AGROCAMPUS OUEST

☑ **CFR Angers**

☐ **CFR Rennes**

Année universitaire : 2015-2016 Spécialité : Horticulture Spécialisation (et option éventuelle) : GDV	**Mémoire de fin d'études** ☑ d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage ☐ de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage ☐ d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Dépérissement de la mâche (*Valerianella locusta*) en région nantaise : Étiologie du dépérissement, caractérisation des Pythiacées impliquées et recherche de premières options de protection.

Par : Estelle NODODUS





Soutenu à Angers le 14 septembre 2016

Devant le jury composé de :

Président : Patrice CANNAVO, Enseignant-chercheur Agrocampus Ouest

Maîtres de stage : Jonathan GAUDIN, Ingénieur d'études INRA et Serge MEVEL, CDDM

Enseignant référent : Alexandre DEGRAVE, Enseignant-chercheur Agrocampus Ouest

Perrine DAVID, HM.Clause

Thomas GUILLEMETTE, Enseignant-chercheur de l'Université d'Angers

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation «Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France» disponible en ligne http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr

Confidentialité

☑ Non ☐ Oui si oui : ☐ 1 an ☐ 5 ans ☐ 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible (1).

Date et signature du maître de stage (2) : 09/09/16

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner)

Droits d'auteur

L'auteur(3) **NODODUS Estelle**
autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

☑ Oui ☐ Non

Si oui, il autorise

☐ la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

☑ la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif) ☑ accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-By-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'auteur : 09/09/16

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

☒ Oui ☐ Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.
Si oui, il autorise

☐ la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

☒ la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant : 28/09/16

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.
(2) Signature et cachet de l'organisme
(3).Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études
(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier toutes les personnes de l'UMR SAVE qui m'ont chaleureusement accueillie au sein de leur unité. Je souhaiterais également remercier Florence LARTIGAUT de l'UMR Biologie du Fruit et Pathologie (BFP), qui m'a hébergée pendant trois mois et m'a aidée à m'intégrer dans cette nouvelle ville qu'était Bordeaux. Je souhaiterais remercier les collaborateurs basés au Ctifl et au CDDM de Nantes qui m'ont beaucoup aidée dans mon travail. Je voudrais encore remercie Gwenaelle COMONT qui m'a été d'une aide précieuse pour les analyses bioinformatiques, ainsi qu'Aurélia NIVAULT et Lucile MUNERET qui, en plus d'avoir été extrêmement amicales, ont toujours été d'excellent conseil. Je souhaiterais également remercier mon maître de stage, Jonathan GAUDIN, et Dominique BLANCARD, qui n'ont cessé de me motiver pendant ces six mois et m'ont fait profiter de leur précieuse expérience et de leurs conseils avisés. Je souhaiterais enfin remercier ma famille, qui n'a jamais cessé de m'encourager et de me soutenir dans tout ce que j'ai entrepris, même si cela n'a pas toujours été facile. Un grand merci à vous tous pour ces six mois, qui resteront pour moi un excellent souvenir et une expérience valorisante.

Liste des abréviations et acronymes

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BLAST : *Basic Local Alignment Search Tool*

CDDM : Comité Départemental de Développement Maraîcher

GAP : Grands Abris Plastiques

INPN : Inventaire National du Patrimoine Naturel

INR : Indice de Nécrose Racinaire

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

ITS : *Internal Transcribed Spacer*

MA : Malt – Agar

MAC : Malt – Agar – Chloramphénicol

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

OAC : *Oat* – Malt – Agar

PARB : Pimaricine – Ampicilline – Rifampicine – Benomyl

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

qsp : quantité suffisante pour

UMR SAVE : Unité Mixte de Recherche de Santé et Agro-écologie du Vignoble (1065)

UV : Ultra-Violets

Tables des matières

Remerciements 3
Liste des abréviations et acronymes 4
INTRODUCTION 8
Synthèse bibliographique 10
A. La mâche, une culture traditionnelle chargée d'histoire 10
B. La mâche, cible d'agents pathogènes 11
C. Pythium sp., pathogènes d'importance des cultures vivrières 12
D. Méthodes de lutte contre les Pythiacées 14
MATÉRIEL ET MÉTHODES 16
A. Fréquence et caractérisation des Pythium sp. associés au dépérissement 16
1) Échantillonnage sur le terrain 16
2) Entretien des isolats de Pythium sp. et production de mycélium pour analyses biomoléculaires 16
3) Caractérisation moléculaire des Pythium sp. isolés 17
4) Caractérisation morphologique des Pythium sp. isolés 21
B. Évaluation du pouvoir pathogène des Pythium sp. isolés 21
C. Étude in vitro de la sensibilité des principales espèces de Pythium à l'égard du métalaxyl 23
RÉSULTATS 24
A. Identification des Pythium associés aux systèmes racinaires des mâches dépérissantes 24
1) Identification moléculaire 24
2) Caractérisation morphologique 27
B. Fréquence des Pythium sp. isolés de mâches dépérissantes dans plusieurs zones de production 35
1) Toutes zones de production confondues 35
2) Dans le grand Grand Ouest et notamment la zone de production nantaise 36
C. Potentialités parasitaires des Pythium sp. associés aux racines de mâches dépérissantes 37
D. Évaluation in vitro des aptitudes antagonistes de Pythium oligandrum à l'égard des Pythium sp. associés au dépérissement de la mâche 39
E. Étude in vitro de la sensibilité des principales espèces de Pythium à l'égard du métalaxyl 43
DISCUSSION 43
CONCLUSION 46
Bibliographie 47
Sitographie 49

ANNEXES……50

INTRODUCTION

Depuis l'hiver 2009, les maraîchers de la région nantaise sont confrontés à un problème de dépérissement sur culture de mâche. Celui-ci se manifeste sept à huit semaines après le semis, les plantes affectées présentant une croissance anormalement réduite par rapport au reste de la culture, mais aussi un jaunissement et un flétrissement des feuilles, les rendant totalement non-commercialisables. Ce phénomène a rapidement pris de l'ampleur et son incidence sur les récoltes est parfois devenue considérable, au point de rapidement mobiliser l'ensemble des acteurs de la filière afin d'étudier la ou les causes de ce phénomène, ceci pour pouvoir y remédier.

La première réponse des producteurs a été de récolter plus tôt dans la saison, avant que les symptômes ne se déclarent, mais la perte de rendement était inévitable. En 2012-2013, les acteurs du Comité Départemental de Développement Maraîcher (CDDM), basé sur Nantes, ont entrepris d'identifier la cause de ce phénomène. En observant les plantes symptomatiques, ceux-ci ont constaté de la nécrose racinaire, suggérant un problème d'origine tellurique induisant *a posteriori* le flétrissement de la plante, sans pour autant préciser son caractère biotique ou abiotique. Ce problème de dépérissement est devenu récurrent les hivers suivants et s'est même amplifié d'une saison à l'autre. Des recherches d'agents pathogènes ainsi que des analyses minérales sur plantes et sur sol ont été réalisées sans donner de résultats probants (CDDM, 2014). Des problèmes de ce type n'ont pas été décrits dans la littérature, mais des signalements similaires en Allemagne (serre et production en mottes) ont été rapportés par des semenciers, incriminant une origine abiotique (CDDM, 2014). Malgré tout, des solutions sont expérimentées : la fertilisation, la désinfection du sol, l'utilisation de différentes variétés de mâches, le type de couvertures plastiques, etc. Aucune incidence positive n'est constatée, seule la désinfection du sol semble repousser un peu le problème dans le temps (CDDM 2014).

Début 2015, un groupe de travail est créé, impliquant les acteurs de la filière mâche (producteurs, CDDM), plusieurs entreprises semencières, ainsi que l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA). Des observations au laboratoire ont mis en évidence la présence de structures de conservation d'oomycètes (oospores) au niveau des nécroses sur racines de mâche. Différentes espèces de *Pythium* ont alors pu être isolées et caractérisées, dont certaines connues. Une autre est encore non identifiée à ce jour et présente une croissance *in vitro* plus lente comparée aux autres espèces qui ont été isolées. Par des tests d'inoculation *in vitro* et en terrines, des symptômes similaires à ceux observés au champ ont été recréés. L'ensemble de ces travaux réalisés en 2015 est résumé sur la figure 1.

C'est dans ce contexte qu'intervient ce stage, dont les principaux objectifs sont de confirmer l'implication des *Pythium* sp. dans le dépérissement de la mâche, d'étudier leur fréquence sur le terrain, de les caractériser phénotypiquement et d'un point de vue moléculaire, de préciser les potentialités parasitaires d'une dizaine d'isolats correspondant aux espèces les plus souvent rencontrées, et d'évaluer *in vitro* les efficacités potentielles des méthodes de protection estimées envisageables en testant un biopesticide (*Pythium oligandrum*), ainsi qu'un fongicide utilisé en enrobage de semences (métalaxyl).

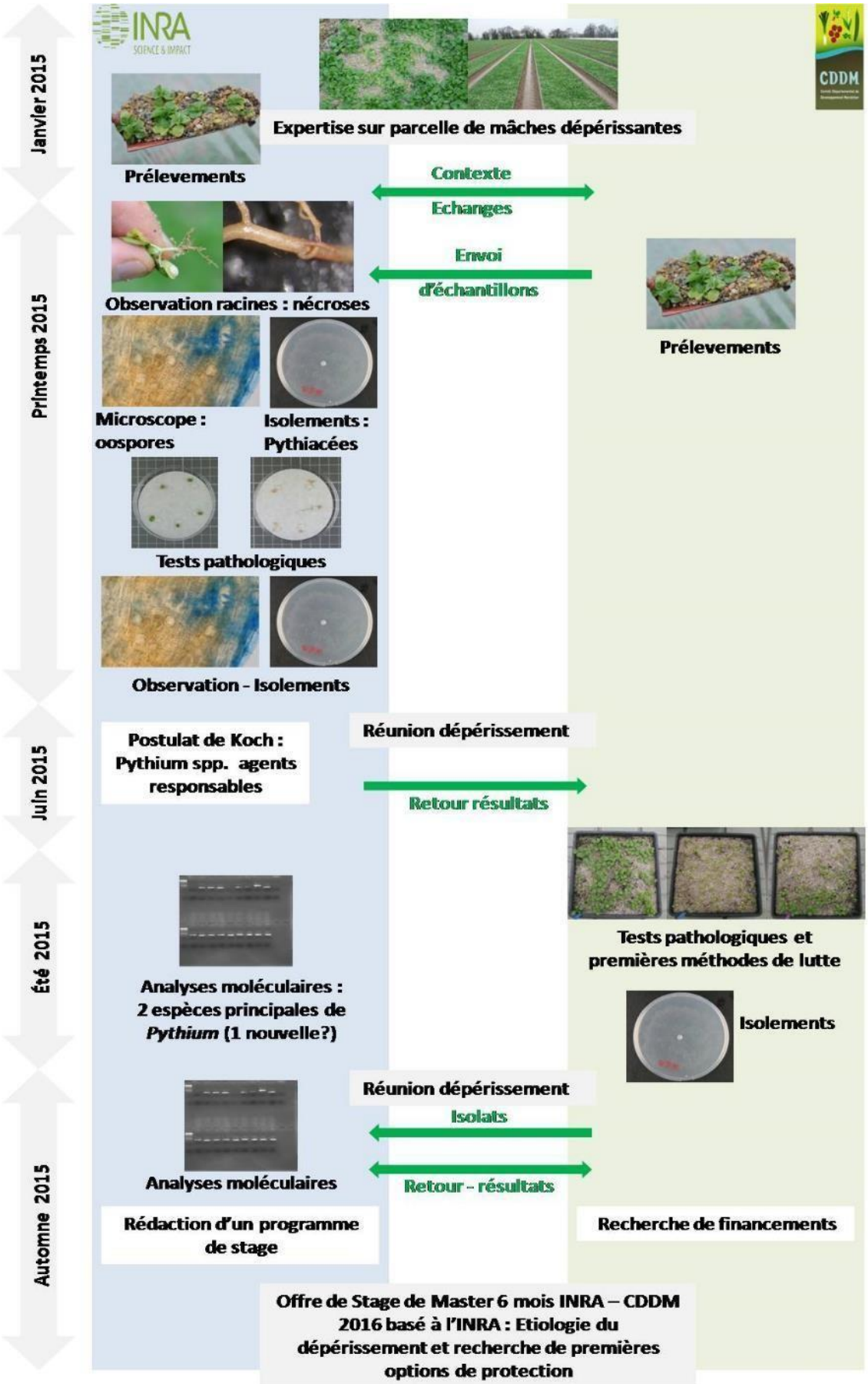


Figure 1. Diagramme récapitulatif de la chronologie des évènements conduisant à la réalisation du stage (Source : CDDM)

Synthèse bibliographique

A. La mâche, une culture traditionnelle chargée d'histoire

La mâche *Valerianella locusta* (L.) Laterr. est une plante dicotylédone de la famille des Valérianacées [1]. Bien que faisant son apparition au milieu du XIXème siècle, c'est durant l'entre-deux-guerres que le maraîchage nantais connaît réellement son essor. Deux facteurs principaux expliquent ce développement : d'une part, l'ouverture d'un marché jusqu'alors local vers Paris et d'autres grandes villes de province, et d'autre part, la mise au point de savoir-faire et techniques inédites qui ont fait l'originalité de produits tels que la mâche. Historiquement, la mâche était cultivée dans la région pour son climat océanique tempéré favorable au développement de la plante et pour la proximité de la Loire qui fournissait eau et sable pour la culture. En effet, les alluvions sableuses et perméables de la Loire étaient employées pour apporter une couche superficielle de sable avant de semer la mâche. De par sa granulométrie spécifique et sa neutralité chimique, le sable faisait lieu d'amendement, améliorant la qualité du sol sans trop en modifier les propriétés. Par la suite, le prélèvement de sable dans la Loire a été interdit, mais les producteurs de mâche ont persévéré avec cette technique, se dirigeant vers des fournisseurs spécialisés. Cette couche de sable a par ailleurs d'autres avantages : elle permet d'améliorer l'aération superficielle, réduit le phénomène de battance, empêche le développement de mousse sur les semis de jours courts, et surtout facilite grandement la mécanisation de la récolte en permettant le passage de la lame directement à la base du pivot. Le sablage n'est pas la seule particularité de cette culture. Que ce soit en plein champ ou sous abris froids (grands abris plastiques – GAP – ou chenilles), la mâche est cultivée en planches buttées, permettant ainsi un nombre plus important de rotations et un meilleur ressuyage du sol (cf. figure 2). En plein champ, les traditionnels châssis nantais ont été remplacés par des tunnels plastiques pour la mâche primeur. La mâche est cultivée pour sa plante entière et est consommée crue. Elle appartient à la catégorie des légumes à feuilles et plus particulièrement des salades. Plusieurs conditionnements existent : la quatrième gamme (conditionnement en sachets plastiques de produits prêt à l'emploi), les plateaux, les barquettes. L'étape de dessablage, lavage et rinçage de la mâche est essentielle, afin d'en retirer tout le sable et la terre pour obtenir un produit fini propre et prêt à consommer [2][3]. En 2015, la récolte de mâche en France s'est élevée à 43 229 tonnes, pour une superficie cultivée de 8039 hectares, en légère augmentation par rapport à la saison 2014 (cf. tableau 1) [4]. Le département de Loire Atlantique domine le marché en fournissant à lui seul 85% de la production nationale et 50% de la production européenne (données 2009) [8].



Figure 2. Culture de mâche ; sous abris froid à gauche, en plein champ avec chenilles au-dessus (Source : CDDM)

Tableau 1. Caractéristiques économiques de la mâche comparée à celles des autres légumes feuilles (Source : Agreste - Récapitulatif des données semi-définitives concernant les légumes à feuilles pour la saison 2014-2015)

VIII - CULTURES LEGUMIERES

(non compris semences sauf indications contraires)

LEGUMES	SUPERFICIE DEVELOPPEE (ha)			RENDEMENT (100 kg/ha)		PRODUCTION RECOLTEE hors jardins (tonne)			dont PRODUCTION dirigée vers la TRANSFORMATION hors jardins (tonne)		
	2014	2015	INDICE 2015/2014	2014	2015	2014	2015	INDICE 2015/2014	2014	2015	INDICE 2015/2014
LEGUMES FEUILLUS ET A TIGE											
Artichauts	7 705	7 709	100,1	50	50	38 354	38 354	100,0	4 984	4 984	100,0
Asperges en production	4 484	4 352	97,1	46	46	20 559	20 110	97,8	642	385	60,0
Céleris branches	489	475	97,1	346	347	16 896	16 467	97,5	3 107	2 516	81,0
Choux-fleurs	17 811	16 919	95,0	172	189	306 132	320 516	104,7	32 222	33 691	104,6
Choux brocolis à jets	2 199	2 237	101,7	92	92	20 223	20 559	101,7	///	///	///
Choux de Bruxelles	724	725	100,1	183	183	13 269	13 231	99,7	4 729	4 733	100,1
Choux à choucroute	837	831	99,3	830	672	69 464	55 847	80,4	66 350	55 230	83,2
Choux autres	5 318	5 314	99,9	212	205	112 799	108 874	96,5	///	///	///
Endives racines	9 222	9 142	99,1	282	282	259 763	257 791	99,2	///	///	///
Endives chicons	///	///	///	///	///	167 578	178 916	106,8	///	///	///
Epinards	5 837	5 764	98,7	202	203	118 069	117 026	99,1	92 695	91 095	98,3
Poireaux	5 222	4 946	94,7	318	331	165 884	163 898	98,8	///	///	///
Laitues	8 955	8 972	100,2	266	258	238 029	231 444	97,2	///	///	///
Chicorées frisées	919	1 023	111,3	322	318	29 562	32 569	110,2	///	///	///
Chicorées scaroles	863	907	105,1	343	331	29 592	30 014	101,4	///	///	///
Cresson	228	222	97,4	199	194	4 548	4 311	94,8	///	///	///
Mâche	7 851	8 039	102,4	55	54	43 008	43 229	100,5	///	///	///
Autres salades	4 350	4 498	103,4	131	125	57 065	56 032	98,2	///	///	///
Bettes et cardes	381	381	100,0	359	358	13 667	13 645	99,8	///	///	///
Brèdes	215	215	100,0	147	147	3 150	3 150	100,0	///	///	///
Persil	838	804	95,9	174	183	14 609	14 719	100,8	854	915	107,1

B. La mâche, cible d'agents pathogènes

Comme toute autre culture, la mâche est affectée par divers organismes pathogènes, majoritairement fongiques comme cela apparaît sur leur inventaire mentionné ci-après.

- Champignons aériens provoquant des symptômes sur le feuillage :

- *Botrytis cinerea*, responsable de la moisissure grise, attaque les feuilles et le collet des plantes [5] ;
- *Golovinomyces orontii*, responsable de l'oïdium, recouvre superficiellement les deux faces des feuilles de son mycélium blanc, celles-ci se recourbent et finissent par pourrir (Koike *et al.*, 2007) ;
- *Peronospora valerianellae*, responsable du mildiou, est un straménopile transmis par les semences, qui sporule abondamment sur les feuilles, qui se recourbent, et envahit la plante, perturbant sa croissance (Messiaen *et al.*, 1991).

- Champignons telluriques provoquant des dégâts sur racines, collet, voire feuilles basses :

- *Sclerotinia minor*, responsable de la sclérotiniose, induit des altérations humides sur les organes au contact du sol, et notamment les feuilles sénescentes, conduisant à la décomposition de ceux-ci [6] ;
- *Phoma valerianellae*, également propagé par les semences (Pellegrinio *et al.*, 2010), entraîne la fonte des semis et des dépérissements par pourriture du collet.

- Bactéries :

- *Acidovorax valerianellae*, bactérie transmise par les semences, provoque la formation de taches noires sur le feuillage (Thiele *et al.*, 2011).

Notons que certaines de ces maladies sont dites non-spécifiques, c'est-à-dire qu'elles peuvent affecter indifféremment une grande variété de cultures, comme par exemple *Sclerotinia minor* et *Botrytis cinerea*. C'est aussi le cas de nombreuses espèces de *Pythium*.

Néanmoins, d'autres pathogènes peuvent lui être spécifiques, tels que *Peronospora valerianellae*, *Phoma valerianellae*, *Golovinomyces orontii*, et la bactérie *Acidovorax valerianellae* (Messiaen *et al.*, 1991).

C. *Pythium* sp., pathogènes d'importance des cultures vivrières

Comme l'ont suggéré les travaux préliminaires portant sur l'étude du dépérissement de la mâche, une à plusieurs espèces de *Pythium* semblent être responsables. Ces microorganismes appartiennent à la famille des Pythiacées, groupe des Oomycètes, règne des Straménopiles.

Les oomycètes constituent un groupe relativement important, fort de plusieurs centaines d'espèces, parmi lesquelles un bon nombre se trouvent être des pathogènes végétaux redoutés. Longtemps considérés comme des champignons *sensu lato*, il a été démontré que les oomycètes sont plus proches des algues et donc clairement distincts des champignons *sensu stricto* [7]. Ils ont des particularités morphologiques qui leur sont propres. Les hyphes mycéliens sont coenocytiques (non-cloisonnés), les cellules végétatives sont diploïdes, les parois cellulaires sont dépourvues de chitine.

Le genre *Pythium* a été décrit pour la première fois en 1858 (Middleton, 1943). Les espèces de ce genre forment un mycélium incolore, plus ou moins aérien selon l'espèce et le milieu de culture utilisé. L'aspect de la colonie constitue un critère d'identification morphologique. Plusieurs formes sont en effet observables : colonie uniforme, radiale, en chrysanthème, en rosette, ou encore une forme mixte intermédiaire entre le chrysanthème et la rosette (Missud A., 1997). Beaucoup d'espèces sont capables de reproduction asexuée en produisant des sporanges et des zoospores. Les sporanges contiennent les zoospores à l'état de protoplasme indifférencié. Au cours de la germination des sporanges, ceux-ci produisent un tube d'émission surmonté d'une vésicule dans laquelle le protoplasme migre et les zoospores se forment puis sont libérées (Middleton, 1943). Les sporanges peuvent être de différentes formes : filamenteux, filamenteux dendroïde, filamenteux enflé, globuleux, proliférant (Van der Plaats-Niterink, 1981). Les zoospores sont des spores aquatiques biflagellées : le flagelle antérieur de type guirlande et le flagelle postérieur de type fouet sont tous les deux fixés sur la spore au niveau d'une rainure ventrale. Ces dernières sont particulièrement difficiles à observer, étant donné que leur formation nécessite des conditions très précises (présence d'eau, température, etc.). Cependant, chez certaines espèces, la reproduction asexuée a été perdue ; dans ce cas, les sporanges ne produisent pas de zoospores mais germent directement, on parle alors plutôt de conidies [7]. La reproduction sexuée passe par la production d'oogones (« femelles ») et d'anthéridies (« mâles »). La majorité des oomycètes sont homothalliques (un individu produit les deux structures), mais il existe certaines espèces hétérothalliques (un individu possède un genre clairement défini). Dans le cas des oomycètes homothalliques, la position de l'anthéridie par rapport à l'oogone est un critère morphologique déterminant dans l'identification des espèces. Les oospores issues de la fécondation de l'oogone par l'anthéridie constituent des

structures de conservation très robustes, pouvant subsister dans le sol pendant plusieurs années. Elles sont cependant sensibles aux augmentations de température [7]. Selon les conditions environnementales, les *Pythium* peuvent être soit saprophytes, soit parasites.

Les *Pythium* sp. sont considérés comme des bioagresseurs essentiellement telluriques, responsables des pourritures des semences, de fontes des semis, de pourriture racinaires (cf. figure 3) et sur fruits en contact avec le sol (Agrios, 1969). Au sein du genre *Pythium*, de nombreuses espèces affectent diverses cultures maraîchères, fruitières, mais également de grandes cultures (cf. tableau 2), et ce partout dans le monde (Middleton, 1943). Ils sont considérés comme des agents pathogènes aspécifiques, autrement dit polyphages. Le processus infectieux de ces champignons peut être décrit de la façon suivante, en prenant un exemple sur chou : le pathogène s'établit en premier lieu au niveau des cellules épidermiques, puis provoque une dégradation massive des pectines des parois des cellules corticales. Cette perte de pectines serait probablement due à la diffusion d'enzymes hydrolytiques depuis le site d'infection. Pour s'en défendre, la plante formerait des parois d'apposition riches en callose et en cellulose (Boudjeko *et al.*, 2006). Cette production d'enzymes hydrolytiques a également été observée sur carotte chez les trois principales espèces responsables du *cavity spot*, qui sont *Pythium violae*, *Pyhtium sulcatum* et *Pythium ultimum* (Campion *et al.*, 1997).



Figure 3. Symptômes de pourriture racinaire à Pythium sp. sur piment (Source : Dominique Blancard, INRA Bordeaux)

Tableau 2. Exemple d'espèces de Pythium pathogènes sur divers hôtes (production personnelle)

Espèce	**Hôte**	**Référence bibliographique**
Pythium abapressorium	*Triticum aestivum*	Paulitz *et al.*, 2003
Pythium aphanidermatum	*Cucumis sativus*	Al-Sadi *et al.*, 2007
	Phaseolus coccineus	Aoki *et al.*, 2007
	Solanum tuberosum	Triki *et al.*, 2001
	Ullucus tuberosus	Tomioka *et al.*, 2002
	Vigna unguiculata	Suleiman, 2010

Pythium helicoides	*Fragaria x ananassa*	Ishiguro *et al.*, 2014
Pythium intermedium	*Daucus carota*	Klemsdal *et al.*, 2008
Pythium irregulare	*Malus domestica*	Mazzola *et al.*, 2002
	Phaseolus vulgaris	Matoba *et al.*, 2008
	Vitis vinifera	Spies *et al.*, 2011
Pythium mamillatum	*Phaseolus vulgaris*	Matoba *et al.*, 2008
Pythium myriotylum	*Glycine max*	Tomioka *et al.*, 2013
	Phaseolus vulgaris	Matoba *et al.*, 2008
	Xanthosoma sagittifolium	Boudjeko *et al.*, 2006
	Zingiber officinale	Stirling *et al.*, 2009
Pythium paroecandrum	*Apium graveolens*	Koike *et al.*, 2007
	Erysiphe heraclei	Koike *et al.*, 2008
Pythium scleroteichum	*Ipomoea batatas*	Tojo *et al.*, 2007
Pythium spinosum	*Phaseolus vulgaris*	Matoba *et al.*, 2008
Pythium sulcatum	*Daucus carota*	Davison & McKay, 2003
Pythium sylvaticum	*Daucus carota*	Klemsdal *et al.*, 2008
	Malus domestica	Mazzola *et al.*, 2002
Pythium tracheiphilum	*Lactuca sativa*	Kumar *et al.*, 2007
Pythium ultimum	*Brassica oleracea*	El-Mohamedy, 2012
	Brassica rapa var. pekinensis	El-Mohamedy & El-Mougy, 2009
	Phaseolus vulgaris	Matoba *et al.*, 2008
	Solanum tuberosum	Triki *et al.*, 2001
	Triticum aestivum	Abdelzaher *et al.*, 1997
Pythium uncinulatum	*Lactuca sativa*	Matsuura *et al.*, 2010
Pythium vexans	*Durio zibethinus*	Vawdrey *et al.*, 2005
	Vitis vinifera	Spies *et al.*, 2011
Pythium violae	*Daucus carota*	Klemsdal *et al.*, 2008

D. Méthodes de lutte contre les Pythiacées

Il existe diverses méthodes de protection permettant de contrôler les oomycètes et notamment les *Pythium* sp., qui sont synthétisées ci-après :

- réaliser des rotations culturales assez longues en terrain vierge, elles ne sont plus très efficaces en sol contaminé ;
- désinfection du sol possible : fumigant, solarisation, biofongicides, etc ;
- bien drainer le sol ;
- éviter de planter trop profondément, d'enterrer le collet des plantes ;
- mettre en place un paillage plastique afin de créer une barrière mécanique entre le sol et certains organes végétaux ;
- éliminer les débris végétaux malades en cours et en fin de culture [9] ;
- soigner l'irrigation (quantité optimale, apport localisé, etc.).

De plus, il peut aussi être conseillé de traiter le substrat avec un fongicide anti-oomycètes. Soulignons que sur mâche, le métalaxyl (nom commercial SANTHAL), anti-pythiacées également autorisé sur carotte, chicorée, fraisier et houblon [10], est utilisé en enrobage de semences.

Pour compléter, signalons la possibilité de contrôler biologiquement certains oomycètes, avec un membre de ce groupe de microorganismes : *Pythium oligandrum*, qui a de plus, la particularité d'être hyperparasite de champignons (Van der Plaats-Niterink, 1981). C'est cette propriété qui en fait un candidat prometteur pour la lutte contre les maladies à *Pythium*. De plus, il se développe bien sur le système racinaire de nombreuses cultures. Ses effets à l'égard des agents pathogènes telluriques se manifestent de différentes façons (Benhamou *et al.*, 2012) :

- par le biais de la compétition pour l'espace et les ressources au sein de la rhizosphère ;
- par parasitisme des agents pathogènes ; *P. oligandrum* possède un spectre d'action très large puisqu'il est capable de s'attaquer aussi bien à des ascomycètes, des basidiomycètes que des oomycètes, même sous forme de structures de conservation ;
- en favorisant la croissance végétative de la plante-hôte en produisant un précurseur de l'auxine ;
- en stimulant les défenses de la plante-hôte grâce à la production entre autres d'oligandrine et de fractions protéiques de paroi cellulaire, la préparant ainsi à faire face aux infections fongiques et bactériennes.

La première étape du **mycoparasitisme** par *P. oligandrum* est la destruction de la paroi des cellules du pathogène par le biais de chitinases, cellulases, glucanases et lipases. *P. oligandrum* peut ensuite parasiter le champignon. Cependant, certaines espèces comme *Rhizoctonia solani* résistent à ce processus en formant des dépôts de matériel pariétal au niveau des points d'entrée de l'antagoniste. *P. oligandrum* dispose lui-même d'un moyen de contourner cette défense, puisqu'il est capable de dégrader ces dépôts localement et ainsi poursuivre sa progression. Parallèlement au mycoparasitisme, *P. oligandrum* fait intervenir de **l'antibiose**. En émettant des molécules antibiotiques, il est capable de causer des dégâts importants aux champignons pathogènes sans entrer en contact direct avec eux. En plus des dégâts physiques que subissent les cellules, *P. oligandrum* serait également capable de retarder la croissance de sa cible, ce qui a été observé sur *Phoma medicaginis* var. *pinodella* et *Mycrosphaerella pinodes*. La chimie exacte de ces molécules antibiotiques n'a pas encore été élucidée. L'effet de *P. oligandrum* sur la croissance végétative peut s'observer, soit au stade graine, soit au stade plante mature, après traitement par une suspension d'oospores ou de mycélium ; les plants traités ont tendance à produire un système racinaire plus dense. Quant à **l'induction de résistance** chez la plante-hôte, elle peut elle aussi se révéler très efficace puisque, sur vigne par exemple, on constate un taux de protection de 75% sur des plants traités à l'oligandrine (Yacoub, 2015).

P. oligandrum est d'ores et déjà utilisé comme agent de biocontrôle dans le cadre de cultures très variées. On peut citer par exemple la tomate, la vigne, le blé (Yacoub, 2015). Il ne s'agit cependant pas de la seule espèce prometteuse. Elle reste la plus étudiée car la plus fréquente dans les sols, mais d'autres espèces ont aussi été identifiées et décrites comme non-pathogènes : *Pythium periplocum*, *Pythium acanthicum*, *Pythium nunn*, *Pythium mycoparasiticum*, *Pythium acantophoron*, *Pythium lycopersicum* (Benhamou *et al.*, 2012). En dehors des *Pythium* sp., il existe d'autres antagonistes potentiels appartenant à différents règnes (champignons, bactéries, etc.). Sur brocoli, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens* ont été testés en trempage de racines et en mélange avec le substrat contre *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium solani*, avec une différence significative observée (El-Mohamedy, 2012). El-Tarabily *et al.* (2008) ont également démontré l'efficacité de trois actinomycètes, *Actinoplanes campanulatus*, *Micromonospora chalcea* et *Streptomyces spiralis*, contre *Pythium aphanidermatum* sur concombre. Encore sur concombre, Li *et al.* (2007) ont constaté une efficacité de certaines souches du genre *Paenibacillus* contre *P. aphanidermatum*. Cependant, il ne faut pas oublier que les interactions entre tous ces organismes ne sont pas des relations à sens unique. Elles dépendent grandement des conditions environnementales et de la diversité des espèces impliquées. Par exemple, *Pythium paroecandrum*, pathogène avéré sur céleri et persil, s'est

révélé être un antagoniste prometteur de *Botrytis cinerea*, responsable de la pourriture grise de la vigne (Abdelghani *et al.*, 2004).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Fréquence et caractérisation des *Pythium* sp. associés au dépérissement

1) Échantillonnage sur le terrain

Notre partenaire le CDDM nous a fourni environ 500 isolats de *Pythium* sp. récupérés à partir de racines de mâches symptomatiques directement prélevées en parcelles cultivées, ceci au cours de l'hiver 2015-2016 (propice à la manifestation du dépérissement). La majorité des isolats provient de la région nantaise, mais un certain nombre d'entre eux sont issus du Sud-est de la France, d'Allemagne et de Belgique.

Afin de réaliser les isolements, une pelletée composée de sol et de plantes a été prélevée dans une zone de chaque parcelle à étudier présentant des symptômes (cf. figure 4). À partir de chaque prélèvement, cinq plantes sont sélectionnées, et pour chacune d'entre elles, cinq petits explants de racines sont placés sur milieu MA, courant et générique en mycologie (cf. ANNEXE I). Les isolats d'intérêt sont clonés et conservés sur le même milieu. Ils sont *in fine* expédiés à l'Unité de Santé et Agro-écologie du Vignoble de l'INRA Bordeaux Aquitaine pour effectuer leur caractérisation.



Figure 4. Prélèvement d'un échantillon de mâches symptomatiques associées à un échantillon de sol (Source : CDDM)

2) Entretien des isolats de *Pythium* sp. et production de mycélium pour analyses biomoléculaires

La caractérisation moléculaire des isolats de *Pythium* nécessite différentes étapes préparatoires.

Tout d'abord, afin d'assurer la viabilité des isolats reçus et de pouvoir les maintenir en collection, ils sont repiqués sur le milieu générique MAC (cf. ANNEXE I) qui contient un antibiotique, le chloramphénicol, dont le rôle est de limiter le développement des bactéries. Ils sont ensuite conservés en chambre froide.

Afin de produire du mycélium pour les analyses moléculaires, les différents isolats sont repiqués sur milieu PARB (cf. ANNEXE I). Ce milieu contient trois antibiotiques, ainsi qu'un fongicide, ce qui le rend spécifique des *Pythium* sp. Cela permet par ailleurs de confirmer que les isolats fournis par le CDDM appartiennent bien au genre *Pythium*. Afin de faciliter le prélèvement ultérieur du mycélium, un explant de gélose de chaque isolat est déposé sur un disque de cellophane stérile initialement apposé à la surface du milieu PARB. Cette procédure permet d'éviter d'emporter de la gélose en même temps que le mycélium, ce qui pourrait impacter par la suite la qualité de l'extrait d'ADN. Les boîtes sont mises à incuber à 22°C durant une semaine, voire plus pour certains isolats à croissance lente. Par la suite, à l'aide d'un scalpel, la surface de la feuille de cellophane est raclée afin de récupérer le mycélium pur, qui est ensuite stocké dans un tube de 2 mL à fond rond. Notons que ce matériel biologique peut être conservé longtemps s'il est congelé à -20°C.

3) Caractérisation moléculaire des *Pythium* sp. isolés

Préalablement à l'extraction d'ADN, il est indispensable de lyophiliser les échantillons de mycélium prélevés précédemment. Un lyophilisateur Christ Alpha 1-4 LD plus (*Bioblock Scientific*) est utilisé. Les tubes sont ouverts et recouverts d'un morceau de papier d'aluminium percé afin de s'assurer que le vide se fasse sans pour autant que les échantillons en soient expulsés. Les tubes sont ensuite placés à -80°C pendant au moins trente minutes. Cette étape est nécessaire pour permettre la solidification de l'eau au sein des échantillons, eau qui sera ensuite sublimée pendant la phase de lyophilisation, dont la durée est approximativement de quinze heures.

À l'issue de cette étape, les échantillons de mycélium lyophilisés sont broyés très finement à l'aide d'un broyeur *TissueLyserII* (QIAGEN-Retsch) et soumis aux différents traitements prévus dans le protocole d'extraction d'ADN de champignons *sensu lato* tels que les oomycètes, les ascomycètes, et les basidiomycètes (Zolan & Pukkila, 1986) (cf. ANNEXE II). À l'issue de l'extraction, 50 µL d'ADN en suspension sont recueillis pour chaque échantillon. Les extraits peuvent être conservés indéfiniment à -20°C. Avant toute autre manipulation supplémentaire, les extraits d'ADN ainsi obtenus sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre DeNovix DS-11. Trois critères majeurs permettent d'évaluer la qualité des extraits d'ADN :

- l'allure de la courbe représentative de la mesure d'absorbance en fonction de la longueur d'onde ; un pic unique très net à 260 nm indique la présence d'ADN et l'absence de contaminations résiduelles ;
- la valeur des rapports 260/230 et 260/280 ; si proches de 2, l'extrait est considéré comme pur, 230 nm et 280 nm étant les valeurs d'absorption respectives des glucides et des protides ;
- la concentration en ADN dans la suspension ; suivant la quantité de mycélium prélevée initialement et la façon dont l'extraction a été conduite, cette valeur peut varier ; néanmoins, plus un extrait est concentré en ADN, plus il faudra le diluer par la suite afin d'éviter des problèmes d'inhibition de la Taq Polymérase pendant la PCR.

Une fois l'étape d'extraction validée, une séquence d'ADN bien précise est amplifiée par PCR (cf. figure 5). Le protocole choisi est celui d'une *nested* PCR incluant deux amplifications successives d'une portion de la région *Internal Transcribed Spacer* (ITS), une région de l'ADN ribosomique non-codante, hautement polymorphe et permettant de discriminer les espèces du genre *Pythium* (Sapkota & Nicolaisen, 2015). Il s'agit de deux séquences consécutives séparées par deux couples d'amorces distinctes. Trois amorces universelles sont utilisées au total : ITS4, ITS6 et ITS7 (cf. ANNEXE III). Pour la première amplification (étape a.), les extraits d'ADN sont dilués au dixième ou au centième suivant leur concentration initiale. Le mélange réactionnel (cf. ANNEXE III) et les ADN dilués peuvent être répartis, soit dans des barrettes de huit puits, soit dans des plaques de quatre-

vingt-seize puits. L'étape a. dure approximativement une heure et le thermocycleur *Mastercycler* ep*gradient* (Eppendorf) est programmé avec le cycle décrit en A. de la figure 6. Les produits PCR de cette première étape sont ensuite dilués au dixième et utilisés comme sources d'ADN pour la seconde amplification (étape b.). Cette seconde amplification dure approximativement une heure et demie selon le cycle décrit en B. de la figure 6.

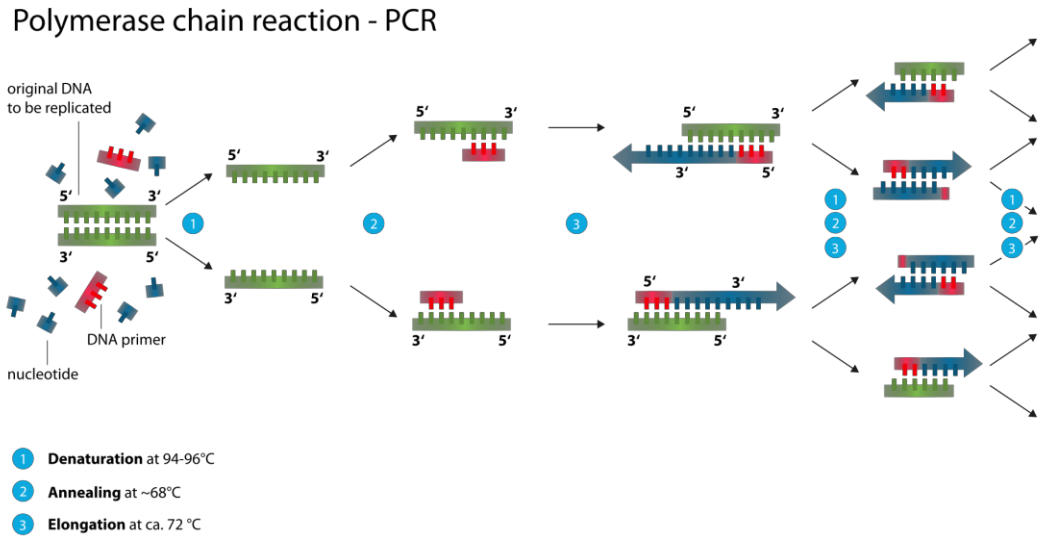


Figure 5. Schéma explicatif du processus de PCR (Source : Wikipedia)

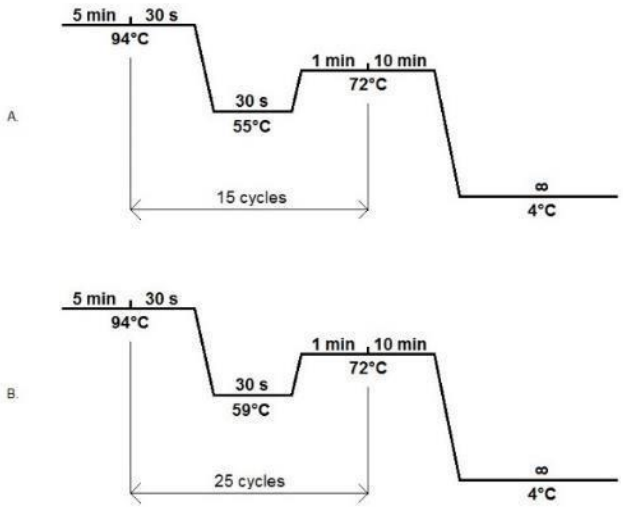


Figure 6. Cycles de nested PCR ; A. première étape, B. deuxième étape (production personnelle)

Les produits PCR finaux sont ensuite soumis à une électrophorèse pour validation de l'amplification. La migration est réalisée sur gel d'agarose à 1% dans du tampon TBE 0,5x, pendant 20 min à 100 V. L'ADN est coloré avec de l'*EZ-vision DNA Dye* (sous forme de tampon de chargement). Un marqueur 1 kb mélangé au même colorant que précédemment est utilisé comme référence. La révélation est faite aux ultra-violets (UV) avec l'assistance du logiciel de capture *Mega-Capt* (version 15.14 pour *Windows*). La *nested* PCR est validée si l'on observe une bande aux alentours de 500 pb correspondant à la longueur de la séquence

amplifiée. Les produits PCR finaux sont enfin envoyés au prestataire *Beckman Coulter Genomics* pour séquençage (cf. ANNEXE IV).

Les séquences réceptionnées par mail sont par la suite analysées dans le but de construire un arbre phylogénétique permettant de les situer par rapport aux différentes espèces du genre *Pythium* connues. Tout d'abord, les séquences sont copiées dans l'outil en ligne *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) du site du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) [8]. Il s'agit d'une méthode utilisée couramment en bioinformatique afin de trouver des portions similaires entre plusieurs séquences et de les aligner entre elles. Pour les champignons *sensu lato*, on considère une correspondance valable lorsque le pourcentage d'identité est supérieur ou égal à 97%. Les résultats du *BLAST* permettent ainsi de se faire une première idée des espèces présentes parmi les isolats, et donc de réduire le champ des recherches pour les séquences de référence issues des bases de données, qui constituent le squelette de l'arbre phylogénétique. À l'aide du logiciel *SeaView* (version 4.6 pour *Windows*), les séquences sont classées et alignées (cf. figure 7). Des chromatogrammes (cf. figure 8), c'est-à-dire des représentations graphiques des pics de détection des nucléotides lors du séquençage, sont fournis par le prestataire avec les séquences. La visualisation s'effectue à l'aide du logiciel *GATCViewer* (for *Windows*, *GATCBiotech*). En s'en aidant, il est possible d'effectuer des corrections dans *SeaView* (version 4.6 pour *Windows*) afin d'obtenir un arbre plus précis. Des corrections peuvent en effet s'avérer nécessaires car les séquences comportent parfois des nucléotides non reconnus, ce qui peut être dû à un défaut de pureté de l'extrait d'ADN de base par exemple. Le logiciel *SeaView* (version 4.6 pour *Windows*) permet de choisir la méthode de construction de l'arbre phylogénétique. La plus simple est la méthode des distances, plus précisément méthode du *Neighbour Joining*, qui est basée sur les similarités entre paires de séquences, rapide et convenant au traitement de grandes quantités de séquences. Il est possible de faire figurer sur l'arbre des valeurs de *bootstrap*, qui quantifient la fiabilité des embranchements. Au moins deux séquences de référence (Lévesque & De Cock, 2004 ; De Cock et al., 2014) par espèce sont nécessaires pour permettre le calcul des valeurs de *bootstrap* (cf. tableau 3).

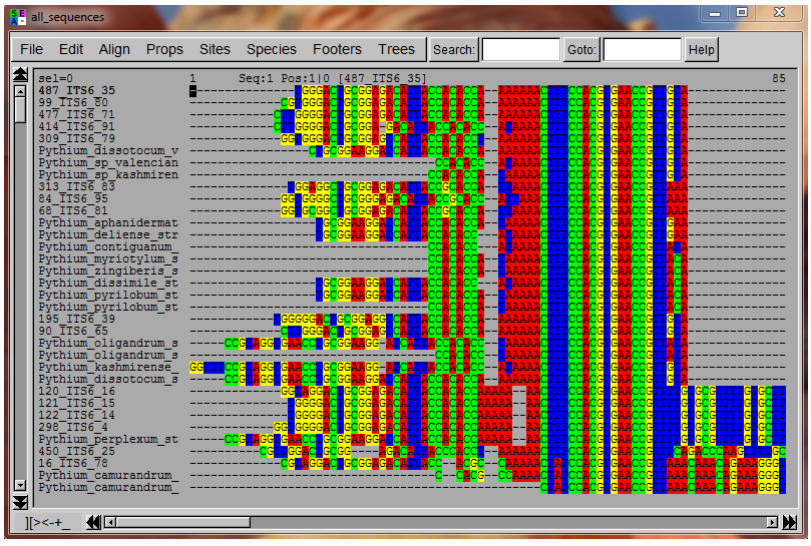


Figure 7. Capture d'écran du logiciel SeaView version 4.6 pour Windows ; fenêtre permettant de corriger et aligner les séquences, ainsi que de générer des arbres phylogénétiques (production personnelle)

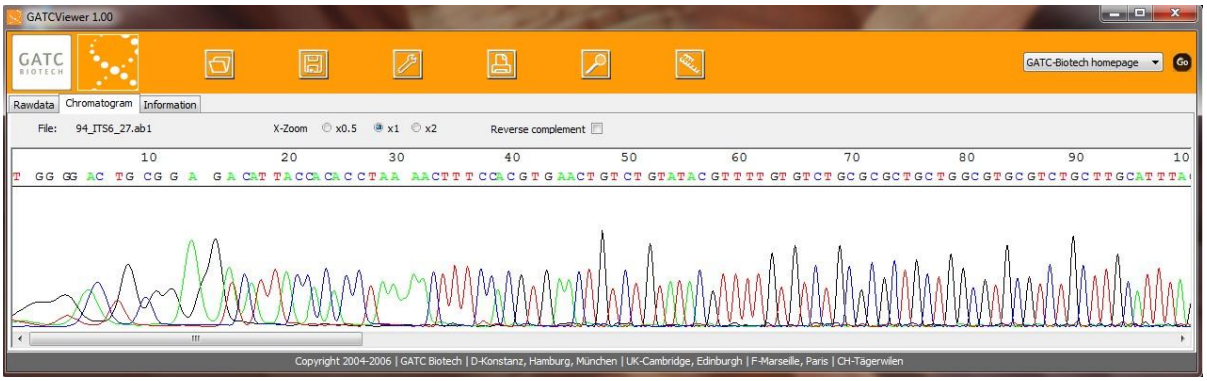


Figure 8. Capture d'écran du logiciel GATCViewer ; visualisation d'un chromatogramme (production personnelle)

Tableau 3 : Listes des séquences de référence utilisées, consultables sur le site du NCBI [11]

Nom de la séquence	**Numéro d'accession GenBank**
Brevilegnia_gracilis_voucher_CBS13137	HQ643127.1
Brevilegnia_macrospora_voucher_CBS_13237	HQ643128.1
Pythium_abappressorium_isolate_020162	DQ091294.1
Pythium_abappressorium_voucher_CBS110198	HQ643408.2
Pythium_aphanidermatum_strain_CBS_118.80	AY598622.2
Pythium_camurandrum_voucher_ADC9902	HQ643481.1
Pythium_camurandrum_voucher_VPRI_42089	KC689899.1
Pythium_contiguanum_voucher_CBS22194	HQ643514.1
Pythium_cryptoirregulare_isolate_D2.5S2P22-1	KT338158.1
Pythium_cylindrosporum_strain_CBS_218.94	AY598643.2
Pythium_debaryanum_strain_CBS_752.96	AY598704.2
Pythium_debaryanum_strain_CBS_113574	KU833269.1
Pythium_deliense_strain_CBS_314.33	AY598674.2
Pythium_dissimile_strain_CBS_155.64	AY598681.2
Pythium_dissotocum_strain_CBS_166.68	AY598634.2
Pythium_dissotocum_voucher_ABDN356	KM061706.1
Pythium_emineosum_strain_DAOM_BR479	GQ244427.2
Pythium_emineosum_strain_DAOM_BR836	GQ244428.2
Pythium_intermedium_strain_CBS_266.38	AY598647.4
Pythium_irregulare_strain_CBS_250.28	AY598702.2
Pythium_irregulare_strain_K6-2	AB107998.1
Pythium_irregulare_strain_Py63	AB108003.1
Pythium_kashmirense_voucher_ADC0819	HQ643671.2
Pythium_myriotylum_strain_CBS_254.70	AY598678.2
Pythium_oligandrum_strain_CBS_382.34	AY598618.2
Pythium_oligandrum_strain_PPRI8597	FJ415918.1
Pythium_paroecandrum_strain_CBS_157.64	AY598644.2
Pythium_perplexum_strain_CBS_674.85	AY598658.2
Pythium_pyrilobum_strain_CBS_158.64	AY598636.2
Pythium_pyrilobum_strain_PPRI8594	FJ415906.1
Pythium_regulare_strain_CI-34	AF492018.1
Pythium_sp_kashmirense	DQ778899.1
Pythium_sp_valencianum_voucher_P11577_B646	EU003443.1
Pythium_sylvaticum_strain_CBS_453.67	AY598645.2
Pythium_sylvaticum_voucher_MAE_02	KF806441.1

Pythium_ultimum_var_ultimum_strain_CBS_291.31	KJ639270.1
Pythium_violae_strain_96-47	DQ528740.1
Pythium_violae_strain_CBS_132.37	AY598717.2
Pythium_violae_strain_CBS_159.64	AY598706.2
Pythium_violae_strain_CBS_178.76	AY598715.1
Pythium_zingiberis_strain_CBS_216.82	AY598679.1

4) Caractérisation morphologique des *Pythium* sp. isolés

Une dizaine d'isolats de *Pythium* sp., représentatifs des espèces majoritaires détectées par biologie moléculaire, ont été caractérisés morphologiquement, ceci afin de confirmer pour partie certaines identifications moléculaires (*Pythium sylvaticum*, *Pythium paroecandrum*, *Pythium intermedium*, *Pythium irregulare*, *Pythium ultimum*, *Pythium violae*), mais aussi pour caractériser les espèces considérées comme nouvelles (deux isolats d'une espèce nommés *Pythium. XXX* INRA et *Pythium. XXX* CDDM, et un isolat d'une autre espèce inconnue désignée 313) (cf. tableau 4). Afin de pouvoir observer les différentes structures fongiques permettant de différencier les différentes espèces de *Pythium*, plusieurs techniques sont utilisées :

- culture sur milieu OAC et sur milieu V8 (cf. ANNEXE I), ce dernier étant censé faciliter la formation de sporanges, puis incubation à 22°C pendant environ une semaine ;
- dépôt d'explants d'une jeune culture de chacun des isolats dans une boîte de Petri contenant une fine couche d'eau permutée, puis incubation pendant environ 72 heures à une température comprise entre 16 et 20°C.

Après incubation, un fragment de culture sur milieu ou du mycélium flottant sont montés entre lame et lamelle, dans une goutte de bleu coton.

Tableau 4 : Listes des isolats de Pythium sp. pathogènes caractérisés morphologiquement (production personnelle)

***Pythium* sp. pathogènes**
Pythium intermedium
Pythium irregulare
Pythium paroecandrum
Pythium sylvaticum
Pythium ultimum
Pythium violae
P. XXX, isolat *P. XXX* INRA
P. XXX, isolat *P. XXX* CDDM
Pythium sp., isolat 313

B. Évaluation du pouvoir pathogène des *Pythium* sp. isolés

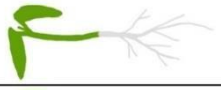
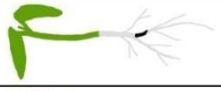
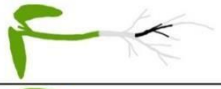
La pouvoir pathogène des mêmes isolats étudiés précédemment est estimé. Pour cela, des graines de mâche verte de la variété Baron sont désinfectées pendant 3 minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium à 3%, puis rincées deux fois dans de l'eau stérile. Elles sont ensuite déposées dans des boîtes de Petri sur papier filtre stérile imbibé d'eau stérile à raison de 5 plantules par boîte. Les boîtes sont laissées à l'obscurité à température ambiante pendant 24 heures, puis placées, toujours à l'obscurité, en armoire climatique réglée à 20°C pour 12 heures de jour et à 16°C pour 12 heures de nuit. L'obscurité est levée environ 36 heures après et les graines sont laissées à germer en armoire climatique pendant approximativement 10 jours.

Les isolats de *Pythium* à étudier sont mis en culture une semaine sur milieux OAC et V8 afin de produire l'inoculum. Lors de l'inoculation, un explant de culture est déposé directement sur le système racinaire de chaque plantule. Six boîtes de 5 plantules sont réalisées pour chaque isolat. Après incubation dans les conditions décrites ci-dessus, le pouvoir pathogène de chaque isolat est apprécié au cours de trois notations (2, 8, 15 jours après inoculation), en suivant l'échelle présentée ci-après qui permet d'établir un Indice de Nécrose Racinaire (INR) moyen pour chaque isolat testé (cf. tableau 5).

Après la dernière notation, les racines des plantules sont récupérées pour des observations microscopiques afin de confirmer la présence des structures de reproduction des différents *Pythium* sp. dans les tissus racinaires.

Soulignons que le pouvoir pathogène de *Pythium oligandrum*, *Pythium* candidat potentiel au contrôle biologique des *Pythium* associés au dépérissement de la mâche, a été évalué selon les mêmes modalités que les autres isolats.

Tableau 5. Échelle de notation permettant d'évaluer le pouvoir pathogène des Pythium sur racines de mâche, et d'en déduire un indice de nécrose racinaire = INR (Source : J. Gaudin, INRA Bordeaux)

INR	Illustration	Description
0		Système racinaire bien développé, entièrement blanc
1		Apparition d'une zone brune (nécrose) au contact de la gélose
2		Extension de la zone nécrosée aux racines secondaires
3		Plus de 50% du système racinaire nécrosé
4		100% du système racinaire nécrosé, cotylédons turgescents (valable également pour un système racinaire peu développé)
5		100% du système racinaire nécrosé, cotylédons flétris (valable également pour un système racinaire peu développé)

C. Évaluation in vitro des aptitudes antagonistes de *Pythium oligandrum*

1) Confrontation ***in vitro*** **sur milieu gélosé**

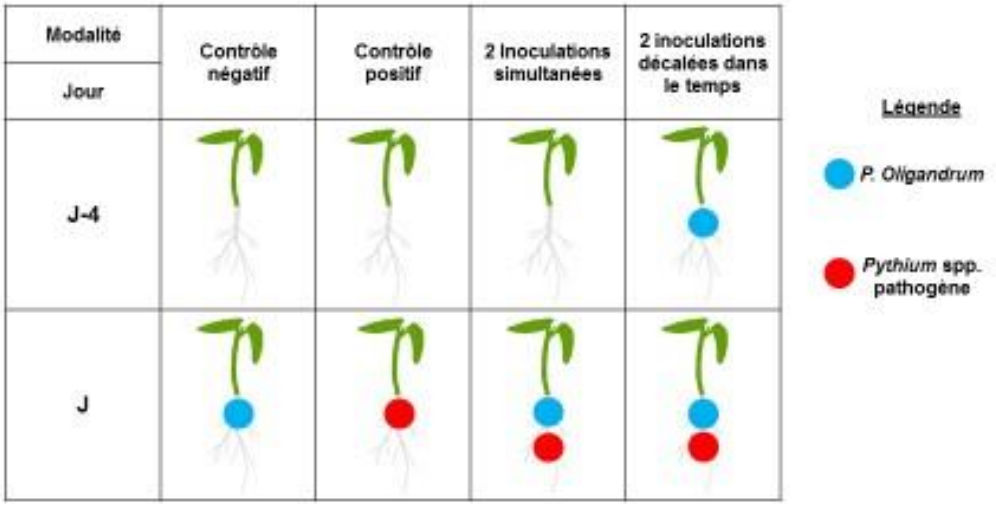
Le pouvoir antagoniste de *P. oligandrum* à l'égard des principales espèces de *Pythium* pathogènes (*P. violae*, *P. intermedium* et *P. XXX* INRA) isolées sur mâche est évalué aux cours de confrontations directes sur milieu MAC. Pour chaque confrontation, les explants mycéliens issus de cultures âgées d'environ une semaine sont placés l'un en face de l'autre à égale distance des bords de la boîte de Petri selon un patron préparé à l'avance. Trois boîtes sont réalisées pour chaque modalité, en plus de boîtes témoins pour chacun des champignons. On observe à intervalle régulier sur une période de 10 jours la croissance des deux colonies, et plus particulièrement leur point de rencontre.

2) Confrontation *in vitro* sur plantules de mâche

Les potentialités antagonistes de *P. oligandrum* sont estimées directement sur plantules de mâche préalablement inoculées par les *Pythium* sp. pathogènes. Seuls les deux espèces de *Pythium* les plus représentatives sont choisies : *P. violae* et *P. XXX* INRA. Pour chacune d'elles quatre modalités sont expérimentées et résumées dans le tableau 6.

Six boîtes contenant 5 plantules sont réalisées pour chaque modalité ; les 3 premières modalités sont notées selon l'échelle décrite précédemment (cf. tableau 5) après 2 jours, 8 jours et 15 jours. La dernière est notée de même après 4 jours, 10 jours et 14 jours, pour des raisons pratiques.

Tableau 6. Représentation des différentes modalités de confrontation sur plantules de mâche entre P. oligandrum et chacune des espèces de Pythium pathogènes (production personnelle)



C. Étude *in vitro* de la sensibilité des principales espèces de *Pythium* à l'égard du métalaxyl

La sensibilité des 10 isolats de *Pythium* sp., dont le pouvoir pathogène a été précédemment étudié, est évaluée sur milieu de culture en boîte de Petri. Chacun d'entre eux est repiqué sur 2 boîtes de milieu MA contenant une dose croissante de métalaxyl, ainsi que sur des témoins sans fongicide. Cinq concentrations différentes dans le milieu de culture sont testées : 0,01 $mg.L^{-1}$, 0,1 $mg.L^{-1}$, 1 $mg.L^{-1}$, 10 $mg.L^{-1}$ et 100 $mg.L^{-1}$ de milieu gélosé. Les différentes concentrations dans le milieu MA sont obtenues en réalisant au préalable une gamme de solutions de métalaxyl préparées à partir du SANTHAL (dosant 465.2 $g.L^{-1}$ de métalaxyl). Pour chacune des dilutions, 15 mL sont déposées dans 500 mL de milieu de culture en surfusion (cf. tableau 7). Les différents milieux sont ensuite coulés en boîtes de Petri.

Les notations consistent à mesurer chaque jour deux diamètres perpendiculaires sur chaque colonie mycélienne, sur une période de 3 jours. Toutefois, les isolats à croissance plus lente font l'objet de mesures supplémentaires : une pour *P. oligandrum*, deux pour *P. XXX* INRA, *P. XXX* CDDM et 313.

Tableau 7. Modalités de préparation des solutions et des milieux de culture MA à différentes concentrations en métalaxyl (production personnelle)

Concentration de la Solution en métalaxyl en $mg.L^{-1}$ (volume : 15mL)	0.5	5	50	500	5000
Concentration finale du milieu MA en métalaxyl $mg.L^{-1}$ (volume : 500 mL)	0.01	0.1	1	10	100

RÉSULTATS

A. Identification des *Pythium* associés aux systèmes racinaires des mâches dépérissantes

1) Identification moléculaire

Suite au BLAST, les 186 séquences sélectionnées, représentatives de la variété des origines géographiques et des producteurs, sont alignées et retravaillées afin de constituer un arbre phylogénétique matérialisé par les figures 9 et 10 qui représentent les grands groupes d'espèces de *Pythium* qui ont pu être mis en évidence. Ainsi, au moins dix espèces de *Pythium* ont pu être différenciées à partir des isolements réalisés sur des racines de mâches affectées par le dépérissement. Tout en bas de l'arbre figure le groupe de *P. violae*, puis on trouve en remontant progressivement l'arbre les groupes de *P. sylvaticum* (cf. figure 11), *P. paroecandrum*, *P. irregulare*, le groupe de *P. XXX*, celui de P. *intermedium*, *P. perplexum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. camurandrum*, *P. kashmirense* et enfin un groupe indistinct comptant au moins une espèce non identifiée autre que *P. XXX* (cf. figure 10). En termes d'effectif, les groupes de *P. violae* et *P. XXX* sont les plus importants. Globalement, les identifications obtenues suite au *BLAST* sont confirmées. En effet, les premières branches de chaque groupe sont soutenues par des valeurs de *bootstrap* assez élevées : 100% pour *P. camurandrum*, *P. ultimum* var. *ultimum* et *P. perplexum*, 99% pour *P. intermedium*, 94% pour *P. XXX* INRA, 67% pour *P. sylvaticum* et 77% pour *P. violae*. Les groupes de *P. irregulare* et *P. paroecandrum*, vraisemblablement très proches phylogénétiquement, sont plus problématiques. La valeur de *bootstrap* est en effet assez faible pour le groupe de *P. paroecandrum*, avec seulement 32% pour l'embranchement qui le distingue de *P. irregulare*.

On constate deux anomalies dans l'arbre phylogénétique obtenu. La première concerne *P. violae*. Les séquences analysées forment un groupe contenant une séquence de référence. Cependant, d'autres séquences de référence de *P. violae* se placent hors du groupe, assez éloignées dans l'arbre. On peut formuler deux hypothèses : soit des erreurs sont présentes dans ces séquences de référence extérieures au groupe, soit les séquences analysées appartiennent à des souches différentes. La seconde anomalie concerne *P. irregulare*. En effet, le BLAST donnait un pourcentage d'identité supérieur à 97% pour quatre espèces : *Pythium cryptoirregulare*, *Pythium regulare*, *Pythium cylindrosporum* et *P. irregulare*. On ne peut qu'en conclure que le gène utilisé pour les analyses moléculaires ne suffit pas à les discriminer.

L'arbre phylogénétique s'interprète de la façon suivante : plus deux séquences seront semblables, plus leurs positions dans l'arbre seront proches. Des séquences identiques seront alignées le long d'un seul et même segment.

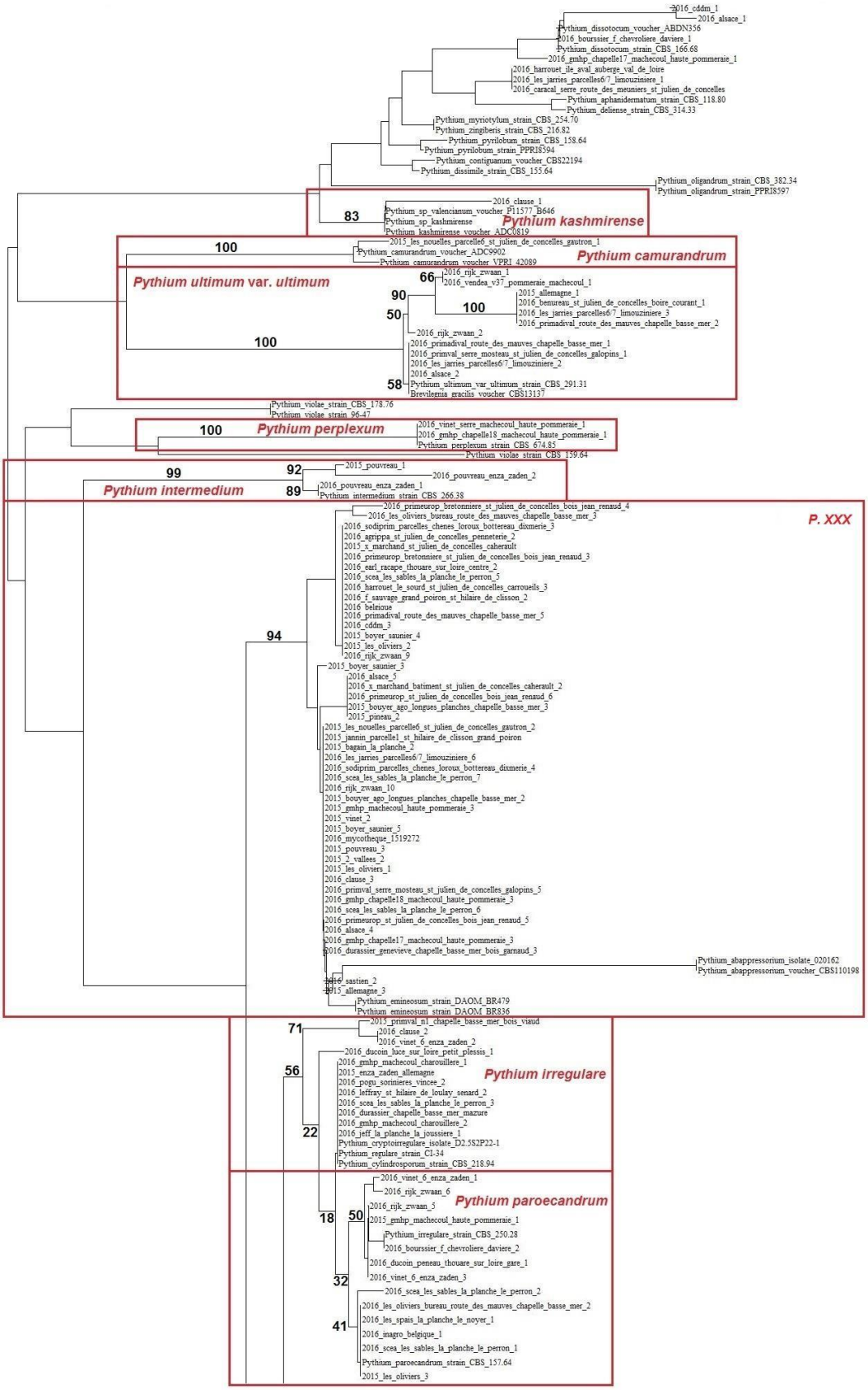


Figure 9. Portion supérieure de l'arbre phylogénétique constitué à partir de 186 séquences d'oomycètes isolés de racines de mâche dépérissantes (les groupes sont encadrés en rouge, les nombres en gras sont les valeurs de bootstrap pour les embranchements majeurs- (production personnelle, assistée de SeaView version 4.6 pour Windows)

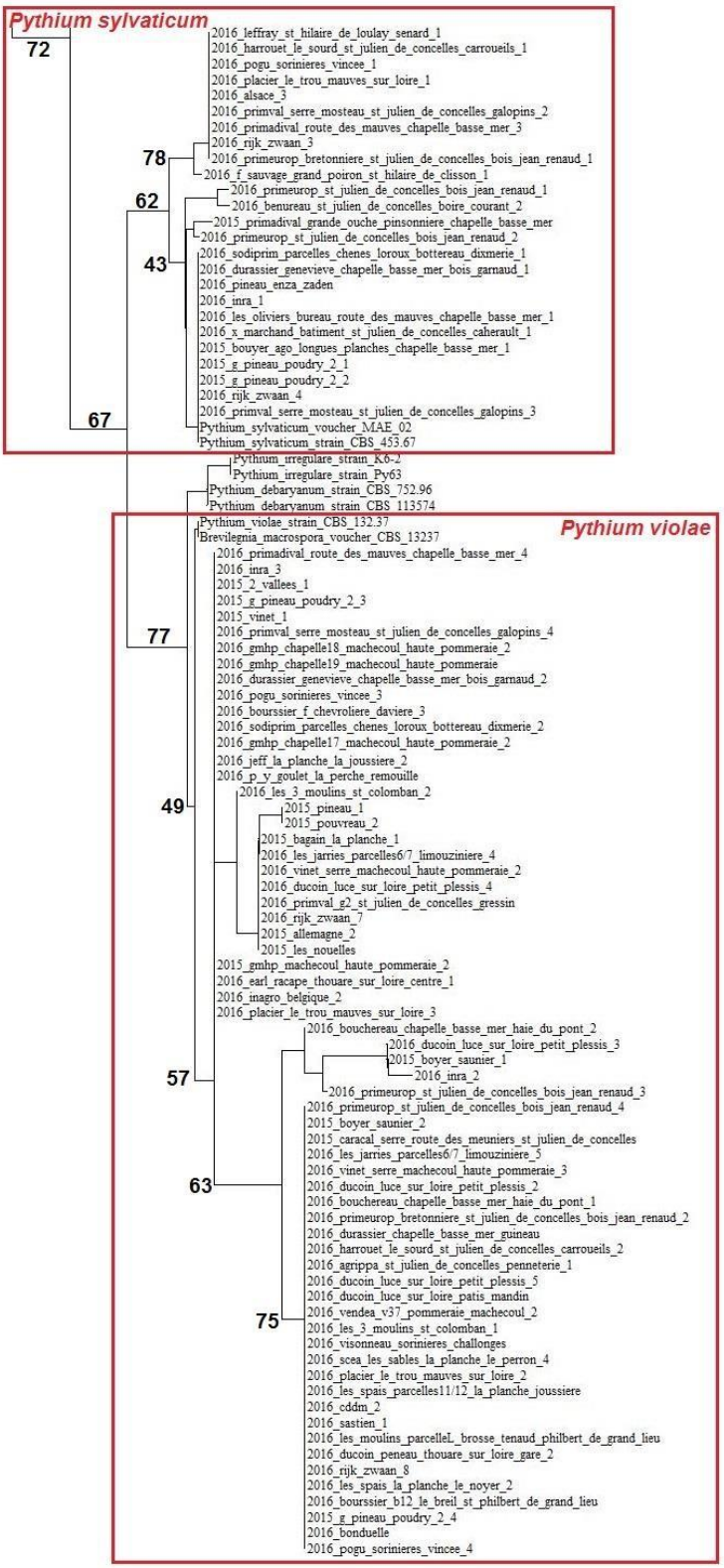


Figure 10. Portion inférieure de l'arbre phylogénétique constitué à partir de 186 séquences d'oomycètes isolées de racines de mâche dépérissantes ; les groupes sont encadrés en rouge, les nombres en gras sont les valeurs de bootstrap pour les embranchements majeurs (production personnelle, assistée de SeaView version 4.6 pour Windows)

2) Caractérisation morphologique

Les caractéristiques morphologiques d'un représentant de chaque groupe de *Pythium* identifié ont été étudiées afin de confirmer que celles-ci étaient conformes. Le tableau 8 concrétise une synthèse des observations réalisées, et notamment des structures spécifiques aux *Pythium* sp. détectées.

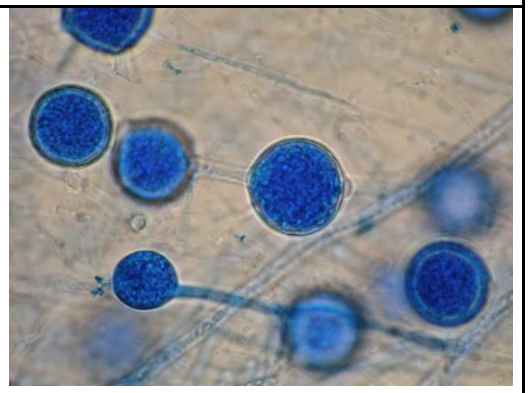
Des structures caractérisant les deux modes de reproduction de ces straménopiles ont pu être identifiées chez plusieurs espèces :

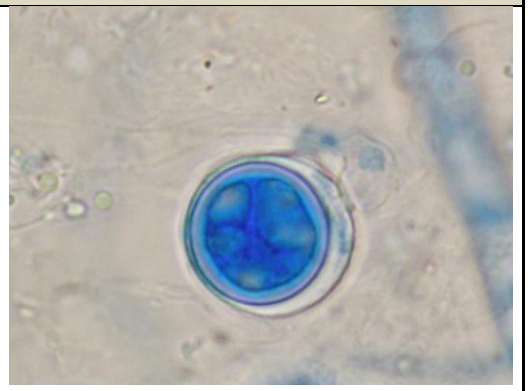
- des oogones, des anthéridies et des oospores matérialisant leur reproduction sexuée ;
- des sporanges essentiellement globulaires assurant leur reproduction asexuée.

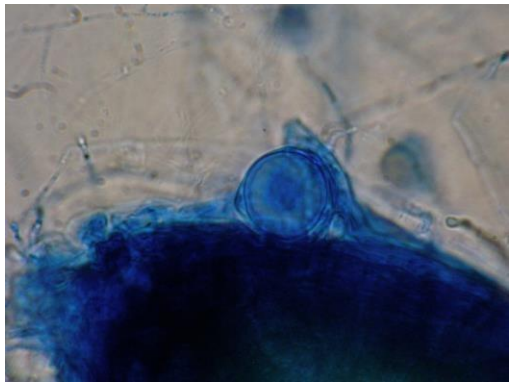
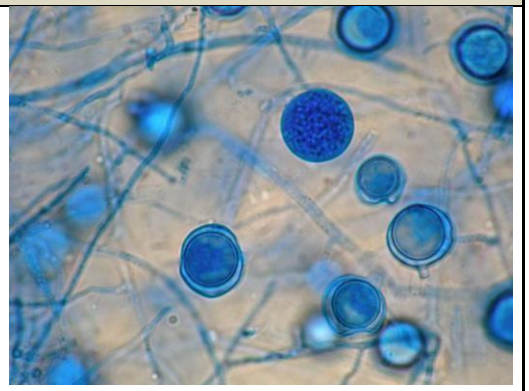
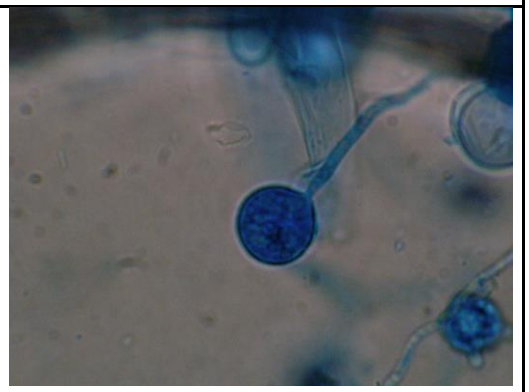
Soulignons que toutes les structures observées pour chaque représentant sont conformes aux caractéristiques morphologiques associées à l'espèce-type décrite, ce qui permet de corroborer les identifications moléculaires. Le représentant de l'espèce *P. violae* pose quelques problèmes car peu de structures ont pu être observées pour cette espèce. Les critères morphologiques observés sont globalement conformes à ceux décrits dans la littérature. Bien que certaines structures n'aient pas pu être observées, on peut considérer que l'identification est validée.

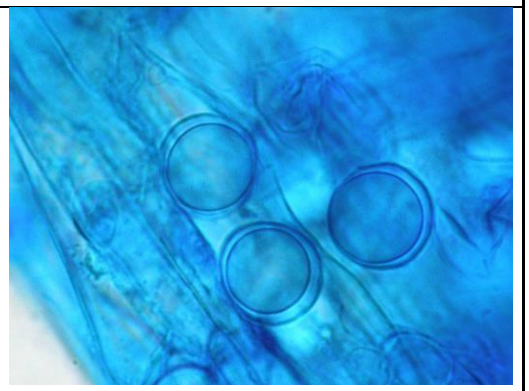
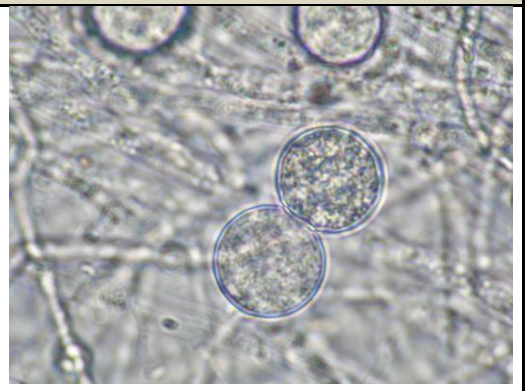
Les caractéristiques morphologiques des deux espèces non identifiées moléculairement (*P. XXX* et 313) sont indiquées dans le tableau 9 et matérialisées par les figures 11 à 13. Des structures comparables aux espèces précédentes ont également été détectées.

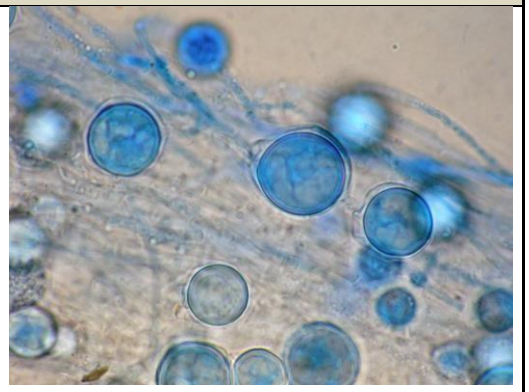
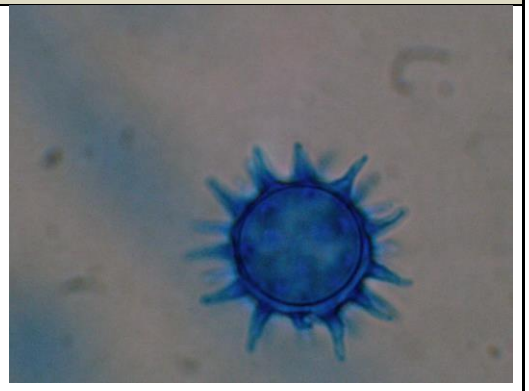
Tableau 8. Caractéristiques morphologiques de référence et observés à partir de cultures ou de racines infectées par les Pythium sp. associés au dépérissement de la mâche (Dominique Blancard, INRA Bordeaux, et production personnelle)

Espèces de *Pythium* identifiées en biologie moléculaire	**Critères morphologiques de référence**	**Critères morphologiques observés**	**Illustrations**
Pythium sylvaticum (Watanabe, 1993)	Sporanges terminaux/intercalaires, globuleux/ellipsoïdes. Sporanges souvent entourés de structures semblables à des hyphes/appressoria.	**X**	
	Absence de zoospores.	**X**	
	Hétéro- ou homothallique.	**X**	
	Oogones lisses, terminales/intercalaires, portant 2 à 4 anthéridies.		
	Anthéridies terminales, globuleuses/cylindriques/semblables aux hyphes/de forme variée, diclines.		
	Oospores aplérotiques.	**X**	
	Appressoria ellipsoïdes allongés ou claviformes.		

Pythium ultimum (Watanabe, 1993)	Sporanges globuleux, terminaux/intercalaires.	**X**	
	Absence de zoospores.	**X**	
	Oogones lisses, terminales, portant une seule anthéridie.	**X**	
	Anthéridies globuleuses/en forme de crochet/croissant de lune/courbé/de forme variée, sessile/à court pédoncule, monoclines.	**X**	
	Oospores aplérotiques, rarement plérotiques.		
Pythium paroecandrum (Watanabe, 1993)	Sporanges globuleux/subglobuleux, terminaux/intercalaires, rarement 2 à 3 sporanges en chaîne.		
	Libération de zoospores après formation de vésicules.		

	Oogones terminales/intercalaires portant une seule anthéridie.	**X**	
	Anthéridies cylindriques/en forme de crochet, typiquement sessiles/souvent sans pédoncule, diclines/monoclines.	**X**	
	Oospores aplérotiques.	**X**	
Pythium irregulare (Watanabe, 1993)	Sporanges majoritairement ellipsoïdes/cylindriques, terminaux/intercalaires.	**X**	

	Oogones terminales/intercalaires, lisses/portant 1 à 4 protubérances distribuées de façon irrégulière, portant une seule anthéridie.	**X**	
	Oospores aplérotiques.	**X**	
	Anthéridies claviformes/cylindriques, séparées de la branche anthéridiale par un septum, couvrant partiellement l'oogone, monoclines.	**X**	
Pythium intermedium (Watanabe, 1993)	Sporanges globuleux, plus de 3 sporanges en chaîne à développement basipétale, caduques.	**X**	

	Pas d'organes sexués.	**X**	
Pythium violae (Van der Plaats-Niterink, 1981)	Renflements mycéliens, terminaux/intercalaires.		
	Oogones globuleuses, terminales/intercalaires, lisses, portant 1 à 8 anthéridies.		
	Anthéridies monoclines, sessiles/pédonculées. Anthéridies diclines, terminales/sessiles.		
	Oospores aplérotiques.	**X**	
Pythium oligandrum (Van der Plaats-Niterink, 1981)	Agrégats irréguliers de sporanges subglobuleux connectés par des filaments, intercalaires/terminaux.		
	Oogones terminales/intercalaires portant des protubérances coniques, 1 à 2 anthéridies par oogone.	**X**	

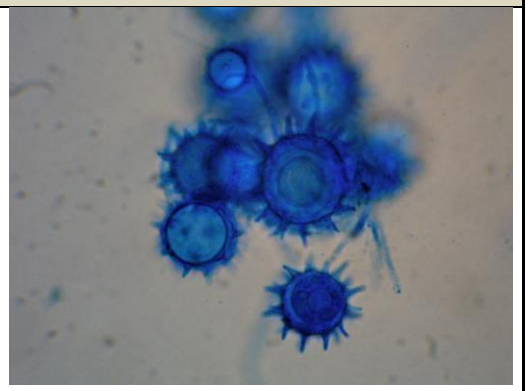
	Anthéridies diclines/parfois monoclines, souvent adhérant complètement à l'oogone, lobées.		
	Oospores aplérotiques.	**X**	

Tableau 9. Caractéristiques morphologiques observées pour les isolats (production personnelle) Caractéristiques morphologiques observés à partir de cultures ou de racines infectées par les Pythium XXX INRA et 313. associés au dépérissement de la mâche (Dominique Blancard, INRA Bordeaux, et production personnelle)

Espèces non identifiées par biologie moléculaire	**Critères morphologiques observés**
P. XXX (INRA et CDDM)	Oogones (Ø 45 µ) lisses intercalaires portant plusieurs anthéridies (4 ou plus), anthéridies diclines, oospores aplérotiques. Pas de sporanges observés. Pas de zoospores observées. Sur racines, toutes les structures sont formées à l'intérieur des tissus.
313	Sporanges globuleux (à confirmer), oogones intercalaires portant une unique anthéridie. Pas de zoospores observées.

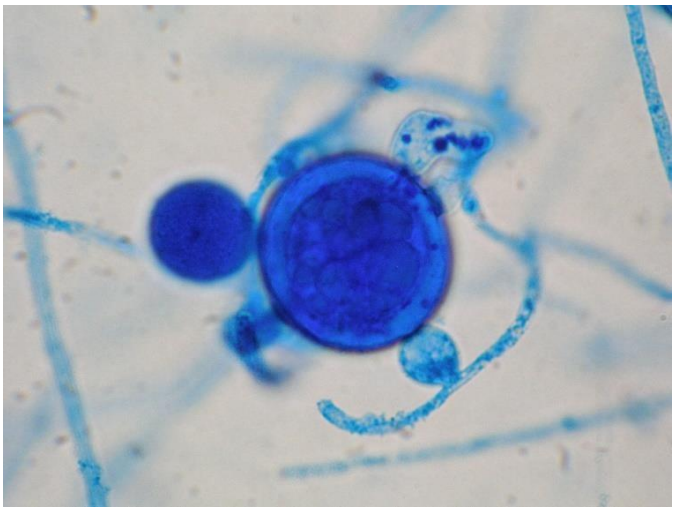


Figure 11. Oogone entourée de plusieurs anthéridies formés par Pythium XXX (Dominique Blancard, INRA Bordeaux et production personnelle)



Figure 12. Oogone fécondée par une seule anthéridie, structures de l'isolat 313 (Dominique Blancard, INRA Bordeaux et production personnelle)



Figure 13. Sporanges de l'isolat 313 (Dominique Blancard, INRA Bordeaux et production personnelle)

B. Fréquence des *Pythium* sp. isolés de mâches dépérissantes dans plusieurs zones de production

1) Toutes zones de production confondues

Un total de 443 isolats de *Pythium* traités en 2015 et en 2016, provenant de systèmes racinaires de mâches dépérissantes, a été séquencé avec succès. Ils ont différentes origines : Allemagne, Belgique, Alsace, Bouches-du-Rhône et majoritairement le Grand Ouest (plus précisément la région nantaise).

La fréquence avec laquelle ils sont isolés, toutes zones de production confondues, est plutôt contrastée et matérialisée dans la figure 14. Les espèces les plus représentées sont *P. violae* et *P.* XXX, avec respectivement 178 et 109 isolats, suivies par *P. irregulare* (58 isolats) et *P. sylvaticum* (54 isolats). D'autres espèces sont moins représentées telles que *P. utlimum* var. *ultimum* et *P. paroecandrum* comptabilisant chacune 13 isolats, voire plutôt anecdotiques avec moins de 10 isolats chacune.

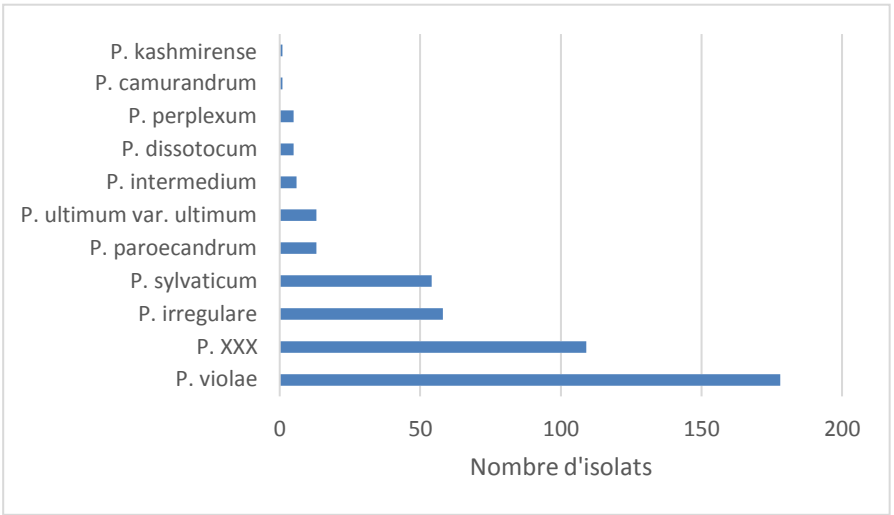


Figure 14. Représentativité des espèces de Pythium identifiées à partir de 443 isolats associés aux racines de mâches dépérissantes (production personnelle)

Si l'on considère les isolats provenant des zones de production autres (cf. figure 15) que le Grand Ouest, qui sera analysé par la suite, on constate que plusieurs espèces de *Pythium* sont associées aux racines des mâches dépérissantes, notamment les espèces *P. XXX*, *P. violae* et *P. ultimum*.



Figure 15. Espèces de Pythium associées aux racines de mâches dépérissantes dans quelques zones de production, hors Grand Ouest (production personnelle, assistée de Google Earth version 7.1.5.1557 pour Windows)

2) Dans le grand Grand Ouest et notamment la zone de production nantaise

Si l'on s'intéresse aux 411 isolats récoltés dans cette région, on retrouve quasiment les mêmes tendances que celles observées pour l'ensemble des zones de production, avec toujours les mêmes espèces majoritaires : *P. violae* avec 42% des échantillons, P. *XXX* avec 24% et *P. sylvaticum* avec 12% (cf. figure 16).

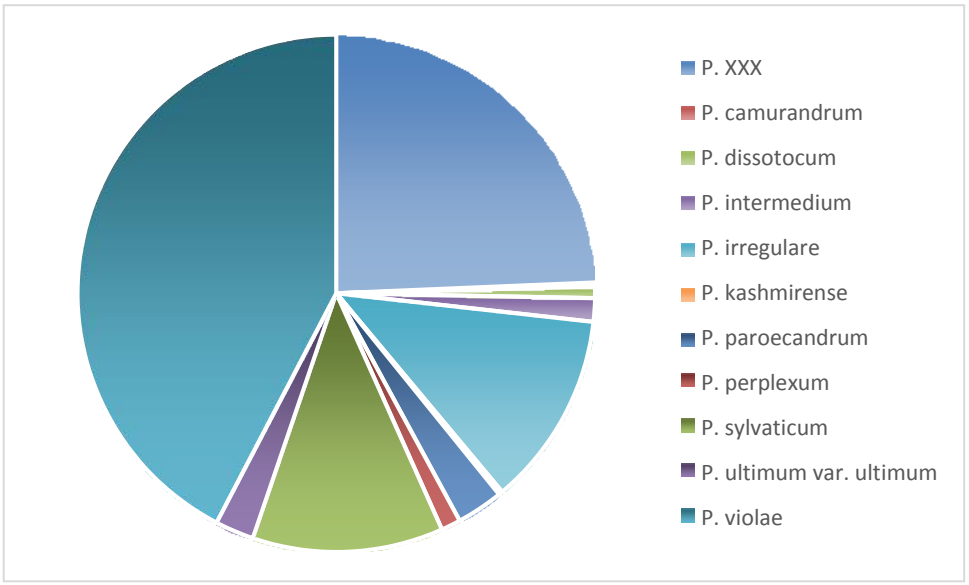


Figure 16. Fréquence des espèces de Pythium identifiées à partir de 411 isolats associés aux racines de mâches dépérissantes récoltées dans le Grand Ouest (production personnelle)

L'étude de la fréquence d'isolement des *Pythium* dans les 66 parcelles de mâches dépérissantes du Grand Ouest (cf. figure 17) permet de constater que l'espèce *P. violae* est de loin la plus présente avec une implantation dans 73% parcelles investiguées, suivie du *Pythium* XXX (48%), *P. sylvaticum* (30%), *P. irregulare* (20%), *P. ultimum* var. *ultimum* dans 12%. Les autres espèces sont moins présentes avec une fréquence inférieure à 10%. Il apparaît donc que *P. violae* et Pythium XXX INRA sont les deux espèces les plus souvent rencontrées dans les différentes parcelles de mâches dépérissantes.

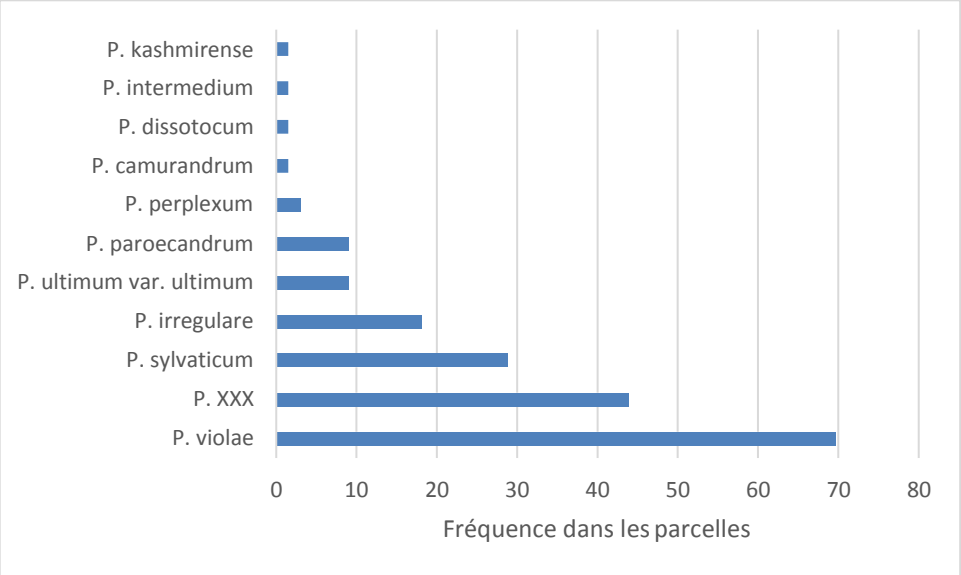


Figure 17. Fréquence des espèces de Pythium retrouvées dans les 66 parcelles de mâches dépérissantes situées dans le Grand Ouest (production personnelle)

C. Potentialités parasitaires des Pythium sp. associés aux racines de mâches dépérissantes

Les différents isolats de *Pythium* sp. étudiés ont révélé un pouvoir pathogène assez différent en fonction des espèces, comme on peut le constater dans la figure 18. En effet les INR moyens calculés lors de la troisième notation fluctuent entre 2 pour l'espèce la moins agressive (313) et presque 5 pour la plus sévère (*P. violae*). Par ailleurs, on constate qu'après 2 jours, la plupart des isolats provoquent déjà des nécroses sur les racines des plantules. *P. violae* et *P. irregulare* sont les plus agressifs, avec un INR proche de 2. Viennent ensuite *P. paroecandrum* et *P. ultimum*, avec un INR égal à 1. *P. sylvaticum* et *P. intermedium* sont relativement peu agressifs, avec des INR respectivement de 0,7 et 0,5. Les isolats non identifiés à croissance dite lente *P. XXX* INRA et CDDM ainsi que l'isolat 313 ne provoquent quant à eux quasiment aucun symptôme. Cela change cependant 8 jours après inoculation. En effet, tous les isolats provoquent clairement des nécroses racinaires. Là encore, *P. violae* et *P. irregulare* sont les plus agressifs, avec des INR respectivement égaux à 4,8 et 4. Mais cette fois, *P. XXX* INRA se démarque également par son agressivité avec un INR égal à 3,6. En l'espace de seulement 6 jours, l'INR est presque trois fois plus important. L'isolat *P. XXX* CDDM, qui appartient au même groupe que *P. XXX* INRA d'après les études moléculaires décrites ci-dessus, réagit pourtant sensiblement différemment : son INR est un peu plus faible, égal à 2,8. *P. sylvaticum*, *P. paroecandrum*, *P. intermedium*, *P. ultimum* et l'isolat 313 présentent tous un INR aux alentours de 2. Comme dans le cas de *P. XXX* INRA 1, l'isolat 313 connaît un gain d'agressivité important en seulement 6 jours. Enfin, 15 jours après inoculation, on constate peu d'évolution pour les isolats les plus agressifs, le système racinaire des plantules étant déjà fortement dégradé. En revanche, on note une

nette différence d'INR pour les isolats moyennement agressifs les premiers jours, excepté *P. ultimum*. Les INR de *P. sylvaticum*, *P. paroecandrum* et *P. intermedium* sont cette fois proches de 3. La figure 19 montre les symptômes observés sur les plantules.

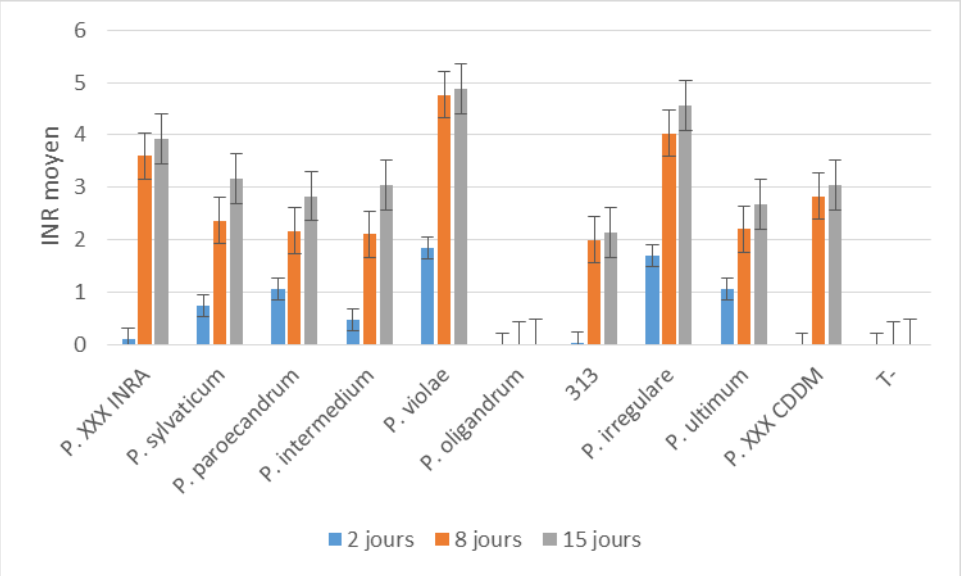


Figure 18. Potentialités parasitaires sur racines de mâche des principales espèces de Pythium associées au dépérissement (INR = indice moyen de nécroses racinaires calculé à partir de notations réalisées dans le temps ; les barres d'erreur indiquent l'erreur standard (production personnelle)

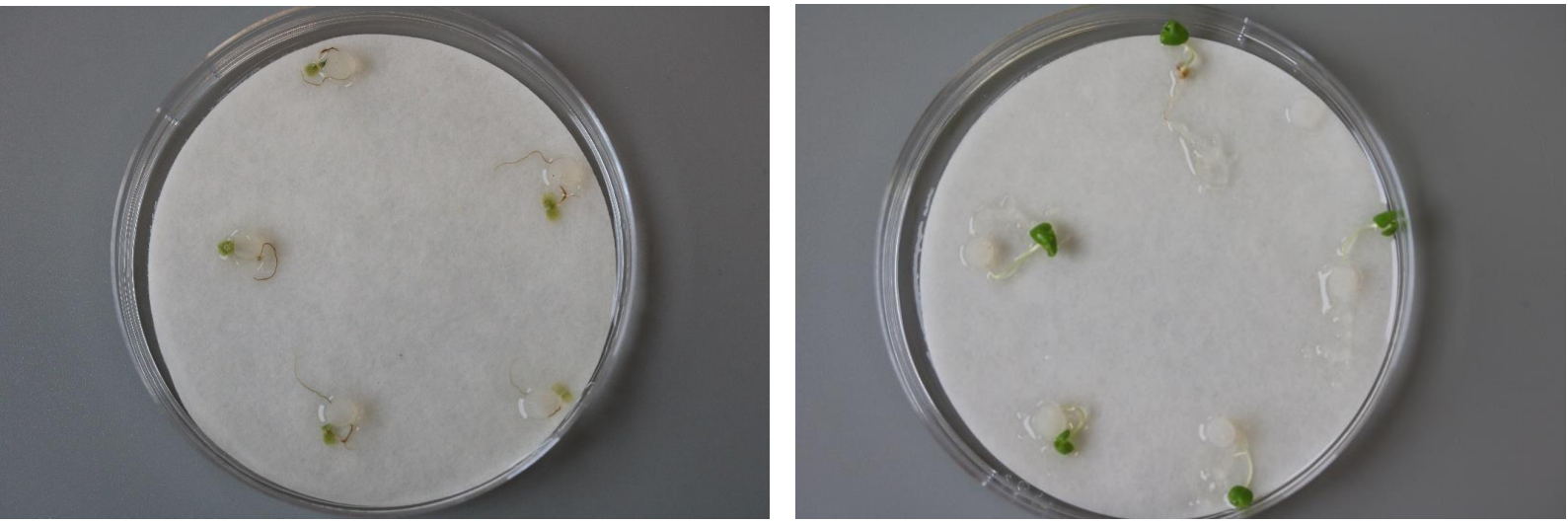


Figure 19. À droite, plantules inoculées avec P. violae*, 15 jours après inoculations ; les racines sont complètement nécrosées et les cotylédons sont flétris ; à gauche, plantules témoins (production personnelle)*

D. Évaluation *in vitro* des aptitudes antagonistes de Pythium oligandrum à l'égard des Pythium sp. associés au dépérissement de la mâche

1) Confrontation ***in vitro*** **sur milieu gélosé**

Les confrontations réalisées in vitro sur milieu de culture entre *P. oligandrum* et quelques espèces de *Pythium* associées au dépérissement n'ont pas permis de mettre en évidence des phénomènes marqués d'antagonisme (antibiose, hyperparasitisme, etc.), mais plutôt de constater deux types de comportements :

- un recouvrement très rapidement de la colonie de *P. oligandrum* par le mycélium de *P. violae* et *P. intermedium* (cf. figures 20 et 21) ;
- un contournement de la colonie de *P. oligandrum* dans le cas de l'isolat *P. XXX* INRA dont la croissance est plus lente, bien que cette dernière espèce finisse là encore par recouvrir *P. oligandrum* (cf. figure 22).

Ce type de confrontation direct sur milieu artificiel, ne semble pas permettre à *P. oligandrum* d'exprimer de quelconques activités antagnosistes.

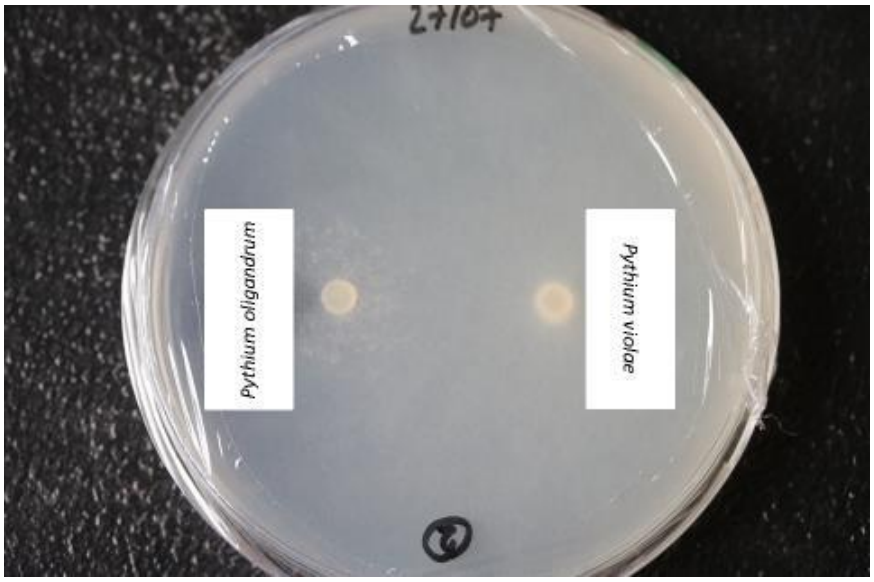


Figure 20. Confrontation P. oligandrum et P. violae sur MAC âgée de 4 jours : recouvrement de P. oligandrum par P. violae (production personnelle)

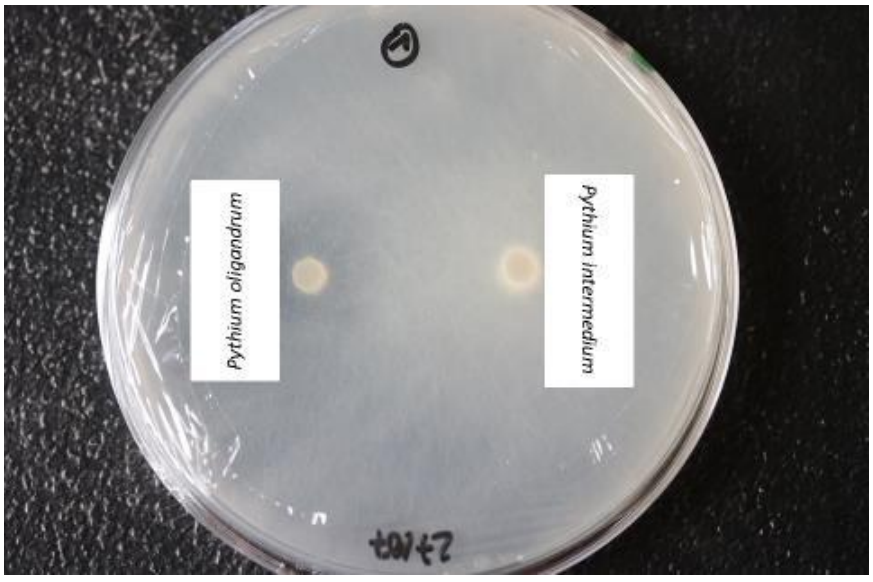


Figure 21. Confrontation P. oligandrum et P. intermedium sur MAC âgée de 4 jours : recouvrement de P. oligandrum par P. intermedium (production personnelle)

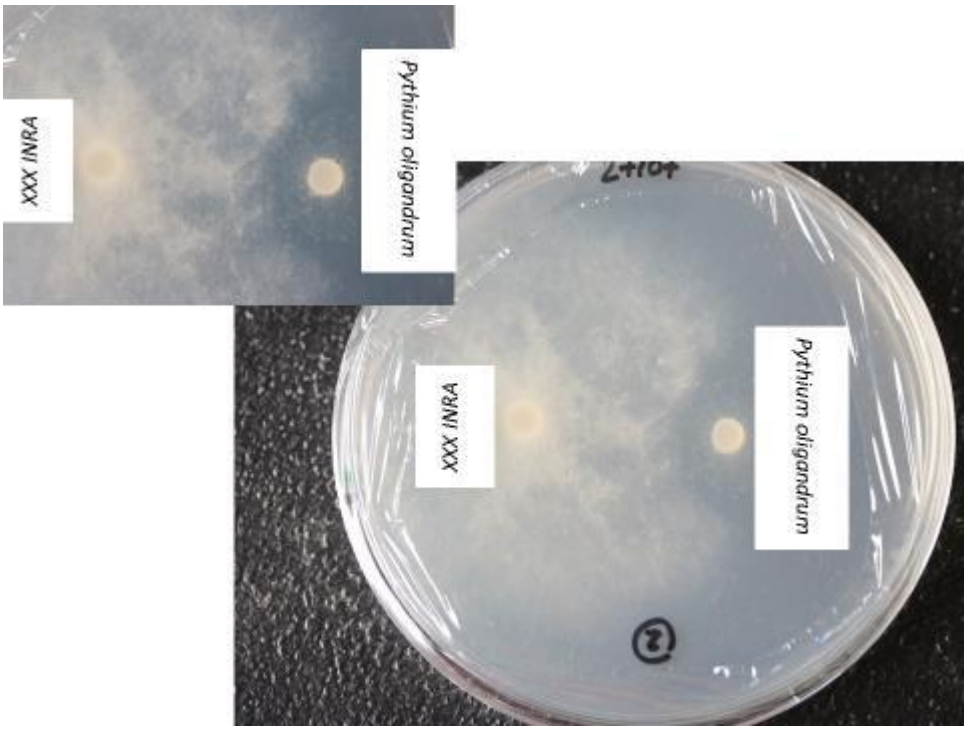


Figure 22. Confrontation P. oligandrum et l'isolat XXX INRA sur MAC âgée de 4 jours (à droite), et gros plan sur la zone de confrontation (à gauche) (production personnelle)

2) Confrontation ***in vitro*** **sur plantules de mâches**

Les co-inoculations de racines de plantules de mâche par *P. oligandrum* et plusieurs espèces de *Pythium* associées au dépérissement de la mâche permettent de mettre en évidence plusieurs effets potentiels de la part du biopesticide expérimenté.

Une modification de la croissance des plantules de mâche

En observant certaines boîtes de Petri, on remarque que pour les deux isolats utilisés toutes les plantules traitées avec *P. oligandrum*, et ce quelle que soit la date de traitement, présentent des organes aériens relativement plus développés que les autres. Dans certains cas, les plantes traitées ont même développé une autre racine après que la première ait été attaquée et nécrosée. Ce phénomène a été observé avec les deux isolats testés, mais tout de même plus souvent avec *P. XXX* INRA. La présence de *P. oligandrum* semble donc avoir un effet positif sur le développement de la partie aérienne des plantules mais aussi la régénération de racines (figure 23).

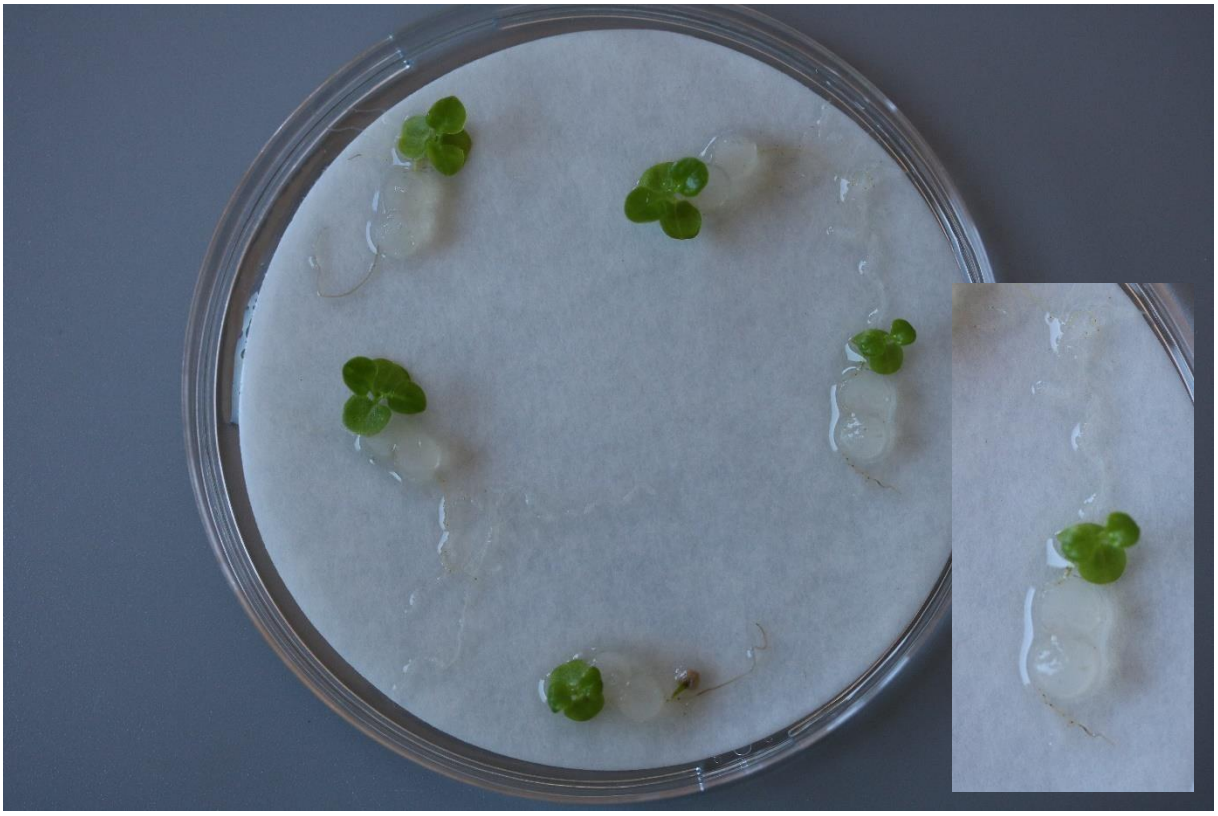


Figure 23. Plantules de mâches inoculées simultanément avec P. oligandrum et P. XXX INRA, 15 jours après inoculations, et gros plan sur une plantule présentant une repousse racinaire (production personnelle)

Une réduction des lésions racinaires des plantules de mâche

Sur les figures 24 et 25 sont mentionnées les INR notés sur les systèmes racinaires de plantules de mâches sur lesquelles les co-inoculations ont été réalisées. On peut constater sur la figure 24 une certaine efficacité de *P.oligandrum* à l'égard du *P. XXX*, surtout lorsque le biopesticide est apporté 4 jours avant d'inoculer avec le *Pythium* pathogène. L'effet protecteur est observé dans ce cas à presque tous les dates d'observations. Par contre, il n'en est pas de même lorsque les deux *Pythium* sp. sont apportés simultanément.

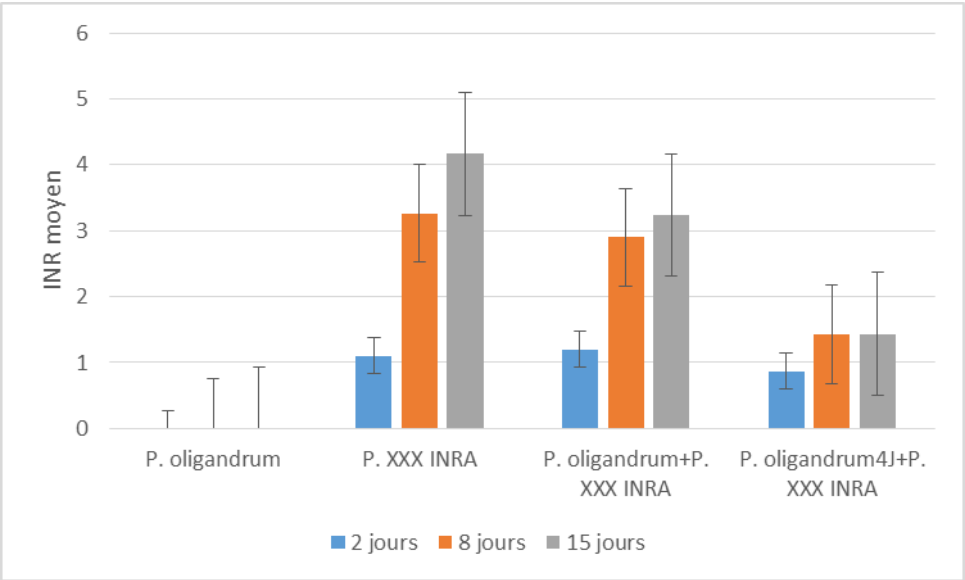


Figure 24. INR moyens constatés sur des systèmes racinaires de mâche co-inoculés ou non avec P. oligandrum et P. XXX INRA, calculés aux trois dates de notations ; les barres d'erreur indiquent l'erreur standard (production personnelle)

En ce qui concerne *P. violae* en revanche, les effets de *P. oligandrum* semblent moins marqués (cf. figure 25).

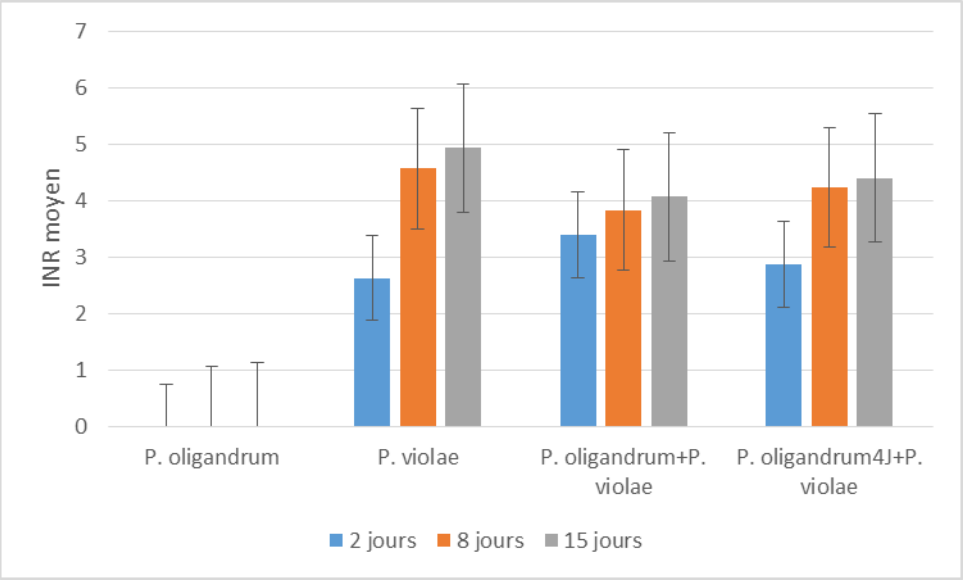


Figure 25. INR moyens constatés sur des systèmes racinaires de mâche co-inoculés ou non avec P. oligandrum et P. violae, calculés aux trois dates de notations ; les barres d'erreur indiquent l'erreur standard (production personnelle)

Des tests de Wilcoxon pour comparaison des modalités deux à deux ont été effectués, afin de vérifier le caractère significatif des différences observées, et ainsi de confirmer que *P. oligandrum* exerce bien un effet antagoniste (cf. tableau 10).

Tableau 10. p-values obtenues pour chacun des tests statistiques effectués sur les traitements avec P. oligandrum (production personnelle)

Modalités comparées	***p-value***
Toutes les modalités traitées avec *P. oligandrum* et toutes celles non traitées	2.908e-15
XXX INRA et P. oligandrum+XXX INRA	1.405e-07
XXX INRA et P. oligandrum4J+XXX INRA	1.982e-12
P. oligandrum+XXX INRA et P. oligandrum4J+XXX INRA	3.739e-10
P. violae et P. oligandrum+P. violae	6.524e-08
P. violae et P. oligandrum4J+P. violae	1.451e-05
P. oligandrum+P. violae et P. oligandrum4J+P. violae	0.0416

Dans chaque cas, les *p-value*s sont inférieures à la valeur-seuil de 0,05. L'hypothèse nulle « les deux distributions sont égales » est donc à chaque fois rejetée, ce qui nous permet de conclure que, pour les deux isolats, le traitement par *P. oligandrum* ainsi que la date de traitement ont un effet significatif. Cependant, étant donné que l'on réalise plusieurs comparaisons successives, on peut choisir d'appliquer la correction de Bonferroni afin de contrôler l'erreur sur l'ensemble des comparaisons [12]. La valeur-seuil devient alors 0,007, pour un total de 7 comparaisons. Dans ce cas, les conclusions précédentes sont toujours valables à une exception près : la date de traitement n'a plus d'effet significatif dans le cas de *P. violae*.

E. Étude *in vitro* de la sensibilité des principales espèces de Pythium à l'égard du métalaxyl

Les comportements à l'égard de 6 concentrations de métalaxyl des principales espèces de *Pythium* isolées des racines de mâches dépérissantes sont synthétisés dans le tableau 11. La majorité des espèces de *Pythium* testées voient leur croissance mycélienne quasiment inhibée aux alentours de 1 mg.L^{-1} de métalaxyl dans le milieu de culture. On note quelques légères différences de sensibilité décalant quelque peu les CI50 de ces espèces, toutes situées en dessous de 1 mg.L^{-1}, voire 0,1 mg.L^{-1}. Seule une espèce semble un peu moins sensible au métalaxyl, *P. irregulare*, sa CI50 étant plus proche de 10 mg.L^{-1}. Enfin, notons que *P. oligandrum* est bien sensible au fongicide. Dans le cas d'une utilisation de ce dernier comme antagoniste, il ne pourrait pas être associé au métalaxyl.

Tableau 11. Pourcentages d'inhibition observés pour chaque isolat en fonction de la concentration du milieu de culture MA en métalaxyl (production personnelle)

	Gamme (mg.L^{-1})	0,00	0,01	0,10	1,00	10,00	100,00
Isolats	XXX INRA	0,0	0,0	89,2	99,0	100,0	100,0
	P. violae	0,0	1,2	22,7	74,7	98,6	100,0
	P. sylvaticum	0,0	7,6	65,5	85,1	82,5	98,5
	P. intermedium	0,0	9,3	28,2	93,2	99,9	100,0
	P. paroecandrum	0,0	11,9	37,0	84,8	98,5	100,0
	P. oligandrum	0,0	2,9	91,4	100,0	100,0	100,0
	P. ultimum	0,0	34,2	80,4	99,5	99,7	100,0
	P. irregulare	0,0	1,7	0,8	9,8	54,3	100,0
	XXX CDDM	0,0	8,3	63,8	100,0	99,6	100,0
	313	0,0	4,2	64,9	98,9	100,0	100,0

DISCUSSION

Un état des lieux précis des différentes espèces de *Pythium* sp. associées au dépérissement de la mâche a été réalisé à l'échelle du bassin de production nantais, puis ponctuellement dans quelques zones de production plus ou moins éloignées.

Les analyses moléculaires ont révélé la présence d'au moins onze espèces de *Pythium*, dont certaines n'avaient pas encore été détectées dans les travaux préliminaires. Parmi ces onze espèces, figurent *P. violae* et *P. irregulare,* deux espèces pouvant s'attaquer aux cultures légumières. Remarquons que *P. violae* est un composant du complexe de *Pythium* sp. responsable du *cavity spot,* principal problème sanitaire se manifestant sur jeune carotte. Il n'est donc pas étonnant que cette espèce se manifeste sur mâche car la carotte est un ancien fleuron de la région nantaise, largement cultivée jusqu'au début des années 1990. L'espèce *P. irregulare* a quant à elle été signalée très récemment sur mâche en Italie, décrite comme agent responsable de pourritures racinaires, symptômes proches de ceux rencontrés

dans les cultures nantaises (Garibaldi *et al.*, 2015). Il convient néanmoins de noter que la caractérisation moléculaire de *P. irregulare* réalisée dans cette étude manque de précision et ne permet que de définir un groupe vague dit « *irregulare* ». Il est tout de même fortement probable, aux vues des résultats du BLAST, que ce groupe formé par les isolats concernés soit bien celui de *P. irregulare,* mais ces isolats semblent aussi très proches d'autres espèces (*P. regulare*, *P. cryptoirregulare* et *P. cylindrosporum)*. C'est pourquoi le choix d'une autre séquence permettrait peut-être de mieux discriminer les différents isolats de ce groupe, et ainsi d'affiner ces résultats. La troisième espèce qui présente un intérêt est celle que l'on a désignée *Pythium XXX*. On la soupçonne d'être une nouvelle espèce de *Pythium* pathogène sur mâche. Ceci a été confirmé par les analyses moléculaires, le BLAST ne permettant pas de trouver suffisamment de similarité avec les espèces référentes de la GenBank du NCBI. Cette espèce reste encore à être caractérisée morphologiquement, même si des premiers éléments ont été apportés dans ce mémoire. Cette espèce a également la particularité de pousser plus lentement que les autres sur milieu de culture. Cette singularité semble déjà avoir été décrite en Allemagne à propos d'une espèce de *Pythium* appelée *Pythium spec*. qui serait pathogène sur mâche et présenterait une croissance lente, mais qui n'a jamais été identifiée par les auteurs (Koch & Riesterer, 2001). Les trois espèces citées ci-dessus se trouvent être les plus fréquentes au sein des isolats analysés : elles constituent l'effectif le plus important. Au moins l'une de ces trois espèces est présente dans la quasi-totalité (58 sur 62) des parcelles étudiées dans la région nantaise et apparaissent dans presque toutes les autres zones de production où des prélèvements ont été effectués suite à des signalements similaires de dépérissement sur mâche (Alsace, Allemagne et Belgique). Ce sont également les espèces les plus agressives en termes de pouvoir pathogène, ce qui rejoint les résultats des essais du CDDM qui avait reproduit des symptômes sévères à partir de *P. violae*, de l'isolat *P. XXX* CDDM et de deux isolats qui ont été récemment identifiés comme appartenant au groupe des *P. irregulare*. Néanmoins, d'autres espèces un peu moins fréquentes, telles que *P. sylvaticum* ou *P. ultimum*, ont également la capacité de reproduire des symptômes similaires à ceux observés au champ. Toutes ces considérations semblent indiquer que le phénomène de dépérissement de la mâche ne serait pas causé par un unique agent pathogène, mais par un complexe de *Pythium*. En effet dans deux tiers des parcelles échantillonnées en région nantaise, au moins deux espèces ont été détectées. Néanmoins, bien que l'étude ait porté sur un effectif important (plus de 400 isolats), leur répartition dans les différentes régions était très inégale. En effet, l'étude devait porter principalement sur le bassin de production nantais, mais des signalements de dépérissement sur mâche ayant été émis dans d'autres zones de production, il convenait d'avoir une première tendance pour ces lieux. On retrouve des espèces similaires et notamment *Pythium XXX*. Il serait donc intéressant d'obtenir d'avantage d'échantillons hors secteur nantais pour appuyer cette première conclusion. Il est à noter également que, plusieurs dizaines de séquences n'ont pas pu être exploitées pour des raisons techniques. De nouvelles analyses seront effectuées afin de confirmer ces premières tendances. En revanche, même si de nombreuses parcelles ont été échantillonnées, seulement quelques plantes ont été prélevées au sein de ces parcelles. Plusieurs échantillonnages intra-parcellaires permettraient de se faire une idée plus représentative de la diversité réelle des espèces au champ. Enfin, il conviendrait de prendre en compte la notion de temps car, bien que le dépérissement soit un problème de saison hivernale, des nécroses sont également observées sur racines en été (CDDM, 2014). Mais les plantes semblent prendre le dessus grâce à des conditions de culture plus favorables. Les tests *in vitro* ont également été effectués dans les optima de température de croissance des *Pythium* sp. (environ 20°C). Néanmoins, d'après Koch et Riesterer, l'espèce non identifiée à croissance lente *Pythium spec*. aurait un optimum thermique plus bas. Comme l'on a également affaire à une espèce inconnue qui pousse lentement, il conviendrait d'étudier plus précisément sa biologie.

Concernant l'étude des premières options de lutte, plusieurs conclusions peuvent être tirées, et de nombreuses perspectives envisagées. *Pythium oligandrum* est connu pour ses capacités mycoparasitiques, antibiotiques et stimulatrices de défense des plantes. Le

mycoparasitisme n'a pas pu être clairement observé, car les espèces de *Pythium* pathogènes prenaient à chaque fois le dessus lors des confrontations directes sur milieu de culture. Néanmoins, on peut sans doute attribuer le contournement de la colonie de *P. oligandrum* par *P. intermedium* aux premiers stades de la confrontation à un phénomène d'antibiose. Quant à l'aspect stimulateur de défense des plantes, il a été observé au cours des co-inoculations sur plantules. En effet, cet essai a permis de conclure que le traitement avec *P. oligandrum* pouvait réduire de manière significative l'INR, d'autant plus si ce *Pythium* était apporté en pré-inoculation. Dans le cas d'une efficacité prouvée au champ, *P. oligandrum* constituerait plutôt une méthode de lutte à action préventive. Il s'agit d'une solution prometteuse en tant qu'agent de biocontrôle. Cependant, des travaux d'approfondissement sont nécessaires. Les tests ont tous été menés *in vitro,* en conditions stériles et contrôlées. S'il n'est pas possible à ce stade d'affirmer que *P. oligandrum* se comportera de la même façon au champ, il serait intéressant d'envisager d'effectuer de nouveaux tests en terrines cette fois et d'observer son comportement dans un substrat proche du sol nantais.

Des premiers essais de lutte chimique ont également été entrepris en testant l'un des rares produits anti-pythiacées disponible sur le marché, le SANTHAL, dont la substance active est le métalaxyl. Ce dernier est beaucoup utilisé en enrobage de semences et notamment sur la majorité des semences de mâche enrobées en culture conventionnelle. Les oomycètes peuvent se transmettre par l'intermédiaire des graines, et sont également connus pour attaquer préférentiellement les tissus jeunes, ce qui en fait de redoutables agents de fonte de semis. Les plantules de mâche sont donc des cibles particulièrement à risques ce qui explique l'utilisation quasi-systématique de graines enrobées. L'essai consistait à mesurer la croissance mycélienne sur milieu contenant une concentration plus ou moins élevée en métalaxyl. Il en ressort que la plupart des isolats sont sensibles, puisqu'ils se développent difficilement sur un milieu contenant une concentration en métalaxyl supérieure à 0,1 $mg.L^{-1}$ Comme seulement cinq concentrations ont été utilisées dans ce test, il n'a pas été possible de calculer de façon précise leur CI50, qui correspond à la concentration en matière active pour laquelle la croissance mycélienne est inhibée à hauteur de 50%, mais on peut situer son ordre de grandeur. Dans l'ensemble, les différentes espèces semblent sensibles au métalaxyl. On note tout de même quelques tolérances (*P. irregulare*) qui pourraient s'expliquer par des traitements récurrents des sols en métalaxyl par le passé. Néanmoins, d'autres isolats au sein des espèces les plus présentes et les plus agressives doivent être testés, car il n'est pas impossible qu'il existe des souches résistantes. Et ces premiers essais n'ont permis de donner qu'une première tendance.

Se pose enfin la question du bien-fondé de la lutte chimique dans le temps. Car, outre l'apparition de résistances, l'efficacité semble limitée sur le terrain, bien que permettant de s'affranchir des fontes de semis. Malheureusement, une fois les plantes matures, celle-ci ne bénéficie plus des effets de l'enrobage et les *Pythium* sp. pathogènes peuvent les coloniser, ce qui pourrait confirmer le phénomène de dépression sur les planches de mâches constaté par les agriculteurs environ huit semaines après le semis.

CONCLUSION

Les deux principaux objectifs de ce stage étaient d'identifier et de caractériser le ou les responsables du dépérissement de la mâche observé dans la région nantaise, principalement en période hivernale, et d'étudier les premières pistes de lutte envisageables. Grâce aux travaux effectués l'année précédente par les partenaires du projet (CDDM, INRA et semenciers), de fortes suspicions existaient à l'égard d'une ou plusieurs espèces du genre *Pythium*. Les isolements biologiques réalisés dans différentes zones de production, et en particulier dans le grand-ouest, ont permis de confirmer l'implication de plusieurs espèces de *Pythium*. Une dizaine d'espèces ont été mises en évidence, dont trois particulièrement fréquentes et agressives. L'hypothèse de l'implication non pas d'une espèce mais d'un complexe d'espèces dans le dépérissement de la mâche a pu être étayée. Les deux pistes de lutte étudiées semblent prometteuses, même si des études complémentaires devront être conduites.

Les travaux présentés dans ce mémoire constituent les fondements d'une problématique plutôt complexe encore trop peu explorée. De nombreuses questions restent encore à être travaillées et élucidées, concernant la caractérisation et l'identification de la nouvelle espèce *Pythium XXX*, la définition du ou des complexes impliqués et les processus parasitaires en cause, ainsi que les conditions pédo-climatiques nécessaires à l'expression de ce dépérissement.

Bibliographie

Abdelghani E.Y., Bala K., Paul B. (2004). Characterisation of *Pythium paroecandrum* and its antagonism towards *Botrytis cinerea*, the causative agent of grey mould disease of grape. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 230, 177-183.

Abdelzaher H.M.A., Mohamed A.E., Ezzat M.F.-A. (1997). Isolation of *Pythium oligandrum* from Egyptian soil and its mycoparasitic effect on *Pythium ultimum var. ultimum* the damping-off organism of wheat. *Mycopathologia*, 139, 97-106.

Agrios G.N. (1969). *Plant Pathology*. Fifth Edition, Elsevier Academic Press, United States, 922 p.

Al-Sadi A.M., Drenth A., Deadman M.L., de Cock A.W.A.M., Aitken A.I.B. (2007). Molecular characterization and pathogenicity of *Pythium* species associated with damping-off in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus*) in Oman. *Plant Pathology*, 56, 140-149.

Aoki K., Tojo M., Watanabe K., Uzuhashi S., Kakishima M. (2007). Cottony leak of scarlet runner bean caused by Pythium aphanidermatum. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 408-410.

Benhamou N., Le Floch G., Vallance J., Gerbore J., Grizard D., Rey P. (2012). *Pythium oligandrum*: an exemple of opportunistic success. *Microbiology*, 158, 2679-2694.

Boudejko T. Andème-Onzighi C., Vicré M., Balangé A.-P., Omokolo Ndoumou D., Driouich A. (2006). Loss of pection is an early event during infection of cocoyam roots by *Pythium myriotylum*. *Planta*, 223, 271-282.

Campion C., Massiot P., Rouxel F. (1997). Aggressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 725-735.

CDDM, ARELPAL, Ctifl (2015). *Dépérissement racinaire de la mâche, Travaux d'expérimentation en phytopathologie*, Angers.

Davison E.M. & McKay A.G. (2003). Host range of *Pythium sulcatum* and the effects of rotation on *Pythium* diseases of carrots. *Australasian Plant Pathology*, 32, 339-346.

De Cock A.W.A.M., Lodhi A.M., Rintoul T.L., Bala K., Robideau G.P., Gloria Abad Z., Coffey M.D., Shahzad S., Lévesque C.A. (2014). *Phytopythium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia*, 34, 25-39.

El-Mohamedy R.S.R. (2012). Biological control of *Pythium* root rot of broccoli plants under greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Technology*, 8, 1017-1028.

El-Mohamedy R.S.R. & El-Mougy N.S. (2009). Occurrence of Pythium rot of Chinese cabbage in Egypt and its biocontrol measures. Journal of Plant Protection Research, 49, 3.

El-Tarabily K.A., Nassar A.H., Hardy G.E.St.J, Sivasithamparam K. (2008). Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 13-26.

Garibaldi A., Gilardi G., Ortega S.F., Gullino M.L. (2015). Root rot of lamb's lettuce (*Valerianella olitoria*) in Northern Italy caused by *Pythium irregulare*. *Plant Disease*, 99, 11.

Ishiguro Y., Otsubo K., Watanabe H., Suzuki M., Nakayama K., Fukuda T., Fujinaga M., Suga H., Kageyama K. (2014). Root and crown rot of strawberry caused by *Pythium helicoides* and its distribution in strawberry production areas of Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 423-429.

Klemsdal S.S., Herrero M.L., Wanner L.A., Lund G., Hermansen A. (2008). PCR-based identification of *Pythium* sp. causing cavity spot in carrots and sensitive detection in soil samples. *Plant Pathology*, 57, 877-886.

Koch E. & Riesterer K. (2001). Occurrence and pathogenicity of Pythium species on lamb's lettuce. *Nachrichtbendl. Deut. Pflanzenschutzd.*, 53, 137-142.

Koike S.T., Gladders P., Paulus A.O. (2007). Vegetable Diseases A Colour Handbook, Manson Publishing, Plant Protection Handbook Series, London, 448 p.

Kumar S., Ray J., Davison E.M., Cunnington J.H., de Alwis S. (2007). First record of *Pythium tracheiphilum* associated with lettuce wilt and leaf blight in Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, 2, 7-9.

Lévesque C.A. & De Cock A.W.A.M. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108, 1363-1383.

Li B., Ravnskov S., Xie G., Larsen J. (2007). Biocontrol of *Pythium* damping-off in cucumber by arbuscular mycorrhiza-associated bacteria from the genus *Paenibacillus*. BioControl, 52, 863-875.

Matoba Y., Kondo N., Akino S., Kodama F., Naito S., Ebe S. (2008). Identification and pathogenicity of *Pythium* species causing damping-off of kidney bean. *Journal of General Plant Pathology*, 74, 81-85.

Matsuura K., Kanto T., Tojo M., Uzuhashi S., Kakishima M. (2010). *Pythium* wilt of lettuce caused by *Pythium uncinulatum* in Japan.

Mazzola M., Andrews P.K., Reganold J.P., Lévesque C.A. (2002). Frequency, Virulence, and Metalaxyl Sensitivity of *Pythium* sp. Isolated from Apple Roots Under Conventional and Orgnaic Production Systems. *Plant Disease*, 86, 669-675.

Messiaen C.M., Blancard D., Rouxel F., Lafon R. (1991). Les maladies des plantes maraîchères, INRA, Du Labo au Terrain, Paris, 552 p.

Middleton J.T. (1943). The Taxonomy, Host Range and Geographic Distribution of the Genus *Pythium*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, Vol. 20, No. 1, 1-171.

Missud A. (1997). Contribution à la caractérisation et à l'étude du pouvoir pathogène des *Pythium* sp. inféodés aux plantules de carotte dans les Landes. Rapport de stage pour l'obtention du brevet de technicien supérieur d'analyses biologiques et biotechnologiques, Lycée Agricole Blanquefort.

Paulitz T.C., Adams K., Mazzola M. (2003). *Pythium abappressorium* – a new species from eastern Washington. *Mycologia*, 95, 80-86.

Pellegrinio C., Gilardi G., Gullino M.L., Garibaldi A. (2010). Detection of *Phoma valerianellae* in lamb's lettuce seeds. *Phytoparasitica*, 38, 159-165.

Sapkota R. & Nicolaisen M. (2015). An improved high throughput sequencing method for studying oomycetes communities. *Journal of Microbiological Methods*, 110, 33-39.

Spies C.F.J., Mazzola M., McLeod A. (2011). Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 103-119.

Stirling G.R., Turaganivalu U., Striling A.M., Lomavatu M.F., Smith M.K. (2009). Rhizome rot of ginger (Zingiberis officinale) caused by *Pythium myriotylum* in Fiji and Australia. *Australasian Plant Pathology*, 38, 453-460.

Suleiman M.N. (2010). Occurrence of *Pythium aphanidermatum* on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in Nigeria. *Journal of Applied Biosciences*, 26, 1659-1663.

Thiele K., Smalla K., Kropf S., Rabenstein F. (2011). Detection of *Acidovorax valerianellae*, the causing agent of bacterial leaf spots in corn salad [*Valerianella locusta* (L.) *Laterr*.], in corn salad seeds. *Letters in Applied Microbiology*, 54, 112-118.

Tojo M., Watanabe K., Kida K., Li Y., Numata S. (2007). Mottle necrosis of sweet potato caused by *Pythium scleroteichum* in Japan and varietal difference in susceptibility to the disease. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 121-124.

Tomioka K., Sato T., Nakanishi T. (2002). Foot rot of Ulluco caused by *Pythium aphanidermatum*. *Journal of General Plant Pathology*, 68, 189-190.

Tomioka K., Takehara T., Osaki H., Sekiguchi H., Nomiyama K., Kageyama K. (2013). Damping-off of soybean caused by *Pythium myriotylum* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 79, 162-164.

Triki M.A., Priou S., El-Mahjoub M., Baudry A. (2001). Leak syndrome of potato in Tunisia caused by *Pythium aphanidermatum* and *Pythium ultimum*. *Potato Research*, 44, 221-231.

Van der Plaats-Niterink J. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology, 21.

Vawdrey L.L., Langdon P., Martin T. (2005). Incidence and pathogenicity of *Phytophthora palmivora* et *Pythium vexans* associated with durian decline in far northern Queensland. *Australasian Plant Pathology*, 34, 127-128.

Watanabe T. (1993). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*, originally written in Japanese and published by Soft Science Publications, Tokyo, Japan, 411 p.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press*, New York, USA: 315–322.

Yacoub A. (2015). Relations entre l'oomycète, *Pythium oligandrum*, et la vigne : étude de l'induction de résistance contre un agent pathogène du bois et impact sur les colonies microbiennes colonisant la plante. Doctorat Pysiologie-Biologie, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Bordeaux Sciences Agro, 246 p.

Zolan M.E. & Pukkila P.J. (1986). Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Cell Bio*, 6, 195-200.

Sitographie

[1] *Ephytia*, Identifier, Connaître, Maîtriser. URL : http://ephytia.inra.fr/fr/C/11125/hypp-Legumes-feuilles, consulté le 05/09/16.

[2] URL : https://www.inao.gouv.fr/fichier/PNOCDCIGPMacheNantaise.pdf, consulté le 26/07/16.

[3] URL : https://www.inao.gouv.fr/fichier/CDCIGPMacheNantaise.pdf, consulté le 26/07/16.

[4] *Agreste*, La statistique, l'évaluation et la prospective agricole. URL : http://agreste.agriculture.gouv.fr/enquetes/statistique-agricole-annuelle-saa/, consulté le 06/09/16.

[5] *Ephytia*, Identifier, Connaître, Maîtriser. URL : http://ephytia.inra.fr/fr/C/5412/Salades-Botrytis-cinerea-moisissure-grise, consulté le 01/09/16.

[6] *Ephytia*, Identifier, Connaître, Maîtriser. URL : http://ephytia.inra.fr/fr/C/5413/Salades-Sclerotiniose-Sclerotinia-sclerotiorum-Sclerotinia-minor, consulté le 01/09/16.

[7] *The American Phytopathological Society*. URL : https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroOomycetes.aspx, consulté le 08/04/16.

[8] *Comité Départemental de Développement Maraîcher*. URL : http://www.cddm.fr/page/le-mara%C3%AEchage-en-loire-atlantique, consulté le 05/09/16.

[9] *Ephytia*, Identifier, Connaître, Maîtriser. URL : http://ephytia.inra.fr/fr/C/5822/Salades-Methodes-de-protection, consulté le 06/09/16.

[10] *e-phy*, Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France. URL : http://e-phy.agriculture.gouv.fr/spe/9800289-18136.htm, consulté le 06/09/16.

[11] *National Center for Biotechnology Information*. URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, consulté les 14/06/16, 16/06/16, 27/06/16.

[12] *Université Ouverte des Humanités*, Statistique et Psychométrie en L2. URL : http://w3.uohpsy2.univ-tlse2.fr/UOHPsy2/index.php?option=com_content&task=view&id=135&Itemid=58, consulté le 01/09/16.

AGROCAMPUS OUEST

☑ **CFR Angers**

☐ **CFR Rennes**

Année universitaire : 2015-2016 Spécialité : Horticulture Spécialisation (et option éventuelle) : GDV	**Mémoire de fin d'études** ☑ d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage ☐ de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage ☐ d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

ANNEXES

Soutenu à Angers le 14 septembre 2016

Devant le jury composé de :

Président : Patrice CANNAVO, Enseignant-chercheur Agrocampus Ouest

Maîtres de stage : Jonathan GAUDIN, Ingénieur d'études INRA et Serge MEVEL, CDDM

Enseignant référent : Alexandre DEGRAVE, Enseignant-chercheur Agrocampus Ouest

Perrine DAVID, HM.Clause

Thomas GUILLEMETTE, Enseignant-chercheur de l'Université d'Angers

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation «Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France» disponible en ligne http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr

ANNEXE I

Milieux pour fructification des Oomycètes

V8

- 200mL de jus de tomate (V8)
- 2g de carbonate de calcium ($CaCO_3$)
- 20g d'agar
- Eau permutée qsp 1L

OAC : *Oat* – Agar – Chloramphénicol

- 40g de bouillie d'avoine (flocons d'avoine cuits pendant 30 min, puis filtrés)
- 50mg de chloramphénicol
- 20g d'agar
- Eau permutée qsp 1L

Milieu pour conservation des Oomycètes

MA : Malt – Agar

- 15g de malt
- 20g d'agar
- Eau permutée qsp 1L

MAC : Malt – Agar – Chloramphénicol

- 15g de malt
- 20g d'agar
- 50mg de chloramphénicol
- Eau permutée qsp 1L

Milieu pour production de mycélium par les Oomycètes

PARB : Pimaricine – Ampicilline – Rifampicine – Benomyl

- 15g de malt
- 20g d'agar
- 0,4mL de pimaricine
- 250mg d'ampicilline
- 10mg de rifampicine
- 21,5mg de de Topsin (contient 70% de Benomyl)
- Eau permutée qsp 1L

Consignes de sécurité : porter obligatoirement blouse, masque, lunettes de sécurité et gants adaptés lors de la manipulation des antibiotiques.

ANNEXE II

INRA UMR Santé Végétale	Mode Opératoire Extraction d'ADN de champignons *sensu lato* (Oomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes)	Réf : MO-BMO-MET-01 Version 02 date : 6 novembre 2007 page 1/3

1 – OBJET ET CHAMP D'APPLICATION

Extraction d'ADN de champignons (Oomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes) pour analyses diverses en biologie moléculaire (microsatellites, CAPS, PCR cytochrome b…)

2 – DOCUMENTS DE REFERENCE

Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*, Zolan&Pukkila (1986), *Cell Biol* 6: 195-200

3 – LISTE DE DIFFUSION

Unité

4 – HYGIENE ET SECURITE

Manipuler avec blouse, gants et cheveux attachés si nécessaire.
Manipuler le CTAB ainsi que le chloroforme/alcool isoamylique, isopropanol sous la sorbonne.
Vider les déchets dans les bidons appropriés.

5 - CONTRAINTES DE LA METHODE?

6 - CONTENU DU MODE OPERATOIRE

6.1 - Matériel nécessaire

- Pissette d'éthanol
- Tubes eppendorf stériles 1.5ml
- Pistons de broyage stériles
- Bain –Marie à 65°C
- Vortex
- Pipettes spéciales extraction (disponibles dans la pièce extraction)
- Centrifugeuse réfrigérante

6.2 - Réactifs (chimiques et biologiques)

- Ethanol à 95% et à 70%
- Tampon d'extraction (CTAB 1X) – *cf ; Annexe 1*
- Chlorofome-Isoamylalcool
- Isopropanol (2-propanol) froid
- TE ou Eau stérile

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom : Fonction :	Wei-Jen Chen	Sylvie Richart-Cervera	Laurent Deliere *Animateur Qualité*

6.3 – Détail des différentes étapes

1. *La veille de la manip.* : lyophiliser l'échantillon : tube ouvert, recouvert d'un petit peu d'aluminium percé (ou broyer directement dans l'azote).
   (cette étape n'est pas nécessaire pour l'oïdium)

ALLUMER LE BAIN MARIE A 65°C

2. **Préchauffer le tampon** d'extraction (EB ou **CTAB 1X**) à 65°C (en verser dans un falcon stérile de 50ml).

3. **Broyer** l'échantillon lyophilisé *(dans le cas de l'oïdium, on met juste le morceau de feuille ou baie à tremper, sans broyer)* et bien vortexer.

4. *Sous sorbonne*, **ajouter 600 µl de tampon** à 65°C, contenant si besoin un peu de proteinase K.

5. Vortexer rapidement et placer dans le bain Marie à 65°C pendant au minium 1 h (ou la nuit à 50°C si le tissu n'est pas lyophilisé). Agiter énergiquement les tubes (vortex) environ toutes les 10-20 min.

Eteindre le bain Marie

6. *Sous sorbonne*, Ajouter 400 µl de **Chloroforme-Isoamylalcool** et agiter DOUCEMENT pendant 5-10 min sur un shaker (200 rpm) ou par retournements réguliers à la main.

7. **Centrifuger** les tubes 10 min à ≥ 13000 rpm et à 4°C (de préférence) puis **Transférer la phase aqueuse** (environ 500µl) dans un nouveau tube de 1.5 ml.

**Facultatif :*

8. *Ajouter 400 µl de EB ou CTAB 1X et retourner doucement à la main pendant 30 sec. Puis ajouter 400 µl Chloroforme-Isoamylalcool. Agiter comme précédemment (étape 5) pendant 5-10 min.*
9. *Centrifuger les tubes 10 min à ≥ 13000 rpm et à 4°C (de préférence)*

10. *[Transférer la phase aqueuse de l'étape 8 (environ 900 µl) dans un nouveau tube]* Ajouter sous sorbonne 2/3 volume (ex : si 500µl ajouter **330µl**, si 900 µl :

ajouter **600 µl**) d'isopropanol (2-propanol) froid (stocké à -20°C). Agiter les tubes pendant 5-10 min.

11. **Laisser précipiter à -20°C** l'ADN pendant au moins 2h ou la nuit (de préférence)

UNE A DEUX HEURES AVANT DE REPRENDRE LA MANIP. ALLUMER LE GROUPE FROID DU SPEED VAC

12. **Centrifuger** 10 min à ≥ 13000 rpm à 4°C. Eliminer le surnageant, rincer le culot avec 800µl d'éthanol 70°. Centrifuger 10 min à ≥ 13000 rpm.

13. Eliminer le surnageant, faire sécher le culot d'ADN (environ 1 h à temp. amb. ou 10-15 min. au speed vac).

14. Dissoudre le culot dans 50-100 µl (selon taille du culot) de **TE ou H2O** en pipetant « UP and DOWN » plusieurs fois. *Mesurer la concentration d'ADN au spectrophotomètre (option)*. La suspension peut être gardée à 4°C si utilisée rapidement, sinon congelée à -20°C.

7 - ANNEXES

1. Préparation du tampon CTAB :

Pour 1 litre :

800ml H2O milliQ
25ml Tris 2M pH8 (ou 50ml Tris 1M pH8)
20ml EDTA 0.5M pH8
41g NaCl solide

Dissoudre sur agitateur

Ajouter . 10g de CTAB (peser sous hotte ou avec masque)
. 5g de PVP-40 (peser sous hotte ou avec masque)

Dissoudre sur agitateur
Compléter à 1000ml avec H2O milliQ
Autoclaver

ANNEXE III

Séquences des amorces utilisées :

ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC (White et al., 1990)

ITS6 : GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG (Sapkota & Nicolaisen, 2015)

ITS7 : AGCGTTCTTCATCGATGTGC (Sapkota & Nicolaisen, 2015)

Composition des deux mélanges réactionnels utilisés (pour 1 échantillon) :

Mélange réactionnel étape a.	
Eau milliQ	11,31 µL
Tampon 10x	1,5 µL
$MgCl_2$	0,45 µL
dNTP 10 µM (nucléotides)	0,2 µL
ITS6 10 µM (amorce forward)	0,2 µL
ITS4 10 µM (amorce reverse)	0,2 µL
Taq (polymérase)	0,04 µL
Extrait d'ADN dilué	1,1 µL
Mélange réactionnel étape b.	
Eau milliQ	22,62 µL
Tampon 10x	3 µL
$MgCl_2$	0,9 µL
dNTP 10 µM (nucléotides)	0,4 µL
ITS6 10 µM (amorce forward)	0,4 µL
ITS7 10 µM (amorce reverse)	0,4 µL
Taq (polymérase)	0,08 µL
Produit PCR a. dilué	2,2 µL

ANNEXE IV

Genewiz
Hope end, Takeley
CM22 6TA Essex
UNITED KINGDOM
N° Fax: +44 1279 873 838
e-mail: DNASeqUK@genewiz.com

COL16-09FR

GENEWIZ®

FEUILLE DE ROUTE

Ce document doit être imprimé et envoyé avec vos échantillons et votre bon de commande

IMPORTANT - un bon de commande est nécessaire pour le traitement de vos échantillons.

Votre numéro de commande: FPP671
Date d'envoi: 26 juillet 2016
Référence de commande Genewiz: COL16-09FR

ADRESSE DE LIVRAISON

Il est possible que nous ayons besoin de vous contacter pour vérifier certains détails techniques.

Nom: RICHART CERVERA
Prénom: Sylvie
E-mail: srichard@bordeaux.inra.fr
Téléphone direct: 0557122617
N° Fax:

Institut: INRA
Département: UMR 1065 SAVE
Service:

Rue: 71 avenue Edouard Bourleaux CS 20032
Zone D - Bât D2
Ville: VILLENAVE D'ORNON
Etat:
Code postal: 33882
Pays: FRANCE, METRO.

ADRESSE DE FACTURATION

Institut: INRA
Département: UMR 1065 SAVE
Service:

Rue: 71 avenue Edouard Bourleaux CS 20032
Zone D - Bât D2
Ville: VILLENAVE D'ORNON
Etat:
Code postal: 33882
Pays: FRANCE, METRO.

Tel: 0557122617
N° Fax:

N° de TVA intracommunautaire :
FR57180070039

OPTIONS DE LA COMMANDE

- Les fichiers texte de vos séquences seront livrés par email en format Fasta sous forme Zip
- Les résultats (texte en Fasta + ab1 en format PC) seront livrés par email non crypté.

CONTENU DE VOTRE ENVOI

Plaques ADN Express

#	Nom de la plaque	Type d'ADN	Vol. par puits (µl)	Antibiotique	Conc. de l'antibiotique (ng/µl)	Options	Numérotation par
1	PYTHIUM26071	PCR	50			PUR	colonne
2	PYTHIUM26072	PCR	50			PUR	colonne
3	PYTHIUM26073	PCR	50			PUR	colonne
4	PYTHIUM26074	PCR	50			PUR	colonne

Amorces à envoyer

#	Nom de l'amorce	CapMarker	Séquence	Est dégénéré	Taille (pb)	Temp. d'hybridation (°C)	Vol. (µl)
1	ITS6	FL17	5'_GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG_3'	Non	21	62	480

RECOMMANDATIONS

Recommandations pour la préparation du matériel.

Echantillon	Préparation	Quantité
Amorces	Longueur de 18 à 25 bases, desalées ou purifiées cartouche 50°C < Tm < 75°C GC % : 40 à 60	Concentration de 5 µM dans un volume minimum de 10 µl (jusqu'à 5 réactions). Aucun ajustement ou dosage n'est effectué sur les amorces.
Produits PCR non purifiés	Vérifier sur gel d'agarose la présence d'un amplicon unique et net.	Volume minimum de 30 µl (jusqu'à 3 réactions de séquence). Ajoutez 5µl pour chaque réaction supplémentaire. Concentration requise en fonction de la taille de la construction: - fragments < 1000pb : 30 ng/µl - fragments compris entre 1000 et 2000pb : 60 ng/µl - fragments compris entre 2000 et 3000pb : 90 ng/µl. Merci d'éviter le TE.
Produits PCR purifiés	Vérifier sur gel d'agarose la présence d'un amplicon unique et net. NB : Les produits de PCR doivent être purifiés avant le séquençage. Si vous souhaiter confier cela à Genewiz, l'option payante PUR doit être cochée lors du passage de la commande. Par défaut, non considérons les produits de PCR que nous recevons comme étant déjà purifiés.	Volume minimum de 15 µl (jusqu'à 3 réactions de séquence). Ajoutez 5µl pour chaque réaction supplémentaire. Concentration requise : - fragments < 1000pb : 15 ng/µl - fragments compris entre 1000 et 2000pb : 25 ng/µl - fragments compris entre 2000 et 3000pb : 35 ng/µl. Merci d'éviter le TE.
Plasmides	Lyse alcaline + purification sur membrane/colonne	Volume minimum de 15 µl à une concentration de 100 ng/µl (jusqu'à 3 réactions de séquence). Ajoutez 5µl pour chaque réaction supplémentaire. Merci d'éviter le TE.
BAC	Lyse alcaline + purification sur membrane/colonne	Volume minimum de 15 µl à une concentration de 100 ng/µl (pour une réaction). Merci d'éviter le TE.
Clones en support unitaire	Colonie isolée en stab agar ou stock glycérol en tube, alternativement dans une boîte de pétri. Les tubes et boîte de pétri doivent comporter un CapMarker. Si plusieurs colonies sont à extraire sur une même boîte de pétri, merci d'entourer les colonies d'intérêt et de coller un Capmarker sous chaque colonie	
Clones en plaques	Une colonie par puits en stock glycérol. L'utilisation d'un Capmarker n'est pas nécessaire pour les envois en plaque.	

Note: S'il vous plaît tenir compte du fait que la séquence peut commencer jusqu'à 50 bases après la dernière base de l'amorce.

Envoi

Les amorces et échantillons doivent être envoyés à température ambiante

En tube : les échantillons et amorces doivent être envoyés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml, identifiés avec les CapMarkers fournis gratuitement par Genewiz. Nous recommendons d'envoyer les tubes dans des enveloppes renforcees ou de les proteger avec du papier à bulles.

En plaque : les amorces doivent être envoyées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml, identifiés avec les CapMarkers fournis gratuitement par Genewiz. Les échantillons d'ADN doivent être envoyés dans des plaques rigides au format de 96 puits. Nous recommendons de sceller les plaques avec du film aluminium ou des barrettes et de proteger vos plaques avec du parafilm et du papier à bulles.

Merci de vérifier que vos tubes sont correctement fermés et éviter de les emballer dans du parafilm.

VOTRE COMMANDE

Plaques de séquençage Express					
#	Service	Nom de la plaque	Nom de la séquence de plaque	Options	Opt. payantes
1	Express Single HT	PYTHIUM26071	PYTHIUM26071SEQ	T I	
2	Express Single HT	PYTHIUM26072	PYTHIUM26072SEQ	T I	
3	Express Single HT	PYTHIUM26073	PYTHIUM26073SEQ	T I	
4	Express Single HT	PYTHIUM26074	PYTHIUM26074SEQ	T I	

Informations détaillées pour la plaque PYTHIUM26071SEQ

Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence	Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence
A01	129		1798	129_1798_1	B01	115		1798	115_1798_2
C01	114		1798	114_1798_3	D01	113		1798	113_1798_4
E01	112		1798	112_1798_5	F01	111		1798	111_1798_6
G01	110		1798	110_1798_7	A02	149		1798	149_1798_9
B02	147		1798	147_1798_10	C02	146		1798	146_1798_11
D02	142		1798	142_1798_12	E02	145		1798	145_1798_13
F02	141		1798	141_1798_14	G02	139		1798	139_1798_15
H02	137		1798	137_1798_16	A03	174		1798	174_1798_17
B03	173		1798	173_1798_18	C03	169		1798	169_1798_19
D03	166		1798	166_1798_20	E03	163		1798	163_1798_21
F03	161		1798	161_1798_22	G03	159		1798	159_1798_23
H03	157		1798	157_1798_24	A04	193		1798	193_1798_25
B04	192		1798	192_1798_26	C04	187		1798	187_1798_27

Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence	Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence
C04	180		ITS8	180_ITS8_29	E04	184		ITS8	184_ITS8_29
F04	182		ITS8	182_ITS8_30	G04	179		ITS8	179_ITS8_31
H04	178		ITS8	178_ITS8_32	A05	211		ITS8	211_ITS8_33
B05	210		ITS8	210_ITS8_34	C05	204		ITS8	204_ITS8_35
D05	203		ITS8	203_ITS8_36	E05	197		ITS8	197_ITS8_37
F05	196		ITS8	196_ITS8_38	G05	195		ITS8	195_ITS8_39
H05	194		ITS8	194_ITS8_40	A06	222		ITS8	222_ITS8_41
B06	221		ITS8	221_ITS8_42	C06	219		ITS8	219_ITS8_43
D06	218		ITS8	218_ITS8_44	E06	216		ITS8	216_ITS8_45
F06	214		ITS8	214_ITS8_46	G06	213		ITS8	213_ITS8_47
H06	208		ITS8	208_ITS8_48	A07	240		ITS8	240_ITS8_49
B07	241		ITS8	241_ITS8_50	C07	229		ITS8	229_ITS8_51
D07	228		ITS8	228_ITS8_52	E07	183		ITS8	183_ITS8_53
F07	81		ITS8	81_ITS8_54	G07	225		ITS8	225_ITS8_55
H07	224		ITS8	224_ITS8_56	A08	267		ITS8	267_ITS8_57
B08	266		ITS8	266_ITS8_58	C08	251		ITS8	251_ITS8_59
D08	249		ITS8	249_ITS8_60	E08	248		ITS8	248_ITS8_61
F08	246		ITS8	246_ITS8_62	G08	244		ITS8	244_ITS8_63
H08	243		ITS8	243_ITS8_64	A09	262		ITS8	262_ITS8_65
B09	261		ITS8	261_ITS8_66	C09	260		ITS8	260_ITS8_67
D09	279		ITS8	279_ITS8_68	E09	278		ITS8	278_ITS8_69
F09	275		ITS8	275_ITS8_70	G09	274		ITS8	274_ITS8_71
H09	273		ITS8	272_ITS8_72	A10	290		ITS8	290_ITS8_73
B10	289		ITS8	289_ITS8_74	C10	288		ITS8	288_ITS8_75
D10	287		ITS8	287_ITS8_76	E10	286		ITS8	286_ITS8_77
F10	285		ITS8	285_ITS8_78	G10	284		ITS8	284_ITS8_79
H10	283		ITS8	283_ITS8_80	A11	307		ITS8	307_ITS8_81
B11	306		ITS8	306_ITS8_82	C11	305		ITS8	305_ITS8_83
D11	330		ITS8	330_ITS8_84	E11	329		ITS8	329_ITS8_85
F11	325		ITS8	325_ITS8_86	G11	323		ITS8	323_ITS8_87
H11	322		ITS8	322_ITS8_88	A12	314		ITS8	314_ITS8_89
B12	316		ITS8	316_ITS8_90	C12	317		ITS8	317_ITS8_91
D12	318		ITS8	318_ITS8_92	E12	319		ITS8	319_ITS8_93
F12	349		ITS8	349_ITS8_94	G12	347		ITS8	347_ITS8_95
H12	346		ITS8	346_ITS8_96					

Informations détaillées pour la plaque PYTHIUM260725EQ

Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence	Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence
A01	295		ITS8	295_ITS8_1	E01	298		ITS8	298_ITS8_2
C01	297		ITS8	297_ITS8_3	D01	299		ITS8	299_ITS8_4
B01	300		ITS8	300_ITS8_5	F01	301		ITS8	301_ITS8_6
D01	302		ITS8	302_ITS8_7	A02	360		ITS8	360_ITS8_9
B02	393		ITS8	393_ITS8_10	C02	394		ITS8	394_ITS8_11
D02	396		ITS8	396_ITS8_12	E02	391		ITS8	391_ITS8_13
F02	392		ITS8	392_ITS8_14	G02	393		ITS8	393_ITS8_15
H02	394		ITS8	394_ITS8_16	A03	379		ITS8	379_ITS8_17
B03	380		ITS8	380_ITS8_18	C03	381		ITS8	381_ITS8_19
D03	382		ITS8	382_ITS8_20	E03	384		ITS8	384_ITS8_21
F03	385		ITS8	385_ITS8_22	G03	387		ITS8	387_ITS8_23
H03	389		ITS8	389_ITS8_24	A04	363		ITS8	363_ITS8_25
B04	388		ITS8	388_ITS8_26	C04	367		ITS8	367_ITS8_27
D04	369		ITS8	369_ITS8_28	E04	372		ITS8	372_ITS8_29
F04	373		ITS8	373_ITS8_30	G04	374		ITS8	374_ITS8_31
H04	376		ITS8	376_ITS8_32	A05	350		ITS8	350_ITS8_33
B05	352		ITS8	352_ITS8_34	C05	353		ITS8	353_ITS8_35
D05	354		ITS8	354_ITS8_36	E05	356		ITS8	356_ITS8_37
F05	357		ITS8	357_ITS8_38	G05	359		ITS8	359_ITS8_39
H05	361		ITS8	361_ITS8_40	A06	146		ITS8	146_ITS8_41
B06	191		ITS8	191_ITS8_42	C06	140		ITS8	140_ITS8_43
D06	104		ITS8	104_ITS8_44	E06	103		ITS8	103_ITS8_45
F06	102		ITS8	102_ITS8_46	G06	91		ITS8	91_ITS8_47
H06	369		ITS8	369_ITS8_48	A07	451		ITS8	451_ITS8_49
B07	439		ITS8	439_ITS8_50	C07	409		ITS8	409_ITS8_51
D07	384		ITS8	384_ITS8_52	E07	383		ITS8	383_ITS8_53
F07	341		ITS8	341_ITS8_54	G07	328		ITS8	328_ITS8_55
H07	324		ITS8	324_ITS8_56	A08	475		ITS8	475_ITS8_57
B08	474		ITS8	474_ITS8_58	C08	473		ITS8	473_ITS8_59
D08	469		ITS8	469_ITS8_60	E08	463		ITS8	463_ITS8_61
F08	461		ITS8	461_ITS8_62	G08	458		ITS8	458_ITS8_63
H08	455		ITS8	455_ITS8_64	A09	90		ITS8	90_ITS8_65

Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence	Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence
B09	481		IT98	481_IT98_68	C09	446		IT98	446_IT98_67
D09	480		IT98	480_IT98_69	E09	479		IT98	479_IT98_69
F09	479		IT98	479_IT98_70	G09	477		IT98	477_IT98_71
H09	476		IT98	476_IT98_72	A10	398		IT98	398_IT98_73
B10	390		IT98	390_IT98_74	C10	163		IT98	163_IT98_75
D10	177		IT98	177_IT98_76	E10	172		IT98	172_IT98_77
F10	156		IT98	156_IT98_78	G10	101		IT98	101_IT98_79
H10	99		IT98	99_IT98_80	A11	412		IT98	412_IT98_81
B11	410		IT98	410_IT98_82	C11	409		IT98	409_IT98_83
D11	407		IT98	407_IT98_84	E11	405		IT98	405_IT98_85
F11	404		IT98	404_IT98_86	G11	401		IT98	401_IT98_87
H11	400		IT98	400_IT98_88	A12	167		IT98	167_IT98_89
B12	140		IT98	140_IT98_90	C12	164		IT98	164_IT98_91
D12	130		IT98	130_IT98_92	E12	421		IT98	421_IT98_93
F12	417		IT98	417_IT98_94	G12	416		IT98	416_IT98_95
H12	413		IT98	413_IT98_96					

Informations détaillées pour la plaque PYTHIUM26073SEQ

Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence	Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence
A01	334		IT98	334_IT98_1	B01	327		IT98	327_IT98_2
C01	320		IT98	320_IT98_3	D01	315		IT98	315_IT98_4
E01	206		IT98	206_IT98_5	F01	202		IT98	202_IT98_6
G01	189		IT98	189_IT98_7	H01	188		IT98	188_IT98_8
A02	397		IT98	397_IT98_9	B02	388		IT98	388_IT98_10
C02	383		IT98	383_IT98_11	D02	369		IT98	369_IT98_12
E02	351		IT98	351_IT98_13	F02	344		IT98	344_IT98_14
G02	343		IT98	343_IT98_15	H02	342		IT98	342_IT98_16
A03	484		IT98	484_IT98_17	B03	435		IT98	435_IT98_18
C03	434		IT98	434_IT98_19	D03	430		IT98	430_IT98_20
E03	427		IT98	427_IT98_21	F03	425		IT98	425_IT98_22
G03	418		IT98	418_IT98_23	H03	408		IT98	408_IT98_24
A04	135		IT98	135_IT98_25	B04	107		IT98	107_IT98_26
C04	94		IT98	94_IT98_27	D04	85		IT98	85_IT98_28
E04	77		IT98	77_IT98_29	F04	75		IT98	75_IT98_30
G04	68		IT98	68_IT98_31	H04	465		IT98	465_IT98_32
A05	228		IT98	228_IT98_33	B05	215		IT98	215_IT98_34
C05	212		IT98	212_IT98_35	D05	205		IT98	205_IT98_36
E05	189		IT98	189_IT98_37	F05	175		IT98	175_IT98_38
G05	158		IT98	158_IT98_39	H05	138		IT98	138_IT98_40
A06	403		IT98	403_IT98_41	B06	375		IT98	375_IT98_42
C06	359		IT98	359_IT98_43	D06	340		IT98	340_IT98_44
E06	339		IT98	339_IT98_45	F06	339		IT98	339_IT98_46
G06	277		IT98	277_IT98_47	H06	273		IT98	273_IT98_48
A07	447		IT98	447_IT98_49	B07	446		IT98	446_IT98_50
C07	441		IT98	441_IT98_51	D07	437		IT98	437_IT98_52
E07	436		IT98	436_IT98_53	F07	433		IT98	433_IT98_54
G07	432		IT98	432_IT98_55	H07	431		IT98	431_IT98_56
A08	154		IT98	154_IT98_57	B08	469		IT98	469_IT98_58
C08	481		IT98	481_IT98_59	D08	471		IT98	471_IT98_60
E08	470		IT98	470_IT98_61	F08	458		IT98	458_IT98_62
G08	454		IT98	454_IT98_63	H08	453		IT98	453_IT98_64
A09	133		IT98	133_IT98_65	B09	131		IT98	131_IT98_66
C09	130		IT98	130_IT98_67	D09	129		IT98	129_IT98_68
E09	33		IT98	33_IT98_69	F09	302		IT98	302_IT98_70
G09	382		IT98	382_IT98_71	H09	260		IT98	260_IT98_72
A10	106		IT98	106_IT98_73	B10	105		IT98	105_IT98_74
C10	83		IT98	83_IT98_75	D10	82		IT98	82_IT98_76
E10	229		IT98	229_IT98_77	F10	148		IT98	148_IT98_78
G10	144		IT98	144_IT98_79	H10	133		IT98	133_IT98_80
A11	289		IT98	289_IT98_81	B11	259		IT98	259_IT98_82
C11	247		IT98	247_IT98_83	D11	245		IT98	245_IT98_84
E11	226		IT98	226_IT98_85	F11	179		IT98	179_IT98_86
G11	253		IT98	253_IT98_87	H11	129		IT98	129_IT98_88
A12	420		IT98	420_IT98_89	B12	415		IT98	415_IT98_90
C12	414		IT98	414_IT98_91	D12	411		IT98	411_IT98_92
E12	402		IT98	402_IT98_93	F12	329		IT98	329_IT98_94
G12	321		IT98	321_IT98_95	H12	299		IT98	299_IT98_96

Informations détaillées pour la plaque PYTHIUM26074SEQ

Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence	Puits	Nom échantillon	Vecteur	Nom de l'amorce	Nom séquence
A01	469		IT98	469_IT98_1	B01	472		IT98	472_IT98_2
C01	459		IT98	459_IT98_3	D01	459		IT98	459_IT98_4
E01	445		IT98	445_IT98_5	F01	445		IT98	445_IT98_6
G01	423		IT98	423_IT98_7	H01	423		IT98	423_IT98_8
A02	191		IT98	191_IT98_9	B02	190		IT98	190_IT98_10
C02	171		IT98	171_IT98_11	D02	170		IT98	170_IT98_12
E02	134		IT98	134_IT98_13	F02	99		IT98	99_IT98_14
G02	92		IT98	92_IT98_15	H02	91		IT98	91_IT98_16
A03	279		IT98	279_IT98_17	B03	271		IT98	271_IT98_18
C03	270		IT98	270_IT98_19	D03	253		IT98	253_IT98_20
E03	253		IT98	253_IT98_21	F03	250		IT98	250_IT98_22
G03	227		IT98	227_IT98_23	H03	217		IT98	217_IT98_24
A04	450		IT98	450_IT98_25	B04	444		IT98	444_IT98_26
C04	443		IT98	443_IT98_27	D04	399		IT98	399_IT98_28
E04	391		IT98	391_IT98_29	F04	377		IT98	377_IT98_30
G04	365		IT98	365_IT98_31	H04	360		IT98	360_IT98_32
A05	93		IT98	93_IT98_34	C05	467		IT98	467_IT98_35
E05	465		IT98	465_IT98_36	F05	464		IT98	464_IT98_37
H05	463		IT98	463_IT98_38	B05	462		IT98	462_IT98_39
H05	452		IT98	452_IT98_40					

	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : GDV Enseignant référent : Alexandre DEGRAVE

Auteur(s) : Estelle NODODUS Date de naissance* : 20/02/1993	Organisme d'accueil : INRA Centre Bordeaux-Aquitaine Adresse : INRA - UMR SAVE (Santé et Agroécologie du Vignoble) 71 Ave Edouard Bourlaux, CS 20032 Zone D – Bat D2 – 33882 Villenave d'Ornon Cedex Maîtres de stage : Jonathan GAUDIN et Serge MEVEL (co-encadrant CDDM Nantes)
Nb pages : 61 Annexe(s) : 4	
Année de soutenance : 2016	

Titre français : **Dépérissement de la mâche (*Valerianella locusta*) en région nantaise : Étiologie du dépérissement, caractérisation des Pythiacées impliquées et recherche de premières options de protection.**

Titre anglais : **Decline of lamb's lettuce (*Valerianelle locusta*) in the area of Nantes: Etiology of the decline phenomenon, characterisation of the Pythiaceae species involved and study of preliminary protection solutions**

Résumé (1600 caractères maximum) : La mâche *Valerianella locusta* (L.) Laterr. est la première culture du bassin nantais. Or, depuis l'hiver 2009, les maraîchers de la région sont confrontés à un problème de dépérissement. Les travaux préliminaires effectués semblaient indiquer l'implication de *Pythium* sp., ce qui a été confirmé par les essais présentés dans ce mémoire. On ira même plus loin en formulant l'hypothèse qu'un complexe pathogène, et non pas une seule espèce, serait responsable de ce phénomène. Étant donné leur fréquence et leur pouvoir pathogène important, *Pythium violae*, *Pythium irregulare*, ainsi qu'une troisième espèce *P. XXX* encore non caractérisée, semblent être les principaux responsables. Des premières pistes de lutte contre les *Pythium* sp. isolés ont également été évaluées. Il en ressort que *Pythium oligandrum*, déjà employé en tant qu'agent de biocontrôle pour d'autres cultures, est une solution envisageable. La lutte chimique semble également possible mais limité à l'enrobage des semences par le métalaxyl pour prévenir la fonte de semis. Néanmoins, aucune espèce testée n'a présenté de réelle résistance à la molécule.

Abstract (1600 caractères maximum) : Lamb's lettuce *Valerianella locusta* (L.) Laterr. is the most important crop cultivated in the area of Nantes. However, since winter 2009, market gardeners have been confronted with lamb's lettuce decline. Preliminary studies indicated that *Pythium* species were involved, which was confirmed by the assays carried out and described in this report. We can even assume that it is not a single species, but a complex of several ones, that is involved in the decline phenomenon. *Pythium violae*, *Pythium irregulare* and a third species yet to be characterised seem likely to be responsible given their frequency and pathogenicity. Also, some preliminary control measures against these *Pythium* species were tested. *Pythium oligandrum*, which is already used as a biocontrol agent on other crops, seems to be a possible solution. A phytosanitary solution can also be considered, but only by the means of seed coating using metalaxyl in order to prevent damping-off symptoms. Still, no species tested here showed any signs of resistance.

Mots-clés : *Valerianella locusta* – *Pythium* sp. – Nantes – *Pythium oligandrum* – métalaxyl

Key Words: *Valerianella locusta* – *Pythium* sp. – Nantes – *Pythium oligandrum* – metalaxyl

* *Elément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires*