

2016-2017

Mention Biologie et Technologie du Végétal

# IMPACT DES CONDITIONS DE CULTURE *IN VITRO* SUR LE DEVELOPPEMENT FONGIQUE

OPTIMISATION DE LA CROISSANCE ET DE LA SPORULATION

UNDA Mateo

Sous la direction de Mme  
BONNEAU Caroline

Membres du jury

SIMIER Philippe | Président du jury

BONNEAU Caroline | Maître de stage

FONTAINE Kevin | Tuteur du stage

MONTIEL Grégory | Auditeur



La + value végétale

Soutenu publiquement le :  
28 juin 2017



UNIVERSITÉ DE NANTES

2016-2017

Mention Biologie et Technologie du Végétal

# IMPACT DES CONDITIONS DE CULTURE *IN VITRO* SUR LE DEVELOPPEMENT FONGIQUE

OPTIMISATION DE LA CROISSANCE ET DE LA SPORULATION

UNDA Mateo

Sous la direction de Mme  
BONNEAU Caroline

Membres du jury

SIMIER Philippe | Président du jury

BONNEAU Caroline | Maître de stage

FONTAINE Kevin | Tuteur du stage

MONTIEL Grégory | Auditeur



La + value végétale

Soutenu publiquement le :  
28 juin 2017



**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



<http://duna.unilesvangas.fr>

PARTIE RESERVEE A L'ETUDIANT(E)

Courriel: \_\_\_\_\_ N° étudiant: \_\_\_\_\_

Je soussigné(e) (nom prénom) \_\_\_\_\_

certifie être l'auteur du document intitulé : \_\_\_\_\_

préparé sous la direction de

et soutenu le \_\_\_\_\_

Je certifie la conformité de la version électronique déposée avec l'exemplaire imprimé remis au jury et certifie disposer de tous les droits sur les documents figurant dans mon mémoire ou, à défaut, disposer de toutes les autorisations nécessaires auprès des ayants droits. Agissant en l'absence de toute contrainte et sachant que je dispose à tout moment d'un droit de retrait de mes travaux :

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers : |   |
| en accès :<br><input type="checkbox"/> tout public<br><input type="checkbox"/> réservé UA                  | à compter :<br><input type="checkbox"/> de la date de soutenance<br><input type="checkbox"/> du _____ |
| <input type="checkbox"/> Je n'autorise pas la diffusion du document.                                       |   |

Figure 1. The distribution of the number of clusters in the data set.

第10章

PARTIE RESERVEE AU (A LA) MAITRE DE STAGE

Nom du (de la) maître de stage : \_\_\_\_\_

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers : |   |
| en accès : <input type="checkbox"/> tout public <input type="checkbox"/> réservé UA                        | à compter : <input type="checkbox"/> de la date de soutenance <input type="checkbox"/> du _____ |

Figure 1. The distribution of the number of species in the 1000 samples of 1000 individuals each.

Figure 1. A 2D histogram of the distribution of the  $\Delta$  values for the 1000000 samples.

Section 1

**PARTIE RESERVEE AU (A LA) PRESIDENT(E) DE JURY**

Nom du (de la) présidentiel de jury :

- J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :

sans corrections | en accès :  tout public | à compter :  de la date de soutenance  
 avec corrections |  réservé UA |  du .....

Je n'autorise pas la diffusion du document.

Figure 1. The distribution of the number of species in the 1000 samples of 1000 individuals each.

Figure 1. The distribution of the number of species in the 1000 samples of 1000 individuals each.

10 of 10

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à mon professeur Monsieur Pascal Poupart de l'Université d'Angers qui m'a aidé dans la recherche de ce stage et m'a présenté à mon maître de stage, permettant ainsi ma participation dans l'entreprise.

Je tiens à remercier toute l'équipe de Végépolys qui m'a accompagné pendant le cadre de ce stage. Particulièrement Monsieur Lionel Vandekerckhove et Madame Laetitia Porcher qui m'ont guidé pour toutes les manipulations de laboratoire et Madame Caroline Bonneau, maître du stage, qui a encadré mes activités et corrigé mon rapport.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille qui m'a donné son appui ; et surtout mes parents qui m'ont permis de faire mes études en France.

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Mateo Gabriel UNDA ULLOA  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **22 / 06 / 2017**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint  
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université  
40 rue de rennes - BP 73532  
49035 Angers cedex  
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



## Liste des abréviations

- **SNES** : Station Nationale d'Essais de Semences
- **PDA** : Potato Dextrose Agar (anglais), Gélose dextrosée à la pomme de terre (français)
- **MEA** : Malt Extract Agar (anglais), Gélose d'extrait de malt (français)
- **CMA** : Corn Meal Agar (anglais), Gélose de farine de maïs (français)
- **PDB** : Potato Dextrose Broth (anglais), Bouillon dextrosé à la pomme de terre (français)

# Table des matières

## LISTE DES ABREVIATIONS

## TABLE DES MATIERES

## TABLE DES FIGURES

## TABLE DES TABLEAUX

## **IMPACT DES CONDITIONS DE CULTURE IN VITRO SUR LE DEVELOPPEMENT FONGIQUE.....1**

<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1.	La structure d'accueil .....	1
1.2.	Impact des maladies cryptogamiques sur les cultures .....	1
1.2.1.	Les cultures.....	1
1.2.2.	Les maladies .....	2
1.3.	Effets environnementaux sur la croissance fongique .....	4
1.3.1.	Température .....	4
1.3.2.	Eléments nutritifs.....	4
1.3.3.	Photopériode et longueur d'onde .....	4
1.4.	Objectif.....	5
<b>2.</b>	<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>6</b>
2.1.	Matériel biologique.....	6
2.2.	Méthodes .....	6
2.2.1.	Milieux de culture.....	6
a)	Milieu V8 .....	6
b)	Milieu Petit Pois.....	6
c)	Milieu Oignon.....	6
d)	Milieu Pomme .....	7
e)	Milieu MEA (Malt Extract Agar) .....	7
f)	Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) .....	7
2.2.2.	Mise en culture .....	7
2.2.3.	Paramètres mesurés .....	7
2.2.4.	Stimulation de la sporulation.....	7
2.2.5.	Analyse statistique .....	7
<b>3.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>8</b>
3.1.	<i>Alternaria solani</i> .....	8
3.2.	<i>Botrytis cinerea</i> .....	8
3.3.	<i>Monilia fructigena</i> .....	9
3.4.	<i>Phytophthora cryptogea</i> .....	10
3.5.	<i>Phytophthora dauci</i> .....	11
3.6.	<i>Phytophthora infestans</i> .....	11
<b>4.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>12</b>
4.1.	Effet de l'alternance de lumière sur la croissance et sporulation .....	12
4.1.1.	<i>Alternaria solani</i> .....	12
4.1.2.	<i>Botrytis cinerea</i> .....	13
4.1.3.	<i>Monilia fructigena</i> .....	14
4.2.	Effet de la température et de trempages successifs sur la croissance et sporulation .....	15
4.2.1.	<i>Phytophthora cryptogea</i> .....	15
4.2.2.	<i>Phytophthora dauci</i> .....	16
4.3.	Effet de la température et du milieu sur la croissance et sporulation .....	17
4.3.1.	<i>Phytophthora infestans</i> .....	17
<b>5.</b>	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>17</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>18</b>
6.1.	Ouvrages (articles et livres) .....	18
6.2.	Ressources en ligne .....	20

# Table des Figures

**Figure 1 :** Symptômes d'alternariose sur feuille (A) et fruit (B) de tomate causée par *Alternaria solani*.

**Figure 2 :** Symptômes du mildiou de la tomate sur tige et feuille (A) et sur fruit (B), causée par *Phytophthora infestans*.

**Figure 3 :** Symptômes de moniliose sur fruit de pêche causée par *Monilia fructigena*.

**Figure 4 :** Symptômes de pourriture grise sur feuille (A) et fruit (B) de tomate causée par *Botrytis cinerea*.

**Figure 5 :** Symptômes de pourritures de racines sur tomate, causée par *Phytophthora cryptogea* (A) et sur carotte, causée par *Phytophthora dauci* (B).

**Figure 6 :** Croissance radiale d'*A. solani* *in vitro* sur milieu V8 à trois expositions de photopériode et longueur d'ondes différentes (photopériode de 12 heures d'UV, photopériode de 12 heures de lumière blanche fluorescente, photopériode de 24 heures de lumière blanche fluorescente), à 20°C.

**Figure 7 :** Croissance radiale d'*A. solani* à 14 jours, sur milieu PDA sous UV (A), sous une photopériode de 12 heures de lumière blanche fluorescente (B) et sous une photopériode de 24 heures de lumière blanche fluorescente (C).

**Figure 8 :** Croissance radiale de *B. cinerea* *in vitro* sur milieu PDA à trois expositions de photopériode et longueur d'onde différentes (photopériode de 12 heures d'UV, photopériode de 12 heures de lumière blanche fluorescente, photopériode de 24 heures de lumière blanche fluorescente), à 20°C.

**Figure 9 :** Croissance radiale de *B. cinerea* à 22 jours sur milieu PDA sous UV (A), sous une photopériode de 12 heures de lumière (B) et sous une photopériode de 24 heures de lumière (C).

**Figure 10 :** Croissance radiale de *M. fructigena* sur trois milieux de cultures *in vitro* (MEA, PDA et pomme) à deux expositions de photopériode et longueur d'onde différentes (lumière et photopériode naturelle et photopériode de 12 heures d'UV), à 20°C.

**Figure 11 :** Croissance radiale de *M. fructigena* à 21 jours, sous lumière naturelle sur milieu MEA (A), PDA (B) et Pomme (C).

**Figure 12 :** Croissance radiale de *P. cryptogea* sur trois milieux de cultures *in vitro* (oignon, petit pois, V8) à 3 températures 18, 20 et 25°C, à l'obscurité.

**Figure 13 :** Croissance radiale de *P. cryptogea* à 25 jours, à 20°C sur milieu oignon (A), petit pois (B) et V8 (C).

**Figure 14 :** Croissance radiale de *P. dauci* sur trois milieux de cultures *in vitro* (oignon, petit pois, V8) à 3 températures 18, 20 et 25°C, à l'obscurité.

**Figure 15 :** Croissance radiale de *P. dauci* à 20 jours, à 18°C sur milieu oignon (A), petit pois (B) et V8 (C).  
Photos de Mateo Unda, Angers, le 19/05/2017.

**Figure 16 :** Croissance radiale de *P. infestans* sur trois milieux de cultures *in vitro* (oignon, petit pois, V8) à 3 températures 18, 20 et 25°C, à l'obscurité.

**Figure 17 :** Croissance radiale de *P. infestans* à 20 jours, à 18°C sur milieu oignon (A), petit pois (B) et V8 (C).

## Table des tableaux

**Tableau I.** Températures optimales pour la croissance mycéienne et la sporulation en laboratoire de : *A. solani*, *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. cryptogea*, *P. dauci* et *P. infestans*.

**Tableau II.** Milieux de culture optimaux pour la croissance mycéienne et la sporulation en laboratoire de : *A. solani*, *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. cryptogea*, *P. dauci* et *P. infestans*.

**Tableau III.** Photopériodes et longueurs d'onde optimales pour la croissance mycéienne et la sporulation en laboratoire de : *A. solani*, *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. cryptogea*, *P. dauci* et *P. infestans*.

**Tableau IV.** Concentration de la sporulation d'*A. solani* à 14, 21 et 28 jours après inoculation avec des photopériodes de 12 heures de lumière UV, 12 heures de lumière blanche fluorescente et 24 heures de lumière blanche fluorescente, sur une culture en croissance.

**Tableau V.** Concentration de la sporulation de *B. cinerea* à 22 jours après inoculation avec 12 heures de lumière UV, 12 heures de lumière blanche fluorescente et 24 heures de lumière blanche fluorescente, sur une culture en croissance.

**Tableau VI.** Concentration de la sporulation de *P. infestans* à 25, 32 et 39 jours après inoculation sur milieu oignon, petit pois et V8, sur une culture en croissance.

**Tableau VII.** Résumé des conditions optimales de température et milieu, pour la sporulation et croissance mycéienne des différents champignons et les conditions utilisées à Végépolys avant le stage.

**Tableau VIII.** Résumé des conditions optimales de lumière et durée, pour la sporulation et croissance mycéienne des différents champignons et les conditions utilisées à Végépolys avant le stage.

**Tableau IX.** Etudes recommandées afin d'optimiser les conditions pour la sporulation des différents champignons.

# Impact des conditions de culture *in vitro* sur le développement fongique

## 1. Introduction

### 1.1. La structure d'accueil

Végépolys est un pôle de compétitivité dans le domaine du végétal composé d'une équipe d'une vingtaine de personnes. Il regroupe des membres tels que des petites et grandes entreprises, des laboratoires de recherche et des centres de formation axés dans le végétal spécialisé. Il a pour objectif de favoriser l'innovation via par exemple l'élaboration de projets collaboratifs, en recherche et développement, pour permettre aux entreprises membres d'améliorer leur compétitivité. Ce pôle a comme objectifs principaux de créer de végétaux innovants, avec de meilleurs rendements et moins d'impacts défavorables sur l'environnement et la santé humaine.

Le pôle possède également un centre de R&D avec trois domaines d'expertise : (i) Innovation variétale, (ii) Protection et Nutrition des plantes, et (iii) Phytochimie, avec respectivement une offre de service pour (i) initier ou accélérer de programmes de sélection, (ii) évaluer des effets de produits de protection ou biostimulants, identifier les organismes phytopathogènes ou bénéfiques des cultures, produire des inocula et (iii) identifier des métabolites secondaires.

Végépolys est situé dans 3 localisations françaises : à Angers, à Orléans et à St. Pol de Léon. Avec un réseau mondial de pôles du végétal, c'est-à-dire avec des partenaires internationaux, Végépolys propose aussi une assistance à ses membres qui envisagent de développer leur activité à l'étranger.

### 1.2. Impact des maladies cryptogamiques sur les cultures

#### 1.2.1. Les cultures

Les champignons sont à la base de plusieurs maladies cryptogamiques des cultures de fruits et de légumes. Parmi elles, notre étude s'est focalisée sur les cultures de carotte, de fruits à noyau et de tomate.

**La culture de carotte (*Daucus carota L.*)** est la plus importante des cultures des Apiaceae dans le monde avec 345 milliers de tonnes produites en France en 2016 (Agreste, 2016). Elle est utilisée comme aliment, ou en industrie pour l'extraction de carotènes précurseurs de vitamine-A (Davis et Raid, 2002). Cette culture peut être atteinte de **pourritures racinaires** causées par *Phytophthora dauci* et par *Phytophthora cryptogea*.

**La pêche (*Prunus persica (L.) Stokes*) et l'abricot (*Prunus armeniaca L.*) sont les fruits à noyau** les plus consommés en Europe. En effet, ils sont consommés directement comme fruits d'été, ou bien transformés en jus, compotes ou autres. En 2016, la France produit 206 milliers de tonnes de pêches et 112 milliers de tonnes d'abricots (Agreste, 2016). Après la récolte, les fruits restent pendant des périodes prolongées en conservation et subissent des affections parasitaires, entraînant des pertes de production (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes, 2009).



**Figure 1 :** Symptômes d'alternariose sur feuille (A) et fruit (B) de tomate causée par *Alternaria solani*.  
Photos de D. Blancard, 2014 (INRA), disponibles sur <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5202/Tomate-Principaux-symptomes>.



**Figure 2 :** Symptômes du mildiou de la tomate sur tige et feuille (A) et sur fruit (B), causée par *Phytophthora infestans*. Photo de Lionel Vandekerckhove, à Angers, 2017 (A). Photo de D. Blancard, 2013 (INRA) disponible sur <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5169/Tomate-Principaux-symptomes> (B).

Ces cultures peuvent être atteintes de **moniliose** causée par *Monilia fructigena*.

**La culture de tomate** (*Lycopersicon esculentum* Mill) est la deuxième culture de légumes la plus importante dans le monde en termes de consommation (INRA, 2017 ; Somappa *et al.*, 2013). En 2016, la France représentait le 7<sup>ème</sup> producteur de tomate de l'Union européenne avec 620 milliers de tonnes (Agreste, 2016). Cette culture peut être atteinte de **mildiou** causé par *Phytophthora infestans* ; d'**alternariose** causée par *Alternaria solani*, de **pourriture grise** causée par *Botrytis cinerea*, ou de **pourritures racinaires** causées par *Phytophthora cryptogea*.

### 1.2.2. Les maladies

Les maladies cryptogamiques sur cultures de carotte, fruits à noyau et tomate sont les causes principales de pertes de production, causant directement des pertes économiques. Parmi elles, l'alternariose (tomate), le mildiou (tomate), la moniliose (prune), la pourriture grise (tomate) et les pourritures de racine (carotte et tomate), sont parmi les maladies les plus problématiques de ces cultures et font l'objet de notre étude.

**L'alternariose est la maladie causée par *Alternaria solani*** sur tomate, sur pomme de terre, aubergine et d'autres solanacées (Van der Waals *et al.*, 2004). **En tomate c'est une maladie très commune qui peut entraîner des pertes de 79% du rendement** (Somappa *et al.*, 2013).

L'alternariose attaque les organes aériens de la plante causant des taches en profondeur sur les fruits verts, qui sont ensuite affectés par d'autres champignons, causant des pourritures humides et des nécroses. Sur feuille, des lésions brunes peuvent collapser et aboutir à des nécroses (**Figure 1**). Sur tige, des chancres peuvent se développer (INRA, 2017).

La température favorable pour le développement d'*A. solani* se situe entre 18 à 30°C. L'humidité est un facteur important pour sa dissémination au champ (INRA, 2017).

**L'agent causal du mildiou** de certaines Solanacées, ***Phytophthora infestans***, est un oomycète particulièrement problématique **pour les cultures de tomate, pouvant entraîner jusqu'à 100% des pertes de production** (Goufo *et al.*, 2008). L'agent pathogène du mildiou attaque tous les organes aériens causant des taches humides sur les folioles qui deviennent brunes et commencent à se nécroser. Sur tige et sur bouquets floraux, se forment des chancres bruns, pouvant entraîner la perte des fleurs. Sur fruit, des marbrures brunes apparaissent entraînant des pourritures plus molles et la perte de la production (INRA, 2017) (**Figure 2**).

**La progression des symptômes est très rapide, causant des pertes supérieures à 3 milliards de dollars par an à niveau mondial (Fry, 2008).** Les conditions favorables dépendent des espèces et parfois des souches, mais en général elles ont besoin d'une humidité relative supérieure à 90% (INRA, 2017). Les nuits froides et les journées chaudes peuvent contribuer à la croissance au champ (INRA, 2017). Chaque espèce possède une température de croissance optimale et, en générale, *P. infestans* se développe entre 4 et 26°C (*Phytophthora Database*, 2016 ; Fry, 2008).



**Figure 3 :** Symptômes de monilioses sur fruit de pêche causée par *Monilia fructigena*. Photo de BASF, 2017, disponible sur [http://www.agro.bASF.fr/agroportal/fr/fr/cultures/arboriculture/les\\_maladies\\_des\\_arbres\\_fruitiers/monilioses\\_des\\_fruits\\_a\\_noix.html](http://www.agro.bASF.fr/agroportal/fr/fr/cultures/arboriculture/les_maladies_des_arbres_fruitiers/monilioses_des_fruits_a_noix.html)



**Figure 4 :** Symptômes de pourriture grise sur feuille (A) et fruit (B) de tomate causée par *Botrytis cinerea*. Photos de D. Blancard, 2013 (INRA), disponibles sur <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5175/Tomate-Principaux-symptomes>



**Figure 5 :** Symptômes de pourritures de racines sur tomate, causée par *Phytophthora cryptogea* (A) et sur carotte, causée par *Phytophthora dauci* (B). Photos de Lionel Vandekerckhove, à Angers, 2017.

**La moniliose est la maladie causée par *Monilia fructigena*** sur divers fruits à pépins et à noyaux, notamment sur pêches et abricots. Elle est à la base de dégâts importants plus en conservation qu'en production (Attrassi *et al.*, 2005 ; Poniatowska *et al.*, 2013). En effet, la maladie cause rapidement des pourritures après la récolte, lors du transport et la conservation, **pouvant atteindre jusqu'à 30 % de pertes** (BASF, 2017).

La moniliose apparaît plutôt sur les fruits blessés par des conditions biotiques ou abiotiques causant des pourritures fermes et brunes. Après la récolte, les symptômes apparaissent rapidement sous forme d'une pourriture ferme, marron foncé avec un contour régulier. S'il y a des conditions humides, il y aura la formation de coussinets blancs qui deviennent gris non concentriques (**Figure 3**). Si les conditions sont sèches, il n'y a pas de formation de coussinets, par contre des lenticelles avec des auréoles noires se forment (INRA, 2016). Les conditions favorables à son développement sont des températures entre 21 et 25°C, une humidité élevée et radiation UV (Attrassi *et al.*, 2005 ; De Cal et Melgarejo, 1999 ; Mari *et al.*, 2012 ; Marquenie *et al.*, 2002 ; Poniatowska *et al.*, 2013).

**La pourriture grise est la maladie causée par *Botrytis cinerea*.** Ce champignon nécrotrophe attaque plusieurs plantes de production comme la tomate, la vigne et la fraise. Lors d'une attaque par *B. cinerea*, jusqu'à **25% des plantes d'une plantation peuvent être affectées** entraînant des pertes économiques considérables (INRA, 2017).

L'agent pathogène attaque toutes les parties aériennes de la plante. Sur tiges il peut y avoir formation de chancres, sur folioles, des taches circulaires et humides, et sur le limbe, des dessèchements évoluent en pourriture et nécrose (**Figure 4**). Il provoque des pourritures sur fruit pendant la culture puis en conservation (INRA, 2017).

Les conditions favorables pour le développement de ce pathogène sont une humidité relative autour de 95%, avec une température entre 17 et 23°C (INRA, 2017), ce champignon nécrotrophe colonise les tissus en stade de sénescence (INRA, 2017).

Plusieurs organismes peuvent causer des pourritures racinaires. Deux pathogènes importants et difficilement diagnostiqués sont ***Phytophthora dauci* et *Phytophthora cryptogea***, causant des pertes d'entre **10 et 25% de la production** dans des cultures de carotte (Davis et Raid, 2002). Le premier affecte les cultures de carotte (*Phytophthora Database*, 2016) et le deuxième, les cultures de carotte et de tomate. Cependant, il peut aussi affecter d'autres cultures comme la courgette ou l'aubergine (*Phytophthora Database*, 2016).

Cette pourriture attaque le système racinaire des cultures, soit au champ, soit en stockage. Les parties infectées deviennent de marron foncé à noir avec une structure gommeuse (**Figure 5**). Puis, la partie plus basse de la tige commence à noircir et les feuilles à jaunir (Davis et Raid, 2002 ; Erwin et Ribeiro, 1996).

La maladie commence à se développer à partir de 15°C avec une humidité élevée (Davis et Raid, 2002 ; Erwin et Ribeiro, 1996). Par contre, *in vitro*, *P. dauci* se développe avec des températures entre 0 et 21°C (*Phytophthora Database*, 2016) et *P. cryptogea* se développe avec des températures entre 1 et 33°C (*Phytophthora Database*, 2016).

**Tableau I.** Températures optimales pour la croissance mycéienne et la sporulation en laboratoire de : *A. solani*, *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. cryptogea*, *P. dauci* et *P. infestans*.

Organisme	Température optimale	Référence
<i>Alternaria solani</i>	25°C	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2010 ; Somappa <i>et al.</i> , 2013)
<i>Botrytis cinerea</i>	25°C	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
	20°C	(Fernández <i>et al.</i> , 2014)
	18°C	(Dik <i>et al.</i> , 1999)
<i>Monilia fructigena</i>	25°C	(Mari <i>et al.</i> , 2012)
	22°C	(Poniatowska <i>et al.</i> , 2013)
<i>Phytophthora cryptogea</i>	25°C	(Safaiefarahani <i>et al.</i> , 2015)
	20 – 30°C	(Otaye <i>et al.</i> , 2006)
	22 – 25°C	( <i>Phytophthora</i> Database, 2016)
<i>Phytophthora dauci</i>	12 – 21°C	(Bertier <i>et al.</i> , 2013)
	0 – 21°C	( <i>Phytophthora</i> Database, 2016)
<i>Phytophthora infestans</i>	20 – 25°C	(Fry, 2008)
	20°C	( <i>Phytophthora</i> Database, 2016)

**Tableau II.** Milieux de culture optimaux pour la croissance mycéienne et la sporulation en laboratoire de : *A. solani*, *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. cryptogea*, *P. dauci* et *P. infestans*.

Organisme	Milieu optimal	Référence
<i>Alternaria solani</i>	Potato Dextrose Broth (PDB) (liquide)	(Somappa <i>et al.</i> , 2013)
	Potato Dextrose Agar (PDA), V8	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2010)
<i>Botrytis cinerea</i>	PDA	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
<i>Monilia fructigena</i>	PDA	(Attrassi <i>et al.</i> , 2005 ; Poniatowska <i>et al.</i> , 2013)
	Malt Extract Agar (MEA), pomme	(Attrassi <i>et al.</i> , 2005)
<i>Phytophthora cryptogea</i>	Corn Meal Agar (CMA), PDA, milieu carotte, MEA, milieu de chanvre	(Safaiefarahani <i>et al.</i> , 2015)
<i>Phytophthora dauci</i>	PDA, CMA, V8	(Bertier <i>et al.</i> , 2013)
<i>Phytophthora infestans</i>	V8	(Kim et Jeun, 2006 ; Ho, 1970)
<i>Phytophthora</i> sp	Oignon	(Ho, 1970)

## 1.3. Effets environnementaux sur la croissance fongique

Différents facteurs affectent le développement des structures fongiques au champ, principalement la température et l'humidité. Au laboratoire, sur milieux de cultures *in vitro*, les principaux paramètres affectant la production mycéienne ou de spores sont la température, les éléments nutritifs et la photopériode et la longueur d'onde (Basu *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2008).

### 1.3.1. Température

La température est un facteur très important pour la croissance fongique. Ils peuvent vivre dans un grand écart de température, cependant, leur croissance, leur métabolisme (Li *et al.*, 2009) et la formation de leurs structures reproductive varient selon la température (Rodrigues *et al.*, 2010). De plus, les champignons n'ont pas tous la même température optimale, il peut y avoir des différences entre microorganismes ou même lors de l'interaction avec un hôte (Rodrigues *et al.*, 2010).

Les températures optimales en laboratoire pour *A. solani*, *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. cryptogea*, *P. dauci* et *P. infestans* peuvent s'apprécier dans le **Tableau I**.

### 1.3.2. Eléments nutritifs

Les microorganismes sont capables de se développer dans différents environnements avec différentes sources d'éléments nutritifs. Il est indispensable d'avoir des milieux de cultures adaptés à leurs besoins afin de pouvoir ensuite les cultiver. En effet, les milieux de culture utilisés sont riches en macroéléments essentiels à leur survie, utilisés pour la synthèse de carbohydrates, lipides, protéines, acides nucléiques, mais aussi en microéléments qui jouent des rôles dans les enzymes et cofacteurs. Pour la croissance fongique, les milieux de culture ont des concentrations élevées de carbohydrates et d'azote, avec des pH entre 5 et 6 pour assurer une croissance entre 15 et 37°C. Ils en existent de deux types, naturels et synthétiques. Les premiers sont élaborés à base de substances naturelles comme grains, feuilles, tiges ; par exemple Potato Dextrose Agar (PDA) à base de pomme de terre ou V8 à base d'un mélange de végétaux. Les deuxièmes sont élaborés avec des quantités définies de nutriments, permettant de connaître exactement leur composition (Basu *et al.*, 2015).

Les milieux optimaux en laboratoire les plus souvent reportés dans la littérature pour *A. solani*, *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. cryptogea*, *P. dauci* et *P. infestans* peuvent s'apprécier dans le **Tableau II**.

### 1.3.3. Photopériode et longueur d'onde

Deux autres facteurs importants pour la croissance et le développement des champignons : la photopériode et la longueur d'onde. En effet, la formation de structures reproductive peut être affectée par différentes expositions lumineuses (Rodrigues *et al.*, 2010).

La lumière est capable de réguler différents aspects dans la vie d'un champignon qui peuvent influencer sa capacité de dissémination et donc de survie. Par exemple la croissance et la direction de croissance, la reproduction sexuée et asexuée, ou la formation de pigments. Certains photorécepteurs ont été mis en évidence, lesquels pourraient inhiber ou stimuler la sporulation (Idnurm et Heitman, 2005).

Les photopériodes et longueurs d'onde optimales en laboratoire pour *A. solani*, *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. cryptogea*, *P. dauci* et *P. infestans* peuvent s'apprécier dans le **Tableau III**.

**Tableau III.** Photopériodes et longueurs d'onde optimales pour la croissance mycélienne et la sporulation en laboratoire de : *A. solani*, *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. cryptogea*, *P. dauci* et *P. infestans*.

Organisme	Photopériode et longueur d'onde optimale	Référence
<i>Alternaria solani</i>	Lumière UV-A constante	(Rodrigues et al., 2010)
	Photopériode de 12 heures d'UV-A	(Landschoot et al., 2016 ; Rodrigues et al., 2010)
<i>Botrytis cinerea</i>	Photopériode de 12 heures de lumière	(Lee et al., 2006)
	Photopériode de 16 heures de lumière fluorescente	(Fernández et al., 2014)
	Lumière UV-A constante	(Dik et al., 1999)
<i>Monilia fructigena</i>	Photopériode de 12 heures de lumière	(Mari et al., 2012)
	Photopériode de 12 heures de lumière UV-A	(Poniatowska et al., 2013)
<i>Phytophthora cryptogea</i>	Obscurité	(Safaiefarahani et al., 2015 ; Otaye et al., 2006 ; <i>Phytophthora</i> Database, 2016)
<i>Phytophthora dauci</i>	Obscurité	(Bertier et al., 2013 ; <i>Phytophthora</i> Database, 2016)
<i>Phytophthora infestans</i>	Obscurité	(Kim et Jeun, 2006 ; Ho, 1970 ; Fry, 2008 ; <i>Phytophthora</i> Database, 2016)

## 1.4. Objectif

Afin de lutter contre les pertes provoquées par ces maladies fongiques sur les cultures, il existe des méthodes de protection conventionnelles ou de biocontrôle. L'usage de fumigations avec des produits chimiques à base de matières actives comme le maneb, le mancozeb ou le chlorothalonil pour l'alternariose par exemple, reste important. Malgré cela, la seule utilisation des fongicides n'est pas suffisante pour éviter les pertes (Landschoot *et al.*, 2016). Pour cela, la recherche constante de nouveaux produits reste une priorité pour les firmes phytosanitaires et la réalisation de programmes de développement passent nécessairement par des essais au champ.

Végépolys offre parmi ses services, un service de production d'inoculum utilisé pour des expérimentations au champ. Les demandes sont en forte augmentation et ce laboratoire souhaite mettre à jour ces compétences en termes de production d'inoculum et d'identifier, dans le cadre de ce stage, les paramètres optimums pour la croissance du mycélium ou la production des spores des agents pathogènes les plus problématiques et les plus demandés pour la production d'inoculum.

L'objectif visé de ce stage est de déterminer les conditions optimums de température, photopériode, longueur d'ondes et milieux de culture pour la croissance et la sporulation des champignons ciblés. Avant ce stage, les difficultés existantes concernaient une croissance mycélienne insuffisante et/ou une faible sporulation de certaines souches.

Plus précisément, l'objectif du stage a été de définir les conditions optimums de culture *in vitro* des pathogènes suivants :

*Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora dauci* et *Phytophthora infestans*.

En effet, des difficultés rencontrées de façon récurrente avec *A. solani* et *B. cinerea*, concernent un problème de sporulation et de vitesse de croissance mycélienne faible.

Pour *M. fructigena*, *P. cryptogea* *P. dauci* et *P. infestans*, les difficultés rencontrées au laboratoire d'accueil concernent une faible sporulation.

La démarche de recherche a été la suivante :

- faire un état des lieux des paramètres optimums de culture *in vitro* des pathogènes ciblés
- identifier les paramètres majeurs parmi la température, la photopériode et la longueur d'onde, et les milieux de culture pour chaque agent pathogène ciblé
- tester différentes conditions pour chacun des paramètres ciblés
- évaluer l'impact sur la croissance mycélienne et la sporulation
- analyser et identifier les conditions ayant une amélioration significative de la croissance et/ou sporulation

L'objectif général est donc d'optimiser la production d'inoculum en termes de qualité et quantité.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Matériel biologique

Les organismes utilisés dans cette étude sont des différents champignons appartenant au règne *Fungi* :

***Alternaria solani* Sorauer** : source SNES, isolé sur tomate.

***Botrytis cinerea* Pers.** : source Végépolys, isolé sur tomate provenant du département Maine-et-Loire (49), 2014.

***Monilia fructigena* (Pers.) Pers.** : source Végépolys, isolé à partir de prune, 2015.

Et aussi des champignons appartenant au règne *Chromista* :

***Phytophthora cryptogea* Pethybr. et Laff** : source Végépolys, isolé sur endive en 2007.

***Phytophthora dauci* Bertier, H. Brouwer et De Cock** : isolé à partir de carotte, provenant du département Manche (50), 2016.

***Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary** : source Eurofins, provenant de Loos-en-Gohelle.

### 2.2. Méthodes

#### 2.2.1. Milieux de culture

##### a) Milieu V8

Le milieu V8-Clarifié, appelé uniquement V8 dans cette étude, a été préparé en ajoutant 20 mL de jus V8 avec 380 mL d'eau osmosée et 6 g d'agar. Le jus V8 a été préparé en centrifugeant un mélange de 160 mL de V8 pur avec 2 g  $\text{CaCO}_3$ , pendant 10 minutes à 4000 rpm. Le mélange a été autoclavé pendant 20 minutes à 121°C.

##### b) Milieu Petit Pois

Un milieu modifié de Ho (1970) consiste à préparer un bouillon de petit pois en faisant bouillir 300 g de petits pois surgelés dans 2 L d'eau osmosée et en les faisant mijoter pendant 45 minutes. Puis une filtration avec un tamis a été faite pour éliminer la partie solide (800 mL de bouillon récupérés). Le milieu Petit Pois a ensuite été préparé en autoclivant 400 mL de bouillon de petit pois avec 3,8 g d'agar, pendant 20 minutes à 121°C. Après un refroidissement à 60°C, 16 mg/L de rifampicine a été ajouté de façon stérile.

##### c) Milieu Oignon

Un milieu modifié de Ho (1970) consiste à préparer un bouillon d'oignon en faisant bouillir 649,3 g d'oignons pelés, coupés en petits morceaux avec 3,2 L d'eau osmosée et en les faisant mijoter pendant 45 minutes. Puis une filtration avec un tamis a été faite pour éliminer la partie solide (1500 mL de bouillon récupérés). Le milieu Oignon a été préparé en autoclivant 400 mL de bouillon d'oignon avec 6 g d'agar, pendant 20 minutes à 121°C.

#### d) Milieu Pomme

Un milieu modifié d'Attrassi *et al.* (2005) a été préparé en autoclavant 500 mL de jus de pomme pressé avec 7,5 g d'agar, pendant 20 minutes à 121°C, en vérifiant un pH=5,8 (le jus de pomme a un pH acide, entre 3 et 4, qui ne permet pas de gélifier le milieu).

#### e) Milieu MEA (Malt Extract Agar)

Le milieu MEA (Becton, Dickinson and Co.) a été préparé en autoclavant 6,8 g d'extrait de malt et 4 g d'agar en 400 mL d'eau osmosée, pendant 20 minutes à 121°C.

#### f) Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Le milieu PDA (VWR Prolabo Chemicals) a été préparé en autoclavant 15,6 g de PDA en 400 mL d'eau osmosée pendant 20 minutes à 121°C.

### 2.2.2. Mise en culture

Les cultures ont été réalisées à partir de plugs mycéliens conservés à -80°C. Un repiquage a ensuite été réalisé en déposant un plug de 4 mm prélevé sur la marge externe en croissance sur une nouvelle boîte de Pétri. Les cultures ont été maintenues en étuve aux différentes températures d'incubation étudiées (18, 20 et 25°C) et des expositions de lumières différentes ont été comparées (lumière naturelle, photopériode de 12 heures de lumière blanche fluorescente de 4800 lumen (Philips, 4 x 50 W), photopériode de 24 heures de lumière blanche fluorescente de 4800 lumen (Philips, 4 x 50 W), photopériode de 12 heures de lumière noire de longueur d'onde entre 320 et 400 nm (UV-A), 5 x 30W)

### 2.2.3. Paramètres mesurés

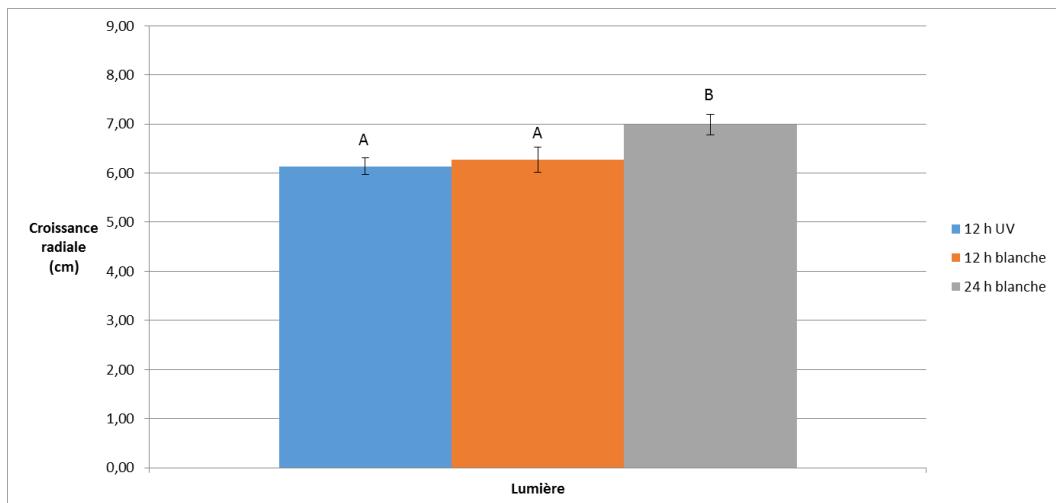
Les paramètres mesurés ont été la **croissance radiale** des colonies, en mesurant le diamètre des colonies ; et la **sporulation**, mesurée en extrayant les spores d'une culture en croissance de chaque modalité avec 2 mL d'eau osmosée à l'aide d'un râteau stérile. Le dénombrement de spores est réalisé avec une cellule de Malassez.

### 2.2.4. Stimulation de la sporulation

Pour *P. dauci*, une culture en croissance avec milieu V8 a été trempée avec 5 mL d'eau osmosée, incubée à 18°C en changeant l'eau un jour sur deux, pendant une semaine. Pour *P. cryptogea*, 10 orifices de 4 mm de diamètre ont été réalisés dans la colonie sur milieu V8, puis la culture en croissance a été trempée avec de l'eau osmosée, incubée à 25°C en changeant l'eau un jour sur deux, pendant une semaine.

### 2.2.5. Analyse statistique

Chaque condition a été traitée avec 6 répétitions. Les données obtenues suivent des lois normales et ont été analysées par le test statistique LSD-Fisher avec un niveau de confiance du 95%, en utilisant le logiciel Statgraphics.



**Figure 6 :** Croissance radiale d'*A. solani* *in vitro* sur milieu V8 à trois expositions de photopériode et longueur d'ondes différentes (photopériode de 12 heures d'UV, photopériode de 12 heures de lumière blanche fluorescente, photopériode de 24 heures de lumière blanche fluorescente), à 20°C.

Les mesures ont été effectuées après 14 jours de culture. Les barres d'erreurs correspondent à un intervalle de confiance de 95%, n=6, les groupes homogènes indiqués ont été obtenus par l'analyse LSD de Fisher.



**Figure 7 :** Croissance radiale d'*A. solani* à 14 jours, sur milieu PDA sous UV (A), sous une photopériode de 12 heures de lumière blanche fluorescente (B) et sous une photopériode de 24 heures de lumière blanche fluorescente (C). Photos de Mateo Unda, Angers, le 29/05/2017.

**Tableau IV.** Concentration de la sporulation d'*A. solani* à 14, 21 et 28 jours après inoculation avec des photopériodes de 12 heures de lumière UV, 12 heures de lumière blanche fluorescente et 24 heures de lumière blanche fluorescente, sur une culture en croissance.

Lumière	Spores/mL		
	14 Jours après inoculation	21 Jours après inoculation	28 Jours après inoculation
12 heures UV	$2,50 \times 10^3$	$5,50 \times 10^3$	$6 \times 10^3$
12 heures blanche fluorescente	$5,00 \times 10^3$	$1,45 \times 10^4$	$1,60 \times 10^4$
24 heures blanche fluorescente	0	$5,00 \times 10^3$	$5,50 \times 10^3$

### 3. Résultats

#### 3.1. *Alternaria solani*

Les conditions de température et milieu de culture ont été fixées à 20°C (non optimale pour des raisons de logistique) et milieu V8. Trois conditions de lumière ont été comparées (photopériode 12 heures avec lumière UV-A, photopériode 12 heures avec lumière blanche fluorescente, photopériode 24 heures avec lumière blanche fluorescente).

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la croissance mycélienne**, des mesures de croissance radiale ont été relevées 4, 9 et 14 jours après mise en culture.

Les résultats obtenus à 14 jours étant le plus discriminant, ceux-ci sont présentés dans la **Figure 6**.

Nos résultats montrent que :

- Le diamètre moyen maximum observé est de 6,98 cm pour la modalité photopériode de 24 heures de lumière blanche fluorescente, et est significativement supérieur à celui observé dans les autres conditions.
- Le diamètre moyen minimum observé est de 6,14 cm pour la condition de lumière blanche fluorescente à une photopériode de 12 heures. Il n'y a pas de différences significatives avec la condition de 12 heures de lumière UV avec lequel on observe un diamètre moyen de 6,28 cm.

La **Figure 7** montre qu'il existe un polymorphisme dans les colonies d'*A. solani*. En effet, nous observons des zones de croissance noires et d'autres blanches. Morphologiquement il n'y a pas de grandes différences entre les trois conditions de cultures. Les champignons semblent évoluer de la même façon.

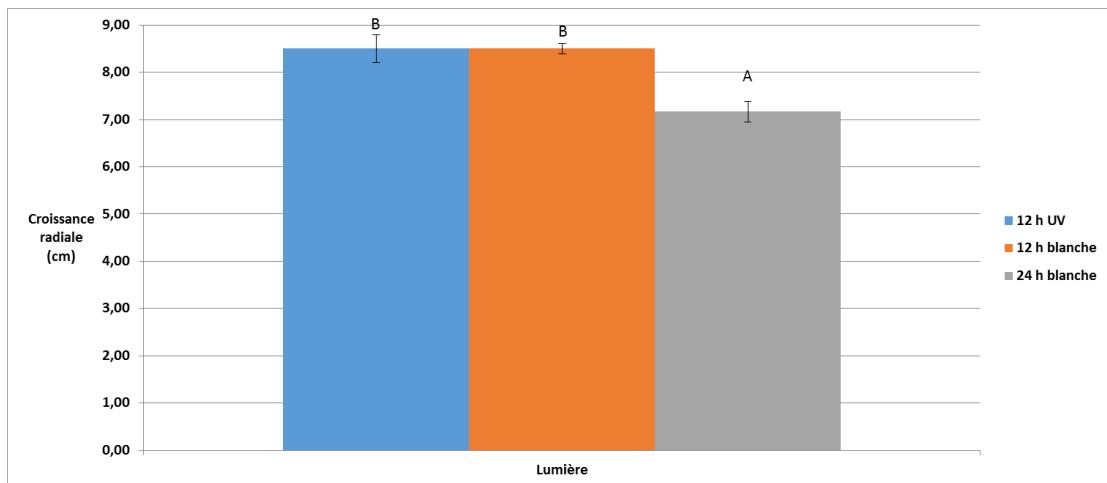
Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la production de spores**, des observations sous loupe ont été réalisées chaque semaine sur le mycélium en croissance et le nombre de conidies a été évalué. A 7 jours, le début de la sporulation est observé mais est trop faible pour être compté.

Le comptage qui a été réalisé à 14, 21 et 28 jours sur une répétition (une boîte de culture) est résumé dans le **Tableau IV**. La lumière constante a donné comme résultat une inhibition de la sporulation jusqu'à 14 jours de culture. La concentration de spores à 14 jours avec 12 heures de lumière blanche fluorescente a été le double qu'avec 12 heures d'UV et de l'ordre de  $10^3$  spores/mL.

A partir de 21 jours de culture avec 12h de lumière blanche, nous obtenons une concentration de l'ordre de  $10^4$  spores/mL, qui est supérieure à celle obtenue dans les autres conditions de lumière ( $10^3$ ).

#### 3.2. *Botrytis cinerea*

Les conditions de température et milieu de culture ont été fixées à 20°C et milieu PDA. Trois conditions de lumière ont été comparées (photopériode 12 heures avec lumière UV-A, photopériode 12 heures avec lumière blanche fluorescente, photopériode 24 heures avec lumière blanche fluorescente).



**Figure 8 :** Croissance radiale de *B. cinerea* *in vitro* sur milieu PDA à trois expositions de photopériode et longueur d'onde différentes (photopériode de 12 heures d'UV, photopériode de 12 heures de lumière blanche fluorescente, photopériode de 24 heures de lumière blanche fluorescente), à 20°C. Les mesures ont été effectuées après 6 jours de culture. Les barres d'erreurs correspondent à un intervalle de confiance de 95%, n=6, les groupes homogènes indiqués ont été obtenus par l'analyse LSD de Fisher.



**Figure 9 :** Croissance radiale de *B. cinerea* à 22 jours sur milieu PDA sous UV (A), sous une photopériode de 12 heures de lumière (B) et sous une photopériode de 24 heures de lumière (C). Photos de Mateo Unda, Angers, le 07/06/2017.

**Tableau V.** Concentration de la sporulation de *B. cinerea* à 22 jours après inoculation avec 12 heures de lumière UV, 12 heures de lumière blanche fluorescente et 24 heures de lumière blanche fluorescente, sur une culture en croissance.

Lumière	Spores/mL
	22 Jours après inoculation
12 heures UV	$6,18 \times 10^6$
12 heures blanche fluorescente	$1,04 \times 10^6$
24 heures blanche fluorescente	$4,10 \times 10^5$

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la croissance mycélienne**, des mesures de croissance radiale ont été relevées 2, 3 et 6 jours après mise en culture.

Les résultats obtenus à 6 jours étant le plus discriminant, ceux-ci sont présentés dans la **Figure 8**.

Nos résultats montrent que :

- Les diamètres moyens maximums observés sont de 8,50 cm pour les modalités de lumière UV et de lumière blanche fluorescente à une photopériode de 12 heures, sans différence significative entre eux et significativement supérieurs à l'autre condition.
- Le diamètre moyen minimum observé est de 7,17 cm pour la modalité de lumière blanche fluorescente à une photopériode de 24 heures.

La **Figure 9** montre qu'avec une photopériode de 12 heures de lumière UV ou 12 heures lumière blanche fluorescente, il y a une formation de cercles concentriques, ce qui n'est pas observable avec la photopériode de 24 heures de lumière blanche fluorescente. Dans les trois cas il y a des colorations marron et blanches duveteuses.

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la production de spores**, des observations sous loupe ont été faites chaque semaine sur les cultures en croissances de chaque modalité. A 6 jours il y a une faible sporulation qui commence et qui n'est pas comptabilisable. L'apparence physique du mycélium et la sporulation ne sont pas homogènes dans toutes les cultures en croissance de la même condition, raison pour laquelle le comptage des spores, sur une culture, s'est fait au moment où tous les mycéliums dans la même condition avaient la même apparence.

Le comptage peut s'observer dans le **Tableau V**. Nous observons au bout de 22 jours de cultures avec 12h de lumière UV, une concentration de conidies de  $6,18 \times 10^6$  spores/mL. Avec la condition de 12 heures de lumière blanche fluorescente, la concentration est inférieure ( $1,04 \times 10^6$  spores/mL). La concentration la plus faible, s'obtient avec la condition de 24 heures de lumière blanche fluorescente ( $4,10 \times 10^5$  spores/mL).

### 3.3. *Monilia fructigena*

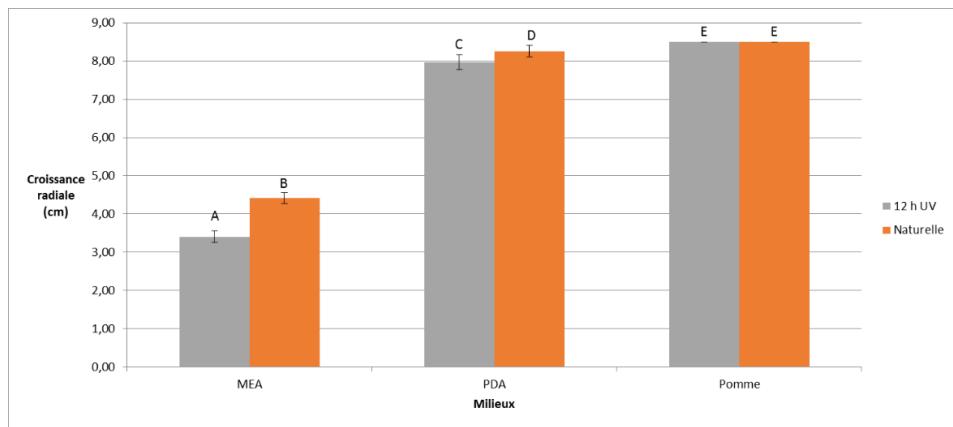
La température a été fixée à 20°C (non optimale par des raisons logistiques). Deux conditions de lumière ont été comparées (photopériode avec lumière naturelle et photopériode 12 heures avec lumière UV-A), ainsi que trois milieux de culture (MEA, PDA et pomme).

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la croissance mycélienne**, des mesures de croissance radiale ont été relevées à 4, 11 et 17 jours après mise en culture.

Les résultats obtenus à 17 jours étant le plus discriminant, ceux-ci sont présentés dans la **Figure 10**.

Nos résultats montrent que :

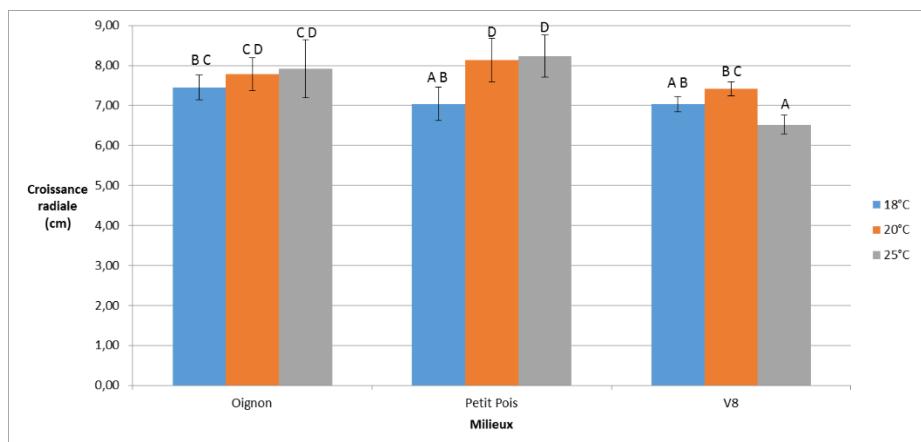
- Le diamètre moyen maximum est obtenu en conditions de lumière naturelle sur milieu MEA et PDA (4,42 et 8,26 cm respectivement) avec un diamètre significativement supérieur à la condition de lumière UV.



**Figure 10 :** Croissance radiale de *M. fructigena* sur trois milieux de cultures *in vitro* (MEA, PDA et pomme) à deux expositions de photopériode et longueur d'onde différentes (lumière et photopériode naturelle et photopériode de 12 heures d'UV), à 20°C. Les mesures ont été effectuées après 17 jours de culture. Les barres d'erreurs correspondent à un intervalle de confiance de 95%, n=6, les groupes homogènes indiqués ont été obtenus par l'analyse LSD de Fisher.



**Figure 11 :** Croissance radiale de *M. fructigena* à 21 jours, sous lumière naturelle sur milieu MEA (A), PDA (B) et Pomme (C). Photos de Mateo Unda, Angers, le 19/05/2017.



**Figure 12 :** Croissance radiale de *P. cryptogea* sur trois milieux de cultures *in vitro* (oignon, petit pois, V8) à 3 températures 18, 20 et 25°C, à l'obscurité.

Les mesures ont été effectuées après 7 jours de culture. Les barres d'erreurs correspondent à un intervalle de confiance de 95%, n=6, les groupes homogènes indiqués ont été obtenus par l'analyse LSD de Fisher.

- Le diamètre moyen maximum est observé sur milieu pomme avec un diamètre supérieur à 8 cm et significativement supérieur aux autres milieux de culture quelle que soit la condition de lumière. Cependant, le diamètre moyen obtenu avec le milieu PDA est élevé et autour de 8 cm.
- Les diamètres moyens miniums sont de de 3,41 et 4,42 cm, observés sur le milieu MEA, respectivement avec les conditions de lumières UV et naturelle.

La **Figure 11** montre que sur milieu pomme et PDA le mycélium est plus abondant et aérien que sur milieu MEA. De plus, sur ces deux milieux la colonie commence à changer de couleur et adopter une coloration plus marronne en profondeur.

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la production de spores**, des observations sous loupe ont été faites chaque semaine sur une culture en croissance de chaque modalité. A 17 jours nous observons des tubes germinatifs qui commencent à se former mais uniquement sur milieu PDA avec une photopériode de 12 heures de lumière UV. Cependant, ils sont très localisés et en faibles quantités. Jusqu'à la fin de cette étude il n'y a pas eu d'évolution des tubes germinatifs et le comptage de spores n'a donc pas pu être réalisé.

### 3.4. *Phytophthora cryptogea*

Trois conditions de température ont été comparées (18, 20 et 25°C), à l'obscurité, pour leurs effets sur la croissance et sporulation, ainsi que trois milieux de cultures : oignon, petit pois et V8.

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la croissance mycélienne**, des mesures de croissance radiale ont été relevées à 2, 7 et 10 jours après mise en culture.

Les résultats obtenus à 7 jours étant le plus discriminant, ceux-ci sont présentés dans la **Figure 12**.

Nos résultats montrent que :

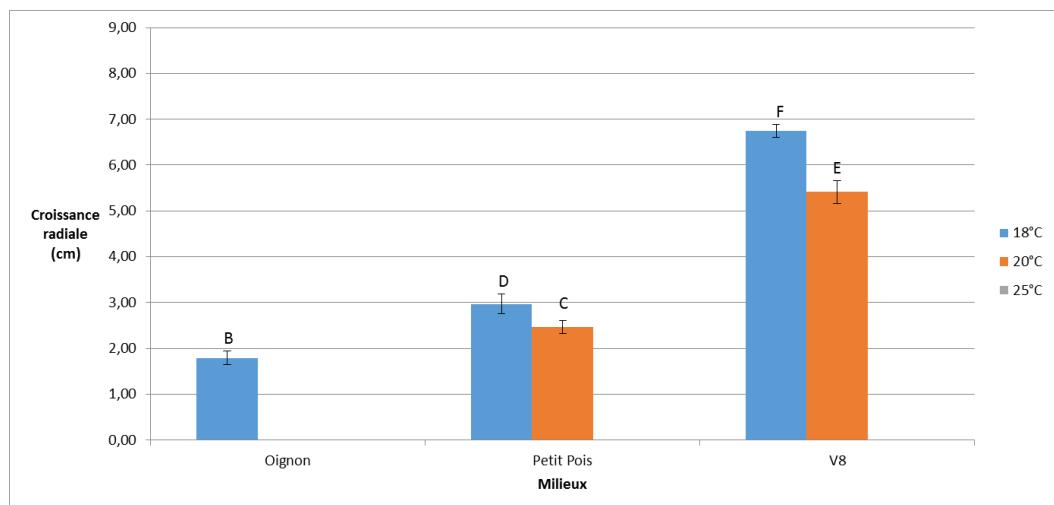
- Les diamètres moyens maximums sont observés à 20 et 25°C sur les milieux de culture oignon (7,78 et 7,92 cm respectivement) et petit pois (8,13 et 8,23 cm respectivement), sans différence significative entre eux.
- Pour les milieux oignon et petit pois, le diamètre moyen est maximal à la température de 20 (7,78 et 8,13 cm respectivement) et 25°C (7,92 et 8,23 cm respectivement).

La **Figure 13** montre que la croissance mycélienne est plus abondante sur milieux oignon et petit pois où les colonies sont rosacées. Les colonies sont rasantes sans modèle défini sur milieu V8. Sur milieu Oignon, la colonie semble plus épaisse et duveteuse.

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la production de spores**, des observations sous loupe ont été faites chaque semaine sur les cultures en croissance de chaque modalité. Au bout de 34 jours nous observons une faible sporulation (8 sporanges par boîte), uniquement sur milieu V8 à 25°C. Pour cette raison, une stimulation de la sporulation a été faite comme décrite au point 2.2.4 du Matériel et Méthodes. Un jour après l'ajout de l'eau osmosée nous observons quelques sporanges. Au bout de 6 jours il y a une sporulation mais en faible quantité ( $3,03 \times 10$  sporanges/mL) et, la plupart sont ancrés dans la gélose.



**Figure 13 :** Croissance radiale de *P. cryptogea* à 25 jours, à 20°C sur milieu oignon (A), petit pois (B) et V8 (C). Photos de Mateo Unda, Angers, le 19/05/2017.



**Figure 14 :** Croissance radiale de *P. dauci* sur trois milieux de cultures *in vitro* (oignon, petit pois, V8) à 3 températures 18, 20 et 25°C, à l'obscurité.

Les mesures ont été effectuées après 24 jours de culture. Les barres d'erreurs correspondent à un intervalle de confiance de 95%, n=6, les groupes homogènes indiqués ont été obtenus par l'analyse LSD de Fisher.



**Figure 15 :** Croissance radiale de *P. dauci* à 20 jours, à 18°C sur milieu oignon (A), petit pois (B) et V8 (C). Photos de Mateo Unda, Angers, le 19/05/2017.

### 3.5. *Phytophthora dauci*

Trois conditions de température (18, 20 et 25°C), à l'obscurité, et trois milieux de cultures : oignon, petit pois et V8 ont été comparées pour leur effet sur la croissance et la sporulation.

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la croissance mycélienne**, des mesures de croissance radiale ont été relevées à 10, 17 et 24 jours après mise en culture.

Les résultats obtenus à 24 jours étant le plus discriminant, ceux-ci sont présentés dans la **Figure 14**.

Nos résultats montrent que :

- Le diamètre moyen maximum observé est pour le milieu V8, à 18°C de 6,74 cm, significativement supérieur à celui des autres conditions.
- A 25°C la croissance mycélienne est inhibée quel que soit le milieu.
- Les diamètres moyens maximums observés pour les milieux oignon, petit pois et V8 sont à 18°C respectivement de 1,79, 2,97 et 6,74 cm, significativement supérieur aux diamètres obtenus à 20°C et 25°C.

La **Figure 15** montre que sur milieu oignon et petit pois ce champignon forme des colonies stolonifères, tandis que sur milieu V8 la colonie est très lisse, sans modèle défini.

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la production de spores**, des observations sous loupe ont été faites chaque semaine sur les cultures en croissance. Après 35 jours de culture, aucune sporulation n'est observée quel que soit les conditions. Pour cette raison, une stimulation de la sporulation a été faite comme décrite au point 2.2.4 du Matériel et Méthodes. Un jour après l'ajout de l'eau osmosée, nous observons des sporanges. Au bout de 5 jours nous observons  $5,83 \times 10^3$  sporanges/mL, soit  $1,46 \times 10^5$  sporanges par boîte, cependant les sporanges poussent à l'intérieur de la gélose.

### 3.6. *Phytophthora infestans*

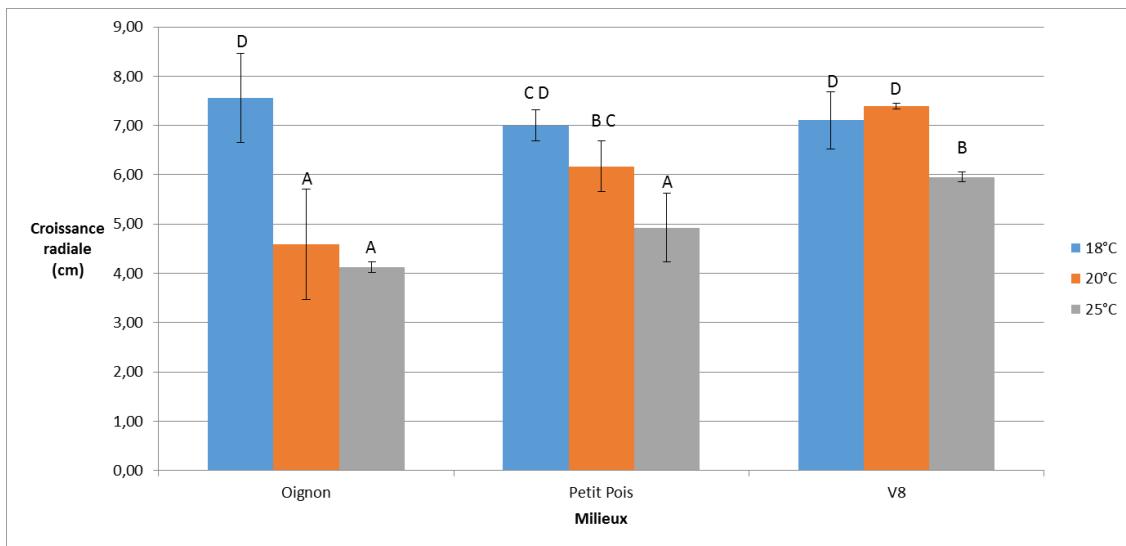
Trois conditions de température ont été comparées (18, 20 et 25°C), à l'obscurité, pour leurs effets sur la croissance et sporulation, ainsi que trois milieux de cultures : oignon, petit pois et V8.

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la croissance mycélienne**, des mesures de croissance radiale ont été relevées à 7, 14 et 21 jours après mise en culture.

Les résultats obtenus à 21 jours étant le plus discriminant, ceux-ci sont présentés dans la **Figure 16**.

Nos résultats montrent que :

- Le diamètre moyen maximum est observé avec la température à 18°C quel que soit le milieu de culture.
- Le diamètre moyen observé sur le milieu V8 (7,32 et 6,57 cm respectivement) est significativement plus grand que celui obtenu avec les autres milieux à 20 et 25°C. A 18°C, les différences ne sont pas significatives (7,44 cm).



**Figure 16 :** Croissance radiale de *P. infestans* sur trois milieux de cultures *in vitro* (oignon, petit pois, V8) à 3 températures 18, 20 et 25°C, à l'obscurité.

Les mesures ont été effectuées après 21 jours de culture. Les barres d'erreurs correspondent à un intervalle de confiance de 95%, n=6, les groupes homogènes indiqués ont été obtenus par l'analyse LSD de Fisher.



**Figure 17 :** Croissance radiale de *P. infestans* à 20 jours, à 18°C sur milieu oignon (A), petit pois (B) et V8 (C). Photos de Mateo Unda, Angers, le 19/05/2017.

**Tableau VI.** Concentration de la sporulation de *P. infestans* à 25, 32 et 39 jours après inoculation sur milieu oignon, petit pois et V8, sur une culture en croissance.

Milieu	Sporanges/mL		
	25 jours après inoculation	32 jours après inoculation	39 jours après inoculation
Oignon	$1,55 \times 10^4$	$5,00 \times 10^4$	$6,20 \times 10^4$
Pois	$2,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$
V8	$1,55 \times 10^4$	$5,00 \times 10^4$	$1,22 \times 10^5$

La **Figure 17** montre que la croissance mycélienne est plus abondante, épaisse et duveteuse sur milieux oignon. Sur milieu petit pois et V8 elles sont rasantes, sans modèle défini. Cependant, sur milieu oignon le mycélium commence à être aérien et pousser sur le couvercle.

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres sur **la production de spores**, des observations sous loupe ont été faites chaque semaine sur les cultures en croissance de chaque modalité.

La sporulation commence à 19 jours à 20°C, mais n'est pas comptabilisable. Elle est plus abondante sur milieu V8 que sur milieu petit pois.

Nous observons que le maximum de conidies est observé au bout de 39 jours de culture sur milieu V8 avec une quantité de  $1,22 \times 10^5$  sporanges/mL. Néanmoins, des concentrations de l'ordre de  $10^4$  spores/mL s'obtiennent dès 25 jours après inoculation sur milieux oignon et V8 avec  $1,55 \times 10^4$  sporanges/mL (**Tableau VI**).

## 4. Discussion

Notre étude a permis d'évaluer : (i) l'effet de l'alternance de lumière sur la croissance et sporulation d'*A. solani*, *B. cinerea* et *M. fructigena*, (ii) l'effet de la température et de trempages successifs sur la croissance et la sporulation de *P. cryptogea* et *P. dauci*, et (iii) l'effet de la température et du milieu de culture sur la croissance et la sporulation de *P. infestans*. L'objectif est d'améliorer les productions d'inoculum réalisés à Végépolys (**Tableau VII**), d'identifier les conditions optimales de lumière et durée dans cette étude (**Tableau VIII**), et de proposer des pistes d'amélioration (**Tableau IX**).

### 4.1. Effet de l'alternance de lumière sur la croissance et sporulation

#### 4.1.1. *Alternaria solani*

L'étude de l'impact de la longueur d'onde et de la photopériode, sur milieu V8 à 20°C indique que la condition de lumière blanche fluorescente constante, permet d'obtenir une croissance mycélienne significativement plus grande que dans les autres conditions de lumière. On peut noter toutefois que la croissance dans les deux autres conditions est satisfaisante avec un diamètre radial de la colonie supérieur à 6 cm après 14 jours de culture. **L'exposition à la lumière semble avoir un impact positif sur la croissance mycélienne**, ce qui correspond aux résultats d'études précédentes (Lukens, 1963 ; Rodrigues *et al.*, 2010).

Dans notre étude, les conditions de lumière optimum pour obtenir une sporulation satisfaisante, correspondent cependant à une photopériode de 12 heures de lumière blanche, avec une concentration de l'ordre de  $10^4$  spores/mL.

**Tableau VII.** Résumé des conditions optimales de température et milieu, pour la sporulation et croissance mycélienne des différents champignons et les conditions utilisées à Végépolys avant le stage.

Organisme	Température		Milieu	
	Avant	A l'issue du stage	Avant	A l'issue du stage
<i>Alternaria solani</i>	20°C		V8	
<i>Botrytis cinerea</i>	20°C		MEA	PDA
<i>Monilia fructigena</i>	20°C		Pomme (compote)	Pomme (jus) PDA
<i>Phytophthora cryptogea</i>	20°C	➤ 20 ou 25°C pour croissance mycélienne ➤ 25°C pour sporulation (avec stimulation)	V8	➤ Oignon et petit pois pour croissance mycélienne ➤ V8 pour sporulation (avec stimulation)
<i>Phytophthora dauci</i>	17-18°C	18°C	V8	V8
<i>Phytophthora infestans</i>	20°C	➤ 18°C pour croissance mycélienne ➤ 20°C pour sporulation	V8	➤ Petit pois ou V8 pour croissance mycélienne ➤ V8 pour sporulation

Nos résultats sont en accord avec ce qui est reporté dans la littérature scientifique, à savoir, **une stimulation de la sporulation *in vitro* sous une lumière blanche** fluorescente (380-775 nm) ou sous lumière UV (320-400 nm) (Rodrigues et al., 2010). Les conditions les moins favorables pour la sporulation dans notre étude sont 24 h de lumière. Et, il a effectivement été rapporté qu'une radiation constante peut apporter **un excès de longueur d'ondes bleues qui induisent une inhibition de la sporulation** (Rodrigues et al., 2010).

L'ensemble de ces données indiquent donc qu'une lumière blanche constante stimulerait la croissance mycélienne mais inhiberait la sporulation.

Il a en effet été reporté qu'une photopériode est nécessaire pour induire la sporulation (Rodrigues et al., 2010). L'exposition à une radiation de longueur d'onde entre 320 et 775 nm stimule la formation de conidiophores, tandis qu'elle inhibe la formation des conidies, laquelle a lieu pendant la phase obscure. Par conséquent, une obscurité ou lumière constante, ou une radiation avec une lumière de longueur d'onde non adéquate va induire une production majoritairement d'hyphe (Rodrigues et al., 2010).

**Des études récentes montrent l'existence de photorécepteurs** qui seraient à la base de la stimulation ou de l'inhibition de la sporulation (Fuller et al., 2014). Plus précisément, des études sur *A. solani*, ont mis en évidence la présence de composés (riboflavine-5-phosphate,  $\beta$ -carotène, P310) possiblement inducteurs de la sporulation (Lukens, 1963 ; Rodrigues et al., 2010). Ces photorécepteurs sont des protéines qui subissent des changements morphologiques suite à une exposition à la lumière, principalement bleue ou rouge et qui interagissent avec des chromophores qui absorbent la lumière afin de déclencher des changements structuraux et physicochimiques avec une cascade de signalisation dans la sporulation (Fuller et al., 2014).

#### 4.1.2. *Botrytis cinerea*

Dans notre étude, la meilleure condition pour avoir une sporulation est une photopériode de 12 heures de lumière UV ( $6 \times 10^6$  spores/mL), suivie de la photopériode de 12 heures de lumière blanche fluorescente ( $1 \times 10^6$  spores/mL).

L'ensemble de nos résultats indique que la lumière semble avoir un effet positif sur la croissance mycélienne quel que soit la longueur d'onde. En effet, avec une lumière blanche fluorescente ou avec une lumière UV, les mêmes résultats de croissance mycélienne sont obtenus. Par contre, **la photopériode semble être une condition importante pour la croissance mycélienne** : en éclairage continu, la croissance mycélienne est significativement réduite. Certains auteurs reportent cependant de bonnes croissances de *B. cinerea* à l'obscurité (Marquenine et al., 2002), mais cette modalité n'a pas été testée dans ce stage.

Nous observons des colonies non homogènes pour les trois conditions de photopériodes. Certaines modalités commencent à sporuler très tôt (6 jours), tandis que d'autres prennent du temps à montrer des changements (22 jours). Ces constatations ne sont pas reportées dans les études réalisant des croissances à l'obscurité (Marquenine et al., 2002). L'incubation à l'obscurité permet peut être d'obtenir des colonies plus homogènes, et donc une sporulation de meilleure qualité.

**Tableau VIII.** Résumé des conditions optimales de lumière et durée, pour la sporulation et croissance mycélienne des différents champignons et les conditions utilisées à Végépolys avant le stage.

Organisme	Lumière		Durée	
	Avant	A l'issue du stage	Avant	A l'issue du stage
<i>Alternaria solani</i>	12 h lumière blanche fluorescente	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 24 h lumière blanche fluorescente pour croissance mycélienne</li> <li>➤ 12 h lumière blanche fluorescente pour sporulation</li> </ul>	21 jours	14 jours
<i>Botrytis cinerea</i>	Obscurité	12 h lumière blanche fluorescente	21 jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 6 jours pour croissance mycélienne</li> <li>➤ 22 jours pour sporulation</li> </ul>
<i>Monilia fructigena</i>	Obscurité	12 h lumière UV pour croissance mycélienne	21 jours	7 jours pour croissance mycélienne
<i>Phytophthora cryptogea</i>	Obscurité		15 jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 7 jours pour croissance mycélienne</li> <li>➤ 12 jours pour sporulation</li> </ul>
<i>Phytophthora dauci</i>	Obscurité		30 jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 24 jours pour croissance mycélienne</li> <li>➤ 29 jours pour sporulation</li> </ul>
<i>Phytophthora infestans</i>	Obscurité		21 jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 21 jours pour croissance mycélienne</li> <li>➤ 25 jours pour sporulation</li> </ul>

Dans notre étude, les longueurs d'onde entre 440 et 490 nm semblent permettre une meilleure sporulation, cela a été reporté par l'étude de Canessa (Canessa *et al.*, 2013).

Avant ce stage, une incubation uniquement à l'obscurité était réalisée et la concentration de spores n'était pas comptabilisée due à la faible sporulation obtenue.

Pour le cas de cet organisme, la morphologie de la colonie pourrait représenter un indice de la sporulation. En effet, les concentrations plus élevées de spores se trouvent dans les colonies où la formation de cercles concentriques avec des colorations marron et blanches duveteuses était plus importante. Un excès de lumière a montré être un facteur de stress pour cet organisme, entraînant l'accumulation d'un pigment foncé, tandis qu'une alternance de 12 heures de lumière fait, parfois, apparaître un pattern de bandes grisâtres dues à une formation de conidies à la lumière et bandes blanches dues à une absence de conidies à l'obscurité (Canessa *et al.*, 2013).

En effet, la réponse de cet organisme face à la lumière dépend de la souche utilisée. Il a été mis en évidence l'existence de 4 comportements différents : (i) des souches qui produisent des sclérotes à l'obscurité et des conidies avec une alternance de 12 heures de lumière blanche fluorescente avec une longueur d'onde entre 400 et 720 nm, (ii) des souches qui produisent majoritairement des sclérotes quelle que soit la photopériode, (iii) des souches qui produisent majoritairement des conidies quelle que soit la photopériode et (iv) des souches qui produisent majoritairement du mycélium duveteux quelle que soit la photopériode (Canessa *et al.*, 2013). Dans la même étude, en comparant avec le génome de *Neurospora crassa*, il a été mis en évidence la présence de plusieurs gènes codant pour des protéines sensibles à la lumière bleu et UV (cryptochromes) (*bccry1*, *bccry2*, *bcwcl1*, *bcwcl2*), qui pourraient interagir avec des gènes codant pour des protéines sensibles à la lumière rouge (phytochromes) (*bcphy1*, *bcphy2*, *bcphy3*) et avec plusieurs facteurs de transcription (SUB-1, SAH-1, VAD-3, CSP-1) pour déclencher ainsi une cascade de signalisation permettant une alternance entre reproduction sexué et asexué (Canessa *et al.*, 2013).

#### **4.1.3. *Monilia fructigena***

Dans notre étude nous observons que le milieu pomme favorise la croissance mycélienne : après 7 jours de culture le champignon atteint sa croissance maximale. On peut noter que la croissance sur le milieu PDA bien que non optimale est cependant satisfaisante. Le milieu MEA ne semble pas adapté à la croissance de *M. fructigena*.

Il semblerait que *M. fructigena* ait besoin de sucres complexes (présente dans le milieu PDA) comme l'amidon pour sa croissance mycélienne.

Le milieu optimal serait donc le milieu pomme ou PDA. En effet, les milieux organiques comme celui de la pomme doivent être utilisés avec prudence étant donné que leur composition exacte n'est pas connue (Basu *et al.*, 2015) et de leur variabilité éventuelle dans les variétés.

**Tableau IX.** Etudes recommandées afin d'optimiser les conditions pour la sporulation des différents champignons.

Organisme	Poursuite
<i>Alternaria solani</i>	25°C et milieu V8, avec une photopériode de 24 heures de lumière blanche fluorescente, pendant au moins 14 jours.
<i>Botrytis cinerea</i>	Incubation sur PDA à 20°C, à l'obscurité, pendant 7 jours, suivi d'un éclairage avec une photopériode de 12 heures de lumière UV ou de lumière blanche fluorescente à 20°C
<i>Monilia fructigena</i>	(i) Incubation à l'obscurité, à 21 ou 25°C ; (ii) incubation avec une condition de photopériode contrôlée de 12 heures de lumière blanche fluorescente ; (iii) incubation à l'obscurité, à 22°C, sur milieu PDA avec acétone 1% ; (iv) diminuer à une température entre 5 et 10°C pendant 60 jours ; (v) incubation sur milieu V8
<i>Phytophthora cryptogea</i>	Préparer le milieu V8 avec de la rifampicine. Faire 10 orifices de 4 mm de diamètre dans la colonie sur milieu V8, puis tremper avec de l'eau osmosée, incuber à 25°C en changeant l'eau tous les jours pendant une semaine.
<i>Phytophthora dauci</i>	Préparer le milieu V8 avec de la rifampicine. Tremper la colonie avec de l'eau osmosée, incuber à 18°C en changeant l'eau tous les jours pendant une semaine.
<i>Phytophthora infestans</i>	Préparer le milieu V8 avec de la rifampicine.

Dans notre étude, aucune sporulation n'a été observée quel que soit le milieu de culture. Il a pourtant été signalé une sporulation maximale à 25°C et moyenne à 18°C sur un milieu préparé avec des pommes après 10 jours d'incubation à l'obscurité (Attrassi *et al.*, 2005). Dans cette étude, une température de 20°C a été utilisée par des raisons de logistique et une photopériode a été appliquée.

Quelques tubes germinatifs commencent à se développer uniquement sur milieu PDA avec une photopériode de 12 heures de lumière UV. Cependant, ils sont présents en très faibles quantités. Cela peut s'expliquer car les rayons UV-A ont une longueur d'onde maximale de 400 nm et ce sont les longueurs d'onde entre 440 et 490 nm qui stimulent la croissance mycélienne et les organes fructifères (De Cal et Melgarejo, 1999). La présence de photorécepteurs est suggérée, étant donné que la croissance mycélienne est mieux observée à la lumière et la sporulation est observée à l'obscurité (De Cal et Melgarejo, 1999). Ayant cette constatation avec des rayons UV-A, les photorécepteurs présents doivent être sensibles à la lumière bleue comme chez *A. solani* et *B. cinerea* (4.1.1. *Alternaria solani* et 4.1.2. *Botrytis cinerea*). L'obscurité pourrait donc favoriser la sporulation de *M. fructigena*.

Il a été montré aussi que le milieu V8 donne de bons résultats pour la sporulation, cela en incubant pendant 7 jours à l'obscurité à 21°C, puis en changeant vers un nouveau milieu et en incubant 7 jours de plus (Marquenine *et al.*, 2002). De plus, une photopériode de 12 heures de lumière blanche fluorescente sur milieu V8 à 25°C a eu aussi des bons résultats (Mari *et al.*, 2012).

Dans certaines études précédentes, les auteurs ont proposé d'augmenter le temps de culture à 60 jours et de baisser à une température entre 5 et 10°C ; ou bien de repiquer le champignon sur un milieu PDA enrichi avec une concentration d'acétone 1% et incuber à l'obscurité et 22°C pendant 10 jours (De Cal et Melgarejo, 1999).

## 4.2. Effet de la température et de trempages successifs sur la croissance et sporulation

### 4.2.1. *Phytophthora cryptogea*

Nous observons dans notre expérimentation de meilleures croissances avec des températures élevées (20 et 25°C) quel que soit le milieu de culture testé. Cela est corroboré par d'autres études (Otaye *et al.*, 2006 ; Safaiefarahani *et al.*, 2015).

Le mycélium observé est abondant, épais et duveteux sur les milieux oignon et petit pois. A 10 jours, la croissance mycélienne atteint son maximum pour toutes les conditions, y compris le milieu V8.

Cependant, après 30 jours de culture, il n'y a aucune sporulation sur milieu oignon et petit pois, tandis que sur milieu V8 de sporanges sont observées.

En effet, il a été rapporté que les colonies duveteuses ont tendance à produire moins de oospores que les colonies rasantes pour favoriser une reproduction sexuée (Erwin et Ribeiro, 1996). De plus, plusieurs études sur cet organisme montrent que la sporulation est plus difficile à obtenir en milieu solide qu'en milieu liquide (Erwin et Ribeiro, 1996 ; Otaye *et al.*, 2006 ; Safaiefarahani *et al.*, 2015).

Dans d'autres études, en alternative aux milieux liquides, des trempages de la colonie, des solutions salines ou des radiations sont utilisés pour stimuler la sporulation (De Jonghe *et al.*, 2005 ; Erwin et Ribeiro, 1996 ; Otaye *et al.*, 2006 ; Safaiefarahani *et al.*, 2015). La sporulation de *Phytophthora* sp dépend beaucoup

des conditions environnementales, en effet, la plupart du temps, la production de sporanges commence quand les concentrations de sucres dans le milieu diminuent drastiquement, quand il existe une bonne oxygénation, quand il y a une humidité relative très élevée et quand il y a les températures adéquates pour l'espèce (Erwin et Ribeiro, 1996).

Dans le cas de *Phytophthora cryptogea*, nous avons réussi à stimuler la sporulation par trempage des colonies et incubation à 25°C sur milieu V8. Cependant, la concentration des sporanges à 6 jours reste très faible (environ 30 sporanges/mL). Sur milieux oignon et petit pois il n'y a pas eu de sporulation, par contre il y a eu un gonflement des hyphes, que certains auteurs considèrent comme d'autres structures permettant la reproduction (Erwin et Ribeiro, 1996).

C'est ainsi qu'avec une finalité de production de sporanges, la meilleure option serait de réaliser une croissance sur milieu V8, puis d'induire la sporulation avec la méthode décrite au point 2.2.4 du Matériel et Méthodes. La durée de cette étude n'a pas permis, malheureusement, de réaliser une cinétique sur la sporulation de ce champignon. Il serait donc recommandable de refaire ce protocole de stimulation de la sporulation avec plusieurs boîtes de *P. cryptogea* sur milieu V8, avec une croissance mycéienne de 5 jours de croissance, à l'obscurité, à 25°C. Comme ça été décrit avant, l'utilisation d'eau osmosée apporte les conditions d'humidité nécessaires et le changement de la même semble apporter une bonne oxygénation.

#### 4.2.2. *Phytophthora dauci*

La plus grande croissance mycéienne est observée à 18°C. Au fur et à mesure que la température augmente, la croissance diminue jusqu'à être complètement inhibée à 25°C. Même si la plupart de ces champignons se développent dans des températures plus élevées, *P. dauci* montre en effet une croissance optimale entre 12 et 21°C (Bertier et al., 2013).

En observant les résultats obtenus sur les différents milieux de culture, l'optimum s'obtient avec le milieu V8. En effet, d'autres études reportent des bonnes croissances en utilisant le milieu V8 ainsi que le milieu CMA (Bertier et al., 2013). La croissance sur milieu petit pois et sur milieu oignon est très faible (<3 cm à 24 jours d'incubation) et les colonies stolonifères ne permettent pas une bonne observation des structures.

Les milieux de culture apportent les nutriments nécessaires pour le développement des microorganismes. Cependant, les besoins varient au sein de différentes espèces du même genre. Le milieu oignon donne des résultats optimums de croissance pour *P. cryptogea*, tandis que le milieu V8 donne les plus faibles, par contre pour *P. dauci* ces résultats sont inversés. Comme la composition exacte de ces milieux n'est pas connue (Basu et al., 2015), il manquerait des informations pour savoir quel métabolite ou quel nutriment permet une bonne croissance pour l'un et une mauvaise pour l'autre.

Après une culture de 35 jours, aucune sporulation n'est observée. Cependant l'induction de la sporulation par trempage est stimulée sur milieu V8 uniquement. Sur milieux oignon et petit pois, nous observons le gonflement des hyphes, sans sporulation. La durée de cette étude n'a pas permis, malheureusement, de

réaliser une cinétique sur la sporulation de ce champignon. La meilleure option serait de réaliser une croissance en milieu V8, puis d'induire la sporulation avec la méthode décrite au point 2.2.4 du Matériel et Méthodes.

### 4.3. Effet de la température et du milieu sur la croissance et sporulation

#### 4.3.1. *Phytophthora infestans*

Dans notre étude, nous observons une croissance optimale à une température de 18 puis 20°C.

En effet, des études précédentes suggèrent une bonne croissance avec des températures entre 20 et 25°C, avec un optimum à 20°C (Fry, 2008 ; *Phytophthora Database*, 2016).

Au cours de 21 jours, Les milieux montrent différents résultats dépendamment de la température. Une des meilleures conditions testées est à 18°C sur milieu oignon. Cependant, ce mycélium est très aérien et une partie commence à pousser sur le couvercle, tandis qu'une autre partie continue dans la gélose. Il serait donc mieux d'utiliser les deux autres milieux, petit pois à une température de 18°C ou V8 à une température de 18 ou 20°C où les croissances aussi ont été satisfaisantes.

Nos résultats indiquent que la sporulation est observée pour les trois conditions de milieu de culture, à 20°C, mais elle est 6 fois plus importante sur milieu V8 que sur milieux oignon et petit pois. L'optimum de la sporulation de l'ordre de  $10^5$  s'obtient à 39 jours après inoculation, cependant, des bons comptages de l'ordre de  $10^4$  s'obtiennent dès 25 jours après inoculation.

Pour les trois espèces de *Phytophthora*, il y a eu présence de bactéries en surface de la gélose sur les milieux oignon et V8. La présence d'un autre microorganisme entraîne la compétition pour l'espace et les nutriments du milieu et pourrait affecter négativement la croissance et la sporulation de *Phytophthora sp*. Par contre, sur milieu petit pois, qui a été préparé avec de la rifampicine, cet organisme était absent. Les meilleurs résultats pour la sporulation de *Phytophthora sp* et pour la croissance de *P. dauci* ont été obtenus avec le milieu V8. Des études précédentes utilisent le même milieu avec des antibiotiques, 150 ppm d'ampicilline et 100 ppm de rifampicine (Goufo et al., 2008). L'utilisation d'un antibiotique serait donc nécessaire pour garantir la qualité de l'inoculum.

## 5. Conclusions et perspectives

Dans cette étude, des conditions de cultures faisant varier un à deux des paramètres suivants, température, lumière et composition du milieu de culture ont été comparées pour leur effet sur la croissance mycélienne et la sporulation de 6 champignons.

Premièrement, un effet de l'alternance de lumière sur la croissance et sporulation d'*A. solani*, *B. cinerea* et *M. fructigena* a été mis en évidence. En effet, notre étude améliore le protocole d'***Alternaria solani*** pour la production de spores avec 12 h lumière blanche fluorescente. Les perspectives sont d'utiliser une température de 25°C (Rodrigues et al., 2010 ; Somappa et al., 2013) afin d'obtenir meilleurs résultats en moins de temps. Cette étude améliore la sporulation de ***Botrytis cinerea*** en utilisant 12 h lumière blanche fluorescente. Par contre, il faut attendre 22 jours pour avoir des colonies homogènes dans les mêmes conditions. Afin d'obtenir

meilleurs résultats en moins de temps, les perspectives sont de tester une croissance en obscurité, suivie de l'exposition à la lumière.

Cette étude accélère la croissance de ***Monilia fructigena*** avec 12 h de lumière UV et milieu de pomme ou PDA, mais sans sporulation. Les perspectives sont de tester d'autres méthodes: obscurité ou alternance de 12 de lumière; températures entre 21 et 25°C ou entre 5 et 10°C ; et enrichir avec acétone et incubation sur milieu V8.

Deuxièmement, un effet de la température et de trempages successifs sur la croissance et la sporulation de *P. cryptogea* et *P. dauci* a été mis en évidence. En effet, cette étude permet d'améliorer la production de mycélium de ***Phytophthora cryptogea*** en utilisant un milieu de petit pois ou d'oignon à 20 ou 25°C. La sporulation n'a pas été suffisante. Il faudrait incuber sur milieu V8 enrichi avec rifampicine, à 25°C et augmenter la fréquence des trempages afin d'améliorer l'oxygénéation. La sporulation de ***Phytophthora dauci*** n'a pas été suffisante non plus, mais, de même, elle permet d'avoir des perspectives en faisant le même protocole décrit pour *P. cryptogea*, mais à 18°C.

Troisièmement, un effet de la température et du milieu de culture sur la croissance et la sporulation de *P. infestans* a été mis en évidence. Cette étude permet d'obtenir plus de mycélium de ***Phytophthora infestans*** en réalisant l'inoculation sur milieu petit pois ou V8 à 18°C. Cependant, pour la sporulation, les conditions optimales utilisées auparavant (20°C sur milieu V8), ont donné les meilleurs résultats. Les perspectives sont d'obtenir des meilleurs résultats en préparant le milieu V8 avec de la rifampicine.

## 6. Bibliographie

### 6.1. Ouvrages (articles et livres)

- Attrassi, K., Selmaoui, K., Ouazzani, A., Badoc, A., et Douira, A. (2005). Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 144(1-2), 47-62. Repéré à : <http://socpharmbordeaux.asso.fr/pdf/pdf-144/144-047-062.pdf>
- Basu, S., Bose, C., Ojha, N., Das, N., Das, J., Pal, M., et Khurana, S. (2015). Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation*, 11(4), 182-184. doi:10.6026/97320630011182
- Bertier, L., Brouwer, H., de Cock, A., Cooke, D., Olsson, C., et Höfte, M. (2013). The expansion of Phytophthora clade 8b: three new species associated with winter grown vegetable crops. *Persoonia*, 31, 63-76. doi:10.3767/003158513X668554
- Canessa, P., Schumacher, J., Hevia, M., Tudzynski, P., et Larrondo, L. (2013). Assessing the Effects of Light on Differentiation and Virulence of the Plant Pathogen *Botrytis cinerea*: Characterization of the White Collar Complex. *PLoS ONE*, 8(12), e84223. doi:10.1371/journal.pone.0084223
- Davis, R., et Raid, R. (2002). *Compendium of Umbelliferous Crop Diseases*. Minnesota, USA: APS Press, p. 1-3 ; 37.
- De Cal, A., et Melgarejo, P. (1999). Effects of Long-Wave UV Light on *Monilinia* Growth and Identification of Species. *Plant Disease*, 83(1), 62-65. doi:10.1094/PDIS.1999.83.1.62

- De Jonghe, K., De Dobbelaere, I., Sarrazyn, R., et Höfte, M. (2005). Control of Phytophthora cryptogea in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1. *Plant Pathology*, 54, 219-226. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01140.x
- Dik, A., Koning, G., et Köhl, J. (1999). Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 115-122. doi:10.1023/A:1008623210258
- Erwin, D., et Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide* (2<sup>e</sup> éd.). St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, p. 301-309 ; 346-352.
- Fernández, E., Segarra, G., et Trillas, M. (2014). Physiological effects of the induction of resistance by compost or *Trichoderma asperellum* strain T34 against *Botrytis cinerea* in tomato. *Biological Control*, 78, 77-85. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.06.012
- Fry, W. (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), 385-402. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x
- Fuller, K., Hurley, J., Loros, J., et Dunlap, J. (2014). Photobiology and Circadian Clocks in Neurospora. Dans K. Esser, et M. Nowrousian (dir.), *Fungal Genomics* (2<sup>e</sup> éd., Vol. 13 The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research). Berlin, Heidelberg, Allemagne: Springer, p. 123.
- Goufo, P., Teugwa, C., Fontem, D., et Ngnokam, D. (2008). High efficacy of extracts of Cameroon plants against tomato late blight disease. *Agronomy for Sustainable Development*, 28, 567-573. doi:10.1051/agro:2008036
- Ho, H. (1970). A Study on the Growth and Sporulation of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Sydowia*, 24, 51-58. Repéré à : [http://www.zobodat.at/pdf/Sydowia\\_24\\_0051-0058.pdf](http://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_24_0051-0058.pdf)
- Idnurm, A., et Heitman, J. (2005). Light Controls Growth and Development via a Conserved Pathway in the Fungal Kingdom. *PLoS Biology*, 3(4), e95. doi:10.1371/journal.pbio.0030095
- Kim, H., et Jeun, Y. (2006). Resistance Induction and Enhanced Tuber Production by Pre-inoculation with Bacterial Strains in Potato Plants against *Phytophthora infestans*. *Microbiology*, 34(2), 67-72. doi:10.4489/MYCO.2006.34.2.067
- Landschoot, S., Vandecasteele, M., Carrette, J., De Baets, B., Höfte, M., Audenaert, K., et Haesaert, G. (2016). Assessing the Belgian potato *Alternaria* population for sensitivity to fungicides with diverse modes of action. *Europe Journal of Plant Pathology*, 148(3), 657-672. doi:10.1007/s10658-016-1123-3
- Lee, J., Lee, S.-W., Kim, C., Son, J., Song, J., Lee, K., . . . Moon, B. (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 37(3), 329-337. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.01.001
- Li, Y., Wadsö, L., et Larsson, L. (2008). Impact of temperature on growth and metabolic efficiency of *Penicillium roqueforti* – correlations between produced heat, ergosterol content and biomass. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1494-1501. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04110.x
- Lukens, R. (1963). Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *American Journal of Botany*, 50(7), 720-724. Repéré à : [https://www.jstor.org/stable/2440051?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/2440051?seq=1#page_scan_tab_contents)

- Mari, M., Martini, C., Guidarelli, M., et Neri, F. (2012). Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. *Biological Control*, 60(2), 132-140. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.10.013
- Marquenie, D., Lammertyn, J., Geeraerd, A., Soontjens, C., Van Impe, J., Nicolaï, B., et Michiels, C. (2002). Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 27-35. doi:10.1016/S0168-1605(01)00719-x
- Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes. (2009). *Monilinia fructicola*. *Bulletin OEPP/EPPO*, 39, 337-343.
- Otaye, D., Von Broembsen, S., et Khare, K. (2006). Effect of water temperature on zoospore repeated emergence by waterborne *Phytophthora cryptogea* isolates. *Indian Phytopathology*, 59(1), 16-21. Repéré à : <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IPPJ/article/view/17242/8229>
- Poniatowska, A., Michalecka, M., et Bielenin, A. (2013). Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4), 855-865. doi:10.1007/s10658-012-0130-2
- Rodrigues, T., Maffia, L., Dhingra, O., et Mizubuti, E. (2010). In vitro production of conidia of *Alternaria solani*. *Tropical Plant Pathology*, 35(4), 203-212. doi:10.1590/S1982-56762010000400001
- Safaiefarahani, B., Mostowfizadeh-Ghalmfarsa, R., Hardy, G., et Burgess, T. (2015). Re-evaluation of the *Phytophthora cryptogea* species complex and the description of a new species, *Phytophthora pseudocryptogea* sp. nov. *Mycological Progress*, 14, 108. doi:10.1007/s11557-015-1129-9
- Somappa, J., Srivastava, K., Sarma, B., Pal, C., et Kumar, R. (2013). Studies on growth conditions of the tomato alternaria leaf spot causing *alternaria solani* L. *The Bioscan*, 8(1), 101-104. Repéré à : [https://www.researchgate.net/publication/257410606\\_STUDIES\\_ON\\_GROWTH\\_CONDITIONS\\_OF\\_THE\\_TOMATO\\_ALTERNARIA\\_LEAF\\_SPOT\\_CAUSING\\_ALTERNARIA\\_SOLANI\\_L\\_MATERIALS\\_AND\\_METHODS](https://www.researchgate.net/publication/257410606_STUDIES_ON_GROWTH_CONDITIONS_OF_THE_TOMATO_ALTERNARIA_LEAF_SPOT_CAUSING_ALTERNARIA_SOLANI_L_MATERIALS_AND_METHODS)
- Van der Waals, J., Korsten, L., et Slippers, B. (2004). Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease*, 88(9), 959-964. doi:10.1094/PDIS.2004.88.9.959

## 6.2. Ressources en ligne

- Agreste. (2016). Bilan Conjoncturel 2016. Repéré le 8 août 2017, sur Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, à : <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/conjibilan2016.pdf>
- BASF. (2017). Les monilioses des fruits à noyau. Repéré le 11 mai 2017, à : [http://www.agro.bASF.fr/agroportal/fr/fr/cultures/arboriculture/les\\_maladies\\_des\\_arbres\\_fruitiers/moniliose\\_des\\_fruits\\_a\\_noyaux.html](http://www.agro.bASF.fr/agroportal/fr/fr/cultures/arboriculture/les_maladies_des_arbres_fruitiers/moniliose_des_fruits_a_noyaux.html)
- INRA. (2016). Maladies et ravageurs du pommier. Repéré le 11 mai 2017, sur Ephytia à : [http://ephytia.inra.fr/fr/P/132/Di\\_gno\\_Pom](http://ephytia.inra.fr/fr/P/132/Di_gno_Pom)
- INRA. (2017). Maladies et ravageurs de la tomate. Repéré le 09 mai 2017, sur Ephytia à : <http://ephytia.inra.fr/fr/P/95/Tomate>
- Phytophthora Database. (2016). Species list. Repéré le 31 mai 2017, à : <http://www.phytophthoradb.org/species.php>

## RÉSUMÉ

L'alternariose, le mildiou, la moniliose, la pourriture grise et les pourritures des racines sont des maladies cryptogamiques entraînant des pertes importantes de production sur les cultures de carotte et de tomate et en verger. Le développement de produits de protection efficaces est donc un challenge permanent pour les firmes phytosanitaires, et l'évaluation de l'efficacité de ces produits passe par une étape nécessairement au champ qui nécessite l'apport d'inoculum artificiel. Cette étude a comme objectif de déterminer les paramètres optimums (température, photopériode, longueur d'ondes et milieu de culture) pour la croissance du mycélium et la sporulation *in vitro* de six agents pathogènes (*Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora dauci* et *Phytophthora infestans*), afin de pouvoir obtenir des inocula en quantité et qualité satisfaisantes.

L'étude sur *A. solani* et *B. cinerea* met en évidence l'importance d'une alternance jour-nuit pour une meilleure quantité de production de spores. Pour *M. fructigena*, une production de spores insatisfaisante a été observée quel que soit les conditions de longueurs d'onde ou de milieux de culture testés. Pour *P. cryptogea* et *P. dauci* une induction par trempage a été nécessaire pour obtenir des sporanges, néanmoins, cette sporulation est faible et insuffisante. Pour *P. infestans* une température de 20°C et un milieu V8 a permis d'obtenir une sporulation satisfaisante

Notre étude a permis d'améliorer les conditions de culture *in vitro* pour *A. solani*, *B. cinerea* et *P. infestans* et ouvre des améliorations possibles pour *M. fructigena*, *P. cryptogea* et *P. dauci*.

## ABSTRACT

Early blight, late blight, brown rot, grey mold and root rot are five cryptogram diseases generating important yield losses in carrot and tomato crops, and in orchards. The development of efficient protection products remains a permanent challenge for the phytosanitary companies, and evaluation of product's efficiency goes through field trials requiring artificial inoculum. The aim of this study is to determine the optimal temperature, photoperiod, wavelength, and culture medium parameters for *in vitro* mycelium growth and sporulation of 6 different pathogens (*Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora dauci* and *Phytophthora infestans*) to obtain sufficient inoculum regarding quality and quantity.

*A. solani*'s and *B. cinerea*'s study showed the importance of a day-night change for spore quantity. Unsatisfactory sporulation results were obtained for *M. fructigena* regardless of the light and medium conditions tested. *P. cryptogea* and *P. dauci* showed sporulation in low concentrations with a soaking induction. *P. infestans* showed a satisfactory sporulation with a temperature of 20°C in V8 medium.

Our study allowed to improve *A. solani*, *B. cinerea* and *P. infestans* *in vitro* culture conditions and proposes possible improvements for *M. fructigena*, *P. cryptogea* and *P. dauci*.

**Keywords :** *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora dauci*, *Phytophthora infestans*, mycelium growth, sporulation, *in vitro* culture.