

Mise au point d'une méthode de culture in vitro du *Marssonina Brunnea* (Ell. et Ev.) P. Magn.

J. PINON

avec la collaboration technique de Arlette SCHIFFER

Laboratoire de Pathologie forestière,
Centre national de Recherches forestières, I. N. R. A.,
Champenoux, 54280 Seichamps

Résumé

Les besoins essentiels du *Marssonina brunnea* pour sa croissance et sa sporulation ont été étudiés en milieu liquide et gélosé. Peu sensible aux vitamines du groupe B, le champignon exige des sources d'azote organique sous la forme d'arginine, de glyco-colle, de peptone ou d'extrait de levure. Le glucose et le saccharose à forte concentration inhibent la sporulation mais de faibles quantités sont nécessaires pour l'assimilation de l'extrait de levure. L'eau d'avoine enrichie en peptone et en extrait de levure, faiblement gélosée et à pH proche de la neutralité, assure, après ensemencement conidien, une croissance convenable et une sporulation active.

1. — Introduction

En dépit d'assez nombreux travaux portant sur le *Marssonina brunnea* (Ell. et Ev.) P. Magn., ce champignon parasite des feuilles de Peuplier a été peu étudié *in vitro*. Magnani (1965) en réussit la culture sur milieu gélosé à base de carottes. Depuis 1972, nous réalisons nos cultures sur milieu de Sabouraud ou mieux sur eau d'avoine ainsi que l'a préconisé Marie Poissonnier (1972).

Très récemment, Simpson et Mayes (1978) ont abordé le problème de la croissance.

La présente note a pour but de définir une technique de culture assurant une croissance, plus satisfaisante et avant tout une sporulation précoce et abondante, afin de poursuivre l'étude de ce parasite. Pour y parvenir, nous avons recherché les principales exigences du *M. brunnea* en ce qui concerne les vitamines, l'azote organique et les sucres.

2. — Méthodologie

La souche de *M. brunnea* support de notre expérimentation a été isolée à partir de feuilles infectées maintenues en survie comme nous en avons l'habitude (Pinon, 1974). Sauf mention contraire, les ensemencements des milieux liquides ou gélosés

à 2 p. 100 ont été réalisés à partir d'implants calibrés prélevés sur des cultures en boîte de Pétri (Sabouraud ou avoine gélosés). La stérilisation des milieux a été assurée par autoclavage pour les sucres, l'urée, la thiamine, le glycolle, la peptone, l'extrait de levure, l'eau d'avoine et par filtration sur millipore 0,22 μ pour les substances thermolabiles.

Pour étudier les besoins en vitamines et en acides aminés nous avons utilisé un milieu de base ajusté à pH 6 et tel que défini par Braverman (1960) : glucose 3,75 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l, FeSO_4 0,01 g/l. Pour l'étude des sources azotées et des vitamines, chaque substance a été apportée en quantité telle que la fourniture d'azote soit toujours égale à 250 mg/l. Toutefois, pour la peptone et l'extrait de levure, nous avons utilisé les doses moyennes des milieux classiques, soit respectivement 10 et 5 g/l. Bien que la température optimale de croissance de notre souche soit de 25 °C, tous nos essais ont été réalisés à 20 °C permettant ainsi des comparaisons multiples (milieu liquide agité ou non, lumière ou obscurité, etc...).

3. — Résultats

Le tableau 1 récapitule les résultats obtenus sur milieu de base pour différentes vitamines et sources azotées. En ce qui concerne les milieux liquides, nous nous sommes limités à des observations semi quantitatives.

TABLEAU 1

Réaction du *M. brunnea* à diverses sources d'azote organique et de vitamines (6 semaines de culture)
Reaction of *M. brunnea* to organic nitrogen and vitamins sources (6 weeks cultures)

Milieu de base Sources	Gelosé		Liquide agité		Liquide stable	
	Rayon (mm)	Sporulation	Croissance	Sporulation	Croissance	Sporulation
Thiamine (vit. B1)	5,7	0/+	0	0	0/+	0
Pyridoxine (vit. B6)	4,1	0	+	0	0	0
Biotine (vit. B8)	7,0	0	+	0	+	0
Ac. ascorbique (vit. C)	0	0	0	0	0	0
Ac. aspartique	0	0	0	0	0	0
Arginine	9,5	+	+ / + +	0 / +	+ +	0
Asparagine	4,5	0	+	0	+	0
Cystéine	0	0	0	0	0	0
Glutathion	3,4	0	+	0	+	0
Glycolle	5,6	+ +	+	+	+	0
Méthionine	3,0	0	0	0	0	0
Tyrosine	2,1	0	+	0	0 / +	0
Urée	0	0	+	0	+	0
Peptone	14,2	+	+ +	0 / +	+ / + +	0
Ex. de levure	15,3	+ +	+ +	+	+ +	0

Croissance et sporulation : 0 nulle ou très faible
+ moyenne
+ + assez intense

3.1. — *Besoins vitaminiques*

L'acide ascorbique s'avère nettement toxique alors que les trois vitamines B apparaissent plutôt favorables à la croissance mais peu stimulantes pour la sporulation.

3.2. — *Azote organique*

L'acide aspartique et la cystéine sont nettement toxiques. L'urée, néfaste en milieu gélosé est mieux tolérée en milieu liquide. Aucune de ces substances ne permet la sporulation. Dans toutes les modalités et pour les deux caractères observés, le *M. brunnea* profite des apports d'arginine, de glyocolle. Les autres sources azotées simples offrent des résultats intermédiaires. En aucun cas nous n'avons observé de formations de conidies en milieu liquide stable. Dans les milieux agités, la sporulation n'intervient que sur les parois des flacons dans la zone de battance du liquide.

Enfin, la meilleure croissance et en conditions aérobies, la meilleure sporulation sont le fait de la peptone et de l'extrait de levure.

3.3. — *Besoins glucidiques*

Le *M. brunnea* a été cultivé sur le milieu de base enrichi en peptone et complémenté en l'un des sucres suivants à raison de 7,5 g par litre : galactose, glucose et saccharose. Le galactose est pratiquement toxique. A l'inverse, glucose et saccharose fournissent une croissance légèrement supérieure à celle des témoins, mais cela au détriment de la sporulation qui, à ces doses, est totalement inhibée. Pourtant, dans l'essai précédent, nous avons obtenu en présence de peptone et de glucose (3,75 par litre) une production conidienne intéressante. La nature et la teneur des composés glucidiques constituent donc un point critique pour la sporogénèse.

3.4. — *Interactions azote-glucose*

Quatre sources d'azotes intéressantes reconnues (arginine, glyocolle, peptone et extrait de levure), et l'effet du glucose en partie défini, nous avons tenté de combiner ces diverses substances tel que l'indique le tableau 2. Trois résultats essentiels y appa-

TABLEAU 2

Croissance radiale (mm) du M. brunnea sur diverses associations d'azote organique (6 semaines de culture)
Interactions avec le glucose

Radial growth (mm) of M. brunnea under organic nitrogen associations (6 weeks cultures)
Interactions with glucose

Sources azotées (g/l)	Lumière		Obscurité	
	glucose (7,5 g/l)	sans glucose	glucose (7,5 g/l)	sans glucose
Peptone (5) + ex. levure (1)	22,5	18,5	22,5	17,5
Peptone (5) + Arginine (1,26)	9,0	18,2	11,7	11,5
Peptone (5) + Glyocolle (1,34)	8,4	13,7	9,0	16,7
Arginine (1,26) + ex. levure (1)	22,1	18,7	22,5	17,5
Glyocolle (1,34) + ex. levure (1)	23,5	18,5	23,5	20,2
Glyocolle (0,67) + Arginine (0,63)	5,7	8,8	7,0	10,0

raissent. Tout d'abord, les conditions lumineuses n'influent pas sur la croissance. En second lieu, le rôle du glucose apparaît encore plus complexe pour ce même caractère. En effet, la présence de glucose stimule la croissance pour toutes les combinaisons comportant l'extrait de levure, et celles-là uniquement. Enfin, trois associations azotées se distinguent avantagement : peptone-extrait de levure, arginine-extrait de levure et glycolle-extrait de levure.

3.5. — Teneur en gélose des milieux

Les techniques classiques de repiquage d'implants exigent pour le prélèvement de ceux-ci que l'on dispose de cultures bien développées. Dans le cas du *M. brunnea* de telles cultures sont obtenues après un mois, époque à laquelle le milieu est déjà partiellement déshydraté et les colonies coriaces. Nous avons donc pour divers milieux classiques (avoine ou milieu de base) fait varier la teneur en gélose entre 10 et 30 g par litre. Il apparaît que la valeur minimale est la plus intéressante : meilleure croissance, colonies plus tendres.

3.6. — Effet de l'ensemencement sur la sporulation

La technique d'ensemencement des boîtes de Pétri par l'implant unique est commode pour les études de croissance. Elle autorise certes la sporulation, si la composition du milieu s'y prête, mais de manière tardive. Nous avons tenté d'y remédier en prélevant un implant porteur de conidies et en le balayant sur toute la surface du milieu gélosé (avoine enrichie en peptone et en extrait de levure). Ainsi, les conidies se déposent-elles, donnant naissance après germination à une multitude de colonies, rapidement coalescentes. Nous avons ainsi, 11 jours après ensemencement noté le début d'une sporulation qui s'avéra rapidement abondante. Cette méthode augmente considérablement l'effet de la composition chimique du milieu. Les conidies obtenues ont été récupérées par lavage et agitation sous l'eau permutée. Pulvérisées sur des feuilles de *Populus × euramericana* (Dode) Guinier cv « I-214 » elles ont assuré une bonne contamination.

4. — Discussion

Les divers besoins du *M. brunnea* mis en évidence concordent globalement avec les premières observations de Magnani et Marie Poissonnier, à savoir, l'avantage des milieux naturels sur les milieux minéraux.

Les données relatives à la lumière, la température, le pH, et certaines substances telles que l'extrait de levure confirment celles que viennent de publier Simpson et Hayes (1978). Toutefois, ces auteurs estiment que *M. brunnea* n'a pas d'exigences particulières en azote organique, ce qui est contraire à nos résultats. Il est vrai que Simpson et Hayes ont toujours incorporé de l'extrait de levure qui masque probablement l'effet des sources d'azote éprouvées. Dans leur conclusion, ces mêmes auteurs signalent les échecs répétés qu'ils ont subi en matière de sporulation. Dans la mesure où certains de leurs milieux sont voisins des nôtres, on peut penser que notre maîtrise de la sporulation réside en partie dans notre technique d'ensemencement, la fréquence de nos repiquages, les proportions respectives de nos ingrédients, à moins qu'il ne s'agisse d'un problème de souche.

5. — Conclusion

Choix d'une méthode de culture

Au terme de cette étude, il apparaît possible d'obtenir une croissance satisfaisante et une sporulation précoce, en particulier avec l'apport de peptone et d'extrait de levure. Ces substances complexes ont l'avantage, sous forme autoclavable, de fournir au champignon les acides aminés qui lui sont favorables (dont l'arginine) et des compléments en vitamines B. La teneur en glucide du milieu doit être modeste si la sporulation est recherchée avant tout. En pratique, nous avons obtenu de bons résultats sur eau d'avoine gélosée (macération de 40 g de grains par litre une nuit à 60 °C) complémentée en peptone et extrait de levure. A 5 g/l, la peptone est plus efficace qu'à 1 g/l, à l'inverse, l'extrait de levure conduit aux mêmes effets à 0,5 ou 1 g/l. Le *M. brunnea* présente une bonne tolérance à l'égard du pH. Nous le cultivons entre pH 5,6 et pH 8 mais la croissance la plus intense intervient entre 6,5 et 7,5. Les résultats rapportés ici ont été obtenus à pH 6, il y aurait donc lieu par la suite d'augmenter le pH d'une unité. Enfin, rappelons l'intérêt de milieux faiblement gélosés, d'une température de 25 °C et surtout d'un ensemencement par épandage de conidies. La concurrence entre de multiples colonies pourrait être un facteur stimulant de la sporulation.

Reçu pour publication en juin 1978.

Summary

Study of a method of culture for Marssonina brunnea

The main requirements of *Marssonina brunnea* for nutrients in relation with growth and sporulation have been investigated on liquid and agar medias. Whereas B vitamins appear of few interest, the fungous needs organic nitrogen in the form of arginin, glycocoll, pepton or yeast extract. Glucose and saccharose at high level inhibit sporulation but small amounts are required for the assimilation of yeast extract. Fair growth and active sporulation occur when conidias are seeded on oat agar complemented with pepton and yeast extract at almost neutral pH.

Références bibliographiques

- BRAVERMAN S.-W., 1960. The *Helminthosporium gramineum* complex and related species on cereal and forage grasses. *Phytopathology*, 50, 668-691.
- MAGNANI G., 1965. Contributo alla conoscenza della *Marssonina brunnea* (Ell. et Ev.) P. Magn. *Publ. Centro Sper. Agric. For.*, 8, 121-126.
- PINON J., 1974. Influence de la concentration de l'inoculum sur la sensibilité des Peupliers cultivés à *Marssonina brunnea* (Ell. et Ev.) P. Magn... Note préliminaire. *Eur. J. For. Path.*, 4, 54-59.
- POISSONNIER Marie, 1972. Contribution à l'étude biologique et épidémiologique du *Marssonina brunnea* (Ell. et Ev.) P. Magn. *Doc. Lab. Cryptogamie*, Univ. Lille, 44 p.
- SIMPSON B., HAYES A.-J., 1978. Growth of *Marssonina brunnea*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 70, 249-255