

Laboratoire de Pathologie végétale E. N. I. T. A. de Bordeaux

Les Rouilles du Pin Maritime

Examen des Spores au Microscope Electronique à Balayage

Note préliminaire

Par J. ARTHAUD

Reception du Ms. 15. 11. 1971

Accepté par E. Donaubauer

Abstract

Rust fungi on *Pinus pinaster*. Study of spores with the scanning electron microscope. Description of aecio- and uredospores of three Uredinales, parasitic on *Pinus pinaster* Sol., examined with a scanning electron microscope.

Les spores des Uredinales ont, le plus souvent, une exospore ornée d'aspérités diverses; les uredospores, notamment, sont généralement échinulées, les écidiospores finement verruqueuses, ponctuées, etc.. Ces aspérités ont des dimensions de l'ordre du micron, qui les rendent tout juste perceptibles au microscope photonique; encore vaut-il mieux, pour les observer, monter les spores dans l'eau que dans l'acide lactique, dont l'indice de réfraction (1,44) est trop élevé; le montage à sec donne des images encore plus contrastées, mais moins détaillées. Quant à la forme et aux dimensions précises de ces ornements, le microscope photonique ne permet pas de les déterminer, surtout quand il s'agit des écidiospores, toujours plus finement ornées que les uredospores.

L'apparition du microscope électronique à balayage (dont le principe, maintenant bien connu, ne sera pas rappelé ici) a permis d'obtenir des informations beaucoup plus détaillées sur la morphologie externe de ces spores.

Il nous a paru intéressant de confronter les résultats obtenus, d'une part au moyen d'un objectif semi-apochromatique à immersion 100x/1,30 monté sur un Photomicroscope Zeiss/Oberkochen, d'autre part avec un microscope électronique à balayage «Stereoscan» de Cambridge¹ dans l'étude des spores des trois rouilles du Pin maritime.

En microscopie photonique, les prises de vues à très fort grandissement sont difficiles en raison du *pouvoir séparateur* qui, dans les meilleurs cas, ne saurait descendre au-dessous de 0,25 μ , et de la *profondeur de champ*, inversement proportionnelle au carré de l'ouverture numérique : si l'on prend comme règle d'adopter un grandissement total égal à mille fois l'ouverture numérique, la profondeur de champ n'est que de 0,1 μ pour un grandissement total de 1300 (ON = 1,30).

¹ Il nous est agréable de remercier MM. OERTLI et SAFFON qui ont bien voulu nous accueillir dans leur laboratoire du Centre de Recherches de Pau (Société Nationale des Pétroles d'Aquitaine) pour examiner et photographier au «Stereoscan» un certain nombre d'échantillons mycologiques, et auprès de qui nous avons toujours été reçus avec la plus chaleureuse sympathie.

Les spores examinées ici ont des dimensions comprises entre 14–23 x 10–16 μ et 20–40 x 15–25 μ : il est donc impossible, avec un objectif à immersion, d'obtenir simultanément la netteté du contour de la spore et celle des détails superficiels vus «de face».

On peut tourner la difficulté en effectuant une «stéréosynthèse»: on prend un négatif en mettant au point sur le contour d'une spore, puis un second négatif en mettant au point sur les ornements qui apparaissent sur la face supérieure de la même spore. Les deux négatifs sont agrandis successivement sur le même papier où les deux images viennent se superposer. Cela exige évidemment un repérage minutieux et, le plus souvent, l'élimination (par masques ajourés) des parties inutiles de chaque négatif. C'est un travail astreignant et délicat, et les résultats sont quelquefois disproportionnés avec l'effort nécessaire pour les obtenir.

Quant au pouvoir séparateur, aucun artifice ne permet de l'améliorer sensiblement.

Le microscope électronique à balayage procure une profondeur de champ relativement énorme : 1 mm pour un grandissement de 500 x, 10 microns pour un grandissement de 50.000 x : cette profondeur de champ est inversement proportionnelle au grandissement, et non à son carré comme dans le microscope photonique.

De plus, il opère en «lumière» réfléchie, et non en «lumière» transmise : les images obtenues ont l'aspect de celles que donnerait une loupe binoculaire extrêmement puissante; c'est donc un instrument idéal pour l'étude des structures superficielles.

Son pouvoir séparateur atteint 25 nm (0,025 μ), ce qui permet d'examiner des détails dix fois plus ténus que le microscope photonique.

Enfin cet appareil fournit une gamme de grossissements très étendue : de 15 x à 30.000 x, et il permet d'observer des objets de 12 mm de diamètre et de 5 mm d'épaisseur.

Si la préparation des objets est relativement simple (métallisation sous un vide de 10^{-4} mm de mercure), le fait de soumettre l'échantillon à un vide poussé, lors de la métallisation et de l'examen, risque parfois de provoquer des déformations importantes; les objets doivent être complètement deshydratés.

Le Pin maritime (*Pinus maritima* Poir. = *P. pinaster* Sol.) est l'hôte de trois espèces d'Urédiinales :

- La Rouille vésiculeuse des aiguilles : *Peridermium oblongisporium* Fck., forme écidienne de *Coleosporium senecionis* (Pers.) Fr.; la forme urédo-télienne est portée par plusieurs espèces de Sénéçons;
- La Rouille vésiculeuse des rameaux et des troncs : *Peridermium* sp.; l'attribution de cette forme écidienne à *Peridermium Cornui* Kleb. suppose une identité spécifique avec la forme urédo-télienne *Cronartium flaccidum* (Alb. & Schw.) Wint. (= *C. asclepiadeum* Fr.), qui n'est pas rigoureusement prouvée dans le cas du Pin maritime; nous avons pourtant examiné les urédospores de *C. flaccidum* prélevées sur Pivoine;
- La Rouille courbeuse des jeunes rameaux : *Caeoma pinitorquum* A. Br., stade écidien de *Melampsora pinitorqua* (A. Br.) Rostr. dont l'hôte urédo-télien le plus courant est le Peuplier-tremble.

1. Les écidiospores de *Peridermium* cf. *cornui* Kleb.

(Planche I)

Le microscope photonique montre des verrucosités de section assez irrégulière, plus ou moins polygonale; sur le contour de la spore, ces détails apparaissent «de profil», en plusieurs couches superposées, trop serrés pour être discernables (photo 1).

Le microscope électronique montre des piliers très distincts, cylindriques ou prisma-

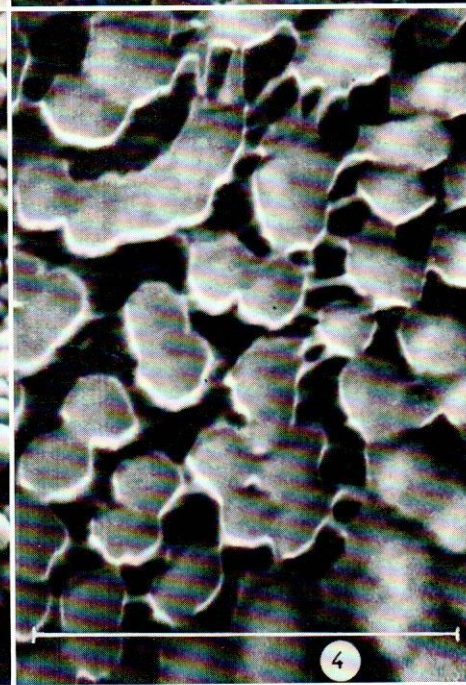
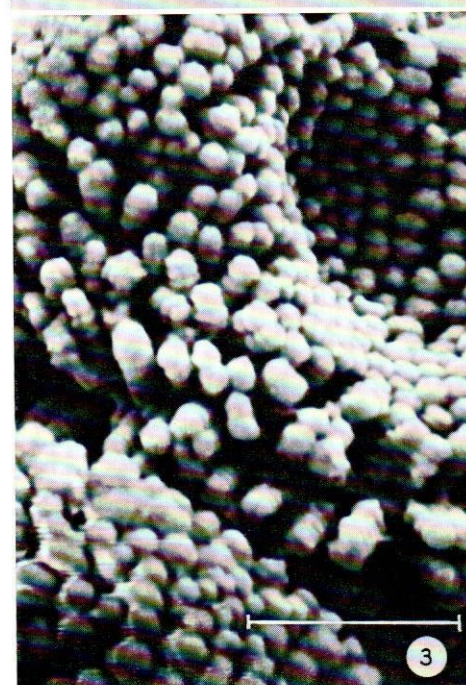
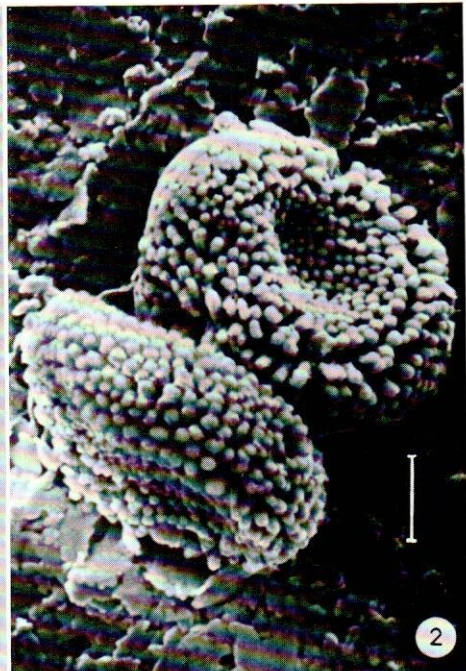
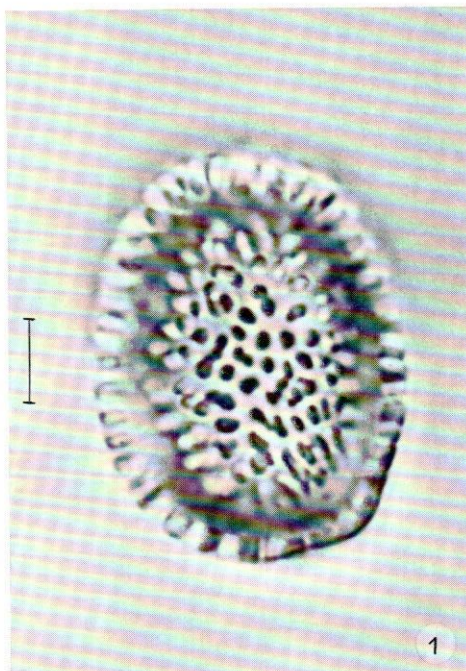
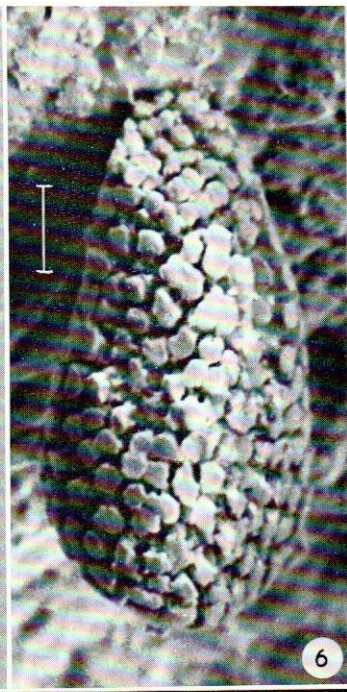


Planche I. Ecidiospores de *Peridermium* cf. *cornui* Kleb.

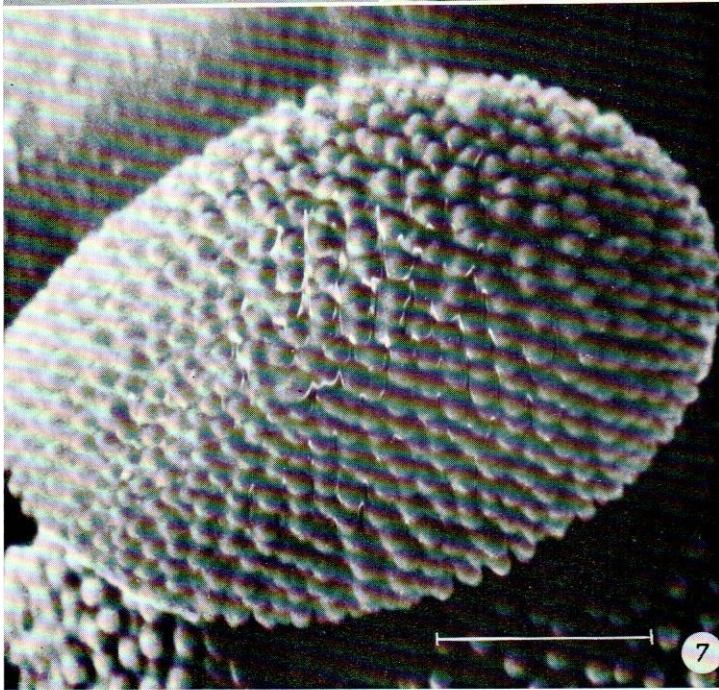
1 – Ecidiospore photographiée en lumière verte (filtre VG-9 de ZEISS) au moyen d'un objectif à immersion 100 x / 1,30. Stéréosynthèse (deux négatifs). 2 – Ecidiospores photographiées au microscope électronique à balayage; même grandissement que la photo 1. 3 – Détail des ornements superficiels. 4 – Les verrucosités vues «de face», montrant les cloisons qui les unissent à la base. Sur toutes les photographies, le trait représente une longueur de 5 microns.



5



6



7

Planche II. Ecdiospores de *Peridermium oblongisporium* Fck. et de *Caeoma pinitorquum* Fr.
 5 - Ecdiospore de *Peridermium oblongisporium* en microscopie photonique. Stéréosynthèse effectuée dans les mêmes conditions que la photo 1. 6 - Ecdiospore de *Peridermium oblongisporium* photographiée au microscope électronique à balayage, au même grandissement. 7 - Ecdiospore de *Caeoma pinitorquum* A. Br. photographiée au microscope électronique à balayage. Sur toutes les photographies, le trait représente une longueur de 5 microns.

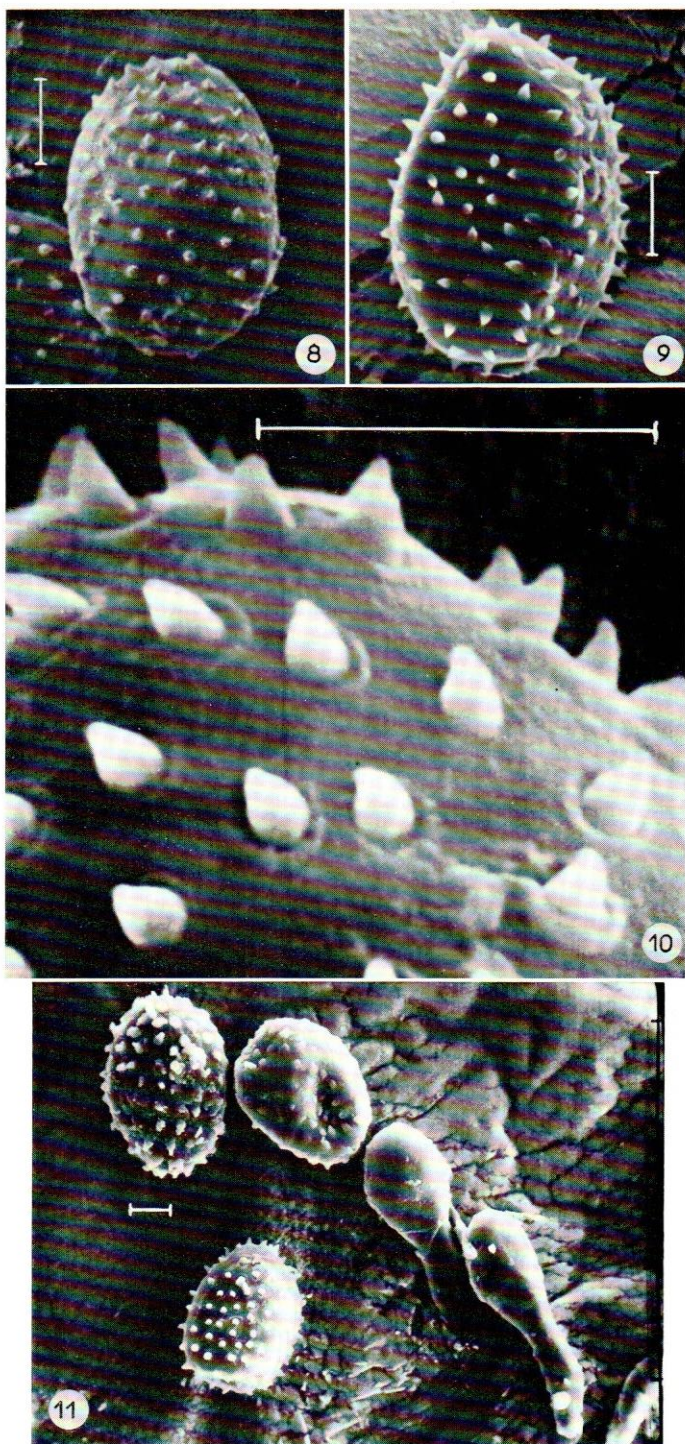


Planche III. Urédospores des trois Rouilles du Pin

8 – Urédospore de *Coleosporium senecionis* (Pers.) Fr. au microscope à balayage. 9 – Urédospore de *Cronartium flaccidum* (Alb. & Schw.) Wint. au microscope à balayage. 10 – Urédospore de *Cronartium flaccidum* : détail. 11 – Urédospores et paraphyses de *Melampsora pini-torqua* (A. Br.) Rostr. au microscope à balayage. Sur toutes les photographies, le trait représente une longueur de 5 microns.

tiques (photos 2 et 3) dont la section présente des fluctuations périodiques dessinant des sortes d'annellations (photo 3); ces piliers sont reliés entre eux, à la base, par des sortes de cloisons plus ou moins radiales (photo 4). Leur diamètre est de 0,7 à 1,0 micron.

Les spores des photos 2 et 3 présentent une invagination marquée : il s'agit d'un artefact, les spores ont été collapsées par la dessiccation. Cette déformation est assez fréquente; dans le cas présent, elle permet d'obtenir un meilleur écartement des protuberances et, par conséquent, une image plus lisible.

2. Les écidiospores de *Peridermium oblongisporium* Fck.

(Planche II)

Le microscope photonique permet de distinguer des verrucosités plus serrées que dans le cas précédent, de section franchement polygonale et même plus ou moins étoilée (photo 5). On peut reconnaître assez nettement l'existence de cloisons entre les verrues.

Le microscope électronique à balayage montre bien mieux la section polygonale-étoilée de ces piliers et la forme tabulaire, comme tronquée, de leur extrémité (photo 6), ainsi qu'une partie des cloisons qui les relient à leur base. La largeur des piliers varie entre 1 et 2 microns.

Les pores germinatifs ne sont apparus sur aucune des spores examinées.

3. Les écidiospores de *Caecoma pinitorquum* A. Br.

(Planche II)

Le microscope photonique ne montre guère que des ponctuations très serrées, qui donnent au contour de la spore un aspect presque lisse. Le microscope à balayage fait ressortir des verrues hémisphériques extrêmement serrées qui n'ont rien de comparable à celles des écidiospores précédentes (photo 7). Leur diamètre est très régulièrement de 0,6 μ . Aucun pore germinatif n'est apparu.

4. Les urédospores des trois rouilles

(Planche III)

Les urédospores des trois espèces envisagées ont une forme ellipsoïdale; leur exospore est ornée d'aiguillons coniques, plus ou moins arqués, de 1,0 à 1,3 μ de hauteur sur 0,7 à 0,8 μ de diamètre à la base. Ces aiguillons sont très semblables à ceux que l'on trouve sur les urédospores de *Tranzschelia pruni-spinosae* (Pers.) Diet., de *Puccinia* et d'*Uromyces* divers examinées dans les mêmes conditions.

Les urédospores de *Melampsora pinitorqua* sont accompagnées (photo 11) de paraphyses en massue, dont la membrane est parfaitement lisse.

Aucun pore germinatif n'a pu être distingué sur ces urédospores.

Conclusions

Cette technique d'observation convient excellemment à l'étude de la morphologie externe des spores d'Urédinales; elle seule permet vraiment de «voir» ces spores comme nous voyons une pomme de pin, avec le relief suggéré par les jeux de lumière sur les accidents de surface. Elle conduit également plus loin que le microscope photonique dans l'étude des fins détails de structure.

Cependant, la structure fine de l'exospore ne peut être étudiée que sur coupes ultra-fines examinées au microscope électronique à transmission, c'est à ce prix qu'on pourra «reconstruire» l'agencement des piliers sur les écidiospores de *Peridermium* et leurs relations précises avec les cloisons qui les unissent.

Sur le plan de la systématique, les écidiospores des deux espèces de *Peridermium* étudiées semblent avoir une certaine affinité morphologique, alors que celles de *Caeoma pinitorquum* ont une ornementation superficielle très différente. Les urédospores semblent présenter moins d'intérêt en systématique, leur constitution superficielle étant très semblable dans les divers genres étudiés de cette façon.

L'examen méthodique au microscope électronique à balayage des spores d'Urédinales apporterait de très intéressants documents à la systématique de ce groupe, et serait utilement complété par l'étude, au microscope électronique à transmission, de la structure fine de la membrane. Ces investigations sont inscrites à notre programme de recherches.

Résumé

Description des écidiospores et urédospores de trois Urédinales parasites de *Pinus pinaster* Sol., examinées au microscope électronique à balayage.

Zusammenfassung

Rostpilze auf Pinus pinaster. Beobachtungen der Sporen mit dem Raster-Elektronenmikroskop
Aufgrund photographischer Aufnahmen mit dem Raster-Elektronenmikroskop werden Aecidio- und Uredosporen von drei auf *Pinus pinaster* parasitierenden Uredineen beschrieben.

Bibliographie

- JONES, D., 1967: Examination of mycological specimens in the scanning electron microscope. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **50**, 690-691.
 ECHLIN, P., 1968: The use of the scanning reflection microscope in the study of plant and microbial material. *Royal Microscopical Society* **88**, 407-418.
 PERREAU, J.; HEIM, R., 1968: L'ornementation des basidiospores au microscope électronique à balayage. *Revue de Mycologie* **33**, 329-340.
 SCHWINN, F. J., 1969: Die Darstellung von Pilzsporen im Raster-Elektronen-Mikroskop. *Phytopath. Z.* **64**, 376-379.

L'adresse de l'auteur: J. ARTHAUD, Laboratoire de Pathologie végétale, E.N.I.T.A. de Bordeaux, F-33 Gradignan, France