

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ASTREDHOR : Association nationale de STuctures d'Expérimentation et de Démonstrations en HORTiculture

CEE : Communauté Economique Européenne

CMAparp : Corn Meal Agar Pimaricine, Ampicilline, Rifampicine, Pentachloronitrobenzène

DCPA : Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar

*F.o* : *Fusarium oxysporum*

FRET: Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

FORL : *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopercisi*

GIE FPSO : Groupement d'Intérêt Economique Fleurs et Plantes du Sud-Ouest

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

jpi : jours post inoculation

ITS : Internal Transcribed Spacer

K : Potassium

M1 à M11 : Modalités de 1 à 11

MA : Malt-Agar

MAC : Malt-Agar-Chloraphénicol

MS : Milieu synthétique

LDA33 : Laboratoire Départemental d'Analyse de la Gironde

N : Azote

OILB : Organisation Internationale de Lutte Biologique

P : Phosphore

PBI : Protection Biologique Intégrée

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCRq ou qPCR : Polymerase Chain Reaction quantitative

PDA: Potato Dextrose Agar

*P.o* : *Pythium oligandrum*

PVP 40 : Polyvinylpyrrolidone 40

SNA : Spezieller Nährstoffärmer Agar

TNH2 : Tryptamine

## Unité de mesures :

°C : degrés

fg : femtogrammes

mL : millilitres

nm : nanomètres

ng : nanogrammes

pg : picogrammes

µL : microlitres



# GLOSSAIRE

---

**Agressivité** : composante quantitative du pouvoir pathogène d'un micro-organisme.

**Anamorphe** : forme asexuée d'un champignon aboutissant le plus souvent à la formation de conidies.

**Anthéridie** : structure cryptogamique mâle assurant la formation la formation des gamètes.

**Appressorium** (pl. appressoria) : extrémité d'un hyphe ou d'un tube germinatif permettant la fixation d'un champignon sur son hôte et sa pénétration.

**Biotisation** : Inoculation d'un substrat par un micro-organisme exerçant un effet théoriquement bénéfique sur la vigueur et la protection des plantes.

**Chlamydospore** : spore issue de la multiplication asexuée, disposant d'une paroi épaisse assurant sa protection et sa conservation en conditions défavorables.

**Chlorose** : nom pour qualifié par exemple un organe végétal qui a pris une teinte anormalement jaune.

**Conidie** : spore issue de la multiplication asexuée et formée à l'extrémité d'un conidiophore

**Conidiophore** : hyphe spécialisé sur lequel se forment une à plusieurs conidies.

**Dissémination** : étape finale d'une maladie durant laquelle l'inoculum est libéré et disséminé.

**Eliciteur** : molécule produite par un agent phytopathogène ou un ravageur, qui induit chez une plante le mécanisme de défense.

**Enzyme** : substance protéique catalysant une réaction biochimique spécifique.

**Flagelle** : structure allongée et fine assurant la mobilité des zoospores des champignons.

**Gène** : unité héréditaire situé sur un chromosome, un plasmide ou un organite cytoplasmique codant pour une protéine.

**Haustorium** (pl. haustoria) : prolongement du mycélium à l'intérieur des cellules, ayant pour rôle de prélever les substances nutritives indispensables aux champignons, tout en préservant leur hôte.

**Hyphe** : filament isolé d'un mycélium de champignon.

**Inoculum** : parties, structures d'un micro-organisme susceptibles d'infecter une plante.

**Inoculum primaire** : inoculum à l'origine d'une épidémie.

**Inoculum secondaire** : inoculum assurant la progression de la maladie.

**Macroconidies** : conidies les plus grosses (souvent cloisonnées) s'il y a deux formes conidiennes chez un Deutéromycète. Il faut distinguer les macroconidies produites dans le mycélium aérien, de forme et de taille hétérogènes, des macroconidies produites en sporodochium, de taille et de formes hétérogènes.

**Microconidies** : conidies les plus petites s'il y a deux formes conidiennes chez un Deutéromycète.

**Mycélium** : filament ou amas de filaments constituant la structure de base des champignons.

**Oogone** : structure contenant un ou plusieurs gamètes femelles chez les Oomycètes.

**Oospore** : spore issue de la reproduction sexuée entre une anthéridie et une oogone chez les Oomycètes.

**Phialide** : cellule-mère produisant des conidies par bourgeonnement avec continuité entre la couche interne de la cellule-mère et la paroi conidienne sans allongement lors des conidiogénèses successives.

- **Monophialide** : phialide avec un unique pore par lequel est produite la ou les conidies



- **Polyphialide** : phialide avec plusieurs pores par lesquels sont produites la ou les conidies.

**Rhizosphère** : micro-environnement des racines du sol.

**Saprophyte** : vivant aux dépens de la matière organique plus ou moins décomposée.

**Souche** : culture pure d'un micro-organisme « sélectionnée » à partir d'un isolat, disposant parfois d'une ou plusieurs caractéristiques biologiques particulières.

**Spore** : unité de reproduction fongique constituée d'une ou plusieurs cellules.

**Téléomorphe** : forme sexuée d'un champignon aboutissant après fusion nucléaire à la formation d'ascospores, de basidiospores...

**Zoospore** : spore de champignon portant un à deux flagelles et capable de se déplacer dans l'eau.



# TABLE DES MATIERES

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Contexte et enjeux de l'étude .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Présentation de l'établissement .....	2
1.1.2. Situation économique .....	2
1.1.3. Problématique générale et objectifs du stage .....	2
<b>II. LE PATHOSYSTEME <i>DIPLADENIA-FUSARIUM OXYSPORUM</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. L'hôte : le <i>Dipladenia</i>.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Physiologie du <i>Dipladenia</i> .....	3
2.1.2. Culture.....	4
<b>2.2. Le pathogène : <i>Fusarium oxysporum</i>.....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Généralités .....	4
2.2.2. Taxonomie.....	4
2.2.3. Cycle de reproduction.....	5
2.2.4. Symptomatologie.....	6
<b>III. LES AGENTS/PRODUITS DE BIOCONTROLE .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Le biocontrôle.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2. L'agent de biocontrôle : <i>Pythium oligandrum</i>.....</b>	<b>6</b>
3.2.1. Taxonomie.....	6
3.2.2. Biologie / Cycle de reproduction .....	7
<b>3.3. L'agent de biocontrôle : <i>Trichoderma asperellum</i>.....</b>	<b>7</b>
3.3.1. Taxonomie.....	8
3.3.2. Biologie / Cycle de reproduction .....	8
<b>3.4. Actions des agents de biocontrôle .....</b>	<b>8</b>
<b>IV. LA DETECTION DES AGENTS DE BIOCONTROLE DANS LA RHIZOSPHERE .....</b>	<b>10</b>
<b>4.1. L'approche biologique .....</b>	<b>10</b>
<b>4.2. L'approche moléculaire .....</b>	<b>10</b>

## MATERIEL ET METHODES

<b>I. MATERIEL BIOLOGIQUE .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Matériel végétal.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Matériel fongique.....</b>	<b>12</b>
1.2.1. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	12
1.2.2. <i>Pythium oligandrum</i> .....	12
1.2.3. <i>Trichoderma asperellum</i> .....	12
<b>II. DISPOSITIF EXPERIMENTAL .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Mise en place de l'essai .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. « Biotisation » des plants avec les agents de biocontrôle.....</b>	<b>13</b>





<b>2.3. Identification de la souche <i>Fusarium oxysporum</i>.....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Postulat de Koch .....	13
2.3.2. Identification de l'agent pathogène .....	14
2.3.3. Inoculation de l'agent pathogène sur plants sains .....	14
<b>2.4. Suivi de la colonisation racinaire par les agents de biocontrôle testés.....</b>	<b>15</b>
2.4.1. Analyses microbiologiques .....	15
a) Prélèvements racinaires .....	15
b) Dépôt sur boîtes de Petri .....	15
c) Lecture et comptage.....	16
2.4.2. Analyses moléculaires .....	16
a) Extraction d'ADN .....	16
b) Amplification par Polymerase Chain Reaction .....	16
c) Quantification de la colonisation de <i>Pythium oligandrum</i> dans la rhizosphère des <i>Dipladenia</i> , par PCR quantitative.....	17
<b>2.5. Observations et mesures au cours de l'essai .....</b>	<b>17</b>
2.5.1. Observation de la croissance des plants de <i>Dipladenia</i> – Etude quantitative .....	17
2.5.2. Observation du développement racinaire des plants de <i>Dipladenia</i> – Etude qualitative .....	18
2.5.3. Observation des symptômes sur les plants de <i>Dipladenia</i> – Etude qualitative.....	18
2.5.4. Analyses statistiques .....	18
<b>RESULTATS.....</b>	<b>19</b>
<b>I. CARACTERISATION DE LA SOUCHE DE <i>FUSARIUM</i> UTILISEE.....</b>	<b>19</b>
1.1. Identification microbiologique de l'agent pathogène .....	19
1.2. Confirmation du Postulat de Koch.....	19
<b>II. DETECTION DES AGENTS DE BIOCONTROLE DANS LA RHIZOSPHERE DES <i>DIPLADENIA</i> .....</b>	<b>20</b>
2.1. Analyse microbiologique de la colonisation racinaire des plants de <i>Dipladenia</i> par <i>P. oligandrum</i> .....	20
2.2. Analyse microbiologique de la colonisation racinaire des plants de <i>Dipladenia</i> par <i>T. asperellum</i> .....	20
2.3. Analyses moléculaires de la colonisation racinaire des plants de <i>Dipladenia</i> par <i>P. oligandrum</i> .....	20
2.4. Résultats de l'effet des agents de biocontrôle sur le développement aérien et racinaire des plants de <i>Dipladenia</i> .....	21
2.4.1. Développement aérien.....	21
2.4.2. Développement racinaire.....	21
<b>III. ETAT SANITAIRE DES PLANTS DE L'ESSAI.....</b>	<b>22</b>
<b>IV. EFFETS DES MICROORGANISMES DANS LA LUTTE CONTRE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>23</b>
<b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>23</b>



## LISTE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1 : Répartition des 13 stations d'expérimentations de l'ASTREDHOR en métropole et représentation des 6 bassins de compétences

Figure 2 : Structure morphologique de *Mandevilla sanderi*.

Figure 3 : Plant de *Mandevilla (Dipladenia) hybrida* var. *diamantina*®, gamme 'Opale', couleur 'Grenat'

Figure 4 : Représentation des formes de dissémination de *F.oxysporum*.

Figure 5 : Cycle de vie de l'agent pathogène de *Fusarium oxysporum*

Figure 6 : Symptômes causés par *Fusarium oxysporum* sur l'appareil aérien du *Dipladenia*

Figure 7 : Symptômes causés par *Fusarium oxysporum* sur le système racinaire du *Dipladenia*

Figure 8 : Arbre phylogénétique des eucaryotes

Figure 9 : Cycle de vie de *Pythium*, champignon pathogène responsable de la pourriture racinaire.

Figure 10 : Voie de biosynthèse de l'auxine utilisant le précurseur de la tryptamine (flèche verte).

Figure 11 : Principe d'une PCR quantitative avec l'utilisation de la sonde Taqman®

Figure 12 : Segment d'ADNr de gène eucaryote constitué des sous-unités du ribosome avec une répétition en tandem

Figure 13 : Représentation schématique du plan d'essai.

Figure 14 : Biotisation de la rhizosphère des plants de *Dipladenia*

Figure 15 : Cellule de Malassez et son quadrillage permettant de compter les conidies

Figure 16 : Principe du Postulat de Koch (Adapté d'une fiche de laboratoire du LDA33)

Figure 17 : Inoculation des plants avec *F.oxysporum* en 3 étapes

Figure 18 : Racines prélevées dans une boîte de Petri. Prélèvement noté : M7.3.2

Figure 19 : Forme caractéristique de *Pythium oligandrum* observé au microscope (Gx100)

Figure 20 : Colonie de *Trichoderma asperellum* sur milieu gélosée PDA

Figure 21 : Observation de *Trichoderma asperellum* au microscope (Gx100) )

Figure 22 : Dépôt des fragments racinaires sur milieu gélosé CMAparp

Figure 23 : Culture de *Trichoderma asperellum* avec développement de champignons secondaires

Figure 24 : Représentation du programme PCR utilisé lors de cet essai

Figure 25 : Référentiel photographique pour la notation du développement racinaire établi en fonction du pourcentage de recouvrement racinaire de la périphérie des pots

Figure 26 : Observation microscopique d'organes fongiques permettant l'identification de *F.oxysporum*

Figure 27 : Cultures pures de *F. oxysporum* responsable du dépérissement des plants de *Dipladenia*.

Figure 28 : Culture pure sur milieu MAC de *F. oxysporum* après réisolement de l'agent causal lors du Postulat de Koch.

Figure 29 : Fréquence d'installation de *P. oligandrum* dans la rhizosphère des plants de *Dipladenia* au cours du temps selon différents traitements.

Figure 30 : Développement de diverses colonies dont *T. asperellum* sur milieu PDA

Figure 31 : Courbe standard utilisée pour la quantification de l'ADN cible de *P. oligandrum* utilisée en PCR quantitative

Figure 32 : Evaluation de la colonisation de *P. oligandrum* dans la rhizosphère des plants de *Dipladenia*, évaluée par PCR quantitative

Figure 33 : Evaluation de l'effet des micro-organismes sur le développement aérien des plants de *Dipladenia*

Figure 34 : Evaluation de l'effet des micro-organismes sur le développement du système racinaire des plants de *Dipladenia* en semaine 19



Figure 35 : Evaluation de l'effet des micro-organismes sur le développement du système racinaire des plants de *Dipladenia* en semaine 34

Figure 36 : Evolution des symptômes causés par la bactérie *Pseudomonas savastanoi*

Figure 37 : Evaluation de la contamination des plants de chaque modalité par la fusariose

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Composition des deux substrats utilisés pour l'essai

Tableau 2 : Modalités de l'essai

Tableau 3 : Amorces et sonde fluorescentes utilisées la PCR quantitative

## LISTE DES ANNEXES

---

Annexe I : Organigramme du GIE FPSO

Annexe II : Composition et protocole de préparation des milieux de culture

Annexe III : Clé d'identification du micro-organisme pathogène *F.oxysporum* utilisé par l'ANSES

Annexe IV : Protocole d'extraction ADN Kit INVITEK Invisorb® Spin Plant Mini Kit

Annexe V : Poster réalisé pour la journée portes ouvertes 2014



# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## I. Introduction

Les stratégies de protection des végétaux reposent essentiellement sur l'utilisation de molécules chimiques. Les traitements phytosanitaires restent le meilleur moyen d'obtenir une bonne qualité des végétaux ainsi que des rendements suffisants. Cependant, aujourd'hui l'impact de ces produits, qui, par définition, agissent sur les organismes vivants, sur la santé humaine (applicateurs et consommateurs) et sur l'environnement, apparaît au cœur des préoccupations sociétales.

Suite au Grenelle de l'environnement de 2008, un plan Ecophyto a été mis en place. Ce plan piloté par le Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt a pour objectif de réduire rapidement l'utilisation des produits phytosanitaires, et d'accélérer l'étude et la diffusion des méthodes alternatives.

Dans un contexte socio-économique en évolution vis-à-vis des produits phytosanitaires, la directive 91/414/CEE votée le 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, a été remplacée par le règlement 1107/2009/CEE. Ce règlement prévoit de garantir un niveau élevé de protection de la santé humaine, animale et de l'environnement en raffermissant l'évaluation des substances actives. Cette nouvelle réglementation met fin à l'âge d'or des produits phytopharmaceutiques en retirant du marché près de la moitié des substances actives. En effet, d'après le ministère de l'agriculture (2013), il y avait un millier de substances actives phytopharmaceutiques autorisées en 1993. Suite au nouveau règlement et donc à un programme de réexamen de toutes les substances, il y a aujourd'hui 423 substances autorisées au niveau européen. Seules les substances actives au niveau européen peuvent entrer dans la composition des produits mis sur le marché en France (agriculture.gouv, 2013).

Afin de pallier le manque de substances actives et de réduire les intrants phytosanitaires en continuant à protéger les végétaux, les itinéraires culturaux incluant la « protection biologique intégrée (PBI) » sont de plus en plus utilisés. La PBI est un système de lutte contre des organismes nuisibles qui utilise un ensemble de méthodes (prophylaxie, lutte biologique, lutte génétique associée ou non à la lutte chimique) satisfaisant à des exigences à la fois économiques, écologiques et toxicologiques. Cette lutte privilégie la mise en œuvre délibérée des éléments naturels de limitation (prédateurs naturels, parasitoïdes...), en respectant les seuils de tolérance (Corbaz, 1990). Dans une logique de protection de l'environnement, des opérateurs agricoles et du consommateur, l'utilisation de la lutte biologique semble être une des voies permettant de s'affranchir des molécules chimiques. La lutte biologique, selon l'Organisation Internationale de Lutte Biologique (OILB), est « l'utilisation d'organismes vivants ou de leur produit pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les ravageurs aux productions végétales » (Michelot, 2010). Les problèmes que pose la lutte chimique (apparition de résistances, impact sur l'environnement, la santé...) ont conduit à un regain d'intérêt pour cette méthode. Cela a permis d'accroître le nombre de recherches scientifiques et de définir des concepts, des outils, des méthodes, permettant de choisir l'auxiliaire et/ou l'antagoniste et d'optimiser son efficacité.

Dans cette étude, les organismes vivants utilisés pour la protection des végétaux sont des micro-organismes, c'est pourquoi cette lutte est qualifiée de lutte biologique par l'utilisation de micro-organismes ou d'« agents de biocontrôle ». Au sein du GIE FPSO, les micro-organismes sont étudiés depuis 2005 pour lutter contre les champignons pathogènes du sol, afin de trouver des solutions alternatives à proposer aux producteurs au vu des nouvelles réglementations. Ces micro-organismes jouent principalement un rôle dans le biocontrôle mais ils permettent aussi la stimulation de la croissance des plantes (un meilleur enracinement, un meilleur développement). Ces micro-organismes sont testés afin de déterminer s'ils ont un potentiel intéressant pour remplacer leurs homologues chimiques, aussi bien phytosanitaires qu'engrais.



Figure 1 : Répartition des 13 stations d'expérimentations de l'ASTREDHOR en métropole et représentation des 6 bassins de compétences (GIE FPSO, 2014)



## 1.1. Contexte et enjeux de l'étude

### 1.1.1. Présentation de l'établissement

La station expérimentale du Groupement d'Intérêt Economique des Fleurs et Plantes du Sud-Ouest (GIE FPSO) est située à Villenave-d'Ornon (33) sur le site de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) depuis 2006. Cette implantation a été choisie dans le but d'avoir accès à certains matériels, de partager des connaissances et d'optimiser les relations entre un organisme proche du terrain et les plateformes de recherches fondamentales. Le GIE FPSO fait partie de l'Association nationale de STRuctures d'Expérimentation et de Démonstration en HORTiculture, plus couramment nommé ASTREDHOR. Cet institut technique horticole est composé d'un réseau de 13 stations d'expérimentation, dont le GIE FPSO. Parmi ces 13 stations, 11 sont situées en métropoles et 2 sont basées en outre-mer (Ile de la Réunion et Nouvelle-Calédonie) (Figure 1). Les 11 stations de la métropole sont regroupées au sein de 6 bassins de compétences. Une cellule nationale basée à Paris coordonne les programmes d'expérimentation régionaux et détermine les programmes nationaux confiés ensuite aux stations. Chaque station définit et conduit au sein de son bassin les programmes d'expérimentations selon les problématiques rencontrées par ses adhérents (producteurs, fournisseurs, jardins et espaces verts...)

L'ensemble du GIE FPSO est dirigé par Madame Catherine SAPIN qui gère aussi la partie stratégie et financements, Jean-Marc DEOGRATIAS est le directeur technique et scientifique. La directrice supervise donc tout le personnel (Annexe 1) et délègue au directeur toute la partie expérimentale de la station.

Grâce aux outils modernes dont dispose la station, il est possible de mener des expérimentations dans tous les domaines concernés par la production horticole. La station s'est inscrite dans un compromis entre être un outil d'expérimentation et un outil technique de démonstration (Sapin, 2013). Les différentes problématiques sont classées par thèmes : élargissement de la gamme, techniques culturales, protection des plantes (GIE Fleurs & Plantes du Sud-Ouest).

### 1.1.2. Situation économique

La filière horticole représente une part importante du marché en France même si dans ce domaine la balance commerciale est en déficit chronique (Sapin, 2013). Malgré tout, la culture de *Dipladenia* (ou *Mandevilla*) est très en vogue actuellement (Thiery, 2012). En effet, cette plante fleurie plaît particulièrement grâce à une diversification variétale. Ainsi en 2012 il s'est vendu 1,2 millions de *Dipladenia* en pot ce qui représente environ 11,16 millions d'euros dépensés par les ménages français (FranceAgriMer, 2013). Ce genre végétal représente une part importante de l'économie en horticulture, c'est pourquoi il est judicieux de trouver dès à présent des solutions pour lutter contre les pathogènes de cette plante. Ces solutions doivent répondre aux soucis environnementaux et humains pour satisfaire les producteurs et ainsi offrir les meilleurs produits aux consommateurs.

### 1.1.3. Problématique générale et objectifs du stage

Dans le domaine de la protection des végétaux et plus précisément en horticulture, la station du GIE FPSO gère différents programmes d'expérimentations définis en fonctions des problèmes rencontrés par les entreprises horticoles. Parmi eux, celui du dépérissement du *Dipladenia* est de plus en plus préoccupant. L'agent pathogène responsable identifié par l'ANSES est un champignon tellurique, *Fusarium oxysporum*. Pour lutter contre ce dépérissement, le GIE FPSO a réalisé depuis 2011 des expérimentations mettant en jeux différents agents de biocontrôle. Parmi les différents agents de biocontrôle testés précédemment, un oomycète *Pythium oligandrum*, a donné les résultats les plus intéressants en termes de protection et développement racinaire. Cependant des différences importantes de niveau de colonisation ont été observées entre les deux années. Le facteur colonisation et installation dans la rhizosphère des plants étant important, il a été décidé de travailler cet aspect avec l'agent de biocontrôle *P. oligandrum*. Ce micro-organisme est donc principalement étudié au cours de ce stage.

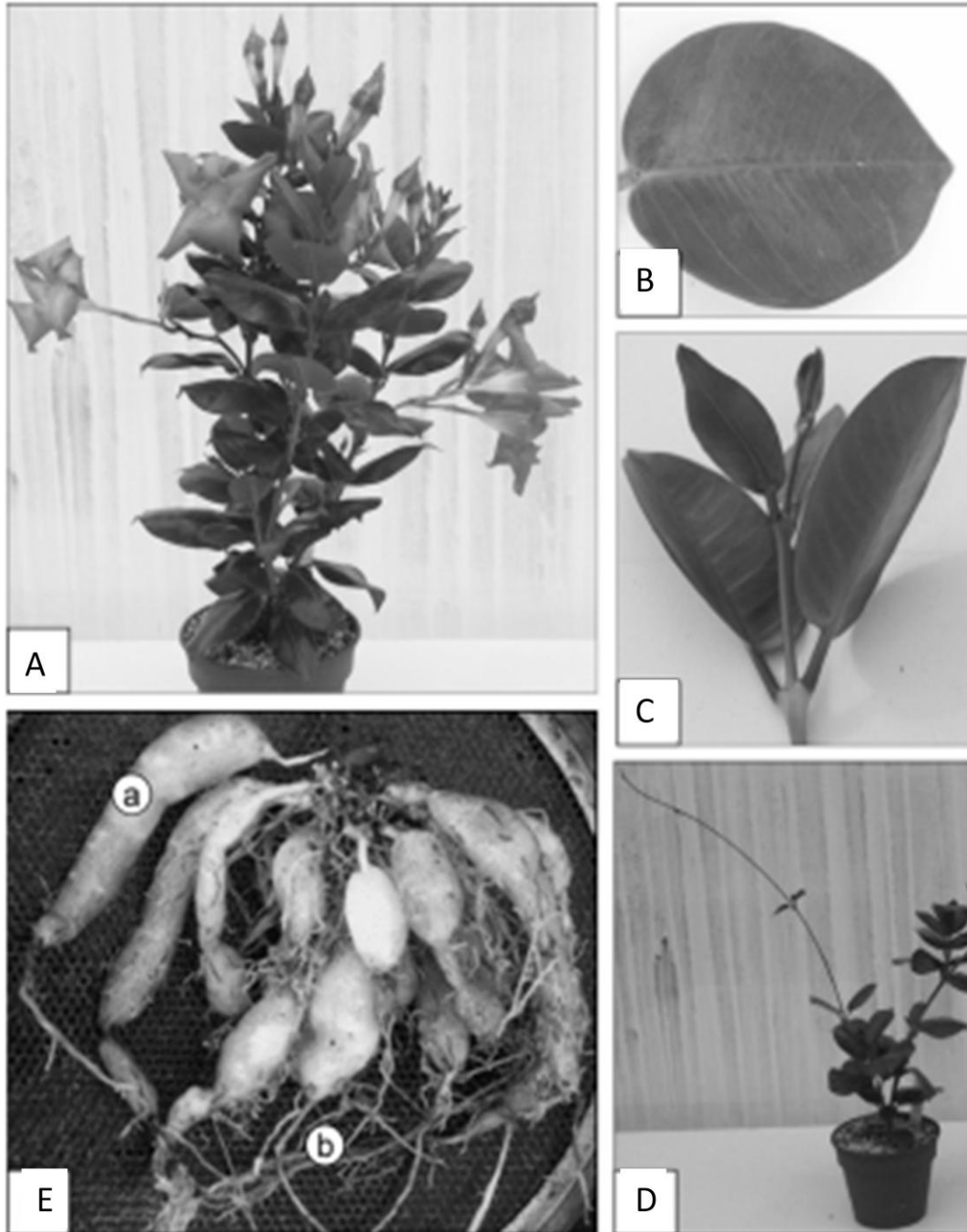


Figure 2 : Structure morphologique de *Mandevilla sanderi*. Fig.2A : Appareil aérien. Fig.2B : Feuille lancéolée. Fig.2C : Jeunes feuilles opposées. Fig.2D : Pousse volubile. Fig.2E : Système racinaire (a) Racines tubérisées, (b) Racines fines. (Boutebtoub *et al.*, 2009)

Par ailleurs, il a été décidé après un contact avec la société De Sangosse d'intégrer un produit contenant le champignon *Trichoderma asperellum* (XEDAVIR®), qui présente des potentialités intéressantes pour lutter contre la fusariose.

Le sujet de ce stage porte sur la lutte contre la fusariose du *Dipladenia* par utilisation des agents de biocontrôle, *P. oligandrum* et *T. asperellum*.

Les objectifs de ce stage sont de :

- (i) Identifier l'agent pathogène responsable du dépérissement de certains cultivars de *Dipladenia* par un postulat de Koch
- (ii) Vérifier l'installation des agents de biocontrôle dans deux substrats différents après inoculation puis au cours du temps, par des analyses microbiologiques et de biologie moléculaire. Les analyses microbiologiques sont utilisées dans un premier temps. Elles consistent à ensemercer des milieux de culture et à observer par la suite les caractères phénotypiques afin de reconnaître ou non l'agent de biocontrôle. Dans un deuxième temps, des analyses de biologie moléculaire, par PCR quantitative seront développées afin de déterminer plus finement la quantité présente de *P. oligandrum* dans la rhizosphère des plants. En outre, ces analyses permettront d'appuyer ou non les analyses de microbiologie.
- (iii) Étudier leurs effets sur les plants de *Dipladenia* et le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*, en termes de stimulation de la plante par des mesures phénotypiques de croissance et de développement racinaire.

La finalité des travaux de ce stage est de valider l'intérêt d'utiliser un agent de biocontrôle pour lutter contre la fusariose du *Dipladenia* et plus particulièrement d'envisager l'homologation de *P. oligandrum* en tant que produit phytosanitaire.

## II. Le pathosystème *Dipladenia-Fusarium oxysporum*

### 2.1. L'hôte : le *Dipladenia*

#### 2.1.1. Physiologie du *Dipladenia*

Le *Dipladenia*, aussi appelé *Mandevilla*, fait partie de l'ordre des Gentianales, appartient à la famille des Apocynaceae et à la sous-famille des Apocynoideae (Lannes, 2010). D'après plusieurs publications, les genres *Dipladenia* et *Mandevilla* sont synonymes, de ce fait il existe de nombreuses confusions botaniques et taxonomiques (Lannes, 2010). Pour différencier au mieux ces plantes, les horticulteurs ont donné aux plantes grimpantes, le nom de *Dipladenia* et aux plantes en touffes, le nom de *Mandevilla*.

Le *Dipladenia* (Figure 2A) est une plante vivace conduite en touffe suite aux pincements effectués (1 à 2 fois) lors de la culture. Cette plante tropicale est une liane à latex avec un feuillage persistant (Figure 2B, 2C et 2D). Le *Dipladenia* produit de nombreuses hampes florales qui prennent naissance à l'aisselle des feuilles (Lannes, 2010).

Les racines du *Dipladenia* sont hypertrophiées et partiellement tubérisées (Figure 2E) ce qui permet leurs transformations en organes de réserve. Ces organes de réserve renferment des éléments nutritifs (glucose, acides aminés, amidon ou inuline) accumulés en période de végétation et sont consommés suivant les besoins de la plante ou quand cette dernière est dans une situation de stress (manque d'eau, manque de nutriment...) (Lannes, 2014). Des analyses biochimiques ont montré que les racines tubérisées avaient un stockage élevé en amidon. Ces réserves confèrent souvent à la plante une grande capacité d'adaptation à des conditions difficiles (Boutebtoub *et al.*, 2009).

Du fait d'une grande diversité variétale, ce genre permet d'offrir aux consommateurs une large palette de coloris et de formes de fleur (Darles, 2013).



Figure 3 : Plant de *Mandevilla (Dipladenia) hybrida* var. *diamantina*®, gamme 'Opale', couleur 'Grenat' (GIE FPSO, 2014)

### 2.1.2. Culture

La culture de *Dipladenia* est très exigeante et deux facteurs importants de l'itinéraire cultural sont à surveiller : la température et la lumière. Les *Dipladenia* doivent être cultivés avec une température au dessus de 16°C (Fiche Ratho, 2006) et avec une forte luminosité. Un manque de lumière provoque un étiolement (apparition de longues pousses volubiles (Figure 2D) et des chloroses (Fiche Ratho, 2006).

Les producteurs de *Dipladenia* multiplient et cultivent des boutures provenant de pieds mères de *Dipladenia*. Ainsi, lors du bouturage et de la taille, les plants sont exposés à un risque de contamination par des agents pathogènes. Depuis 2006, il a été observé un dépérissement des plants de *Dipladenia* dans le Sud-Ouest de la France (Darles, 2013). En outre, une variété s'est avérée très touchée par *Fusarium oxysporum*, *Mandevilla* (*Dipladenia*) *hybrida* var. *diamantina*®, gamme 'Opale', couleur 'Grenat' (Figure 3), aussi cette variété a été choisie pour cette étude.

## 2.2. Le pathogène : *Fusarium oxysporum*

### 2.2.1. Généralités

En 1809, le genre *Fusarium* a été décrit pour la première fois par Link (Jeunot, 2005). Ce dernier se compose de plusieurs espèces phytopathogènes responsables de maladies appelées « fusariose » sur un grand nombre de plantes. L'origine du nom *Fusarium* provient du latin *Fusus*, car ses spores sont en formes de fuseau (Jeunot, 2005). Le genre *Fusarium* est caractérisé par de nombreuses espèces très variables au niveau morphologique. Chacune d'elle étant représentée dans la nature par une majorité de souches saprophytes ou parasites de faiblesse au sein desquelles peuvent se différencier des formes plus ou moins spécialisées douées d'une véritable pathogénicité (Fernon, 1970).

Parmi le genre *Fusarium*, *Fusarium oxysporum* est certainement l'espèce de champignon tellurique la plus répandue dans la nature et dans tous les types de sols (Champion, 1997, Fravel *et al.*, 2002). Différentes souches de ce pathogène existent, celles qui envahissent le système vasculaire par les racines profondes induisant une maladie de type systémique et celles qui peuvent pénétrer les racines sans envahir les vaisseaux et causer la maladie (Fravel *et al.*, 2002). En outre, il possède de nombreuses formes spécialisées ce qui lui permet de s'attaquer à une multitude de cultures, telles que les légumineuses (*F. oxysporum* f. sp. *pisi* sur pois) (Champion, 1997), les plantes maraîchères (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) (Messiaen *et al.*, 1991), le melon (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) (Oumouloud *et al.*, 2001), les plantes ornementales (*F. oxysporum* f. sp. *dianthi* sur œillets) (Ardila *et al.*, 2014) et tropicales (*F. oxysporum* f. sp. *cubenses* sur bananiers) (Nel *et al.*, 2006). D'après tous ces auteurs, l'impact économique est très important. En effet, sur œillets, la présence de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* a entraîné des pertes économiques et une diminution significative de la production (Ardila *et al.*, 2014).

### 2.2.2. Taxonomie

Le nom *Fusarium* est donné aux champignons dits « imparfaits » (Deutéromycètes). Dans le genre *Fusarium*, les formes asexuées (anamorphes) sont les plus connues. Cependant, il existe quelques souches de *Fusarium* qui possèdent une forme parfaite (téléomorphe). Ces formes appartiennent à la classe des Ascomycètes, à l'ordre des *Hypocreales*, à la famille des *Nectriaceae* et aux genres *Gibberella*, *Nectria* et *Plectosphaerella* (Rakotonirainy, 2014). En outre, il est important de savoir que pour beaucoup d'espèces de *Fusarium*, la forme sexuée reste encore inconnue.

La forme asexuée, *Fusarium oxysporum*, appartient aux Deutéromycètes, aux groupes des Hyphomycètes et des Hyphales (Blancard, 1998). Cependant, cette « classification » est plutôt un ensemble artificiel regroupant les formes asexuées des Eumycètes et il n'y a donc pas de lien phylogénétique. Afin d'être rigoureux, il serait judicieux d'associer une forme spécialisée au pathogène *Fusarium oxysporum* sur *Dipladenia*. En effet, seules les formes spécialisées de *Fusarium oxysporum* sont pathogènes (Blancard,



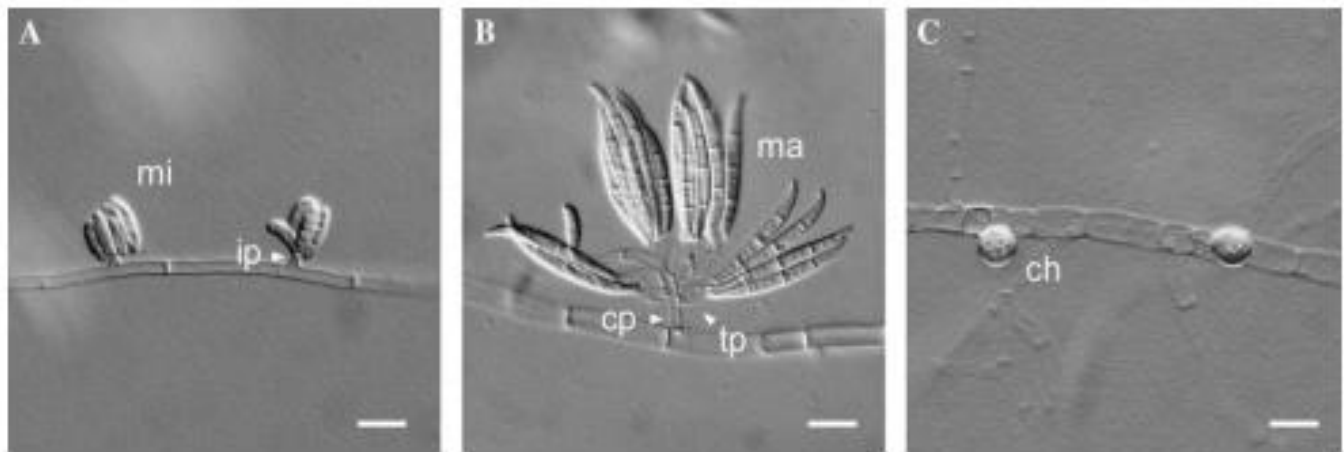


Figure 4 : Représentation des formes de dissémination de *F.oxysporum*. Culture sur milieu SNA à 25°C pendant 5 jours. (A) Microconidies (mi) produites sur des monophialides très courts et en fausse tête. (B) Macroconidies (ma) produites sur un conidiophore (cp) polyphialide (tp). (C) Chlamydospores formées sur des hyphes. L'échelle est de 10 µm. (Iida, 2006)

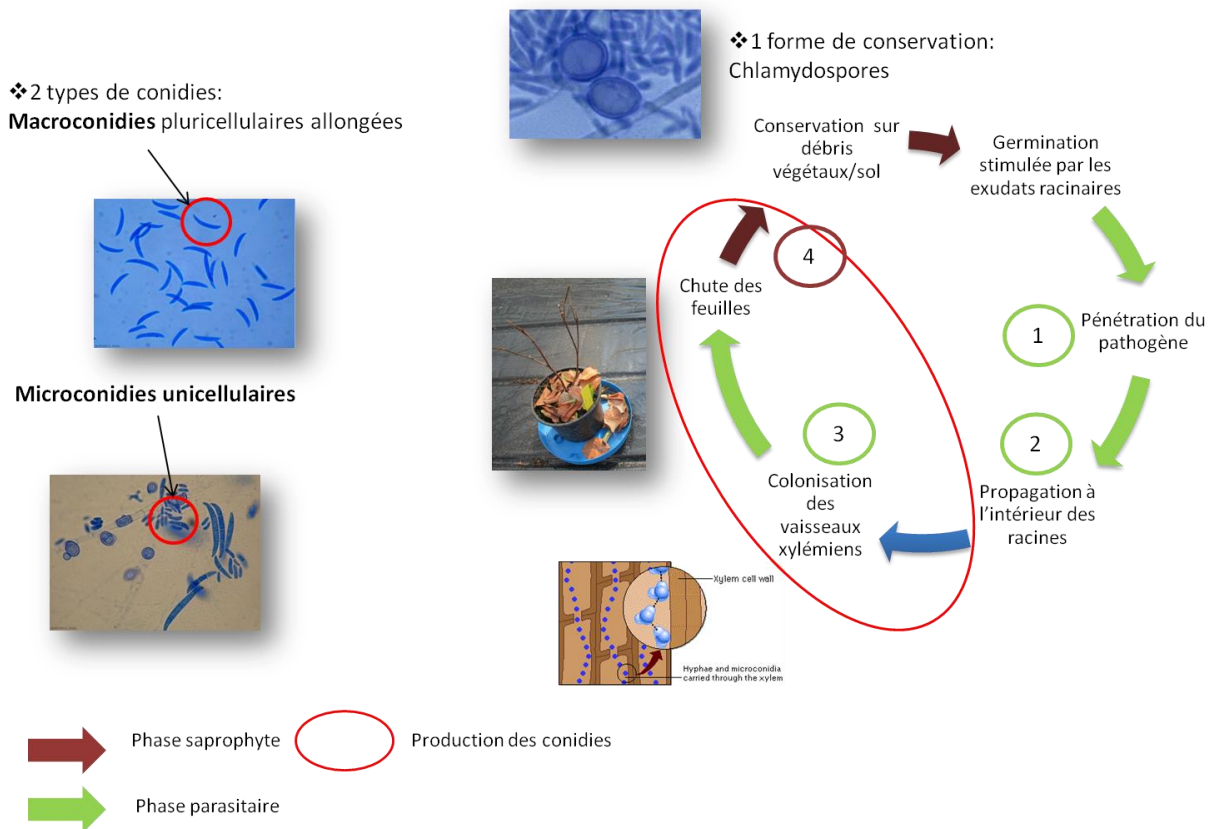


Figure 5 : Cycle de vie de l'agent pathogène de *Fusarium oxysporum* (Marion TRIOLET, 2014)

Communication personnelle). Par conséquent, ce pathogène pourrait avoir pour forme spécialisée *mandevilla*. Pour confirmer la pathogénicité de *F. oxysporum* f. sp. *mandevilla*, il est nécessaire d'effectuer un essai comprenant une gamme d'hôte de la famille des *Apocynaceae* ainsi que d'autres espèces.

### 2.2.3. Cycle de reproduction

#### Description des formes de reproduction végétative du pathogène

La forme asexuée de *F. oxysporum* est la seule observée à ce jour. La multiplication végétative de ce champignon produit deux types de conidies : les macro et microconidies. Les microconidies (Figure 4A) sont ellipsoïdales, non cloisonnées et produites à partir de conidiophores où elles sont disposées au dessus de ces derniers en fausse-tête (Iida, 2006). Les macroconidies sont falciformes et cloisonnées (trois ou quatre cloisons), produites par un regroupement de conidiophores (Figure 4B). Ces amas de conidiophores, *sporodochia*, ressemblent à des petits amas gélatineux (LNPV, 2008). Ce pathogène produit aussi des chlamydospores (Figure 4C), structures permettant sa conservation pendant l'hiver et dans le sol. Ces chlamydospores sont constituées de portions d'hyphes où le cytoplasme s'est condensé et sont entourées d'une paroi épaisse et mélanisée (LNPV, 2008).

#### Cycle biologique

*F. oxysporum* possède un cycle à deux phases : une phase parasitaire et une phase saprophytique (Figure 5).

##### 1. Pénétration du pathogène dans la racine

Le plus souvent, le pathogène pénètre par les blessures naturelles, comme celles présentes au niveau du point d'émission des racines secondaires (Blancard, 1998). Cependant s'il y a une blessure, il s'avère selon Fernon (1970), que la position de la blessure sur la racine peut avoir une importance sur la pénétration de l'agent pathogène et que l'invasion racinaire s'effectue par étapes successives suite à la compétition entre le champignon et le système de défense de la plante. D'après un travail réalisé sur *F. oxysporum* f. sp. *melonis* sur melon, il est possible d'extrapoler le comportement de *F. oxysporum* sur *Dipladenia*. Ainsi, après 24 heures, des hyphes mycéliennes se développent sur l'épiderme des racines pour commencer sa phase parasitaire. Le pathogène fixe son mycélium à la paroi végétale, et par formation d'appressoria, un filament mycélien plus fin va pouvoir percer la paroi végétale (Feron, 1970).

##### 2. Propagation du pathogène à l'intérieur de la racine

Suite à la pénétration dans la paroi cellulaire, le mycélium se ramifie et colonise les cellules épidermiques voisines de façon intercellulaire. Une fois cette action réalisée, il y a colonisation du parenchyme cortical et de tout le cortex au niveau inter et intracellulaire. La colonisation du cortex provoque des brunissements sur les cellules non touchées par l'agent pathogène, ce qui suggère la production de toxines par l'agent pathogène (Feron, 1970). En effet, deux toxines ont été identifiées, la lycomarasmine et l'acide fusarique (Darles, 2013). L'expansion mycélienne atteint ensuite les tissus du cylindre central, c'est ainsi que les vaisseaux sont colonisés. A partir des vaisseaux, l'agent pathogène progresse rapidement vers la tige.

##### 3. Propagation du pathogène dans la tige

Dans les vaisseaux de la tige, le champignon produit des microconidies. Ces dernières sont transportées vers le haut et lorsqu'une paroi transversale empêche la progression, les microconidies germent. Le tube germinatif produit permet de passer dans la paroi et la formation de microconidies se réitère de l'autre côté de la paroi. Le champignon continue alors sa colonisation jusqu'à atteindre l'apex (CABI/OEPP). Parfois, ce champignon produit des sporodochies qui contiennent des macroconidies (HYPP Pathologie). Après la mort de la plante, le mycélium se développe en dehors et démarre ainsi sa phase saprophyte. La production de micro et macroconidies à la surface de l'hôte constitue l'inoculum secondaire qui se dissémine par l'intermédiaire du vent, des eaux d'arrosages et l'utilisation d'outils (Iida, 2006 ; Darles, 2013). En outre, ce

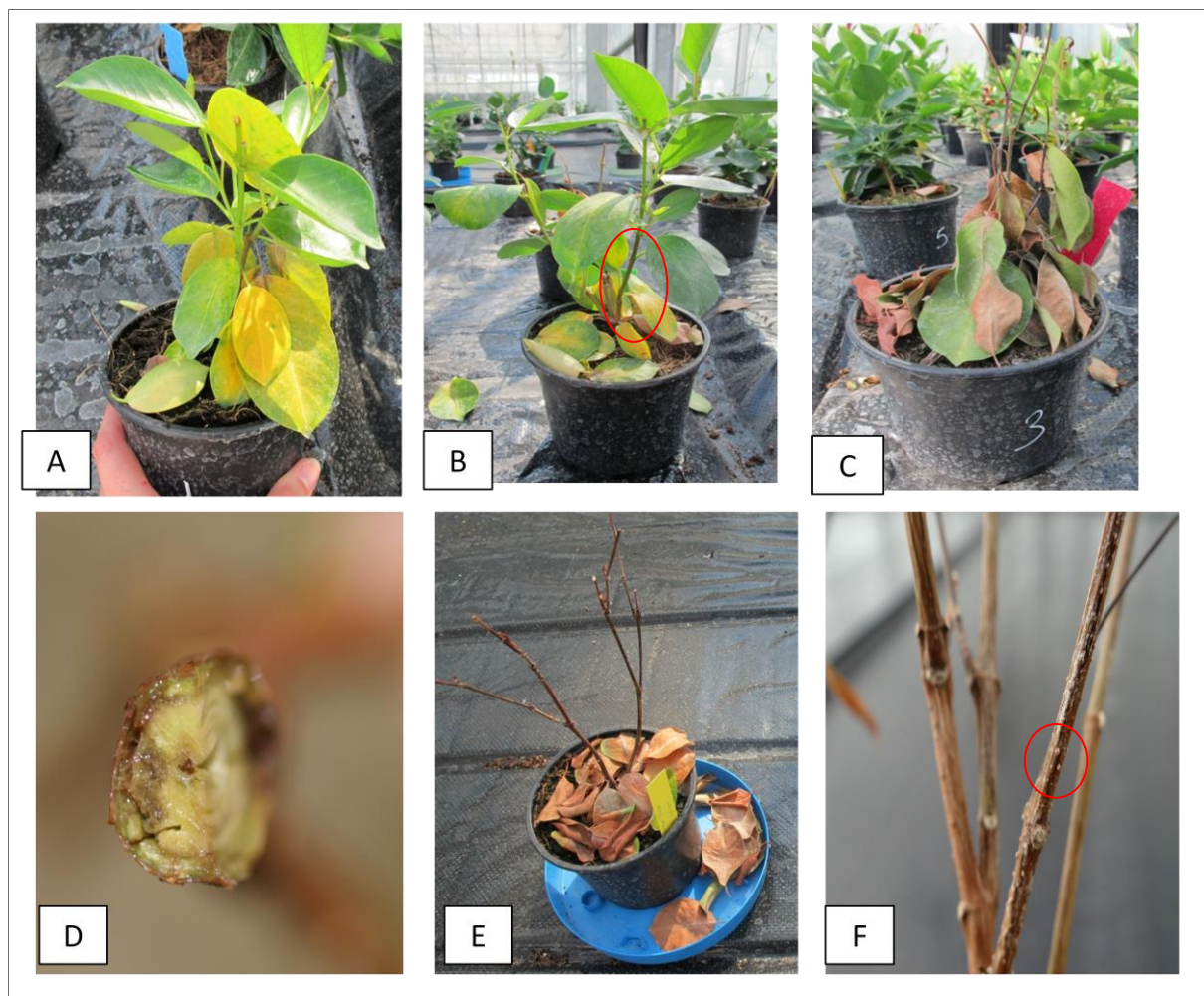


Figure 6 : Symptômes causés par *Fusarium oxysporum* sur l'appareil aérien du *Dipladenia*

(A) Feuilles retombantes et jaunissement, (B) Début de nécroses des tiges et de la chute des feuilles, (C) Colorations brunes des feuilles et tiges nécrosées (D) Coloration brune des tissus vasculaires sur tige en coupe transversale (E) Mort de la plante (F) Sporodochia sur tiges. (Marion TRIOLET, 2014)



Figure 7 : Symptômes causés par *Fusarium oxysporum* sur le système racinaire du *Dipladenia*

(A) Organe de réserve nécrosé, (B) Coupe longitudinale d'un organe de réserve, observation d'une coloration brune des tissus vasculaires, (C) Racines tubérisées nécrosées. (Marion TRIOLET, 2014)



développement amorce la production de formes de conservation, les chlamydospores, pouvant persister plusieurs années dans le sol et être l'inoculum primaire lorsque les plantes hôtes appropriées sont plantées dans le sol (Iida, 2006).

#### 4. Reprise de la phase parasitaire

Les chlamydospores permettent la reprise de la phase parasitaire en germant suite à la reconnaissance d'exsudats que produit la plante (Blancard, 1998). Le cycle peut ainsi recommencer.

#### 2.2.4. Symptomatologie

Les symptômes causés par les souches vasculaires de *F. oxysporum* sont divers. Il peut s'agir de coloration brune des tissus vasculaires provoquant le dessèchement des tiges, le jaunissement des nervures et du limbe des feuilles, le flétrissement du feuillage et l'exsudation de gomme (Figure 6) (Costa Rodrigues et al., 2006). Sur certaines cultures, il a été observé des fontes de semis, des pourritures du collet et des nécroses racinaires (Figure 7) (HYPP Pathologie).

### III. Les agents/produits de biocontrôle

#### 3.1. Le biocontrôle

D'après un article de Decoin (2014) dans le magazine Phytoma, le biocontrôle est « l'ensemble des méthodes de protection des végétaux (...) privilégiant l'utilisation de mécanismes et d'interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel (...) ». Les produits de biocontrôle peuvent être de quatre types : macroorganismes auxiliaires, micro-organismes, substances naturelles et médiateurs chimiques. Dans cette étude, les agents de biocontrôle sont des micro-organismes, ils sont donc considérés comme produits phytopharmaceutiques. Depuis une dizaine d'années, les études sur les agents de biocontrôle ont augmenté de façon significative. Cependant, en Europe, seuls 14 produits de biocontrôle à base de champignons, oomycètes et bactéries, comme *Trichoderma* spp., *Pythium oligandrum* et *Bacillus* spp. sont inscrits au règlement n° 1107/2009 (Gerbore et al., 2013). Ces agents sont utilisés dans le but de limiter le développement des micro-organismes pathogènes dans la rhizosphère et la phyllosphère (Darles, 2013). Ces derniers possèdent différentes capacités selon l'espèce et la souche utilisée qui peuvent être classées en actions directes ou indirectes. Les actions directes sont les mécanismes mis en place par l'agent de biocontrôle contre le pathogène. Il s'agit du mycoparasitisme, de l'antibiose et de la compétition nutritive et/ou spatiale. Les actions indirectes sont les effets de l'agent de biocontrôle sur la plante hôte. Il s'agit principalement de la stimulation de la croissance des plantes et de l'induction des mécanismes de défense des cellules du végétal (Mc Quilken, 1990). La plante devient alors plus résistante aux agents pathogènes. Dans cette étude, les agents de biocontrôle testés pour lutter contre le pathogène *Fusarium oxysporum* sont *Pythium oligandrum* et *Trichoderma asperellum*.

#### 3.2. L'agent de biocontrôle : *Pythium oligandrum*

*P. oligandrum* a été décrit pour la première fois en 1930 aux Etats-Unis par Dreschler (McQuilken, 1990). L'espèce *P. oligandrum* est considérée comme non pathogène et a été utilisée comme agent de biocontrôle sur différentes cultures telles que la tomate, la vigne, le blé (Gerbore et al., 2013, Darles, 2013).

##### 3.2.1. Taxonomie

Parmi les micro-organismes eucaryotes, il existe deux règnes qui se partagent la capacité de croître avec un mycélium : le règne *Fungi* et le règne *Chromista*. Parmi le règne *Chromista* se trouvent les oomycètes qui sont souvent associés aux champignons suite à divers caractères communs.

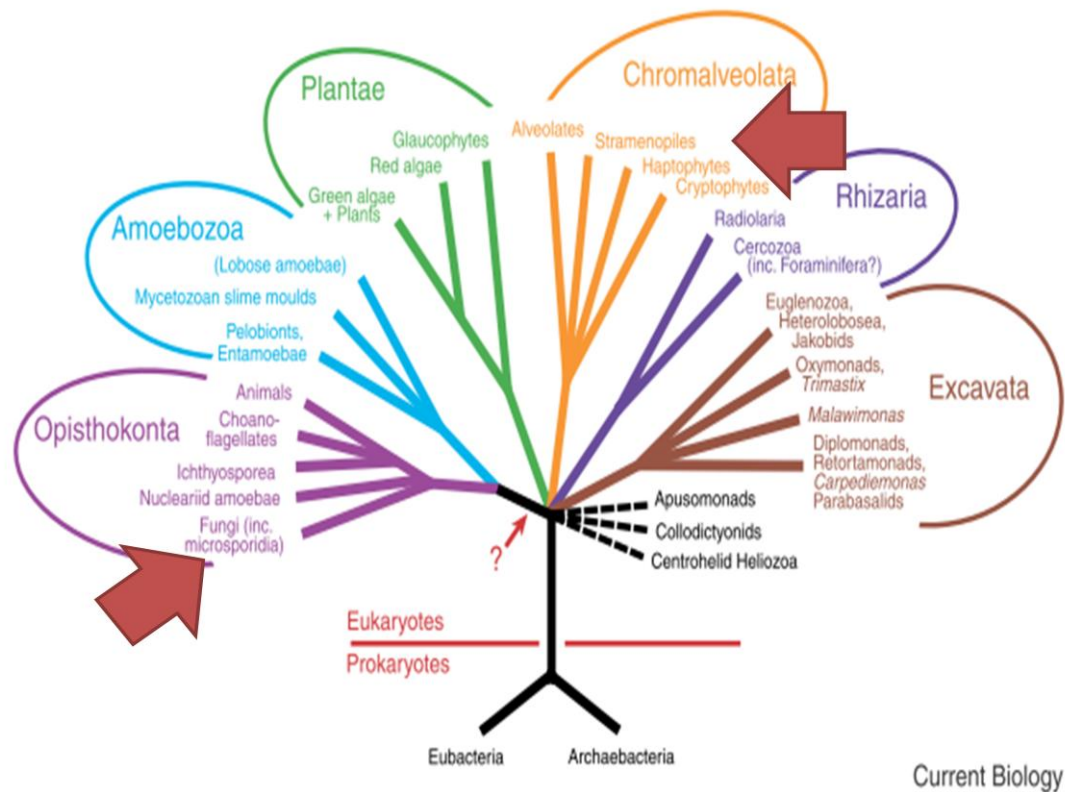


Figure 8 : Arbre phylogénétique des eucaryotes  
La position des champignons – Fungi- et oomycètes (Straménopiles) est indiquée par une flèche. (Adapté de Simpson et Roger, 2004)

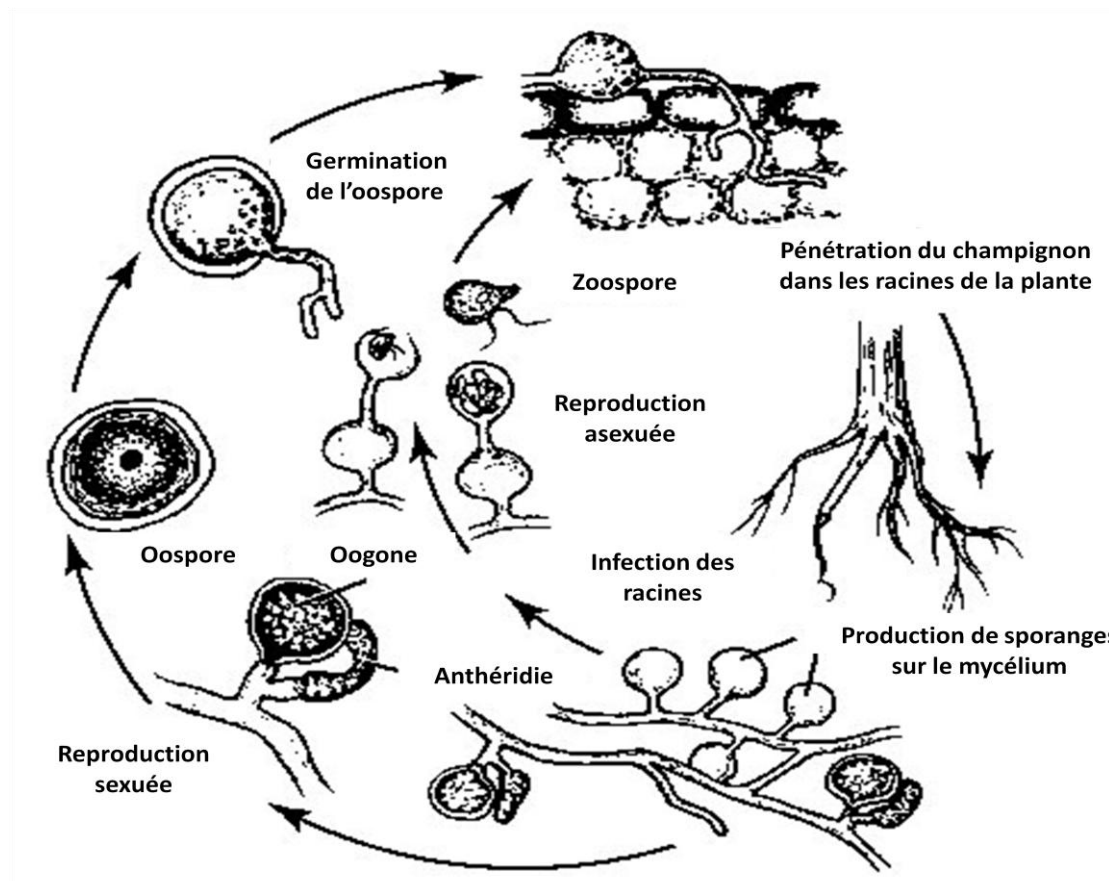


Figure 9 : Cycle de vie de *Pythium*, champignon pathogène responsable de la pourriture racinaire. (OMAFRA Staff, 2012)

Notamment, le caractère hétérotrophique, la nutrition par absorption et la dissémination des spores (Badreddine, 2008). Cependant, de nombreuses caractéristiques permettent de les distinguer. En effet, les oomycètes libèrent des zoospores mobiles biflagellées lors de la reproduction asexuée et possèdent un cycle diplophasique avec une reproduction sexuée oogame (productions d'oospores). Le dernier caractère qui permet d'exclure les oomycètes des champignons se situe au niveau des parois. Ces dernières étant constituées en partie de cellulose et non de chitine.

Suite à différentes études phylogénétiques, il a été montré l'existence d'une grande distance évolutive qui sépare les deux groupes. Actuellement, les oomycètes sont placés dans le domaine des Eucaryotes, le règne des Chromistes (ou *Chromalveolata*) et dans l'infra-règne des *Heterokonta* ou, *Stramenophiles* (Figure 8), avec les diatomées et les algues brunes (Badreddine, 2008). Dans l'ancienne classification les oomycètes étaient classés dans le domaine des Eucaryotes, le règne *Fungi*, dans l'embranchement des Mastigomycètes et dans la classe des Phycomycètes (Viennot-Bourgin, 1965).

En conséquence *P. oligandrum* est situé dans le règne des Chromistes, dans l'infra-règne des Hétékotes, dans la classe des Oomycètes, dans l'ordre des Pythiales, dans la famille des Pythiacées.

### 3.2.2. Biologie / Cycle de reproduction

Cet organisme est capable de coloniser les tissus racinaires, y compris les tissus vasculaires comme le xylème, sans endommager les cellules végétales et donc sans causer de symptômes (Darles, 2013). La colonisation des tissus racinaires se fait à long terme et au bout de six mois, 20 à 35% des racines restent colonisées (Gerbore *et al.*, 2013, Darles, 2013).

*P. oligandrum* possède deux cycles de reproduction, une reproduction sexuée et une asexuée (Figure 9). La reproduction sexuée représente environ 20% de la reproduction totale.

La reproduction asexuée commence par la production de sporanges plurinucléés sur le mycélium. Les sporanges arrivés à maturité libèrent des zoospores diploïdes flagellées. Ces zoospores grâce à leurs flagelles se disséminent par l'intermédiaire de l'eau, elles sont aussi capables de s'enkyster et de rester en dormance jusqu'à l'établissement d'un nouveau cycle de reproduction (European Commission Health & Consumers Directorate-General, Review report, 2008). Dans la reproduction sexuée, l'oogone est fécondée par une anthéridie, aboutissant à la formation d'oospores diploïdes à parois épaisses. Ces oospores présentent une phase de dormance constitutive, la post-maturation, pendant laquelle la paroi devient plus fine et s'est alors que les oospores deviennent échinulées (European Commission Health & Consumers Directorate-General, Review report, 2008). Chez certaines espèces, les oospores peuvent se conserver de deux à douze années (Blancard, 1998) ; les oospores sont donc les formes de conservation de cet oomycète. La germination de ces dernières est stimulée par des exsudats émis par les plantes hôtes ou par un champignon phytopathogène.

### 3.3. L'agent de biocontrôle : *Trichoderma asperellum*

Divers *Trichoderma* tels que *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride* et *T. asperellum* sont des agents de biocontrôle efficaces contre un certain nombre d'organismes phytopathogènes pour une large gamme de culture (Darles, 2013). Les *Trichoderma sp.* se développent dans presque tous les sols et sur les végétaux en décomposition (Meriem, 2010), ils sont par conséquent, des saprophytes.

*Trichoderma asperellum* est homologué en traitements généraux incluant les cultures ornementales et après des recherches bibliographiques, il s'avère qu'une souche T34 de *Trichoderma asperellum* est homologuée au Québec en culture ornementale sous serre. En outre, cet agent de biocontrôle est utilisé pour lutter contre *F. oxysporum* responsable de la « flétrissure fusarienne » chez les plantes ornementales, et notamment pour les œillets. Ce dernier agit en parasitant le champignon pathogène, en entrant en compétition nutritive et spatiale et en stimulant les réactions naturelles de défense chez la plante (Grégoire, 2013).



### 3.3.1. Taxonomie

Les formes asexuées (anamorphes) les plus couramment observées appartiennent aux Deutéromycètes, aux groupes des Hyphomycètes et des Hyphales. Cependant, sachant que la taxonomie moderne a aboli l'embranchement des Deutéromycètes, la classification se base principalement sur les formes sexuées observées. La classification actuelle est basée sur la morphologie mais aussi sur la biologie moléculaire. C'est pourquoi les formes sexuées (téléomorphes) bien que très rares sont de la classe des Ascomycètes, de l'ordre des Hypocreales, de la famille des *Hypocreaceae* et du genre *Hypocrea* (Meriem, 2010).

### 3.3.2. Biologie / Cycle de reproduction

*Trichoderma asperellum* est un champignon asexué, par conséquent la multiplication végétative s'effectue par les conidies qui sont de petites tailles et ovoïdes. La germination de ces conidies et le développement des tubes germinatifs sont influencés par différents facteurs tels que le pH, la nutrition, la lumière et les propriétés hydrologiques du sol (Magan, 1988). Une fois les conidies germées, le mycélium croît rapidement et produit des conidiophores polyphialides (=ramifications sur le conidiophore). Ces conidiophores à plusieurs branches portent les conidies qui une fois arrivées à maturité sont disséminées. La plupart des conidies du genre *Trichoderma* sont de couleur verte (Darles, 2013).

## 3.4. Actions des agents de biocontrôle

### ✚ Compétition nutritive et spatiale

Cette compétition est définie comme un phénomène général régissant la dynamique des populations des micro-organismes qui partagent la même niche écologique et les mêmes exigences physiologiques lorsque les ressources sont limitées. En milieu fortement concurrentiel de la rhizosphère, *P. oligandrum* s'avère très compétitif (Lutchmeah et Cook, 1984). Cette compétition a été montrée par Martin et Hancock (1987) contre *Pythium ultimum*, agent pathogène responsable de la fonte des semis sur coton. Les auteurs ont montré que *P. oligandrum* était plus compétitif pour l'espace et les nutriments que *P. ultimum*; des quantités de propagules de *P. oligandrum* élevées limite ou supprime le développement de *P. ultimum*.

Cette capacité de colonisation a également été observée en culture de tomate. *P. oligandrum* colonise tous les tissus racinaires, y compris le xylème et empêche la colonisation des plants de tomates par l'agent pathogène *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi* (FORL).

Les *Trichoderma* sp. ont, quant à eux, une aptitude supérieure aux autres organismes à mobiliser et à absorber les nutriments du sol (Darles, 2013). En effet, ce champignon serait capable de séquestrer les ions ferriques (indispensables au développement de tous les micro-organismes) en libérant des sidérophores. Ainsi, *Trichoderma* sp. montre bien sa capacité à être un compétiteur pour les nutriments (Verma et al., 2007). La compétition spatiale a lieu si *Trichoderma* sp. est appliqué en préventif car une installation précoce autour des racines permet de créer un manchon protecteur autour d'elles et ainsi contrer l'entrée des pathogènes dans la plante (Meriem, 2010).

### ✚ Mycoparasitisme

Chez *P. oligandrum*, le mycoparasitisme est le principal mécanisme de la lutte biologique (Lutchmeah et Cooke, 1984). *P. oligandrum* peut pénétrer et tuer les hyphes de certains champignons, y compris ceux qui sont pathogènes des plantes (Lutchmeah et Cooke, 1984). Le mycoparasitisme de cet organisme fongiforme dégrade la paroi cellulaire de ce dernier. Suite à cela, *P. oligandrum* pénètre dans les cellules fongiques. Cette pénétration est associée à la destruction complète du cytoplasme des cellules du pathogène qui finit par mourir. Ce phénomène a été observé dans l'interaction avec FORL ou *P. ultimum* (Gerbore et al., 2013). Il faut savoir que grâce à *P. oligandrum* plusieurs pathologies des cultures ont pu être contrôlées. En fonction des plantes hôtes, de l'agent pathogène cible et de la méthode d'application, l'incidence des maladies peut varier de 15% à 100% (Brozova 2002 ; Rey et al. 2008 ; Benhamou et al. 2012).





Chez *Trichoderma sp.*, le mycoparasitisme se manifeste par un changement de morphologie qui lui permet de s'enrouler autour du pathogène. Ce phénomène induit l'étranglement du pathogène et donc sa destruction. En outre, ce champignon forme des appressoria pour pénétrer à l'intérieur du pathogène. Une fois à l'intérieur, ce dernier dégrade les parois fongiques du pathogène à l'aide de diverses enzymes (Meriem, 2010 ; Darles, 2013).

#### Antibiose

L'antibiose est un phénomène connu défini comme une interaction spécifique dans laquelle la cible est détruite par des métabolites secondaires toxiques produites par le micro-organisme de biocontrôle (Gerbore *et al.*, 2013). Pour les deux agents de biocontrôle étudiés durant ce stage l'antibiose est associée à une production d'enzymes hydrolytiques. D'après Picard *et al.* (2000), *P. oligandrum* produit et sécrète des enzymes cellulolytiques qui dégradent la carboxyméthyl cellulose et la cellulose. Ces molécules composent les sites d'accrochage des oomycètes pathogènes comme *Pythium spp.* et *Phytophthora spp.*

En plus de produire des enzymes hydrolytiques, *T. asperellum* produit des peptaïbols (=les peptaïbols sont des peptides hélicoïdaux amphipolaires d'origine fongique, connus pour former des pores (Rippa, 2007)) ayant pour rôle de dégrader la paroi fongique (Verma *et al.*, 2007). Ces composés facilitent à la fois l'entrée des hyphes de *Trichoderma sp.* dans le lumen du champignon et l'assimilation du contenu de la paroi fongique (Darles, 2013).

#### Stimulation des mécanismes de défense des plantes

*P. oligandrum* produit deux types d'éléciteurs : l'oligandrine et les CPWs (Cell Wall Proteins = Protéines de la paroi cellulaire) codées POD-1 et POD-2 par Takenaka *et al.* (2006), lesquelles sont capables de stimuler les mécanismes de défense de la plante.

L'oligandrine est une glycoprotéine extracellulaire qui stimule les gènes liés à la résistance systémique induisant ainsi la mise en place de barrières morphologiques et biochimiques dans les tissus végétaux (Darles, 2013). Cette molécule induit des réponses de défense sans déclencher la réaction d'hypersensibilité (HR) associée à une réponse nécrotique (Gerbore *et al.*, 2013). Les CWP, POD-1 et POD-2, sont des protéines de la paroi qui déclenchent la résistance induite contre les maladies bactériennes et fongiques.

Au travers de ces différentes protéines élicitrices, l'agent de biocontrôle *P. oligandrum*, lorsqu'il colonise la rhizosphère, va permettre la mise en « éveil » des mécanismes de défenses de la plante qui répondra alors plus fortement et plus rapidement lors d'attaques de pathogènes (Benhamou *et al.*, 2012).

Le genre *Trichoderma* est connu pour la production de cellulase. Cette production est intéressante et efficace car ces enzymes induisent une réaction systémique dont les effets persistent pendant une quinzaine de jours en culture de melon, concombre, tomate et vigne sous serre (Blanchard et Limache, 2005). D'après ces mêmes auteurs, la protection conférée par ces cellulases atteint jusqu'à 60% sur melon contre *F. oxysporum f. sp. melonis*. Une colonisation des racines à long terme, ainsi qu'une pénétration dans l'épiderme peut s'établir avec certaines souches de *Trichoderma sp.*

Ces champignons libèrent des composés reconnus comme éliciteurs par les plantes et qui induisent l'expression des gènes liés aux mécanismes de défense des plantes (Darles, 2013).

#### Stimulation de la croissance des plantes

*P. oligandrum* est capable de synthétiser un précurseur de la voie de biosynthèse de l'auxine, la tryptamine (TNH2). Ce précurseur (Figure 10) est absorbée par les racines de tomates qui se développent en conséquence (Gerbore *et al.*, 2013). Cette phytohormone favorise la croissance et le développement végétal plus particulièrement le système racinaire (Darles, 2013).

L'activité de *Trichoderma sp.* sur la croissance des plantes est due à la production d'hormones de croissance de type cytokinines et au transfert accru d'éléments minéraux de la rhizosphère (Benitez *et al.*, 2004, Verma *et al.*, 2010). Cette hormone améliore le développement, la résistance aux stress abiotiques, l'absorption et l'utilisation des nutriments par les racines (Benitez *et al.*, 2004).

## Taqman

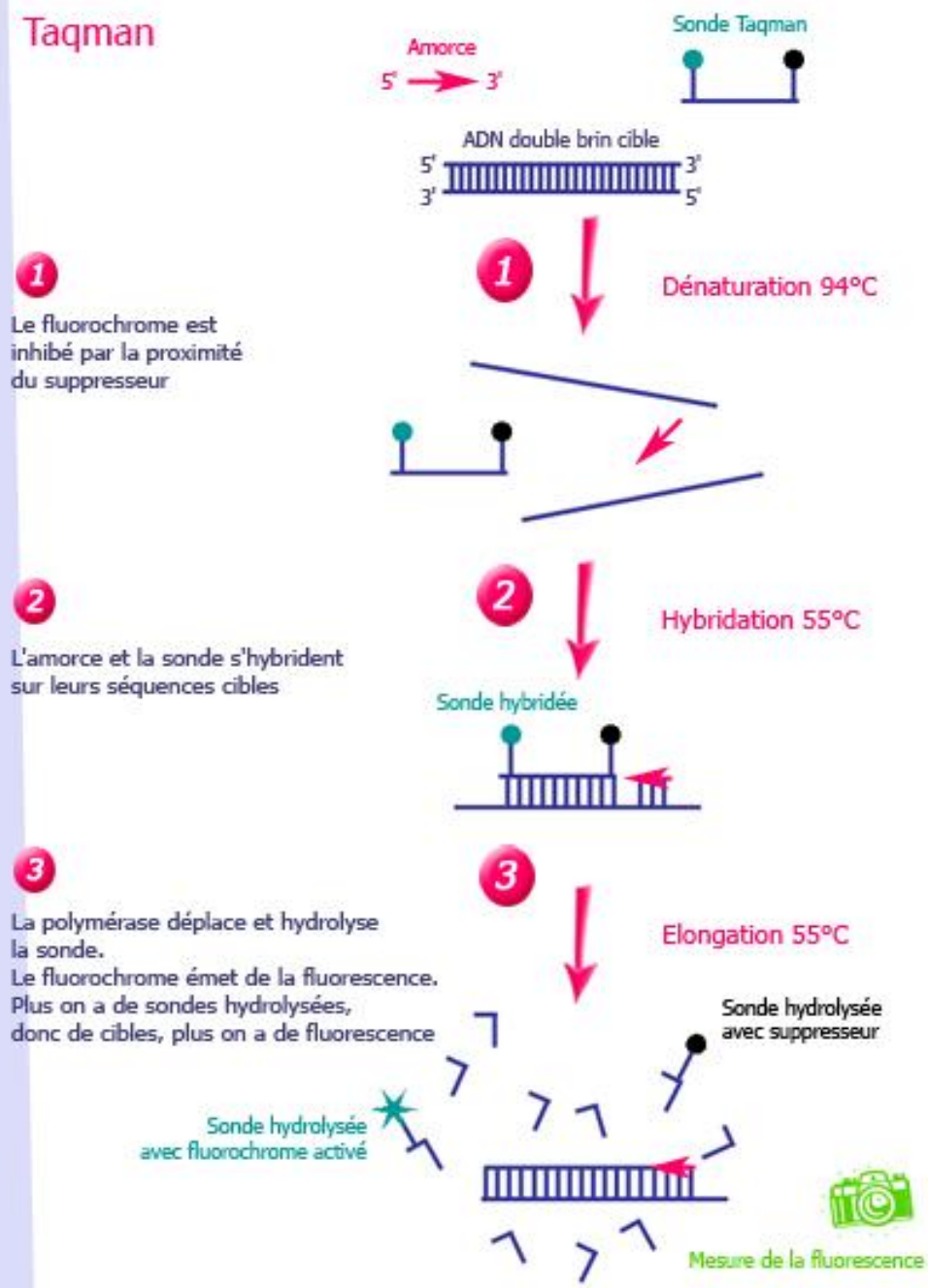


Figure 11 : Principe d'une PCR quantitative avec l'utilisation de la sonde Taqman® (Poitras *et al.*, 2002)



## IV. La détection des agents de biocontrôle dans la rhizosphère

Pour étudier *P. oligandrum* et *T. asperellum* des approches de microbiologie classique et de biologie moléculaire sont utilisées.

### 4.1. L'approche biologique

Les méthodes de microbiologie sont couramment employées pour l'observation des micro-organismes et l'identification selon des critères phénotypiques. Ces méthodes sont basées sur l'ensemencement de milieux de culture et l'observation après une période d'incubation. Dans cette étude, le but a été de biotiser la rhizosphère des *Dipladenia* avec les agents de biocontrôle *P. oligandrum* et *T. asperellum*. Afin de les détecter, des fragments racinaires sont placés sur un milieu sélectif (CMAparp afin de détecter *P. oligandrum* et PDA pour détecter *T. asperellum*). Toutefois, l'approche biologique présente certains inconvénients : les résultats dépendent de l'état physiologique des micro-organismes qui peuvent être viables, viables mais non cultivables, en dormance... (Massot, 2011). Elles ne permettent pas de discriminer plusieurs souches au sein d'une même espèce. La croissance des micro-organismes est sélective, ainsi les espèces à croissance rapide et les plus adaptées à des conditions de cultures (température, éléments nutritifs du milieu) sont favorisées. Pour appuyer l'approche biologique quant à la détection des micro-organismes, des méthodes basées sur des techniques de biologie moléculaire sont aussi utilisées.

### 4.2. L'approche moléculaire

La biologie moléculaire est une discipline qui a pour objectif de comprendre les mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire, elle désigne aussi l'ensemble des techniques de manipulation de l'ADN et de l'ARN. Dans les années 80, la biologie moléculaire a été bousculée par l'arrivée d'une nouvelle technique : la PCR (Polymerase Chain Reaction). A partir de cette technique, d'autres se sont développées, notamment la PCR quantitative qui a une meilleure sensibilité que la PCR conventionnelle. Ainsi, c'est cette technique qui est utilisée pour appuyer la technique de microbiologie.

La PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel est une méthode de PCR permettant de mesurer le nombre d'amplicons synthétisés, à partir d'un couple d'amorces spécifiques. Le suivi de la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant, ainsi que l'amplification est possible grâce à cette technique. La qPCR repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent qui se fixe sur l'ADN, et permet de suivre de façon proportionnelle l'évolution des amplifications. Il existe deux systèmes de détection et de quantification du signal fluorescent en temps réel :

- les agents intercalants, molécules capables de s'insérer entre les bases appariées d'un acide nucléique. Actuellement, l'agent intercalant le plus utilisé est le SYBR® Green.
- les sondes fluorescentes qui se composent de quatre technologies principales de sensibilité égale : Taqman ou hydrolyse de sondes, HybProbes (FRET), Molecular Beacons et Scorpion.

Dans cette étude, la sonde Taqman<sup>TM</sup> est utilisée. Cette dernière est un fragment oligonucléotique, de 25 à 30 nucléotides, marqué par deux groupements fluorophores en ses extrémités 5' et 3'. Un fluorophore donneur, dérivé de la fluoescéine (FAM), est porté par l'extrémité 5'. L'extrémité 3' possède le fluorophore accepteur. Les deux fluorophores étant très proches dû à la petite taille de la sonde, l'énergie absorbée par le fluorophore donneur excité est transférée par FRET au fluorophore accepteur (Figure 11 (1)). Ce dernier n'émet aucune fluorescence car son spectre d'excitation est différent du spectre d'émission du fluorophore donneur, c'est l'effet *quenching*. Lors de l'élongation des amorces par l'ADN polymérase, la sonde est déplacée puis clivée grâce à l'activité nucléase de cette dernière. Ainsi, le fluorophore donneur émet un signal fluorescent car il est libéré de l'effet *quenching* du fluorophore accepteur. Le fluorophore donneur ainsi séparé du fluorophore accepteur émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées et mesurable à la fin de chaque cycle d'amplification (Figure 11 (2) et (3)). Cette technique présente l'avantage d'être spécifique, rapide et sensible mais manque d'efficacité et de flexibilité lors de mutations variables ou

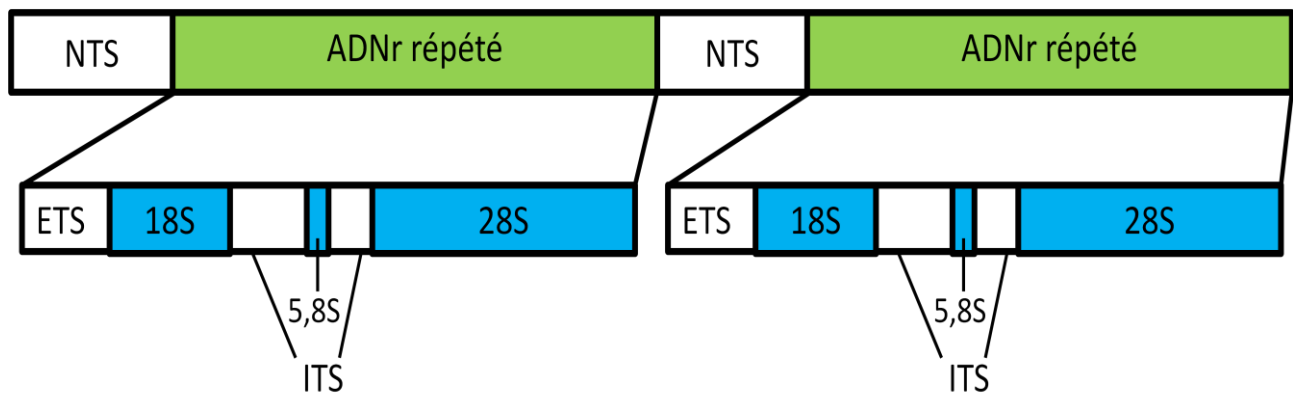


Figure 12 : Segment d'ADNr de gène eucaryote constitué des sous-unités du ribosome avec une répétition en tandem

Légende : NTS= non-transcribed spacer, ADNr = ADN ribosomique, ETS = external transcribed sequence, ITS = internal transcribed spacer.

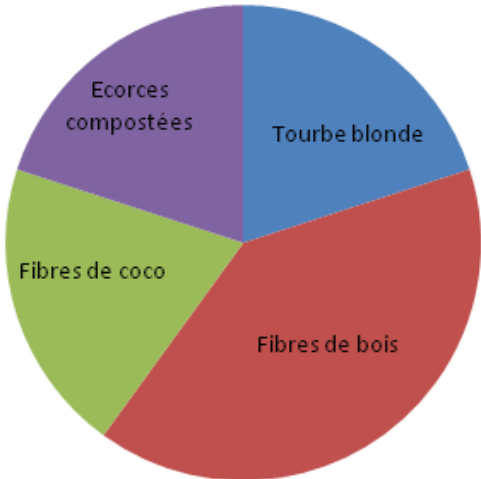
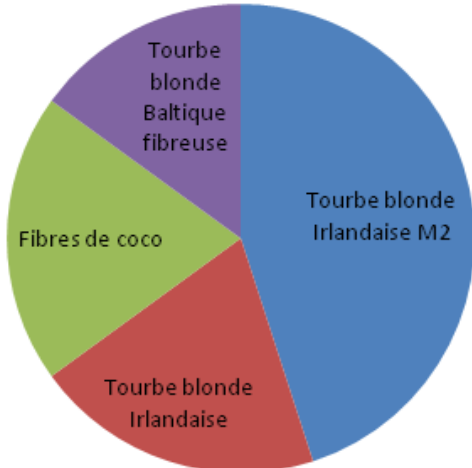
(Adapté du site [http://bioinfo.unice.fr/biodiv/rrn\\_gene\\_organisation.html](http://bioinfo.unice.fr/biodiv/rrn_gene_organisation.html))

localisées dans les régions comportant des séquences répétées (faux négatifs) (Institut Louis Malardé, 2014).

Pour quantifier l'ADN de *P. oligandrum* dans la rhizosphère par PCR quantitative, des amorces spécifiques de cette espèce qui cible la région ITS (Internal Transcribed Spacer) sont utilisées (Figure 12).

Grâce à la combinaison des deux techniques, un suivi des populations des micro-organismes est possible.

Tableau 1 : Composition des deux substrats utilisés pour l'essai (Adapté des fiches techniques DUMONA® et Premier Tech FALIENOR®)

Composition des substrats	
Premier Tech FALIENOR® pH=5	DUMONA® TCH2 pH=6
<p>60% Tourbe blonde 20% Fibres de bois 10% Fibres de coco 10% Ecorces compostées</p> 	<p>45% Tourbe blonde Irlandaise M2 20% Tourbe blonde Irlandaise 20% Fibres de coco 15% Tourbe blonde Baltique fibreuse</p> 

# MATERIEL ET METHODES

---

## I. Matériel biologique

### 1.1. Matériel végétal

La variété de *Dipladenia* choisie pour cet essai est la variété Diamantina® de la gamme 'Opale' et de couleur 'Grenat'. Cette variété a été créée par l'entreprise Lannes. Les plants sont reçus sur plaque de micro-mottes comprenant 84 boutures enracinées réalisées à partir de pieds mères. Le choix de cette variété s'est porté sur le fait de sa très forte sensibilité à *Fusarium oxysporum*.

### 1.2. Matériel fongique

#### 1.2.1. *Fusarium oxysporum*

La souche du pathogène a été isolée au GIE FPSO, puis multipliée au Laboratoire Départemental d'Analyse de la Gironde (LDA33) afin de la conserver pour de futurs essais. La souche est utilisée pour préparer des inocula. Les inocula sont calibrés à  $3.10^6$  conidies/mL.

#### 1.2.2. *Pythium oligandrum*

L'agent de biocontrôle est fourni par l'entreprise BIOVITIS S.A (Auvergne). Cet agent est livré sous forme liquide, milieu aqueux contenant du mycélium et des oospores issues de *P. oligandrum*, à une concentration de  $10^5$  oospores/mL.

#### 1.2.3. *Trichoderma asperellum*

Ce micro-organisme est testé pour la première fois cette année. Le produit contenant ce champignon est XEDAVIR fourni par la firme DE SANGOSSE (Lot-et-Garonne). C'est un produit homologué en tant que produit phytopharmaceutique contre les champignons telluriques du sol. Donc son efficacité contre la fusariose reste à démontrer. Ce produit est livré sous forme de poudre à diluer dans l'eau.

## II. Dispositif expérimental

### 2.1. Mise en place de l'essai

#### ✚ Empotage

Les plants de *Dipladenia* sont réceptionnés à la station en semaine 5. L'empotage est effectué, pour toutes les modalités, en semaine 14 dans des pots de 12 cm de diamètre contenant un volume de substrat de 0,7 à 0,8L. Pour cet essai, deux compositions de substrat sont utilisées (Tableau 1). Le premier est distribué par la société Premier Tech Faliénor, ce substrat a été choisi en raison de sa capacité d'accueil à une vie microbienne. En effet, les matériaux tels que la fibre de bois et les écorces de pin compostées améliorent la colonisation des micro-organismes. Le second est distribué par la société DUMONA, ce substrat TCH2 a été choisi afin de comparer l'installation des micro-organismes par rapport au substrat de base.

Un engrais retard à diffusion lente : Basacote native à 6 mois (N-P-K de 16-3-19) est ajouté au substrat lors de l'empotage afin de fournir aux plants de *Dipladenia* tous les éléments nutritifs nécessaires à leur développement. Il est mélangé au substrat en quantité de 2,5 g/L de substrat.

#### ✚ Modalités et plan d'expérimentation

Pour réaliser cet essai, 335 plantes sont mises à disposition. Cinq plantes sont réservées pour réaliser le postulat de Koch.

Tableau 2 : Modalités de l'essai

Témoins exclus non inoculés <i>F. oxysporum</i> (Bloc exclu)	Témoins non exclus inoculés <i>F. oxysporum</i>	Modalités inoculées <i>F. oxysporum</i>
M1: Témoin négatif	M3: Témoin inoculé <i>F.o</i>	M5: Apport 1 fois <i>P.o</i>
M2: Témoin apport <i>P.o</i> mensuel	M4: Témoin fongicide	M6: Apport 2 fois <i>P.o</i>
M9: Témoin Nouveau Substrat (TCH2)		M7: Apport <i>P.o</i> mensuel
M10: Témoin TCH2 + apport <i>P.o</i> mensuel		M8: Apport <i>P.o</i> c <sup>o</sup> ≠ mensuel
		M11: Xedavir®

*P.o* = *Pythium oligandrum*  
*F.o* = *Fusarium oxysporum*

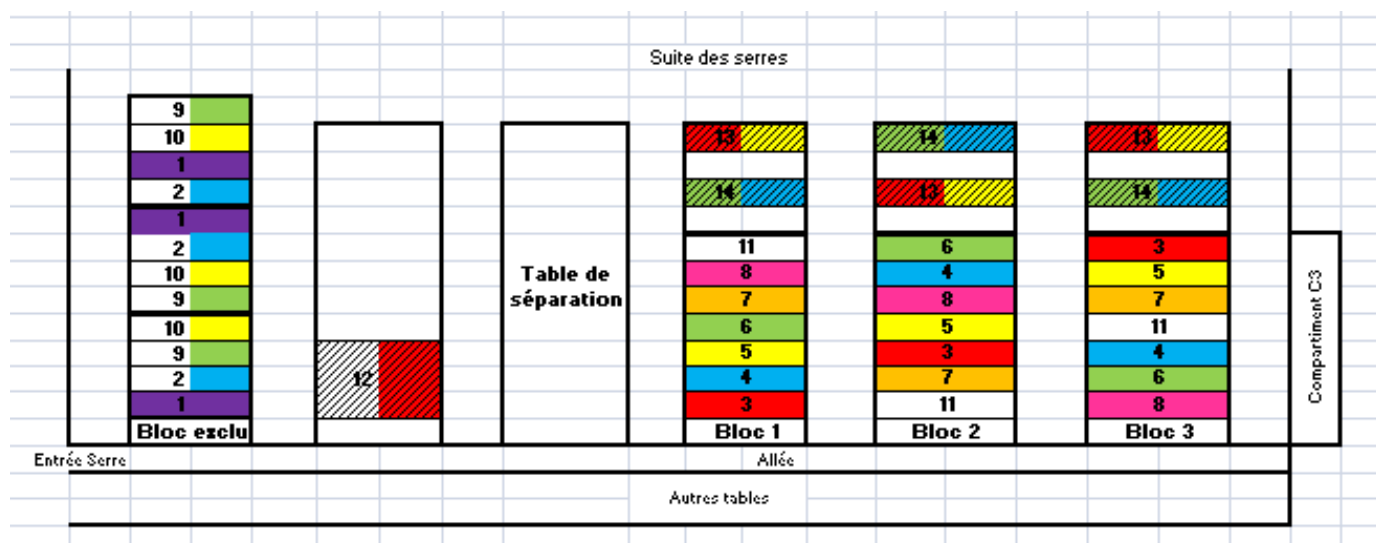


Figure 13 : Représentation schématique du plan d'essai. (Pour les légendes cf. Tableau 2)  
 (Les cases grisées ne font pas parties de l'essai)

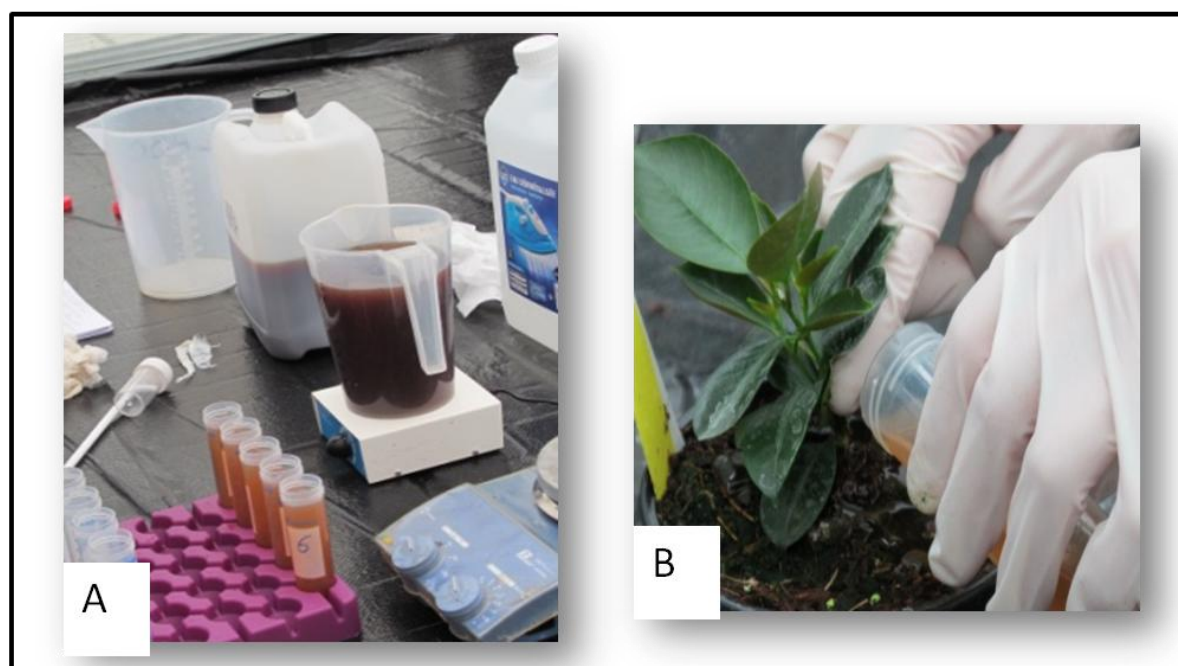


Figure 14 : Biotisation de la rhizosphère des plants de *Dipladenia*  
 (A) Préparation des dilutions de la solution mère de *Pythium oligandrum*; (B) Dépôt de 50mL de cette solution dans le substrat des plantes à biotiser. (Marion TRIOLET, 2014)

Les modalités sont définies en fonction des agents de biocontrôle à tester. Dans cet essai, deux micro-organismes sont étudiés dont principalement *Pythium oligandrum*, la plupart des modalités contiennent ce micro-organismes. L'essai comporte 11 modalités ; 7 modalités sont biotisées avec les agents de biocontrôle dont 5 sont inoculées avec *F.oxysporum*, les 2 modalités restantes sont : un témoin inoculé *F.oxysporum* et un témoin fongicide appelé témoin de référence (Tableau 2).

L'essai s'effectue dans le compartiment C3 des serres du GIE FPSO. L'essai comporte 3 blocs en dispositif de Fisher. Chacun des blocs contient 11 modalités réparties aléatoirement, et chaque modalité est représentée dans un bloc par 10 plantes soit au total 30 plants de *Dipladenia* par modalité. Les modalités T. négatif, T. apport *P.o* mensuel, T. Nv. Substrat (TCH2) et T. TCH2 + apport *P.o* mensuel sont exclues des blocs pour éviter toutes contaminations dues à *F.oxysporum*. Il y a donc 7 modalités placées dans les 3 blocs. Tous les plants sont surélevés à l'aide de microplaques de bouturage afin d'éliminer le risque de mélange entre les différents agents de biocontrôle.

Les plants sont ainsi disposés suivant le plan expérimental représenté sur la figure 13, après l'empotage en semaine 14.

L'irrigation est faite manuellement permettant ainsi un arrosage au plus près des besoins des *Dipladenia*.

La modalité M4 témoin fongicide nécessite l'utilisation de deux produits phytopharmaceutiques, Topsin 70 WG® et Octave®, ayant pour substance active le Thiophanate-méthyl 70,4% et le complexe Prochloraze-manganèse 46,1% respectivement. Ces deux produits sont appliqués en alternance toutes les quatre semaines après l'empotage.

## 2.2. « Biotisation » des plants avec les agents de biocontrôle

### - *Pythium oligandrum*

Les modalités contenant le micro-organisme *P. oligandrum* sont traitées en apportant ce dernier en arrosage. La solution mère de *P. oligandrum* ( $10^5$  oospores/mL) a été diluée au 1/5<sup>ème</sup> selon les recommandations du fournisseur et apportée à raison de 50 mL par plante (Figure 14). Il est ainsi apporté  $10^6$  oospores par plante. Pour la modalité M8 où la concentration de *P. oligandrum* est double, la solution mère a été deux fois moins diluée.

La première « biotisation » est faite en semaine 15, soit une semaine après l'empotage pour permettre l'installation de *P. oligandrum* à un stade précoce de la culture de *Dipladenia*.

Les « biotisations » suivantes sont effectuées en fonction des modalités.

### - *Trichoderma asperellum*

L'apport du produit XEDAVIR est recommandé à 5 kg/ha, il doit donc être apporté à raison de 5g/L/10m<sup>2</sup>. A noter, la concentration de cette solution commerciale est de  $10^7$  UFC/g, ainsi il est apporté environ  $1,6 \times 10^7$  UFC par plant de *Dipladenia*.

## 2.3. Identification de la souche *Fusarium oxysporum*

### 2.3.1. Postulat de Koch

Le postulat de Koch énoncé en 1881 permet d'établir une relation causale entre une maladie et un agent phytopathogène. Afin de pouvoir établir ce lien, différentes étapes sont nécessaires (Figure 15).

- 1) l'agent pathogène doit être visible sur les plantes malades et absent des plantes saines ;
- 2) l'agent pathogène doit être isolé des plantes malades et cultivé sur milieux gélosés pour être identifié au microscope
- 3) une inoculation de plants sains doit être réalisée avec la culture pure de l'agent pathogène et induire des symptômes caractéristiques de la maladie



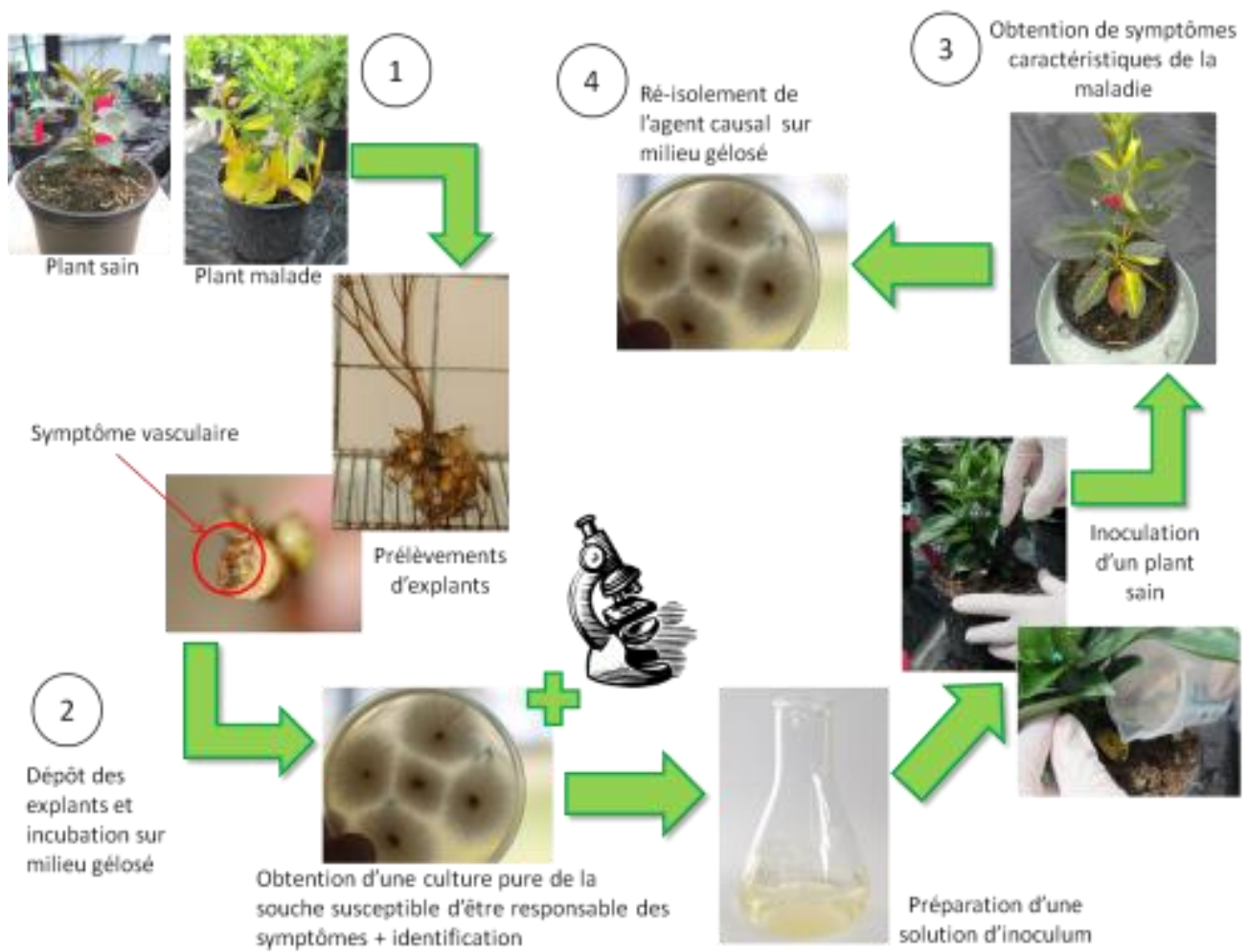


Figure 15 : Principe du Postulat de Koch (Adapté d'une fiche de laboratoire du LDA33)

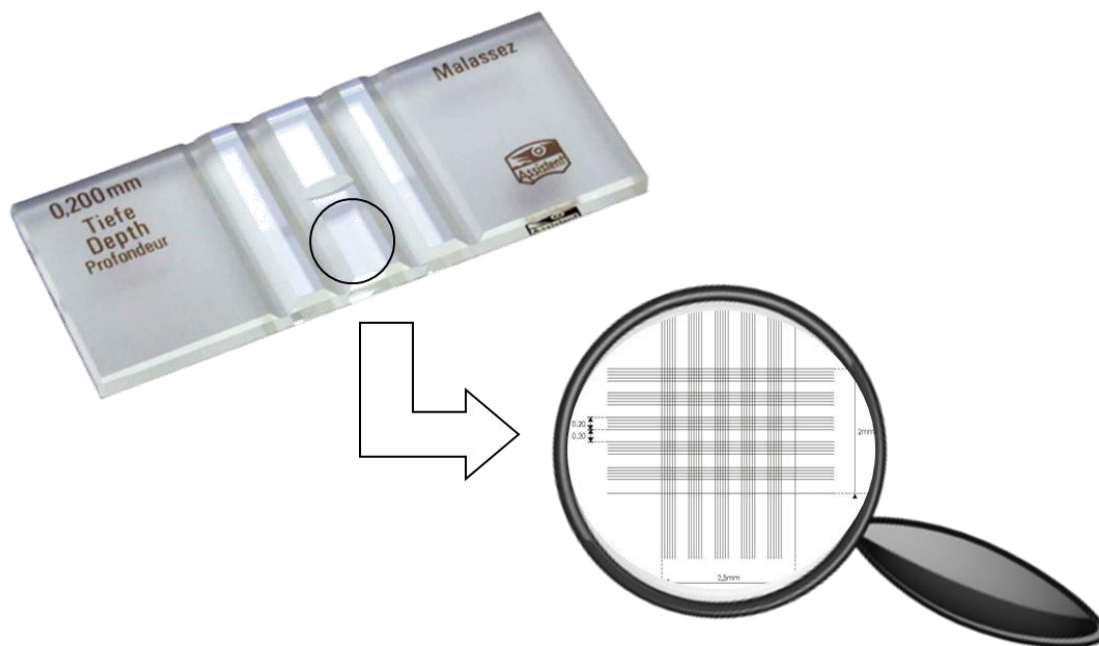


Figure 16 : Cellule de Malassez et son quadrillage permettant de compter les conidies (Adapté d'une fiche de laboratoire du LDA33)



- 4) l'agent pathogène doit être ré-isolé à partir des mêmes symptômes et son identification doit être confirmée (Lepoivre, 2003).

La première étape du Postulat de Koch est réalisée avec des plants conservés de l'essai 2013 qui présentaient des symptômes caractéristiques de fusariose vasculaire. Des isollements issus de ces plants sont réalisés pour identifier l'agent pathogène. *Fusarium oxysporum* étant un pathogène vasculaire, différents types d'explants (racines et racines tubérisées, tiges) ont été prélevés sur ces plants.

Pour isoler l'agent pathogène, il faut au préalable rincer les explants choisis à l'eau puis les désinfecter dans une solution d'hypochlorite de sodium diluée à 3% pendant 2 à 3 minutes afin d'éviter de contaminer le milieu gélosé par des champignons saprophytes ou secondaires. En condition stérile, chaque type d'explant est déposé sur différents milieux gélosés (MS, MA et MAC) (Annexe II), à raison de 5 explants par boîtes. Les boîtes de Petri sont déposées en chambre d'incubation à température ambiante et en lumière naturelle jusqu'au développement de colonies.

### 2.3.2. Identification de l'agent pathogène

Les colonies développées, issues des différents explants, sont en premier lieu, observées à l'œil nu pour constater l'homogénéité de la croissance, puis à la loupe binoculaire pour distinguer les colonies contaminantes des colonies de *Fusarium*. Enfin, elles sont observées sous lame et lamelle pour identifier le pathogène grâce à une clé d'identification de *Fusarium*. Une fois le pathogène identifié, ce dernier est repiqué sur milieu DCPA pour être identifié conformément au protocole d'identification de l'ANSES (Annexe III).

### 2.3.3. Inoculation de l'agent pathogène sur plants sains

Des repiquages de la souche, issue des prélèvements des plants malades de 2013 sont réalisés, afin d'obtenir des colonies plus jeunes pour les inoculations. Un temps d'incubation de 10 à 15 jours est nécessaire afin d'obtenir des colonies suffisamment développées.

La **préparation d'inoculum** est réalisée en versant 6mL d'eau stérile dans une boîte de Petri contenant la souche de *F.oxysporum*. A l'aide d'un petit « râteau », la surface de la gélose est grattée afin de récolter les conidies et le mycélium. Cette solution est ensuite transvasée dans un bécher. Afin d'effectuer le comptage des conidies et estimer la concentration de la solution, 1  $\mu$ L de l'extrait est déposé sur une cellule de Malassez (Figure 16). Cette estimation a pour objectif de déterminer le volume de solution à diluer dans l'eau pour obtenir un inoculum à  $3.10^6$  spores/mL.

L'**inoculation des plants sains** se fait en trois étapes : la première permet de blesser le système racinaire en pratiquant une incision dans le substrat, à l'aide d'un couteau, de chaque côté de la plante ; la deuxième consiste à verser 20mL de solution d'inoculum de *F. oxysporum* au niveau des deux incisions. La dernière étape est de placer un voile protecteur P30 (plants de l'essai) ou un cône plastique (Postulat de Koch) (Figure 17) pendant 48 heures afin de maintenir l'humidité du substrat et une certaine hygrométrie pour favoriser l'entrée du pathogène.

Les plants des modalités exclues (témoins non inoculés) subissent le même protocole, cependant les 20mL de suspension d'inoculum de *F. oxysporum* sont remplacés par 20mL d'eau.

L'inoculation du Postulat de Koch est effectuée en semaine 21 et celle pour l'essai est en semaine 25.



Figure 17 : Inoculation des plants avec *F.oxysporum* en 3 étapes (Marion TRIOLET, 2014)



Figure 18 : Racines prélevées dans une boîte de Petri. Prélèvement noté : M7.3.2 (Marion TRIOLET, 2014)

## 2.4. Suivi de la colonisation racinaire par les agents de biocontrôle testés

### 2.4.1. Analyses microbiologiques

#### a) Prélèvements racinaires

##### *Pythium oligandrum*

Les prélèvements racinaires sont effectués, le plus possible, au centre de la motte. Ces prélèvements se font à la main en enlevant délicatement le substrat pour dégager les racines ; elles sont ensuite coupées et déposées dans une boîte de Petri (Figure 18). Ces prélèvements sont réalisés sur toutes les modalités contenant *P. oligandrum* et sur la modalité témoin non « biotisée » et non inoculée.

Les prélèvements ont commencé en semaine 15 juste après la première biotisation. Cependant, seules les modalités, témoin non biotisé non inoculé (M1) et témoin apport *P.o* mensuel (M2), sont prélevées à J0 jours après inoculation (jpi). Le choix de ce prélèvement est la conséquence de l'état juvénile des plants dont le système racinaire était peu développé. Pour ces modalités, un plant par bloc est prélevé.

Les prélèvements suivants sont toujours réalisés avant la biotisation et à différents temps (à 15, 30, 60 et 120 jpi) en prélevant deux plants par modalité et par bloc.

Une fois les prélèvements réalisés, les boîtes de Petri contenant les racines sont gardées au frais à 4°C en attendant d'être déposées sur milieu gélosé et d'être mise en culture afin de détecter par observation microscopique l'agent de biocontrôle.

##### *Trichoderma asperellum*

Les prélèvements de la modalité Xedavir (M11) sont effectués de la même manière que ceux pour *P. oligandrum*. Ces derniers sont réalisés un mois après la biotisation et ensuite tous les mois (J+30 à J+120 jpi).



##### Notation des prélèvements : Exemple

Prélèvement de la modalité 7 du bloc 3, plante n°2 prélevée sur cette modalité et sur ce bloc, la plante ainsi que le prélèvement porte donc le nom M7.3.2 (Figure 18) Tous les prélèvements ont été notés de cette manière afin d'assurer une traçabilité des plants prélevés.

#### b) Dépôt sur boîtes de Petri

##### *Pythium oligandrum*

Les racines de *Dipladenia* sont tronçonnées en une vingtaine de fragments de 50mm autour d'un bec bunsen pour éviter toutes contaminations extérieures. Ces fragments sont ensuite déposés sur un milieu CMAparp, milieu sélectif des Oomycètes (Annexe II), à raison d'une dizaine de fragments par boîte de Petri (Figure 19). Pour chaque plant prélevé, un duplicata A et B est effectué. Une vingtaine de racines sont observées au microscope pour chaque individu. Ces boîtes sont ensuite conservées à l'obscurité dans une chambre de culture à 27°C pendant 5 jours.

##### *Trichoderma asperellum*

Avant d'être déposées sur milieu de culture, les racines de *Dipladenia* prélevées sur la modalité Xedavir (M11) sont légèrement désinfectées par immersion dans une solution d'eau oxygénée à 10 volumes pendant une minute puis plongées dans deux bains d'eau stérile pendant une minute respectivement. Sous hotte à flux laminaire vertical, les racines sont découpées en une vingtaine de fragments de 50mm et ces derniers sont déposés à raison de 7 par boîte de Petri sur milieu PDA (Annexe II) (milieu favorable au développement des *Trichoderma sp.* mais non sélectif). Ces boîtes sont ensuite déposées en chambre de culture à température ambiante pendant 3 à 5 jours.



Figure 19 : Dépôt des fragments racinaires sur milieu gélosé CMAparp (Marion TRIOLET, 2014)

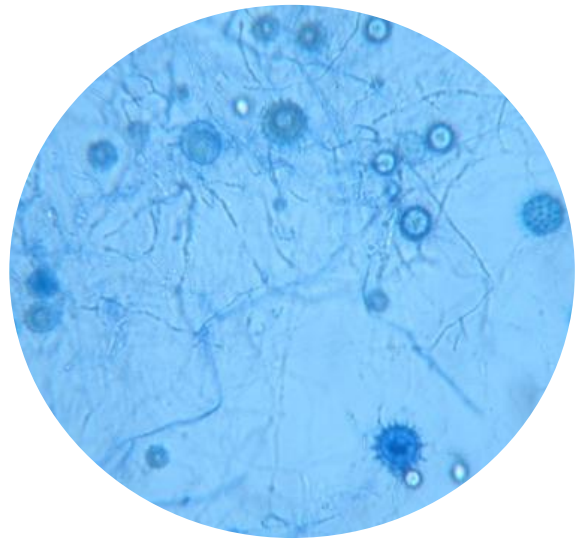


Figure 20 : Forme caractéristique de *Pythium oligandrum* observée au microscope (Gx100) (Marion TRIOLET, 2014)



Figure 21 : Culture de *Trichoderma asperellum* avec développement de champignons secondaires (Marion TRIOLET, 2014)



Figure 22 : Colonie de *Trichoderma asperellum* sur milieu gélosé PDA (De los Santos-Villalobos, 2012)

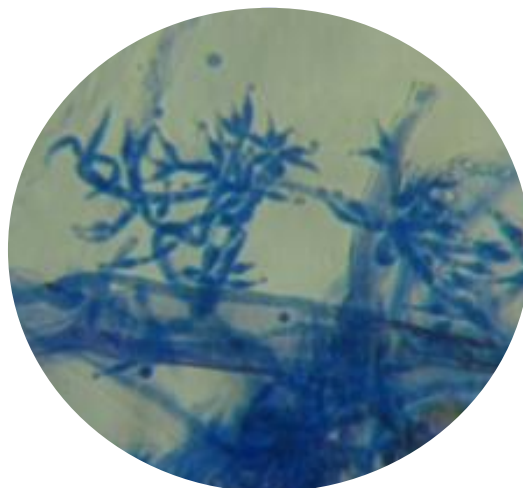


Figure 23 : Observation de *Trichoderma asperellum* au microscope (Gx100) (Marion TRIOLET, 2014)

### c) Lecture et comptage

#### *Pythium oligandrum*

La lecture des boîtes de Petri est réalisée 5 jours après la mise en culture. Le mycélium de *P. oligandrum* est translucide et rasant, cependant cela n'est pas suffisant pour l'identifier. L'identification se fait au microscope en observant les oospores de *P. oligandrum* qui sont caractérisées par leur forme échinulée (Figure 20). Une racine est considérée positive si autour de celle-ci au moins une oospore est présente. Grâce à cette méthode, la fréquence d'installation peut être déterminée.

#### *Trichoderma asperellum*

Le milieu PDA utilisé pour détecter *T. asperellum* n'est pas suffisamment sélectif de ce dernier. Ainsi de nombreux champignons secondaires se sont développés sur le milieu. C'est pourquoi, pour cet agent de biocontrôle, la fréquence d'installation n'a pas pu être déterminée. Par conséquent, seule la présence/absence de ce champignon a été notée. Le mycélium de cet agent de biocontrôle se caractérise par la formation de cercles concentriques verts et blancs (Figure 22) (De los Santos-Villalobos, 2012). Pour vérifier la présence de ce champignon, une observation microscopique (Figure 23) est faite en appui à l'observation morphologique. Ce suivi permet d'obtenir des informations de types qualitatives sur cet agent.

### 2.4.2. Analyses moléculaires

Parmi les prélèvements racinaires, une partie est utilisée pour les analyses microbiologiques et l'autre partie est stockée à -20°C pour les analyses moléculaires. L'ADN total des échantillons racinaires est extrait à partir d'un kit commercial Invisorb Spin Plant Mini Kit® d'INVITEK. Pour réaliser l'analyse de PCR quantitative des amorces spécifiques de *P. oligandrum* UpF1 et Lo146 sont utilisées (Tableau 3). Ces amorces amplifient une région répétée de l'ADN ribosomique incluant l'extrémité 3' du gène ARNr 18S, l'ITS 1, le gène ARNr 5.8S, l'ITS 2 et quelques paires de base de l'extrémité 5' du gène ARNr 28S.

#### a) Extraction d'ADN

Après broyage mécanique à l'aide d'un mortier et d'azote liquide, environ 60 mg de poudre de racines sont prélevés et placés dans un tube de 2mL. Le protocole d'extraction prévu par INVITEK (Annexe IV) recommande d'utiliser un tampon de lyse déjà prêt à l'emploi. Cependant pour diminuer la présence de contaminant, ce dernier a été supplémenté avec :

- du  $\beta$ -mercaptoéthanol, qui permet la réduction des ponts disulfures et la libération des protéines,
- du polyvinylpyrrolidone 40 (PVP 40) utilisé pour absorber les polyphénols.

En outre, l'ajout de ces produits a permis de supprimer l'étape d'incubation. La dernière modification de ce protocole a été de multiplier par deux les étapes de lavage.

Suite à cette extraction, la pureté ainsi que la quantité de l'ADN sont évaluées au Nanodrop® (ND-1000, ThermoScientific, Labtech Nanodrop), les échantillons sont ensuite stockés à -20°C avant utilisation. La quantification de l'ADN se fait par mesure de l'absorbance à 260 nm. La pureté, quant à elle, est évaluée en mesurant les rapports d'absorbance à 260/280 (contamination en protéines) et à 260/230 (contamination en molécules organiques (polyphénols)). Si la pureté est correcte, les valeurs des deux rapports doivent être supérieures à 1,8.

#### b) Amplification par Polymerase Chain Reaction

Les amplifications par PCR conventionnelle servent à vérifier la présence de l'agent de biocontrôle recherché avant de le quantifier par PCR quantitative.



Tableau 3 : Amorces et sondes fluorescentes utilisées pour la PCR Quantitative. (<sup>a</sup> Godfrey *et al.* (2003), <sup>b</sup> Le Floch *et al.* (2007), <sup>c</sup> Tambong *et al.* (2006)).

gène cible	nom	séquence	taille de l'amplicon
<i>P. oligandrum</i>	up F1 <sup>a</sup>	5'-TGCTTCGTCGCAAGACT-3'	
ITS	Lo 146 <sup>b</sup>	5'-CGTATTCGGAGTATAGTTCAGT-3'	124 pb
	142 LNA <sup>c</sup>	5'-FAM-AGTCTGCGTCTATTTGGA-BHQ1-3'	

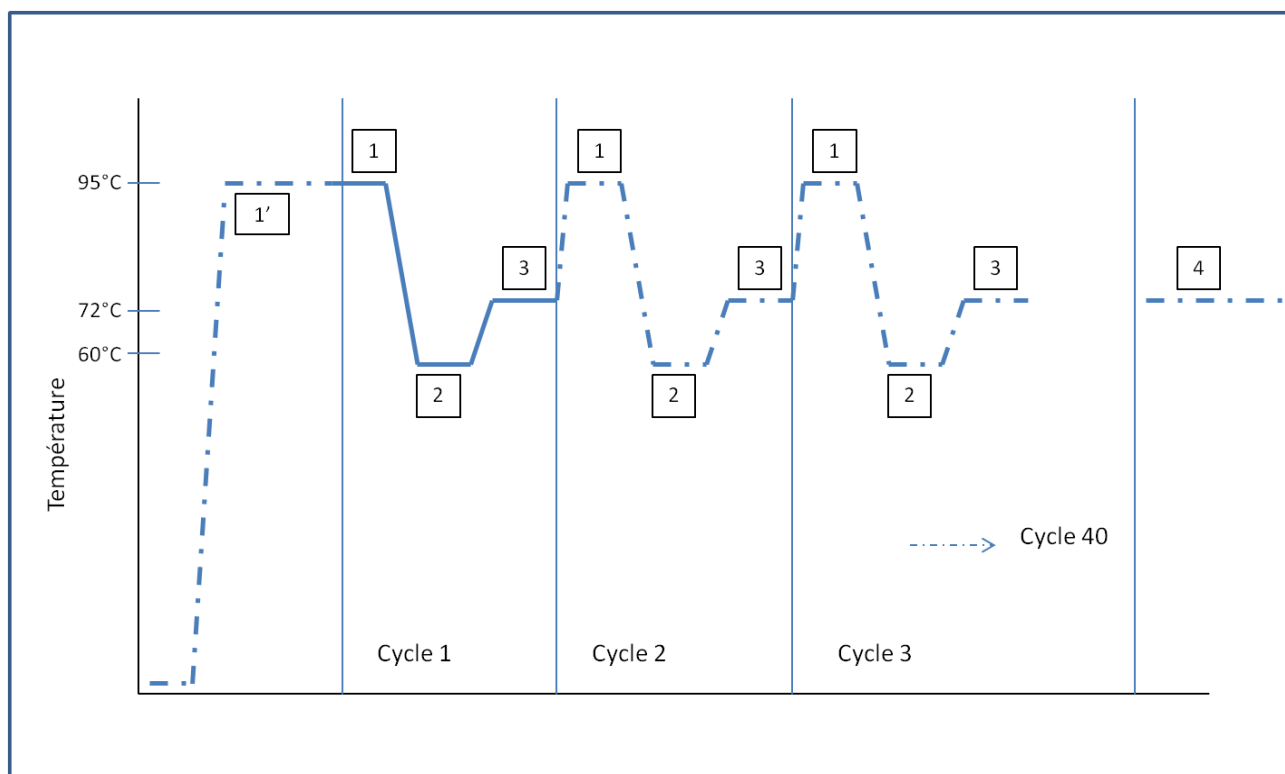


Figure 24 : Représentation du programme PCR utilisé lors de cet essai

La présence de *P. oligandrum* a été détectée avec les amorces spécifiques eucaryotes UpF1 et Lo146. Les amplifications par PCR conventionnelle sont réalisées dans un thermocycleur eppendorf (Mastercycler epgradient Eppendorf AG 22331 Hamburg) dans un volume réactionnel de 15 µL contenant 1 µL d'ADN à 10 ng/µL, 1,5 µL de tampon PCR 10X (Tris-HCl (pH=8,8), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% tween 20), 0,5 µL MgCl<sub>2</sub> à 50 mM, 0,3 µL dNTPs à 10 mM, 0,15 µL de chaque amorce (UpF1 et Lo146) à 20 µM, 0,05 µL de Sylvestar Taq et de l'eau stérile. Dans ce mélange réactionnel, il est ajouté 1,5 µL de BSA (Bovine Serum Albumine) à 10 ng/mL afin de supprimer l'action des inhibiteurs de PCR tels que les polysaccharides et les composés phénoliques extraits des racines en même temps que les ADN (Massot, 2011).

Une fois ce mélange réalisé, les échantillons sont placés dans le thermocycleur ayant le programme PCR suivant (Figure 24) : une dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C (1') suivie de 40 cycles comprenant une phase de dénaturation de 45 secondes à 95°C (1), une phase d'appariement des amorces de 45 secondes à 60°C (2) et une phase d'élongation de 1 minute 50 seconde à 72°C (3). Le dernier cycle de la PCR est dédié à l'élongation finale pendant 8 minutes à 72°C (4).

Les produits PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose pour vérifier l'efficacité de l'amplification.

### c) Quantification de la colonisation de *Pythium oligandrum* dans la rhizosphère des plants de *Dipladenia*, par PCR quantitative

Le jeu d'amorces utilisé est le même que pour réaliser la PCR conventionnelle, seule la sonde Taqman™ (=FAM 142 LNA) est ajoutée pour cette étape (Tableau 3).

Avant de lancer les amplifications de PCR quantitative, un mélange réactionnel de 25 µL est effectué. Ce mélange est fait en trois temps et il contient :

- 1) 12,5 µL de Quantitect Mix (Mix de chez Quiagen)
- 2) 0,5 µL de chaque amorce (UpF1, Lo146 et 142 LNA à 20 µM) et de 10 µL d'eau RNase Free
- 3) 2 µL d'ADN

Les amplifications sont faites à l'aide d'un thermocycleur Stratagene (Agilent Technologies Stratagene Mx3005pro), dont le programme en est le suivant: une dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C suivie de 40 cycles comprenant une phase de dénaturation (30 secondes à 94°C), une phase d'appariement des amorces (30 secondes à 60°C) et une phase d'élongation (30 secondes à 72°C). La fluorescence a été mesurée à chaque cycle, après l'étape d'élongation.

Deux contrôles sans ADN sont inclus comme contrôle négatif pour chaque paire d'amorces, ainsi qu'une gamme de dilution d'échantillons purs de la souche de *P. oligandrum* utilisée pour quantifier l'agent de biocontrôle. Cette gamme de dilution se fait de 10 en 10 à partir d'extraits d'ADN et débute à 58 ng/µL pour finir à 0,58 fg/µL. Les résultats ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel MixPro pour réaliser la courbe étalon nécessaire au calcul de la quantité d'ADN de *P. oligandrum* détectée dans l'échantillon. La courbe étalon permet également de vérifier l'efficacité (R<sup>2</sup>) de la gamme et la validation de l'analyse qPCR.

## 2.5. Observations et mesures au cours de l'essai

Des observations physiologiques et sanitaires sont faites régulièrement, afin de rendre compte des effets des produits testés sur, d'une part, la protection des plantes contre *Fusarium oxysporum* et d'autre part sur la stimulation du développement des plants.

### 2.5.1. Observation de la croissance des plants de *Dipladenia* – Etude quantitative

Pour mettre en évidence un effet potentiel des produits testés sur la croissance des plants, des mesures de hauteurs, allant du collet jusqu'à l'apex, sont réalisées régulièrement. Après l'empotage, 30 plants ont été



Figure 25 : Référentiel photographique pour la notation du développement racinaire établi en fonction du pourcentage de recouvrement racinaire de la périphérie des pots (Marion TRIOLET, 2014)



choisis au hasard et mesurés pour obtenir une taille moyenne à un temps T0. Par la suite, les lianes de *Dipladenia* sont coupées à chaque notation à hauteur de plants. Cette suppression des lianes fait partie de l'itinéraire de culture, c'est pourquoi il est nécessaire de l'effectuer. Les mesures de hauteur des plants sont faites en semaines 15, 17, 23 et 27.

### 2.5.2. Observation du développement racinaire des plants de *Dipladenia* – Etude qualitative

Pour évaluer la qualité du développement racinaire et ainsi déterminer si les produits testés ont un effet potentiel, des notations basées sur des observations visuelles des racines sont réalisées. Afin de statuer sur le pourcentage de recouvrement racinaire du substrat en périphérie du pot, des classes sont définies. Ainsi, six classes (Figure 25) comprenant différents pourcentages de recouvrement sont utilisées. Ces états racinaires sont effectués en semaines 19, 25, 29 et 33.

### 2.5.3. Observation des symptômes sur les plants de *Dipladenia* – Etude qualitative

Suite à l'inoculation, en semaine 25, les plants sont observés toutes les semaines au niveau foliaire afin de repérer les symptômes causés par *Fusarium oxysporum* et de différencier ceux causés par d'autres pathogènes/ravageurs ou par un stress quelconque.

Chaque plant présentant des symptômes (jaunissement, chute des feuilles, nécroses) est référencé et comptabilisé.

### 2.5.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel R et Statbox. Les données obtenues en serre (croissance en hauteur) et les données obtenues en laboratoire (installation de *P. oligandrum*, résultats des qPCR...) subissent un traitement différent.

Les comparaisons entre les modalités sont effectuées par analyses de variance (ANOVA) pour les données obtenues en serre. Les données obtenues en laboratoire sont traitées grâce au test de Kruskal Wallis (non paramétrique).

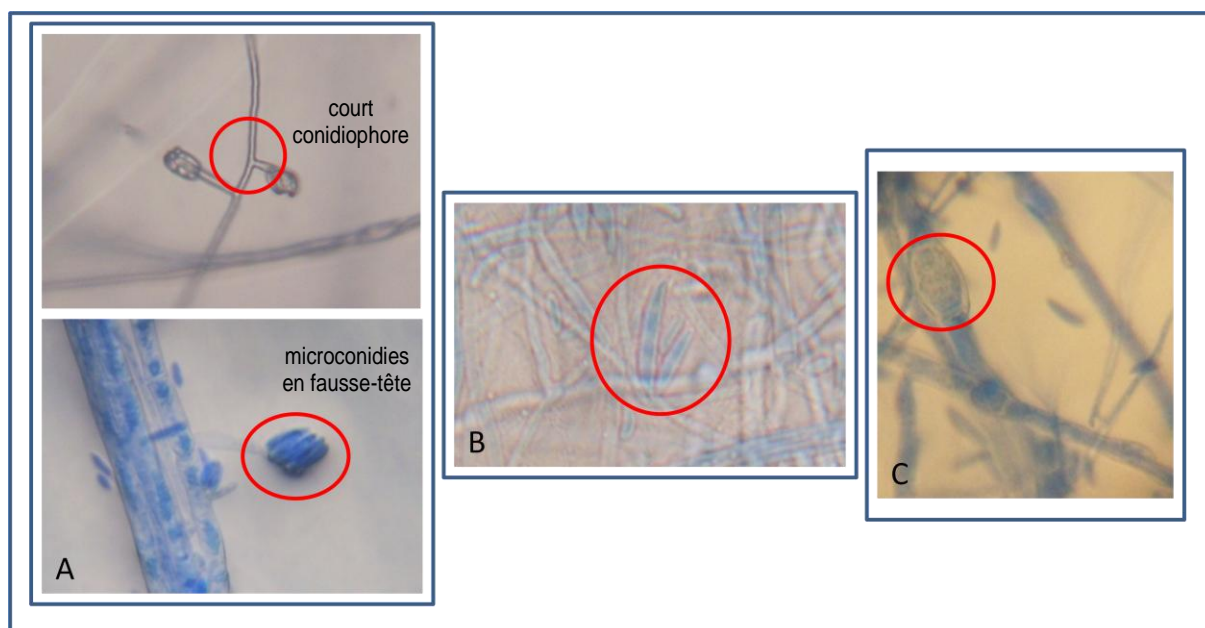


Figure 26 : Observation microscopique d'organes fongiques permettant l'identification de *F.oxysporum* tels que : (A) microconidies en fausse-tête et les courts conidiophores (x200), (B) macroconidies en faucille (x400) et (C) chlamydospores (X100) (Marion TRIOLET, 2014)

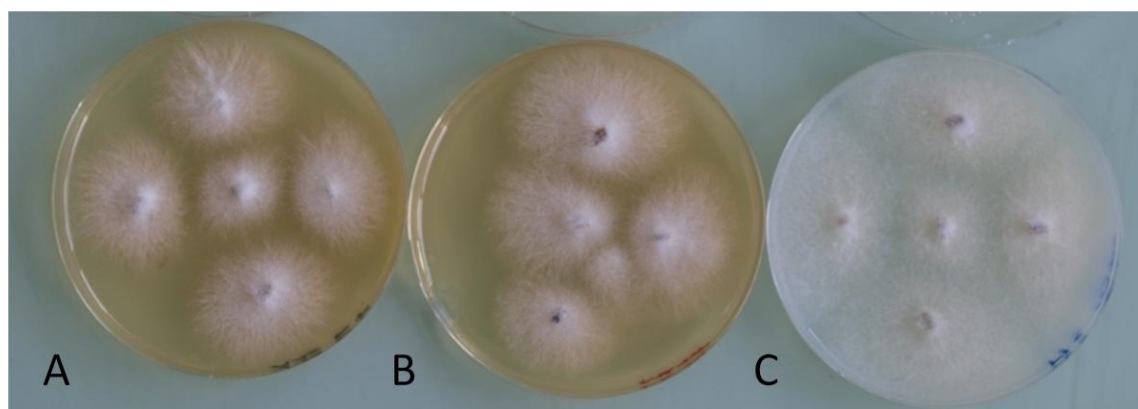


Figure 27 : Cultures pures de *F. oxysporum* responsable du dépérissement des plants de *Dipladenia*. Isolement sur milieux MA (A), MAC (B) et MS (C) à partir d'explants de tige. (Marion TRIOLET, 2014)



Figure 28 : Culture pure sur milieu MAC de *F. oxysporum* après réisolement de l'agent causal lors du Postulat de Koch. (Adapté de Darles, 2013)

# RESULTATS

---

## I. Caractérisation de la souche de *Fusarium* utilisée

### 1.1. Identification microbiologique de l'agent pathogène

L'isolement effectué à partir des plantes symptomatiques de l'essai 2013 et l'observation microscopique ont mené au diagnostic de fusariose, cependant l'espèce de *Fusarium* reste à déterminer. De ce fait, des analyses microbiologiques basées sur l'aspect des conidies sont réalisées. En effet, l'espèce *F. oxysporum* est la seule de son genre dont les conidies présentent des caractéristiques morphologiques, dispensant ainsi d'une analyse moléculaire.

Les résultats présentés ci-dessous sont le fruit de l'analyse microbiologique effectuée au laboratoire LDA33 suivant la clé d'identification fournie par l'ANSES (Annexe III) L'observation s'est faite sur milieu PDA.

- Observation du mycélium : mycélium aérien très abondant blanc et cotonneux
- Milieu sous la culture : coloré et présentant un gradient centrifuge de pourpre à incolore
- Observation des spores asexuées :
  - (i) microconidies plutôt réniformes, souvent regroupées en amas. Ces microconidies ont pour dénomination microconidies en fausse-tête (Figure 26 (A))
  - (ii) conidiophores très courts voire invisible dans certains cas. Ce conidiophore porte les microconidies en fausse-tête, le tout est relié à l'hyphe végétatif (Figure 26 (A))
  - (iii) macroconidies ont une forme de faucille (Figure 26 (B))
  - (iv) chlamydospores (Figure 26 (C)) présentes mais peu abondantes contrairement à ce que l'ANSES établit dans sa clé d'identification sur milieu SNA. Les milieux utilisés étant différents, l'abondance des chlamydospores peut varier.
  - (v) sporodochia : absentes. Cette absence peut être expliquée par l'utilisation d'un milieu PDA à la place d'un milieu SNA.

Tous ces éléments confirment que les symptômes de fusariose observés ont bien été causés par l'espèce *F. oxysporum*.

### 1.2. Confirmation du Postulat de Koch

Suite à la mise en culture des différents fragments (racines, racines tubérisées et tiges) des plants malades issus de l'essai 2013, sur trois milieux de culture (MA, MAC et MS), un mycélium identique à celui de *F. oxysporum* est observé (Figure 27).

Tous les explants de tiges, racines et racines tubérisées malades développent sur les milieux un mycélium aérien pur de *F.oxysporum*. En outre, l'observation microscopique des spores asexuées confirme la présence de l'espèce de *F. oxysporum*.

L'inoculation des plants sains avec un inoculum préparé à partir des colonies pures de l'agent causal *F. oxysporum*, provoque des dépérissements de plantes, cependant, seuls 4 plants sur 8 montrent des symptômes entre trois à sept semaines après l'inoculation.

Au total une vingtaine d'explants sont prélevés à partir des racines et des tiges de ces 4 plants et déposés sur milieu MS et MAC. Au final, 100% d'entre eux ont produit un mycélium identique (Figure 28) à celui qui a servi à les inoculer.

Grâce à ces résultats, le Postulat de Koch a établi la relation de causes à effets entre la souche inoculée et les symptômes générés. En outre, la pureté de l'inoculum et l'efficacité de la méthode d'inoculation sont confirmées. Bien que la forme spéciale de cette souche ne soit pas encore établie, il est d'ores et déjà possible d'émettre la forte hypothèse qu'elle est à l'origine d'une fusariose vasculaire puisque la souche inoculée au niveau des racines peut être ré-isolée quelques semaines plus tard au niveau des tiges (cf. Postulat de Koch).

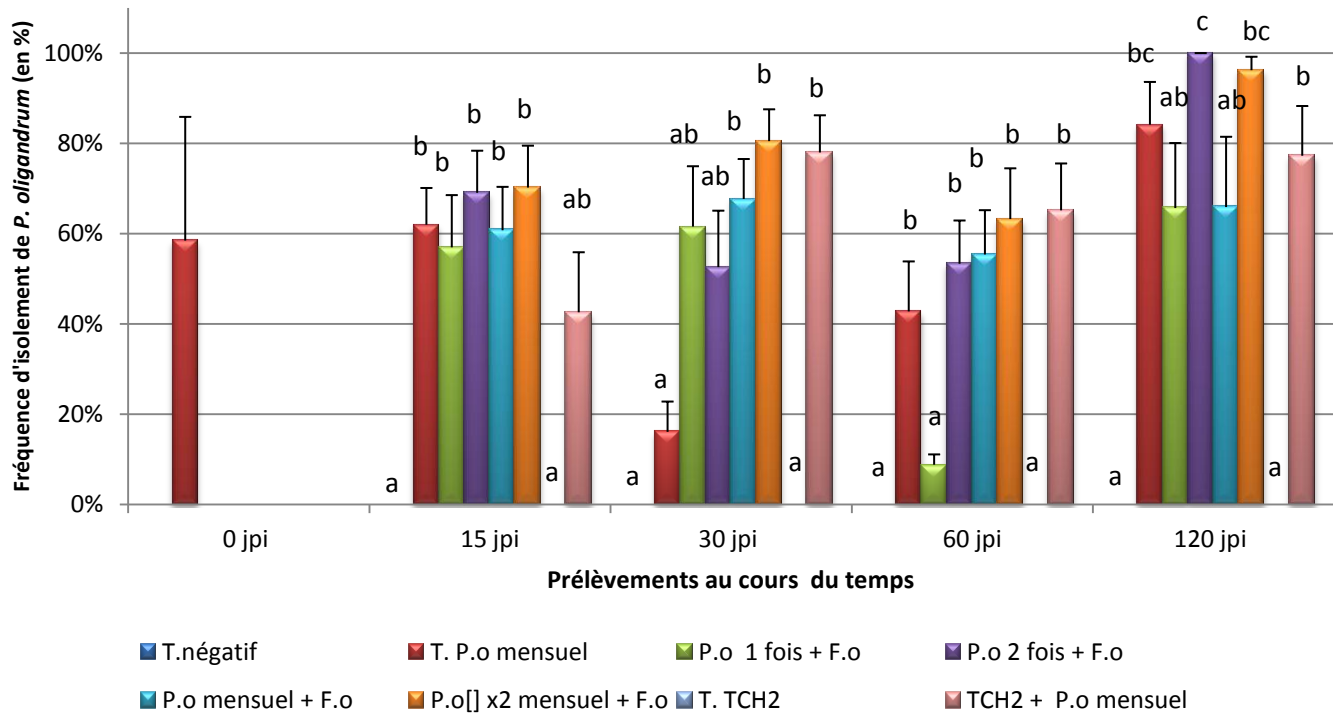


Figure 29: Fréquence d'installation de *P. oligandrum* dans la rhizosphère des plants de *Dipladenia* au cours du temps selon différents traitements.

Légende : Jpi= jours post inoculation ; T= témoin ; P.o= *Pythium oligandrum* ; F.o= *Fusarium oxysporum* ; [x2= concentration double ; TCH2= nouveau substrat

Les variables sont exprimées en fréquence moyenne d'isolements. Les données avec des lettres différentes sont significativement différentes à  $p < 0,05$  (Test de Kruskal-Wallis)

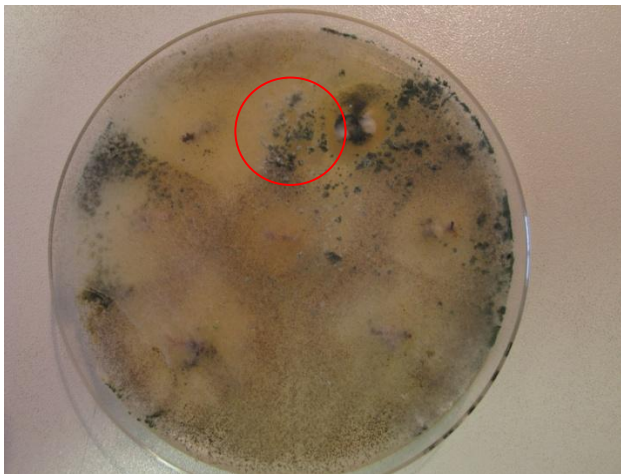


Figure 30 : Développement de diverses colonies dont *T. asperellum* sur milieu PDA (Marion TRIOLET, 2014)  
Entouré en rouge : développement caractéristique du mycélium vert et blanc de *T. asperellum*

## II. Détection des agents de biocontrôle dans la rhizosphère des *Dipladenia*

### 2.1. Analyse microbiologique de la colonisation racinaire des plants de *Dipladenia* par *P. oligandrum*

Afin d'évaluer la capacité d'implantation et de persistance de *P. oligandrum* dans la rhizosphère, des prélèvements de racines sont régulièrement réalisés (Figure 29). L'étude de la fréquence d'isolement de *P. oligandrum* (Figure 29) montre qu'il est détecté en moyenne à 50% dans rhizosphère des plants de *Dipladenia* quel que soit le substrat ou les modalités d'apport étudiées. Les taux de colonisation les plus élevés sont observés pour les modalités « T.P.o mensuel + F.o », « P.o 2 fois » et « P.o [ ]x2 mensuel » à 120 jpi avec respectivement 84 et 100 et 96 % de fréquence d'isolement. Au début de l'expérimentation (0 jpi), le taux de colonisation après inoculation de *P. oligandrum* est de 58%. Le plus faible taux de colonisation, moins de 10%, est obtenu lorsque *P. oligandrum* est apporté une seule fois (« P.o 1 fois »). Pour la modalité « TCH2 + P.o mensuel », les taux de colonisation sont similaires aux autres, sans différence statistiquement significative. De même au sein de chaque modalité, il n'y a pas de différence statistiquement significative de la fréquence d'isolement de *P. oligandrum* au cours du temps (entre 0 et 120 jpi), à l'exception de la modalité « P.o 2 fois ».

A 120 jpi, les modalités « P.o 2 fois » et « TCH2 + P.o mensuel » montrent une différence statistiquement significative.

Les différences significatives ou non sont appuyées par la réalisation du test de Kruskal-Wallis au risque de 5%.

### 2.2. Analyse microbiologique de la colonisation racinaire des plants de *Dipladenia* par *T. asperellum*

L'installation du micro-organisme *T. asperellum* est suivie en effectuant des prélèvements identiques à ceux faits pour *P. oligandrum*. Les prélèvements déposés sur milieu PDA donnent des colonies diverses avec un développement trop important (Figure 30) pour déterminer un taux d'installation. Ainsi, au moment de la lecture des boîtes il a été décidé d'effectuer une simple présence ou absence de l'agent de biocontrôle.

Les trois prélèvements effectués à 30 jpi, 60 jpi et 90 jpi, révèle bien la présence de *T. asperellum* sur l'ensemble des boîtes. Par conséquent, l'implantation et la colonisation de *T. asperellum* dans la rhizosphère des plants de *Dipladenia* semble être réussie.

### 2.3. Analyses moléculaires de la colonisation racinaire des plants de *Dipladenia* par *P. oligandrum*

La colonisation de *P. oligandrum* chez *Dipladenia* est quantifiée par PCRq pour les modalités « T. négatif », « T. P.o mensuel », « P.o mensuel + F.o » et « P.o [ ]x2 mensuel ».

Pour réaliser cette analyse, une gamme étalon est utilisée à partir d'échantillons d'ADN purs de *P. oligandrum* dont la concentration est connue. La figure 31 montre un exemple de gamme étalon obtenue. Cette gamme étalon sert à vérifier et à valider la qualité de l'analyse par PCRq par un R<sup>2</sup> de 0,99 (forte corrélation entre le cycle seuil mesuré et la quantité d'ADN de *P. oligandrum*).

La courbe étalon montre un seuil de détection allant jusqu'au fg/μL d'ADN de *P. oligandrum*.

La figure 32 montre que *P. oligandrum* est bien présent dans les modalités biotisées en plus ou moins grande quantité suivant les traitements. Le jour de la première inoculation (0 jpi), 93 pg/ μL d'ADN de *P. oligandrum* sont détectés. Au prélèvement suivant (15 jpi), les quantités augmentent significativement pour les deux modalités suivies, « P.o mensuel + F.o » et « P.o [ ]x2 mensuel + F.o » avec respectivement 230 et 310 pg/μL. Les différences entre les deux modalités ne sont pas statistiquement significatives. Les quantités d'ADN de *P. oligandrum* détectées à 30 et 60 jpi chutent pour atteindre en moyenne, 40 pg/μL. A 60 jpi la quantité d'ADN détectée pour la modalité P.o [ ]x2 mensuel » (100 pg/μL) est significativement supérieure à la modalité « P.o 1 fois + F.o » (10 pg/μL).

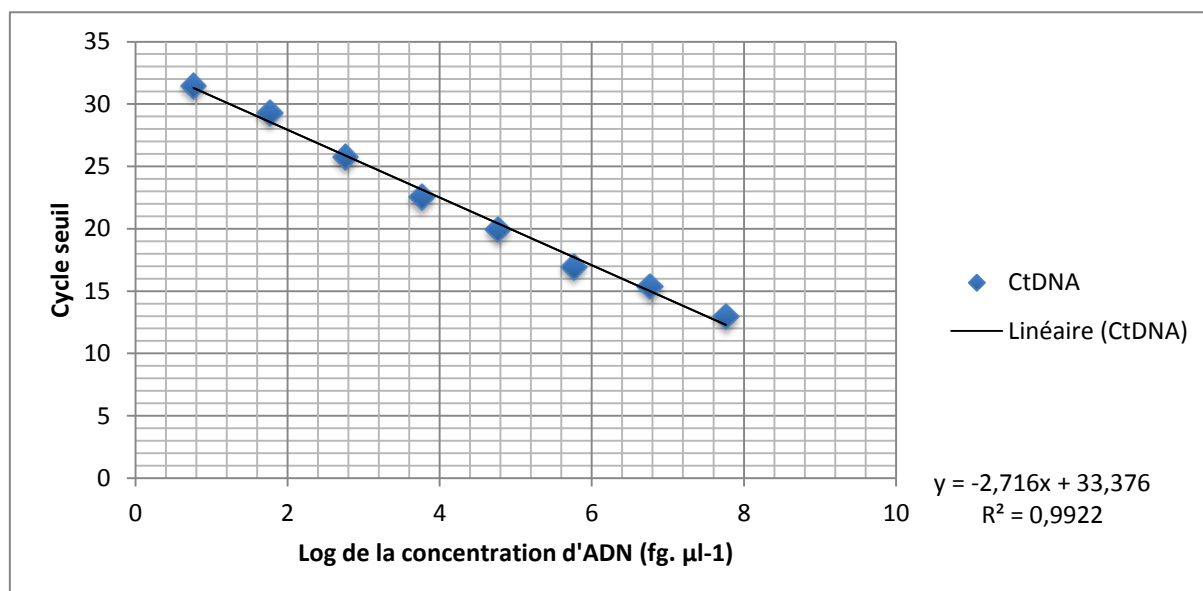


Figure 31 : Courbe standard utilisée pour la quantification de l'ADN cible de *P. oligandrum* en PCR quantitative

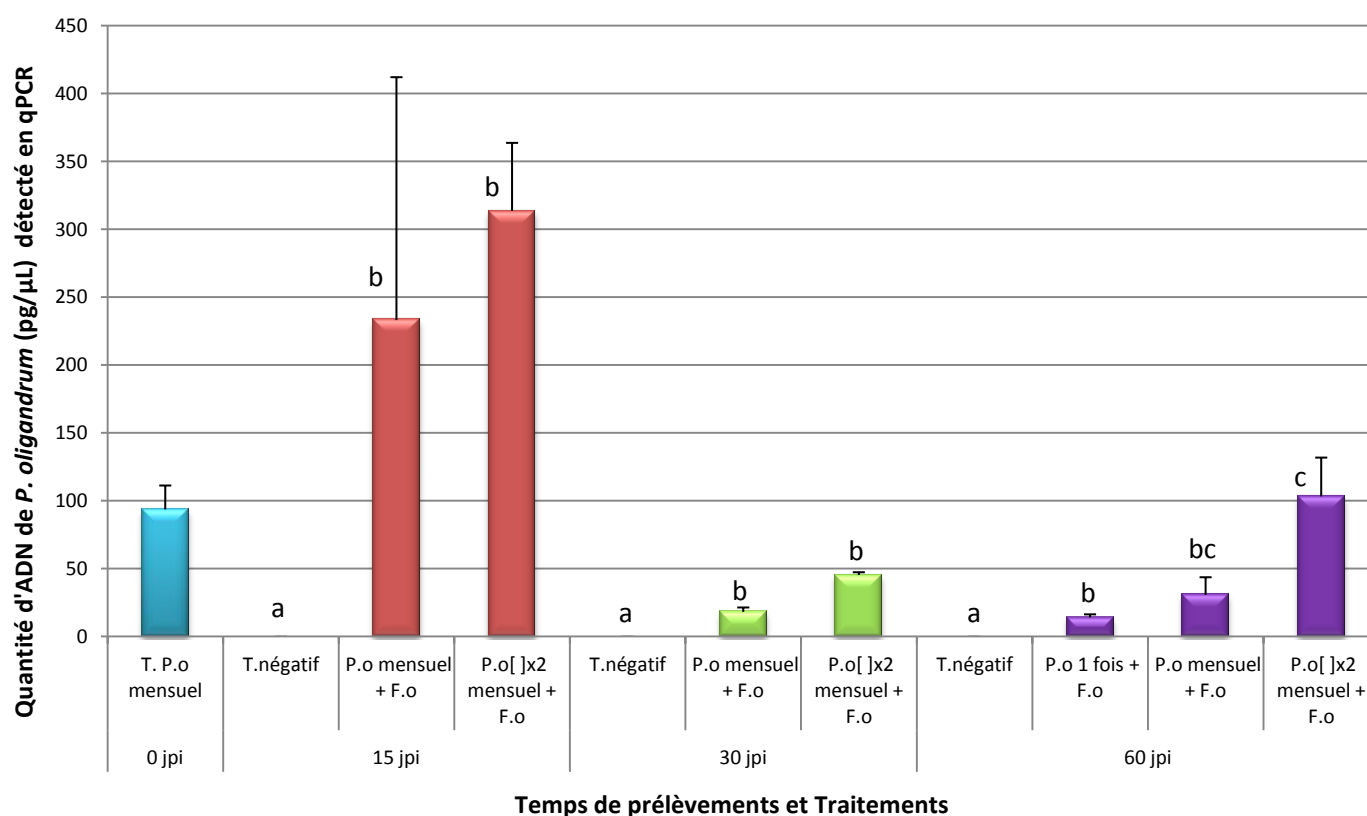


Figure 32 : Evaluation de la colonisation de *P. oligandrum* dans la rhizosphère des plants de *Dipladenia*, évaluée par PCR quantitative

Légende : jpi= jours post inoculation ; T= témoin ; *P.o*= *Pythium oligandrum* ; *F.o*= *Fusarium oxysporum* ; [ x2= concentration double. Les variables sont exprimées en quantités moyennes d'ADN de *P. oligandrum*. Les données avec des lettres différentes sont significativement différentes à  $p < 0,05$  (Test de Kruskal-Wallis)



## 2.4. Résultats de l'effet des agents de biocontrôle sur le développement aérien et racinaire des plants de *Dipladenia*

Dans ce paragraphe, les modalités « T. TCH2 » et « TCH2 + *P.o* mensuel » sont traitées ensemble et indépendamment des autres modalités. La modalité « Xedavir » est comparée à la modalité « T. négatif ».

### 2.4.1. Développement aérien

La hauteur moyenne des plants de *Dipladenia* est réalisée en semaine 15 et est représentée par la droite horizontale sur la figure 33. Suite à cette mesure, la hauteur des plants est mesurée en semaine 17 afin d'observer les premiers effets potentiels des agents de biocontrôle.

**En semaine 17**, les deux modalités témoins « T. négatif » et « T. *P.o* mensuel » sont significativement différentes (ANOVA). Cependant, ces deux témoins ne sont pas significativement différents de toutes les autres modalités (de la modalité « T. inoculé *F.o* » à la modalité « *P.o* [ ] x2 mensuel »).

Les modalités « T. TCH2 » et « T. TCH2 + *P.o* mensuel » ne présentent aucune différence significative entre elles. La modalité « Xedavir » quant à elle est différente de la modalité « T. négatif ».

**En semaine 23**, deux groupes se distinguent. Le groupe 'b' avec les modalités « T. négatif » et « T. apport *P.o* mensuel » et le groupe 'a' avec les modalités allant de « T. inoculé *F.o* » à « Apport *P.o* c° ≠ mensuel ». Les modalités de ces deux groupes sont donc différentes entre elles.

**En semaine 27**, les modalités « T. négatif » et « T. *P.o* mensuel » montre des différences significatives avec les modalités « T. fongicide », « *P.o* 1 fois » et « *P.o* [ ] x2 mensuel ». Les modalités « T. inoculé *F.o* », « *P.o* 2 fois » et « *P.o* mensuel » ne se distinguent pas des autres modalités.

Les modalités « T. TCH2 » et « T. TCH2 + *P.o* mensuel » ne présentent aucune différence significative entre elles.

La modalité « Xedavir » quant à elle, est différente de la modalité « T. négatif ».

### 2.4.2. Développement racinaire

Quatre notations sont menées en cours d'essai, afin de mettre en évidence l'évolution du développement du système racinaire. Parmi, celles-ci, seules celles effectuées en semaine 19 et semaine 34 sont décrites.

La première notation est réalisée trois semaines après l'empotage (**semaine 19**), afin de permettre aux racines de se développer et de coloniser le substrat. Ainsi, au regard de la figure 34, il est possible d'observer un réel détachement de la modalité « 1 fois *P.o* + *F.o* » par rapport à toutes les autres modalités. En effet, cette modalité contient le plus de plantes recensées en classe 2 et aucune en classe 0. Le système racinaire est en conséquence plus avancé à cette date. Il est à noter que la modalité « T. négatif » ressort de par son faible enracinement avec plus de 70% des plants recensés en classe 1. Toutes les autres modalités sont assez similaires entre elles.

Les modalités « T. TCH2 » et « T. TCH2 + *P.o* mensuel » ne présentent aucune différence entre elles. Ces modalités semblent posséder plus de plants figurant en classe 0. Inéluctablement à cette date, ce nouveau substrat TCH2 ne semble pas procurer un développement optimal du système racinaire.

La modalité « Xedavir » quant à elle, est différente de la modalité « T. négatif ». C'est la modalité qui comporte le plus de racines développées car possède des plants de classe 3 (classe maximale à cette date)

La figure 35 représente les résultats obtenus en **semaine 34**. Cette notation est la dernière réalisée sur l'essai. Celle-ci est menée 9 semaines après l'inoculation des plants par le pathogène *F. oxysporum*. La présence du pathogène, ne semble en rien affecter le développement racinaire. En effet la modalité « *P.o* 1 fois » a conservé son avance. Elle comporte 40% des plants de classe 6 (classe maximale à cette date). Les modalités « T. négatif » et « T. *P.o* mensuel » ne montrent aucune différence entre elles et la modalité « T. négatif » se démarque toujours des autres modalités par un système racinaire relativement peu développé et des plants très hétérogènes.



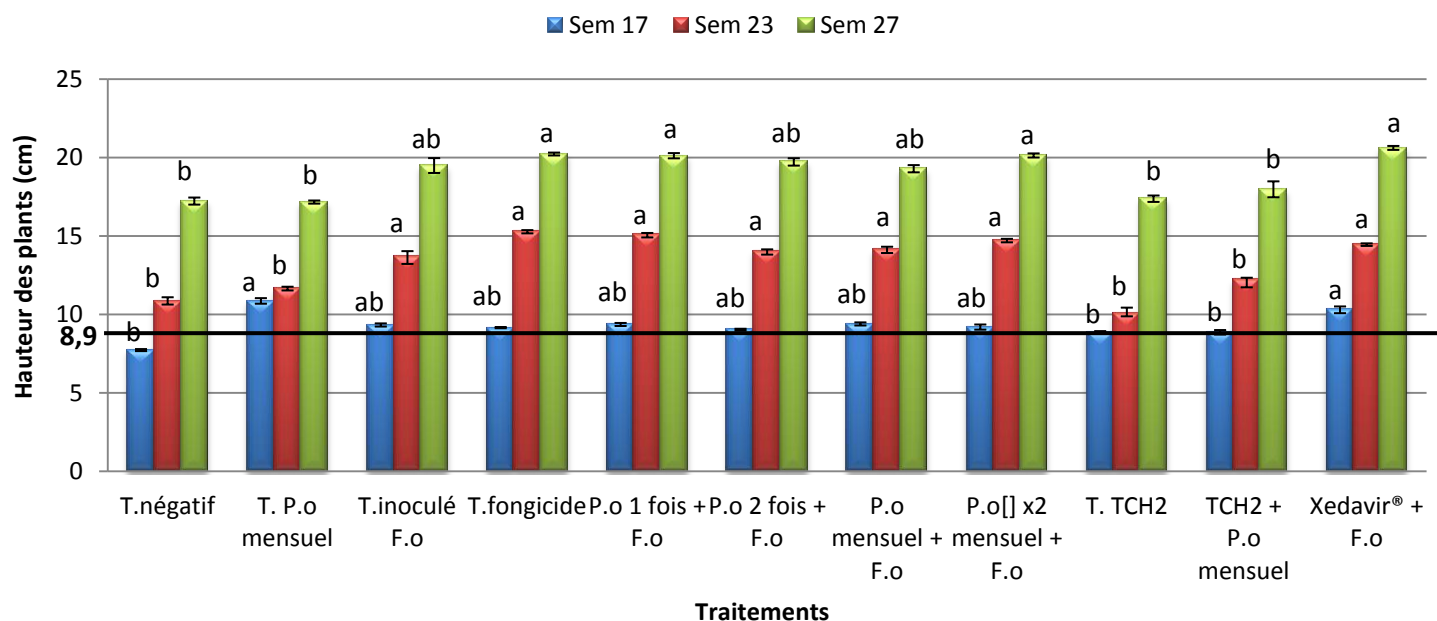


Figure 33 : Evaluation de l'effet des micro-organismes sur le développement aérien des plants de *Dipladenia*

Légende : T= témoin ; P.o= *Pythium oligandrum* ; F.o= *Fusarium oxysporum* ; []x2= concentration double.

Les variables sont exprimées en hauteurs moyennes. Les données avec des lettres différentes sont significativement différentes à  $p < 0,05$  (Test de Kruskal-Wallis)

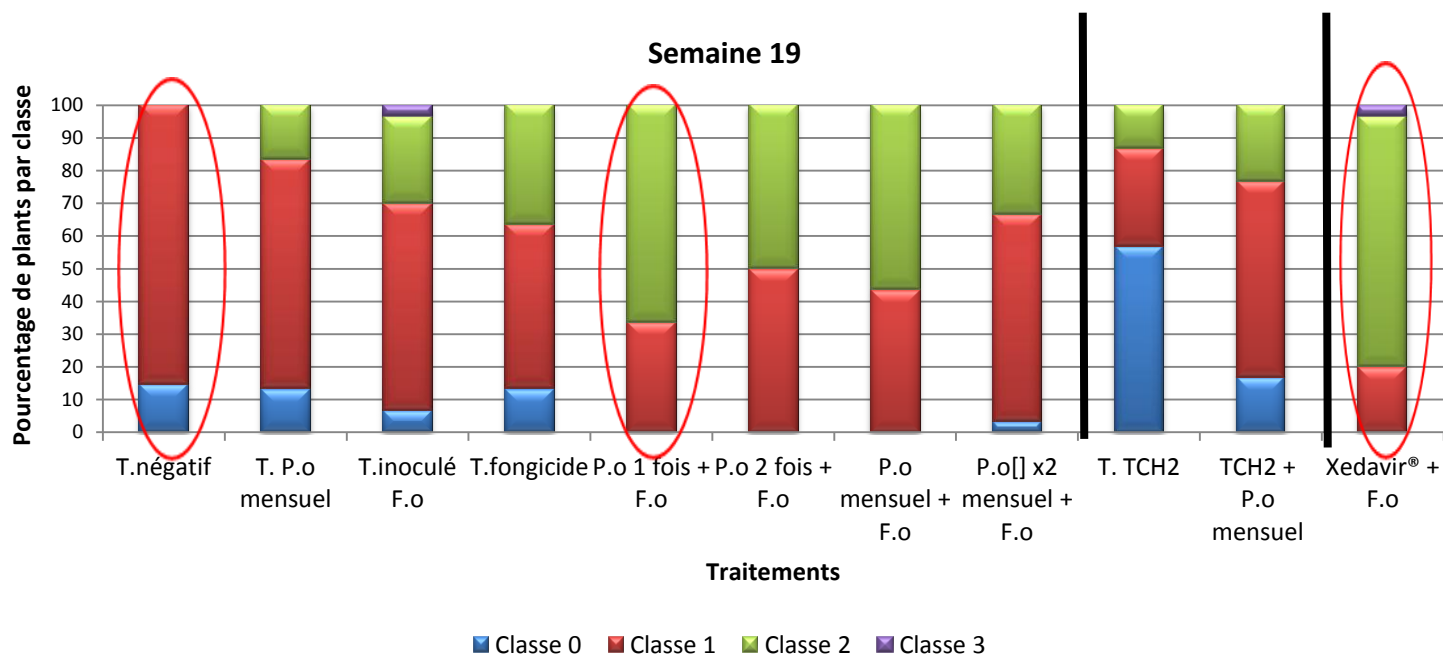


Figure 34 : Evaluation de l'effet des micro-organismes sur le développement du système racinaire des plants de *Dipladenia* en semaine 19

Légende : T= témoin ; P.o= *Pythium oligandrum* ; F.o= *Fusarium oxysporum* ; []x2= concentration double.

Les autres modalités sont très proches les unes des autres et aucune différence ne transparaît. Les modalités « T. TCH2 » et « T. TCH2 + *P.o* mensuel » n'évoluent pas depuis la première notation, cependant la modalité contenant *P. oligandrum* semble posséder plus de plants recensés en classes supérieures en comparaison avec son témoin (60% de classe 5 et 30% de classe 5 respectivement). Il est possible d'imaginer un impact de *P. oligandrum* au niveau de l'enracinement au sein de ce substrat. Par ailleurs, la modalité Xedavir qui jusque-là présentait des résultats intéressants s'avère ne pas être trop différente des modalités contenant l'agent de biocontrôle *P. oligandrum*. Cependant, comparé à la modalité « T. négatif », une différence est tout de même observée. La modalité « Xedavir » possède plus de 80% de classe 5. Ce produit peut jouer un rôle utile pour favoriser développement racinaire.

### III. Etat sanitaire des plants de l'essai

Au cours de l'essai, différents plants de *Dipladenia* sont morts suite aux nombreux prélèvements effectués. Une analyse sanitaire au LDA33 a permis de révéler la présence de *F. oxysporum*. Ainsi, il apparaît que cet agent pathogène est présent naturellement dans la serre. Les différents prélèvements effectués ont causé une blessure au niveau des racines entraînant une porte d'entrée du champignon. En outre, au début de l'essai, les jeunes plants de *Dipladenia* possédaient des taches foliaires rougeâtres. Les feuilles tachées ont été supprimées, cependant ces symptômes sont revenus. Ces taches prises pour des œdèmes étaient en fait des symptômes dû à une bactérie *Pseudomonas savastanoi* couramment rencontrée sur des plantes de la même famille tel que le laurier rose. Cette bactérie a été identifiée en 2012 par l'ANSES. Ainsi, une perte de plants assez importante a été constatée avant même l'inoculation de l'agent pathogène *F. oxysporum*.

### IV. Effets des microorganismes dans la lutte contre *Fusarium oxysporum*

Neuf semaines (semaine 25) après le début de l'essai, les plants de *Dipladenia* de chaque modalité, sauf les témoins exclus, sont inoculés avec l'agent pathogène *F. oxysporum*. Deux semaines après l'inoculation, les premiers symptômes de fusariose apparaissent sur un plant. Le diagnostic visuel des symptômes ainsi que l'isolement de la souche responsable permet de confirmer la présence de *F. oxysporum*. Ainsi, le pathogène inoculé est bien retrouvé. Cependant, suite aux résultats présentés par la figure 36, la pression fongique attendue n'est pas celle espérée. En effet, dix semaines après l'inoculation, le nombre d'apparition de symptômes est très faible voire nul. De sorte qu'en semaine 35, aucun des plants des témoins exclus « T. négatif », « T. *P.o* mensuel », « TCH2 » et « TCH2 + *P.o* mensuel » ne montre de symptômes de fusariose. Le témoin inoculé avec *F. oxysporum* présente environ 7% des plantes infectées ce qui est un peu moins que les modalités biotisées en préventif. En effet, les modalités « 1 fois *P.o* + *F.o* » et « 2 fois *P.o* + *F.o* » possèdent le plus de plantes avec symptômes.

Le témoin fongicide apporte une amélioration vis-à-vis de la lutte contre la fusariose, cependant aucune conclusion ne peut être faite car les modalités « *P.o* [ ]x2 mensuel + *F.o* » et « Xedavir » n'ont pour le moment développées aucun symptôme.

Le taux de contamination semble donc relativement faible même après dix semaines suivant l'inoculation.

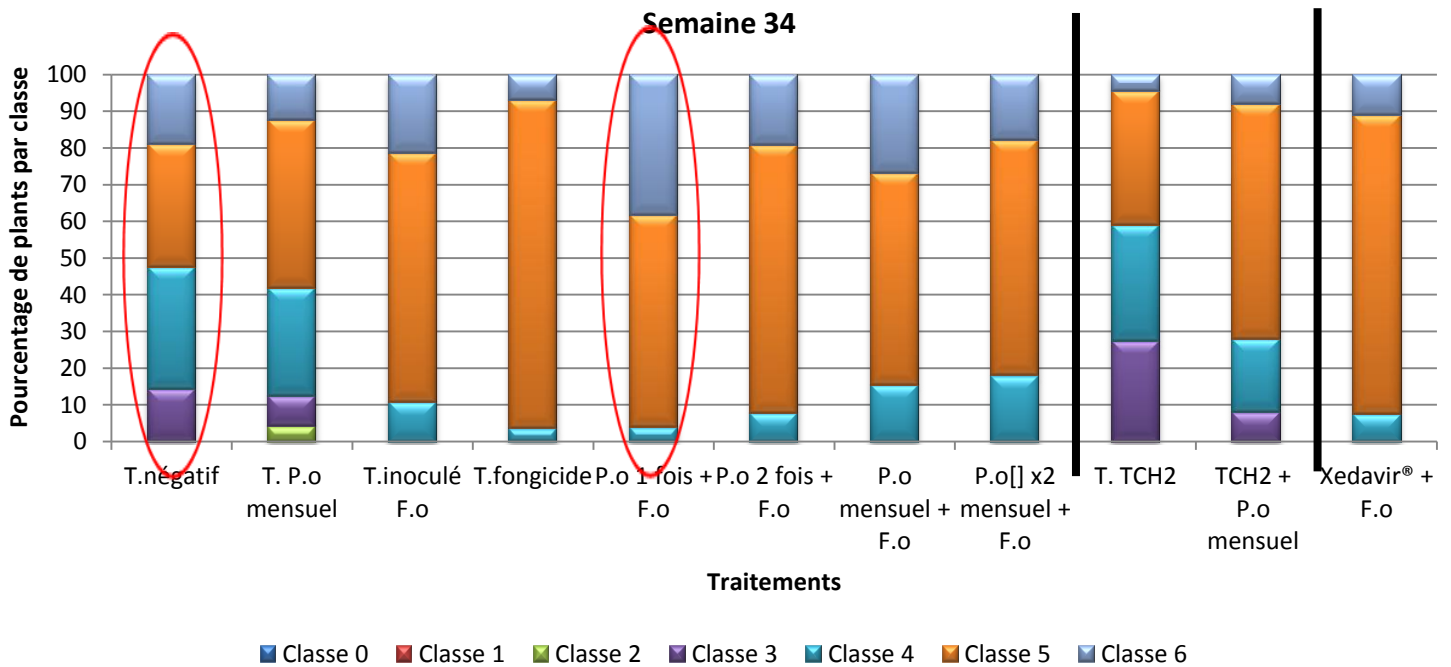


Figure 35 : Evaluation de l'effet des micro-organismes sur le développement du système racinaire des plants de *Dipladenia* en semaine 34  
Légende : T= témoin ; P.o= *Pythium oligandrum* ; F.o= *Fusarium oxysporum* ; [] x2= concentration double.

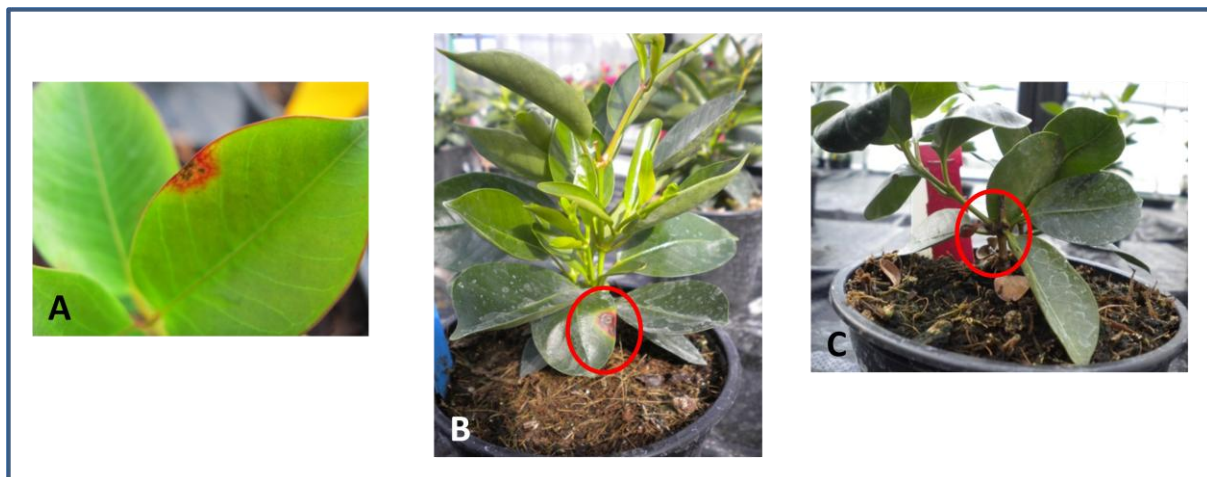


Figure 36 : Evolution des symptômes causés par la bactérie *Pseudomonas savastanoi*  
(A) et (B) Taches foliaires auréolées de rouge, (C) Eclatement de la tige. (Marion TRIOLET, 2014)

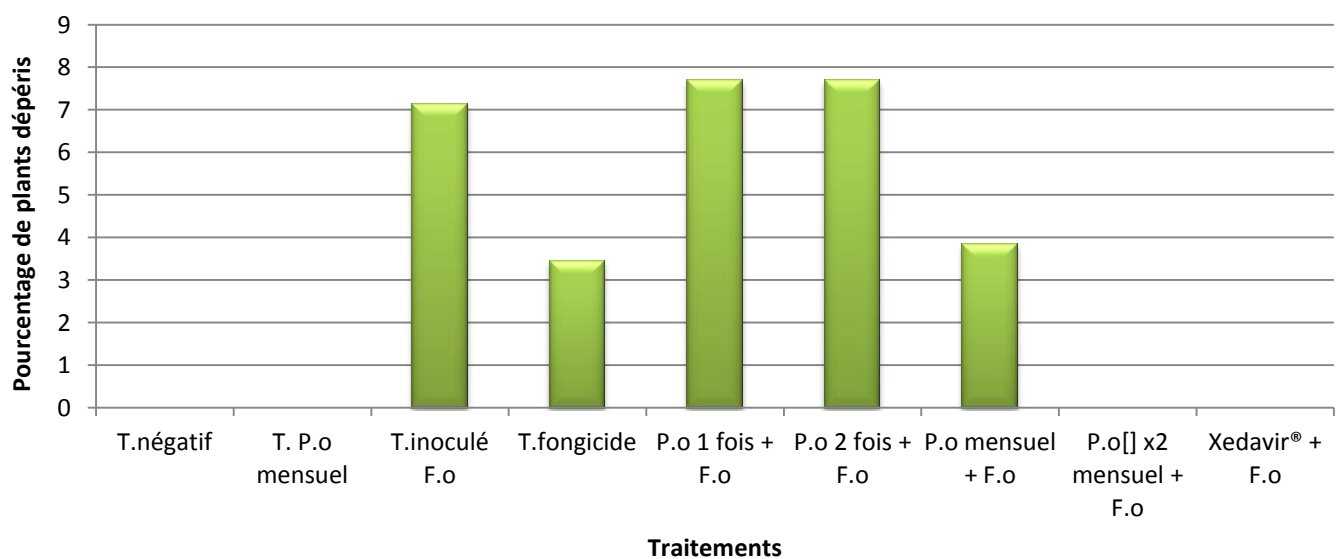


Figure 37 : Evaluation de la contamination des plants de chaque modalité par la fusariose

## DISCUSSION

---

Dans le contexte socio-économique actuel, le développement de méthodes alternatives pour la protection des végétaux devient de plus en plus nécessaire. C'est dans ce contexte que s'inscrit l'étude sur l'utilisation de micro-organismes potentiellement « bénéfiques » pour les plantes. Afin de développer une méthode de lutte biologique contre la fusariose du *Dipladenia*, un essai sous serre est actuellement conduit avec deux agents de biocontrôle, un oomycète *P. oligandrum* et une préparation commerciale Xedavir à base de *T. asperellum*. Pour qu'un effet protecteur soit obtenu, une condition essentielle est que les agents de biocontrôle colonisent et persistent dans la rhizosphère du végétal à protéger.

La capacité des agents de biocontrôle à s'installer durablement dans la rhizosphère des plants de *Dipladenia* est étudiée ainsi que les effets « bénéfiques » et la protection contre l'agent pathogène *F. oxysporum*.

La colonisation dans le temps par les agents microbiens est suivie selon une approche (i) de microbiologie classique (réalisation d'isolement sur milieu de culture) et (ii) de biologie moléculaire (PCR quantitative).

Les résultats des analyses microbiologiques classiques montrent que les deux micro-organismes étudiés, *P. oligandrum* et *T. asperellum* sont fréquemment détectés dans la rhizosphère des plants de *Dipladenia*. Les niveaux de colonisation de *P. oligandrum* sont plus précisément étudiés par analyse de la fréquence d'isolement de fragment racinaire.

L'implantation de *P. oligandrum* s'avère être homogène pour toutes les modalités au cours du temps (de 0 jpi à 60 jpi). Les différents traitements appliqués, y compris la modalité avec une double concentration de *P. oligandrum*, ne montrent aucune différence significative. L'apport d'une double dose ne permet pas une meilleure implantation de l'agent de biocontrôle. Les interactions dans un environnement complexe sont nombreuses, à la fois au niveau biotique et abiotique, impliquant une compétition pour l'espace et les nutriments qui influence l'installation d'un agent de biocontrôle (Gerbore *et al.* 2013). Dans nos conditions expérimentales une seule application de *P. oligandrum* ne semble pas limitant pour une bonne implantation. Néanmoins, la modalité où *P. oligandrum* est apporté deux fois se démarque à la fin de l'expérimentation, à 120 jpi. Il est possible que des différences entre les traitements apparaissent à plus long terme ; Il serait intéressant de poursuivre le suivi sur une année complète.

Pour étudier l'influence du substrat sur la colonisation par un agent de biocontrôle, un deuxième substrat est évalué (TCH2). Le substrat TCH2, composé principalement de tourbe ne permet pas d'améliorer le développement de *P. oligandrum* dans la rhizosphère des plants et il est moins favorable à la croissance du *Dipladenia*. Le substrat Premier Tech Faliénor, dont le mélange comporte une part d'écorces fines compostées et qui est utilisé depuis les premiers essais en 2012, reste intéressant. Il permet d'obtenir une bonne colonisation des micro-organismes.

Ces résultats sont issus de l'isolement de fragment de racines de *Dipladenia* sur un milieu sélectif. Ce milieu permet un très bon développement des *Pythium* spp., dont *Pythium oligandrum*. Mais compte tenu de sa sélectivité, ce milieu CMAparp présente certaines limites. En effet, la seule présence d'un fragment de mycélium ou d'une spore permet le développement de l'oomycète sur boîtes de Petri. Le développement étant favorisé, la quantification de *P. oligandrum* est moins évidente.

Les inconvénients majeurs des techniques de microbiologie sont qu'elles sont assez lourdes à mettre en œuvre, l'utilisation des milieux de culture demande beaucoup de temps et de main d'œuvre pour réaliser une expertise taxonomique qualifiée. En outre, ces techniques sont dépendantes de la capacité de l'organisme à être cultivé.

D'autres méthodes de détection sont aujourd'hui développées, comme par exemple les techniques de biologie moléculaire qui permettent de surmonter certains défauts des méthodes conventionnelles.



Pour notre étude, la PCR et la PCRq sont utilisées car ces méthodes sont généralement plus sensibles, plus précises, plus spécifiques et plus rapides que les analyses traditionnelles (Lievens *et al.*, 2006). En outre, ce type d'analyse peut permettre la détection des microorganismes non cultivables.

Afin de confirmer et de comparer les résultats obtenus au cours de l'analyse microbiologique, la quantification de la colonisation dans le temps par *P. oligandrum* est réalisée par PCRq. L'analyse par PCRq confirme les résultats obtenus sur les milieux de culture. D'une part, par la présence de l'oomycète tout au long de l'essai et d'autre part, par l'absence de différence significative entre les modalités où *P. oligandrum* est apporté mensuellement ou à concentration double.

Il est intéressant de noter que les quantités d'ADN détectées augmentent significativement à 15 jpi pour redescendre et se stabiliser aux autres temps de prélèvements. Un pic de colonisation par *P. oligandrum*, à 8 jours, a été observé sur la vigne par Massot (2011). Curieusement, cette différence n'est pas observée avec la méthode de microbiologie classique, selon laquelle la colonisation est constante.

Cette quantité supérieure d'ADN détecté à 15 jpi peut s'expliquer par la forme de *P. oligandrum* détectée et son cycle biologique. En effet, l'apport de l'oomycète à 0 jpi se fait sous forme d'oospores échinulées. Par conséquent, 15 jours après (à 15 jpi), *P. oligandrum* doit être présent sous forme de mycélium. Le mycélium étant plurinucléé, il y a plus de noyau donc plus d'ADN et un plus grand nombre de copies ITS dans le milieu. C'est pourquoi, à cette date, l'ADN de *P. oligandrum* est détecté en plus grande quantité. Ainsi la phase de multiplication (phase la plus active) de ce micro-organisme se situerait 15 jours après sa biotisation ce que confirment les résultats de la PCRq.

Aux autres temps de prélèvements, il est probable que la forme prédominante de *P. oligandrum* dans la rhizosphère soit à nouveau celles des spores. Ainsi à 30 et 60 jpi, la quantité d'ADN détectée est inférieure, les spores ne contiennent qu'un seul noyau et ces dernières sont produites en moins grande quantité en comparaison avec le mycélium.

La même méthode de PCRq a été utilisée en 2009 par Vallance *et al.* pour quantifier la présence de *P. oligandrum* colonisant des racines de tomates en culture hors-sol. Dans leurs travaux, *P. oligandrum* est retrouvé tout au long de l'essai, avec une assez bonne corrélation comparé aux méthodes microbiologiques. Le pourcentage de colonisation des racines de tomates semble avoir le même profil que celui sur *Dipladenia*. En effet, dans les deux cas, la colonisation par *P. oligandrum* semble augmenter au cours du temps.

Les deux techniques d'analyses ont montré que *P. oligandrum* s'implante durablement dans la rhizosphère. Cette aptitude à coloniser différents sols et différentes cultures a déjà été rapportée dans la littérature (Gerbore *et al.* 2013).

Après avoir vérifié l'installation des agents de biocontrôle, l'effet potentiellement bénéfique sur le développement du système aérien et racinaire ainsi que sur la protection des plants contre *Fusarium oxysporum* est étudié.

D'après les résultats obtenus sur les hauteurs, *P. oligandrum* ne semble pas avoir d'influence notable sur le développement aérien des plants de *Dipladenia*, et ceux pour tous les traitements. L'effet du traitement avec le micro-organisme *T. asperellum* est similaire voire identique à tous les traitements effectués avec *P. oligandrum*.

Les études des années précédentes avaient montré que *P. oligandrum* pouvait jouer sur le développement racinaire. Cette année, un des objectifs prioritaires est de voir si des concentrations et des apports différents de *P. oligandrum* dans le substrat des *Dipladenia* peut impacter le développement racinaire. Les résultats de cette année confirment que l'oomycète *P. oligandrum* peut influencer le développement du système racinaire. Cependant, de manière générale, un seul traitement se démarque. Il





s'agit de la modalité où *P. oligandrum* est apporté une seule fois au cours de cet essai. Cette seule modalité est corrélée aux observations des années précédentes où l'agent de biocontrôle était apporté une seule fois au cours des essais.

*P. oligandrum* semble donc avoir un effet sur le développement racinaire mais aucun sur le développement de la partie aérienne.

Suite à la bonne installation de *P. oligandrum* dans la rhizosphère des plants de *Dipladenia*, il est judicieux de se demander si ce dernier a un effet potentiellement protecteur contre *F. oxysporum*. Cependant, il faut rappeler ici que les résultats obtenus en 2012 et 2013 à la station du GIEFPSO permettaient de mettre en évidence un effet protecteur de *P. oligandrum* contre ce champignon tellurique. Pour l'instant, l'inoculation de *F. oxysporum* n'a pas donnée les résultats attendus. En effet, dix semaines après l'apport de l'agent pathogène, le nombre de plants malades reste très faible. Le problème de la contamination des plants de *Dipladenia* par *F. oxysporum* peut être dû au fait que la souche inoculée n'est pas assez agressive. Cependant il s'agit de la même souche utilisée depuis 2012 et qui avait donnée des taux de contaminations très importants et notamment vis-à-vis du témoin inoculé. Il peut alors s'agir d'une perte d'agressivité de la souche. Il faudrait envisager de renouveler l'inoculum.

D'autres facteurs limitant peuvent expliquer la faible attaque de *F. oxysporum*. Un des premiers facteurs est sans doute lié aux conditions climatiques non optimales (température, humidité du substrat) limitant ainsi l'agressivité et le développement du pathogène. En effet, certains auteurs, dont Blancard *et al.* (2009) mettent en évidence l'influence des températures du milieu sur le développement de certaines souches de *Fusarium sp.*.

Le second facteur est peut être la conséquence d'une préparation d'inoculum trop faible. L'apport de trois millions de spores par plante n'est peut-être pas suffisant ou alors, après la préparation de la suspension d'inoculum, une forte mortalité de spores se produit ce qui entraîne une baisse de population des spores. De ce fait, pour les prochaines séries de tests menées en 2015 il serait intéressant de tester différentes concentrations d'inoculum et de vérifier la viabilité de ce dernier. Il faudrait aussi prendre en considération les résultats de 2012, où deux inoculations avaient été effectuées à un mois d'intervalle et pour lesquels les taux de mortalité étaient conséquents et significatifs (GIE FPSO, 2012).

Le dernier facteur pouvant limiter la pénétration et la propagation de *F. oxysporum* dans les racines et les tissus vasculaires est supposé être la lignification liée à l'âge des plants. En effet, des plantes plus âgées et donc plus vigoureuses résistent mieux aux agressions extérieures. Cependant, les plantes inoculées sont, cette année, plus jeunes et supposées plus sensibles.

Dans tous les cas, pour obtenir des symptômes et espérer favoriser la contamination une deuxième inoculation devrait avoir lieu sur l'essai.



## CONCLUSION & PERSPECTIVES

---

L'objectif principal de cet essai est d'étudier les effets potentiellement bénéfiques de *Pythium oligandrum* et de *Trichoderma asperellum* sur les plants de *Dipladenia* (développement aérien et racinaire, qualité et protection des plantes) et sur le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*. Cette étude allie aussi une volonté de rechercher de nouveaux supports de culture pour améliorer la qualité des plantes en développant un microbiome au sein de la rhizosphère de la plante.

Cette démarche s'inscrit directement dans la recherche de méthodes alternatives à la lutte chimique. En effet, l'installation d'un micro-organisme au sein d'un substrat agirait comme une lutte préventive et permettrait de contenir la pression d'un pathogène. Le mieux serait d'avoir des micro-organismes compatibles avec divers fongicides chimiques pour permettre aux producteurs de réaliser des traitements en cas de fortes attaques du pathogène. Des essais à mener sur cette problématique seraient particulièrement intéressants au vu de la situation actuelle.

Les résultats des ces trois années d'expérimentation sur Dipladénia s'ajoutent aux nombreuses études sur d'autres espèces végétales (vigne, tomate...) ayant révélé un réel intérêt des agents de biocontrôle dans la lutte contre divers organismes phytopathogènes.

Les techniques de culture, multiplication et implantation de ces agents de biocontrôle dans les supports de culture sont très complexes. De ce fait, afin de voir si une installation durable de *P. oligandrum* et de *T. asperellum* est possible dans la rhizosphère des plants de *Dipladenia*, des analyses sur milieux de cultures sont réalisées au cours du temps. Cette année, *P. oligandrum* est l'agent de biocontrôle principalement étudié, Les analyses microbiologiques sont complémentées par des analyses moléculaires. Ces analyses mises en place permettent de suivre plus finement la population de *P. oligandrum*. Les résultats obtenus montrent bien que l'agent de biocontrôle s'installe parfaitement au niveau des racines. Il en est de même pour *T. asperellum*.

L'installation de *P. oligandrum* et de *T. asperellum* confirmée, il a s'agit par la suite de démontrer si ces derniers induisent un effet bénéfique sur les plants de *Dipladenia*.

Plusieurs apports et une concentration différente de *P. oligandrum* ainsi que deux substrats sont testés. Ceci, dans l'intention de trouver les conditions idéales pour optimiser la biotisation. En effet, le matériel biologique est parfois difficile à maîtriser et son installation dans les substrats n'est pas garantie. La biotisation est dépendante de facteurs biotiques et abiotiques.

Au vu et au su des résultats obtenus, *P. oligandrum* semble avoir pour l'instant un effet bénéfique uniquement sur le développement racinaire. Le fait que le système racinaire soit plus important permet d'imaginer que les plants puissent lutter plus facilement contre la maladie. En effet, plus les racines sont nombreuses et plus le développement de *P. oligandrum* est important. Globalement, une seule application de *P. oligandrum* dans le substrat adapté suffit à influencer la croissance racinaire. En outre, cette seule application de *P. oligandrum* est suffisante pour que celui-ci soit détecté sur milieux de culture et en analyse PCRq.

Néanmoins, à cette date, une simple application ne semble pourtant pas suffisante pour obtenir un effet protecteur contre la fusariose. Malgré cela, aucune conclusion ne peut être faite, car à ce jour, l'installation de la maladie n'est pas optimale.

Les premiers résultats avec *T. asperellum* paraissent prometteurs. En effet, *T. asperellum*, est testé pour la première fois cette année sur culture de *Dipladenia*. Ce micro-organisme, montre des effets potentiellement bénéfiques sur le développement racinaire et sur la protection vis-à-vis de *F. oxysporum*.



Dans la continuité de cette étude, il serait intéressant de pousser la réflexion quant au mode d'action de *P. oligandrum* sur le pathogène *F. oxysporum*. Des essais de confrontation directe, sur milieu de culture entre *F. oxysporum* et *P. oligandrum* permettraient de voir si ce dernier peut inhiber la croissance mycélienne de *F. oxysporum*. En outre, des tests moléculaires recherchant des molécules élicitrices particulières pourraient confirmer ou non le mode d'action principal de cet agent de biocontrôle.

Par ailleurs, *T. asperellum* semble être un micro-organisme prometteur dans la lutte contre la fusariose sur *Dipladenia*. En conséquence, il est judicieux de continuer des essais avec ce micro-organisme. Par la suite des analyses moléculaires comme celles utilisées pour *P. oligandrum* pourraient être envisagées.

La finalité des travaux effectués en 2012 et 2013 ainsi qu'au cours de ce stage est de valider l'intérêt d'utiliser un agent de biocontrôle pour lutter contre la fusariose du *Dipladenia* et plus particulièrement d'envisager l'homologation de *P. oligandrum* en tant que produit phytosanitaire. Des travaux de recherche sur la vigne sont en cours au sein de l'INRA et ont la même orientation. En outre, dans le cadre de cet essai, un transfert et une valorisation des résultats est déjà effectuée auprès des producteurs et des différents acteurs de la filière. Effectivement, un poster présentant l'essai et les résultats obtenus (Annexe V) m'a permis de valoriser le travail que j'ai mené au sein de la structure lors de la journée portes ouvertes 2014.

Par ailleurs, ces résultats seront présentés lors de la 5<sup>ème</sup> conférence internationale sur les méthodes Alternatives de Protection des plantes organisée par l'Association Française de Protection des Plantes à Lille en 2015.

Dans le contexte actuel de réduction des intrants phytosanitaires et pour répondre aux besoins des producteurs en termes de nouvelles stratégies de lutte et de nouvelles techniques culturales, il est indispensable de continuer à travailler sur ces expérimentations.

Il faut garder à l'esprit qu'il s'agit d'un matériel vivant très dépendant des conditions édaphiques et climatiques du milieu. L'apport des agents de biocontrôle doit impérativement se faire de manière préventive et il est nécessaire d'assurer les prémices de leur installation dans le support de culture, principalement en contrôlant les conditions environnantes.



## BIBLIOGRAPHIE

---

- ANONYME**, CABI et OEPP. Fiche informative sur les organismes de quarantaine *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*. Paris : CABI et OEPP pour l'UE. 6 p. Contrat 90/399003.
- ANONYME** (2008). European Commission Health & Consumers Directorate-General, Review report. Review report for the active substance *Pythium oligandrum* M1. European Commission, 2008. 11 p. Rapport SANCO/1864/08.
- ANONYME** (2008). LNPV (Laboratoire National de la Protection des Végétaux). Toutes céréales, détection et Identification des espèces de *Fusarium Spp.* et *Microdochium Nivale* sur grains de céréales par isolement mycologique semi-sélectif et étude microbiologique. Malzéville : LNPV, 2008. 28 p. Réf. MH-03.16 : version B.
- ANONYME** (2012). GIE FPSO. Compte rendu ASTREDHOR, Agents antagonistes des champignons pathogènes du sol : Lutte contre la fusariose du *Dipladenia*.
- ANONYME** (2013). FranceAgriMer. Données et bilans, Végétaux d'ornement : achats des ménages en 2012. 80 p.
- Ardila H.D., Torres A.M., Martínez S.T. and Higuera B.L.** (2014). Biochemical and molecular evidence for the role of class III peroxidases in the resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) to *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.85, pp 42-52.
- Badreddine I.** (2008). Etude des surfaces cellulaires d'*Aphanomyces euteiches*, parasite majeur de légumineuses. Thèse, Biosciences végétales, Université de Toulouse, Toulouse, 171 p.
- Benhamou N., le Floch G., Vallance J., Gerbore J., Grizard D., Rey P.** (2012) *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology*, n°158, pp. 2679–2694.
- Benitez T., Rincón A.M., Limón M.C., Codón A.C.** (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, v.7, n°4, pp. 249-260.
- Blancard D.** (1998) Maladies du tabac : Observer, identifier, lutter. Ed.INRA, Paris, 375 p.
- Blancard D, Laterrot H, Marchoux G et Candresse T.** (2009) Les maladies de la tomate, identifier, connaître, maîtriser. Editions Quae pp 510-514
- Blanchard A. et Limache F.** (2005). Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN). DAA Protection des plantes et environnement, 2005. 18 p.
- Boutebtoub W., Chevalier M., Mauget JC., Sigogne M., Morel P. and Galopin G.** (2009). Localizing Starch Reserves in *Mandevilla sanderi* (Hemsl.) Woodson Using a Combined Histochemical and Biochemical Approach. *HortScience*, n°44, pp. 1879-1883.
- Brozova J.** (2002). Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science*, v. 38, n°1, pp. 29–35
- Champion R.** (1997). Identifier les champignons transmis par les semences : Techniques et pratiques. Ed. Quae, Paris, 398 p.





- Corbaz R.** (1990). Lutte intégrée. In: Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes, PPUR presses polytechniques, pp 203-231.
- Costa Rodrigues A.A. and Menezes M.** (2006). Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from crowpea seeds. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, v. 3, p. 203-215.
- Darles B.** (2013), Évaluation de l'efficacité de différents produits de biocontrôle, pour lutter contre la fusariose du *Dipladenia*. Rapport de stage, « Bioingénierie » option Biotechnologie végétales, Université Paul Sabatier, Toulouse, 35 p.
- Decoin M.** (2014). Produits de biocontrôle et évolution des lois. *Phytoma*, n°672, pp. 16-23.
- Fernon J-P.** (1970). Etude de la pénétration et de la colonisation du *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. SN. & H, Influence des facteurs écologiques sur ce phénomène et sur l'extériorisation des symptômes sur plantules de Melon. Mémoire, Diplôme d'Ingénieur des Techniques Agricoles, ENITA de Bordeaux, Bordeaux, 30 p.
- Fravel D., Olivain C. and Alabouvette C.** (2002). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, v. 157, pp. 493-502.
- Gerbore J., Benhamou N., Vallance J., Le Floch G., Grizard D., Regnault-Roger C. and Rey P.** (2013). Biological control of plants pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ Science Pollution Research*, pp. 25-35.
- Godfrey SAC, RD. Monds, DT. Lash, and JW. Marshall.** (2003) Identification of *Pythium oligandrum* using species-specific ITS rDNA PCR oligonucleotides. *Mycol. Res.* n°107, pp. 790-796.
- Iida Y., Ohara T. and Tsuge T.** (2006). Identification of genes up-regulated during conidiation of *Fusarium oxysporum* through expressed sequence tag analysis. *Fungal Genetics and Biology*, n°43, pp. 179-189.
- Jeunot B.** (2005). Les fusariotoxines sur céréales : Détection, risque et nouvelle réglementation. Thèse, Doctorat en Pharmacie, Université Henri Poincaré, Nancy, 125 p.
- Lannes R. et H.** (2010). *Dipladenia & Mandevilla : Balcons, terrasses, jardins*. Edition de la Lesse, Edisud, Aix-en-Provence, 95 p.
- Le Floch, G, J. Tambong, J. Vallance, Y. Tirilly, CA. Lévesque, et P. Rey.** (2007) Rhizosphere persistence of three *Pythium oligandrum* strains in tomato soilless culture assessed by DNA macroarray and real-time PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* n°61, pp. 317-326.
- Lepoivre P.** (2003). Phytopathologie: Le diagnostic : détection et identification des agents phytopathogènes. In : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Supérieur, Paris, pp. 218-219.
- Bart Lievens, Margreet Brouwer, Alfons C.R.C. Vanachter Bruno P.A. Cammue, Bart P.H.J. Thomma.** (2006) Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science*, n°171, pp. 155-165.
- Lutchmeah R.S. and Cooke R.C.** (1984). Aspects of antagonism by the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Transactions of the British Mycological Society*, n°83, pp. 696-700.



- Magan N.** (1988). Effect of water potentiel and temperature on spore germination and germ-tube growth *in vitro* and on straw leaf sheaths. *Transactions of the British Society*. v.90, pp. 97-107.
- Martin FN, Hancock JG** (1987). The Use of *Pythium oligandrum* for biological control of pre- emergence damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathol* 77(7):1013-1020
- Massot M.** (2011). Lutte Biologique contre les pathologies affectant les parties aériennes de la vigne par utilisation de l'oomycète, *Pythium oligandrum*. Mémoire, ENITA de Bordeaux, Bordeaux, 77 p.
- Mc Quilken M.P.** (1990). Development of *Pythium oligandrum* Drechsler for biological control of fungal soil-borne diseases. Thèse, Philosophie, University of Sheffield, 307 p.
- Meriem M.** (2010). Développement et extraction des métabolites secondaires de *Trichoderma viride* et leurs effets biologiquement actifs. Mémoire, Biotechnologie des mycètes, Université Mentouri Constantine, Algérie, 80 p.
- Messiaen C-M., Blancard D., Rouxel F., Lafon R.** (1991). Les maladies des plantes maraîchères : Du labo au terrain. Ed. Quae, Paris, 552 p.
- Michelot P.** (2010). Vers une autre approche de la protection phytosanitaire. In : La production en pépinière. Ed., Lavoisier Tec et Doc, Paris, p. 341.
- Morales-Quirós F. J.** (1995). An evaluation of the *Mandevilla boliviensis* complex. *Phytologia*, v.78, n°3, pp. 197-198.
- Nel B., Steinberg C., Labuschagne N. and Viljoen A.** (2006). The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. *Plant Pathology*, v.55, pp. 217-223.
- Oumouloud A., González Torres R., Garcés-Claver A., Chikh-Rouhou H. and Alvarez J.M.** (2012). Differential response of *Cucumis melo* to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 isolates. *Crop protection*, v.44, pp. 91-94.
- Picard K., Tirilly Y. and Benhamou N.** (2000), Cytological Effects of Cellulases in the Parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n°10, pp. 4305-4314.
- Ratho.** (2006). Fiche technique : dipladenia sanderi.
- Rey P., Gl F., Benhamou N., Tirilly Y.** (2008). *Pythium oligandrum* biocontrol: its relationships with fungi and plants. In: Ait Barka E, Clément C (eds) Plant-microbe interactions. Research Signpost, Kerala, pp 43-67.
- Rippa S.** (2007). Interactions peptaïbols/plantes : étude de l'effet de l'alaméthicine, toxine ou éliciteur de réactions de défense, chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Thèse, Stratégies d'exploitation des fonctions biologiques, Université de Compiègne, Compiègne, 172 p.
- de los Santos-Villalobos S., Hernandez-Rodriguez L.E., Villasenor-Ortega F. and Pena-Cabriales J.J.** (2012). Production of *Trichoderma asperellum* T8a spores by a "home-made", solid-state fermentation of mango industrial wastes. *BioResources*, v.7, n°4, pp. 4938-4951.



- Takenaka S, Nakamura Y, Kono T, Sekiguchi H, Masunaka A, Takahashi H** (2006) Novel elicitor-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. *Mol Plant Pathol* 7(5):325-339
- Tambong JT, AWAM. De Cock, NA. Tinker, et CA. Lévesque.** (2006) An oligonucleotide array for identification and detection of *Pythium* species. *Applied and Environmental Microbiology* n°72, pp. 2691-2706.
- Thiery C.** (2012). *Dipladenia* : une culture en vogue mais délicate à conduire. *Le lien Horticole*, n°814, pp. 10-11.
- Vallance J., Le Floch G., Dénier F., Barbier G., Lévesque C.A. and Rey P.** (2009). Influence of *Pythium oligandrum* Biocontrol on Fungal and Oomycete Population Dynamics in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, n°14, pp. 4790-4800.
- Viennot-Bourgin G.** (1949). Systématique des champignons parasites des plantes. Les Masson et C, Paris, 120 p.
- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. and Valéro J.R.** (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, n°37, pp. 1-20.

## WEBOGRAPHIE

---

GIE Fleurs&Plantes du Sud-Ouest. Orientations générales de la recherche au sein du GIE Fleurs et Plantes du Sud-Ouest.

<http://www.giefleursetplantes.fr/Recherche-experimentation/Orientations-generales-GIE-fleurs-plantes-sud-ouest.html> (modifié le 28/01/14).

Grégoire G. (2013). Homologation d'un nouveau biofongicide. Québec : Fédération Interdisciplinaire de l'Horticulture Ornementale du Québec. 1 p. Nouvelle 171.

<http://www.fihq.qc.ca/nouvelles/homologation-d-un-nouveau-biofongicide/171>

HYPP Pathologie. *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *cepae* (Hanz.) Snyd. et Hansen : Mycologia, DEUTEROMYCOTINA, HYPHOMYCETALES, TUBERCULARIACEAE.

<http://www7.inra.fr/hyp3/pathogene/3fuoxce.htm> (modifié le 18/07/11).

Institut Louis Malardé, PCR en temps réel.

<http://www.ilm.pf/PCRtempsreel> (consulté le 22/05/2014).

Lannes : Créateur-Obtenteur-Multiplicateur, tout le site.

[http://www.lannes.pro/fr/plus\\_sur\\_les\\_dipladenia/origine\\_histoire\\_mandevilla.htm](http://www.lannes.pro/fr/plus_sur_les_dipladenia/origine_histoire_mandevilla.htm) (consulté le 11/04/14).

Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt (2013). Tout savoir sur les pesticides et leurs autorisations de mise sur le marché.

<http://agriculture.gouv.fr/pesticides> (modifié le 30/04/2013).

Rakotonirainy M. S., CRCC, site MYCOTA. *Fusarium*.

<http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?num=20&n=Fusarium> (consulté le 18 mai 2014)





Rapport-Gratuit.com

## ANNEXES



# ANNEXES

## Annexe I : Organigramme du GIE FPSO



Rapport-gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



### **Milieu Synthétique (MS)**

#### **Solution A :**

- Nitrate de Ca                      100g de Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- Nitrate de Potassium        25g (KNO<sub>3</sub>)

#### **Solution B:**

- Sulfate de magnesium            25g (Mg SO<sub>4</sub>)

#### **Solution C:**

- Phosphate de Potassium        25g (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
  Monopotassique

#### **Solution D:**

- Phosphate de potassium        25g (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)  
  Bipotassique

Doses par litre.

Mycologie: dose pour 1 L d'eau permutée

10 mL de A et B

5 mL de C et D

5g de sucrose

1g de malt

50 mg d'acide citrique en 1 mL de solution d'acide citrique 50 L à 50 g/L

25g de gélose (agar)

La solution d'acide citrique est à faire bouillir 5 mn avant de mettre au réfrigérateur.

#### **Mélanger :**

Un peu d'eau, gélose, saccharose, malt et acide citrique. Homogénéiser. Ajouter l'agar et l'eau permutée puis les solutions A, B, C et D.

Autoclavage : 20mn à 120°C

QSP                                      1L eau ultrapure

### **Milieu Malt-Agar-Chloramphénicol (MAC)**

- Extrait de malt 30,0 g/L

- Agar : 12,0 g/L

- pH : 5,5

Verser l'extrait de Malt et l'Agar dans 1 L d'eau distillée. Porter à ébullition en chauffant doucement et en agitant jusqu'à ce que le milieu devienne brun-rouge transparent. Autoclavage classique à 120°C pendant 15 à 20 minutes en fonction du fabricant.

Ajouter le chloramphénicol

Laisser refroidir à 45-50°C au bain-marie avant utilisation.

#### **Malt-Agar (MA) (pour flore totale) : (Pour 1 L)**

- 20 g d'Agar

- 15 g de Malt



### **PDA (Potato Dextrose Agar)**

Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière directe.

Pour un 1L de milieu :

- PDA en poudre prêt à l'emploi, de préférence de marque Difco :  $39\pm 1$  g
- H<sub>2</sub>O distillée ou osmosée :  $1000\pm 10$  ml

### **CMA-PARP (Jeffers et Martin, 1986) :**

Mélange prêt à l'emploi Corn Meal Agar (CMA, Difco) : 17 g

Après autoclavage, les solutions d'antibiotiques suivantes sont filtrées (0,2  $\mu\text{m}$ , Millipore) et additionnées au milieu en surfusion :

- Pimaricine (2.5% suspension stérile, Sigma) : 200  $\mu\text{l}$ ,
- Ampicilline (99%, Aldrich) : 250 mg dissous dans de l'eau distillée,
- Rifampicine (97%, Sigma) : 100 mg dissous dans du Dimethyl sulfoxide (Sigma),
- Pentachloronitrobenzene (PCNB, 97%, Aldrich) : 200 mg dissous dans du DMSO.



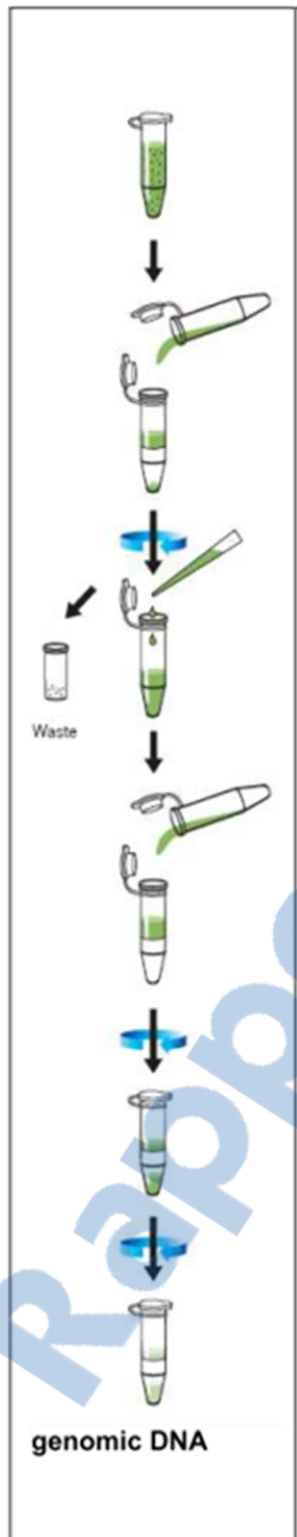


Annexe III : Clé d'identification du micro-organisme pathogène *F.oxysporum* utilisé par l'ANSES

Caractéristiques sur milieu PDA				Microconidies sur SNA				Sporodochia sur SNA			Macroconidies produites en sporodochium sur SNA				Chlamydo-spores	Fréquence de l'espèce sur céréales	
Espèce de <i>Fusarium</i>	Mycélium aérien	Couleur sous la culture	Vitesse de croissance	Abondance dans le mycélium aérien	Forme(s)	Disposition (observation directe de la culture)	Aspect du conidio-phore	Conidio-genèse	Disposition	Couleur (éventuellement sur PDA)	Taille relative	Forme générale	Section la plus large	Forme de la cellule basale	Forme et taille de la cellule apicale		
<i>F. culmorum</i> (W. G. Smith) Sacc.	abondant, aérien, blanc à jaune, parfois rosé	rouge carmin	rapide	abondantes					Dispersées sur toute la colonne	orange à brun rouge <i>Idem sur DCPA</i>	taille petite à moyenne <i>Idem sur DCPA</i>	forme de fusille à racol serrées <i>Idem sur DCPA</i>		souvent arrondie voire parallèle <i>Idem sur DCPA</i>	parfois en forme de maubelon ou de bec <i>Idem sur DCPA</i>	présentes et parfois abondantes, fusées solitairement en chapelets ou en amas	très fréquente sur autres céréales
<i>F. graminearum</i> Schwabe	abondant, aérien, blanc à jaune, parfois rosé	rouge carmin	rapide	abondantes					concentrées au centre de la colonne <i>Idem sur DCPA</i>	orange à brun rouge <i>Idem sur DCPA</i>	taille moyenne à grande <i>Idem sur DCPA</i>	forme de fusille <i>Idem sur DCPA</i>	parois quasi parallèles <i>Idem sur DCPA</i>	distichement, pédonculiforme <i>Idem sur DCPA</i>	en forme de bec <i>Idem sur DCPA</i>	très rares et très petites à se former	très fréquente sur maïs et sur autres céréales
<i>F. crochoviense</i> Burgess, Nelson & Touzoun	abondant, aérien, blanc à jaune, parfois rosé	rouge carmin	rapide	abondantes					concentrées au centre de la colonne <i>Idem sur DCPA</i>	orange à brun rouge <i>Idem sur DCPA</i>	taille moyenne à grande <i>Idem sur DCPA</i>	forme de fusille, face dorsale plus sombre que la ventrale <i>Idem sur DCPA</i>	plus large dans la moitié supérieure <i>Idem sur DCPA</i>	très distichement, pédonculiforme <i>Idem sur DCPA</i>	en forme de bec <i>Idem sur DCPA</i>	présentes, petites à se former	peu fréquente sur autres céréales
<i>F. laterum</i> Nées	peu abondant, généralement blanc à ocre	rouge carmin ou brun ou orange	lente	rare	ellipsoïde, fusiforme à forme de chapelet	solitaires	de taille moyenne	monophalide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonne	orange vif	taille moyenne	relativement droite			formant solitairement un bec	très peu fréquentes, sur autres céréales	très peu fréquente sur autres céréales
<i>F. verticillioides</i> Sacc. Nirenberg	abondant et blanc se teignant de pourpre	sauumon à pourpre	rapide	extrêmement abondantes	unicellulaire, ovale à forme de chapelet et à la base apiculée	en chapelets et en fusées téta	relativement long	monophalide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonne	ocre à orange	taille moyenne à grande	relativement droite, assez fine				abondantes	très fréquente sur maïs, très peu fréquente sur autres céréales
<i>F. proliferatum</i> (Marichinus) Nirenberg	abondant et blanc se teignant de pourpre	sauumon à pourpre	rapide	extrêmement abondantes	unicellulaire, ovale à forme de chapelet et à la base apiculée	en chapelets et en fusées téta	de taille moyenne, parfois ramifié	monophalide et polyphalide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonne	ocre à orange	taille moyenne à grande	relativement droite, assez fine				abondantes	très fréquente sur maïs, très peu fréquente sur autres céréales
<i>F. subglutinans</i> (Wollenw. & Reinking) Nelson, Touzoun & Marasas comb. nov.	abondant et blanc se teignant de pourpre	sauumon à pourpre	rapide	extrêmement abondantes	unicellulaire, ovale à forme de chapelet et à la base apiculée	en fusées téta	court à taille moyenne, souvent ramifié	monophalide et polyphalide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonne	ocre à orange	taille moyenne à grande	relativement droite, assez fine				abondantes	très fréquente sur maïs, très peu fréquente sur autres céréales
<i>F. anthophilum</i> (A. Braun) Wollenw.	abondant et blanc se teignant de pourpre	sauumon à pourpre	rapide	extrêmement abondantes	unicellulaire, ovale, rarement ramifiée, parfois en forme de chapelet	en fusées téta	court à taille moyenne, souvent ramifié	monophalide et polyphalide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonne	ocre à orange	taille moyenne à grande	relativement droite, assez fine				abondantes	très peu fréquente, sur maïs essentiellement
<i>F. oxysporum</i> Schlecht. emmend. Syd. & Hans.	abondant et blanc se teignant de pourpre	sauumon à pourpre	rapide	extrêmement abondantes	ovale à renfoncée	en fusées téta	trichiquement téta, court, parfois ramifié	monophalide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonne	incolore à pourpre	taille moyenne	forme de fusille		pas légèrement émaculé		abondantes, typiquement solitaires et rarement en amas	très peu fréquente sur maïs et sur autres céréales
<i>F. solani</i> (Mart.) Appel & Wollenw. emmend. Syd. & Hans.	abondant ou rare et blanc jaunâtre se teignant de pourpre	sauumon à pourpre parfois très prononcé	rapide	rare à extrêmement abondantes	ovale à renfoncée	en fusées téta, souvent dans une zone acrochaetée	trichiquement téta, long	monophalide	concentrées au centre de la colonne ou en cercle concentriques	orange à pourpre	taille moyenne à grande	relativement droite		pédonculiforme à amas, voire arrondi	enroulés à amas, arrondis	abondantes, typiquement solitaires et rarement en amas	très peu fréquente sur autres céréales



## Protocole Extraction ADN Kit INVITEK Invisorb® Spin Plant Mini Kit



Echantillons de 60mg environ (max 120 à 180 mg si matière fraîche)

- Ajouter 400  $\mu$ L de Tampon de Lyse P (**Lysis Buffer P**) et 20  $\mu$ L de protéinase K (**Proteinase K**)
- Vortexer brièvement
- Transférer la solution de lyse sur un préfiltre (**Prefilter Vert**) avec un tube de 2 mL (**Receiver Tubes Jaune**)
- Centrifuger 1 min à 11000 rpm
- Eliminer le préfiltre

Traitement RNase :

- Ajouter 40  $\mu$ L de **RNase A** (10 mg/mL) au filtrat
- Vortexer brièvement
- Incuber 5 min à T°C ambiante

- Ajouter 200  $\mu$ L de Tampon de Fixation P (**Binding Buffer P**)
- Vortexer
- Transférer le solution sur un filtre (**Spin Filter Jaune**) avec un tube de 2 mL (**Receiver Tubes Jaune**)
- Centrifuger 1 min à 11000 rpm
- Eliminer le filtrat et remplacer le filtre sur le tube de 2 mL (**Receiver Tubes Jaune**)

- Ajouter 550  $\mu$ L de Tampon de Lavage I (**Wash Buffer I**)
- Centrifuger 1 min à 11000 rpm
- Eliminer le filtrat et placer le **Spin Filter** sur le tube de 2 mL (**Receiver Tubes Jaune**)

- Ajouter 550  $\mu$ L de Tampon de Lavage II (**Wash Buffer II**)
- Centrifuger 1 min à 11000 rpm
- Eliminer le filtrat et placer le **Spin Filter** sur le tube de 2 mL (**Receiver Tubes Jaune**)

- Répéter cette étape de lavage 1 fois
- Eliminer le filtrat et centrifuger 4 min à 11000 rpm (pour éliminer l'éthanol résiduel)

- Placer le Spin Filter dans un tube de 1,5 mL (Receiver tubes Blanc) et ajouter 50  $\mu$ L de Tampon d'Elution D (**Elution Buffer D**) préalablement chauffé à 65°C pendant 5 min
- Incuber pendant 3 min à T°C ambiante
- Centrifuger 1 min à 10500 rpm

- Jeter le Spin Filter et conserver les échantillons d'ADN à 4°C





www.gieflleursetplantes.fr - www.astredhor.fr  
GIE Fleurs et Plantes du Sud-Ouest, 71, avenue Edouard Bourlaux,  
CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon cedex / Station de l'Institut Astredhor

## Evaluation de l'efficacité de différents produits de biocontrôle à base de microorganismes pour lutter contre la fusariose du *Dipladenia*

Marion Triollet - Master professionnel production et technologies du végétal - Université des sciences d'Angers (maître de stage Jean-Marc Desgranges)

### CONTEXTE

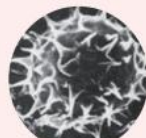
- Plan Ecophyto : mise au point de méthodes alternatives pour palier au retrait de molécules chimiques
- Efficacité non négligeable de *Pythium oligandrum* lors d'essais effectués en 2012-2013 sur le pathosystème *Dipladenia-F.oxysporum* : Réévaluation et confirmation de ces résultats en 2014
- Test d'un nouveau produit à base de *Trichoderma asperellum* (XEDAVIR®)

### MATERIELS ET METHODES

- Matériel végétal : *Dipladenia* var. 'diamantina Opale Grenat' (Société Lannes) - Empotage : Semaine 14 - Substrat : Falienor® et Dumona® TCH2
- Fertilisation : Basacote native 6 mois (N-P-K de 16-3-19)
- Matériel fongique : *Fusarium oxysporum*
- Produits testés : *Pythium oligandrum* et *Trichoderma asperellum*



T. asperellum



P. oligandrum

### BIOTISATION



Dilutions de la solution mère de P. o



« Biotisation » des plants

### PRELEVEMENTS ET MISE EN CULTURE



Racines de *Dipladenia*

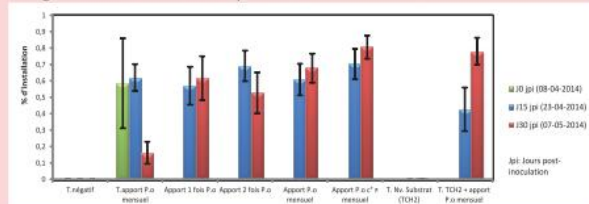


Dépot de fragments de racine sur milieu spécifique CMAgarp

« Biotisation » : suivi d'installation de *P. oligandrum* dans la rhizosphère  
Observation au microscope de *P. oligandrum* sur racines de *Dipladenia*



Représentation graphique de l'installation de *P. oligandrum* sur racines de *Dipladenia*



- A J+15 jpi, les modalités avec P.o colonisent la rhizosphère des plants de *Dipladenia* à 60%.
- Globalement, à J+30 jpi, la colonisation des racines par P.o a légèrement augmentée. Cependant, le « témoin apport de P.o mensuel » est très en dessous des autres modalités, cela peut s'expliquer d'une part, par les plants choisis au moment des prélèvements, à une surface racinaire moindre, et/ou une faible installation de P.o. D'autre part, le bloc où est disposé ce témoin est exclu des autres blocs et est dans une zone défavorable (moins de chaleur, de luminosité) au bon développement des *Dipladenia*.

NOS PARTENAIRES FINANCIERS



### OBJECTIFS

Trouver des agents de biocontrôle efficaces pour lutter contre l'agent pathogène *Fusarium oxysporum*, responsable de la fusariose du *Dipladenia*

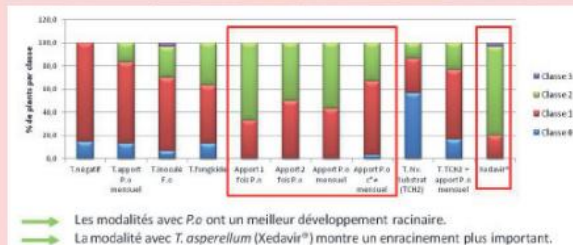
### Dispositif

T. exclus non inoculés F. oxysporum	T. non exclus inoculés F. oxysporum	Modalités inoculées F. oxysporum
M1 : T. négatif	M3 : T. inoculé F.o	M5 : Apport 1 fois P.o
M2 : T. apport P.o mensuel	M4 : T. fongicide	M6 : Apport 2 fois P.o
M9 : T. Nv. Substrat (TCH2)		M7 : Apport P.o mensuel
M10 : T. TCH2 + apport P.o mensuel		M8 : Apport P.o c* ≠ mensuel
		M11 : Xedavir®

### RESULTATS EN COURS

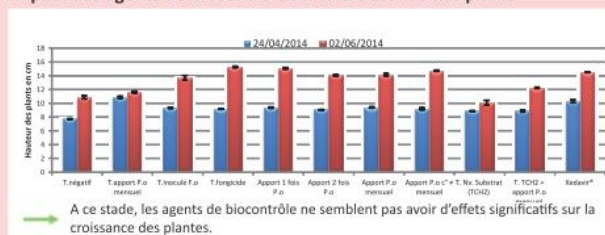
#### Impact des agents de biocontrôle sur le développement racinaire

Définition des classes racinaires



Les modalités avec P.o ont un meilleur développement racinaire.  
La modalité avec *T. asperellum* (Xedavir®) montre un enracinement plus important.

#### Impact des agents de biocontrôle sur la croissance des plants



A ce stade, les agents de biocontrôle ne semblent pas avoir d'effets significatifs sur la croissance des plantes.

### PROCHAINE ETAPE


- Observation après inoculation des plants de *Dipladenia* (Semaine 25) par *Fusarium oxysporum*
- Vérification de la protection des plants par les agents de biocontrôle en fonction des modalités
- Réalisation d'analyses moléculaires (qPCR) pour suivre la population de *P. oligandrum* au cours du temps, en parallèle de l'observation microscopique

### PERSPECTIVES

Grâce aux résultats obtenus sur différents pathosystèmes étudiés: envisager l'homologation de *P. oligandrum* en tant que produit phytosanitaire.





  		Diplôme / Mention : M2 Biologie et Technologie du Végétal Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV) Parcours : PVS Option : Produits phytosanitaires, Réglementation et méthodes alternatives
Auteur : Marion TRIOLET		Organisme d'accueil : GIE Fleurs et Plantes du Sud-Ouest
Date de naissance* : 14/02/1989		
Nb pages : 31    Annexe(s) :5		Adresse : 71 rue Edouard Bourlaux 33883 VILLENAVE D'ORNON Cedex Maître de stage : Jean-Marc DEOGRATIAS
Année de soutenance : 2014		
Titre français : Evaluation de l'efficacité de différents produits de biocontrôle à base de micro-organismes pour lutter contre la fusariose du <i>Dipladenia</i> / Approches biologiques et moléculaires		
Titre anglais : Assesment of the efficiency of various products of biocontrol with microorganisms to fight against the fusariose of <i>Dipladenia</i> / Biological and molecular approach		
<u>Résumé :</u>  Dans le contexte actuel de réduction des intrants chimiques et du respect de l'environnement, de nouveaux produits biologiques aux propriétés alliant protection contre les pathogènes et stimulation de la vigueur des plantes apparaissent. Ainsi, des produits contenant des micro-organismes tels que <i>P. oligandrum</i> et <i>T. asperellum</i> sont testés pour lutter contre la fusariose du <i>Dipladenia</i> . L'agent responsable de cette maladie est <i>Fusarium oxysporum</i> . Ce pathogène pose un problème majeur depuis quelques années aux producteurs. L'objectif de cet essai est de suivre les populations de micro-organismes au sein du substrat par des analyses sur milieux de cultures et par des analyses moléculaires par PCR quantitative (pour <i>P. oligandrum</i> ). La réussite de la biotisation des substrats dans la mise en œuvre de cette approche est essentielle. Ces deux techniques complémentaires confirment la bonne installation des agents de biocontrôle dans la rhizosphère des plantes. Les résultats de cette étude, montre que <i>P. oligandrum</i> et <i>T. asperellum</i> ont des effets potentiellement bénéfiques sur le développement racinaire. En ce qui concerne le niveau de protection, il est difficile à l'heure actuelle de conclure vraiment sur l'effet protecteur de <i>P. oligandrum</i> . Cependant, les premières données révèlent qu'une seule application de <i>P. oligandrum</i> ne paraît pas suffisante pour avoir un effet protecteur. Il semblerait qu'une application mensuelle soit plus judicieuse. <i>T. asperellum</i> s'avère prometteur pour lutter contre la fusariose puisque aucune plante à ce jour ne présente des symptômes. En conséquence, il serait intéressant de continuer ces essais avec ces deux agents de biocontrôle.		
<u>Abstract:</u>  In the current context of reduced chemical inputs and respect for the environment, new biologic products combining properties of protection against pathogens and stimulation of plant vigor develop. Thus, products containing microorganisms such as <i>P. oligandrum</i> and <i>T. asperellum</i> are tested to fight against the fusariose of <i>Dipladenia</i> . The agent responsible for this disease is <i>Fusarium oxysporum</i> . This pathogen has been a major problem for producers since a few years. The objective of this trial is to follow populations of microorganisms in the substrate through analysis on culture media and molecular analysis by quantitative PCR (for <i>P. oligandrum</i> ). Successful biotisation of the substrates in the implementation of this approach is essential. These two complementary techniques confirm good installation of biocontrol agents in the substrate of <i>Dipladenia</i> plants. The results of this study show that <i>P. oligandrum</i> and <i>T. asperellum</i> have potentially beneficial effects on root development. Regarding the level of protection, it is difficult at this time to really conclude about the protective effect of <i>P. oligandrum</i> . However, initial data show that a single application of <i>P. oligandrum</i> does not seem to be sufficient to have a protective effect. It seems that a monthly application to fight against <i>F. oxysporum</i> is judicious. <i>T. asperellum</i> proves to be encouraging in the control of fusariose since no plant to date exhibit symptoms. Therefore, it would be interesting to continue testing these two biocontrol agents.		
Mots-clés : Biotisation, <i>P. oligandrum</i> , <i>T.asperellum</i> , agents de biocontrôle, <i>F.oxysporum</i> , <i>Dipladenia</i> , PCR quantitative. Key Words: Biotisation, <i>P. oligandrum</i> , <i>T.asperellum</i> , biocontrol agents, <i>F.oxysporum</i> , <i>Dipladenia</i> , quantitative PCR.		