

Teneur des gamètes mâles et femelles d'*Allomyces* en acides nucléiques et composition comparée d'une fraction saline de l'acide ribonucléique des gamétanges

La différenciation sexuelle de la moisissure aquatique *Allomyces* s'accompagne de changements dans les rapports quantitatifs des acides nucléiques¹. C'est ainsi que la synthèse d'acide ribonucléique (RNA) préluant à la formation des corps paranucléaires basophiles des futurs gamètes est nettement plus importante dans les gamétanges femelles². La détermination des rapports RNA/DNA dans des récoltes de gamétanges femelles mûrs et de leurs gamètes libres a fourni des valeurs près de deux fois plus élevées qu'avec des organes mâles correspondants³. Il nous restait cependant à établir ce taux différentiel sexuel en RNA par unité nucléaire, c'est-à-dire sur une base cellulaire, gamétique. Cette information sera présentée dans la première partie de notre travail.

D'autre part, nous avons déjà étudié la composition nucléotidique de deux fractions de l'acide ribonucléique femelle⁴ et montré que la fraction insoluble dans le NaCl (60% du RNA gamétique) présente un rapport purines/pyrimidines nettement plus élevé (1,36) que la fraction soluble (1,15). La fraction NaCl-soluble étant prédominante dans les jeunes gamétanges en voie de différenciation (plus de 80% du RNA total), on pouvait penser qu'elle présenterait une composition plus significative, par conséquent différentielle, du point de vue du déterminisme sexuel d'*Allomyces*. Nous avons donc repris l'analyse de cette fraction saline du RNA d'un point de vue comparatif, en nous adressant à de très jeunes gamétanges soit mâles, soit femelles. Les résultats seront présentés dans la seconde partie de ce travail.

I. RNA et DNA totaux dans les gamètes. Les souches pratiquement unisexuées, mâles et femelles, du gamétophyte d'*Allomyces* hybride (*A. arbusculus* × *A. macrogynus*⁵) ont été cultivées soit en milieu semi-synthétique liquide agité G₂Y (glucose-extrait de levure⁶), à 22°C, soit sur plaques de milieu YpSs Difco⁶. Les gamétanges mûrs sur les boules mycéliennes de 5 jours ou les mycelia des plaques de 8-10 jours ont été amenés à libérer leurs gamètes dans la solution saline diluée de MACHLIS⁷. La dense suspension obtenue (après 2 h en moyenne) a été soumise à une centrifugation modérée (900-1000 g) et le culot gamétique remis en suspension dans un volume connu de solution trichloracétique (10%) dont une aliquote a été prélevée pour comptage des gamètes à l'hémacytomètre. Après centrifugation à froid et à forte vitesse (10000 g), les gamètes ont été redispersés, tout en les désintégrant par rotation d'une baguette de verre, dans une solution d'acide trichloracétique à 10% bien refroidi, pour l'extraction des bases et nucléotides libres. Dégraissage, hydrolyse alcaline différentielle (RNA dans KOH 0,5N 18 h à 37°C), neutralisation, précipitation (DNA, protéines) avec l'acide trichloracétique (2,5%) et extraction sélective du DNA par l'acide perchlorique (0,5N 20 min à 70°C) ont été réalisés selon notre technique habituelle^{2,3} combinant les mérites respectifs des méthodes de SCHNEIDER-OGUR-SCHMIDT et THANNHAUSER. Finalement, le RNA a été dosé colorimétriquement (660 nm) par la méthode à l'orcinol^{8,9} et le DNA par mesure spectrophotométrique UV (260 nm), dans les deux cas par comparaison avec des standards des produits correspondants (Sigma).

Les valeurs présentées dans le Tableau I correspondent à la moyenne de 5 déterminations réalisées avec des cultures successives.

La richesse des gamètes femelles en RNA est en accord avec les hautes valeurs des rapports RNA/DNA obtenus précédemment dans les gamétanges femelles mûrs, contenant les gros corps paranucléaires prégamétiques³. Quant à la relative pauvreté en RNA des gamètes mâles, elle se reflète au microscope dans la minceur de leur corps paranucléaire basophile. De même, leur plus faible teneur moyenne en DNA (guère plus de 2/3 de celle des femelles) pourrait bien être en rapport avec le plus petit diamètre de leurs noyaux (2-3 µ contre 3,5-4,5 µ chez la femelle¹⁰), lui-même imposé par leur confinement, à nombre égal, dans un volume cytoplasmique environ 4 fois plus réduit que celui des gamétanges femelles (égalité numérique atteinte par multiplication sélective des noyaux précocement enfermés dans le petit cénocyte mâle, au hasard des cloisonnements intergamétangiaux séparant les territoires sexuels sur l'hyphe fertile d'*A. macrogynus*¹⁰).

II. Composition nucléotidique du RNA NaCl soluble des jeunes gamétanges mâles comparée à celle des femelles. Les jeunes gamétophytes des souches unisexuées d'*Allomyces* ont été obtenus par culture agitée dans le milieu G₂Y (voir plus haut, 50 ml par flacon de 150 ml) et récoltés juste au début de la différenciation gamétangiale de leurs apex hyphaux (3-4 jours à 22°C).

La fraction soluble du RNA a été extraite trois fois à chaud dans une solution de NaCl à 10% contenant 0,002% de NaHCO₃ à pH 7,5^{11,12}. Le nucléate de Na a ensuite été précipité avec trois volumes d'éthanol (8 h à 2°C), lavé à l'éthanol et séché sous vide. Une quantité connue de la poudre obtenue a été soumise à l'hydrolyse avec HCl N (1 h à 100°C), en ampoule scellée, selon la technique de SMITH et MARKHAM¹³. Les composants du RNA ont été finalement séparés par chromatographie unidimensionnelle sur papier Whatman N° 1, avec le mélange solvant isopropanol-HCl de WYATT¹⁴. Bases pures et nucléotides pyrimidiques ont été localisés sous lumière UV (lampe Hanovia), découpés et élués dans HCl 0,1N (au moins 6 h). Dans les quelques cas de séparation incomplète, les composants partiellement superposés ont été élués et re-chromatographiés. La lecture des extinctions au spectrophotomètre de Beckman

Tableau I. Teneur en acides nucléiques des gamètes d'*Allomyces* (µg · 10⁻⁶)

	Mâles	Femelles
RNA ^a	7,47	16,41
DNA ^b	1,08	1,42
RNA/DNA	6,9	11,6

^a $A_{\min} \varphi - \sigma = + 6,12$. ^b $A_{\min} \varphi - \sigma = + 0,05$.

¹ G. TURIAN, Nature 190, 825 (1961).

² G. TURIAN, Nature 196, 493 (1962).

³ G. TURIAN, Devl. Biol. 6, 61 (1963).

⁴ G. TURIAN, Pathologia Microbiol. 28, 58 (1965).

⁵ R. EMERSON et CH. M. WILSON, Mycologia 46, 393 (1954).

⁶ R. EMERSON, Lloydia 4, 77 (1941).

⁷ L. MACHLIS, Am. J. Bot. 40, 189 (1953).

⁸ W. MEJBAUM, Z. physiol. Chem. 258, 117 (1939).

⁹ W. E. MILITZER, Archs Biochem. 9, 85 (1946).

¹⁰ G. TURIAN, Bull. Soc. bot. suisse 67, 458 (1957).

¹¹ E. VOLKIN et W. E. COHN, Meth. biochem. Analysis 7, 287 (1954).

¹² E. C. CANTINO, Phytochemistry 1, 107 (1961).

¹³ J. D. SMITH et R. MARKHAM, Biochem. J. 46, 509 (1950).

¹⁴ G. R. WYATT, Biochem. J. 48, 581 (1951).

à 250, 260 et 280 nm a permis l'estimation quantitative des composants en utilisant les coefficients d'extinction molaire donnés par MARKHAM¹⁵.

L'établissement de courbes complètes d'absorption UV pour chaque composant isolé a complété son identification préalable sur la base du Rf et sa co-chromatographie avec des composés connus. En outre, deux analyses de contrôle de la technique avec du RNA de levure (Sigma) ont donné un rapport purines/pyrimidines moyen de 1,06 (1,00 selon ELSON et CHARGAFF¹⁶) et une somme G + C (voir plus bas) de 50,52.

Quatre séries successives de cultures d'*Allomyces* ont fait l'objet de 6 analyses de RNA pour les mâles et 5 analyses pour les femelles dont les valeurs moyennes sont présentées dans le Tableau II.

Aucune différence très significative n'est apparue entre la composition nucléotidique de la fraction saline du RNA de jeunes gamétanges mâles et celle des gamétanges femelles au stade de développement correspondant. Tout au plus pourrait-on remarquer la relative pauvreté de la femelle en acide adénylique et sa richesse en acide uridylique. Ses jeunes gamétanges contiennent d'ailleurs deux fois plus d'uracil(-uridine) libre que les organes mâles correspondants⁴.

Tableau II. Composition nucléotidique* comparée du RNA_{NaCl} soluble extrait des jeunes gamétanges mâles et femelles d'*Allomyces*

	Mâles	Femelles
Acide adénylique (adénine)	25,71 ± 1,05	24,15 ± 0,32
Acide guanylique (guanine)	30,17 ± 1,18	31,20 ± 1,47
Acide cytidylique	21,08 ± 1,54	20,25 ± 0,57
Acide uridylique	23,04 ± 1,16	24,40 ± 0,73
Acide guanylique + cytidylique	51,25	51,45
Purines/pyrimidines	1,27	1,24

* Moles/100 Moles de nucléotides.

Le rapport purines/pyrimidines s'est le plus souvent montré plus élevé dans les gamétanges mâles et, lors d'une analyse portant sur des gamétanges un peu plus mûrs (corps paranucléaires en organisation), nous avons obtenu une valeur de 1,21 pour le rapport mâle contre 1,13 seulement pour la femelle. A noter que ce dernier rapport est en bon accord avec celui trouvé dans des gamétanges femelles analysés par la méthode de séparation des nucléotides sur résine Dowex (1,15–1,16⁴).

Par contre, la somme acide guanylique + acide cytidylique (G + C) ne diffère pas entre mâle et femelle et, comme le RNA total de *Neurospora*¹⁷ et de levure (voir ci-dessus), le RNA d'*Allomyces* se range dans la catégorie à GC faible¹⁸.

Summary. Estimation of RNA and DNA by gamete in the unisexual strains of *Allomyces* showed the amount of RNA to be twice as much in the female as in the male. The amount of DNA was only slightly, though consistently, higher in the female. Comparison of NaCl-soluble RNA from young gametangia of the unisexual strains showed no appreciable difference in the nucleotide composition, although a tendency for a higher purine pyrimidine ratio was noticed in the males.

M. A. VISWANATHAN et G. TURIAN

Laboratoire de Microbiologie, Institut de Botanique générale, Université de Genève (Suisse), le 6 janvier 1966.

¹⁵ R. MARKHAM, *Modern Methods of Plant Analysis* (Springer-Verlag, 1955) 4, 246.

¹⁶ D. ELSON et E. CHARGAFF, *Biochim. biophys. Acta* 17, 367 (1955).

¹⁷ H. HENNEY et R. STORCK, *J. Bact.* 85, 822 (1963).

¹⁸ Ce travail a été réalisé grâce à l'appui du Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

Preparation of Spore Coats of *Fusarium culmorum*

Mould spores have been studied mainly from their physiological aspects and little has been done on the structure and composition of conidia. The main difficulty in this kind of study on the fungal cell wall results from the fact that no pure wall material is yet available. HORIKOSHI and ILDA¹ have recently studied the spore coats of unicellular conidia of *Aspergillus oryzae*, but reports on this subject are very rare. The method used to obtain isolated spore coats of *Fusarium culmorum* is described here. The work was undertaken in relation with investigations on germination and 'protoplast' formation from conidia of *F. culmorum*^{2,3}.

The culture of *F. culmorum* used in these experiments was obtained from the Colección Española de Cultivos Tipo and was maintained on potato dextrose agar by mass spore transfer. *F. culmorum* is characterized by the formation of extremely abundant macroconidia. Under proper conditions sporulation is so profuse that by suit-

able techniques masses of spores can be obtained substantially free from vegetative mycelium and other contaminants. Ungerminated spores have been considered as surrounded by an amorphous cell wall and a number of poorly defined structures in the cytoplasm. Multicellular macroconidia were harvested from 5-day-old cultures of the mould grown in Roux bottles on solid glucose-asparagine-yeast-extract medium⁴ incubated at 26°C. They were harvested by scraping with sterile glass beads after adding sterile distilled water.

In order to eliminate contamination from mycelium and from medium components, spore suspensions were

¹ K. HORIKOSHI and S. ILDA, *Biochim. biophys. Acta* 83, 197 (1964).

² M. J. RODRÍGUEZ AGUIRRE, I. GARCÍA ACHA, and J. R. VILLANUEVA, *Antonie van Leeuwenhoek* 30, 33 (1964).

³ J. R. VILLANUEVA, I. GARCÍA ACHA, and M. J. RODRÍGUEZ AGUIRRE, *Proceedings of the Society for General Microbiology*, London, April 1965.

⁴ I. GARCÍA ACHA and J. R. VILLANUEVA, *Can. J. Microbiol.* 10, 99 (1964).