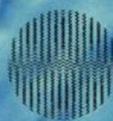
The background of the cover is a blue-tinted microscopic image showing the cellular structure of soil fungi, with numerous circular spores or hyphae visible.

détection et isolement des champignons du sol

P. Davet, F. Rouxel

TECHNIQUES ET PRATIQUES



INRA

EDITIONS

détection et isolement des champignons du sol

Pierre Davet, Francis Rouxel

TECHNIQUES ET PRATIQUES

Ouvrages parus dans la même collection :

Maladies de la tomate
Observer, identifier, lutter
D. BLANCARD
1988, 232 p.

Espèces exotiques utilisables pour la reconstitution du couvert végétal en région méditerranéenne
Bilan des arboretums forestiers d'élimination
P. ALLEMAND
1989, 150 p.

Le cerf et son élevage
Alimentation, techniques et pathologie
Co-édition INRA-Le Point Vétérinaire
A. BRELURUT, A. PINGUARD,
M. THERIEZ
1990, 144 p.

L'alimentation des chevaux
W. MARTIN-ROSSET
1990, 232 p.

Maladies des Cucurbitacées
Observer, identifier, lutter
D. BLANCARD, H. LECOQ, M. PITRAT
1991, 320 p.

Weeds of the Lesser Antilles
Mauvaises Herbes des Petites Antilles
J. FOURNET, J.L. HAMMERTON
1991, 214 p.

Maladies de conservation des fruits à pépins : pommes et poires
P. BONDOUX
Co-édition INRA-PHM Revue horticole
1992, 228 p.

Techniques de cytogénétique végétale
J. JAHIER
1992, 196 p.

Pratique des statistiques non paramétriques
P. SPRENT
Traduction française : J.P. LEY
1992, 302 p.

Immuno-analyses pour l'agriculture et l'alimentation
A. PARAF, G. PELTRE. Traduction française : E. RERAT et A. BOUROCHE
1992, 356 p.

Graines des feuillus forestiers
De la récolte au semis
B. SUSZKA, C. MULLER,
M. BONNET-MASIMBERT
1994, 318 p.

Guide pour la description des sols
D. BAIZE et B. JABIOL
1995, 388 p.

Flore des champs cultivés
P. JAUZEIN
1995, 898 p.

Référentiel Pédologique 1995
1995, 332 p.

Seeds of Forest Broadleaves from Harvest to Sowing
B. SUSZKA, C. MULLER
M. BONNET-MASIMBERT
1996, 342 p.

Catalogue des Aphididae du monde
Catalogue of the world's Aphididae (Homoptera aphidoidea)
G. REMAUDIÈRE et M. REMAUDIÈRE
1997, 478 p.

Identifier les champignons transmis par les semences
R. CHAMPION
1997, 399 p.

© INRA, Paris, 1997

ISBN : 2-7380-0731-7

ISSN : 1150-3912

Le code de la propriété intellectuelle du 1^{er} juillet 1992 interdit la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Le non respect de cette disposition met en danger l'édition, notamment scientifique. Toute reproduction, partielle ou totale, du présent ouvrage est interdite sans autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC), 3, rue Hautefeuille, Paris 6^e.

Avant-propos

Ce petit ouvrage s'adresse à tous ceux qui, pour des études théoriques ou des applications pratiques, sont appelés à manipuler des champignons du sol.

Autant la détection et l'identification des micromycètes ont fait, ces dernières années, des progrès remarquables, autant l'obtention en culture pure d'un champignon à partir d'un échantillon de terre ou d'une racine infectée fait encore largement appel à des méthodes empiriques. Certaines de ces méthodes ont été publiées en tant que telles dans diverses revues. La plupart ne représentent qu'un petit paragraphe de la rubrique « matériel et méthodes » d'un article scientifique, échappant ainsi à une recherche rapide. Elles ne semblent jamais encore avoir été réunies en un même volume. C'est cette lacune que nous nous sommes efforcés de combler.

Ce livre est donc avant tout un livre de recettes. Cependant, tout empiriques qu'elles soient, ces recettes s'appuient sur quelques données de base qui, rappelées dans une première partie, pourront faciliter la mise au point d'autres techniques ou la confection de nouveaux milieux sélectifs. Dans la deuxième partie sont réunis les techniques et les milieux d'isolement utilisables pour un champignon donné. Les espèces sont classées par ordre alphabétique et des index, à la fin du livre, permettent d'entrer dans l'ouvrage selon les noms des champignons et selon les désignations et les auteurs des milieux et des techniques. Un index des composés organiques permet, par ailleurs, de trouver rapidement des indications sur les adjuvants de toute nature utilisés, et sur les champignons qu'ils permettent d'isoler.

Nous sommes reconnaissants à Dominique Blancard et à Yves Tirilly d'avoir accepté la tâche ingrate de lire notre manuscrit de la première à la dernière ligne et de nous avoir fait part de leurs suggestions, et à Josiane Peyre d'avoir mis en forme les versions successives de l'ouvrage avec sa patience et sa compétence habituelles.

Table des matières

Introduction

Isoler des champignons du sol : pour quoi faire ?	7
Comment faire ?	8

PRINCIPES GÉNÉRAUX

Prélèvement et préparation des échantillons	13
A partir du sol	13
A partir des racines	14
Les techniques d'isolement	17
Isolement à partir du sol	17
Techniques d'isolement direct	17
<i>Les suspensions-dilutions</i> (dilution plates)	18
<i>L'incorporation directe du sol</i>	19
<i>Avantages et inconvénients</i>	19
Techniques de piégeage dites « des appâts »	21
<i>Les pièges inertes</i>	22
<i>Les plantes entières</i>	22
<i>Les fragments de plantes vivantes</i>	24
L'extraction directe	25
Isolement à partir des racines	26
Fragments de racines de petite taille	26
Broyage et suspension	27
Piégeage	27
Facteurs de sélectivité	27
Le traitement de l'échantillon de sol	28
La technique proprement dite	28
Les conditions d'incubation	29

Mise en culture	31
Préparation du milieu d'isolement	31
Éléments de base	32
<i>Source de carbone</i>	32
<i>Source d'azote</i>	32
<i>Rapport C/N</i>	33
<i>Éléments minéraux</i>	34
<i>Facteurs de croissance</i>	34
<i>Facteur de solidification du milieu</i>	34
Principaux facteurs de sélectivité	35
<i>Stimulateurs de la croissance</i>	35
<i>Inhibiteurs</i>	35
<i>pH</i>	35
<i>Métaux</i>	36
<i>Antibiotiques antibactériens</i>	36
<i>Antibiotiques antifongiques</i>	38
<i>Fongicides</i>	39
<i>Autres inhibiteurs</i>	40
<i>Autres additifs</i>	42
Stérilisation des milieux	43
Procédure générale	43
<i>Autoclavage</i>	43
<i>Filtration</i>	44
Conservation	44
Incubation des boîtes de Petri	45
Purification des isollements	46

APPLICATIONS PRATIQUES

Milieux de base	53
Techniques et milieux sélectifs	57
Références bibliographiques	179
Index des composés organiques cités	195
Index des champignons cités	197
Index des techniques et des milieux	201

Introduction

Isoler des champignons du sol : pour quoi faire ?

Lorsque les racines d'une plante sont victimes d'une agression microbienne, il est souvent difficile de réunir assez d'indices pour démasquer directement et sans ambiguïté l'agresseur. On tente alors, chaque fois que cela est possible, de l'amener à révéler sa présence en lui proposant un substrat, naturel ou artificiel, qui lui convienne suffisamment pour qu'il s'y développe malgré la concurrence des autres micro-organismes du sol. Il est ensuite facile, par repiquage, d'obtenir une culture pure que l'on peut maintenir en collection pour une mise en examen ultérieure. Il est vrai qu'il existe aussi depuis quelques années des techniques rapides et efficaces pour identifier l'agent pathogène sur les lieux de l'attaque. On peut ainsi détecter la présence de certains champignons à l'aide de sérums spécifiques qui, associés à un révélateur, permettent d'obtenir une réponse en quelques heures sur des plaques de microtitration (techniques DAS-ELISA ou, plus commodément, ELISA indirecte). La biologie moléculaire peut aussi apporter une aide considérable au diagnostic. Quelques fragments de mycélium suffisent pour que, après extraction des acides nucléiques et amplification enzymatique dirigée (PCR), on mette en évidence le champignon recherché. Néanmoins ces techniques, si prometteuses qu'elles soient, ne sont pas toujours satisfaisantes. Ainsi, les sérums ne font pas de différence entre le mycélium mort et le mycélium vivant, et les risques de réaction croisée ne sont pas négligeables. La biologie moléculaire nécessite un équipement encore très onéreux et des installations adaptées à la manipulation des isotopes radioactifs. Elle fournit encore rarement des résultats quantitatifs. En outre, les sondes dont on dispose actuellement ne permettent pas de distinguer les variétés ou les formes spéciales à l'intérieur d'une espèce, précision pourtant indispensable pour le diagnostic de certaines maladies comme, par exemple, les fusarioses. Seule l'obtention d'une culture pure du micro-organisme présumé pathogène permet de satisfaire aux postulats de Koch et de lever toute ambiguïté.

Le matériel vivant est, par ailleurs, nécessaire à l'élaboration des techniques les plus sophistiquées. Pour préparer les sérums utilisés dans les tests ELISA et les sondes destinées à la biologie moléculaire, il est nécessaire de posséder d'abord une culture pure du champignon étudié. Pour pouvoir apprécier la fiabilité de l'outil de diagnostic mis au point, il est aussi indispensable de connaître l'étendue de la variabilité au sein de l'espèce et, pour cela, il faut disposer d'un grand nombre d'isolats de provenances différentes.

L'obtention de cultures de micro-organismes n'est pas nécessaire seulement pour comprendre l'étiologie des désordres racinaires. Le généticien qui sélectionne des plantes pour la résistance aux maladies a, lui aussi, besoin d'une collection de souches de champignons pathogènes. Le pathologiste qui tente de mettre au point des méthodes de lutte biologique doit disposer à la fois d'une grande diversité de micromycètes antagonistes et d'une large gamme d'isolats du champignon qu'il désire combattre.

Enfin, pour des études d'épidémiologie, pour des recherches sur l'écologie des champignons parasites (et aussi de leurs antagonistes), pour évaluer l'effet de traitements fongicides ou de toute modification des caractéristiques de l'environnement, on doit pouvoir suivre qualitativement et quantitativement l'évolution des populations. Mais le sol est un milieu où les observations directes sont particulièrement malaisées. L'identification et le dénombrement des espèces *in situ* sont très rarement possibles. Les techniques d'immunofluorescence pourraient apporter une solution à ce problème. Mais elles ne sont pas d'un emploi très commode et les risques d'obtenir de fausses réponses sont assez élevés. Il faut donc, là encore, avoir recours à des méthodes indirectes. La quasi totalité des études de dynamique des populations de champignons repose sur des dénombrements de colonies obtenues après avoir mis en contact un échantillon calibré de sol et un substrat approprié.

Il est donc important, aujourd'hui tout comme hier, de pouvoir disposer de techniques permettant d'obtenir rapidement et simplement des colonies aisément identifiables d'un champignon donné, autant que possible exemptes de contaminants de façon à pouvoir ensuite être repiquées et conservées en collection pour un usage ultérieur.

Comment faire ?

Un volume de sol, même faible, renferme des myriades d'espèces microbiennes différentes. Aussi est-il illusoire d'essayer de mettre en évidence sur des milieux de culture usuels, rapidement envahis, des champignons dont, souvent, l'activité saprophytique est réduite et la vitesse de croissance, peu élevée. Il faut donc trouver des substrats qui stimulent la croissance de l'organisme recherché tout en limitant ou en supprimant le développement de ses concurrents.

Eventuellement, avant même de commencer les opérations d'isolement, on pourra l'inciter à se multiplier dans son milieu d'origine. Dans ce cas, toutefois, une analyse quantitative ne sera plus possible.

La réussite d'un isolement dépend de l'efficacité de la méthode employée mais la représentativité des résultats est aussi étroitement liée à la qualité de l'échantillonnage et à la manière dont les échantillons ont été conservés et traités. C'est pourquoi, avant de présenter les principales techniques d'isolement et les opérations qui se succèdent jusqu'à l'obtention d'un isolat, nous commencerons par exposer les règles qu'il convient de respecter pour le prélèvement et le conditionnement des échantillons.

Les aspects statistiques et les méthodes d'interprétation des données quantitatives ne seront pas abordés dans cet ouvrage.

Principes généraux

Prélèvement et préparation des échantillons

L'échantillonnage est une phase essentielle puisque de sa bonne réalisation va dépendre la fiabilité des résultats, qu'il s'agisse d'isollements à partir du sol ou à partir d'un végétal.

A partir du sol

C'est avant tout la couche arable qui, du fait du travail du sol et de la fertilisation, est colonisée par le chevelu racinaire des plantes cultivées. C'est donc dans cet horizon de 30 à 40 cm d'épaisseur que l'on recherche généralement les champignons du sol. Les prélèvements sont pratiqués à la tarière, à la pelle-bêche ou à la spatule, en prenant les précautions d'usage de désinfection des outils (flamage à l'alcool éthylique à 90 %) pour éviter tout risque de contamination entre échantillons.

Les analyses microbiologiques à objectif écologique nécessitent des techniques d'échantillonnage sophistiquées, liées à la distribution des populations microbiennes étudiées ; elles peuvent conduire à prélever le sol à différentes profondeurs. On cherche avant tout à obtenir un échantillon final représentatif de la parcelle ou de la microparcelle. Compte tenu de l'hétérogénéité habituelle de cette répartition, différents dispositifs de prélèvement ont été proposés, selon que l'on est en présence d'une distribution au hasard ou en agrégats (Bouhot, 1973 ; Mihail et Alcorn, 1987).

Une méthode souvent utilisée consiste à regrouper une vingtaine de prélèvements de 500 ml par hectare, réalisés selon les deux diagonales de la parcelle ou du foyer d'infection. Après élimination des cailloux et débris racinaires puis brassage, cet échantillon global peut être subdivisé en plusieurs sous-échantillons constituant autant de répétitions pour l'analyse. On aura ainsi une idée

de l'infestation moyenne du champ. Cependant, si c'est la répartition de l'inoculum que l'on souhaite connaître, un plus grand nombre de prélèvements sera nécessaire et il faudra les analyser individuellement, ou faire des regroupements partiels selon des règles précises.

Les champignons du sol ont la faculté de se maintenir sous forme d'organes de conservation (sclérotés, oospores, chlamydospores, ...) ou de mycélium, actif ou non. Les prélèvements peuvent donc être réalisés aux différentes périodes de l'année. Il est malgré tout déconseillé de les effectuer juste en fin de culture (risque de surestimation) ou en fin de période très sèche (risque de sous-estimation) lorsqu'on vise la quantification de l'inoculum dans un sol.

Les échantillons, recueillis dans des sacs en plastique après séchage à une température modérée (20 - 25 °C), se conservent dans un endroit frais (4 - 6 °C). S'ils peuvent être ainsi maintenus plusieurs mois avant analyse, il est toutefois préférable de les traiter le plus rapidement possible. Avant l'analyse proprement dite, les échantillons peuvent être broyés et calibrés : on cherche ainsi à individualiser chaque propagule vivante. Les traitements mécaniques permettent parfois d'opérer une première sélection du micro-organisme visé parmi la microflore présente. Ainsi, puisque *Rhizoctonia solani* se conserve principalement dans les fragments organiques du sol, l'analyse de cette fraction séparée du reste du sol par tamisage humide sur tamis à mailles de 74 µm permet un isolement plus aisé de ce champignon (Trujillo *et al.*, 1987). De même, pour l'isolement des *Fusarium*, il a été montré qu'un broyage suivi d'un tamisage à sec du sol à 100 µm permet de dénombrer le maximum de propagules présentes dans l'échantillon (Rouxel et Bouhot, 1971).

Nous verrons plus loin qu'il est aussi largement fait appel à ces facteurs de sélectivité au cours de l'analyse proprement dite.

A partir des racines

C'est souvent à partir de plantes malades que l'on est amené à isoler les champignons du sol. La première précaution à prendre est alors de disposer d'un échantillon représentatif de la maladie, présentant des symptômes typiques, mais dans leur phase la moins évoluée. Les symptômes terminaux correspondent en effet généralement à des tissus fortement dégradés envahis par une microflore saprophytique, masquant ou ayant relayé les agents responsables de la maladie.

Il convient ensuite d'éliminer les éléments extérieurs à la racine, en particulier les particules de matière organique riches en micro-organismes susceptibles de fausser les résultats de l'analyse : un rinçage vigoureux sous l'eau du robinet, suivi d'un séchage à l'air ambiant entre deux feuilles de papier-filtre, est vivement recommandé.

Avant l'analyse proprement dite, il est important de désinfecter la racine, de manière à éliminer les saprophytes présents dans les assises corticales externes et les envahisseurs secondaires des lésions. Le mode de désinfection, qui constitue le premier facteur de sélectivité, doit être adapté à la nature de l'échantillon (taille, consistance) et à l'agent pathogène pressenti (localisation en surface ou en profondeur, sous forme mycélienne ou sous forme de repos plus résistante à la désinfection) : une radicelle colonisée par *Rhizoctonia solani* devra être traitée avec plus de ménagement qu'un tubercule de pomme de terre atteint de fusariose, par exemple.

Plusieurs désinfectants plus ou moins efficaces sont disponibles : une technique courante consiste à appliquer un tampon de coton imbibé d'alcool éthylique à 90 % sur la surface de la racine, puis à passer rapidement cette dernière à la flamme. On élimine en principe de cette façon toute la microflore externe, en particulier les espèces saprophytes très envahissantes sur les milieux d'isolement, telles que les Mucorales, mais aussi les agents pathogènes superficiels tels que *Rhizoctonia* ou *Pythium*. Cette technique est donc particulièrement adaptée à la désinfection de tissus colonisés en profondeur (par des *Fusarium* par exemple). La désinfection à l'hypochlorite de sodium (Javel), en solution aqueuse ou en solution alcoolique à 1° chlorométrique, est également une pratique fréquente : le trempage pendant une à quelques minutes est bien adapté à l'isolement de champignons à microsclérotés relativement résistants tels que *Macrophomina phaseolina* ou *Pyrenochaeta lycopersici*. On sera beaucoup plus prudent en présence de Pythiacées, plus sensibles : Denman *et al.* (1993) isolent toujours significativement moins de colonies de *Pythium* après une désinfection à l'hypochlorite de sodium qu'après un simple lavage à l'eau, à partir de jeunes luzernes. On peut encore utiliser le trempage dans des bains de bichlorure de mercure à 1g/l, ou de nitrate d'argent à 1% (efficace contre les *Rhizopus*) pendant 30 s à 5 mn, en fonction de la consistance des tissus et du pathogène pressenti. La difficulté est que bien souvent, au moins dans le diagnostic de routine, on ne dispose que de peu d'éléments sur la nature du micro-organisme en cause : il est alors prudent d'appliquer deux modes de désinfection, plus ou moins puissants. Enfin, on n'oubliera pas de bien rincer l'échantillon, après désinfection, par passage dans 2 ou 3 bains d'eau stérile pour éliminer toute trace de désinfectant, et de terminer par un séchage sur papier-filtre pour éviter la prolifération des bactéries.

Reste alors le choix du site de prélèvement des fragments de tissus pour l'analyse : il se fera généralement en marge du symptôme, là où l'on a le plus de chances de sélectionner l'agent primaire de la maladie.

Les techniques d'isolement

Isolement à partir du sol

Il existe deux grands types de techniques permettant de détecter la présence des champignons du sol et de les isoler.

Avec les techniques directes, on obtient directement le développement de colonies sur un milieu nutritif plus ou moins sélectif, soit par incorporation du sol dans le milieu, soit, plus rarement, par immersion dans le sol du milieu fixé sur un support. Ces méthodes ne sont utilisables que pour des champignons capables d'un développement saprophytique.

Dans le deuxième cas la technique, indirecte, consiste à piéger le champignon dans le sol à l'aide de substrats vivants ou inertes, puis à l'isoler à partir de ces substrats lorsque sa biologie le permet.

On peut toutefois citer un troisième type de technique, réservé à certains parasites obligatoires et aux champignons possédant des formes de conservation assez facilement séparables des particules de sol : il s'agit de l'extraction directe, qui se fait donc sans milieu nutritif et sans piège.

Techniques d'isolement direct

Deux méthodes peuvent être utilisées pour incorporer l'échantillon de sol dans le milieu d'isolement. L'une et l'autre permettent d'isoler les principaux groupes de champignons, cette faculté étant surtout liée, comme nous le verrons plus loin, à la sélectivité du milieu et, dans une certaine mesure, au degré de fractionnement du sol et aux conditions d'incubation. Par contre, si l'on souhaite quantifier l'inoculum présent dans le sol, il sera nécessaire de choisir la méthode la mieux adaptée à la biologie du champignon recherché.

Les suspensions-dilutions (*dilution plates*)

Le principe consiste à mettre le sol en suspension dans de l'eau stérile, puis à incorporer les différentes dilutions de cette suspension dans le milieu d'isolement. Cette technique comprend plusieurs étapes, allant de la préparation des dilutions jusqu'à l'interprétation des résultats (Rapilly, 1968).

La préparation des dilutions consiste tout d'abord à ajouter une masse connue de terre (en général 10 g) à 90 ml d'eau stérile, puis à agiter pendant un temps donné (en général 30 mn), ce qui constitue la dilution 10^{-1} . Des prélèvements successifs de 10 ml dans cette suspension, puis dans les suivantes, ajoutés chaque fois à 90 ml d'eau stérile, vont constituer les dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , ... jusqu'à 10^{-6} en général. Rappelons que pour réaliser ces différents prélèvements, il est primordial d'utiliser des pipettes stériles qui sont changées à chaque dilution. Des agents dispersants sont parfois ajoutés pour améliorer la mise en suspension des particules. On utilise des détergents ou des produits plus complexes comme par exemple le Calgon, préparation commerciale destinée à « adoucir » l'eau et contenant de l'hexamétaphosphate, du citrate de sodium et des zéolites. Les tensioactifs, cependant, ralentissent la croissance mycélienne (voir p. 42).

Au moment de l'analyse, 10 ml de chaque dilution sont versés dans une fiole d'ermeneyer contenant 90 ml du milieu d'isolement adéquat, maintenu en surfusion au bain-marie entre 37 et 40 °C. Il est important de veiller à ce que la température ne soit pas trop élevée, ce qui aurait pour conséquence d'éliminer les champignons les plus thermosensibles. Après homogénéisation, les 100 ml sont répartis en 5 boîtes de Petri que l'on maintient dans les conditions (température, éclairage, durée d'incubation) les plus propices à l'isolement sélectif du champignon recherché. Certains auteurs préfèrent déposer un volume déterminé de la dilution finale dans chaque boîte de Petri (en général 1 ml) et verser par-dessus le milieu gélosé maintenu en surfusion. L'homogénéisation est réalisée en agitant manuellement les boîtes d'un mouvement circulaire dans le plan horizontal.

Après un laps de temps qui, selon l'espèce recherchée, peut varier de 2 à 20 jours, on observe les boîtes et l'on repère la dilution présentant un nombre de colonies suffisant, mais sans confluences entre elles ni avec des envahisseurs indésirables, ce qui compliquerait l'isolement. En effet, la sélectivité est rarement absolue et il faut donc être à même de parfaitement localiser et identifier le micro-organisme recherché sur le milieu d'isolement. La « dilution de travail » étant choisie, on peut procéder à l'examen, au dénombrement puis à l'isolement des colonies. Connaissant le nombre de colonies obtenues pour une dilution donnée, on en déduit ensuite la densité de population par gramme de sol.

Une variante proposée par Parkinson et Williams (1961) fait appel à des tamisages successifs du sol en phase humide permettant de séparer les particules et les propagules en fonction de leur taille. L'eau de drainage, qui peut être centrifugée pour améliorer la séparation, est ensuite incorporée au milieu d'isolement selon la méthode classique des suspensions-dilutions. Pour Parkinson et