



TRAVAUX MYCOLOGIQUES

dédiés à

R. KÜHNER

Numéro spécial du Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon
43^e année ————— Février 1974

LES ANSES D'ANASTOMOSE DES MYCÉLIUMS MONOCARYOTIQUES, DICARYOTIQUES ET HÉTÉROCARYOTIQUES CHEZ *GEOPETALUM CARBONARIUM* (A. et S.) Pat.

par Paule TERRA *

Résumé. — Tandis que les anses d'anastomose des mycéliums dicaryotiques sont toujours des anses ouvertes, celles des mycéliums hétérocaryotiques de facteurs A différents et B identiques, restent fermées et ceux-ci ne peuvent être cultivés. La reconnaissance d'une tétrapolarité masquée sous une bipolarité apparente est rendue plus délicate par le fait qu'environ 50 % des mycéliums monocaryotiques acquièrent spontanément des anses ou des crochets.

C'est en 1954 que R. KÜHNER poursuivant ses recherches sur les caractères cytologiques des mycéliums de Basidiomycètes, entreprit l'étude de *Geopetalum carbonarium*. Le but initial de son travail étant l'examen morphologique et caryologique des spores, des germinations et des mycéliums primaires et secondaires, R. KÜHNER n'isola qu'un petit nombre de mycéliums monosporiques. Il les confronta néanmoins entre eux et obtint un tableau dont l'interprétation lui parut délicate et l'amena à conclure : « la tétrapolarité est difficile à reconnaître à cause d'une abondance inusitée de copulations illégitimes ». Il étudia le mycélium formé dans ces copulations illégitimes et vit que « les noyaux et boucles se comportent de façon fort variable ».

R. KÜHNER demeura très intrigué par le comportement de ce champignon et c'est pourquoi le récoltant à nouveau en 1963, il nous offrit d'en reprendre l'étude, ce dont nous le remercions bien vivement.

I. MATÉRIEL ET TECHNIQUES DE CULTURE.

Le carpophore récolté par R. KÜHNER aux Echets (Ain) et que nous symboliserons (G. c. I) nous fournit par germination de ses spores en semis clair, 55 mycéliums monosporiques. Après fructification au laboratoire

* Depuis 1969 ce travail a bénéficié de la collaboration technique de Mme Jeanne BARALE, technicien du C.N.R.S.

(Pl. I, C et D) d'un mycélium dicaryotique de cette souche, en 1970, nous avons isolé 61 cultures monosporiques : (G. c. II).

Le milieu de culture le plus favorable à la germination des spores et à la croissance rapide des mycéliums est celui de Hagem¹ avec une concentration plus élevée en extrait de malt. Des milieux particuliers à base de jus de cerise² ou de flocons d'avoine³ qui favorisent l'apparition d'hyphes aériennes sur les cultures ont également été utilisés. La production de mycélium aérien a été accrue en plaçant sur le milieu de culture gélosé et après ensemencement de celui-ci, un disque de papier fin et poreux. Pour améliorer le pourcentage des « néohaplontes » après broyage d'un mycélium dicaryotique, nous avons au préalable fait pousser ce dernier sur un milieu de Hagem gélosé additionné de 0,5 % d'oxgall⁴ suivant la technique préconisée par TAKEMARU (1964).

Pour l'obtention des carpophores, divers milieux ont été expérimentés ; de bons résultats ont été obtenus avec un milieu à base de Hagem gélosé auquel on ajoute des fragments de carotte, du sable et du charbon de bois grossièrement pulvérisé.

L'étude caryologique des mycéliums a été faite suivant les techniques classiques à partir de cultures sur lames gélosées et de cultures en milieu liquide sous collodion.

II. POLARITÉ - MYCÉLIUMS DICARYOTIQUES ET HÉTÉROCARYOTIQUES.

A partir des 55 mycéliums monosporiques de G. c. I et de 12 des 61 mycéliums de G. c. II, nous avons effectué plus de 500 confrontations sur disques gélosés en boîte de Petri. Des prélèvements pour l'observation immédiate et pour des subcultures ont été faits en des points définis des cultures des deux partenaires : ligne de contact et marges.

1. Solution nutritive de Hagem enrichie en extrait de malt : Chlorure d'ammonium : 0,5 g ; Phosphate monopotassique : 0,5 g ; Sulfate de magnésium : 0,5 g ; Glucose pur : 5 g ; Extrait de malt : 15 g ; Eau : 1 000 cm³.

2. Milieu gélosé au jus de cerise : Décoction de 200 g de cerises dans 200 cm³ d'eau, filtrée et stérilisée à 110° C pendant 30 minutes. Ajouter 800 cm³ d'une solution gélosée à 2 % préalablement stérilisée pendant 20 mn à 120° C. Stériliser ensuite le mélange pendant 5 mn à 102° C.

N.B. — Le pH de ce milieu étant très acide (3,8 à 4,6) la dernière stérilisation doit être effectuée à une température à peine supérieure à 100° C pour que le milieu se solidifie en refroidissant.

3. Milieu aux flocons d'avoine : Flocons d'avoine très finement broyés : 40 g ; Gélose : 15 g ; Eau : 1 000 cm³.

4. Oxgall : Bile déshydratée. Production BBL distribuée en France par Ets Mérieux.

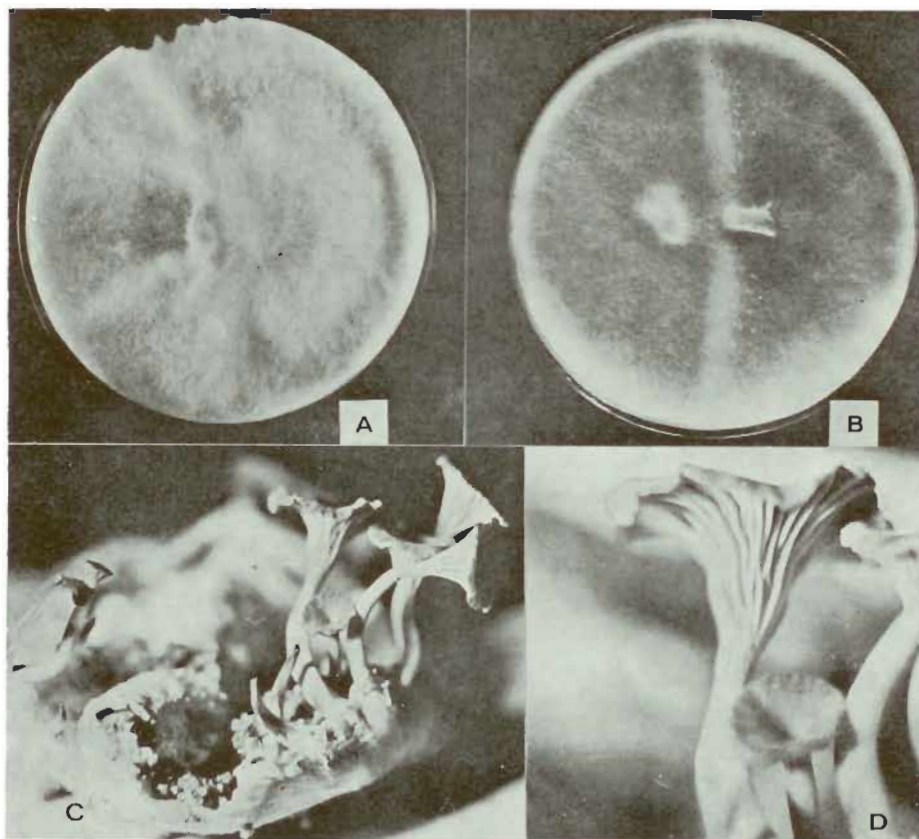


PLANCHE I

A : Confrontation compatible de type $A_1B_1 \times A_2B_2$. Le mycélium dicaryotique s'étend très rapidement sur toute la surface des cultures.

B. Confrontation incompatible de type $A_1B_1 \times A_2B_1$. Le mycélium hétérocaryotique forme un bourrelet d'hyphes aériennes sur la ligne de contact.

C et D : Carpophores de *Geopetalum carbonarium* obtenus au laboratoire sur un milieu à base de Hagem gélosé, carotte et charbon de bois.

L'examen microscopique montre que dans les confrontations de type $A_1B_1 \times A_2B_2$, le mycélium présente des articles à dicaryons avec des cloisons très régulièrement bouclées (Pl. II, 2-5). Ce mycélium apparaît d'abord sur la ligne de contact, 3 ou 4 jours après l'ensemencement, et s'étend rapidement aux marges des cultures. (Pl. I A). Une telle réaction sera symbolisée (+ + +) dans le tableau 1. Ce mycélium dicaryotique et lui seul, présente très souvent, comme l'avait remarqué R. KÜHNER, des poils capités (Pl. II, 1).

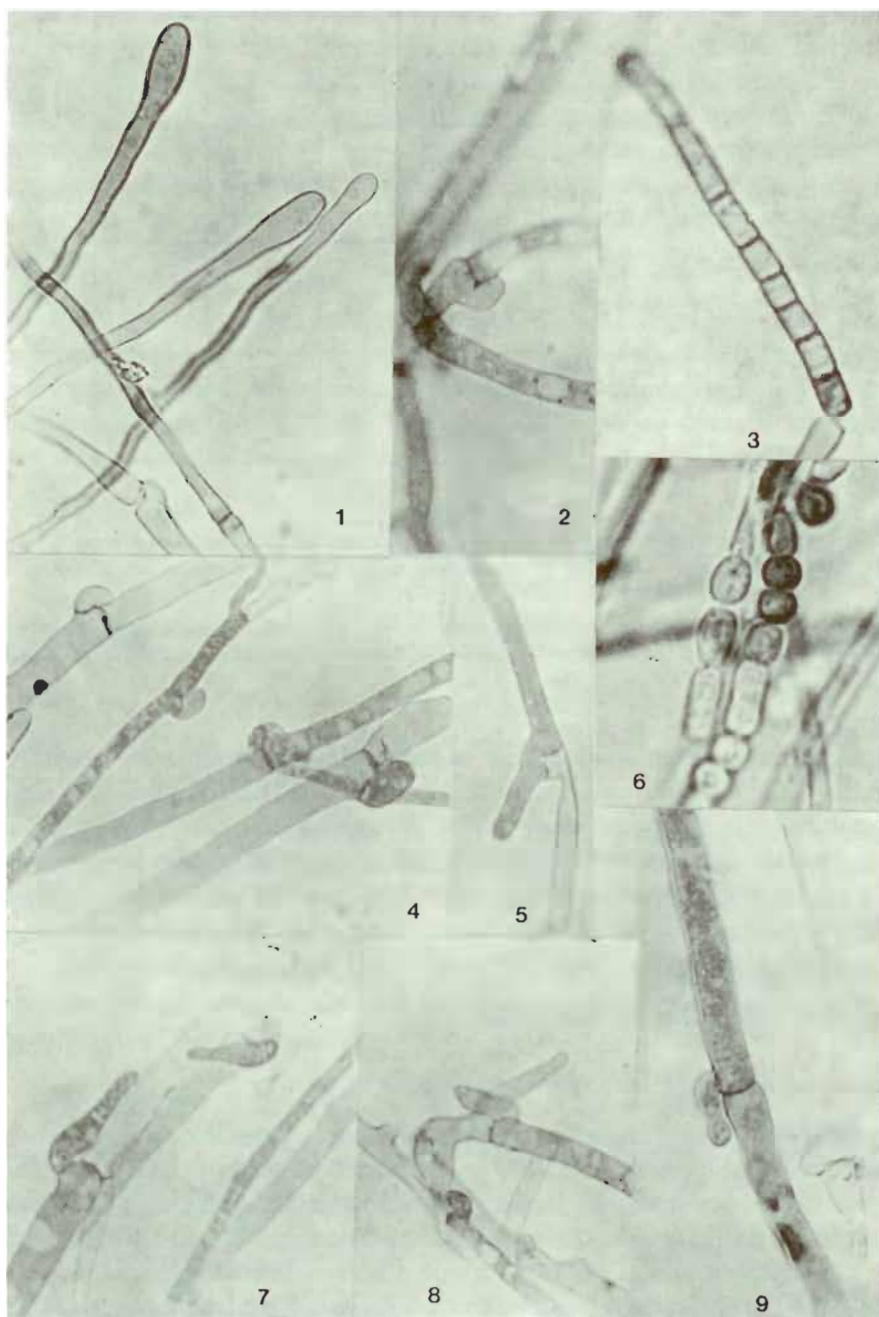
Dans les confrontations de type $A_1B_1 \times A_2B_1$, le mycélium prélevé sur la ligne de contact présente des cloisons munies de fausses boucles, les articles sont uninucléés, sauf l'article terminal qui est binucléé et un noyau est prisonnier dans la boucle. Ce mycélium généralement considéré comme hétérocaryotique reste étroitement localisé à la ligne de contact (Pl. I - B). Une telle réaction sera symbolisée (— + —) dans le tableau 1.

Les subcultures des prélèvements effectués sur la ligne de contact de ces deux types de confrontations, ont un devenir différent. Sur un milieu gélosé, le mycélium hétérocaryotique donne naissance parfois dès le premier repiquage, à un mycélium à cloisons simples dans lequel la répartition des noyaux est celle décrite par R. KÜHNER pour les mycéliums primaires : article terminal cénocytique, les autres articles le plus souvent uninucléés. En milieu liquide profond, la transformation de ce mycélium hétérocaryotique en mycélium primaire est immédiate. Le mycélium dicaryotique est stable, non seulement sur milieu gélosé où cultivé depuis 9 ans il ne montre aucun signe de dégénérescence, mais également en milieu liquide profond où ses vraies boucles persistent.

Le tableau 1 schématise les résultats des confrontations en indiquant pour G.c. I et G.c. II, leurs nombres respectifs de représentants dans chaque groupe de polarité. De la lecture de ce tableau il ressort nettement que la tétrapolarité de *Geopetalum carbonarium* est masquée sous une bipolarité apparente. Il est possible de dévoiler une tétrapolarité parfaite : il suffit, comme nous l'avons fait pour les 66 confrontations de G.c. II, d'ensemencer en milieu liquide profond les prélèvements effectués sur la ligne de contact ; seuls les véritables mycéliums dicaryotiques présentent des boucles.

PLANCHE II

- 1 : Poils capités apparaissant sur le mycélium dicaryotique.
- 2 et 5 : Véritables anses d'anastomose formées sur le mycélium dicaryotique.
- 3 et 6 : Oïdies sur certains mycéliums monosporiques.
- 4, 7, 8 et 9 : Fausses anses sur les mycéliums monosporiques.



GcI	GcII		A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂
14	4	A ₁ B ₁		— — —	— + —	+ + +
11	3	A ₁ B ₂			+ + +	— + —
7	3	A ₂ B ₁				— — —
21	2	A ₂ B ₂				

TABLEAU 1

Tableau de polarité idéal résumant les résultats des confrontations pour 53 mycéliums monosporiques de G.c. I et 12 mycéliums de G.c. II. Le nombre des mycéliums de chaque pôle est indiqué à gauche du tableau.

+ + + : Formation de mycélium dicaryotique sur toute l'étendue de la culture.
 — + — : Le mycélium hétérocaryotique à fausses boucles est limité à la ligne de contact.

Mais il faut bien préciser que ce tableau qui récapitule les résultats de plus de 500 confrontations, est un tableau idéal. Il ne tient pas compte des « troubles du comportement » que peuvent présenter les mycéliums monosporiques de *Geopetalum carbonarium*, troubles dont les manifestations au cours des confrontations, sont extrêmement gênantes, empêchant toute interprétation à la fois correcte et rapide des résultats obtenus.

III. MYCÉLIUMS MONOSPORIQUES.

1. Evolution de ces mycéliums avec le temps.

Examinés quelques jours seulement après leur isolement, les mycéliums monosporiques de G.c. I., présentent tous des hyphes aux cloisons simples. Mais un peu plus tard, nous remarquons que des prélèvements effectués sur la marge de certaines confrontations, sont constitués d'hyphes avec des crochets et des anses. Il s'agit d'une acquisition spontanée de ces formations par certains mycéliums monosporiques, comme nous le confirme

l'observation de la culture-témoin, et non pas d'une réaction en présence du partenaire de confrontation.

Six mois plus tard, 12 mycéliums de G.c. I (c'est-à-dire 20 % environ) présentent des crochets ou des anses. Les 55 mycéliums de G.c. I, conservés à 4° C, seront examinés avant chaque repiquage annuel et nous constaterons que le nombre des mycéliums à anses s'accroît régulièrement puis se stabilise. Certains mycéliums « régressent » même, c'est-à-dire reprennent des cloisons simples ! Après 6 années de culture le nombre des mycéliums monosporiques de G.c. I possédant ou ayant possédé des anses ou crochets, n'a pas dépassé 32, soit environ 60 %.

Pour les 61 mycéliums monosporiques de G.c. II, nous avons pratiqué des examens et des repiquages mensuels et les avons cultivés à température élevée (25° C). Le tableau suivant indique les nombres respectifs des mycéliums à cloisons simples et des mycéliums à anses, au cours des 6 premiers mois de culture et lors du dernier examen au bout de 18 mois.

Age des mycéliums monosporiques

	15 jours	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois	6 mois	18 mois
Nombre de mycéliums à cloisons simples	48	38	34	32	31	31	31	30
Nombre de mycéliums avec des anses	13	23	27	29	30	30	30	31

A la lecture de ce tableau, on s'aperçoit que le pourcentage des mycéliums monosporiques à anses qui est de 20 % 15 jours au plus après leur naissance, atteint 45 % au bout de 2 mois, puis se stabilise très rapidement aux environs de 50 % .

La transformation des mycéliums à cloisons simples en mycéliums à anses, semble plus rapide lorsqu'il sont cultivés à 25° C, que lorsqu'ils sont conservés à 4° C, mais une sorte d'équilibre tend ensuite à s'établir.

2. Morphologie des anses et répartition des noyaux.

L'étude microscopique révèle une très grande diversité morphologique et caryologique de ces mycéliums à anses. Tous les types de fausses boucles décrits par R. KÜHNER, ont été reconnus à nouveau : crochets à peine courbés appendus le long des hyphes et cloisonnés ou non à leur base, crochets dont l'extrémité amincie est étroitement appliquée contre la paroi de l'hyphe simulant une sorte de bec de canard, dans ces deux cas l'hyphe

porteuse étant ou non cloisonnée à leur niveau, enfin anses bien formées et cloisonnées et même très rarement véritables anses d'anastomose ouvertes. (Planche II : 4-7-8-9).

Lorsqu'il s'agit de simples crochets, la répartition des noyaux dans les articles est variable, mais l'article terminal reste cénocytique ; on peut observer un noyau dans les crochets, mais ce n'est pas général. Lorsque les anses sont bien formées mais ne s'ouvrent pas, l'article terminal est binucléé, les articles précédents uninucléés et un noyau reste enfermé dans l'anse. Enfin lorsque les anses d'anastomose sont ouvertes, les articles du mycélium sont régulièrement binucléés.

3. *Les oïdies.*

L'examen périodique répété des mycéliums monosporiques a permis de détecter chez certains d'entre eux (20 % environ) la production d'oïdies : (Planche II : 3-6). Celles-ci apparaissent en général dans les mycéliums à cloisons simples. La formation de ces oïdies est sans doute liée à un état physiologique particulier du mycélium à une période donnée, car, d'une part, leur présence n'est pas constante, et d'autre part, il ne nous a pas été possible d'en obtenir « sur commande » en repiquant ces mycéliums sur des milieux de culture (fragments de carottes, tiges de mousses) favorisant normalement la production d'oïdies.

4. *Relations entre les conditions de culture et la permanence des anses.*

Chez les mycéliums monosporiques, les anses sont surtout abondantes sur les hyphes aériennes et toutes les techniques qui favorisent la production de mycélium aérien (en particulier papier « pelure » disposé à la surface des cultures) permettent de détecter plus facilement les mycéliums à anses.

Cultivés en milieu liquide profond et immobile, les mycéliums monosporiques perdent très régulièrement leurs anses, même lorsque celles-ci sont ouvertes et fonctionnelles. Par contre en milieu liquide très fortement agité, les anses persistent. Il semble donc y avoir une influence déterminante de l'aération du milieu.

5. *Formation de fausses anses chez les « néohaplontes ».*

Après culture en milieu liquide profond, un mycélium dicaryotique de G. c. I a été broyé pendant 25 minutes à l'aide d'un broyeur de type Ultra Turrax. Deux boutures sans boucles sont recueillies. Confrontées entre elles, ces deux boutures redonnent un mycélium dicaryotique, et testées avec les 4 pôles, elles révèlent les facteurs suivants :

n 1 : A₁B₁

n 2 : A₂B₂

Trois mois après son isolement, n° 1 possède des fausses boucles sur ses hyphes, tandis que n° 2 en est dépourvu, mais par contre présente des oïdies.

Après culture sur un milieu de Hagem gélosé additionné d'oxgall, les mycéliums dicaryotiques perdent totalement leurs anses et le broyage permet d'obtenir un très fort pourcentage de néohaplontes : environ 90 %, tandis que dans les conditions normales, le pourcentage de néohaplontes ne dépasse pas 5 à 10 %.

Pour le même mycélium dicaryotique, sur 24 prélèvements effectués, 23 sont des néohaplontes ; 22 appartiennent au pôle A_2B_2 et 1 au pôle A_1B_1 .

Un mois après leur isolement, 4 néohaplontes de pôle A_2B_2 , ont des fausses boucles. La formation des anses sur les mycéliums monocaryotiques, qu'ils soient d'origine monosporique ou que ce soient des néohaplontes, n'est donc pas du tout liée aux facteurs de polarité.

6. Les mycéliums monosporiques à double compatibilité.

Chez G. c. I, deux mycéliums monosporiques (n° 2 et n° 14) ont présenté dès les premières confrontations (1963) une double compatibilité, tous deux possédant à la fois les facteurs A_1 et A_2 (Tableau 2).

$$n^{\circ} 2 = A_1A_2B_2$$

$$n^{\circ} 14 = A_1A_2B_1$$

Dans ces deux mycéliums le facteur A_2 semble plus faible que le facteur A_1 :

— ainsi « 14 » diploïdise beaucoup plus lentement le test A_1B_2 que A_2B_2 et ne forme que très difficilement des fausses boucles lorsqu'il est confronté avec A_1B_1 , tandis que celles-ci sont abondantes en présence de A_2B_1 .

— quant au mycélium « 2 » s'il diploïdisait en 1963 à la fois A_1B_1 et A_2B_1 , mais sans former de fausses boucles avec A_1B_2 , il s'est modifié depuis et ne diploïdise plus que A_2B_1 (1970).

Les noyaux de ces mycéliums seraient peut-être des diploïdes partiels, le chromosome portant A_2 étant supplémentaire. Au cours des mitoses successives, le mycélium « 2 » aurait perdu le chromosome, ou un fragment du chromosome, portant A_2 .

IV. CONCLUSIONS.

Cette étude de *Geopetalum carbonarium* portant sur un grand nombre de mycéliums monosporiques et poursuivie pendant plusieurs années, permet de préciser les points suivants :

		A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂
A ₁ A ₂ B ₂	" 2 "	+	—"	+	(+)
A ₁ B ₂		—	—	+	(+)
A ₁ A ₂ B ₁	" 14 "	(+)"	+"	(+)	+
A ₁ A ₂ B ₁		(+)"	+	(+)	+

TABLEAU 2

Tableau des confrontations des mycéliums monosporiques « 2 » et « 14 » en 1963 et en 1970. La constitution de ces mycéliums est indiquée à gauche du tableau.

+ : Formation de mycélium dicaryotique.

(+) : Formation de mycélium hétérocaryotique sur la ligne de contact.

— : Réaction négative.

Le signe " indique que la réaction est lente et peu marquée ou même — " qu'elle n'a pas eu lieu.

1. La tétrapolarité est indiscutable mais, la formation de mycélium à anses sur la ligne de contact de toutes les confrontations mettant en présence des mycéliums monosporiques ayant des facteurs A différents, d'une part, et d'autre part l'acquisition plus ou moins précoce par des mycéliums à cloisons simples de crochets et même d'anses bien formées, trouble l'observateur. Le tableau de polarité établi par R. KÜHNER est parfaitement comparable au nôtre : il suffit de regrouper les pôles ayant les facteurs A identiques et de considérer que les mycéliums « 6 » et « 8 » ont acquis spontanément des anses.

2. L'apparition progressive des anses chez certains mycéliums monosporiques, ne paraît pas être un phénomène propre à *Geopetalum carbonarium* : G.M. BUTLER (1968) signale ce même fait chez *Coprinus disseminatus*, après des périodes de culture prolongées.

3. La formation des anses sur ces mycéliums monosporiques, ne paraît pas liée aux facteurs de polarité. Tous les mycéliums monosporiques à anses,

sont en effet aptes à produire un mycélium dicaryotique lorsqu'ils sont confrontés avec un mycélium monosporique de pôle complémentaire, et à partir d'un mycélium dicaryotique on peut obtenir des néohaplontes à anses de pôles complémentaires.

4. Le mycélium à anses formé sur la ligne de contact dans les confrontations incompatibles, a au contraire sa formation conditionnée par les facteurs de polarité. Il n'apparaît que lorsque les facteurs A sont différents et les facteurs B identiques, et doit être hétérocaryotique. Il ne peut en effet être cultivé comme le mycélium dicaryotique qui n'apparaît que si à la fois les facteurs A et B sont différents, et il ne possède pas, comme ce dernier, de véritables anses d'anastomose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BUTLER G. M., 1968. — Environmentally induced changes in clamp connection incidence in hyphal branching systems of *Coprinus disseminatus*. *Ann. Bot.* 32, 847-862.
- KÜHNER R., 1954. — Germination, caractères mycéliens et polarité de *Geopetalum* (*Cantharellus*) *carbonarium* (A. et S.) Pat.; Etude cytologique des copulations illégitimes. *Ann. Univ. Lyon*, 8, 5-20.
- TAKEMARU T., 1964. — Monokaryotization studies in the Basidiomycetes: I Chemical induction. *Rep. Tott. Mycol. Inst.* 4, 37-40

43, boulevard du 11-Novembre-1918, F-69621 Villeurbanne.
Département de Biologie végétale,
Laboratoire de Mycologie associé au C.N.R.S.,
Université Claude-Bernard (Lyon I).

SOCIETE LINNEENNE DE LYON
33, RUE BOSSUET — 69006 LYON

Commission paritaire n° 52 199
Le gérant : Marc Terreaux