



QK
623
B 67

2



0 0301 0014143 8

N. Y. Academy
Of Sciences

5 817.
B 66

GERMINATION

DE

L'ASCOSPORE DE LA TRUFFE

Par M. EMILE BOULANGER

PHARMACIEN — LICENCIÉ ÈS-SCIENCES



IMPRIMERIE OBERTHUR, RENNES—PARIS

—
1903

10323

15 Juin 1903.

GERMINATION

DE

L'ASCOSPORE DE LA TRUFFE

Par M. EMILE BOULANGER

Pharmacien. — Licencié-ès-Sciences

J'ai publié déjà ⁽¹⁾ les résultats que j'ai obtenus sur la culture pratique de la truffe : j'aborde aujourd'hui le côté scientifique de cette question par l'étude de la germination de l'ascospore.

Si l'on examine avec attention, à un fort grossissement, l'ascospore échinulée du *Tuber melanosporum*, on peut se rendre compte que sa structure est assez compliquée.

A l'intérieur, le protoplasma contient des gouttelettes d'huile, ainsi qu'un grand nombre de petits corps arrondis : il est renfermé dans une membrane incolore, et cette cellule constitue l'ampoule germinative de la spore. Autour de cette ampoule, on aperçoit une membrane épaisse, d'un brun foncé, qui est recouverte de piquants de la même couleur. C'est cette membrane externe qui donne à la spore son aspect caractéristique, lorsque celle-ci est arrivée à maturité.

Quand on plonge des fragments de truffe dans des tubes d'eau ordinaire stérilisée, afin d'obtenir la germination de l'ascospore, on remarque, au

(1) Voir page 8.

bout de quelques jours, si les spores sont bien mûres, qu'un certain nombre d'entre elles se sont transformées : c'est au fond des tubes d'eau, au milieu de petits cristaux de carbonate de chaux, qui s'y sont déposés, que l'on peut recueillir ces spores qui ont commencé à germer ; on les trouve souvent dans des tubes d'eau où les filaments germinatifs ne sont pas visibles à l'œil nu. J'ai pu ainsi observer un grand nombre de spores à différents états de développement, ce qui m'a permis de reconstituer les phases de la germination.

On remarque d'abord (fig. 1) que la spore se décolore sur le côté, à égale distance des deux pôles : la membrane externe brune se dissout en cet endroit et l'ampoule germinative, primitivement enfermée, se trouve mise à nu sur une certaine surface.

Il est facile de se rendre compte de la structure de la membrane externe, au fur et à mesure qu'elle se résorbe et se décolore : les piquants commencent d'abord par s'émousser, puis ils n'offrent bientôt plus que l'apparence de mamelons arrondis ; la couche brune continuant à se liquéfier, on aperçoit des cellules polyédriques, aux points de jonction desquelles se dressent les piquants. Lorsque la coloration brune a complètement disparu, il ne reste plus qu'une membrane jaune, formée par une assise de cellules régulières. Le liquide, provenant de la résorption de l'enveloppe, colore en brun l'intérieur de l'asque.

On peut encore observer la constitution cellulaire de la membrane externe, quand on colore la spore incolore de certaines espèces de truffes, qui restent blanches à l'intérieur (*T. aestivum* par exemple).

La constitution de la membrane externe de la spore amène la conséquence suivante : la distinction, que l'on fait entre spores échinulées et spores alvéolées dans les diverses espèces de truffes, ne dépend que de la disposition de la couche brune et du nombre des piquants qui recouvrent la membrane externe de la spore : la constitution de celle-ci est toujours la même, mais les cellules peuvent être visibles ou ne pas l'être, d'où un aspect différent.

Dès que l'ampoule germinative est mise à nu sur une certaine surface, elle grossit et fait saillie au dehors de l'enveloppe rigide qui l'enserrait (fig. 2, 3) ; la croissance se fait dans une direction opposée au côté où l'enveloppe externe ne s'est pas résorbée. Puis l'ampoule prend une forme

sphérique et son volume, en y comprenant l'enveloppe qui lui reste accolée, est plus considérable que celui de la spore dont elle provient : on la trouve toujours en cet état au dehors de l'asque, dont elle atteint souvent la taille.

A ce moment, on aperçoit assez facilement, en coupe optique, la constitution cellulaire de la membrane externe (fig. 4, 5); celle-ci est en effet plus épaisse au voisinage des deux pôles de la spore, et les cellules qui la forment y présentent d'assez grandes dimensions.

Pendant le développement de l'ampoule, la membrane externe, qui n'a pas été détruite, reste attachée à celle-ci; par suite de l'augmentation de volume de la sphère, les parties de cette membrane, qui occupaient les pôles de la spore, se trouvent rassemblées en un point de la sphère (fig. 7): puis, la résorption de l'enveloppe se faisant à l'équateur de la spore primitive, il ne reste plus de la membrane externe primitive que deux calottes hémisphériques brunes, séparées l'une de l'autre et accolées à la sphère germinative (fig. 8 et 9).

Les deux hémisphères sont assez rapprochées l'une de l'autre, d'un côté de la sphère; une plus grande distance les sépare de l'autre côté. Leur membrane cellulaire se dépouille complètement de la matière brune et des piquants qui la recouvraient primitivement : elle devient jaune, d'après la coloration des cellules qui la composent.

La membrane de la sphère est colorée aussi en jaune et est très finement chagrinée. A l'intérieur on aperçoit des gouttes d'huile et de nombreux petits corps arrondis de couleur jaune.

Quand on observe, en coupe optique, la sphère germinative, placée entre ses deux calottes hémisphériques (fig. 10), on distingue entre la membrane cellulaire de ces dernières et la sphère une cavité de forme hémisphérique; cette cavité communique avec l'intérieur de la sphère par une ouverture régulière, qui s'est creusée dans la membrane. Il se produit encore d'autres ouvertures à la surface de la sphère; quelquefois il n'y en a qu'une seule placée entre les deux ailes (fig. 12).

J'ai pu observer dans certaines préparations (fig. 11) le mode par lequel se fait la communication entre la sphère centrale et ses deux calottes symétriques. Par chacune des ouvertures qui débouchent dans celle-ci, la sphère envoie un tube de même diamètre que l'orifice : le tube s'épanouit, en prenant la forme d'un cornet acoustique, et s'applique par son extrémité

évasée contre la paroi cellulaire dont il recueille très probablement le contenu, car les cellules sont ouvertes à l'intérieur de la cavité hémisphérique. On distingue très bien ces tubes de communication, car lorsque tout l'appareil en question est immergé dans l'acide lactique des préparations, il reste de l'air dans ces conduits et ceux-ci restent longtemps avant de s'imprégner de ce liquide. Ces conduits se détruisent après un certain temps, et on n'en distingue plus que les débris autour des ouvertures donnant accès à la sphère.

Dans les phases suivantes du développement de cet appareil compliqué et très caractéristique, on aperçoit à l'intérieur de la sphère un filament formé d'articles courts et renflés, qui s'y est développé (fig. 11 et 12) : celui-ci est constitué par des cellules cubiques, irrégulières et bossuées, à pans coupés, qui deviennent plus ou moins nombreuses selon l'activité du bourgeonnement. Il occupe la partie centrale de la sphère et y forme une masse compacte qui ne remplit pas toute la cavité ; à l'intérieur de cet amas cellulaire, il reste toujours un espace vide, ce qui lui donne dans les préparations l'aspect d'une couronne.

Lorsque ces cellules sont très nombreuses (fig. 15), on aperçoit à l'intérieur de la sphère un grand nombre de cellules ovoïdes ; il semblerait alors que ce sont des spores ovales, irrégulières, noyées dans du mucilage. Mais ces petits corps restent toujours groupés au centre de la sphère où ils offrent un contour défini sans s'écarter les uns des autres ; quand on fait varier le point, on aperçoit qu'ils sont réunis et forment des filaments cloisonnés et ramifiés, composés de cellules très courtes. Bientôt d'ailleurs (fig. 16), ce massif de cellules présente à la surface des ramifications terminales très visibles, on est donc amené à conclure, bien que ce fait paraisse extraordinaire, que l'ascospore de la truffe a formé un œuf à l'intérieur de sa cellule germinative transformée ; l'ampoule incolore, qui se trouvait à l'intérieur de l'ascospore, est devenue une *oogone*, une partie de la membrane cellulaire externe, qui occupait les pôles de la spore, a formé des *anthéridies*.

Je n'ai pu observer les phénomènes de la fécondation ; il faudrait pour cela suivre le développement en cellule, ce qui ne sera possible qu'à la prochaine récolte des truffes, à moins qu'on n'étudie le développement des truffes d'été. Je dirai néanmoins, à titre d'indication, que j'ai cru distinguer dans

quelques préparations les éléments mâles et les éléments femelles; les premiers se forment probablement dans les cellules qui constituent la paroi des calottes hémisphériques, qui seraient ainsi des anthéridies. J'ai aperçu dans le liquide de préparations, provenant de tubes d'eau exempts de bactéries, un grand nombre de petits corps bacillaires au voisinage d'anthéridies écrasées; j'en ai vu aussi qui étaient disséminés à l'intérieur de quelques oogones, à l'exclusion d'autres cellules ou corps arrondis. — J'ai vu aussi, en écrasant des oogones où l'œuf n'était pas développé, mais où se trouvaient un grand nombre de petits corps arrondis, sortir de chaque oogone une grappe formée de petites sphères jaunes (fig. 19), reliées entre elles par un ligament extrêmement ténu; il y en a une quarantaine, quelquefois un plus grand nombre dans les oogones. Ces sphères, ayant la même dimension, ressemblent à des gouttelettes d'huile, mais elles ont un contour défini et résistant; dès qu'elles sont en liberté, elles ne se séparent pas, mais elles restent reliées par le ligament qui les entoure; certaines d'entre elles sont allongées et divisées en deux par une cloison transversale. Elles étaient disposées dans l'oogone en une masse présentant la forme d'une sphère creuse. Y a-t-il fécondation d'une de ces cellules dans l'oogone ou plutôt de plusieurs, ce qui semble assez vraisemblable? Doit-on les considérer comme des oosphères? L'observation fixera ce point dans l'avenir.

J'ai pu voir d'une façon très nette dans des oogones de petites dimensions (fig. 18, 18', 18''), la sortie des filaments germinatifs, qui sont les ramifications terminales des filaments constitutifs de l'œuf: les anthéridies se détachant après la formation de l'œuf (on en trouve un grand nombre dans les tubes d'eau: elles sont isolées et gardent une forme très reconnaissable en raison de leur membrane grillagée), l'oogone présente à sa surface un certain nombre d'ouvertures (fig. 13, 14) par lesquelles les filaments germinatifs peuvent sortir facilement.

Dès que ces derniers sont suffisamment développés, il est impossible de se rendre compte de leur origine par l'examen d'une préparation: ils sortent, en effet, d'un peloton embrouillé de filaments enchevêtrés, au milieu desquels on n'aperçoit plus que quelques débris de la membrane jaune de l'oogone.

Je décrirai prochainement les mycelium truffiers que j'ai obtenus, ainsi que les formes conidiennes qui en dérivent et qui m'ont servi à faire mes semis dans le sol. Depuis 5 ans, je n'ai jamais cessé de m'occuper de cette question, bien que mes occupations journalières m'aient rendu la tâche difficile.

Je rectifie aujourd'hui une assertion que j'ai faite dans le pli cacheté qui a été ouvert à la séance de l'Académie des Sciences du 4 Mai 1903 : je n'ai pu le faire dans cette séance, car au lieu d'y voir faire une communication sur mes recherches, j'ai dû me contenter de demander l'ouverture de ce pli, daté de Décembre 1900. Le mycelium truffier blanc, que je cite, ne provient pas de la truffe de Bourgogne (*T. uncinatum*) : c'est le filament germinatif d'une ascospore échinulée⁽¹⁾ et non alvéolée.

Parmi les nombreux mycelium truffiers que je possède, les uns sont blancs (c'est le plus grand nombre), les autres ont une coloration gris noirâtre : tous proviennent de la germination d'ascospores *échinulées*.

Il m'est difficile actuellement de dire à quelles espèces ces filaments appartiennent ; j'ai traité en effet, chaque année, un nombre considérable de truffes afin d'en obtenir le filament pour mes semis en grand dans le sol, et je ne m'attachais qu'à choisir des truffes de la meilleure qualité comestible, sans les déterminer botaniquement, ce qui m'eût pris trop de temps. Le seul terme de comparaison que je possède pour différencier ces mycelium, c'est l'ascospore qui a germé dans les tubes d'eau.

Les filaments gris sont nettement cloisonnés ; leur coloration tient à leur membrane, qui est cutinisée ; ils germent d'ascospores plus petites et de forme plus arrondie que les spores donnant des filaments blancs ; les piquants sont légèrement recourbés à l'extrémité. Ces filaments (qui présentent les mêmes formes conidiennes que les blancs) proviennent de

(1) Je dis, dans ce pli, que j'ai obtenu dans des cultures pures de ce mycelium blanc des truffes de dimension très réduite, mais adultes : c'est par l'examen de leurs spores, atrophiées et non colorées, car elles n'étaient pas recouvertes par la couche brune, que j'avais cru retrouver la spore alvéolée du *T. uncinatum*. Les récoltes, que j'ai obtenues depuis dans le sol, me permettent aujourd'hui de faire cette rectification.

truffes sauvages, que m'adressait des environs de Sarlat un rabassier de la région.

Les filaments truffiers blancs proviennent de truffes récoltées en Vaucluse; les spores étaient échinulées, franchement ovales, de grande dimension, avec des piquants rigides. Parmi tous ceux que j'ai obtenus, quelques-uns représentent des variétés différentes de truffes, car leurs formes conidiennes, bien qu'analogues entre elles, offrent des différences de coloration; l'étude approfondie des formes conidiennes de la truffe permettra de fixer des variétés que l'examen du tubercule ne suffit pas à caractériser.

Néanmoins, ces divers mycelium truffiers blancs ont tous à l'état stérile le même aspect et la même structure; il sera très facile de les reconnaître. En effet, d'après l'examen auquel s'est livré M. Matruchot, maître de conférences à l'École Normale Supérieure, à qui j'avais communiqué mes résultats et mes tubes de culture dès l'année 1901, ce mycelium blanc ne serait autre qu'un *Mortierella*; il semble en effet, au premier abord, qu'il ne soit pas cloisonné; son calibre est irrégulier, certains filaments sont assez gros, tandis que d'autres sont excessivement fins; ils sécrètent dans les cultures de nombreuses gouttes d'huile, il semble même qu'ils aient comme cette Mucorinée des chlamydo-spores, ainsi que des conidies isolées, etc.

Bien que M. Matruchot soit très qualifié pour parler de la structure des *Mortierella*, qu'il a étudiée tout particulièrement¹, je soutiens que ce mycelium blanc qu'on retrouvera facilement l'hiver prochain, en suivant mes indications, provient de la truffe. Quand on veut distinguer les cloisons d'un filament excessivement fin, avant de le colorer il est bon d'enlever le contenu des cellules, et cette précaution est surtout utile lorsque le protoplasma contient de nombreuses gouttes d'huile qui prennent la forme des cellules: en plus des réactifs ordinairement usités, l'essence de térébenthine et l'éther, en dissolvant la matière grasse, permettent d'établir la preuve en question: on voit alors que ce filament blanc présente des cloisons très régulières.

J'ajouterai, dès maintenant, que la forme conidienne qui apparaît toujours la première, lorsqu'on cultive tous ces mycelium truffiers, est la forme *Monilia*, qui est brune, jaunâtre ou grise, suivant l'espèce de truffe.

(1) L. MATRUCHOT: Sur une structure particulière du protoplasma chez une Mucorinée. *Rev. gén. Botanique*, tome XII.

Extrait des comptes rendus de l'Académie des Sciences (Séance du 4 Mai 1903) :

« M. Emile BOULANGER demande l'ouverture d'un pli cacheté, déposé par lui le 10 Décembre 1900, et donnant les premiers résultats de ses recherches sur la culture de la truffe.

« Dans une lettre adressée à M. le Secrétaire perpétuel, l'auteur déclare qu'il a maintenant réussi à créer un nombre considérable de truffières, dans les bois des environs d'Etampes, après y avoir semé, deux ans auparavant, les formes conidiennes de la truffe, qu'il avait obtenues.

« Le pli cacheté est ouvert en séance, par M. le Président, et renvoyé à la Section de Botanique ».

Extrait des comptes rendus de l'Académie des Sciences (Séance du 11 Mai 1903) :

« Le pli cacheté qui avait été déposé le 10 Décembre 1900 par M. Emile BOULANGER, et qui a été ouvert, sur sa demande, dans la dernière séance, contenait la note suivante, sur la culture de la truffe :

« Il y a deux ans que j'ai obtenu la germination de l'ascospore de la truffe dans un liquide aqueux stérilisé. Je suis arrivé à ce résultat au mois de Janvier 1899, et, depuis cette époque, j'ai réussi à l'obtenir à nouveau un grand nombre de fois.

« J'ai pu cultiver ainsi le mycelium provenant de la germination de la spore, et le reproduire dans des milliers de cultures pures ; j'ai ainsi un grand nombre de cultures de *Tuber melanosporum* (truffe du Périgord) et de *T. uncinatum* Chatin (truffe de Bourgogne).

« Le mycelium de ces champignons se développe bien sur tranches de carotte, sur tranches de carotte plongées en terre calcaire, sur terre calcaire seule, sur terreau, enfin sur tous les milieux ordinairement usités à la culture des mucédinées, mais la présence de carbonate et de biphosphate de chaux facilite le développement.

« Le mycelium de *T. melanosporum* est grisâtre et très fin ; bien que ce soit un filament rampant, il atteint en culture sur carotte une hauteur de un à deux centimètres et souvent même trois centimètres. Il forme, dans les cultures vieilles de un ou deux mois, des amas gélatineux très caractéristiques, rappelant vaguement les sclérotés des Botrytis, mais d'un volume beaucoup plus considérable.

« Le mycelium jeune est très résistant ; on a de la peine à l'arracher du substratum quand, pour le semer, on veut le prendre au moyen du fil de platine.

« Le mycelium du *T. uncinatum* est entièrement blanc⁽¹⁾, d'un blanc neigeux; le filament est très fin et soyeux. Il sécrète dans les cultures de nombreuses gouttelettes d'huile qui, suspendues dans la masse filamenteuse, donnent au champignon l'aspect d'une mucorinée.

« Après un mois de culture sur tranche de carotte, ce mycelium donne naissance à un grand nombre de périthèces, qui restent au début de leur développement; ceux-ci sont très petits, jaunâtres et mesurent de 1/2 à 3/4 de millimètre de diamètre. Ces débuts de périthèces sont formés de faux tissu, sans qu'il y ait trace de quelque organisation.

« Dans certaines cultures sur carotte, après un à deux mois de culture, j'ai observé des périthèces beaucoup plus avancés dans leur développement : leur taille atteignait un centimètre de diamètre, leur consistance était charnue, la coloration brunâtre; en examinant au microscope l'intérieur de ces masses charnues, j'y ai trouvé des asques à quatre spores, peu nombreuses, mais absolument semblables, comme aspect et comme dimensions, à celles du *Tuber uncinatum* normal.

« J'ai obtenu aussi la forme conidienne de ce champignon dans des cultures additionnées de sels de potasse; le mycelium, primitivement blanc et stérile, était recouvert d'un grand nombre de spores brunes; ce champignon est alors brun rougeâtre et ressemble assez comme coloration à une culture d'*Acrostalagmus cinnabarinus*. Le filament ramifié porte sur de courts rameaux des spores agglomérées en capitules par un mucilage à la façon des *Stachylidium*. Je décrirai ultérieurement cette forme, ainsi qu'une autre forme monilienne qui semble lui être connexe.

« En résumé, d'après les procédés de laboratoire, j'ai pu obtenir un grand nombre de fois la germination des spores (ascospores) de la truffe (*Tuber melanosporum* et *T. uncinatum*).

« Le filament de chaîne de ces espèces se développe abondamment dans les cultures sur la plupart des milieux usités.

« L'ascospore du *T. uncinatum* ayant donné un mycelium bien développé, celui-ci a redonné la truffe elle-même, dépourvue de goût, d'odeur et déformée sans doute; mais c'est un périthèce adulte, puisqu'il contenait des asques bien normales.

« Le mycelium du *T. uncinatum* a présenté aussi une forme conidienne dont les spores sont agglomérées en grand nombre en capitules au moyen de mucilage, cette forme semble voisine des *Stachylidium*; j'ai observé aussi une seconde forme conidienne qui semble être un *monilia* ou un *amblyosporium*.

« Après avoir eu ces résultats, j'ai voulu essayer la culture de la truffe

(1) Voir la rectification, page 6.

in situ, en reproduisant les conditions où elle se développe dans la nature. J'ai acheté, dans le cours de l'hiver 1899-1900, des terrains sis à Morigny-Champigny, près Etampes, au lieu dit les Blandards; j'en possède aujourd'hui une dizaine d'hectares. J'en aiensemencé 2 hectares 5 au cours du printemps et de l'été 1900, et j'espère obtenir un résultat dans le cours de l'hiver 1901-1902, si ce n'est dans le courant de l'hiver actuel (1900-1901).

« Les terrains où j'aiensemencé le mycelium de la truffe sont plantés depuis de nombreuses années en bois de chênes; le sol est calcaire et ne contient presque pas de sable siliceux, ni d'argile, mais il est très riche en terreau produit par la chute des feuilles. Comme composition, le sol a sensiblement celle des meilleures truffières du Sarladais; j'ai pu vérifier par l'analyse qu'il avait la même composition que le sol des truffières de M. de Bosredon.

« Au printemps de 1901, je compteensemencer plusieurs hectares, car je disposerai d'une plus grande quantité de mycelium le mycelium dont je disposerai à cette époque occupera approximativement de 5000 à 6000 vases à culture, d'une capacité de 2 litres chacun ».

Paris, 10 Décembre 1900.

Extrait du Bulletin de la Société Mycologique de France ¹⁾ " Sur la culture de la truffe à partir de la spore ", par M. Emile BOULANGER :

« Depuis l'année 1898 j'ai poursuivi des recherches sur la culture de la truffe, appuyées sur des données scientifiques analogues à celles qui permettent aujourd'hui de livrer au commerce *des blancs de champignon de couche*, par cultures à partir de la spore.

« Les résultats positifs, obtenus au laboratoire dès l'année 1899, m'ont engagé, d'une part, à déposer à l'Académie des Sciences un pli cacheté exposant ma méthode, et, d'autre part, à entreprendre en grand la culture pratique de la truffe.

« Je suis en mesure actuellement de montrer les récoltes obtenues au bout de deux années de cette culture, en déposant sur le bureau de la Société Mycologique de France quelques échantillons de truffes.

« Je crois devoir, en même temps, donner communication du contenu du pli cacheté déposé en 1900 et dont j'ai demandé l'ouverture dans la séance du 4 Mai 1903 ²⁾.

¹⁾ Séance du 7 mai 1903. Voir le Bulletin de la Société qui paraîtra en juillet.

²⁾ Voir page 8.

« Les résultats scientifiques qui sont exposés dans ce document ne doivent pas être considérés comme définitifs; depuis l'époque du dépôt, j'ai continué mes recherches et j'ai pu me convaincre que quelques points de mes premières données avaient besoin d'être révisés. Malheureusement, les conditions d'obtention des cultures de départ sont sous la dépendance des saisons et je n'ai pu poursuivre ces expériences aussi vite que je l'aurais désiré.

« Aussi n'aurais-je pas, dès maintenant, entretenu la Société de ce sujet si je ne m'y voyais obligé par une communication récente faite sur le même sujet à l'Académie des Sciences.

« Je me borne donc, mes expériences étant encore incomplètes, à publier le texte du pli cacheté déposé en 1900.

« En ce qui concerne les résultats pratiques obtenus, je puis, dès maintenant, annoncer que dans 45 hectares de bois situés aux environs d'Étampes, j'ai provoqué la formation de 5000 places truffières par les opérations suivantes :

« 1^o Germination de l'ascospore de la truffe par semis aseptique de fragments internes du tubercule dans des tubes d'eau ordinaire stérilisée;

« 2^o Multiplication du mycelium ainsi obtenu sur tubes de carotte cuite, additionnée de terre calcaire.

« C'est dans ces conditions que se produisent les formes conidiennes, qui permettent une grande dilution de la semence;

« 3^o Préparation d'un engrais minéral, contenant 6 ‰ de sulfate de potasse et une égale quantité de superphosphate de chaux. — Emulsion de conidies dans cet engrais, qui sert ensuite à imprégner des carottes crues que l'on enfouit au pied des chênes. — Le sol est ensuite saupoudré de l'engrais précité, semé en poudre.

« C'est dans ces conditions que j'ai pu, sur les places ainsiensemencées, obtenir à la récolte de l'hiver 1902-1903 les truffes que j'expose aujourd'hui et dont la grosseur varie entre celle d'une noisette et celle d'une noix. Ces truffes, dont les plus petites sont elles-mêmes bien formées et présentent des ascospores typiques, ont en outre les qualités de parfum qu'on rencontre dans les sortes commerciales; elles ont d'ailleurs été récoltées avec l'aide de chiens truffiers.

« Je dois à la vérité de rappeler que, pour ce qui concerne la partie scientifique de ces recherches, j'avais pu en 1893-1895 me familiariser avec la technique de culture des champignons dans le laboratoire de M. Costantin à l'École Normale Supérieure, et je dois remercier M. Matruchot, préparateur du cours à cette époque, des conseils qu'il a bien voulu me donner

pour l'étude des quelques espèces qui m'ont permis de fournir des données nouvelles à la littérature mycologique ⁽¹⁾.

« Ces relations bienveillantes m'ont engagé à lui communiquer en 1901, après le dépôt de mon pli cacheté, les premiers résultats de mes recherches sur la truffe, en lui remettant les tubes de culture qui avaient servi à mes expériences.

« Les conclusions de cet examen, telles que M. Matruchot a bien voulu me les formuler de vive voix, n'ont pas été de tous points conformes aux miennes. Je me propose donc de réviser sévèrement mes procédés et être en mesure, à la prochaine saison de germination, d'apporter sur cet intéressant sujet des données plus complètes ».

Extrait des comptes rendus de l'Académie des Sciences (Séance du 2 Juin 1903) :

Sur les caractères botaniques du mycelium truffier. — Note de M. Louis Matruchot, présentée par M. Gaston BONNIER.

« La publication du contenu d'un pli cacheté de M. Emile BOULANGER, faite dans le numéro des *Comptes rendus* du 11 Mai dernier, m'engage à revenir sur l'étude du mycelium truffier, partiellement exposée par moi-même dans une précédente note ⁽²⁾. M. E. BOULANGER énonce, en effet, des résultats absolument **contradictaires** avec ceux que, par une méthode différente de la sienne, j'ai obtenus de mon côté; je crois donc devoir dès maintenant préciser, en les étendant, les notions précédemment fournies par moi sur les caractères botaniques du mycelium truffier tel que je le possède en culture.

« Qu'il s'agisse du *Tuber melanosporum* (truffe du Périgord) ou du *T. uncinatum* (truffe de Bourgogne), le mycelium truffier peut être caractérisé par la remarquable gradation de couleurs nuancées qu'il présente avec l'âge et par un ensemble de caractères microscopiques très nets.

« Tout à fait au début du développement, le mycelium est incolore; mais à peine âgé de quelques jours, il devient *rose*, puis *roux clair*, puis il se nuance de *vert* et enfin, âgé de quelques mois, il prend une teinte *roux brunâtre* caractéristique.

« Dès le jeune âge, les filaments s'agrègent en cordons; par ramifications et anastomoses ces cordons atteignent un assez grand diamètre, mais à tout âge le mycelium reste *friable* et facile à détacher du substratum.

(1) *Matruchotia varians*, *Rev. gén. Botan.*, tome V :

Sur le polymorphisme du genre *Sporotrichum*, *Rev. gén. Botan.*, t. VII :

Sur une forme conidienne nouvelle dans le genre *Chaetomium*, *Rev. gén. Botan.*, t. IX :

Action de quelques antiseptiques sur l'*Aspergillus fumigatus*. *La Pharmacie Française*, 1898.

(2) L. MATRUCHOT, Germination des spores de Truffes; culture et caractère du mycelium truffier. (*Comptes rendus*, t. CXXXVI, 4 mai 1903, p. 1022).

« Le mycelium est régulièrement cloisonné. Il n'est *jamais très fin* ; bien au contraire, le diamètre des filaments peut atteindre jusqu'à 8 μ et 10 μ , ce qui est une taille relativement considérable pour un mycelium d'Ascomycète. Il offre, particulièrement dans le *Tuber uncinatum*, une tendance manifeste à l'enkystement, surtout dans les portions toruleuses du mycelium, où la membrane présente des épaisissements locaux caractéristiques.

« Enfin, ce mycelium ne m'a jamais présenté *aucune forme conidienne* ; il donne naissance seulement à des sclérotés en petit nombre et de taille volumineuse, qui ne sont *jamais gélatineux*, à aucun stade de leur développement.

« En se reportant aux diverses particularités qui viennent d'être énumérées, on voit que, d'après mes expériences et mes observations :

« 1° Le mycelium de *Tuber melanosporum* n'est ni « grisâtre », ni « fin », ni « résistant » ; il ne forme jamais « d'amas gélatineux » ;

« 2° Le mycelium de *Tuber uncinatum* n'est ni d'un « blanc neigeux », ni « très fin et soyeux » ; il ne donne jamais « de nombreux petits périthèces » jaunâtres, restant au début de leur développement et mesurant moins de « 1 millimètre de diamètre » ;

« 3° Les mycelium truffiers des deux espèces que j'ai étudiées, loin de différer extrêmement l'un de l'autre, se ressemblent beaucoup, par tous leurs caractères microscopiques et macroscopiques ;

« 4° Enfin, ni l'un ni l'autre de mes mycelium ne donne de forme conidienne et ne rappelle en quoi que ce soit ni les *Acrostalugmus*, ni les *Stachylidium*, ni les *Monilia*, ni les *Amblyosporium*.

« En conséquence, le mycelium truffier que je possède en culture, défini par les caractères botaniques énumérés plus haut, diffère essentiellement des divers mycelium étudiés par M. E. BOULANGER, et c'est là en particulier un point que je tenais à mettre dès maintenant en évidence.

« Quant au mycelium obtenu par M. Raphaël Dubois (*Comptes rendus*, 25 Mai 1903), je ne saurais dire s'il est ou non identique à celui que je possède, l'auteur ne donnant aucun renseignement botanique qui permette la comparaison. Toutefois, le fait que ce mycelium fournit dans les ballons de culture « de larges taches **blanches** » me laisse supposer qu'il s'agit d'un mycelium différent ».

GERMINATION

DE

L'ASCOSPORE DU TUBER MELANOSPORUM

EXPLICATION DES PLANCHES

Grossissement = 1100

FIG. 1. — L'*ascospore* de la truffe au début de la germination; la membrane cellulaire externe, qui est brune et recouverte de piquants, se résorbe sur le côté de la *spore*, à égale distance des deux pôles. Le mode de destruction de cette enveloppe permet d'en distinguer la structure : elle est formée par une assise de cellules polyédriques, les piquants qui recouvraient la *spore* se dressent aux points d'intersection des cellules; la surface externe de ces cellules est recouverte, ainsi que les piquants, par une épaisse couche brune.

Au moment de la résorption de la membrane, les piquants s'émeussent d'abord, de manière à former de petits mamelons arrondis, puis, au fur et à mesure que la couche brune se dissout, on aperçoit nettement la constitution cellulaire de la membrane; celle-ci est jaune clair, car telle est la coloration des cellules.

FIG. 2 et 3. — La membrane externe est complètement résorbée sur une certaine surface et son tissu cellulaire détruit. L'ampoule germinative, qui se trouvait à l'intérieur de l'*ascospore*, et qui est limitée par une membrane incolore, fait saillie au dehors de l'enveloppe brune rigide qui l'entourait; dans sa croissance elle tend à devenir sphérique.

FIG. 4-5. — Vue en coupe optique de l'*ascospore*, au moment de l'extension de l'ampoule germinative interne; la membrane externe est plus épaisse au voisinage des pôles de la *spore* que sur le reste du pourtour : on y distingue facilement la structure cellulaire.

FIG. 6. — Une ampoule germinative, qui s'est dilatée et qui porte encore à sa surface quelques mamelons non résorbés, provenant de l'enveloppe externe brune de la *spore*.

FIG. 7. — Pendant la croissance de l'ampoule germinative, l'enveloppe externe, qui n'a pas été résorbée, est restée appliquée sur la membrane de l'ampoule : elle se trouve par ce fait rejetée sur l'arrière de la sphère, formée par l'extension dans un sens de l'ampoule. La résorption de l'enveloppe brune se poursuivant, il ne reste bientôt plus de celle-ci que deux calottes hémisphériques, séparées l'une de l'autre et accolées à la

sphère; elles proviennent des parties de la membrane externe qui se trouvaient aux pôles de l'*ascospore*.

FIG. 8-9. — Aspect de la sphère produite par la croissance de l'ampoule germinative (c'est l'*oogone*) et des calottes hémisphériques (*anthéridies*) qui proviennent d'une partie de la membrane externe de l'*ascospore*. L'*oogone* est colorée en jaune clair, sa membrane présente à l'extérieur un aspect très finement chagriné. Les *anthéridies* sont complètement débarrassées de la matière brune et des piquants qui recouvraient l'assise cellulaire de l'enveloppe externe de la *spore*; la couleur des *anthéridies* est jaune clair, d'après la couleur des cellules qui constituent leur paroi.

FIG. 10. — L'*oogone* et les *anthéridies* vues en coupe optique : on distingue les ouvertures qui se sont faites dans la membrane de l'*oogone* et qui permettent la communication entre celles-ci et les *anthéridies*. Les *anthéridies* circonscrivent une cavité entre leur paroi et la membrane de l'*oogone*.

FIG. 11-12. — Développement de l'œuf dans l'*oogone*.

FIG. 13. — L'*oogone* contenant un œuf; au centre de l'œuf se trouve une cavité indiquant que celui-ci s'est développé par la croissance d'un filament, lequel s'est accru dans tous les sens en se recroisant. Les *anthéridies* se sont détachées; sur le pourtour de la membrane de l'*oogone* on distingue trois ouvertures par où sortiront les filaments germinatifs émis par l'œuf : deux de ces ouvertures communiquaient avec les *anthéridies*.

FIG. 14. — Une *oogone* libre avant la formation de l'œuf.

FIG. 15. — L'*oogone* et les *anthéridies* vues par transparence; à l'intérieur, un œuf très développé. Les cellules de l'œuf, régulières et ovoïdes se présentent comme des spores : cet aspect provient d'une illusion d'optique, parce que les filaments sont vus par leur diamètre; on peut voir en effet certains filaments dans le sens de la longueur, en faisant varier le point.

On aperçoit par transparence, sous la membrane des *anthéridies*, les deux ouvertures de l'*oogone* vis-à-vis des *anthéridies*; il s'est formé aussi à l'extérieur de l'*oogone* une ouverture centrale.

L'œuf est rassemblé au centre de l'*oogone* et laisse autour de lui un espace vide dans l'*oogone*.

FIG. 16. — Un œuf où s'aperçoivent des filaments terminaux enchevêtrés (filaments germinatifs).

FIG. 17. — L'ouverture centrale de l'*oogone*; il peut y en avoir plusieurs, sans compter celles des *anthéridies*.

FIG. 18. — Une *oogone* de très petites dimensions, d'où sortent les filaments germinatifs qui sont les ramifications terminales de l'œuf.

FIG. 18' et 18''. — La même *oogone*, vue par transparence à des plans différents, de manière à permettre d'observer la constitution de l'œuf qui est très simple.

FIG. 19. — Petits corps sphériques, réguliers, jaunes, provenant de l'*oogone* écrasée : il semble que ce soient des *oosphères*. Elles sont reliées ensemble par un ligament fin extrêmement ténu.

DAS KEIMEN

DER

ASCOSPORE DER TRÜFFEL

(*Tuber melanosporum*)

ERKLÄRUNG DER TAFELN

Vergrößerung = 1100

FIG. 1. — Die Ascospore der Trüffel beim Beginn des Keimens; die äussere Zellenmembrane, welche braun und mit Stacheln bedeckt ist, wird auf der Spore-Seite, in gleicher Entfernung von beiden Polen, aufgesogen. Die Art der Zerstörung dieser Hülle erlaubt ihre Struktur zu unterscheiden: Sie besteht aus einer Schicht vieleckiger Zellen, die Stacheln, welche die Spore bedeckten, richten sich an den Durchschnittpunkten der Zellen auf; die äussere Oberfläche dieser Zellen ist, gleichwie die Stacheln, mit einer dicken, braunen Schicht bedeckt.

Im Momente der Wiederaufsaugung der Membrane stumpfen sich vorerst die Stacheln derart ab, dass sie kleine abgerundete Wäzchen bilden, hernach im Verhältniss zur fortschreitenden Auflösung der Schicht, sieht man deutlich den Zellenbau der Membrane, diese ist hellgelb, denn dies ist die Färbung der Zellen.

FIG. 2 und 3. — Die äussere Membrane ist in einer gewissen Ausdehnung der Oberfläche aufgesogen und ihr Zellgewebe zerstört. Die Keimblase, welche sich im Innern der Ascospore befand und mit einer farblosen Membrane umgeben war, bricht durch die starre Hülle, die sie umgibt: In ihrem Wachstum neigt sie zur kugelförmigen Bildung.

FIG. 4-5. — Durchschnittsansicht einer Ascospore im Momente der Ausdehnung der Keimblase; die äussere Membrane ist in der Nähe der Sporepole dicker als am übrigen Umfang; man kann den Zellenbau leicht unterscheiden.

FIG. 6. — Eine erweiterte Keimblase, welche an der Oberfläche noch einige nicht aufgesaugte Wäzchen trägt, die von der äussern braunen Sporehaut herrühren.

FIG. 7. — Während des Wachstums der Keimblase blieb die äussere Hülle, soweit sie nicht aufgesogen ward, auf der Membrane der Blase. Sie befindet sich hierdurch auf die Hinterseite der Kugel zurückgeworfen, welche sich durch die Ausdehnung in einer Richtung der Keimblase gebildet hat. Bei fortschreitender Aufsaugung der braunen Hülle bleiben von dieser bald nur mehr zwei halbkugelförmige Häubchen übrig, welche von

einander getrennt sich an die Kugel anschliessen; sie rühren von den Theilen der äusseren Membrane, her die sich an den Polen der Ascospore befanden.

FIG. 8 & 9. — Ansicht der durch das Wachstum der Keimblase gebildeten Kugel (des Oogons) und der halbkugelförmigen Häubchen (Antheridien), welche von einem Theile der äusseren Hülle der Ascospore herrühren. Das Oogon ist hellgelb gefärbt, seine Membrane ist aussen fein gearbt. Die Antheridien sind völlig frei von der braunen Materie und den Stacheln, welche die Zellschicht der äusseren Sporenhülle bedeckten : Die Farbe der Antheridien ist hellgelb, nach der Farbe der Zellen, welche ihre Wand bilden.

FIG. 10. — Das Oogon und die Antheridien im Durchschnitt gesehen : Man unterscheidet die Oeffnungen, die sich in der Membrane des Oogons bildeten und eine Verbindung zwischen diesen und den Antheridien herstellen. Die Antheridien begrenzen eine Höhlung zwischen ihrer Wand und der Membrane des Oogons.

FIG. 11-12. — Entwicklung des Eies im Oogon.

FIG. 13. — Das Oogon mit einem Ei; in der Mitte des Eies befindet sich eine Höhlung, welche anzeigt dass es sich durch das Entstehen eines Filament entwickelt hat, der nach allen Seiten wuchs, indem er sich umbog. Die Antheridien sind abgelöst : auf dem Umfange der Membrane des Oogons unterscheidet man drei Oeffnungen, durch welche Keimfäden, welche das Ei treibt, austreten : zwei dieser Oeffnungen standen mit den Antheridien in Verbindung.

FIG. 14. — Ein freies Oogon vor der Eibildung.

FIG. 15. — Oogon und Antheridien transparent gesehen : im Innern ein sehr entwickeltes Ei. Die regelmässigen eiförmigen Zellen des Eies sehen Sporen ähnlich; das kommt von einer optischen Täuschung; denn die Fäden kehren dem Beobachter ihren Durchmesser zu; man kann in der That einzelne Fäden der Länge nach sehen, wenn man den Seh winkel ändert.

Man bemerkt, transparent, unter der Membrane der Antheridien die zwei Oeffnungen des Oogons gegenüber den Antheridien; es hat sich auch auf der Aussenseite des Oogons eine zentrale Oeffnung gebildet.

Das Ei ist in der Mitte des Oogons und lässt rings um sich einen leeren Raum im Oogon.

FIG. 16. — Ein Ei an welchem sich verwickelte Endfäden befinden (Keimfäden).

FIG. 17. — Die zentrale Oeffnung des Oogons; es können deren mehrere sein, ohne diejenigen der Antheridien mitzurechnen.

FIG. 18. — Ein Oogon von sehr kleinem Umfange, aus welchem die Keimfäden austreten, welche die Endverzweigungen des Eies sind.

FIG. 18, 18'. — Dasselbe Oogon, transparent unter verschiedenen Ansichtspunkten gesehen, so dass es möglich ist die Bildung des Eies, die sehr einfach ist, zu beobachten.

FIG. 19. — Kleine kugelförmige regelmässige, gelbe Körper, welche vom zerquetschten Oogon herrühren : es scheinen Oosphären zu sein. Sie sind durch ein äusserst dünnes Band miteinander verbunden.

GERMINATION

OF THE

ASCOSPORE OF THE TUBER MELANOSPORUM

EXPLANATION OF THE DRAWINGS

Enlargement = 1100

FIG. 1. — The *ascospore* of the truffle at the beginning of the germination; the external cellular membrane which is brown and covered over with prickles, is reabsorbed on the side of the *spore*, at an equal distance from the two poles. The way in which this envelope is destroyed allows of its structure being distinguished: it is formed of a layer of polyhedric cells, the prickles which covered over the *spore* rise to the points of intersection of the cells; the external surface of these cells is covered over, as well as the prickles, by a thick brown layer.

When the membrane is being reabsorbed, the prickles at first become dull, and blunt, in such a way as to form small rounded nipples then, according as the brown layer is dissolved, there may clearly be seen the cellular constitution of the membrane, which is light yellow, such being the colour of the cells.

FIG. 2-3. — The external membrane is completely reabsorbed over a certain surface and its cellular tissue destroyed. The germinal ampulla which was inside the *ascospore*, and which is limited by a colourless membrane projects outside the rigid brown envelope surrounding it: in its growth it tends to become spherical in form.

FIG. 4-5. — Section view of the *ascospore* at the moment of the extension of the internal germinal ampulla, the external membrane is thicker in the vicinity of the poles of the *spore* than on the rest of the circumference: the cellular structure may easily be distinguished.

FIG. 6. — A germinal ampulla which has dilated and still bears on its surface a few un-reabsorbed nipples, coming from the external brown envelope of the *spore*.

FIG. 7. — During the growth of the germinal ampulla, the external envelope which has not been reabsorbed, has remained applied on the membrane of the ampulla: it is thus rejected to the back of the sphere formed by the extension in one direction of the ampulla. The reabsorption of the brown envelope continuing, there soon remains nothing of the latter except two hemispherical calottes, separated from one another and

joined to the sphere; they spring from the parts of the external membrane which were at the poles of the *ascospore*.

FIG. 8-9. — View of the sphere produced by the growth of the germinal ampulla (this is the *oogone*) and of the hemispherical calottes (*antheridies*) which come from one part of the external membrane of the *ascospore*. The *oogone* is coloured light yellow, its membrane presents, on the exterior, a very finely slagreened aspect. The *antheridies* are completely freed of the brown matter and of the prickles which covered over the cellular layer of the external envelope of the *spore*. The colour of the *antheridies* is light yellow after the colour of the cells which compose their coating.

FIG. 10. — The *oogone* and the *antheridies* seen in section : one can distinguish the openings which have been made in the membrane of the *oogone* and which allow of communication between the latter and the *antheridies*. The *antheridies* circumscribe a cavity between their coating and the membrane of the *oogone*.

FIG. 11-12. — Development of the egg in the *oogone*.

FIG. 13. — The *oogone* containing an egg; in the centre of the egg is found a cavity indicating that the egg has been developed by the growth of a filament, which has increased in every direction, by bending over. The *antheridies* have become detached; on the circumference of the membrane of the *oogone* may be distinguished three openings whence will issue the germinal filaments sent out by the egg : two of these openings communicated with the *antheridies*.

FIG. 14. — A free *oogone* before the formation of the egg.

FIG. 15. — The *oogone* and the *antheridies* seen transparently; in the interior, a fully-developed egg. The cells of the egg, regular and oval-shaped, appear as spores; this aspect is caused by an optical illusion, for the filaments are seen in diameter; it is, indeed, possible to see certain filaments longitudinally, by causing the point to vary.

There may be seen, transparently, under the membrane of the *antheridies*, the two openings of the *oogone* opposite to the *antheridies* : a central opening is also formed at the exterior of the *oogone*.

The egg is brought together again at the centre of the *oogone* and leaves all around an empty space in the *oogone*.

FIG. 16. — An egg in which may be seen the terminal filaments, all mixed up (germinal filaments).

FIG. 17. — The central opening of the *oogone*; there may be several of these, without counting those of the *antheridies*.

FIG. 18. — An *oogone* of very small dimensions, from which issue the germinal filaments which are the terminal ramifications of the egg.

FIG. 18ⁱ and 18ⁱⁱ. — The same *oogone* seen transparently, at different planes, so as to allow of one's observing the constitution of the egg which is very simple.

FIG. 19. — Small spherical bodies, regular and yellow, coming from the crushed *oogone* : they seem to be *oospheres*. They are bound together by a delicate and extremely thin ligament.

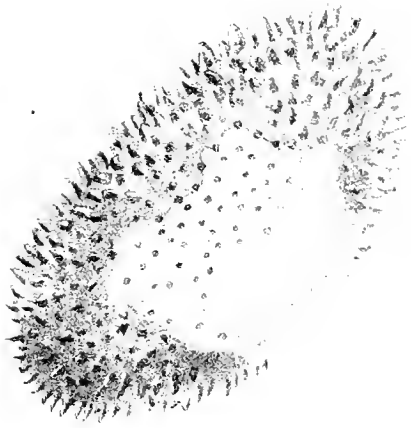


Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

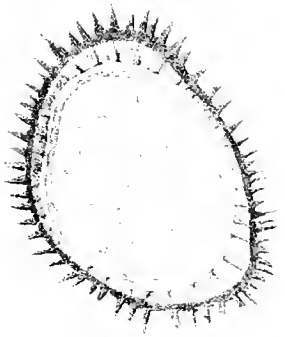


Fig. 4



Fig. 5

Fig. 6



Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8





Fig 13



Fig 10



Fig 14

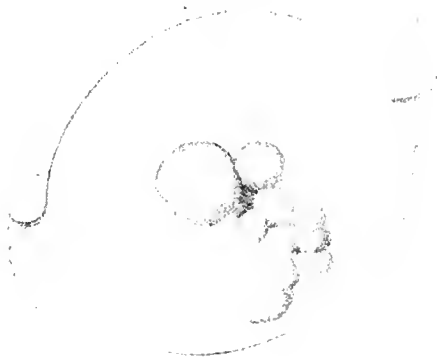


Fig 11



Fig 19

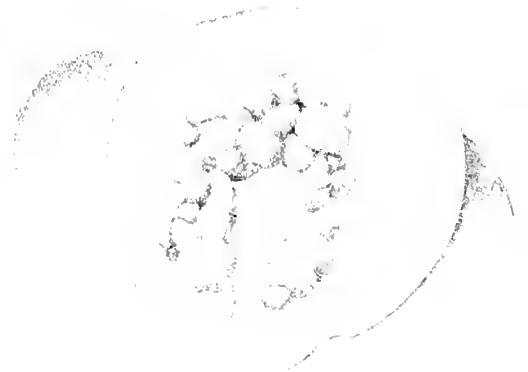


Fig 12



Fig 18'



Fig 15



Fig 18''



Fig 18



Fig 16



Fig 17

