



TRAVAUX MYCOLOGIQUES

dédiés à

R. KÜHNER

Numéro spécial du Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon
43^e année ————— Février 1974

ÉTUDE PRÉLIMINAIRE SUR LA NUTRITION DE QUELQUES ESPÈCES DE *RAMULARIA* (*MONILIACEAE*)

par N. FRIES et E. GUNNERBECK.

Abstract. — Some nutritional requirements of *Ramularia agrestis*, *R. armoraciae*, *R. episphaeria*, *R. glechomae* (4 strains), *R. lactea* (2 strains), *R. moehringiae*, and *R. picridis* were studied in pure culture experiments. *R. armoraciae*, *R. lactis* (strain I), and *R. picridis* required thiamine (the pyrimidine moiety) for growth, in contrast to the other strains. All isolates grew well with nitrate as a source of nitrogen except *R. agrestis*, *R. glechomae* (strain III), and *R. lactea* (strain II). Glucose, fructose, galactose, and mannose were good carbon sources for all species, except for *R. episphaeria*, which did not grow on galactose. The two nutritionally different *R. lactea* strains had been isolated from two different species of *Viola*.

INTRODUCTION

Dans la plupart des études faites sur la nutrition des champignons, on n'a utilisé qu'une seule souche représentant chaque espèce cultivée. Les caractères physiologiques trouvés pour cette souche, sont ordinairement considérés comme valable pour toute l'espèce en question. Les quelques investigations plus approfondies, exécutées en étudiant plusieurs souches d'une certaine espèce, ont généralement montré que cette conception était justifiée. On peut mentionner par exemple les recherches étendues de SUNDSTRÖM (1964) sur le genre *Exobasidium*.

Par conséquent, on peut supposer qu'une étude sur le comportement d'un champignon de point de vue physiologique, puisse contribuer à la caractérisation taxonomique de cette espèce. Il est d'ailleurs bien connu que certains caractères physiologiques sont d'une grande valeur pour identifier les espèces de bactéries et de levures. Pour les champignons filamenteux cependant on a utilisé presque exclusivement des caractères morphologiques.

Ceci nous a conduits à entreprendre quelques expériences sur la nutrition d'un certain nombre d'espèces de *Ramularia*, pour examiner s'il y a des différences quant à leur nutrition en culture pure. *Ramularia* est un genre de *Moniliaceae*, dont toutes les espèces se développent comme parasites sur

diverses plantes supérieures. Il y a plus de quarante ans, KILLIAN (1928), le grand chercheur en ce domaine, a réussi à transporter plusieurs de ces espèces en culture axénique. Il a pu ainsi comprendre certains caractères de culture dans ses descriptions des espèces étudiées. Plus tard MANGENOT (1963) a fait une étude intéressante sur la croissance de quelques espèces de *Ramularia* en milieu stérile, auquel il avait ajouté des autolysats de feuilles.

Cependant, jusqu'à ce jour, aucun auteur n'a tenté des expériences physiologiques proprement dites avec les *Ramularia* pour élucider leurs besoins vitaminiques et leurs facultés à utiliser différentes sources azotées et carbonées. Nous rapportons ici les résultats de quelques expériences préliminaires effectuées dans ce but.

TABLEAU 1. Nom et provenance des souches de *Ramularia* étudiées dans le présent mémoire.

Espèce (et souche)	Hôte	Dates de récolte	Provenance (province et localité)
<i>R. agrestis</i> Sacc.	<i>Viola arvensis</i>	31-10-71	Upland, Vassunda
<i>R. armoraciae</i> Fuck.	<i>Armoracia rusticana</i>	21-10-71	Upland, Uppsala
<i>R. episphaeria</i> (Desm.) Gunnerbeck	<i>Stellaria nemorum</i>	24- 8-72	Dalarna, Säter
<i>R. glechomae</i> ¹ ; (I)	<i>Glechoma hederacea</i>	31-10-71	Upland, Vassunda
Item; (II)	—	28- 8-72	Upland Uppsala
Item; (III)	—	10- 9-72	Upland, Alsike
Item; (IV)	—	18-10-72	Ostergötland, Omberg
<i>R. lactea</i> (Desm.) Sacc; (I)	<i>Viola riviniana</i>	17-10-71	Upland, Haga
Item; (II)	<i>Viola hirta</i>	14- 9-72	Upland, Uppsala
<i>R. moehringiae</i> Lindr.	<i>Moehringia trinerva</i>	28-10-72	Ostergötland, Omberg
<i>R. picridis</i> Fautrey et Roum.	<i>Picris hieracioides</i>	17-10-71	Upland, Skokloster

1. *Ramularia glechomae* Gunnerbeck nom. nov. = *Fusisporium calceum* Desmazières, Ann. Sci. Nat., Sér. 2, 17 (Botanique) p. 95 (1842), non *Ramularia calcea* Cesati in Klotzsch, Herbarium vivum mycologicum (ed. L. Rabenhorst) n. 1681 (1852). D'habitude cette espèce a été incorrectement citée comme « *Ramularia calcea* (Desm.) Ces. ». Cette question de nomenclature sera traitée plus en détail dans une monographie future du genre *Ramularia* par GUNNERBECK.

SOUCHES ÉTUDIÉES

Nous avons étudié 11 souches de *Ramularia* appartenant à 7 espèces. Elles ont été récoltées en différentes localités de Suède par l'un de nous (GUNNERBECK), qui en a aussi fait les déterminations taxonomiques.

Opérant sous une loupe binoculaire, nous avons transféré directement les conidies des feuilles infectées à un milieu nutritif gélosé contenu dans des boîtes de Pétri. La germination et le développement ont été observés au microscope. Quand un mycélium s'est développé, un petit fragment de celui-ci a été transféré dans un tube de culture contenant le même milieu nutritif.

La provenance des souches isolées est indiquée dans le tableau 1.

MÉTHODES

Pour maintenir les cultures en bon état, nous nous servons des milieux nutritifs gélosés suivants :

1) « *Corn meal agar* » Oxoid CM 103 : extrait de farine de 50 g de maïs, 2 g, + gélose, 15 g, + 1 litre d'eau. pH environ 6.0.

2) *Pomme de terre glucose* Oxoid CM 139 : extrait de pomme de terre, 4 g, + glucose, 20 g, + gélose, 15 g, + 1 litre d'eau. pH environ 5.6.

3) *Extrait de malt* Oxoid CM 159 : extrait de malt (Oxoid L 39), 30 g, + peptone mycologique (L 40), 5 g, + gélose, 15 g, + 1 litre d'eau. pH environ 5.4.

Les cultures expérimentales sont réalisées sur des substrats liquides, dans des fioles d'Erlenmeyer en pyrex de 100 ml. Le milieu de culture utilisé est un milieu synthétique dont la composition est la suivante (d'après FRIES 1949) :

tartrate d'ammonium	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂	0.1 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	4.43 mg
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	4.05 mg
citrate de fer (avec 6 H ₂ O)	4.00 mg
D-glucose	20 g
thiamine	40 µg
eau distillée	1000 ml

Dans certaines expériences, la thiamine est absente ou remplacée par un mélange de plusieurs vitamines, dans d'autres expériences le tartrate d'ammonium est remplacée par une autre source d'azote, et dans d'autres encore, le glucose est remplacé par un autre glucide.

Les fioles contiennent chacune 25 ml de milieu nutritif. Elles sont stérilisées à l'autoclave en chaleur humide à 120° C pendant 10 minutes.

L'ensemencement est effectué par des fragments de mycélium préparés par agitation d'un morceau de mycélium dans un flacon rempli d'eau et de perles de verre. La suspension de fragments obtenue est filtrée sur de la gaze et le filtrat pipeté dans les fioles de culture : 1 ml pour chaque fiole. Après l'ensemencement, les fioles sont placées sur un appareil d'agitation en étuve obscure à une température constante de 20° C.

Chaque expérience se compose d'un certain nombre de séries différentes, chaque série contenant 4 cultures identiques. La croissance est mesurée par la détermination du poids de substance sèche produite pendant un certain temps de culture. Pour cela le mycélium est recueilli sur papier filtre et lavé avec de l'eau distillée. Puis le filtre avec le mycélium est placé dans une boîte à tare (préalablement séchée et pesée avec le papier filtre) et desséchée jusqu'à poids constant. La différence entre les deux pesées donne le poids de substance sèche récoltée. Les valeurs données dans les tableaux suivants sont les moyennes des quatre valeurs obtenues pour chaque série expérimentale ; ces dernières ne diffèrent presque jamais de la moyenne de plus de 20 %.

Les tableaux montreront que la durée de la culture n'est pas la même pour chaque souche dans toutes les expériences. Cela dépend tout simplement du fait que le nombre de fragments mycéliens ensemencés dans chaque fiole, peut être grand dans une expérience, mais petit dans une autre. Pour la même raison, une haute valeur de poids sec mycélien obtenue dans une expérience, ne signifie pas nécessairement que la souche en question pousse particulièrement vite, comparée aux autres.

RÉSULTATS

En premier lieu nous avons examiné les besoins en facteurs de croissance vitaminiques des diverses souches de *Ramularia* isolées en culture axénique. Toutes ces expériences sont faites avec le milieu nutritif synthétique. Elles se composent de trois séries, différentes entre elles en ce qui concerne les vitamines ajoutées : (1) sans vitamines (= témoin); (2) avec thiamine ; (3) avec un mélange de vitamines.

TABLEAU 2. Action de la thiamine et d'un mélange de six vitamines sur la croissance de cinq espèces de *Ramularia*.

La composition du mélange vitaminique est la suivante : thiamine, 100 μg ; pyridoxine, 100 μg ; riboflavine, 100 μg ; biotine 25 μg ; acide nicotinique, 100 μg ; acide para-aminobenzoïque; 100 μg ; pantothénate de calcium, 100 μg , et myo-inositol, 10 mg, par litre du milieu de culture. Les chiffres dans le tableau indiquent le poids de mycelium sec en mg par fiole (moyenne de 4 cultures).

Espèces	Addition			Nombre de jours de culture
	Aucune (= témoin)	Thiamine (1 μg /fiole)	Mélange vitaminique	
<i>R. agrestis</i>	152	163	169	21
<i>R. armoraciae</i>	8.9	178	189	21
<i>R. episphaeria</i>	220	206	190	22
<i>R. glechomae</i> I	201	198	176	11
<i>R. glechomae</i> II	153	132	161	28
<i>R. glechomae</i> III	43	42	31	16
<i>R. glechomae</i> IV	87	110	80	16
<i>R. lactea</i> I	0.2	139	144	22
<i>R. lactea</i> II	65	57	90	16
<i>R. moehringiae</i>	85	143	108	16
<i>R. picridis</i>	0.7	162	183	22

Les résultats de ces expériences sont résumés dans le tableau 2. Nous constatons que certaines espèces peuvent se développer sans aucune vitamine dans le milieu nutritif : *R. agrestis*, *R. episphaeria*, *R. glechomae* I-IV et *R. moehringiae*. Pour deux espèces, la thiamine est facteur essentiel : *R. armoraciae* et *R. picridis*. La présence d'autres vitamines n'ajoute rien à l'activité de la thiamine.

Quant à *R. lactea* les deux souches diffèrent : N° I exige la thiamine, tandis que N° II croît bien sans cette vitamine. L'expérience a été répétée avec le même résultat.

Une expérience, effectuée avec les trois souches qui exigent la thiamine, démontre que la pyrimidine et le thiazol qui sont les deux constituants de

la molécule de thiamine, permettent aussi la croissance dans le milieu synthétique, s'ils sont additionnés ensemble. Le tableau 3 indique pourtant qu'au moins une des souches, *R. lactea* I, ne croît pas si bien avec les deux constituants, présents en concentrations équimolaires, qu'avec la molécule entière de thiamine.

TABLEAU 3. Action de deux moitiés de la thiamine sur la croissance des trois espèces de *Ramularia* qui exigent la thiamine.

La pyrimidine (2-méthyl-4-amino-5-aminométhyl-pyrimidine . 2 HCl) et le thiazol (4-méthyl-5- β -oxyéthyl-thiazol . HBr) sont ajoutés en quantités équimolaires. Ils sont stérilisés en autoclave avec le milieu nutritif. La thiamine est stérilisée par filtration.

Espèces	Addition					Nombre de jours de culture
	Aucune (= témoin)	Pyrimidine (06 μ g/ fiole)	Thiazol (0.6 μ g/ fiole)	Pyrimidine + thiazol	Thiamine (1 μ g/ fiole)	
<i>R. armoraciae</i>	0	139	0	112	138	13
<i>R. lactea</i> I	0	117	0	103	189	21
<i>R. picridis</i>	2.8	204	1.1	175	223	27

Si les deux constituants de la thiamine sont essayés séparément, on peut constater que le thiazol est absolument inactif, alors que la pyrimidine seule permet une croissance équivalente à celle produite par la thiamine, ou presque équivalente dans le cas de *R. lactea* I. Par conséquent, on peut conclure que *R. armoraciae*, *R. lactea* I et *R. picridis*, ont perdu leur capacité de synthétiser la pyrimidine, mais qu'ils gardent encore la capacité de synthétiser le thiazol et, en liant ce composé à la pyrimidine ajoutée, de former la molécule entière de thiamine.

Il nous a paru intéressant d'examiner la faculté des sept espèces de *Ramularia* à utiliser différentes sources azotées; il est en effet bien connu que différentes espèces de champignons se distinguent souvent entre elles à cet égard. Les sources d'azote examinées sont le nitrate, l'ammonium en liaison organique et inorganique, l'asparagine et l'urée. Le tableau 4 démontre clairement que toutes les espèces étudiées peuvent utiliser l'asparagine et le tartrate d'ammonium. Dans les cas de *R. armoraciae*, *R. episphaeria* et

R. lactea I, l'action de l'asparagine paraît inférieure à celle du tartrate d'ammonium. Pour les autres espèces ces deux sources azotées sont à peu près équivalentes. L'ion ammonium peut sans doute toujours être utilisé, mais s'il est présenté sous forme de sulfate, des complications résultant de l'acidité du milieu apparaissent. En suivant les changements de pH pendant la durée de cette expérience, nous avons pu constater que dans la série avec sulfate d'ammonium, le pH tombe de 5,4 à 2,8. Vraisemblablement un pH d'environ 3 est trop bas pour permettre au champignon de continuer sa croissance. Une autre expérience, non rapportée ici, a démontrée que pH 3 est la plus basse et pH 7,5 la plus haute limite pour le développement des espèces de *Ramularia* étudiées.

TABLEAU 4. Croissance de 11 souches de *Ramularia*
avec différentes sources d'azote.

Les composés azotés, dissous dans l'eau, sont stérilisés séparément dans l'autoclave ; seul l'urée a été stérilisée par filtration. En utilisant des pipettes, les solutions sont ensuite additionnées au reste du milieu nutritif contenu dans des fioles. Chaque apport à 25 mg d'azote par fiole (= 1 g/l). Un tiret (—) indique qu'aucun essai ne fut exécuté.

Espèces	Source d'azote					Nombre de jours de culture
	KNO	(NH ₄) ₂ SO ₄	Tartrate d'ammo- nium	Aspara- gine	Urée	
<i>R. agrestis</i>	0.3	26	187	223	203	21
<i>R. armoraciae</i>	75	25	203	113	48	22
<i>R. episphaeria</i>	64	19	129	69	107	22
<i>R. glechomae I</i>	82	85	143	176	135	35
<i>R. glechomae II</i>	69	81	183	58	109	28
<i>R. glechomae III</i>	2.9	—	43	—	—	16
<i>R. glechomae IV</i>	36	—	87	—	—	16
<i>R. lactea I</i>	124	42	160	61	183	21
<i>R. lactea II</i>	4.0	—	65	—	—	16
<i>R. moehringiae</i>	56	—	85	—	—	16
<i>R. picridis</i>	120	15	145	120	10	39

Toutes les souches peuvent utiliser l'urée, bien qu'avec une certaine difficulté dans les cas de *R. armoraciae* et *R. picridis*. D'autre part, pour trois souches, *R. agrestis*, *R. glechomae* et (peut-être) *R. lactea* II, le nitrate ne peut pas servir comme source d'azote.

Enfin nous avons fait quelques expériences sur l'utilisation de divers hexoses comme sources de carbone. Le glucose, le fructose, le galactose et le mannose, ont été essayés. Afin de mieux discerner les différences éventuelles, nous avons cherché à terminer les expériences avant que la production mycélienne ait atteint son maximum.

La faculté d'utiliser les hexoses est assez différente entre les 10 souches étudiées (Tableau 5). Le glucose, le fructose, le galactose et le mannose se valent approximativement comme sources carbonées pour *R. armoraciae*, *R. glechomae*, *R. lactea* I, *R. moehringiae* et *R. picridis*, bien que le galactose soit généralement un peu inférieur aux autres hexoses. La croissance de *R. agrestis* est faible avec le galactose, et celle de *R. lactea* II — chose curieuse ! — avec le glucose. *R. episphaeria* représente le seul cas d'une incapacité absolue, car cette souche n'a produit aucun mycélium avec le galactose comme source de carbone.

TABLEAU 5. Croissance de 10 souches de *Ramularia* avec divers glucides.

Les glucides sont dissous dans l'eau et les solutions sont stérilisées séparément dans l'autoclave. Ensuite les solutions ont ajoutées au reste du milieu nutritif stérile contenue dans des fioles. Chaque apport est de 250 mg d'hexose par fiole (= 10 g/l).

Espèces	Source carbonée				Nombre de jours de culture
	Glucose	Fructose	Galactose	Mannose	
<i>R. agrestis</i>	69	89	16	52	21
<i>R. armoraciae</i>	75	79	66	61	21
<i>R. episphaeria</i>	72	10	0.9	30	27
<i>R. glechomae</i> I	43	36	24	30	14
<i>R. glechomae</i> II	83	87	71	75	21
<i>R. glechomae</i> III	43	39	18	33	14
<i>R. lactea</i> I	43	50	42	44	14
<i>R. lactea</i> II	9.0	24	22	34	14
<i>R. moehringiae</i>	81	107	70	92	21
<i>R. picridis</i>	81	97	90	74	27

DISCUSSION

Nous pouvons confirmer les expériences de KILLIAN (1928) et de MANGENOT (1963), montrant que les *Ramularia* poussent très lentement sur un milieu nutritif gélosé. En général le mycélium n'atteint que 10 mm de diamètre en trois semaines. D'autre part, la déclaration de MANGENOT qu'ils « poussent très mal en milieu liquide, ce qui interdit les pesées et donc la mesure précise de leur croissance », nous paraît trop pessimiste. En fait, toutes les espèces étudiées sont capables de produire, en milieu liquide dans des fioles agitées, des poids de mycélium considérables pendant un temps de culture de 3 ou 4 semaines, mais certes, la croissance des *Ramularia* est sans doute plus lente que celle de la plupart des champignons les plus utilisés pour des recherches physiologiques.

Les diverses espèces de *Ramularia* en culture sur le milieu nutritif gélosé diffèrent, parfois très distinctement, les unes des autres par la couleur, la formation des conidies et par d'autres caractères morphologiques. Ces caractéristiques ne seront pas discutées dans le présent mémoire. Avant de commenter les expériences décrites plus haut, nous voulons attirer l'attention sur les recherches de quelques auteurs, qui ont indiqué que certains caractères physiologiques sont d'une plus grande valeur que d'autres. D'après SNYDER & HANSEN (1954), dans leurs études sur le genre *Fusarium*, on ne peut s'appuyer sur la pigmentation, sur la vitesse de croissance, sur la sexualité et la pathogénicité. Il est impossible, selon SKINNER & HUXLEY (1956), de discerner des espèces distinctes dans *Rhodotorula* en utilisant la pigmentation et la faculté de faire fermenter des glucides. D'autre part, GEORG a démontré dans plusieurs publications (GEORG 1952, 1956, SWARTZ & GEORG 1955, GEORG & CAMP 1957) que certaines espèces de Dermatophytes se distinguent effectivement selon leurs besoins nutritifs, notamment l'exigence en vitamines et en acides aminés. GRIFFITHS (1958) est arrivé à la même conclusion en examinant un grand nombre de souches de *Gloeotinia temulenta*, aussi bien que SUNDSTRÖM (1964) dans ses études sur plusieurs espèces d'*Exobasidium*.

De l'examen des résultats reproduits dans les tableaux ci-dessus, on peut conclure que des qualités physiologiques pourraient servir comme un moyen de caractérisation des espèces de *Ramularia*. C'est surtout le pouvoir de synthétiser la thiamine qui diffère le plus pour les espèces étudiées. La faculté d'utiliser le nitrate comme source d'azote est un autre moyen éventuel de caractérisation. Il est aussi possible qu'il y ait des différences intéressantes concernant le pouvoir d'utiliser différentes sources de carbone, bien que jusqu'ici, nous n'ayons testé seulement que quatre hexoses.

Il faut cependant considérer le fait que la plupart des espèces étudiées, ne sont représentées que par une souche. Nous avons isolé et examiné 4 souches dans le seul cas de *R. glechomae*; leur comportement est à peu près le même, avec la seule exception que la souche N° III ne paraît pas capable d'utiliser le nitrate comme source azotée. Cette souche, cependant, est un peu faible et croît en général plus lentement que les trois autres. Par ailleurs les quatre souches réagissent de la même façon à la thiamine et aux hexoses.

Les deux souches de *R. lactea* sont intéressantes à plusieurs points de vue. N° I, contrairement à N° II, exige la thiamine, mais aussi, contrairement à N° II, elle est capable d'utiliser le nitrate comme source azotée. D'autre part, en ce qui concerne la morphologie, les deux souches se ressemblent.

Tandis que les souches de *R. glechomae* ont été isolées du même hôte, *Glechoma hederacea*, les souches de *R. lactea* proviennent de deux espèces différentes de *Viola*: N° I de *Viola riviniana* et N° II de *V. hirta*. A ce sujet on peut se souvenir des recherches de SUNDSTRÖM (1964), qui a démontré que certaines espèces d'*Exobasidium* possèdent des races différentes (« host races »), qui se trouvent sur des hôtes différents et qui sont caractérisées par des qualités physiologiques distinctes. Ainsi, une recherche étendue à un plus grand nombre de souches de *R. lactea* isolées de différentes espèces de *Viola* nous paraît motivée.

TRAVAUX CITES

- FRIES N., 1949. — Effects of different purine compounds on the growth of guanine-deficient *Ophiostoma*. *Physiol. Plant.* 2, 78-102.
- GEORG L. K., 1952. — Cultural and nutritional studies of *Trichophyton gallinae* and *Trichophyton megninii*. *Mycologia* 44, 470-492.
- GEORG L. K. et CAMP L. B., 1957. — Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. *Journ. Bact.* 74, 113-121.
- GRIFFITHS E., 1958. — Sexual reproduction and variation in *Gloeotinia temulenta* (Prill et Delacr.) Wilson et Gray. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 41, 461-482.
- KILLIAN Ch., 1928. — Etudes comparatives des caractères culturels et biologiques chez les Deutéromycètes et les Ascomycètes parasites. *Ann. Sci. Nat., Bot. et Zool.*, 10^{me} Série, 10, 101-292.
- MANGENOT F., 1963. — Préparation d'autolysats de feuilles destinés à la culture de parasites maculicoles. *Bull. Ecole Nat. Sup. Agron. Nancy*, 5, 173-188.
- SKINNER C. E. et HUXLEY M. J., 1956. — *Rhodotorula glutinis*. *Mycologia* 48, 371-377.
- SNYDER W. C. et HANSEN H. N., 1954. — Variation and speciation in the genus *Fusarium*. *Ann. New York Acad. Sci.* 60, 16-23.
- SUNDSTRÖM K.-R., 1964. — Studies of the physiology, morphology, and serology of *Exobasidium*. *Symb. Bot. Upsal.* 18 : 3, 1-89.
- SWARTZ H. E. et GEORG L. K., 1955. — The nutrition of *Trichophyton tonsurans*. *Mycologia* 47, 475-493.

Institut de Botanique physiologique, et Institut de Botanique systématique,
Université d'Uppsala, S-75121 Uppsala, Suède.

SOCIETE LINNEENNE DE LYON
33, RUE BOSSUET — 69006 LYON

Commission paritaire n° 52 199
Le gérant : Marc Terreaux