

## Quelques aspects de la croissance rhizomorphique chez le *Sphaerostilbe repens*

### Some aspects of rhizomorphic growth in *Sphaerostilbe repens*

B. Botton

Université de Nancy I, Laboratoire de Physiologie Végétale, C.O. 140, 54037 Nancy Cédex (France), 1 février 1978

**Summary.** The rhizomorphs of *Sphaerostilbe repens* attached to synnemata and mycelia or severed from them, grew providing that their apices were kept inside the culture medium. Exposed to air, apical regions became dark brown, stopped growing and differentiated into synnemata. However central canals in the middle of the rhizomorphs had to be continuously maintained in contact with the atmosphere; nitrogen immediately stopped rhizomorphic growth. This indicates that oxygen for growing apices is supplied through central canals and that the partial pressure of oxygen has to be higher at the origin of the rhizomorphs than that which is in contact with the outside surfaces of their apices.

Le *Sphaerostilbe repens* différencie dans la nature et en culture pure des organes agrégés mixtes composés d'une corémie aérienne et d'un rhizomorphe intramatriciel. Ces 2 structures en continuité anatomique forment une «unité agrégée»<sup>1</sup>.

Le rhizomorphe est constitué d'une zone corticale et d'une médulla entourant une lacune ou canal central pratiquement vide de toute hyphe; la croissance est localisée à l'apex de l'organe<sup>2,3</sup>. La croissance des rhizomorphes, non influencée par la pesanteur, s'effectue toujours au sein du milieu de culture. Lorsque les rhizomorphes émergent du substrat, leur apex brunit, s'arrête de croître et se différencie en corémies<sup>4,5</sup>. Il en est de même lorsqu'on dépose des boutures d'apex de rhizomorphes sur le milieu de culture: la partie en contact avec l'air ambiant donne naissance à des corémies et la partie située sur le milieu de culture régénère des rhizomorphes<sup>6</sup>. Ces résultats donnent à penser que la tension d'oxygène pourrait intervenir dans l'initiation et la croissance des rhizomorphes du *Sphaerostilbe repens*.

Quelques preuves d'un tel rôle de l'oxygène ont été acquises en étudiant la croissance des rhizomorphes de l'*Armillaire*. Reitsma<sup>7</sup> a montré que l'*Armillaria mellea* ne peut s'accroître en atmosphère d'azote. D'après cet auteur, de même que pour Snider<sup>8</sup> et Jacques-Félix<sup>9</sup>, l'oxygène semble nécessaire à l'initiation des rhizomorphes bien que certains essais, réalisés en cultures submergées ou dans des enceintes de faible volume supportant le vide ou une atmosphère confinée doivent être interprétés avec beaucoup de réserves. Reitsma<sup>7</sup> a d'autre part prouvé que l'oxygène diffusait à travers le canal central du rhizomorphe. Smith et Griffin<sup>10</sup> et Griffin<sup>11</sup> expérimentant sur l'*Armillaria elegans* fournissent des données quantitatives et montrent qu'à des concentrations très basses d'oxygène, 0,5%, l'initiation des rhizomorphes, bien que retardée est encore possible. La croissance rhizomorphique optimale exige des pressions d'oxygène d'autant plus élevées à l'entrée du canal central que le rhizomorphe est plus long. En revanche, la croissance n'est possible que si des concen-

trations beaucoup plus basses sont en contact avec la surface externe du rhizomorphe.

Chez le *Sphaerostilbe repens* de simples essais permettent de penser que les rhizomorphes de ce champignon ont un comportement assez comparable à ceux de l'*Armillaria elegans*.

**Matériel et méthodes.** La souche de *Sphaerostilbe repens* (CBS.275.60) provenant de Baarn (Hollande), est conservée sur milieu au malt à 2%. Les cultures sont réalisées en boîtes de Pétri sur milieu de Bertrand gélosé. La composition du milieu et le mode d'ensemencement ont été précédemment décrits<sup>6</sup>. L'incubation a lieu à l'obscurité à  $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Les expériences rapportées dans cet article sont conduites sur des thalles où la croissance rapide des rhizomorphes est obtenue en inhibant partiellement le développement du mycélium par le dépôt d'une plaque de verre sur la colonie. Des expériences témoins réalisées avec des cultures possédant du mycélium aérien ont fourni des résultats qualitatifs absolument identiques. 36 h après l'ensemencement une plaque de verre percée d'un trou central de 8 mm de diamètre est déposée sur la culture. Les unités agrégées non recouvertes au centre de la culture peuvent alors se développer.

Le traitement des rhizomorphes est effectué au 10<sup>e</sup> jour de croissance. Lorsqu'il est nécessaire d'effectuer une section des rhizomorphes sous la plaque de verre, le fond de la boîte de Pétri est découpé avec une aiguille chauffée de façon à intervenir sans enlever la plaque. Sa suppression, même temporaire, expose en partie l'apex des rhizomorphes à l'air et ralentit leur croissance. Des cultures ont été incubées en atmosphère d'azote. 4 boîtes de Pétri sont déposées dans un caisson d'un volume de 12 l. L'air atmosphérique est chassé par une pompe à vide, puis est remplacé par de l'azote qu'on laisse diffuser avec un débit de 0,5 l par min pendant toute la durée de la culture. La

Croissance des rhizomorphes entiers ou sectionnés exposés à l'air ambiant et en atmosphère d'azote

Traitement	Air ambiant (21% d'oxygène)	Atmosphère d'azote
Rhizomorphes entiers	8,50 ± 0,43	0,71 ± 0,11
Rhizomorphes sectionnés	6,40 ± 0,61	0,14 ± 0,08

Les rhizomorphes entiers sont ceux des cultures laissées intactes. Les rhizomorphes sectionnés sont ceux des cultures où le centre a été enlevé de façon à ne laisser subsister que l'apex intramatriciel d'une longueur de 5 mm. Les chiffres indiquent l'accroissement moyen des rhizomorphes en millimètres après 4 jours d'incubation. A côté de chaque mesure, figure l'erreur standard.

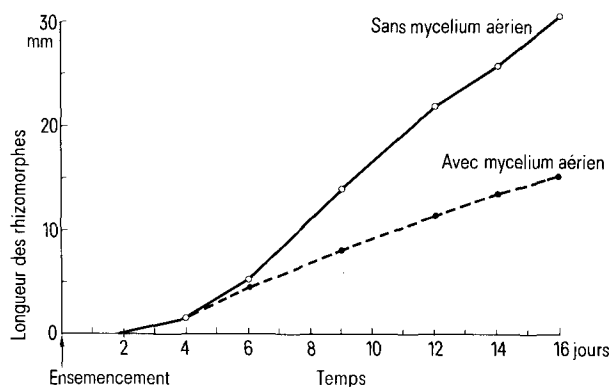


Fig. 1. Croissance des rhizomorphes en présence et en absence du mycélium aérien.

disparition de l'air atmosphérique est vérifiée en dosant le gaz carbonique à l'aide d'un analyseur IR (Infralyt III Junkalor). De même, on a contrôlé continuellement qu'il n'y avait pas d'accumulation de  $\text{CO}_2$  dans les enceintes. La croissance des rhizomorphes est appréciée en mesurant la longueur de 10 rhizomorphes, préalablement repérés, par boîte de Pétri. Les résultats sont la moyenne de 40 mesures. **Résultats.** En absence de mycelium aérien, la vitesse de croissance des rhizomorphes est beaucoup plus rapide qu'en sa présence (figure 1). D'après les résultats acquis par Casalis-Gougerot<sup>12</sup>, il semblerait que le mycelium aérien inhibe les rhizomorphes sous-jacents par détournement trophique. L'expérimentation sur les thalles est effectuée au 10<sup>e</sup> jour de croissance.

a) Pour que le rhizomorphe puisse continuer à se développer, l'apex doit être maintenu à l'intérieur du milieu gélosé. En effet, lorsqu'on enlève le milieu de façon à découvrir la partie apicale, après une légère croissance résiduelle, l'allongement du rhizomorphe cesse, l'apex brunit et différencie des corémies porteuses de spores (figure 2, d). La carence trophique de la zone génératrice ne semble pas en cause car on peut laisser la partie inférieure de l'apex en contact avec le milieu de culture gélosé ou laisser flotter le rhizomorphe sur un milieu liquide sans que pour autant les résultats soient modifiés. L'effet le plus probable semble être une trop forte oxygénation de la surface externe apicale.

b) L'aération est cependant nécessaire au développement rhizomorphique car lorsque les corémies sont renfermées sous une cloche, l'élongation des rhizomorphes s'arrête immédiatement (figure 2, f). La présence dans l'enceinte fermée d'une base telle que  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$  ou  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  pour capter le  $\text{CO}_2$  qui pourrait éventuellement s'accumuler ne change aucunement les résultats. Le besoin d'oxygène est

confirmé car les cultures incubées en atmosphère d'azote montrent un arrêt immédiat de la croissance rhizomorphique (tableau). On ne constate pas, dans ce cas, le brunissement de la pointe de l'organe agrégé.

Dans les conditions normales de croissance, l'oxygène nécessaire au métabolisme de l'apex du rhizomorphe transiterait donc par le canal central. Dans les unités agrégées en place, les échanges gazeux se feraient essentiellement au niveau de la corémie dont la structure est très lâche. On peut remarquer, cependant, que la corémie n'est pas nécessaire à la croissance du rhizomorphe; en effet, si les corémies sont sectionnées à la base et que toute régénération est éliminée, les rhizomorphes conservent la même vitesse de développement que ceux des cultures témoins (figures 2, a, et 2, b).

c) Lorsqu'on sectionne le rhizomorphe de façon à étudier sa croissance autonome, on obtient les mêmes résultats qu'avec des rhizomorphes entiers. Si l'apex est laissé en place, mais séparé de la culture mère par un fossé creusé dans la gélose, la région apicale demeurée intramatricielle continue à s'allonger en tant que rhizomorphe (figure 2, c). L'allongement est toutefois légèrement ralenti dans les premières heures qui suivent le traitement car les boutures ont tendance à se ramifier avant de reprendre une croissance normale. La partie sectionnée régénère le plus souvent des corémies. L'aération au niveau de la section paraît nécessaire car si on colmate le fossé par du milieu gélosé déposé juste avant solidification, la croissance est rigoureusement nulle (figure 2, e). Il semble bien que le manque d'oxygène soit en cause puisque la croissance demeure nulle lorsque les rhizomorphes ainsi isolés sont incubés en atmosphère d'azote (tableau). Dans ce cas, la section des rhizomorphes ne donne lieu à aucune régénéra-

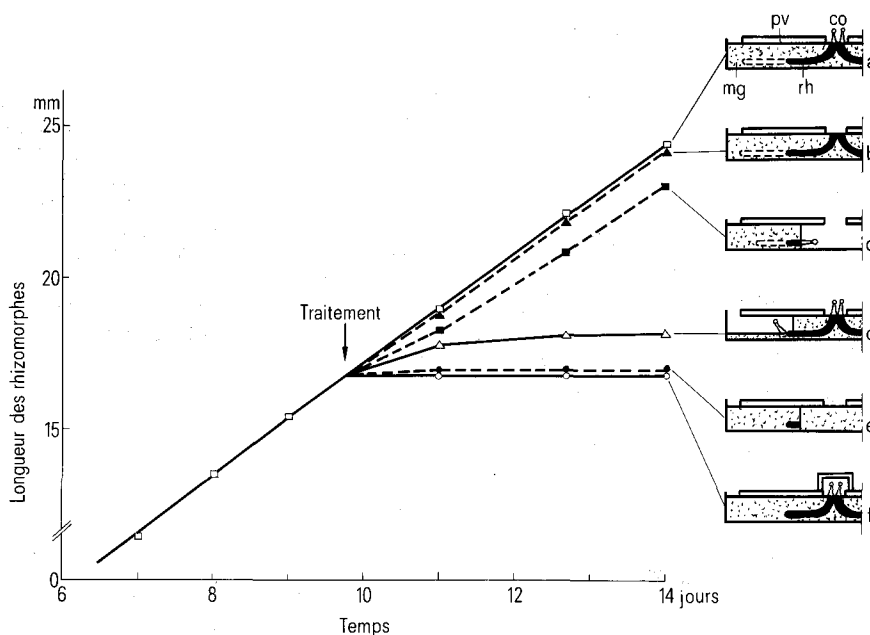


Fig. 2. Croissance des rhizomorphes en fonction des différents traitements; pv, plaque de verre; mg, milieu gélosé; rh, rhizomorphe; co, corémie; a Développement des rhizomorphes sur les cultures témoins ne subissant aucun traitement; b les corémies ont été supprimées en les sectionnant au niveau de leur jonction avec les rhizomorphes. La croissance des rhizomorphes continue; c le centre de la culture a été enlevé, ne laissant en place que l'apex rhizomorphique. Le rhizomorphe poursuit sa croissance. En atmosphère normale, la section régénère souvent des corémies fertiles; en atmosphère d'azote, aucune régénération n'a lieu; d l'apex du rhizomorphe a été mis en contact avec l'air ambiant. Il brunit, s'arrête de croître et différencie des corémies fertiles; e l'apex rhizomorphique séparé du thalle a été isolé de l'air par du milieu de culture déposé immédiatement après le sectionnement. La croissance est rigoureusement nulle. Le même résultat est obtenu si on met les cultures en atmosphère d'azote après avoir enlevé leur partie centrale; f les corémies ont été enfermées dans une enceinte close. La croissance rhizomorphique s'arrête aussitôt, même si l'on ajoute dans l'enceinte une base pour capter le  $\text{CO}_2$ . On obtient le même résultat en mettant une culture normale en atmosphère d'azote.

tion. Les résultats ne se trouvent pas sensiblement modifiés en faisant varier la longueur de l'apex entre 2 et 10 mm.

**Discussion et conclusion.** Le rhizomorphe du *Sphaerostilbe repens* bien que se développant dans un milieu compact exige l'oxygène pour sa croissance et ne peut donc pas s'affranchir d'un métabolisme exclusivement fermentaire. Cependant, il est important que la pression d'oxygène soit appliquée à l'entrée du canal central et non sur la face externe de l'apex. Il apparaît donc que la concentration en oxygène doit être plus faible sur la face externe apicale du rhizomorphe qu'à l'entrée du canal central. Smith et Griffin<sup>10</sup> mentionnent qu'une concentration supérieure à 4% en contact avec l'apex des rhizomorphes d'*Armillariella elegans* est de nature à inhiber leur croissance. En même temps, chez ce champignon, l'apex brunit et dédifférencie des articles lâchement accolés les uns aux autres, formant ainsi de véritables «pores» qui mettent en communication, par endroit, le canal central avec le milieu externe. Chez le *Sphaerostilbe repens*, les corémies régénérées par l'apex seraient l'équivalent de ces «pores respiratoires». On peut penser que le brunissement de l'apex correspond à la formation de produits apparentés aux mélanines. Selon Smith et Griffin<sup>10</sup>, ces produits seraient de nature, entre

autre, à empêcher la diffusion des éléments nutritifs, inhibant ainsi la croissance de l'organe.

Comme chez l'*Armillaire*, le canal central du rhizomorphe du *Sphaerostilbe repens* semble capable de laisser diffuser l'air jusqu'à l'apex. Ceci semble appuyé par le fait que les articles de la médulla à proximité du canal central sont extrêmement riches en mitochondries, notamment à l'extrémité du rhizomorphe<sup>3</sup>.

- 1 J.J. Guillaumin, Cah. Orstom. Sér. Biol. 12, 51 (1970).
- 2 J. Dexheimer et B. Botton, C.r. Acad. Sci. Paris 281D, 1093 (1975).
- 3 B. Botton et J. Dexheimer, Z. Pflanzenphysiol. 85, 429 (1977).
- 4 R.D. Goos, Am. J. Bot. 49, 19 (1962).
- 5 P.R. Ly, DEA Biologie végétale. Université de Nancy I, 1974.
- 6 B. Botton et P.R. Ly, Biologia Pl. 18, 436 (1976).
- 7 J. Reitsma, Phytopath. Z. 5, 461 (1932).
- 8 P.J. Snider, Mycologia 51, 693 (1959).
- 9 M. Jacques-Félix, Bull. Soc. mycol. Fr. 84, 161 (1968).
- 10 A.M. Smith et D.M. Griffin, Aust. J. biol. Sci. 24, 231 (1971).
- 11 D.M. Griffin, dans: Ecology of Soil Fungi, p. 113. Chapman and Hall, London 1972.
- 12 C. Casalis-Gougerot, DEA Biologie végétale. Université de Nancy I, 1976.

## Nuclear pores. Can they expand and contract to regulate nucleocytoplasmic exchange?

N.J. Severs<sup>1</sup> and E.G. Jordan

Cell Pathology Unit, The School of Pathology, The Middlesex Hospital Medical School, Riding House Street, London W1P 7LD, and Biology Department, Queen Elizabeth College, Campden Hill, London W8 7AH (England), 20 January 1978

**Summary.** Recent evidence has revived the idea that translocation of macromolecules between nucleus and cytoplasm may be regulated via expansion and contraction of the entire diameter of the nuclear pore complex. The present investigation does not support this hypothesis.

Nuclear pore complexes (NPCs) are thought to play a key role in communication between nucleus and cytoplasm, thus allowing integration of the specialized activities of these 2 cellular compartments. Precisely how NPCs mediate selective nucleocytoplasmic exchange of macromolecules is a problem which has challenged cell biologists for over 2 decades, and the progress made in this field has been given detailed treatment in several recent reviews<sup>3-7</sup>.

Quantitatively, macromolecule translocation could conceivably be controlled by modulation of the proportion of nuclear envelope occupied by NPC area - operating via changes in NPC number or size. Values for overall NPC diameter reported in the earlier literature range from 30 nm<sup>8</sup> to 200 nm<sup>9</sup>. Thus, regulation by expansion and contraction of NPCs might originally have seemed a plausible hypothesis<sup>10</sup>. However, various methodological considerations later revealed that such differences do not reflect the *in vivo* state and it became generally agreed that true NPC diameter in fact shows little variation<sup>3,5,7,11</sup>.

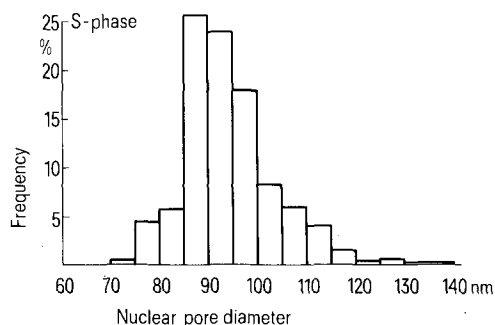
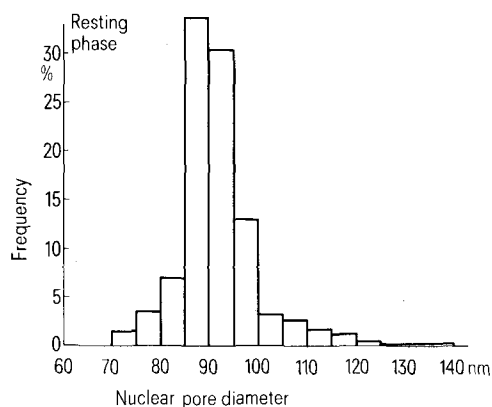


Fig. 1. Histograms showing frequency distribution of nuclear pore diameters in resting and S phase *S. cerevisiae* cultures. The cells were synchronized, sampled at 0 min and 90 min after inoculation, and freeze-fractured without pretreatment as described previously<sup>13,14</sup>. Approximately 500 nuclear pores from 50 nuclear envelopes were measured for each sample. Pores on steeply inclined areas of nuclear membrane fracture face were excluded. A single peak between 85 and 95 nm is shown in both resting and S phase cells, and no 2nd peak between 120 and 175 nm is present. A small number of pores in the range 115–140 nm is encountered but inspection of these indicates that they arise when the fracture path departs from the membrane before reaching the true pore periphery. A similar frequency distribution was obtained in unfixed *Chlorella* cells (results not shown).