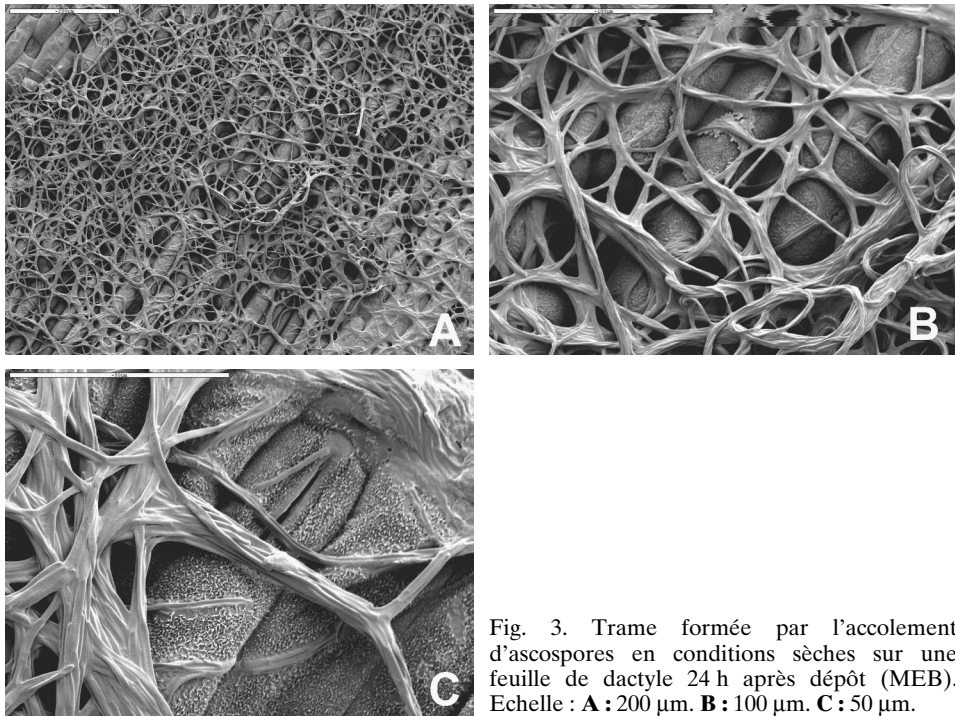


Fig. 3. Trame formée par l'accolement d'ascospores en conditions sèches sur une feuille de dactyle 24 h après dépôt (MEB). Echelle : **A** : 200 μm . **B** : 100 μm . **C** : 50 μm .

Nous n'avons pas pu quantifier le nombre de générations produites par conidiation microcyclique, mais Bacon et Hinton (1991) sur *E. typhina* de *Sphenopholis obtusata* avaient pu en dénombrer 2. Ils notaient que la troisième génération produisait du mycélium. Nous notons que les conidies d'*E. typhina* comportent des tubes germinatifs classiques, susceptibles de produire un mycélium, dès la première génération.

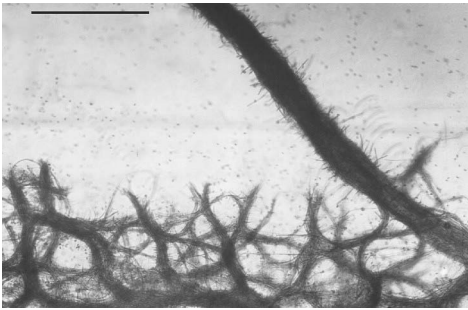


Fig. 4. Trame hautement sporulante formée par l'accolement d'ascospores. Echelle : 100 μm .

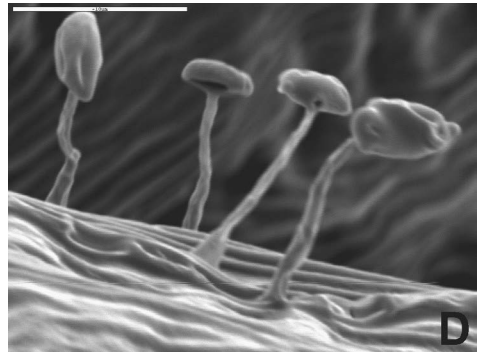
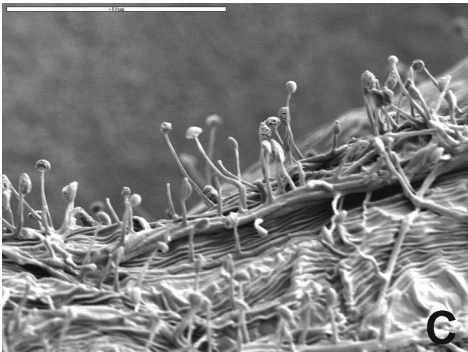
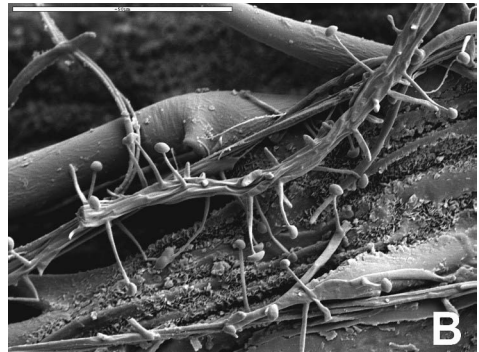
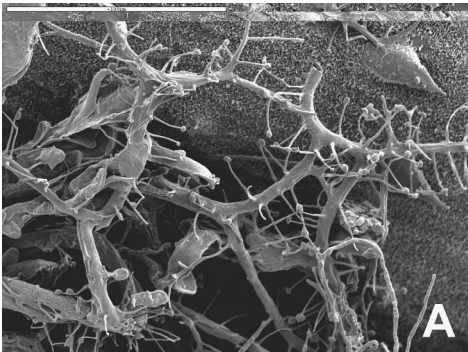


Fig. 5. **A** : Motif de la trame formée par l'accolement d'ascospores, en conditions humides 24 h après dépôt. Echelle : 100 μm . **B**, **C** : filaments sporulants formés par l'accolement d'ascospores 24 h après dépôt sur une étamine de dactyle en conditions humides. Echelle : 50 μm . **D** : conidiophores formés à partir de la trame d'ascospores portant des conidies nouvellement produites. Les conidies formant un « T » avec l'axe du conidiophore sont à maturité et prêtes à être libérées. Echelle 10 μm .

L'étude des spermaties et des conidies issues d'ascospores, montre qu'en dépit de leur ressemblance morphologique, leur germination n'est pas la même. Cette constatation appuie l'idée que ces deux types de spores n'ont pas le même rôle dans les processus infectieux.

Remerciements. Nous remercions Nelly Wolff, INRA Versailles UR 251, pour son aide aux observations en microscopie électronique à balayage.



Fig. 6. Germination d'une conidie issue d'ascospore : formation d'un tube germinatif et d'un conidiophore sur lequel se développe une nouvelle génération de conidies. Echelle : 10 μ m.

RÉFÉRENCES

- BACON C.W. & HINTON D., 1988 — Ascosporic iterative germination in *Epichloe typhina*. *Transactions of the British Mycological Society* 90 : 563-569.
- BACON C.W. & HINTON D., 1991 — Microcyclic conidiation cycles in *Epichloe typhina*. *Mycologia* 83: 743-751/
- BULTMAN T.L., WHITE J.F.JR, BOWDISH T.I., WELCH A.M. & JOHNSTON J., 1995 — Mutualistic transfer of *Epichloe* spermatia by *Phorbia* flies. *Mycologia* 87 : 182-189.
- LEUCHTMANN A., SCHMIDT D., BUSH L.P., 2000 — Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma forming and seed transmitted *Epichloe/Neotyphodium* endophytes. *Journal of Chemical Ecology* 26 : 1025-1036.
- LEYRONAS C., 2005 — Avancées dans la compréhension des *Neotyphodium* et *Epichloe*, Clavicipitacées endophytes des graminées fourragères et à gazon. Méthodes de lutte. Thèse. Ecole doctorale ABIES/INA P.G., Paris, 26 mai 2005, 168 p.
- RAYNAL G., 1991 — Libération des ascospores d'*Epichloe typhina*, agent de la quenouille du dactyle. Conséquences pour l'épidémiologie et la lutte. *Fourrages* 127 : 345-358.
- SCHARDL C.L., 1996 — *Epichloë* species: fungal symbionts of grasses. *Annual Review of Phytopathology* 34: 109-130.
- WHITE J.F., 1993 — Endophyte-host associations in grasses. XIX. A systematic study of some sympatric species of *Epichloe* in England. *Mycologia* 85: 444-455.
- WHITE J.F., MORGAN-JONES G. & MORROW A.C., 1993 — Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 44: 13-37.

