

**Influence de divers effecteurs sur le développement de
Botrytis cinerea en milieu synthétique:
Définition d'un cycle conidien**

par

B. DONECHE et B. PUCHEU-PLANTE

**Influence of various parameters upon the growth of *Botrytis cinerea* on
synthetic medium:
Definition of a conidial cycle**

S u m m a r y : The growth of *Botrytis cinerea* from the germination of conidia to the emission of conidiophores appears as a conidial cycle. The length of this cycle is influenced by environmental factors as temperature and pH. Malic and tartaric acids are the most effective parameters, at concentrations of tartaric acid higher than 7 g/l the formation of conidiophores is not possible.

Key words : Botrytis, growth, temperature, acidity, malic acid, tartaric acid, glucose, fructose.

Introduction

Botrytis cinerea est un champignon parasite de très nombreux végétaux supérieurs (JARVIS 1977). Sur le raisin il peut être responsable d'une amélioration de qualité (pourriture noble) ou d'une importante dépréciation (pourriture grise). Lors de l'attaque de pourriture, les conidies de *B. cinerea* émettent un ou plusieurs tubes germinatifs qui pénètrent par les diverses microfissurations de la pellicule (BESSIS 1972). Le mycélium se développe ensuite dans l'épaisseur des parois des cellules épidermiques et sous-épidermiques (PUCHEU-PLANTE et MERCIER 1983). Au bout de 4—8 d, des hyphes émergent de la surface du fruit et se développent en conidiophores. De nombreux travaux ont montré l'importance de l'eau et de diverses substances nutritives sur la germination des conidies et le développement du tube germinatif (BLAKEMAN 1980). Le rôle prépondérant de la lumière dans le processus de formation des conidies a également été étudié (EPTON et RICHMOND 1980).

Mais il existe peu de connaissances sur la phase végétative de croissance précédant la conidiation, phase dont la durée est déterminante dans l'importance et la qualité des modifications de la constitution chimique du raisin par la pourriture. Cette remarque nous a incités à rechercher l'existence d'un cycle conidien chez *B. cinerea*. Ce travail se propose de déterminer la durée de ce cycle et l'influence de certains effecteurs susceptibles d'intervenir sur le raisin, par exemple les teneurs en acides tartrique et malique et en sucres simples (glucose et fructose). L'action du pH et de la température est également envisagée. Parallèlement, l'analyse des milieux de culture après développement de *B. cinerea* montre l'intensité de la dégradation des différents substrats carbonés.

Matériel et méthodes

Les expériences ont été réalisées avec la souche de *B. cinerea* C.77.4 isolée du vignoble de Bordeaux (Collection de l'Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II).

Le champignon a été cultivé sur un milieu minéral contenant: KH_2PO_4 , 3 g/l; KCl, 0,5 g/l; MgSO_4 , 0,5 g/l; NaNO_3 , 5,0 g/l; FeSO_4 , 1 mg/l; ZnSO_4 , 1 mg/l; CuSO_4 , 1 mg/l. La source de carbone varie selon l'expérience.

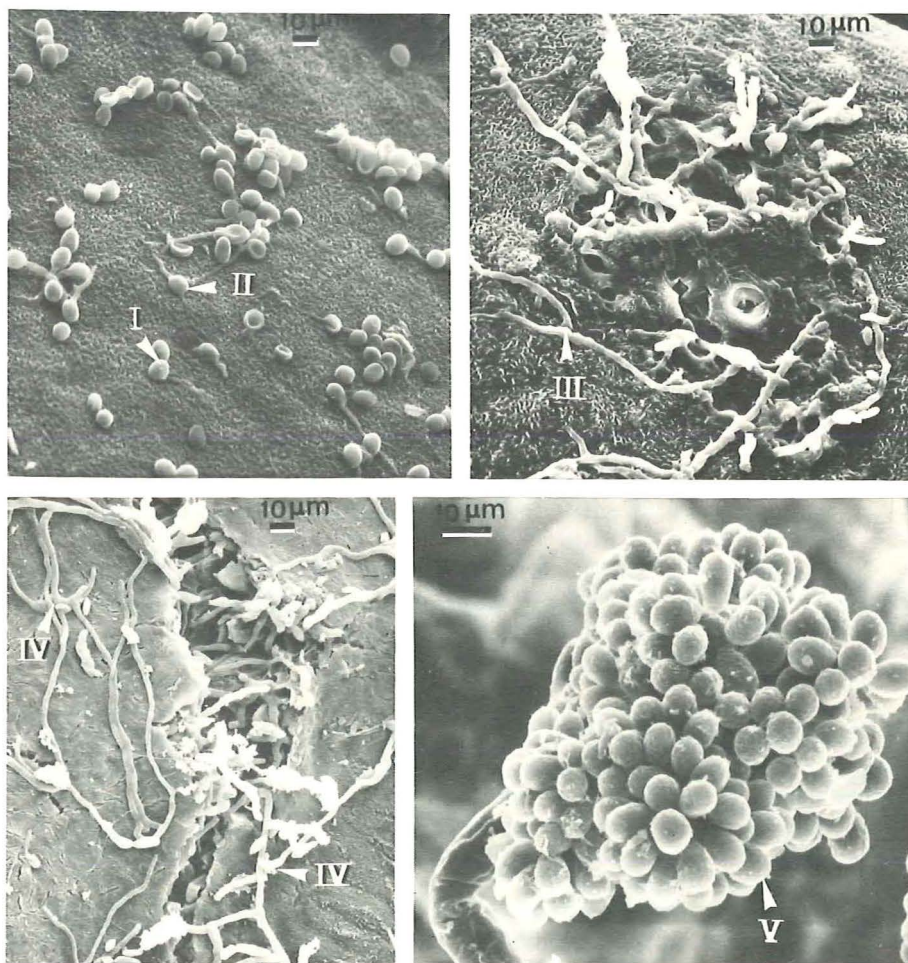


Fig. 1: Les différents stades du cycle conidien chez *Botrytis cinerea*. Conidies isolées (I), émission du tube germinatif (II), première dichotomie (III) et deuxième dichotomie (IV) du filament mycélien, développement des conidiophores (V). (Microphotographies: Département de Microscopie Electronique, Université de Bordeaux).

The different steps of the conidial cycle of *Botrytis cinerea*. Detached conidia (I), emission of germinative tube (II), first branching (III) and second branching (IV) of mycelium, growth of conidiophores (V).

Pour étudier l'effet de l'acide tartrique, le milieu minéral a été additionné de 1, 2, 5, 7 et 10 g/l d'acide L-tartrique, puis le milieu a été ajusté à pH 3,5 avec 1 M NaOH. Pour l'acide L-malique, les concentrations de 2, 5, 10, 15 et 20 g/l ont été testées.

L'influence des sucres simples a été étudiée sur le milieu minéral à pH 3,5 par addition d'un mélange 1 : 1 de glucose et de fructose. Les concentrations de ce mélange ont été de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 et 400 g/l.

Le milieu minéral contenant 200 g/l de sucres (glucose, 100 g/l; fructose, 100 g/l); acide tartrique, 5 g/l; acide malique, 10 g/l a été choisi pour observer les effets du pH et de la température.

Ces différents milieux sont répartis en boîtes de Pétri stériles, à raison de 10 ml/boîte. L'ensemencement est effectué sous atmosphère stérile en déposant des conidies à la surface du liquide par retournement d'une culture sporulée de *B. cinerea* sur Malt Extract Agar. Par cette technique, chaque boîte de Pétri reçoit de 250—300 conidies sans aucun fragment mycélien.

L'incubation est réalisée avec des phases alternées (12 h) de lumière et d'obscurité à la température de 20 °C, à l'exception de l'essai sur l'influence de la température. Le développement mycélien est suivi par observation microscopique (grossisse-

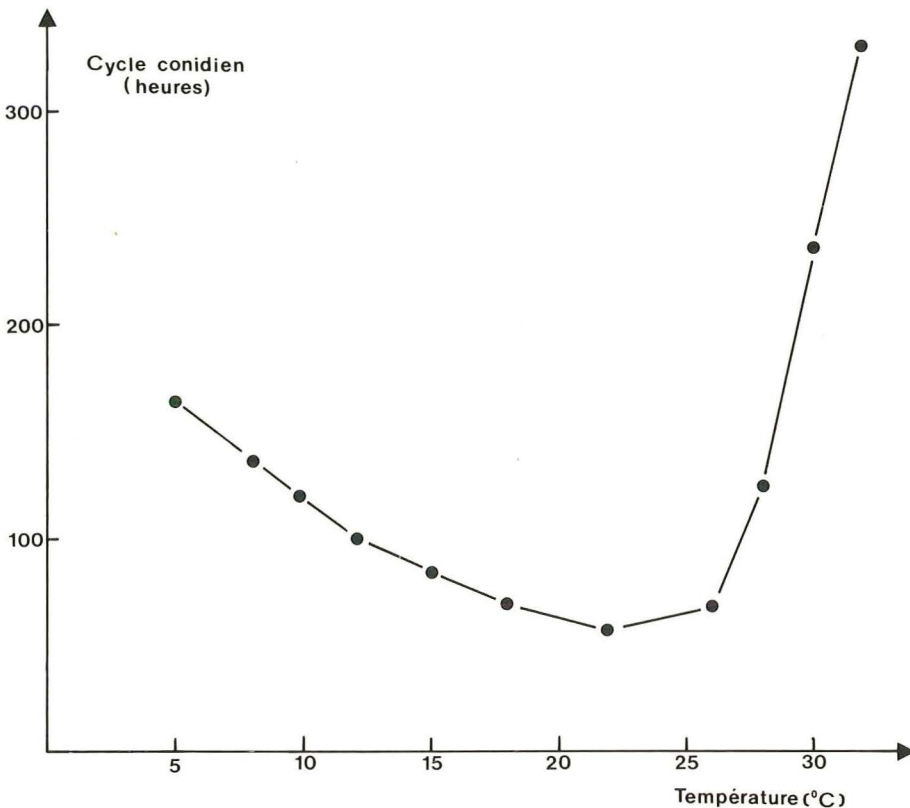


Fig 2: Influence de la température sur la durée du cycle conidien de *Botrytis cinerea*.

Effect of temperature on the length of the conidial cycle in *Botrytis cinerea*.

ment $\times 450$). La durée du cycle conidien est obtenue lorsque 50 % des spores initiales ont atteint le stade d'émission des conidiophores.

L'analyse de la constitution des milieux après développement de *B. cinerea* est faite par méthode enzymatique selon les techniques décrites par BERGMAYER (1974). L'acide tartrique est déterminé par mesure à 500 nm du complexe formé entre l'acide tartrique et l'acide vanadique en milieu tamponné à pH 3,7.

Ces essais ont été répétés trois fois, et chaque résultat présenté est la moyenne de ces trois répétitions.

Résultats

Le cycle conidien de *Botrytis cinerea*

Cinq stades sont proposés pour définir le cycle conidien (Fig. 1):

- I — conidies isolées
- II — émission du tube germinatif
- III — première dichotomie du filament mycélien
- IV — deuxième dichotomie du filament mycélien
- V — développement des conidiophores

La durée de ce cycle est très variable; elle passe de 70 h à plus de 800 h selon les conditions du milieu. Pour les plus longs cycles, et à l'exception d'un cas signalé (acide tartrique), aucune étape n'est particulièrement ralentie; dans tous les cas le temps de passage entre deux stades consécutifs est toujours environ 1,8 fois supérieur à la durée du stade précédent.

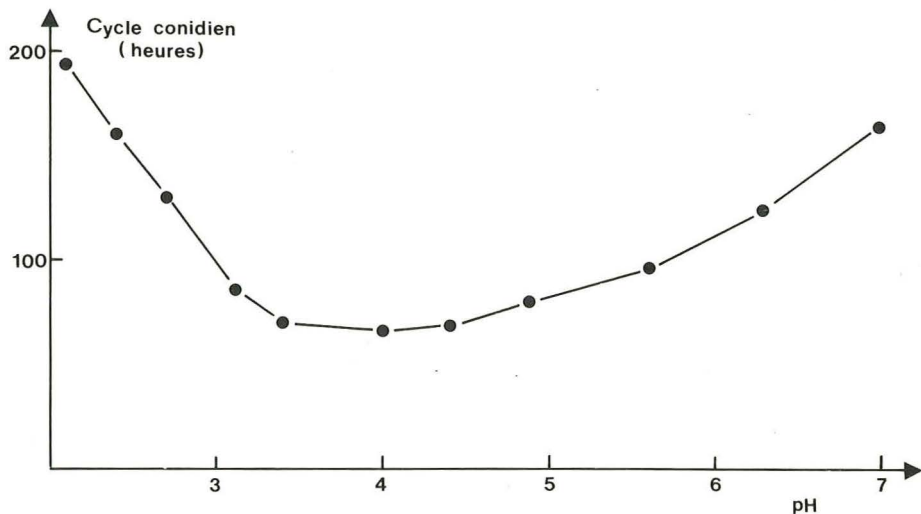


Fig. 3: Influence du pH sur la durée du cycle conidien de *Botrytis cinerea*.

Effect of pH on the length of the conidian cycle in *Botrytis cinerea*.

Influence de la température et du pH

L'effet de la température a été étudié sur un milieu de composition voisine de celle du moût de raisin, à pH 3,5. Entre 5 °C et 22 °C, la vitesse de croissance de *B. cinerea* augmente avec la température, entraînant une durée du cycle de plus en plus courte (Fig. 2). Au dessus de 25 °C, le développement du champignon est ralenti et il y a très rapidement inhibition totale. Il n'a pas été possible d'obtenir la germination des conidies pour des températures supérieures à 35 °C.

Comme de nombreux champignons inférieurs *B. cinerea* se développe plus rapidement dans un milieu légèrement acide. La vitesse de croissance est optimale pour des pH compris entre 3,0 et 5,0 (Fig. 3). Mais il supporte des pH plus bas de l'ordre de 2,0.

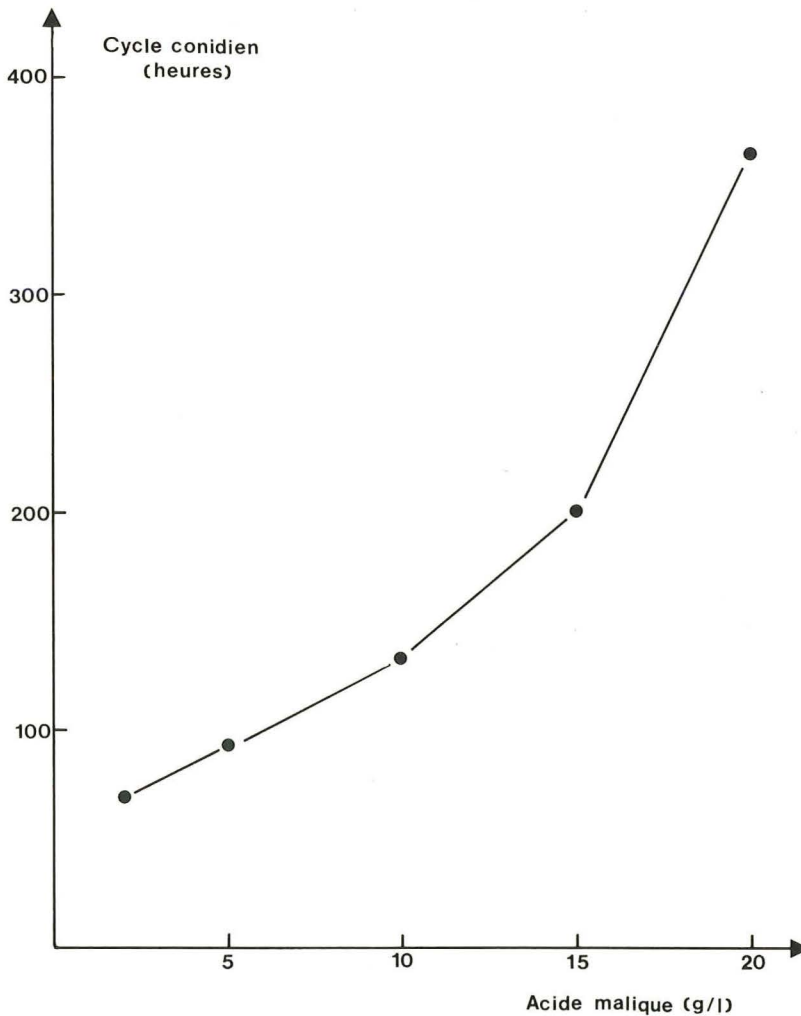


Fig. 4: Effet de la concentration en acide malique sur la durée du cycle conidien de *Botrytis cinerea*.

Effect of the concentration of malic acid on the length of the conidial cycle in *Botrytis cinerea*.

Influence des principaux constituants du raisin

Le développement de *B cinerea* est fortement ralenti par des concentrations croissantes en acide malique (Fig. 4). La durée du cycle conidien suit une relation du type $\log y = ax + b$. Pour 15 valeurs différentes, cette relation s'écrit:

$$\log y = 0,038x + 1,77$$

y = durée du cycle conidien en h

x = acide malique en g/l

Le coefficient de corrélation est égal à 0,995.

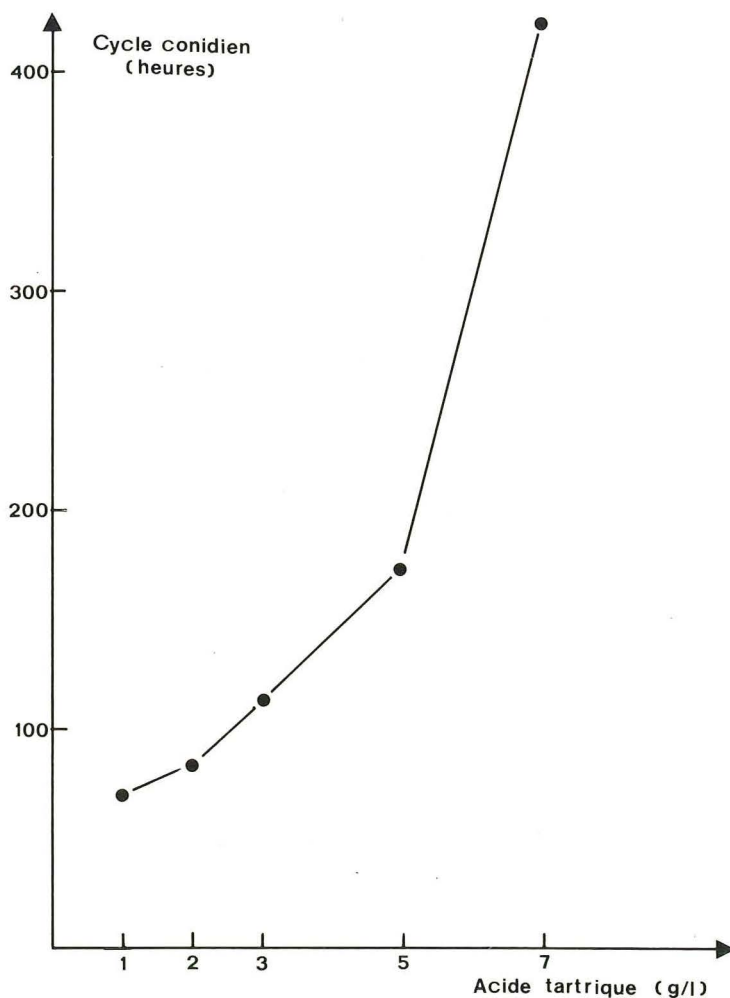


Fig. 5: Effet de la concentration en acide tartrique sur la durée du cycle conidien de *Botrytis cinerea*.

Effect of the concentration of tartaric acid on the length of the conidial cycle in *Botrytis cinerea*.

Ce phénomène est encore plus marqué pour l'acide tartrique (Fig. 5). Lorsque la concentration en acide tartrique augmente de 5 à 7 g/l, la durée du cycle conidien est plus que doublée. Mais il existe le même type de relation que pour l'acide malique:

$$\log y = 0,127x + 1,68$$

y = durée du cycle conidien en h

x = acide tartrique en g/l

Pour 12 valeurs différentes, le coefficient de corrélation est 0,986. En présence de 10 g/l d'acide tartrique, le développement de *B. cinerea* s'arrête au stade III et il n'est pas possible de déterminer la durée totale du cycle conidien. Les cultures présentent dans ce cas l'aspect d'un feutrage mycélien à filaments courts et denses.

L'effet de la concentration en sucres simples (glucose et fructose) est plus atténué (Fig. 6). La durée du cycle conidien augmente légèrement pour des concentrations croissantes en sucres de 50 à 200 g/l, puis se stabilise pour des concentrations supérieures. Mais le temps du cycle conidien n'est que doublé pour les concentrations extrêmes.

Dégradation des différents substrats carbonés

Le développement de *B. cinerea* sur milieu minéral additionné d'un seul substrat carboné s'accompagne nécessairement de l'assimilation de ce substrat. Mais l'augmentation de la durée du cycle conidien n'entraîne pas une utilisation proportionnellement plus importante du substrat de croissance (Fig. 7). A partir de concentrations initiales supérieures à 50 g/l le pourcentage de sucres dégradés représente moins de 50 % et diminue régulièrement au fur et à mesure que la concentration en sucres du milieu augmente, malgré l'augmentation apparente des quantités dégradées.

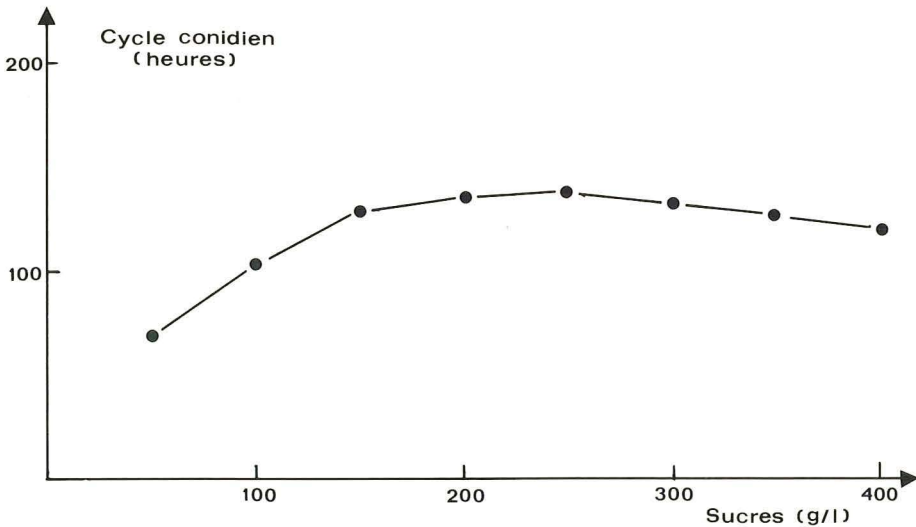


Fig. 6: Effet de la concentration en sucres simples (glucose et fructose) sur la durée du cycle conidien de *Botrytis cinerea*.

Effect of the concentration of reduced sugars (glucose and fructose) on the length of the conidial cycle in *Botrytis cinerea*.

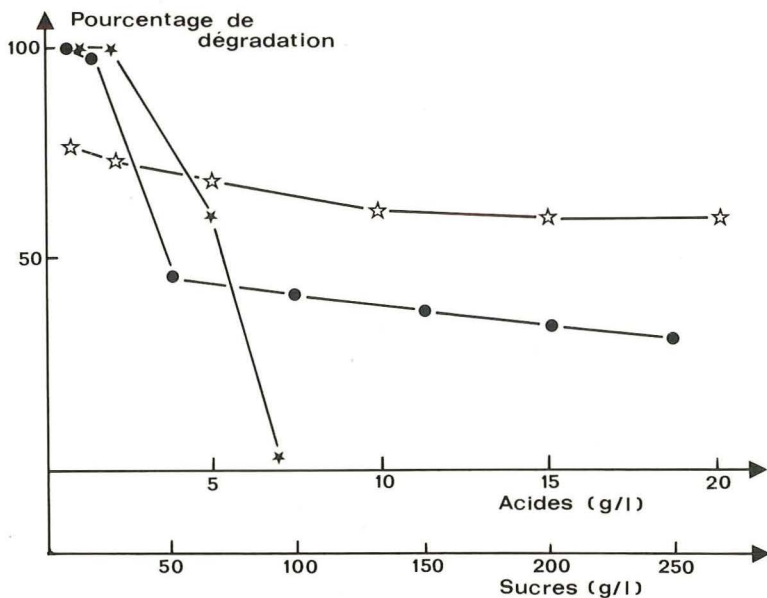


Fig. 7: Effet de la concentration initiale sur la dégradation du substrat de croissance. ☆—☆ = Acide malique; ★—★ = acide tartrique; ●—● = sucres simples (glucose et fructose).

Effect of the initial concentration on the degradation of the growth substrate. ☆—☆ = Malic acid; ★—★ = tartaric acid; ●—● = reduced sugars (glucose and fructose).

Ce phénomène est moins marqué en ce qui concerne l'acide malique. Lorsque la concentration en acide malique du milieu de culture augmente de 2 à 20 g/l, le pourcentage de dégradation diminue de 73 à 59 %. Par contre, la dégradation de l'acide tartrique diminue très fortement lorsque sa concentration initiale augmente. A partir de 5 g/l, l'assimilation devient rapidement négligeable. L'analyse périodique des milieux de culture montre que ces acides sont dégradés essentiellement au début du développement du champignon.

Discussion

La définition d'un cycle conidien, telle qu'elle est proposée dans ce travail, représente une méthode originale pour la mesure de la croissance du champignon. En effet il est classique de mesurer la croissance d'un champignon inférieur tel que *B. cinerea* par la détermination du poids sec de mycélium. Mais à partir d'un certain stade de développement, l'accroissement de la masse mycélienne peut simplement résulter de l'accumulation de diverses substances de réserve alors que l'activité métabolique du champignon n'augmente plus. Cette fin de la croissance est difficile à déterminer et les cultures au laboratoire sont souvent prolongées au delà de cette limite.

L'émission des conidiophores, qui constitue la fin du cycle conidien, intervient lorsque certaines conditions intramycéliennes sont réunies (HAWKER 1957). De telles conditions sont influencées par l'environnement. Cette étude montre que la durée du

cycle varie de 55 à 800 h selon les conditions du milieu; elle est voisine de la durée réelle du développement de *B. cinerea* sur le raisin (3—15 d).

Les résultats montrent que la température optimale de développement de *B. cinerea* correspond bien aux conditions climatiques du vignoble de Bordeaux en fin de maturation du raisin. L'inhibition rapide de la croissance qui se produit pour des températures relativement peu élevées est un phénomène connu chez les champignons (DEVERALL 1965).

Le pH optimum est proche du pH vacuolaire des cellules de la pulpe (pH = 3,5) et de la pellicule (pH = 4,3) du raisin mûr (RIBÉREAU-GAYON *et al.* 1975). On constate qu'une croissance du champignon est possible à pH bas, ce qui laisse penser que les parois mycéliennes sont peu perméables aux ions hydrogènes afin de maintenir la neutralité interne nécessaire au fonctionnement des enzymes intracellulaires. Il est vraisemblable que les anions organiques pénètrent également très lentement. HAMPEL (1970) a montré que *B. cinerea* n'assimile pas le tartrate disodique. A pH = 3,5 cette forme représente plus de 8 % de la concentration totale en acide tartrique. Au cours du développement du champignon, le pH du milieu de culture augmente, et à pH = 7,0 la totalité de l'acide tartrique est alors sous forme de tartrate disodique non assimilable, ce qui peut expliquer l'arrêt de la croissance mycélienne. Ce phénomène est moins marqué pour l'acide malique dont les fonctions acides ont des constantes de dissociation plus élevées.

L'acide tartrique, et dans une moindre mesure l'acide malique, apparaît comme l'effecteur le plus actif dans le développement de *B. cinerea*. La richesse en sucres simples pour des teneurs supérieures à 150 g/l n'influence que faiblement la durée du cycle conidien. Au cours de la maturation, la constitution chimique du raisin se rapproche des conditions optimales de développement du champignon par diminution de la concentration en acides. La maturité technologique du raisin semble correspondre au moment le plus favorable pour l'attaque de pourriture.

Résumé

Le développement de *Botrytis cinerea* de la germination des conidies à l'émission des conidiophores présente l'aspect d'un cycle conidien. La durée de ce cycle est sous l'influence des conditions du milieu (température, pH). Les acides tartrique et malique sont les effecteurs les plus actifs; il n'y a pas de formation de conidiophores pour des concentrations en acide tartrique supérieures à 7 g/l.

Références bibliographiques

- BERGMEYER, H.U.; 1974: Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim; Academic Press, New York.
- BESSIS, R.; 1972: Etude de l'évolution des stomates et des tissus péristomatiques du fruit de la vigne. C.R. Acad. Sci., Sér. D, **274**, 2158—2161.
- BLAKEMAN, J.P.; 1980: Behaviour of conidia on aerial plant surfaces. In: COLEY-SMITH, J.R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W.R. (Eds.): The Biology of *Botrytis*, 115—152. Academic Press, London.
- DEVERALL, B.J.; 1965: The physical environment for fungal growth. In: AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S. (Eds.): The Fungi, Vol. I. The Fungal Cell, 543—550. Academic Press, New York.
- EPTON, H.A.S.; RICHMOND, D.V.; 1980: Formation, structure and germination of conidia. In: COLEY-SMITH, J.R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W.R. (Eds.): The Biology of *Botrytis*, 41—84. Academic Press, London.

- HAMPEL, W.; 1970: Zum Stoffwechsel der Weinsäure in Pilzen. I. Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Mitt. Klosterneuburg **20**, 356—367.
- HAWKER, L.E.; 1957: The physiology of reproduction in fungi. In: SALT, G. (Ed.): Cambridge Monographs in Experimental Biology, No. 6, 2—24. University Press, Cambridge.
- JARVIS, W.R.; 1977: *Botryotinia* and *Botrytis* Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity. Monogr. 15, Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa.
- PUCHEU-PLANTE, B.; MERCIER, M.; 1983: Etude ultrastructurale de l'interrelation hôte-parasite entre le raisin et le champignon *Botrytis cinerea*: exemple de la pourriture noble en Sauternais. Canad. J. Bot., **61**, 1785—1797.
- RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; RIBÉREAU-GAYON, P.; SUDRAUD, P.; 1975: Sciences et Technique du Vin, Tome II: Maturation du Raisin, 93—175. Dunod ed., Paris.

Eingegangen am 15. 7. 1985

B. DONECHE
Institut d'Oenologie
Université de Bordeaux II
351, cours de la libération
33405 Talence
France