



Bioherbicides fongiques : recherche de champignons telluriques à action pathogène sur les semences d'adventices

Liu-Ji Harada

► To cite this version:

Liu-Ji Harada. Bioherbicides fongiques : recherche de champignons telluriques à action pathogène sur les semences d'adventices. Sciences agricoles. 2016. dumas-01405164

HAL Id: dumas-01405164

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01405164>

Submitted on 29 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AGROCAMPUS
OUEST

☒ CFR Angers

☐ CFR Rennes



Année universitaire : 2015 - 2016

Spécialité :

Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

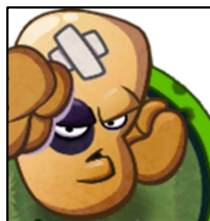
Gestion Durable du Végétal (GDV)

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)

Bioherbicides fongiques : recherche de champignons telluriques à action pathogène sur les semences d'adventices

Par : Liu-Ji HARADA



(Source : [http://plantsvszombies.wikia.com/wiki/Plants \(PvZH\)](http://plantsvszombies.wikia.com/wiki/Plants_(PvZH)))

Soutenu à Angers

le 02/11/2016

Devant le jury composé de :

Président : Etienne Chantoiseau

Maître de stage : Jean-Philippe Guillemin

Enseignant référent : Alexandre Degrave

Autres membres du jury (Nom, Qualité) :

Matthieu Barret

Valérie Grimault

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>



Fiche de confidentialité

Confidentialité :

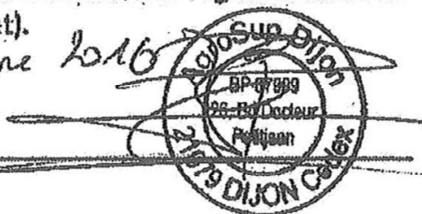
☒ Non ☐ Oui

si oui : ☐ 1 an ☐ 5 ans ☐ 10 ans

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

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).

Date et signature du maître de stage⁽²⁾ : le 2 Novembre 2016



Droits d'auteur :

L'auteur⁽³⁾ autorise la diffusion de son travail

☒ 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)

Date et signature de l'auteur : le 2 Novembre 2016

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant :

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé

☒ 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 :

7/11/2016

(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

Dépôt numérique de mémoire
ATTESTATION DE CONFORMITE DE LA VERSION NUMERIQUE

Je, soussigné(e),

Nom : HARADA

Prénom : Lina - Ji

Ci-après désigné « l'auteur »

Atteste que la version numérique de mon mémoire de fin d'études dans sa version définitive
(incluant les corrections demandées par le jury de soutenance),
intitulé

*Bioherbicides fongiques: recherche de champignons telluriques
à action pathogène sur les semences adventices.*

correspond à la version imprimée du document, déposé à la bibliothèque générale
d'AGROCAMPUS OUEST (CFR de référence)

A Jongens, le 07/22/2016

Signature de l'auteur,



Dépôt numérique de mémoire
CONTRAT DE DIFFUSION NUMERIQUE DE MEMOIRE

Entre

AGROCAMPUS OUEST, Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage dont le siège est basé 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 RENNES, représenté par son Directeur Général, Grégoire THOMAS

et

L'auteur du mémoire :

Nom : Harada

Prénom : Liu-Ji

Adresse personnelle : La Mionnière 49140 Marcé

Intitulé du mémoire : Bioherbicides fongiques : recherche de champignons telluriques à action pathogène sur les semences adventices.

Ci-après désigné auteur,

Article 1

Le présent contrat ne concerne que les mémoires de fin d'études des cursus de formation d'AGROCAMPUS OUEST, déposés suite à la soutenance dans leur version validée par le jury. La diffusion de ces mémoires est conditionnée au visa du responsable de spécialisation, garantissant la prise en compte de l'avis du jury.

Article 2

L'auteur autorise AGROCAMPUS OUEST à diffuser le mémoire sur le site Internet de l'établissement ou sur les plateformes choisies par AGROCAMPUS OUEST en conformité avec la fiche de diffusion correspondante. Le présent contrat a pour objet de permettre à AGROCAMPUS OUEST de diffuser le mémoire dans le respect des droits de propriété intellectuelle de son auteur.

Le présent contrat n'implique pas l'obligation pour AGROCAMPUS OUEST de faire usage de l'autorisation qui lui est donnée. La diffusion effective, tout comme son éventuelle suppression, n'implique en aucun cas une appréciation au bénéfice de l'auteur ou des tiers et n'est pas source de responsabilité à l'égard des tiers.

Article 3

L'auteur demeure responsable du contenu de son oeuvre. L'auteur garantit à AGROCAMPUS OUEST qu'il détient tous les droits nécessaires à la diffusion de son oeuvre, en particulier les autorisations écrites des titulaires des droits sur les oeuvres reproduites, partiellement ou intégralement. En cas de non-respect de cette clause, AGROCAMPUS OUEST se réserve le droit de refuser, suspendre ou arrêter la diffusion des parties du mémoire intégrant des documents ou parties de documents pour lesquels les droits de reproduction et de représentation n'auraient pas été acquis.

AGROCAMPUS OUEST ne pourra être tenu responsable de représentations illégales de documents, pour lesquels l'auteur n'aurait pas signalé qu'il n'en avait pas acquis les droits.

Article 4

L'auteur pourra à tout moment retirer l'autorisation de diffusion qu'il accorde par le présent contrat. Pour cela, il devra en aviser formellement AGROCAMPUS OUEST par lettre recommandée avec accusé de réception. AGROCAMPUS OUEST aura alors l'obligation de retirer l'oeuvre lors de la plus prochaine actualisation du site de l'établissement et du portail documentaire et sur la plate-forme DUMAS.

Article 5

L'auteur autorise AGROCAMPUS OUEST à procéder, le cas échéant, au reformatage de son mémoire en vue de l'archivage, de la diffusion ou de la communication dans le respect des autorisations de diffusion définies par lui précédemment.

Article 6

Les autorisations de diffusion données à AGROCAMPUS OUEST n'ont aucun caractère exclusif et l'auteur conserve toutes les autres possibilités de diffusion de son mémoire.

Article 7

L'auteur autorise, à titre gracieux, la cession des droits de diffusion, concernant le mémoire qui lui appartient. Cette autorisation, dans la durée maximale définie par le droit patrimonial, est strictement réservée à la diffusion du mémoire à des fins pédagogiques et de recherche.

Fait à Angers, le 07/11/2016

Pour AGROCAMPUS OUEST,
Pour Le Directeur Général
Et par délégation,

HARADA
Yun-gi

L'auteur,



Remerciements

Je tenais personnellement à remercier Jean-Philippe Guillemain et Christian Steinberg de m'avoir accepté pour ce stage de fin d'études et pour tous les conseils et le soutien qu'ils m'ont donné jusqu'à la fin de mon stage. Je remercie également le RMT Florad pour le financement du stage ainsi que l'INRA Centre de Dijon et AgroSup Dijon pour le matériel et les locaux. Merci à l'équipe Foxy d'avoir su m'accepter tel que je suis et de m'avoir aidé pendant, et en dehors des réunions d'équipe : Véronique, Nadine, Elodie, Éric. Un grand merci à la doctorante Marion Triolet pour son côté pédagogue et critique, je te souhaite bon courage pour tes deux prochaines années de thèse. Merci à Carole Reibel, Séverine et Karine pour leurs conseils et leur aide. Merci à Laura Galvez de m'avoir fourni une aide pour les manipulations expérimentales. Je remercie également l'INRA Centre de Dijon et Agrocampus Ouest d'avoir accepté de m'accorder une prolongation suite à mon opération chirurgicale.

Remerciements spéciaux pour la compagnie des pauses déjeuner ; Laure, Juliette (bon courage pour ton entrée dans l'école doctorale !), Sébastien et Patricia. Remerciement spéciaux également pour les abonnés aux instants de convivialité du vendredi soir : Yuko, Jérémy, Antonin, Maé, Julie, Guillaume, Florent, Florian, Thibault et Veronica.

En dehors de l'INRA je tiens tout particulièrement à remercier le service hospitalier de la clinique de Talant pour la prise en charge de mon opération, ainsi que les infirmières qui m'ont procuré des soins journaliers durant toute ma période de convalescence et plus (tout le mois de Juillet jusqu'à mi-Août). Merci à mon père et mon petit frère d'être venu expressément sur Dijon pour m'aider pendant ma convalescence.

Enfin, une mention spéciale pour la firme LU qui a su accompagner mes après-midi de travail sur toute la durée de mon stage, boîtes après boîtes.



Table des matières

Fiche de confidentialité.....	
Attestation de conformité numérique	
Contrat de diffusion numérique	
Remerciements.....	I
Table des matières	III
Glossaire.....	 V
Liste des figures.....	 VI
Liste des tableaux	 VII
Introduction	1
La structure d'accueil : l'UMR Agroécologie et l'équipe Foxy	1
I. Contexte scientifique général	1
I.1. Les problèmes associés aux plantes adventices	1
I.2. Les enjeux soulevés par la gestion des adventices	2
II. Le biocontrôle des adventices.....	3
II.1. Les macroorganismes et les préparations naturelles peu préoccupantes	3
II.2. Les bases du biocontrôle des adventices avec les microorganismes	4
II.3. Les bactéries et les virus	4
II.4. Les champignons et la lutte contre les adventices.....	5
III. Microorganismes fongiques telluriques et biocontrôle du stock semencier adventice.....	6
III.1. L'usage des champignons sur les semences adventices.....	6
III.2. Les champignons associés aux semences adventices	7
III.3. Intérêts de ces champignons dans le biocontrôle du stock semencier	8
IV. Problématique et démarche.....	9
IV.1. Problématique de l'étude	9
IV.3. Présentation de la démarche	9
Matériels et méthodes.....	10
I. Matériel végétal.....	10
I.1. <i>Amaranthus retroflexus</i>	10
I.2. <i>Sinapis arvensis</i>	10
II. Collecte des échantillons de sol et extraction des semences adventices	11
III. Isolement des champignons associés aux semences	13
IV. Morphotypage et sélection des champignons à tester	14

V. Tests de pathogénicité.....	15
V.1. Inoculation du substrat.....	15
V.2. Dépôt des semences adventices	15
V.2. Suivi des semences et des plantules	16
VI. Analyses statistiques	16
Résultats	17
I. Isolement et morphotypage.....	17
II. Résultats des tests de pathogénicité sur <i>S. arvensis</i>	18
III. Résultat des tests de pathogénicité sur <i>A. retroflexus</i>	24
Discussion	25
I. Choix des parcelles.....	25
II. Isolement et morphotypage.....	26
III. Tests de pathogénicité	28
Conclusion.....	31
Bibliographie	32
Sitographie	37
Annexe I : Détails de la prospection en amont: choix des parcelles et des espèces adventices.....	38
Annexe II : Echantillonnage de sol et extraction des semences : matériels et modes opératoires	43
Annexe III : Préparation, stérilisation, humectation et inoculation des substrats : matériels et mode opératoires	45
Annexe IV : Désinfection et dépôt des semences adventices dans les substrats inoculés : matériels et modes opératoires	47
Annexe V : Liste des morphotypes	54
Annexe VI : Résultats des taux de survie des plantules chez <i>Sinapis arvensis</i>	76

Glossaire

Biocontrôle : ensemble de méthodes de protection des plantes contre les bioagresseurs par utilisation des mécanismes et interactions impliqués dans les relations entre les espèces concernées dans leur milieu naturel.

Biotrophe obligatoire/facultatif : organisme qui se nourrit d'autres organismes. Il est dit obligatoire lorsqu'il se nourrit aux dépens des autres organismes. Sinon, il est facultatif.

Endophyte : qui se trouve à l'intérieur du végétal sans causer de dégâts apparents. Cet adjectif s'applique aux organes végétatifs, aux organes reproducteurs, aux tubercules, aux fruits, et aux semences

Emergence : en biologie végétale, l'émergence désigne l'instant où les plantules sont visibles à la surface du sol.

Inoculum : échantillon de germes vivants disponibles pour une contamination

Isolat fongique : désigne un champignon qui a été isolé sur milieu de culture à partir d'une colonie fongique. L'isolat ne garantit toutefois la pureté du champignon isolé.

Levée : désigne une ou plusieurs périodes de l'année correspondant à la levée de dormance des semences adventices. Elle se manifeste notamment par l'émergence des plantules.

MAA: Malt-Acid Antibiotic.

Microbiote : désigne l'ensemble des microorganismes résidant dans un environnement donné (le microbiome).

Parasite obligatoire/facultatif : organisme capable de vivre sur (ectoparasite) ou dans (endoparasite) un autre organisme et qui se nourrit de son hôte, le plus souvent, sans le détruire. Il est dit obligatoire lorsqu'il vit aux dépens de son hôte. Sinon, il est facultatif.

PCNB: Pentachloronitrobenzène.

PDA: Potato Dextrose Agar

Pré/post-émergence : « avant » (pré) / « après » (post) l'émergence.

Saprophyte : qui se nourrit de matière organique végétale morte.

Screening : désigne la stratégie utilisée sur une population d'individus pour détecter une éventuelle présence de maladie parmi des individus qui ne présentent pas de symptômes.

Souche fongique : désigne un champignon qui a été isolé, purifié et (si possible) identifié.

Spermosphère : zone du sol soumise à l'influence des semences végétales enfouies. Elles correspondent le plus souvent au millimètre de sol qui entoure les semences.

Tellurique : qui provient de la terre

Liste des figures

Figure 1 : Plantes et des semences d' <i>A. retroflexus</i> et <i>S. arvensis</i>	11
Figure 2 (A, B) : Photographie des deux parcelles de blé où ont été effectués les prélèvements. (A) Parcelle P1 vue depuis le Sud ; (B) Parcelle P2 vue depuis l'Est.....	12
Figure 3 (A, B) : Répartition des paires d'échantillons (rectangles bleus numérotés) sur les parcelles P1 (A) et P2 (B)	12
Figure 4 : Récapitulatif de l'étape d'isolement des champignons associés aux semences adventices	13
Figure 5 : Démarche appliquée pour le test de pathogénicité des champignons.....	15
Figure 6 (A, B, C) : Exemple d'une boîte carré de 12x12cm avec malt-acid antibiotique et des semences de <i>S. arvensis</i> , après 0 jours (A) et 7 jours (B) de développement. Exemple d'un biotrophe obligatoire sur une semence de <i>S. arvensis</i> (C)	17
Figure 7 (A, B, C) : Résultats graphiques des taux d'émergence obtenus à partir des isolats testés sur <i>S. arvensis</i> , 7 et 12 jours après dépôt des semences dans le substrat (A, B et C)	19
Figure 8 (A, B, C) : Boîtes de substrat avec semences et plantules de <i>S. arvensis</i> après 12 jours d'incubation : boîtes témoins avec substrat (A), boîtes qui présentent un résultat intermédiaire (B) et les boîtes du champignon avec lequel aucune plantule n'a émergé (C).....	21
Figure 9 (A, B) : Boîtes du témoin avec substrat seul après 7 jours (A) et 12 jours (B) d'incubation.....	23
Figure 10 (A, B) : Exemples de boîtes avec substrat inoculé contenant des plantules dépéries après 12 jours d'incubation (A et B).....	23
Figure 11 (A, B, C) : Exemples de boîtes avec substrat inoculé contenant des plantules dépéries et colonisées partiellement (A et B) ou entièrement (C) par le champignon après 12 jours d'incubation.....	24
Figure 12 (A, B) : Exemple d'une boîte de 12x12cm sans contaminations (A) et avec contaminations (B) après 7 jours de développement.....	27
Figure 13 : Exemple d'une boîte de substrat contaminée (A) et d'une boîte de substrat inoculé avec un <i>Trichoderma</i> (B) après 12 jours d'incubation.....	29

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description des lots de semences adventices issues de collection.....	11
Tableau 2 : Localisation et informations sur les deux parcelles choisies.....	12
Tableau 3 : Liste des critères de description des morphotypes.....	14
Tableau 4 : Nombre de semences déposées et nombre de champignon obtenus chez <i>A. retroflexus</i> et <i>S. arvensis</i> en fonction de la modalité de désinfection des semences et des échantillons de sol.....	17
Tableau 5 : Nombre de champignons en fonction des genres distingués et de l'espèce adventice.....	18
Tableau 6 : Nombre de champignons en fonction des genres distingués et des modalités de désinfection des semences adventices.....	18
Tableau 7 : Résultats du test de Tukey sur les résultats d'émergence des plantules de <i>S. arvensis</i>	20
Tableau 8 : Extrait des analyses de comparaisons multiples sur R avec les témoins avec (TS) et sans gélose (TGS).....	21
Tableau 9 : Liste des champignons candidats possédant un effet pré-émergence	22

Introduction

La structure d'accueil : l'UMR Agroécologie et l'équipe Foxy

L'étude présentée dans ce rapport a été réalisée dans le cadre d'un stage de fin d'études effectué au sein de l'UMR (Unité Mixte de Recherche) 1347-agroécologie dans les locaux du Centre INRA (Institut national de la recherche agronomique) de Dijon (France) (<http://www6.dijon.inra.fr/umragroecologie>). Cette UMR regroupe trois organismes institutionnels l'Université de Bourgogne et de Franche Comté, le centre INRA de Dijon, et Agrosup-Dijon. L'UMR Agroécologie est structurée en 4 pôles dont les activités sont complémentaires et visent à comprendre pour les promouvoir, les mécanismes de régulation biologique au sein des agrosystèmes. Un pôle travaille plus particulièrement sur les interactions plantes microorganismes. C'est celui dans lequel s'inscrit l'équipe Foxy, animée par Christian Steinberg. Cette équipe est spécialisée dans l'écologie des champignons phytopathogènes d'origine tellurique avec un focus particulier sur le genre *Fusarium*. Un autre pôle s'intéresse plus particulièrement à la gestion des adventices. C'est celui dans lequel s'inscrit l'équipe a2e2 dans lequel Jean-Philippe Guillemain, enseignant-chercheur à Agrosup Dijon spécialisé en malherbologie, exerce ses activités de recherche. Mon stage a ainsi pu bénéficier des compétences présentes dans ces deux équipes grâce à l'aide technique et aux conseils de Carole Reibel, technicienne, Nadine Gautheron, assistante-ingénieure, Véronique Edel-Hermann, ingénieure de recherche, et Marion Triolet, doctorante.

I. Contexte général

En agriculture, la protection des cultures est un domaine qui prend une place importante au sein de l'acte de production. Elle contribue au développement de moyens préventifs et curatifs afin de limiter l'impact des facteurs biotiques et abiotiques qui nuisent à la culture. Les bioagresseurs font partie de ces nuisances et regroupent des animaux, des insectes, des microorganismes, et des adventices. En agronomie, une espèce adventice désigne une espèce végétale qui se développe sur une culture sans y avoir été intentionnellement introduite par l'homme [1]. Une espèce adventice est appelée mauvaise herbe lorsque celle-ci nuit à la culture dans laquelle elle se développe. Toutefois, en agriculture, le terme adventice devient de plus en plus associé à celui de mauvaise herbe dans la mesure où elle est considérée indésirable pour l'homme même si elle ne nuit pas à la culture [1].

I.1. Les problèmes associés aux plantes adventices

Les adventices représentent un vaste panel de plantes ligneuses, herbacées, vivaces ou annuelles. Elles regroupent tous les types de cycle biologiques (annuel, bisannuel, pluriannuel et vivace), des périodes de levée préférentielles et des périodes de croissance et de floraison variées (printanier, estival, automnal et hivernal), ainsi que diverses aptitudes à la germination (différents types de semences, dormances et profondeur de germination) (Aubert et Glachant, 2009). En France, plus de la moitié des adventices les plus fréquentes en culture font partie de la famille des Poacées, Astéracées et Brassicacées [2], mais d'autres familles telles que les Amarantacées, Convolvulacées et Scrofulariacées rassemblent également des espèces rencontrées très fréquemment en culture.

De nombreux problèmes sont actuellement associés aux adventices, toutefois les problèmes d'ordre agronomiques sont les plus nombreux, les plus importants en termes d'enjeu économique, et font l'objet de nombreuses études. En effet, lorsqu'elles se développent dans une culture, les adventices peuvent représenter des sources de nuisibilité importantes. On parle de nuisibilité primaire lorsqu'elles génèrent des baisses de rendement ou de la qualité de la production agricole, et de nuisibilité secondaire lorsqu'elles n'ont pas d'incidences sur la production agricole mais sur la propreté de la culture (gêne physique occasionnée lors du semis et de la récolte) (Aubert et Glachant, 2009). Ces deux types de nuisibilité sont valables aussi bien à long terme qu'à court terme car la reconstruction du stock semencier permet aux espèces adventices de se maintenir sur leur lieu d'implantation (Imbert et al., 2002 ; Ullrich et al., 2011). La nuisibilité primaire demeure la préoccupation majeure dans la lutte contre les adventices en agriculture. Cette nuisibilité est associée en grande partie à la compétition pour l'eau, les nutriments, la lumière et l'espace (Labrada et al., 1996 ; Boyetchko, 1996, Aubert et Glachant, 2009), cette compétition pouvant générer des pertes de rendement allant de 10 à 50%. D'autre part, la nuisibilité primaire concerne également la capacité des adventices à être source de maladies lorsqu'elles s'implantent dans la culture (transmission de maladies et libération d'exsudats phytotoxiques) (Qasem et Foy, 2001 ; Van Bogaert et al., 2015). Certaines adventices peuvent également constituer des foyers pour des maladies spécifiques à la culture permettant aux agents pathogènes d'être toujours présents sur la parcelle même en l'absence de la plante cultivée (Osdaghi et al., 2015). Enfin des adventices sont considérées perturbatrices d'écosystèmes à cause de leur caractère invasif (exemple de la jussie à grande fleur, *Ludwigia grandiflora* : McGregor et al., 1996), d'autres représentent des dangers pour la santé humaine et notamment pour les allergies (exemple du pollen de l'ambrosie à feuille d'armoise, *Ambrosia artemisiifolia* : Wayne et al., 2002), et d'autres occasionnent une gêne esthétique pour les aménagements urbains (Ward et al., 1999).

I.2. Les enjeux soulevés par la gestion des adventices

La maîtrise des adventices implique au moins l'une de ces trois stratégies: (i) réduire les capacités de compétition des plantes développées ; (ii) épuiser le stock semencier; (iii) empêcher l'émergence des plantules (Boyetchko, 1996 ; Aubert et Glachant, 2009). Actuellement, ce sont les méthodes dites « conventionnelles » qui sont les plus utilisées avec l'usage des herbicides chimiques de synthèse de pré-levée et post-levée. En 2011, près de 48% des substances actives vendues en France correspondent à des herbicides contre 40% en 2014 [3]. Cependant, même si cette proportion a diminué entre 2011 et 2014, les quantités de substances actives herbicides sont restées à peu près les mêmes entre ces deux années (les fongicides et bactéricides ont augmenté) et ces substances tiennent encore une place importante au sein du marché des produits phytopharmaceutiques [3].

Les herbicides chimiques de synthèse ont longtemps été utilisés en tant que solution bien adaptée, efficace et peu coûteuse pour traiter les adventices et requérant un travail souvent compatible avec les équipements agricoles couramment utilisés (Boyetchko, 1996). Cependant, ils représentent aujourd'hui un véritable enjeu environnemental, sanitaire, économique et sociétal. En effet, l'essor des produits chimiques a favorisé le développement de la monoculture intensive sans réussir à complètement éradiquer les espèces adventices les plus problématiques. Par conséquent, l'usage intensif de ces substances actives herbicides a généré de nombreux cas de pollution des sols, des eaux superficielles, des eaux souterraines et de l'air [4] ainsi que d'importants impacts sur la faune et la flore. De

plus, l'usage répété de ces substances a favorisé la présence d'espèces adventices résistantes aux herbicides (sélection inter-espèce), mais également la sélection et la reproduction d'individus résistants au sein d'une même espèce adventice (sélection intra-espèce) (Gressel, 2009). Enfin, les herbicides font l'objet de nombreuses contestations sociétales vis-à-vis de leur toxicité pour l'alimentation humaine et animale (Charudattan, 2001). A l'heure actuelle, de nombreuses substances actives existent encore, mais un grand nombre d'entre elles ont été retirées du marché [4].

Aujourd'hui, les attentes sociétales sur la durabilité (écologique/économique/sociale) des systèmes agricoles et les contraintes réglementaires et techniques deviennent de plus en plus fortes. La recherche de méthodes autres que l'usage d'herbicides chimiques contre les adventices suscite un intérêt grandissant auprès des différents acteurs du monde agricole. Parmi ces solutions, le désherbage mécanique constitue un moyen de lutte post-levée relativement efficace qui ne fait aucun biais de sélection parmi les adventices ciblées et empêche la sélection d'individus résistants, mais il est coûteux, laborieux et très difficilement applicable à grande échelle et sur certaines cultures (Van der Weide et al., 2008). D'autres techniques culturales peuvent être également utilisées et modulées en tant que mesures préventives à effets pré/post-levée pour : (i) éviter une spécialisation de la flore adventice au sein de la culture (succession culturale, cultures associées, diversification du choix des dates de semis) ; (ii) réduire les effets générés par la compétition entre les adventices et la culture (choix de variétés cultivées très compétitrices) ; (iii) réduire le stock semencier adventice (labour, déchaumage et faux semis) (Aubert et Glachant, 2009 ; Nichols et al., 2015).

Parmi les moyens de lutte alternatifs, le biocontrôle des adventices s'est considérablement développé depuis les cinq dernières décennies. Il s'est montré particulièrement innovant et prometteur dans la mesure où il a ouvert de multiples pistes de recherches et offert de nouvelles solutions, stratégies, et de nouveaux produits de lutte contre les adventices (Labrada et al., 1996 ; Boyetchko, 1996 ; Müller-Schärer et al., 2000 ; Charudattan, 2001 ; Harding et Razaida, 2015).

II. Le biocontrôle des adventices

Le biocontrôle désigne un ensemble de méthodes de protection des plantes contre les bioagresseurs par utilisation des mécanismes et interactions impliqués dans les relations entre les espèces concernées dans leur milieu naturel [5]. Le biocontrôle repose toutefois sur la gestion de l'équilibre des populations de bioagresseurs et ne vise pas spécialement leur éradication. La définition du biocontrôle reste la même pour les adventices même si la plupart d'entre elles ne constituent pas des bioagresseurs en tant que telles. Le biocontrôle des adventices a recours à des agents de lutte biologique, c'est-à-dire organismes vivants (ou des extraits d'origine biologique) qui sont utilisés pour lutter contre une ou plusieurs espèces indésirables (Harding et Razaida, 2015).

II.1. Les macroorganismes et les Préparations Naturelles Peu Préoccupantes

Les insectes, rongeurs et oiseaux contribuent à réduire la taille du stock semencier adventice superficiel après dispersion des semences par la plante-mère (Bohan et al., 2011 ; Nichols et al., 2015). Parallèlement, certaines pratiques culturales (tonte, rotation, résidus de

cultures) favorisent la consommation des semences adventices par ces insectes et animaux, mais les effets sur la taille du stock semencier sont limités aux semences situées en surface et peuvent être variables selon les conditions environnementales (Nichols et al., 2015). Les insectes phytophages tels que les carabes granivores et omnivores ont contribué en moyenne à 5% de réduction du stock semencier adventice (toutes espèces confondues) sur 257 parcelles de maïs, betterave et colza réparties sur l'ensemble des régions du Royaume-Uni (Bohan et al., 2011), toutefois l'étude suggère que cette contribution serait beaucoup plus importante. De même, le recours aux animaux brouteurs a montré que le pâturage intensif de printemps avec des ovins a permis de réduire de 90% les populations d'orge au rat (*Hordeum murinum*) en Nouvelle-Zélande (Popay et Field, 1996). Enfin, les tests *in vitro* de plusieurs études sur des préparations naturelles peu préoccupantes (PNPP) ont montré de potentiels intérêts pour leur usage en tant que bioherbicides. Les huiles essentielles d'eucalyptus (*Eucalyptus erythrocorys*) concentrées à 1.5µL/mL sont capables d'inhiber complètement la germination des semences de moutarde des champs (*Sinapis arvensis* L.) et d'alpiste (*Phalaris canariensis*) (Ghnaya et al., 2013). Cependant, l'application de PNPP au champ nécessite d'autres recherches sur l'applicabilité, le coût et la toxicité de ces produits (Tworkoski, 2002 ; Amri et al., 2013).

II.2. Les bases du biocontrôle des adventices avec les microorganismes

Les microorganismes représentent la catégorie de bioherbicides la plus importante en termes de diversité, de piste de recherches, et de produits développés (Müller-Schärer et al., 2000 ; Charudattan, 2001 ; Harding et Razaida, 2015). Ils regroupent les bactéries, les virus et les champignons, et ils suscitent un grand intérêt en matière de sélectivité grâce à leur spécificité d'hôte (Harding et Razaida, 2015). Les critères de choix de ces microorganismes en tant que bioherbicides sont basés sur : (i) leur spécificité et l'absence d'impacts négatifs sur l'environnement ; (ii) leur stabilité génétique ; (iii) leur efficacité d'action malgré les conditions environnementales ; (vi) la possibilité de les produire en quantité abondante et de les maintenir stable lors de la formulation du bioherbicide (Trognitz et al., 2016).

Les pratiques culturales influencent la composition du microbiote des adventices et notamment le microbiote tellurique, ainsi que leurs effets sur la persistance des adventices (plantes et stock semencier) (Boyetchko, 1996 ; Davis et al., 2006 ; Ullrich et al., 2011 ; Lou et al., 2016 ; Nichols et al., 2015 ; Verdú et Mas, 2015 ; Smith et al., 2016). Malgré cette variabilité, la recherche et l'isolement de microorganismes susceptibles d'affecter le développement d'adventices sont généralement effectués à partir de plantes adventices présentant des symptômes (au niveau des feuilles, tige, inflorescences, rhizome ou racines) (Kremer, 1998 ; Mothlag, 2011(a) ; Berner et al., 2015 ; Harding et Razaida, 2015), mais également à partir du stock semencier et du sol dans lequel se trouvent ces plantes (Meyer et al., 2014 ; Trognitz et al., 2016).

II.3. Les bactéries et les virus

Dans le domaine des bioherbicides, les bactéries ont fait l'objet de recherches en matière de screening, d'études du spectre d'action, d'extraction de métabolites, et de formulation de produits et mélanges destinés au marché. En général, les bactéries sont capables de se développer beaucoup plus rapidement que les champignons, ce qui rend leur production plus facile et plus rapide que celle des champignons (Charudattan, 2001). Les deux espèces les plus étudiées sont *Pseudomonas fluorescens* et *Xanthomonas*

campestris pour lesquelles nombre de souches prometteuses ont été identifiées (Kremer, 1998 ; Harding et Razaida, 2015 ; Trognitz et al., 2016). Au sein de l'espèce *P. fluorescens* par exemple, trois souches produisent des métabolites impliqués dans une action inhibitrice sur la germination et/ou la croissance d'adventices (Banowetz et al., 2008 ; Harding et Razaida, 2015). Au sein de l'espèce *X. campestris*, une seule souche est actuellement enregistrée en tant que bioherbicide, et une deuxième est étudiée en tant que candidat potentiel. Cependant, bien que les mécanismes d'infection des adventices par ces souches de *X. campestris* n'aient pas été clairement caractérisés, il est supposé que des métabolites phytotoxiques soient impliqués (Harding et Razaida, 2015).

L'usage des virus en tant que bioherbicide a déjà fait l'objet de plusieurs études (Kazinczi et al., 2006 ; Ferrell et al., 2008). Cependant les virus semblent inappropriés pour les usages inondatifs en raison de leur forte variabilité génétique et du manque de spécificité des souches actuellement testées. Toutefois, leurs mécanismes d'infection diffèrent grandement des bactéries et des champignons et sont beaucoup moins influencés par les pratiques culturales, c'est pourquoi les virus font encore l'objet de recherches pour le biocontrôle des adventices (Harding et Razaida, 2015). La majorité de ces virus sont des souches dérivées du virus de la mosaïque du tabac.

II.4. Les champignons et la lutte contre les adventices

Avec les bactéries, les champignons constituent la majeure partie des recherches et études pour les bioherbicides (Charudattan, 2001 ; Trognitz et al., 2016). La méthode la plus couramment employée en matière de screening est l'isolement de champignons à partir de plantes infectées. Les champignons rassemblent le plus grand nombre de candidats phytopathogènes (Charudattan, 2001 ; Harding et Razaida, 2015 ; Trognitz et al., 2016) et recouvrent un vaste nombre d'espèces et de formes spéciales (Te Beest et al., 1992 ; Charudattan, 2001 ; Harding et Razaida ; 2015). Pour en citer quelques-uns, les genres *Phoma* et *Colletotrichum* (les deux genres les plus étudiés), ainsi que *Fusarium*, *Puccinia*, *Phomopsis*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Epicoccum* et *Cladosporium* font partie des genres auxquels appartiennent ces candidats. Toutefois, ces champignons ne sont pas toujours spécifiques à l'espèce adventice à partir de laquelle ils ont été isolés et peuvent avoir un spectre d'action beaucoup plus large, c'est notamment le cas des parasites facultatifs (Charudattan, 2001).

Parmi les champignons qui présentent un intérêt en tant que bioherbicide, certains sont capables d'exercer une action systémique et d'autres une action locale. Leurs mécanismes d'infection sont essentiellement associés au parasitisme, à la libération de molécules phytotoxiques (Evidente et al., 1998 ; Cristofaro et al., 2011) ou à une combinaison des deux. Toutefois, l'efficacité des champignons peut être variable en fonction du stade de développement de la plante. Par exemple, sur l'amarante réfléchie (*Amaranthus retroflexus*), le champignon *Alternaria alternata* a généré des taux de mortalité proche de 100% sur les stades à deux et quatre feuilles alors le stade cotylédons et les stades supérieurs à huit feuilles ont eu des taux de mortalité compris entre 20 et 60% (Ghorbani et al., 2000). De même, le type d'infection des champignons pathogènes peut différer selon le stade de développement et/ou la partie de la plante qu'ils infectent. Le champignon *Puccinia punctiformis* (Str.) Röhl a une action locale sur les feuilles de chardon des champs (*Cirsium arvense*) lorsque la plante est développée, mais il peut également avoir une action

systémique s'il infecte les jeunes plantules ou les méristèmes racinaires (Wandeler et al., 2008 ; Cripps et al., 2009).

Au cours des trente dernières années, des bioherbicides à base de champignons pathogènes ont été également formulés, développés et testés au champ (Charudattan, 2001). Aujourd'hui, plusieurs d'entre eux sont catalogués en tant que produit de biocontrôle et la plupart sont conçus sur la base d'un seul champignon phytopathogène moyennant l'ajout d'additifs tels que des surfactants ou des polymères hydrophiles (Charudattan, 2001 ; Harding et Razaida, 2015). Toutefois, le nombre d'espèces adventices qui ont fait l'objet de recherches sur les champignons phytopathogènes est très restreint et se cantonne principalement aux espèces ou aux familles les plus problématiques selon les régions du globe (Müller-Schärer et al., 2000 ; Charudattan, 2001 ; Harding et Razaida, 2015).

Les recherches et les essais effectués avec les champignons pathogènes aux adventices se sont principalement focalisés sur les effets générés au niveau des plantules et des plantes développées (Te Beest et al., 1992 ; Charudattan, 2001 ; Harding et Razaida, 2015). Les effets générés au niveau des semences adventices sont souvent mentionnés à titre complémentaire et font rarement l'objet d'une étude à part entière. De plus, à l'instar des plantes développées et des plantules, les semences adventices enterrées sont moins utilisées pour la recherche de champignons pathogènes.

III. Microorganismes fongiques telluriques et biocontrôle du stock semencier adventice

III.1. L'usage des champignons sur les semences adventices

Le stock semencier représente une composante importante de la présence des adventices dans une parcelle (Kremer, 1998 ; Imbert, 2002 ; Ullrich et al., 2011). Aujourd'hui, la recherche de microorganismes capables de réduire la persistance ou la taille du stock semencier suscite un intérêt grandissant dans le biocontrôle des adventices. Cependant, la grande majorité des champignons testés sur semences adventices ont été isolés à partir de plantes et plantules symptomatiques, et très peu à partir des semences qui se trouvent dans le sol (Müller-Stöver et al., 2016).

Actuellement, de nombreux tests de pathogénicité *in vitro* ont été effectués sur des semences adventices avec des champignons isolés à partir d'organes foliaires et racinaires. Par exemple, *Curvularia lunata* est capable de réduire de 30% le taux de germination d'*Echinochloa crus-galli* alors qu'il a été isolé à partir de feuilles symptomatiques (Mothlag, 2011(b)). En plus d'avoir une action anti-germination, ces champignons pathogènes obtenus à partir de plantes entières sont souvent capables d'infecter les adventices à différents stades de développement. En parasitant les semences et générant d'importantes nécroses foliaires, *Aspergillus alliaceus* est capable d'infecter la plante et les semences d'*Orobancha cernua* quels que soient leur stade de développement (Aybecke et al., 2014). Toutefois, aucun produit à base de champignons n'a encore été développé pour un usage spécifique sur le stock semencier.

Tout comme les organes végétatifs souterrains, le stock semencier est en contact direct avec les microorganismes du sol. L'environnement immédiat des semences est appelé spermosphère, il correspond le plus souvent au millimètre de sol qui entoure les semences.

L'ensemble des microorganismes qui se trouvent à l'intérieur (les endophytes), à la surface des semences et ceux qui sont situés dans la spermosphère constitue le microbiote de ces semences (Müller-Stöver et al., 2016). Or, tout comme le microbiote des plantes développées, le microbiote des semences est également susceptible de contenir des microorganismes pathogènes. Notre étude étant focalisée sur les champignons, nous qualifierons de « champignons associés aux semences » les champignons du microbiote des semences et ce, quelle que soit l'action qu'ils y exercent.

III.2. Les champignons associés aux semences adventices

Les champignons associés au stock semencier adventice ont principalement deux origines : le sol (« soil-borne fungi ») et la semence lorsqu'elle était encore rattachée à la plante-mère (« seed-borne fungi »). Le sol est à l'origine de la majorité des champignons situés à la surface des semences et dans la spermosphère. Il rassemble à la fois des champignons ubiquistes (les genres *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Cladosporium*) et des champignons dits « spécifiques » présents au niveau des semences d'une espèce adventice donnée (Wagner et Mitschunas, 2008). L'origine et la diversité de ces champignons est étroitement liée à l'histoire du sol qui les contient (Davis et al., 2006). Malgré la connaissance des facteurs susceptibles d'influencer la composition microbienne du sol, il est difficile de savoir lesquels ont favorisé la présence de tel ou tels champignons associés au stock semencier adventice. La spécificité de certains microorganismes à s'associer à une espèce adventice donnée a été remarquée à de multiples reprises (Kremer, 1998 ; Wagner et Mitschunas, 2008), mais les processus de sélection sous-jacents demeurent encore inconnus (Agler et al., 2016). Il a toutefois été remarqué que les exsudats libérés par les semences et les racines pouvaient attirer ou repousser certains microorganismes par chimiotactisme, ce qui expliquerait leur présence ou leur absence (Kremer, 1998 ; Dalling et al., 2011).

La majorité des champignons endophytes associés au stock semencier proviennent des semences adventices avant que celles-ci n'aient été disséminées. Lors de la dissémination, les endophytes restent conservés à l'intérieur des semences et peuvent être transmis à la plantule émergente pendant la germination (Halloin, 1986). La plupart des champignons endophytes sont originaires de la plante-mère qui les a transmis aux embryons des futures semences pendant que celles-ci se formaient (Halloin, 1986). Certains endophytes peuvent également provenir des grains de pollen et sont transmis à la future semence durant la fécondation (Halloin, 1986 ; Trognitz et al., 2016). Enfin, des cas de symbiose chez quelques espèces herbacées ont aussi été reportés (Trognitz et al., 2016).

La composition du microbiote du stock semencier d'une adventice donnée dépend de plusieurs facteurs tels que le type de sol, le climat, les caractéristiques de la plante (espèce, génotype) et toute autre intervention anthropique appliquée sur le sol (Davis et al., 2006 ; Ullrich et al., 2011). Le développement de nouvelles technologies de séquençage a grandement contribué à l'étude des communautés microbiennes qui composent ce microbiote. Toutefois, la diversité, la complexité et les multiples facteurs influençant le microbiote tellurique rendent difficile la compréhension des mécanismes d'interactions entre les semences et leurs microorganismes associés. Le microbiote tellurique exerce cependant une forte influence sur la plante en général et peut avoir des impacts aussi bien positifs que négatifs sur son état de santé, sa croissance, le développement de ses organes, sa compétitivité, et sa résistance aux stress, aux maladies et aux substances allochimiques

(Trognitz et al., 2016). Il en va de même pour le stock semencier (Kremer, 1993 ; Davis et al., 2006 ; Chee-Sanford et al., 2006 ; Dalling et al., 2011 ; Müller-Stöver et al., 2016).

III.3. Intérêt de ces champignons dans le biocontrôle du stock semencier adventice

Plusieurs expérimentations en conditions contrôlées ont permis d'observer les effets générés par l'absence de champignons telluriques sur des semences adventices enterrées (Blaney et Konaten, 2001 ; Wagner et Mitschunas, 2008). Dans ces expérimentations, le plus souvent, des traitements fongicides ont été appliqués sur les semences adventices utilisées afin de simuler l'absence de champignons tandis que les témoins n'avaient subi aucun traitement fongicide. Wagner et Mitschunas (2008) ont rassemblé l'ensemble des résultats de ces études afin d'analyser l'évolution du nombre de semences germées, viables et mortes au cours du temps en fonction de la présence et de l'absence de champignons. Il a été montré que l'absence de champignons permet de maintenir une proportion plus importante en semences viables jusqu'à ce que celles-ci germent ou meurent, ce qui a mis en évidence que les champignons associés aux semences adventices ont tendance à avoir un effet négatif sur leur viabilité et leurs capacités à germer. Toutefois, ces études n'ont été restreintes qu'à quelques adventices et se sont limitées aux champignons qui se situent à la surface des semences et dans la spermosphère. De plus, elles n'ont pas permis de comprendre les mécanismes responsables de leurs effets sur les semences adventices.

A l'inverse, d'autres études se sont focalisées sur les semences adventices contenues dans des sols qualifiés de suppressifs, c'est-à-dire des sols dans lesquels les plantes adventices ont localement du mal à s'installer et/ou présentent des symptômes de maladies. Par exemple, les fontes des semis observées chez brome des toits (*Bromus tectorum*) ont permis l'isolement et l'étude des effets pathogènes de *Pyrenophora seminiperda* et d'un *Fusarium* sur les semences (Baughman et Meyer, 2013 ; Meyer et al., 2014). Ces études ont ainsi contribué à découvrir un ensemble de champignons capables d'exercer des actions pathogènes pré-émergence et post-émergence sur les semences adventices (Kremer, 1993 ; Blaney et Konaten, 2001 ; Wagner et Mitschunas, 2008, Mohler et al., 2012). Toutefois, ces effets pathogènes sont rarement dû à l'action d'un seul champignon et d'autres microorganismes peuvent également être impliqués (Kremer, 1998 ; Chee-Sanford, 2006 ; Müller-Stöver et al., 2016). D'autre part, les champignons endophytes associés à certaines adventices herbacées contribuent à favoriser leur implantation (Trognitz et al., 2016), cependant le rôle exact des champignons endophytes transmis de la plante-mère aux semences reste généralement inconnu. En revanche deux cas de détériorations de semences adventices par des champignons du genre *Fusarium* ont été étudiés *in vitro* (Müller-Stöver et al., 2009 ; Franke et al., 2014). En général, ces champignons proviennent du sol et peuvent être des parasites obligatoires ou facultatifs, ou des saprophytes (Harman, 1983 ; Halloin, 1986 ; Chee-Sanford, 2008). Lorsque les conditions leur sont favorables, ces champignons sont capables de s'attaquer directement aux semences et d'en coloniser l'intérieur (tégument interne, embryon et/ou albumen), ce qui les confond parfois aux endophytes (Müller-Stöver et al., 2009 ; Chee-Sanford et al., 2008 ; Franke et al., 2014). En ce qui concerne les champignons de la spermosphère et les champignons épiphytes, des effets réducteurs sur la viabilité des semences, des actions anti-germinations et des effets fonte des semis ont été reportés (Kremer, 1993 ; Blaney et Konaten, 2001 ; Wagner et Mitschunas, 2008). Cependant, les mécanismes d'action demeurent très souvent inconnus (Kremer, 1993 ; Müller-Stöver et al., 2016), mais les pistes de recherches les plus courantes s'intéressent en particulier aux enzymes et exsudats libérés par ces champignons afin de

découvrir s'ils possèdent une éventuelle phytotoxicité ou action pathogène sur les semences (Ahmed et al., 2001 ; Cristofaro et al., 2011 ; Cimmino et al., 2013).

Les champignons telluriques associés au stock semencier adventices présentent un potentiel intérêt pour le biocontrôle des adventices dans la mesure où quelques candidats pathogènes à ces semences ont été découverts malgré le peu d'études réalisées. De plus, certains champignons se sont avérés très prometteurs pour un possible usage en tant que bioherbicide. Cependant, les contraintes méthodologiques et techniques limitent considérablement les études visant à déterminer la véritable contribution des champignons du sol dans la réduction de la taille et de la persistance du stock semencier (Wagner et Mitschunas, 2008 ; Müller-Stöver et al., 2016). D'autre part, comparés aux recherches effectuées sur des champignons associés aux plantes entières ou aux plantules, peu d'études se sont véritablement focalisées sur la recherche de champignons telluriques associés aux semences et capables d'exercer une action pathogène sur ces semences (Evans, 2013).

IV. Problématique et démarche

IV.1. Problématique de l'étude

L'objectif de notre étude est de mettre en évidence la présence de candidats fongiques à action bioherbicide au sein du microbiote du stock semencier d'adventices en ciblant notre étude sur deux espèces adventices majeures : l'amarante réfléchie (*Amaranthus retroflexus*) et la moutarde des champs (*Sinapis arvensis*). Deux types d'effets pathogènes seront abordés: les effets pré-émergence *via* le taux d'émergence des plantules, et les effets post-émergence *via* l'état de santé des plantules.

IV.2. Démarche proposée

L'objectif est d'identifier des candidats fongiques à action bioherbicide au moyen d'un screening réalisé sur un ensemble de champignons associés aux semences d'*A. retroflexus* et de *S. arvensis*. Sur le modèle de Meyer et al. (2014), une prospection sur deux parcelles aura lieu afin de se procurer des échantillons de sol contenant les semences adventices des deux adventices étudiées. Après extraction, sur le modèle de Meyer et al. (2014) et d'Ismael (2010), la moitié de ces semences seront désinfectées en surface pour isoler les champignons endophytes et l'autre moitié sera laissée telle quelle pour isoler les champignons de la spermosphère. Le pouvoir pathogène des différents isolats fongiques sera testé en faisant germer des semences adventices issues de collection dans un substrat préalablement inoculé avec les différents champignons isolés. Les semences déposées dans les substrats inoculés seront laissées dans un compartiment à l'obscurité, puis transférées vers un autre compartiment avec une photopériode. L'émergence des semences sera notée avant le transfert vers le compartiment avec photopériode puis à la fin de la manipulation. Enfin, les effets des microorganismes sur les plantules seront observés.

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal

Les deux espèces adventices *A. retroflexus* et *S. arvensis* ont été retenues à la suite d'une prospection appliquée en amont sur plusieurs parcelles (blé, colza, cassis et moutarde) de la commune de Fénay située au Sud de Dijon en Côte-d'Or. L'objectif de cette prospection était d'observer le contenu de leur stock semencier afin de retenir les espèces adventices à étudier et les parcelles à échantillonner (Annexe I). Les deux adventices font partie des espèces trouvées plus abondantes. De plus, les lots de semences issues de collections qui ont été testés nous ont permis choisir *A. retroflexus* et *S. arvensis* car leurs semences sont faciles à faire germer (Tableau 1). Ces lots ont été ensuite utilisés pour réaliser le test de pathogénicité des différents champignons qui auront été isolés.

I.1. *Amaranthus retroflexus*

L'amarante réfléchie est une plante annuelle herbacée de la famille des Amaranthacées (Figure 1). Elle est reconnue comme espèce nuisible et problématique sur plusieurs de cultures d'été, dans de nombreux pays et sur plusieurs continents (Roskopf, 1997 ; [7]). En effet, cette plante est capable de produire une quantité abondante de graines (supérieure à 10000 semences par plante), et de croître rapidement dans des conditions favorables [7]. *A. retroflexus* fait partie des espèces adventices dont la dissémination s'effectue principalement par gravité sans l'intervention de facteurs biotiques et abiotiques (à l'exception de l'anthropochorie), on parle de barochorie (Benvenuti, 2007).

Actuellement, cette espèce a déjà fait l'objet de plusieurs recherches de microorganismes pathogènes pour un usage en tant que bioherbicide. Parmi les champignons, on compte entre autres : *Phomopsis amaranthicola* (Roskopf, 1997), *Alternaria alternata* (Ghorbani et al., 2000) ; *Trematophoma lignicola* Petrak (Lawrie et al., 2001) ; *Albugo amaranthi* (Spring et al., 2005) ; *Aposphaeria amaranthi* (Mintz et al., 1992) ; *Fusarium oxysporum* (Schlechtendahl) (Boari et al., 2003) ; *Microsphaeropsis amaranthi* (Moran et al., 2007). Ces champignons ont tous été isolés à partir de plantes symptomatiques, mais leurs effets n'ont été observés que sur les plantules et les plantes développées. De plus, aucune étude n'a porté spécifiquement sur les champignons associés aux semences d'*A. retroflexus*.

I.2. *Sinapis arvensis*

La moutarde des champs est une plante annuelle herbacée de la famille des Brassicacées (Figure 2). Elle est reconnue comme espèce adventice nuisible dans certaines cultures [8]. Comme *A. retroflexus*, elle est capable de produire une quantité de semences importantes (entre 500 et 5000 semences par plante), mais elle est surtout dotée d'un important système racinaire et d'une croissance rapide qui lui permettent d'exercer une forte compétition sur la culture. Son mode de dissémination est également la barochorie (Benvenuti, 2007). Actuellement, aucune étude ne s'est intéressée aux microorganismes associés à cette plante pour un potentiel usage en tant que bioherbicide.

Tableau 1 Description des lots de semences adventices issues de collection

Espèce adventice concernée par le lot	<i>Amaranthus retroflexus</i>	<i>Sinapis arvensis</i>
Organisme collecteur	INRA – Centre Dijon 17 Rue Sully 21000 Dijon France	Herbiseed W End, Reading RG10 0NJ, Royaume-Uni
Lieu d'obtention	Jardin Quetigny 21800 Quetigny France	Non-communicué Royaume-Uni
Mode d'obtention	Collecte manuelle sur plantes développées	Non-communicué
Date d'obtention	22/09/2005	2006

Espèce adventice	<i>Amaranthus retroflexus</i>	<i>Sinapis arvensis</i>
Photographie de la plante entière Sources : - Wikipédia (pour <i>A. retroflexus</i>) - Tela Botanica, Catherine Mahyeux, 29/04/2010 (pour <i>S. arvensis</i>)		
Photographie des semences extraites du sol Source : Harada Liu-Ji, 02/05/2016 (pour les deux plantes)		

Figure 1 Plantes et des semences d'*A. retroflexus* et *S. arvensis*.

II. Collecte des échantillons de sol et extraction des semences adventices

L'objectif de cette étape était d'extraire un nombre suffisant de semences d'adventice contenues dans le sol tout en cherchant à préserver au maximum les microorganismes fongiques associés à ces semences. Deux parcelles de blé situées aux environs de Dijon dans la commune de Fénay ont été choisies pour l'échantillonnage de sol, elles ont été notées P1 et P2 par la suite (Tableau 2, Figure 2). P1 a été sélectionnée pour étudier l'amarante réfléchie (*Amaranthus retroflexus*) et P2 pour la moutarde des champs (*Sinapis arvensis*). Comme pour le choix des deux espèces adventices, le choix des parcelles a été effectué à la suite de la prospection appliquée en amont sur plusieurs parcelles à Fénay.

Trois paires de prélèvement de sol ont été collectées sur chacune des parcelles (Figure 3). Une paire correspond à deux prélèvements proches de 1m, distance qui a été choisie afin d'éviter de prélever dans le rayon de dissémination d'une même plante adventice. Nous avons estimé ce rayon à un mètre car la dissémination des semences d'*A. retroflexus* et de *S. arvensis* se fait majoritairement par barochorie (Benvenuti, 2007), et la hauteur et le diamètre apparent des plantes développées dépasse rarement un mètre [7] [8].

Les paires d'échantillons ont été réparties sur l'ensemble des zones de chaque parcelle qui contenaient une quantité abondante de semences (Figure 3, Annexe I). Les échantillons de sols ont été collectés à l'aide d'une tarière de 5cm de diamètre en prélevant les 10 premiers centimètres de sol, puis conservés dans des sacs plastiques étanches.

Tableau 2 Localisation et informations sur les deux parcelles choisies

Nom	P1	P2
Coordonnées GPS	47°14'41.3"N 5°03'13.6"E	47°13'25.6"N 5°03'11.5"E
Commune	21600 Fénay, France	21600 Fénay, France
Principales espèces adventices présentes dans le stock semencier	<i>Amaranthus retroflexus</i> , <i>Fallopia convolvulus</i> , <i>Picris chioides</i> , <i>Gallium aparine</i> , <i>Stellaria media</i>	<i>Sinapis arvensis</i> , <i>Viola tricolor</i> , <i>Avena fatua</i>

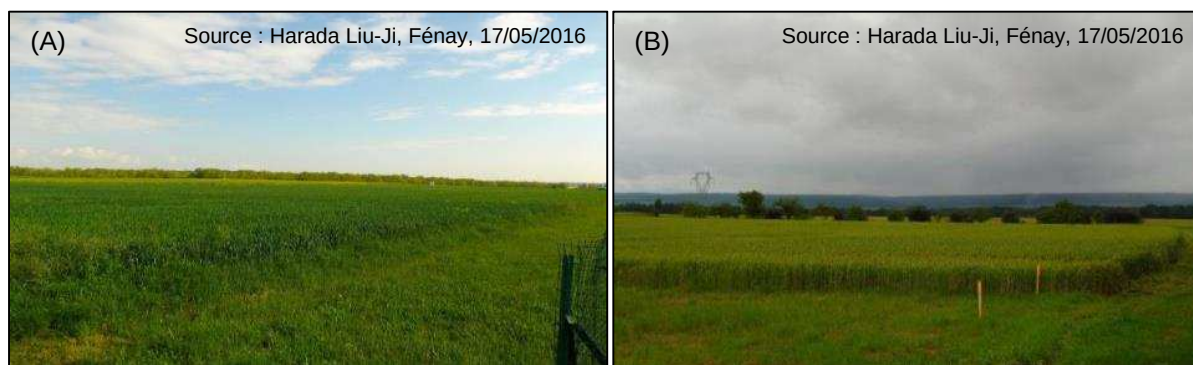


Figure 2 Photographie des deux parcelles de blé où ont été effectués les prélèvements. (A) Parcelle P1 vue depuis le Sud ; (B) Parcelle P2 vue depuis l'Est

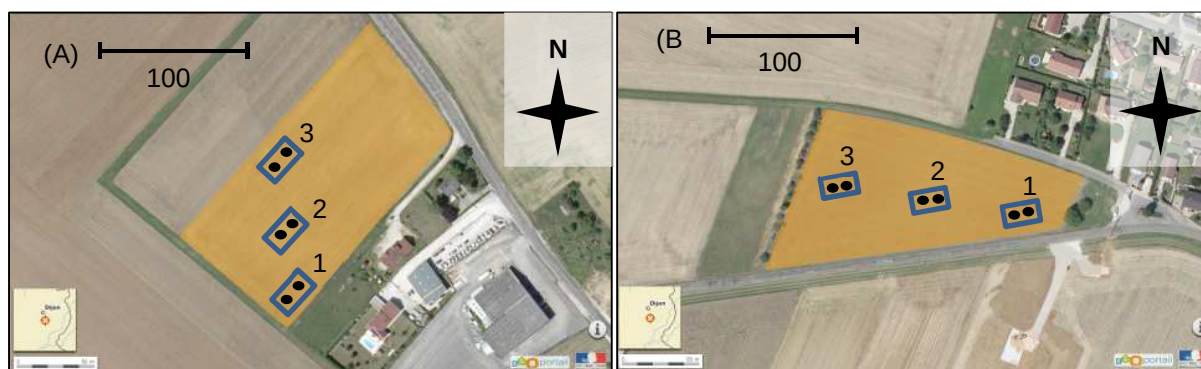


Figure 3 Répartition des paires d'échantillons (rectangles bleus numérotés) sur les parcelles P1 (A) et P2 (B). Images obtenues avec Géoportail le 31/08/2016.

Les échantillons de sol ont été tamisés à l'eau courante avec deux tamis de mailles différentes : 5mm et 400µm (Ter Heerd et al., 1996 ; Annexe II). Le sol tamisé a été ensuite maintenu humide en l'emballant avec une toile en nylon humidifiée, le tout stocké dans une boîte de Petri en plastique afin de préserver les microorganismes. Les semences d'amarante et de moutarde ont été respectivement extraites des échantillons de sol tamisés issus de P1 et de P2. Elles ont ensuite été déposées dans des boîtes de Petri en verre sur un papier Whatman humidifié, puis stockées en chambre froide à 4°C.

III. Isolement des champignons associés aux semences

L'objectif de cette étape était d'isoler sur milieu de culture un maximum de microorganismes fongiques associés aux semences d'adventices extraites. Nous avons cherché à obtenir séparément les champignons issus de la spermosphère et les champignons endophytes. Pour cela, les semences extraites des échantillons tamisés ont été divisées en deux lots équilibrés correspondant chacun à une modalité (Figure 4). L'un des lots correspondait à celui dont les semences étaient laissées telles quelles afin d'isoler les champignons situés dans la spermosphère. L'autre lot correspondait à celui dont les semences allaient être désinfectées en surface puis blessées pour permettre l'isolement des champignons endophytes (Ganley et Newcombe, 2006). Les lots issus des échantillons appariés ont été regroupés afin d'avoir un nombre suffisant de semences pour chaque modalité traitée. Ainsi, pour chaque espèce adventice, on disposait de six lots de semences dont trois lots désinfectés et blessés notés « D+B », et trois lots non-désinfectés notés « ND » (Figure 4).

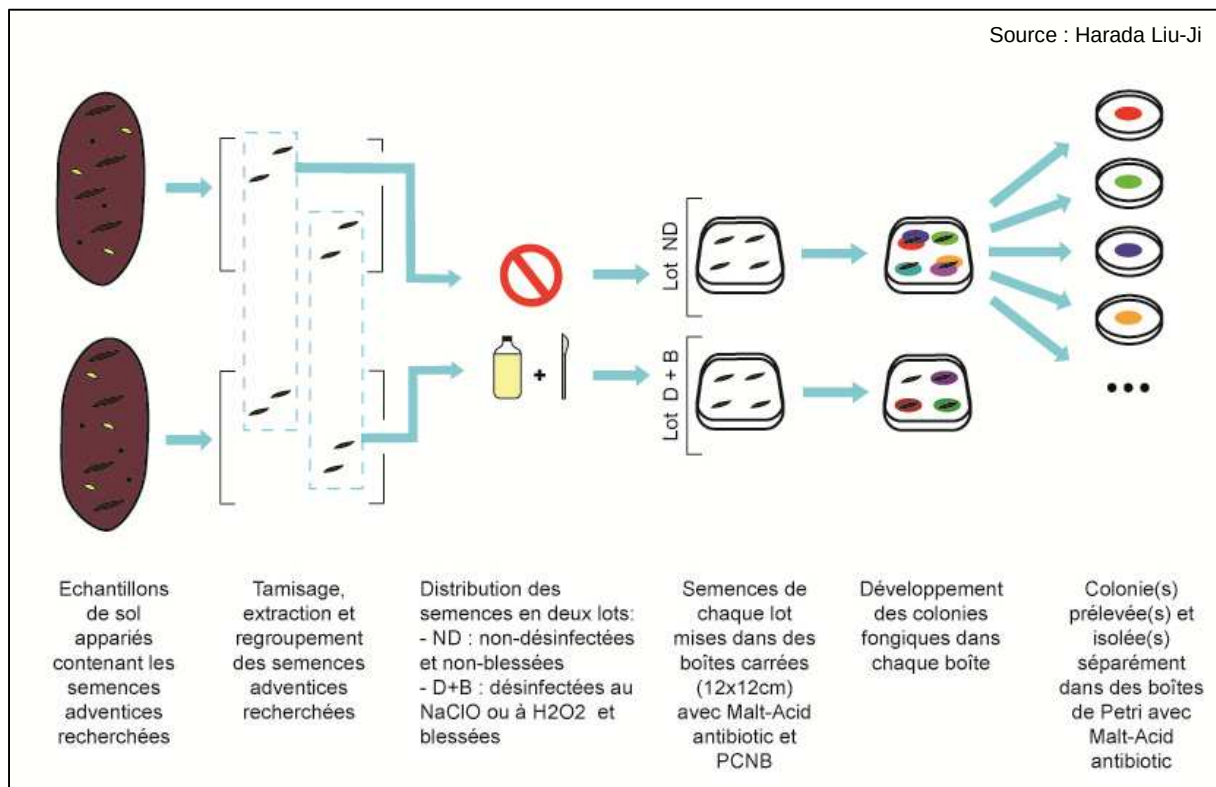


Figure 4 Récapitulatif de l'étape d'isolement des champignons associés aux semences adventices

Les semences des lots D+B ont été désinfectées par trempage dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 10%(v/v) pour la moutarde et dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 2%(v/v) pour l'amarante, le tout sous agitation pendant 20min (Oyebanji et al., 2009 ; Barampuran et al., 2014). Après désinfection, les semences ont été rincées par un trempage de 5 min dans de l'eau stérile, séchées à l'aide de papier absorbant, puis percée avec une aiguille. Les semences de chaque lot ont été déposées dans des boîtes de Petri en plastique de 12x12cm contenant du malt-acid antibiotique (MAA : Malt 10g, gélose 15g, eau osmosée 1L, puis après autoclavage 20' à 120°C, addition d'acide citrique 250mg, de chlortetracycline 50mg/L, et de streptomycine 100mg/L) avec du pentachloronitrobenzène (PCNB, 1g/L) (Figure 4). L'ajout de PCNB au MAA permet de

limiter le développement des mucorales, champignons opportunistes à développement rapide et qui n'ont pas d'action pathogène spécifique sur les semences. Dès qu'un champignon commençait à se développer, celui-ci était repiqué individuellement dans une boîte de Petri contenant du MAA. Plusieurs repiquages successifs d'un même champignon pouvaient avoir lieu lorsqu'il y avait contamination ou présence de deux champignons différents dans une même boîte et ce, afin de s'assurer de la pureté de chaque champignon isolé. Une fois qu'il était suffisamment développé sur MAA, chaque isolat fongique a été ensuite repiqué sur Potato Dextrose Agar (PDA, 39g/L).

IV. Morphotypage et sélection des champignons à tester

Compte tenu du nombre important d'isolats, nous avons choisi d'optimiser la réalisation du test de pathogénicité en effectuant au préalable une classification par morphotype de ces isolats. Cette classification a permis de regrouper les différents isolats obtenus chez les deux espèces adventices sur la base de plusieurs critères morphologiques observables à l'œil nu et au microscope optique sur PDA et MAA (Tableau 3). Cependant, la classification n'a pas pris en compte l'origine des champignons isolés, c'est-à-dire le numéro d'échantillon de sol et la modalité de désinfection des semences adventices. Ainsi, un morphotype pouvait regrouper un seul ou plusieurs isolats, et un morphotype pouvait être présent chez les deux espèces adventices ou chez une seule. La nomenclature de chaque morphotype était basée sur la ou les deux première(s) lettre(s) de la couleur dominante observée sur PDA. Un numéro était également attribué à chaque morphotype ayant la même couleur dominante sur milieu PDA.

Tableau 3 Liste des critères de description des morphotypes (MAA : malt-acid antibiotic ; PDA : Potato Dextrose Agar)

1) Observation à l'œil nu sur PDA 7 jours après repiquage	- Couleur(s) dominante(s) du mycélium et des fructifications s'il y en a - Vitesse de croissance - Epaisseur de l'isolat - Aspect / texture
2) Observation au microscope optique sur PDA	- Genre ou espèce fongique supposé à partir des caractéristiques des hyphes et des spores
3) Observation à l'œil nu sur MAA 7 jours après isolement	- Couleur(s) dominante(s) du mycélium et des fructifications s'il y en a - Vitesse de croissance
4) Observation à l'œil nu sur MAA 14 jours après isolement	- Couleur(s) dominante(s) du mycélium et des fructifications s'il y en a - Epaisseur de l'isolat - Aspect / texture

La sélection des isolats pour le test de pathogénicité a été réalisée de façon à ce que la totalité des morphotypes soit testée et que les champignons choisis soient représentatifs de la diversité des origines tout en évitant des redondances. Lorsqu'un seul isolat appartenait à un morphotype, celui-ci était systématiquement sélectionné. Sinon, pour chaque autre critère d'origine (espèce adventice, numéro d'échantillon de sol, et modalité de désinfection des semences), la moitié des isolats était sélectionnée pour le test de pathogénicité.

V. Tests de pathogénicité

Les isolats sélectionnés ont été testés sur des semences issues de collections de la même espèce adventice (Tableau 1). Contrairement à beaucoup d'autres tests de pathogénicité sur semences adventices, il a été choisi d'utiliser un substrat qu'on inoculerait avec les différents isolats à tester et dans lequel les semences adventices seraient placées. Après plusieurs tests, c'est un terreau qui a été sélectionné.

V.1. Inoculation du substrat

Le terreau a été tamisé deux fois successivement avec un tamis de 5mm puis un tamis de 3 mm de mailles afin d'obtenir un substrat suffisamment fin. Des boîtes de Petri en verre de 10cm de diamètre ont été remplies avec 12g de terreau et ce, à raison de cinq boîtes par isolat à tester. Les boîtes ont été autoclavées à 121°C pendant 40min afin de s'assurer de la stérilité du substrat, puis laissées reposer pendant au moins trois jours pour permettre le dégagement de méthane et autres gaz produits lors de l'autoclavage.

Pour chaque isolat à tester et cultivé sur PDA, un morceau de milieu colonisé par du mycélium a été déposé dans cinq boîtes constituant les répétitions (Figures 5, Annexe III). Vingt boîtes de substrat ont également été utilisées pour les témoins de l'amarante et de la moutarde parmi lesquelles dix ont eu un morceau de milieu PDA. Les boîtes ont ensuite été transférées dans une étuve à 25°C, et incubées pendant sept jours. Les boîtes pour lesquelles le développement fongique était trop faible étaient incubées sur une plus longue durée, période durant laquelle une surveillance et une humidification régulière du substrat inoculé était effectuées.

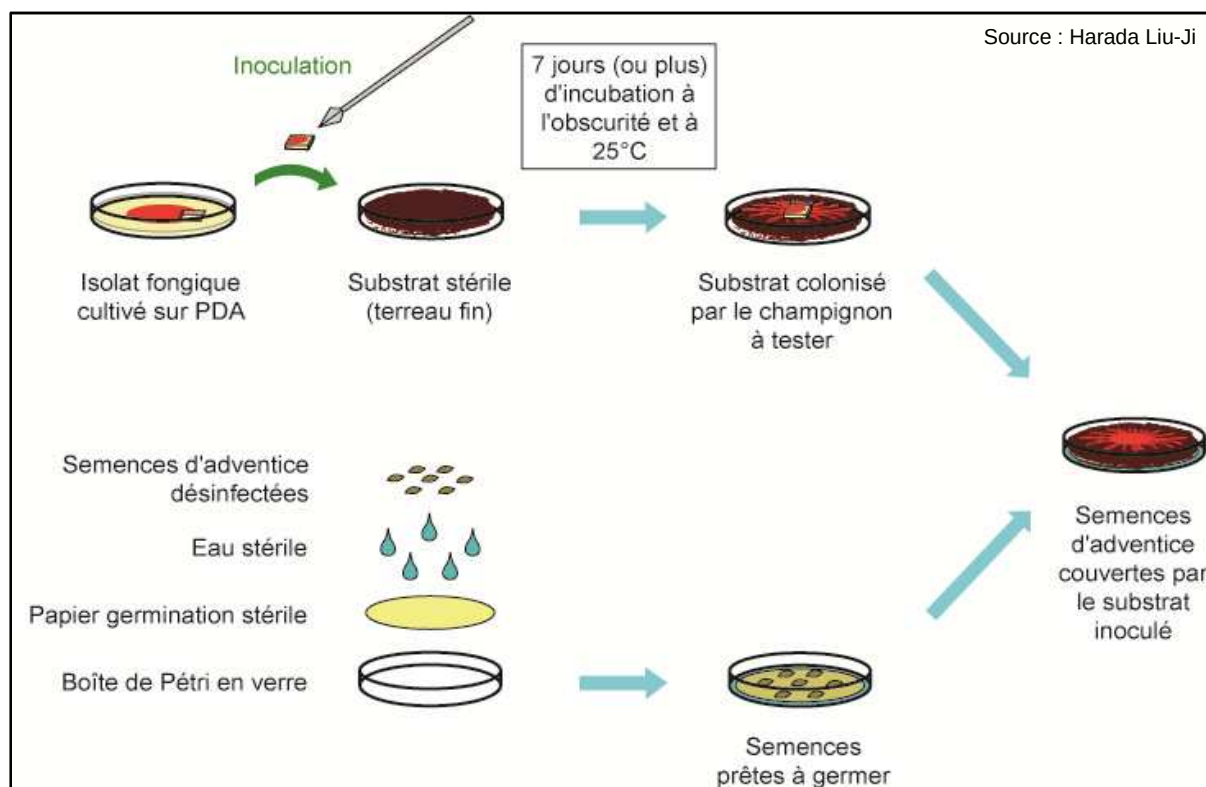


Figure 5 Démarche appliquée pour le test de pathogénicité des champignons

V.2. Dépôt des semences adventices

Les deux lots de semences d'*A. retroflexus* et de *S. arvensis* issues de collections ont été utilisés (Tableau 3). Afin de faciliter la levée de leur dormance, les semences de *S. arvensis* ont été mises à stratifier en les stockant à 4°C sur un papier absorbant humidifié sept jours avant leur désinfection. Les semences des deux adventices ont été désinfectées par trempage dans une solution d' H_2O_2 à 10% (v/v) pendant 20 min, puis rincées par un trempage de 5min dans de l'eau stérile. Cinquante semences désinfectées ont été déposées par boîtes de Petri en verre sur un papier germination stérilisé et humidifié à l'eau stérile. Les substrats inoculés sont ensuite ajoutés pour recouvrir ces semences (Figure 5, Annexe IV).

V.3. Suivi des semences et des plantules

Les boîtes de Petri ont ensuite été transférées dans des modules de germination et incubées à 20°C à l'obscurité pendant sept jours. Une humidification du substrat était appliquée par arrosage avec des seringues de 10mL jetables et de l'eau stérile après 3-4 jours d'incubation afin d'éviter le dessèchement des champignons, des semences et du substrat. Après sept jours d'incubation, le nombre de plantules émergentes a été compté dans chaque boîte de substrat afin d'obtenir leur taux d'émergence. Toutefois, si plus de deux boîtes inoculées avec un même isolat étaient contaminées (présence d'un champignon différent de celui inoculé), l'isolat n'était plus pris en compte et les cinq boîtes étaient jetées. Les boîtes saines ont été ensuite transférées dans des modules de croissance, leur couvercle ôté, et incubées à 20°C avec une photopériode de 8h jour / 16h nuit. Pour des raisons de disponibilité matérielle et d'espace, les boîtes transférées n'ont pu être incubées que cinq jours dans ces modules. Si une boîte présentait un quelconque signe de contamination, la boîte était jetée.

Après cinq jours d'incubation, le nombre de plantules était à nouveau compté dans chaque boîte pour obtenir un deuxième taux d'émergence. Les caractéristiques de la majorité des plantules des boîtes témoins ont été observées et comparées aux autres boîtes dans le but de déterminer quels critères pouvaient constituer des indicateurs pertinents pour distinguer une plantule viable d'une plantule malade ou morte. Ainsi, pour chaque boîte, le nombre de plantules viables a été compté et le taux de survie des plantules calculé en effectuant le rapport du nombre de plantules viables sur le nombre total de plantules.

VI. Analyses statistiques

Les données relatives taux d'émergence et les taux de survie ont été normalisées en effectuant une transformation angulaire [6]. Cette opération nous permet d'assurer la normalité des données, de palier aux éventuelles hétérogénéités entre les variances, et de pouvoir effectuer les analyses de comparaison en supposant l'hypothèse d'homosédasticité vérifiée. Avec le logiciel R et le package R-commander (« Rcmdr »), des tests de Student-t de comparaison de moyennes ont été effectués pour tous les isolats entre les valeurs prises 7 jours et les valeurs prises 12 jours après le dépôt des semences. Un test de Student-t a également été réalisé entre les témoins avec et sans gélose. Ensuite, pour chaque espèce adventice, une ANOVA (analysis of variance) à un facteur a été effectuée en prenant les données transformées en tant que variable, et les champignons testés en tant que facteur. Un test HSD (Honestly Significant Difference) de Tukey est également effectué afin de déterminer quels champignons présentaient des résultats d'émergence ou de survie des plantules significativement différents du témoin.

Résultats

I. Isolement des champignons et morphotypage

Seuls les champignons qui se sont développés sur le MAA ont été isolés, les champignons qui se développaient uniquement sur les semences n'ont pas été conservés (Figure 6). Ces champignons sont supposés biotrophes obligatoires, seuls deux champignons de ce type ont été trouvés chez *S. arvensis* et aucun n'a été trouvé chez *A. retroflexus*. Au total, 59 champignons ont été isolés à partir des 73 semences d'*A. retroflexus* extraites des échantillons de sol, et 85 champignons à partir des 190 semences de *S. arvensis*. Quelles que soit l'espèce adventice et les échantillons de sol, on obtient un nombre plus élevé de champignons à partir des semences non-désinfectées qu'à partir des semences désinfectées et blessées (Tableau 4).

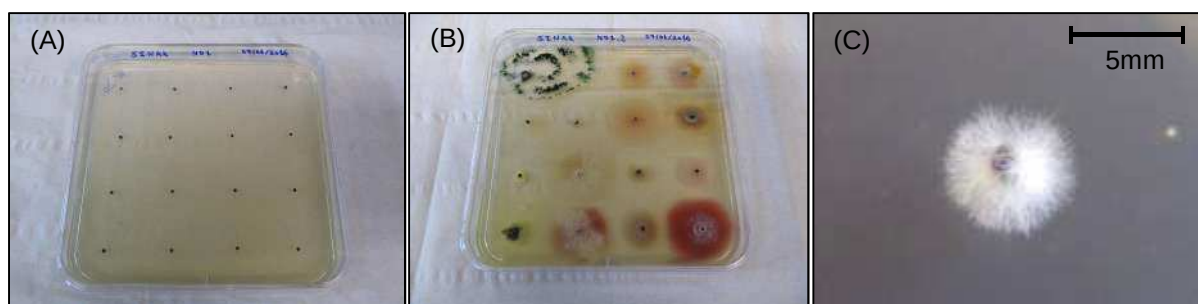


Figure 6 : Exemple d'une boîte carré de 12x12cm avec malt-acid antibiotique et des semences de *S. arvensis*, après 0 jours (A) et 7 jours (B) de développement. Exemple d'un biotrophe obligatoire sur une semence de *S. arvensis* (C). Source : Harada Liu-Ji, 07/06/2016 (A) ; 14/06/2016 (B et C)

Tableau 4 : Nombre de semences déposées et nombre de champignon obtenus chez *A. retroflexus* et *S. arvensis* en fonction de la modalité de désinfection des semences et des échantillons de sol.

Modalité de désinfection des semences		Non-désinfectées (ND)			Désinfectées et blessées (D+B)			Total
Numéro de la paire d'échantillons de sol		N°1	N°2	N°3	N°1	N°2	N°3	
A. retroflexus	Nombre de semences déposées	10	6	22	10	5	20	73
		38			35			
	Nombre de champignons isolés	9	6	19	6	3	16	59
		34			25			
S. arvensis	Nombre de semences déposées	41	51	4	40	50	4	190
		96			94			
	Nombre de champignons isolés	31	38	3	4	8	1	89
		76			13			

Lors des observations au microscope, on suppose que cinq genres ont été reconnus sur 108 champignons isolés : *Fusarium* (le plus abondant), *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Gliocladium* et *Penicillium* (Tableau 5). Le genre des 36 autres champignons n'a pas pu être déterminé, toutefois les différentes caractéristiques sur PDA et MAA se sont avérées suffisantes pour décrire leur morphotypes. De même, parmi les *Fusarium*, quelques espèces ont été distinguées mais sans certitude sur leur identification. Cependant, malgré l'absence d'identifications précises sur les genres et les espèces des champignons isolés, les critères morphologiques observés au microscope ont tout de même été pris en compte pour la

description des morphotypes pour éviter d'omettre un éventuel candidat pathogène. D'autre part, en plus du nombre de champignon isolés, la diversité des genres distingués est moins importante chez les semences désinfectées et blessées que les semences non-désinfectées (Tableau 6).

Tableau 5 : Nombre de champignons en fonction des genres distingués et de l'espèce adventice

Genres supposés	Aspergillus	Fusarium	Gliocladium	Penicillium	Trichoderma	Non-identifiés
<i>A. retroflexus</i>	0	31	1	6	2	19
<i>S. arvensis</i>	1	45	3	8	11	17
Total	1	76	4	14	13	36

Tableau 6 : Nombre de champignons en fonction des genres distingués et des modalités de désinfection des semences adventices

Genres supposés	Aspergillus	Fusarium	Gliocladium	Penicillium	Trichoderma	Non-identifiés
Semences désinfectées et blessées (D+B)	0	23	0	0	2	13
Semences non-désinfectées (ND)	1	53	4	14	11	23

Un total de 70 morphotypes a été décrit (Annexe V). 35 morphotypes concernent *A. retroflexus* et 42 *S. arvensis*, et 7 morphotypes sont présents chez les deux espèces adventices. Au final, 51 champignons ont été sélectionnés pour le test de pathogénicité sur *A. retroflexus*, et 65 sur *S. arvensis*.

II. Résultats des tests de pathogénicité sur *S. arvensis*

Les taux d'émergence des semences de *S. arvensis* incubées avec la grande majorité des champignons isolés varient de 50 à 60%, douze jours après le dépôt des semences dans les substrats (Figure 7, Tableau 7). Les écarts-types sont relativement élevés et possèdent des valeurs proches de 10 (unités de pourcentage). Quatre champignons ont été abandonnés à cause des contaminations survenues dans les boîtes de substrat pendant la période d'incubation dans le module avec photopériode. Les tests de Student-t ont montré que les taux d'émergences calculés à douze jours n'ont pas de différence significative avec calculés à sept jours (p -valeur <0.05). De plus, aucune différence significative n'a été constatée entre le témoin avec substrat seul et le témoin avec substrat et morceau de gélose (p -valeur <0.05).

L'ANOVA effectuée à partir des données obtenues à douze jours montre qu'il y a des différences significatives entre les différentes valeurs de taux d'émergence (p -valeur $<10^{-16}$). Cependant, le nombre important de champignons testés n'a pas permis de réaliser l'analyse de comparaison multiple avec le test HSD de Tukey car le package R-commander (« Rcmdr ») ne peut pas effectuer plus de 1000 comparaisons de moyennes deux-à-deux. Par conséquent, les données à douze jours ont été divisées en trois séries rassemblant chacun une vingtaine d'isolats et les deux témoins, puis le test HSD de Tukey a été effectué sur les données de chacune de ces séries (Tableau 7). Les analyses de comparaisons multiples montrent que sept champignons ont généré des taux d'émergence des plantules significativement différents des témoins (Tableau 8). Suite aux classifications réalisées à l'issue du test HSD de Tukey, on remarque également que ces champignons correspondent à ceux qui occupent les groupes les plus éloignés de ceux des témoins (Tableau 7).

Tableau 7 : Résultats du test de Tukey sur les résultats d'émergence des plantules de *S. arvensis*.
TS : Témoin avec substrat seul ; TGS : Témoin avec substrat et morceau de gélose. Les cellules de couleur foncée correspondent aux témoins et aux isolats ayant un effet significatifs

Série 1				Série 2				Série 3			
Isolat	Groupe	Moyenne (%)	Ecart-type	Isolat	Groupe	Moyenne (%)	Ecart-type	Isolat	Groupe	Moyenne (%)	Ecart-type
B2b	a	32,8	7,33	B31	a	14	4,73	N7	a	0	0
B3a	ab	40	3,16	G1b	b	29,6	8,89	V1d	b	31,6	4,8
B2c	ab	41	1,73	G1d	bc	31,6	7,74	Ro5	bc	36,8	7,22
B5c	ab	43,2	6,27	G6	cd	45,6	6,37	V1a	bd	43,2	7,44
B5b	ac	43	6,71	B25	de	47,6	4,63	V1c	bde	44,8	61,4
B2a	ac	43,3	6,8	B29	df	52,4	4,08	V1b	bde	47,2	5,15
B3c	ac	46	1,79	N2b	df	52,4	5,28	Ro4	bde	48	2,83
B10a	ac	46	5,66	G1a	df	52,4	5,43	Oc1b	bde	48,8	8,91
B9	ac	47	4,12	G1c	df	55	8,77	Oc1c	cde	48,8	9
B10b	ac	47,3	8,22	G5	df	55,2	3,71	V3a	cde	49,2	3,71
B6a	ac	47,6	3,88	G7	df	55,6	4,08	V2b	cde	50,8	4,83
B20	ac	48	7,48	B32	df	56,4	4,27	Oc1d	cdf	52	8,39
B7b	bc	50,8	3,71	B27	df	57,6	4,08	Rg4	cdf	53,5	8,87
B23	bc	51,6	4,96	N2a	df	58	5,66	Oc1e	df	54,8	5,31
B3b	bc	55,6	3,67	B30	df	58	6,07	Oc1f	df	54,8	6,76
B	bc	56,8	8,91	B33	df	58,4	4,08	V3b	df	55,6	9,41
B	bc	57,6	9,33	TS	df	58,8	7,96	TS	df	58,8	7,96
B	bc	58	5,06	N1	df	59,2	6,52	Oc1a	df	58,8	7,33
TS	bc	58,8	7,96	Be1	df	59,3	3,4	V2a	df	60,4	4,8
B21	c	61,2	14,5	N3	ef	60,8	3,25	Oc6	df	60,4	4,08
TGS	c	63	4,58	TGS	ef	63	4,58	TGS	ef	63	4,58
				B26	ef	64,7	2,49	N8	f	68	7,8
				B28	f	62,8	2,99				
				B24	f	64,4	2,65				

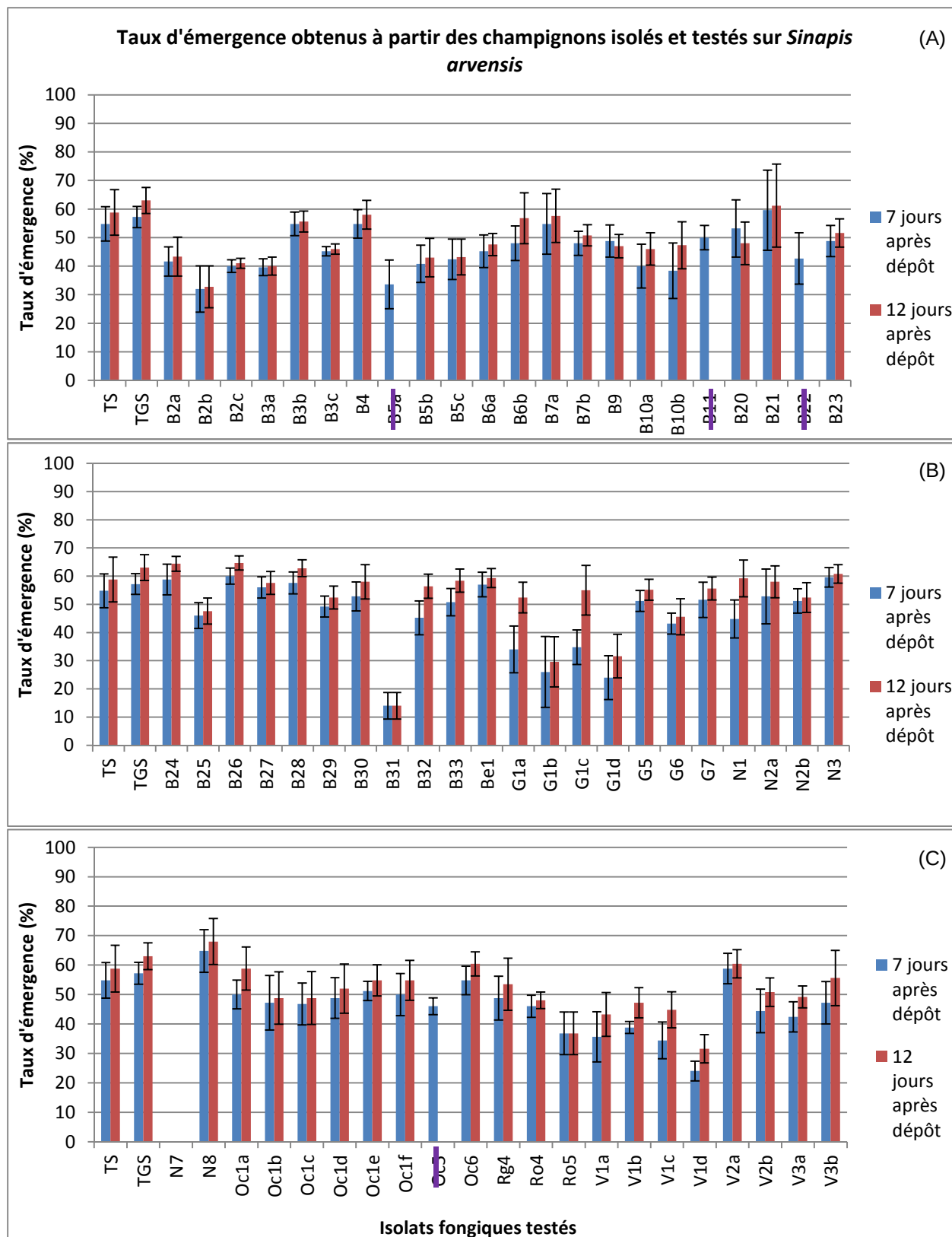


Figure 7 : Résultats graphiques des taux d'émergence obtenus à partir des isolats testés sur *S. arvensis*, 7 et 12 jours après dépôt des semences dans le substrat (A, B et C). TS : Témoin avec substrat seul ; TGS : Témoin avec substrat et morceau de gélose. Les isolats rayés correspondent à ceux qui ont été abandonnés après 12 jours. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types.

Tableau 8 : Extrait des analyses de comparaisons multiples sur R avec les témoins avec (TS) et sans gélose (TGS). Sont comparés avec les témoins (TG et TGS) les isolats fongiques ayant une différence significative (Ro5 ; B2b ; B31 ; G1b ; G1d ; N7 ; V1d) et l'isolat ayant le taux d'émergence le plus bas et qui n'a pas de différence significative avec les deux témoins (B3a).

Isolats testés	Moyenne (%)	Ecart-type	Hypothèse Ho testée	Estimate	Std. Error	t-value	Pr(> t)
TS	58,8	7,96	TS - TGS == 0	-0,04	0,053	-0,8	0,99203
TGS	63	4,58					
B3a	40	3,16	TGS - B3a == 0	0,23	0,056	4,2	0,0111 *
			TS - B3a == 0	0,19	0,053	3,6	0,0627 .
B2b	32,8	7,33	TGS - B2b == 0	0,31	0,053	5,8	< 0,001 ***
			TS - B2b == 0	0,27	0,050	5,3	< 0,001 ***
B31	14	4,73	TGS - B31 == 0	0,54	0,053	10,1	< 0,001 ***
			TS - B31 == 0	0,5	0,050	9,9	< 0,001 ***
G1b	29,6	8,89	TGS - G1b == 0	0,35	0,053	6,5	< 0,001 ***
			TS - G1b == 0	0,31	0,050	6,1	< 0,001 ***
G1d	31,6	7,74	TGS - G1d == 0	0,32	0,053	6,1	< 0,001 ***
			TS - G1d == 0	0,28	0,050	5,6	< 0,001 ***
N7	0	0	TGS - N7 == 0	0,92	0,053	17,2	< 0,001 ***
			TS - N7 == 0	0,88	0,050	17,4	< 0,001 ***
Ro5	36,8	7,22	TGS - Ro5 == 0	0,27	0,050	5,3	<0,01 ***
			TS - Ro5 == 0	0,23	0,048	4,7	<0,01 **
V1d	31,6	4,8	TGS - V1d == 0	0,32	0,053	6	< 0,001 ***
			TS - V1d == 0	0,28	0,050	5,6	< 0,001 ***

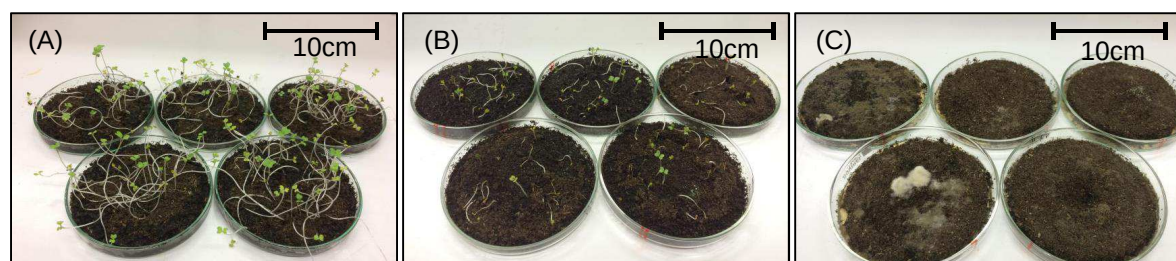
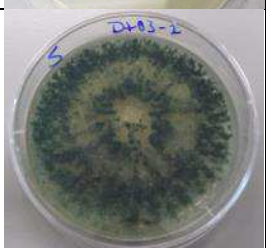


Figure 8 : Boîtes de substrat avec semences et plantules de *S. arvensis* après 12 jours d'incubation : boîtes témoins avec substrat (A), boîtes qui présentent un résultat intermédiaire (B) et les boîtes du champignon avec lequel aucune plantule n'a émergé (C). Source : Harada Liu-Ji, 30/09/2016 (A) ; 05/09/2016 (B) ; 09/09/2016 (C).

Tableau 9 : Liste des champignons candidats possédant un effet pré-émergence.

Champignons candidats	Paire d'échantillons de sol d'origine	Modalité de désinfection de la semence d'origine	Genre supposé	Pourcentage de réduction du taux d'émergence par rapport au témoin	Photographie sur PDA (Potato Dextrose Agar) Source: Harada Liu-Ji, 04/07/2016
B2b	2	Non-désinfectée	<i>Fusarium</i>	47,2	
B31	2	Non-désinfectée	<i>Fusarium</i>	77	
G1b	1	Non-désinfectée	<i>Penicillium</i>	51,5	
G1d	3	Non-désinfectée	<i>Penicillium</i>	48,2	
N7	1	Non-désinfectée	Non-identifié	100	
Ro5	2	Désinfectée et blessée	<i>Fusarium sp.</i>	39,7	
V1d	3	Désinfectée et blessée	<i>Trichoderma</i>	48,2	

Parmi les sept champignons ayant des effets négatifs significatifs sur le taux d'émergence des plantules (taux d'émergence moyen des deux témoins égal à 61%) : cinq d'entre eux sont capables de le réduire de 40% (taux d'émergence égal à $33 \pm 3,5\%$) ; un autre est capable de le réduire de 75% (taux d'émergence à 14%), puis le dernier inhibe totalement l'émergence (Figure 8C, Tableau 9). Ces champignons constituent donc des candidats qui ont des effets pré-émergence sur les semences de *S. arvensis* et qui leur sont potentiellement pathogènes. On n'observe aucune similarité entre ces champignons vis-à-vis de leur l'origine ou de leurs critères morphologiques. En effet, ces champignons proviennent tous de différentes paires d'échantillons de sol. Deux d'entre eux proviennent de semences désinfectées et blessées et les autres proviennent de semences non-désinfectées (Tableau 11). De plus, leurs genres sont presque tous différents et ils appartiennent tous à des morphotypes différents (sauf G1b et G1d) (Tableau 9).

Lors du premier comptage des plantules après les sept jours d'incubation à l'obscurité, il a été constaté que de nombreuses boîtes contenaient des plantules très étiolées, y compris celles des témoins (Figure 9A). Cependant, après le transfert dans le module avec photopériode et les cinq jours d'incubation, les plantules témoins possédaient des cotylédons verts, turgescents, et leur tige sont parvenue à se dresser à leur extrémité par phototropisme malgré leur étiolement (Figure 9B).

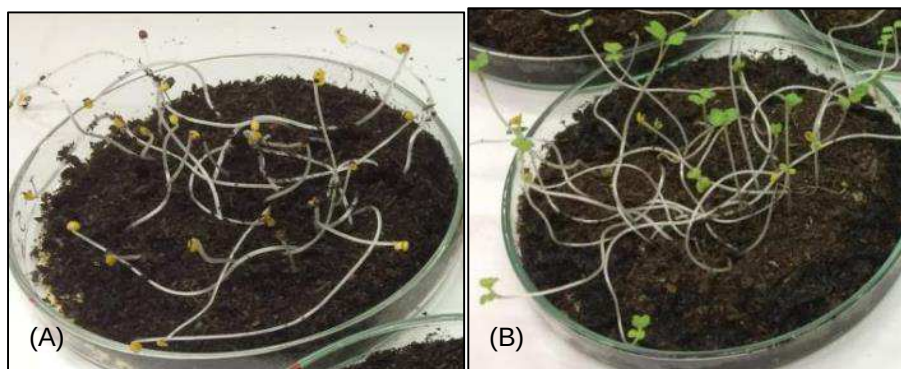


Figure 9 : Boîtes du témoin avec substrat seul après 7 jours (A) et 12 jours (B) d'incubation. Source: Harada Liu-Ji, 26/09/2016 (A) ; 30/09/2016 (B)

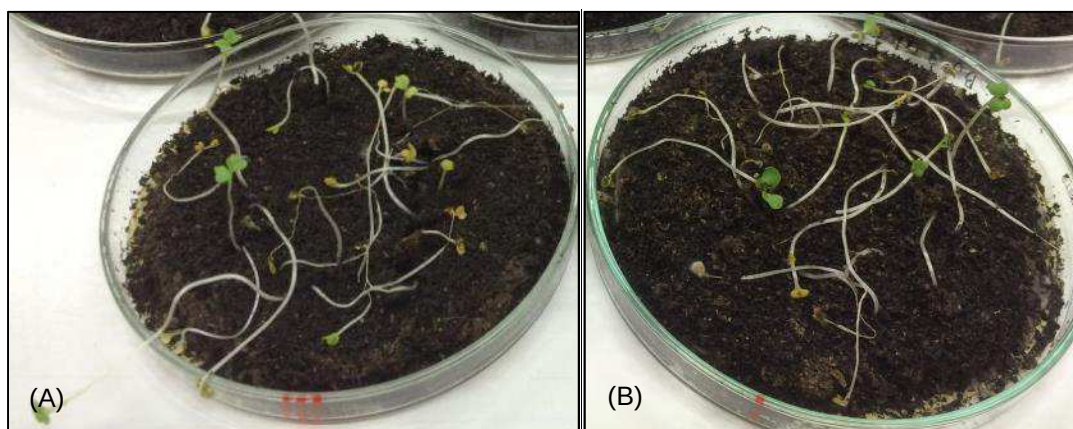


Figure 10 : Exemples de boîtes avec substrat inoculé contenant des plantules dépériées après 12 jours d'incubation (A et B). Source: Harada Liu-Ji, 06/09/2016 (A) ; 09/09/2016 (B)

Toutefois, chez 90% des champignons testés, la majorité des plantules ont tendance à dépérir après leur transfert dans le module avec photopériode (Figure 10). En effet, on observe chez ces plantules des pertes de turgescence plus ou moins importantes au niveau de la tige ainsi qu'un déploiement moins important des cotylédons. Les pertes de turgescence font incliner les plantules vers le bas, et parfois même jusqu'à les étaler entièrement sur le substrat (Figure 10). On constate ainsi que l'état de santé de ces plantules est moins bon que celui des plantules témoins après émergence sans doute parce que les conditions d'incubation n'étaient pas optimales. D'autre part, pour huit champignons testés, les plantules ont été partiellement voire entièrement colonisées par des champignons (Figure 11). Toutefois, il n'est pas certain qu'il s'agisse des champignons qui ont été inoculés.



Figure 11 : Exemples de boîtes avec substrat inoculé contenant des plantules dépériées et colonisées partiellement (A et B) ou entièrement (C) par le champignon après 12 jours d'incubation. Source: Harada Liu-Ji, 09/09/2016 (A) ; 12/09/2016 (B et C)

III. Résultats des tests de pathogénicité sur *A. retroflexus*

Aucun résultat n'a pu être exploité sur *A. retroflexus* car les plantules témoins n'ont pas émergé après les sept jours d'incubation à l'obscurité et ce, à deux reprises, aussi bien chez le témoin avec substrat et morceau de gélose que le témoin avec substrat sans morceau de gélose. Contrairement aux tests effectués en amont, les plantules témoins commençaient à émerger trois jours après le transfert des boîtes dans le module avec photopériode. Par conséquent, aucun champignon candidat à effet pré ou post-émergence n'a pu être détecté.

Discussion

I. Choix des parcelles

En général, la recherche de microorganismes pathogènes aux adventices est effectuée sur des sols suppressifs, c'est-à-dire des sols sur lesquels peu d'adventices sont présentes. Cependant, pour les microorganismes pathogènes aux semences adventices, le choix du lieu d'échantillonnage s'avère beaucoup plus délicat dans la mesure où il est difficile d'orienter ce choix en se fiant uniquement aux relevés floristiques. De plus, la flore adventice située en surface ne reflète pas le contenu du stock semencier et réciproquement. Une autre possibilité plus directe consiste à étudier le contenu du stock semencier afin d'y trouver directement les semences adventices, mais le choix des lieux de prospection reste délicat car rien ne permet véritablement de l'orienter. Meyer et al. (2014) se sont surtout fiés aux plantes symptomatiques trouvées au sein des prairies qu'ils ont étudiés pour s'intéresser au stock semencier. Dans notre cas, nous nous sommes principalement basés sur l'abondance des espèces adventices présentes dans le stock semencier d'une dizaine de parcelles pour sélectionner celles qui allaient faire l'objet de notre étude (Annexe I). Le choix des dix parcelles était aléatoire, seule leur superficie devait être comprise entre 1 et 3 hectares afin d'estimer le contenu de leur stock semencier avec un nombre suffisant d'échantillons de sol.

Nous avons fait le choix de ne pas prospector sur des jachères ou des sols non-agronomique même s'ils pouvaient représenter un intérêt pour notre étude. En effet, ces sols ont la particularité d'être délaissés et représentent des zones propices à l'établissement des adventices. Ils sont donc susceptibles d'avoir une très grande abondance en semences adventices, ce qui maximise les chances d'isoler des microorganismes pathogènes à ces semences (Wagner et Mitschunas, 2008). Or, sur les parcelles, les interventions anthropiques exercent des pressions de sélection sur l'établissement et la persistance des espèces adventices, aussi bien les interventions mécaniques (labour et déchaumage) que les interventions chimiques (traitements phytosanitaires). De plus, il a été remarqué à de nombreuses reprises la forte influence des pratiques culturales sur la composition du microbiote des adventices et le microbiote tellurique (Boyetchko, 1996 ; Davis et al., 2006 ; Ullrich et al., 2011 ; Lou et al., 2015 ; Nichols et al., 2015 ; Verdú et Mas, 2015 ; Smith et al., 2016). Les pressions exercées par les interventions anthropiques permettent en quelque sorte de sélectionner les biotypes les plus résistants parmi les espèces adventices et leurs microorganismes associés, ce qui est beaucoup moins le cas dans les jachères et les sols non-agronomiques. Prospector dans des parcelles nous donne ainsi plus de chance de trouver des semences adventices qui ont persisté malgré les méthodes de lutte employées et ce, au détriment de leur abondance. Par conséquent, on est également susceptible d'obtenir des microorganismes qui sont pathogènes à ces semences adventices résistantes. De plus, ces microorganismes sont eux-mêmes issus des pressions de sélection générées par les interventions anthropiques (notamment vis-à-vis les traitements biocides appliqués sur le sol) (Meyer et Cookson, 2010), ce qui leur confère d'autres caractéristiques intéressantes en plus de leur action pathogène. Ainsi, travailler à partir de parcelles agricole favorise l'obtention de microorganismes telluriques pathogènes à des semences adventices résistantes et qui sont eux-mêmes résistants aux interventions anthropiques, mais au détriment de l'abondance en semences et en microorganismes pathogènes.

A l'inverse, nous avons fait le choix de ne pas chercher des microorganismes dans des sols sur lesquels une espèce adventice donnée n'a pas pu s'installer, c'est-à-dire là où aucune semence ou plante de cette espèce n'a été trouvée ou recensée (Kremer, 1993). L'absence d'une espèce adventice dans les relevés floristiques ou les échantillons de sol d'une parcelle donnée ne garantit pas forcément que les semences de l'adventice en question aient été présentes dans les sols de cette zone et ce, même si l'adventice est présente dans les parcelles avoisinantes. Toutefois, il est possible que les semences adventices d'une espèce donnée aient été disséminées sur ces sols et que les microorganismes contenus dans ces sols les aient dégradés, ce qui expliquerait leur absence. De plus, l'extraction des semences adventices dans les échantillons de sol tamisés nous a permis de voir que ces échantillons contenaient parfois des débris de téguments de semences, mais pas ou très peu de semences entières. Il aurait ainsi été possible de sélectionner les espèces adventices et les parcelles en se fiant à la fois aux relevés floristiques et aux parcelles contenant des débris de semences adventices. Isoler des microorganismes à partir de ces sols aurait donc pu constituer une piste intéressante, mais cela aurait nécessité plus de temps et un nombre d'échantillons de sol plus important pour vérifier que la présence de ces débris de semences n'était pas due à un effet localisé. Il nous paraissait donc plus pertinent de travailler à partir des semences adventices intactes car elles constituent le matériau de départ pour s'intéresser aux microorganismes qui leur sont pathogènes.

Les parcelles P1 et P2 contenaient toutes les deux du blé lorsque l'échantillonnage a eu lieu. Les cultures contenues dans ces parcelles sont céréalières depuis (au moins) 2013, avec de l'orge ou du blé. De plus, les interventions effectuées sur ces deux parcelles au cours des années 2013 et 2014 comportent entre autres des traitements herbicides et fongicides susceptible de contribuer à la pression de sélection mentionnée ci-dessus. De plus, les relevés floristiques de 2013 et 2014 confirment bien la présence de *S. arvensis* sur la parcelle P2, mais aucune présence d'*A. retroflexus* sur la parcelle P1. N'ayant pas eu accès aux relevés de 2015, il est possible qu'*A. retroflexus* se soit implantée récemment sur P1 ou que son stock semencier n'ait pas germé depuis 2013. Les deux espèces adventices sont en effet capables de produire en abondance des semences persistantes [7] [8], et il ne serait donc pas surprenant que les semences d'*A. retroflexus* qui ont été extraites des échantillons de sol aient été produites par des plantes qui ont émergé avant 2013.

II. Isolement et morphotypage

Le milieu de culture utilisé pour l'isolement des champignons était du malt-acid antibiotique (MAA) qui a la particularité de favoriser le développement des champignons et de prévenir celui des bactéries grâce à la présence d'antibiotiques. Cependant, l'ajout de PCNB dans le MAA s'est avéré nécessaire car les tests sur des semences non-désinfectées ont montré d'importants développements de mucorales. En effet, ces champignons risquaient d'empêcher ou de limiter le développement de nombreux autres champignons en raison de leur aptitude à coloniser très rapidement les milieux de culture et en outre, ils représentent une source de contamination importante. Nous avons pu constater que l'ajout de PCNB s'est montré efficace pour empêcher le développement des mucorales, toutefois les propriétés fongicides de ce produit ont probablement empêché le développement d'autres champignons potentiellement pathogènes (Bauske et Kirby, 1992).

Lors de l'isolement des champignons endophytes, le choix des produits de désinfection a été effectué parmi ceux cités dans la littérature (Oyebanji et al., 2009 ; Barampuran et al., 2014), mais également en fonction des caractéristiques des semences adventices. L'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 2%(v/v) semblait approprié pour les semences d'*A. retroflexus* dans la mesure où ce produit est couramment utilisé pour les désinfection en surface des matériaux végétaux, mais aussi parce que le tégument de l'amarante est lisse et peu susceptible de contenir des foyers dans lesquels peuvent se réfugier les microorganismes. En revanche, le tégument des semences de *S. arvensis* est beaucoup plus rugueux, s'est pourquoi le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 10%(v/v) a été utilisé pour s'assurer qu'un maximum de microorganismes soit éliminé de la surface des semences. Les résultats de l'isolement ont montré que moins de champignons supposés endophytes ont été isolés à partir des semences adventices désinfectées et blessées. Cependant, le ratio du nombre de champignons supposés endophytes sur le nombre de semences désinfectées est nettement plus important chez *A. retroflexus* que chez *S. arvensis* (Tableau 4). Ceci suggère que NaOCl n'est probablement pas aussi efficace que H₂O₂, et qu'un autre test avec H₂O₂ sur les semences d'*A. retroflexus* pourrait le confirmer. C'est ce constat qui nous a poussés à utiliser H₂O₂ à 10%(v/v) pour la désinfection des semences issues de collection utilisées lors du test de pathogénicité.

Lors de l'observation des boîtes de 12x12cm, les semences déposées ayant permis le développement de champignons ne possédaient qu'un seul champignon par semence (Figure 6B et 12A), ou très rarement deux. Cependant, des contaminations ont empêché l'isolement d'un certain nombre d'entre eux (Figure 12B). L'origine exacte de ces contaminations reste inconnue, mais le champignon impliqué appartient au genre *Trichoderma*. Ce genre de champignon est couramment présent les intérieurs de bâtiment, aussi bien dans l'air qu'à la surface des objets (Sousa et al., 2014). Sur les milieux de culture, les *Trichoderma sp.* sont également capables de se développer et de sporuler aussi rapidement que les mucorales. Même si certains *Trichoderma* faisaient partie des champignons qui ont été isolés à partir des semences adventices, ceux qui étaient à l'origine de contaminations n'ont pas été isolés. Ces derniers étaient facilement reconnaissables dans la mesure où leur foyer d'apparition ne provenait pas des semences déposées (Figure 12B). Les contaminations ont toutes été constatées dans les boîtes contenant des semences de *S. arvensis*, et les champignons qui n'ont pas pu être isolés étaient très peu nombreux mais il est possible que des candidats pathogènes se trouvaient parmi eux.

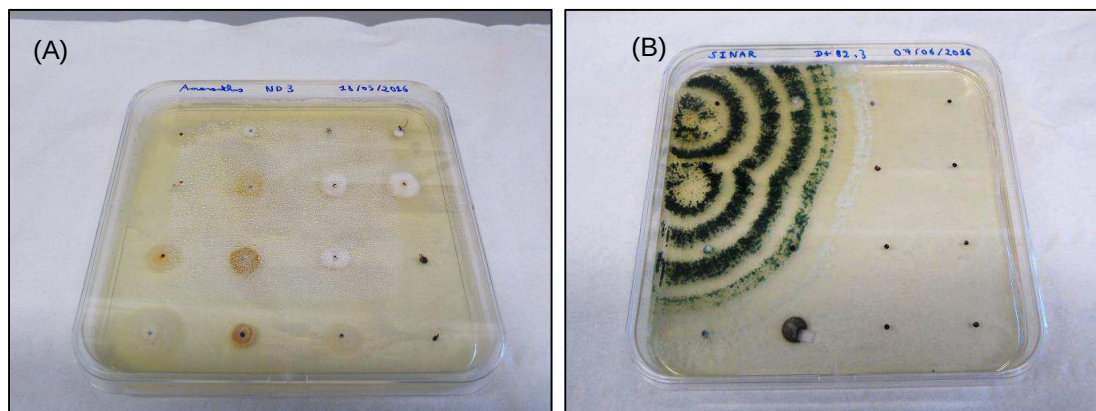


Figure 12 : Exemple d'une boîte de 12x12cm sans contaminations (A) et avec contaminations (B) après 7 jours de développement. Source : Harada Liu-Ji, 27/05/2016 (A) ; 22/06/2016 (B)

A l'origine, la classification par morphotypes avait pour but d'éviter de tester la totalité des champignons isolés pour des raisons de faisabilité. Cette classification nous a permis de nous rendre compte de la diversité des champignons obtenus rien qu'en se basant sur leurs critères morphologiques observés sur MAA et sur PDA à l'œil nu et au microscope optique, soit 70 morphotypes à partir des 144 champignons (Annexe V). Les observations au microscope optique ont également contribué à distinguer quelques genres de champignons qui font partie de ceux qui sont couramment rencontrés dans le sol : *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Gliocladium* et *Penicillium*. Cependant, cette classification n'avait pas pour but d'identifier les différents champignons isolés mais juste de les distinguer afin de sélectionner ceux qui allaient faire partie du test de pathogénicité. Il est donc tout à fait possible que des champignons potentiellement pathogènes aient été mis à l'écart à l'issue de cette sélection.

III. Test de pathogénicité

Un substrat a été choisi comme support du test de pathogénicité et comme support d'inoculation (Chee-Sanford, 2008 ; Müller-Stöver et al., 2009 ; Franke et al., 2014 ; et Meyer et al., 2014). Notre objectif n'était pas de savoir si les semences adventices pouvaient constituer une ressource nutritive pour les champignons isolés (Chee-Sanford, 2008). Nous avons donc testé les champignons sur les semences adventices dans une situation avec des conditions semblables à celles d'un sol. Suite à quelques tests, un terreau a été choisi principalement pour sa porosité et ses propriétés hydriques. L'usage du terreau nous a assuré que les champignons inoculés disposaient d'une source de carbone et de nutriments alternatives aux semences adventices. De plus, la stérilisation préalable du substrat, de l'eau d'arrosage et des semences adventices ont également permis de nous assurer que le champignon inoculé était le seul microorganisme fongique présent dans le terreau. La durée d'incubation dans les modules de germination à l'obscurité a été fixée à sept jours, durée sélectionnée en fonction des tests réalisés sur les lots de semences issues de collection. Pour des raisons de timing, cette durée était la même pour *A. retroflexus* et *S. arvensis*, elle correspond aux premières émergences des plantules d'*A. retroflexus* et aux deux jours qui suivent les premières émergences de *S. arvensis*. Une photopériode et une ouverture des boîtes de Petri étaient donc nécessaires pour maintenir les plantules en vie. Cependant, les contraintes dues aux disponibilités matérielles ne nous ont pas permis de conserver les plantules au-delà de cinq jours dans les modules avec photopériode. C'est pourquoi les observations finales ont été réalisées douze jours après le dépôt des semences dans les substrats.

Notre étude fait du screening. Ici, seuls les effets pré/post-émergences suffisent à sélectionner les champignons susceptibles d'avoir une action pathogène. Lorsqu'un champignon exerce une action pathogène sur des semences adventices, les effets pré-émergence peuvent se manifester par une dégradation partielle ou totale de ces semences, une action anti-germination temporaire ou permanente, ou une réduction de la vigueur des semences (Harman, 1983 ; Halloin, 1986). Afin de simplifier la caractérisation des effets pré-émergence, nous nous sommes basés sur les valeurs des taux d'émergence des plantules relevés après sept jours et douze jours d'incubation. La comparaison entre les valeurs prises à sept et douze jours permet de déceler les effets pré-émergence qui ralentissent ou inhibent temporairement l'émergence des plantules (Mothlag, 2011(a)), et la comparaison avec les valeurs des témoins permet de déceler les effets pré-émergence qui inhibent l'émergence des plantules. Quant aux effets post-émergences, ils se manifestent par des fontes de semis ou des symptômes sur les plantes développées, mais cet effet ne serait valable que pour les

champignons endophytes responsables d'infections systémiques transmissibles par les semences (Harman, 1983 ; Halloin, 1986 ; Wagner et Mitschunas, 2008). Etant donné que notre durée d'incubation était limitée à douze jours, l'observation des effets post-émergence ne pouvait qu'être basée sur une comparaison à l'œil nu entre les plantules témoins et celles des boîtes avec substrat inoculé.

Des contaminations sont survenues dans les boîtes de Petri lors de l'incubation dans le module avec photopériode (Figure 13A). Au total, quatre champignons n'ont pas pu être étudiés avec *S. arvensis*. En comparant le contenu des boîtes contaminées et celles contenant les inocula de *Trichoderma*, nous avons pu constater quelques similarités : des pustules de couleur verte abondantes et visibles à la surface du substrat (Figure 13B). Ces contaminations ont probablement une origine exogène et ont dû être favorisées par l'ouverture des boîtes lors de l'incubation avec photopériode.

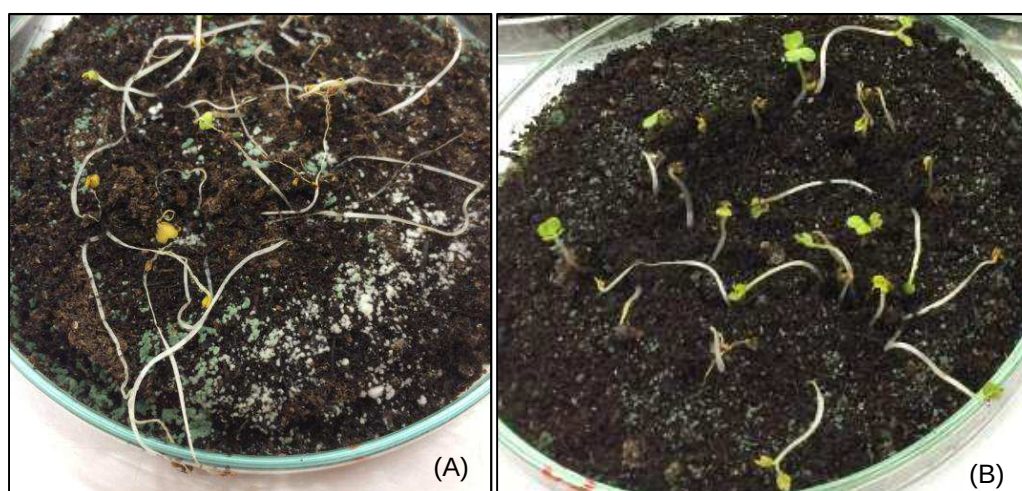


Figure 13 : Exemple d'une boîte de substrat contaminée (A) et d'une boîte de substrat inoculé avec un *Trichoderma* (B) après 12 jours d'incubation. Source : Harada Liu-Ji, 09/09/2016 (A) ; 05/09/2016 (B)

Chez *S. arvensis*, l'absence de différences significatives entre les taux d'émergences relevés à sept jours et à douze jours montre qu'il n'y a aucun effet qui retarde l'émergence des plantules. En revanche, l'analyse des données relevées à douze jours ont montré que sept champignons ont des effets significatifs qui réduisent le taux d'émergence. Il serait donc intéressant d'étudier les mécanismes d'action impliqués derrière ces effets, d'autant plus que l'un de ces champignons a entièrement inhibé l'émergence des plantules (Tableau 9). L'observation des semences à la loupe binoculaire et/ou au microscope à balayage permettent de déterminer si ces champignons ont une action parasite ou non (Franke et al., 2014). D'autre part, ces sept champignons appartiennent presque tous à des genres et des morphotypes différents. Toutefois, si le caractère pathogène et le rôle bioherbicide de ces champignons sont avérés lors de validation de leur activités par de nouveaux tests, leur identification précise deviendra nécessaire. Cette identification pourra être réalisée à l'aide d'outils moléculaires ciblant par exemple le séquençage de la région ribosomique ITS (Internal Transcribed Spacer) qui correspond au code barre de la plupart des espèces fongiques (Schoch et al., 2012).

Initialement, le protocole prévoyait de calculer le taux de survie des plantules en se fiant aux caractéristiques de ces plantules témoins. Compte tenu du nombre élevé de champignons pour lesquels les plantules sont en mauvais état de santé après émergence, il y avait de fortes chances que ces champignons ne soient pas les seuls responsables de ces

effets. Malgré ces observations, le taux de survie a tout de même été calculé (Annexe VI). Comme on s'y attendait, les taux de survie des plantules en substrat inoculé sont plus faibles que chez les témoins et ce, pour la majorité des champignons testés. Le dépérissement global des plantules peut donc difficilement être associé à un caractère pathogène spécifique des champignons inoculés mais plutôt à un caractère non spécifique lié à l'absence de contrôle biologique des champignons, inoculés seuls dans le substrat. En effet, l'inoculum a colonisé le substrat sans être naturellement régulé par le reste de la microflore tellurique et son développement peut avoir un effet délétère sur celui des plantules. C'est pourquoi aucune analyse statistique n'a été réalisée en raison du manque de pertinence des taux de survie, et aucun champignon candidat à effet post-levé n'a été retenu.

De plus, le développement saprophytes surexprimé par les champignons inoculés dans le terreau désinfecté est encore plus marqué pour huit des champignons testés. Ces derniers ont en effet partiellement voire entièrement colonisé les plantules présentes dans les boîtes. Il peut s'agir de saprophytes opportunistes qui ont profité du dépérissement des plantules pour les coloniser. Il n'est pas non plus exclu qu'il s'agisse de contaminations externes autres qu'un *Trichoderma*.

Conclusion

Notre étude s'est basée sur le peu d'études réalisées sur les champignons pathogènes aux semences adventices. Les expérimentations nous ont toutefois permis d'isoler un grand nombre de champignons telluriques originaires de la spermosphère, et un nombre plus faible de champignons endophytes. Pour chacune des deux espèces adventices, ces champignons ont été obtenus à partir des semences contenues dans seulement six échantillons de sol. L'étape d'isolement des champignons a révélé une importante diversité traduite par les 70 morphotypes décrits à partir des 144 champignons isolés. Bien qu'elle ne reflète qu'une partie du microbiote fongique associé aux semences adventices, la diversité rencontrée a pu être conservée malgré les aspects sélectifs des manipulations (tamisage humide, utilisation de PCNB). De plus, les tests de pathogénicité de ces champignons ont abouti à des résultats et des observations intéressantes pour *S. arvensis*, mais les tests effectués sur *A. retroflexus* n'ont pas donné de résultats exploitables. La méthodologie qui a été appliquée à notre étude pourra donc contribuer à la recherche de champignons pathogènes aux semences d'autres espèces adventices mais, comme avec *A. retroflexus*, une approche et des moyens techniques différents adaptés à l'adventice ciblée seront probablement nécessaires afin d'obtenir des résultats exploitables.

L'analyse des résultats de *S. arvensis* a permis de distinguer sept champignons à effets pré-émergence capables de réduire le taux d'émergence des plantules de 40 à 100%. Ce résultat s'avère prometteur dans la mesure où 65 champignons ont été testés, ce qui signifie que presque un champignon sur neuf a montré des effets significatifs sur le taux d'émergence des plantules de *S. arvensis*. De plus, les champignons testés avaient été sélectionnés parmi les 89 isolés à partir des semences extraites des échantillons de sol. La sélection était basée sur les différents morphotypes observés parmi ces champignons et il est donc possible que des champignons potentiellement pathogènes aient été mis à l'écart par inadvertance. Il faut cependant relativiser ces résultats dans la mesure où le caractère pathogène de ces sept candidats doit être validé par de nouveaux tests qui permettront de sélectionner le ou les vrais champignons dont l'activité bioherbicide est valorisable pour le contrôle du stock semencier. Parmi ces tests, la caractérisation des mécanismes d'infection sur les semences, l'identification de leur spectre d'hôtes et de leurs conditions optimales d'action comptent parmi les pistes de recherches pouvant contribuer à l'élaboration d'un éventuel produit bioherbicide.

Aujourd'hui, de plus en plus d'études s'intéressent à la recherche d'agents de biocontrôle contre les semences adventices. Ces derniers fournissent des moyens de lutte alternatifs aux luttres mécaniques et chimiques qui sont couramment employées. Notre étude s'est focalisée sur les champignons ayant des effets pré et post-émergence sur les semences d'*A. retroflexus* et *S. arvensis*. Même si les résultats n'ont été exploitables que sur *S. arvensis*, ils soulignent bien l'intérêt des champignons telluriques associés aux semences pour la recherche de candidats pathogènes du stock semencier. Le sol est un réservoir dans lequel siège une vaste diversité de microorganismes. Tester différentes méthodes de screening ne peut donc que contribuer à l'amélioration des techniques de recherche de candidats pathogènes.

Bibliographie

- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S. T., Weigel, D., & Kemen, E. M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS Biol*, 14(1), e1002352.
- Ahmed, N. E., Sugimoto, Y., Babiker, A. G. T., Mohamed, O. E., Ma, Y., Inanaga, S., & Nakajima, H. (2001). Effects of *Fusarium solani* isolates and metabolites on *Striga* germination. *Weed Science*, 49(3), 354-358.
- Amri, I., Hanana, M., Gargouri, S., Jamoussi, B., & Hamrouni, L. (2013). Comparative study of two coniferous species (*Pinus pinaster* Aiton and *Cupressus sempervirens* L. var. *dupreziana* [A. Camus] Silba) essential oils: chemical composition and biological activity. *Chilean journal of agricultural research*, 73(3), 259-266.
- Aubert, C et Glachant, C. Caractéristiques biologiques des adventices-Les connaître pour mieux les gérer. Chambre d'agriculture de Seine-et-Marne : ITAB, 2009. 23p.
- Aybeke, M., Şen, B., & Ökten, S. (2014). *Aspergillus alliaceus*, a new potential biological control of the root parasitic weed *Orobanche*. *Journal of basic microbiology*, 54(S1).
- Barampuram, S., Allen, G., & Krasnyanski, S. (2014). Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 179-185.
- Banowetz, G. M., Azevedo, M. D., Armstrong, D. J., Halgren, A. B., & Mills, D. I. (2008). Germination-Arrest Factor (GAF): Biological properties of a novel, naturally-occurring herbicide produced by selected isolates of rhizosphere bacteria. *Biological Control*, 46(3), 380-390.
- Baughman, O. W., & Meyer, S. E. (2013). Is *Pyrenophora semeniperda* the cause of downy brome (*Bromus tectorum*) die-offs?. *Invasive Plant Science and Management*, 6(1), 105-111.
- Bauske, E. M., & Kirby, H. W. (1992). Effects of dinitroaniline herbicides, carboxin-pentachloronitrobenzene seed treatment, and rhizoctonia disease on soybean. *Plant disease*, 76(3), 236-239.
- Benvenuti, S. (2007). Weed seed movement and dispersal strategies in the agricultural environment. *Weed Biology and Management*, 7(3), 141-157.
- Berner, D., Cavin, C., Woudenberg, J. H., Tunali, B., Büyük, O., & Kansu, B. (2015). Assessment of *Boeremia exigua* var. *rhapontica*, as a biological control agent of Russian knapweed (*Rhaponticum repens*). *Biological Control*, 81, 65-75.
- Blaney, C. S., & Kotanen, P. M. (2001). Effects of fungal pathogens on seeds of native and exotic plants: a test using congeneric pairs. *Journal of Applied Ecology*, 38(5), 1104-1113.
- Boari, A., Vurro, M., Abouzeid, M. A., Zonno, M. C., & Evidente, A. (2003). Microbes and microbial products for biological control of parasitic weeds. In *VI International Bioherbicide Group Workshop. Canberra, Australia: International Bioherbicide Group* (p. 6).
- Bohan, D. A., Boursault, A., Brooks, D. R., & Petit, S. (2011). National-scale regulation of the weed seedbank by carabid predators. *Journal of Applied Ecology*, 48(4), 888-898.

- Boyetchko, S. M. (1996). Impact of soil microorganisms on weed biology and ecology. *Phytoprotection*, 77(1), 41-56.
- Charudattan, R. (2001). Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *BioControl*, 46(2), 229-260.
- Chee-Sanford, J. C., Williams, M. M., Davis, A. S., & Sims, G. K. (2006). Do microorganisms influence seed-bank dynamics?. *Weed Science*, 54(3), 575-587.
- Chee-Sanford, J. C. (2008). Weed seeds as nutritional resources for soil Ascomycota and characterization of specific associations between plant and fungal species. *Biology and Fertility of Soils*, 44(5), 763-771.
- Cimmino, A., Andolfi, A., Abouzeid, M., & Evidente, A. (2013). Polyphenols as fungal phytotoxins, seed germination stimulants and phytoalexins. *Phytochemistry reviews*, 12(4), 653-672.
- Cripps, M. G., Edwards, G. R., Waipara, N. W., Bourdôt, G. W., Saville, D. J., & Fowler, S. V. (2009). Does transmission of the rust pathogen, *Puccinia punctiformis*, require stem mining vectors?. *Biocontrol Science and technology*, 19(4), 447-454.
- Cristofaro, M., Lecce, F., Paolini, A., Zonno, M., Boari, A., & Vurro, M. (2011). The use of *Ascochyta caulina* phytotoxins for the control of common ragweed. In *Proc. XIII Symp* (Vol. 42, No. 4).
- Dalling, J. W., Davis, A. S., Schutte, B. J., & Elizabeth Arnold, A. (2011). Seed survival in soil: interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *Journal of Ecology*, 99(1), 89-95.
- Davis, A. S., Anderson, K. I., Hallett, S. G., & Renner, K. A. (2006). Weed seed mortality in soils with contrasting agricultural management histories. *Weed Science*, 54(2), 291-297.
- Evans, H. C. (2013). 6 Biological Control of Weeds with Fungi. In *Agricultural Applications* (pp. 145-172). Springer Berlin Heidelberg.
- Evidente, A., Capasso, R., Cutignano, A., Taglialatela-Scafati, O., Vurro, M., Zonno, M. C., & Motta, A. (1998). Ascaulitoxin, a phytotoxic bis-amino acid N-glucoside from *Ascochyta caulina*. *Phytochemistry*, 48(7), 1131-1137.
- Ferrell, J., Charudattan, R., Elliott, M., & Hiebert, E. (2008). Effects of selected herbicides on the efficacy of Tobacco mild green mosaic virus to control tropical soda apple (*Solanum viarum*). *Weed science*, 56(1), 128-132.
- Franke, J., Geary, B., & Meyer, S. E. (2014). Identification of the Infection Route of a *Fusarium* Seed Pathogen into Nondormant *Bromus tectorum* Seeds. *Phytopathology*, 104(12), 1306-1313.
- Ganley, R. J., & Newcombe, G. (2006). Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research*, 110(3), 318-327.
- Ghnaya, A. B., Hanana, M., Amri, I., Balti, H., Gargouri, S., Jamoussi, B., & Hamrouni, L. (2013). Chemical composition of *Eucalyptus erythrocorys* essential oils and evaluation of their herbicidal and antifungal activities. *Journal of pest science*, 86(3), 571-577.

- Ghorbani, R., Seel, W., Litterick, A., & Leifert, C. (2000). Evaluation of *Alternaria alternata* for biological control of *Amaranthus retroflexus*. *Weed Science*, 48(4), 474-480.
- Gressel, J. (2009). Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest management science*, 65(11), 1164-1173.
- Halloin, J. M. (1986). Microorganisms and seed deterioration. *Physiology of seed deterioration*, (physiologyofsee), 89-99.
- Harding, D. P., & Raizada, M. N. (2015). Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Frontiers in plant science*, 6.
- Harman, G. E. (1983). Mechanisms of seed infection and pathogenesis. *Phytopathology*.
- Imbert, E. (2002). Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 5(1), 13-36.
- Ismael, J. H. (2010). Isolation and identification of some fungi from certain solanaceous seeds in Sulaimania and Germian regions and their exudate effects on germination rate. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(4), 615-619.
- Kazinczi, G., Lukács, D., Takacs, A., Horvath, J., Gaborjanyi, R., Nadasy, M., & Nádas, E. (2006). Biological decline of *Solanum nigrum* due to virus infections. *Zeitschrift für pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz*, 20, 325.
- Kremer, R. J. (1993). Management of weed seed banks with microorganisms. *Ecological Applications*, 3(1), 42-52.
- Kremer, R. J. (1998). Microbial interactions with weed seeds and seedlings and its potential for weed management. *Integrated Weed and Soil Management*, 161-179.
- Labrada, R., Moran, V. C., & Hoffman, J. H. (1996, January). The importance of biological control for the reduction of the incidence of major weeds in developing countries. In *Proceedings of the IX International Symposium on Biological Control of Weeds* (pp. 287-290).
- Lawrie, J., Agallou, E., Greaves, M. P., & Down, V. M. (2001). Efficacy of *Trematophoma lignicola* Petrak as a Biological Control Agent for *Amaranthus retroflexus* L. *Biocontrol Science and Technology*, 11(5), 583-595.
- Lou, Y., Davis, A. S., & Yannarell, A. C. (2016). Interactions between allelochemicals and the microbial community affect weed suppression following cover crop residue incorporation into soil. *Plant and Soil*, 399(1-2), 357-371.
- McGregor, M. A., Bayne, D. R., Steeger, J. G., Webber, E. C., & Reutebuch, E. (1996). The potential for biological control of water primrose (*Ludwigia grandiflora*) by the water primrose flea beetle (*Lysathia ludoviciana*) in the southeastern United States. *Journal of Aquatic Plant Management*, 34, 74-75.
- Meyer, B., & Cookson, B. (2010). Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control?. *Journal of Hospital Infection*, 76(3), 200-205.
- Meyer, S. E., Franke, J. L., Baughman, O. W., Beckstead, J., & Geary, B. (2014). Does *Fusarium*-caused seed mortality contribute to *Bromus tectorum* stand failure in the Great Basin?. *Weed Research*, 54(5), 511-519.

Mintz, A. S., Heiny, D. K., & Weidemann, G. J. (1992). Factors influencing the biocontrol of tumble pigweed (*Amaranthus albus*) with *Aposphaeria amaranthi*. *Plant Disease*, 76(3), 267-269.

Mohler, C. L., Dykeman, C., Nelson, E. B., & Ditommaso, A. (2012). Reduction in weed seedling emergence by pathogens following the incorporation of green crop residue. *Weed research*, 52(5), 467-477.

Moran, P. J., & Showler, A. T. (2007). *Phomopsis amaranthicola* and *Microsphaeropsis amaranthi* symptoms on *Amaranthus* spp. under South Texas conditions. *Plant disease*, 91(12), 1638-1646.

Motlagh, M. R. S. (2011 (a)). Evaluation of *Epicoccum purpurascens* as biological control agent of *Echinochloa* spp. in rice fields. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(1), 394-397.

Motlagh, M. R. S. (2011 (b)). Evaluation of *Curvularia lunata* as an biological control agent in major weeds of rice paddies. *Life Science Journal*, 8(2), 81-91.

Müller-Schärer, H., Scheepens, P. C., & Greaves, M. P. (2000). Biological control of weeds in European crops: recent achievements and future work. *Weed research*, 40(1), 83-98.

Müller-Stöver, D., Kohlschmid, E., & Sauerborn, J. (2009). A novel strain of *Fusarium oxysporum* from Germany and its potential for biocontrol of *Orobancha ramosa*. *Weed research*, 49(2), 175-182.

Müller-Stöver, D., Nybroe, O., Baraibar, B., Loddo, D., Eizenberg, H., French, K., Sønderskov, M., Neve, P., Peltzer, D. A., Maczey, N., & Christensen, S. (2016). Contribution of the seed microbiome to weed management. *Weed Research*, 56(5), 335-339.

Nichols, V., Verhulst, N., Cox, R., & Govaerts, B. (2015). Weed dynamics and conservation agriculture principles: A review. *Field Crops Research*, 183, 56-68.

Osdaghi, E., Taghavi, S. M., Fazliarab, A., Elahifard, E., & Lamichhane, J. R. (2015). Characterization, geographic distribution and host range of *Curtobacterium flaccumfaciens*: An emerging bacterial pathogen in Iran. *Crop Protection*, 78, 185-192.

Oyebanji, O. B., Nweke, O., Odebunmi, O., Galadima, N. B., Idris, M. S., Nnodi, U. N., Afolabi, A. S., & Ogbadu, G. H. (2009). Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology*, 8(20).

Popay, I., & Field, R. (1996). Grazing animals as weed control agents. *Weed Technology*, 217-231.

Qasem, J. R., & Foy, C. L. (2001). Weed allelopathy, its ecological impacts and future prospects: a review. *Journal of crop production*, 4(2), 43-119.

Roskopf, E. N. (1997). Evaluation of *Phomopsis amaranthicola* sp. nov. as a biological control agent for *Amaranthus* spp

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & Miller, A. N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal

DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.

Smith, R. G., Atwood, L. W., Morris, M. B., Mortensen, D. A., & Koide, R. T. (2016). Evidence for indirect effects of pesticide seed treatments on weed seed banks in maize and soybean. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 216, 269-273.

Spring, O., Haas, K., Lamla, I., Thurnhofer, S., & Vetter, W. (2005). The composition and taxonomic significance of fatty acid patterns in three white rust species: *Albugo amaranthi*, *A. candida* and *A. tragopogonis* (Peronosporales, Albuginaceae). *Mycological Progress*, 4(3), 179-184.

Te Beest, D. O., Yang, X. B., & Cisar, C. R. (1992). The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Annual review of phytopathology*, 30(1), 637-657.

Ter Heerdt, G. N. J., Verweij, G. L., Bekker, R. M., & Bakker, J. P. (1996). An improved method for seed-bank analysis: seedling emergence after removing the soil by sieving. *Functional ecology*, 144-151.

Trognitz, F., Hackl, E., Widhalm, S., & Sessitsch, A. (2016). The role of plant-microbiome interactions in weed establishment and control. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(10), fiw138.

Twoorkoski, T. (2002). Herbicide effects of essential oils. *Weed Science*, 50(4), 425-431.

Ullrich, S. D., Buyer, J. S., Cavigelli, M. A., Seidel, R., & Teasdale, J. R. (2011). Weed seed persistence and microbial abundance in long-term organic and conventional cropping systems. *Weed science*, 59(2), 202-209.

Van Bogaert, N., Smagghe, G., & De Jonghe, K. (2015). The role of weeds in the epidemiology of pospiviroids. *Weed Research*, 55(6), 631-638.

Van der Weide, R. Y., Bleeker, P. O., Achten, V. T. J. M., Lotz, L. A. P., Fogelberg, F., & Melander, B. (2008). Innovation in mechanical weed control in crop rows. *Weed Research*, 48(3), 215-224.

Verdú, A. M. C., & Mas, M. T. (2015). Density-related effects on the infectivity and aggressiveness of a sterilising smut in a wild population of *Digitaria sanguinalis*. *Plant Biology*, 17(1), 281-287.

Wagner, M., & Mitschunas, N. (2008). Fungal effects on seed bank persistence and potential applications in weed biocontrol: a review. *Basic and Applied Ecology*, 9(3), 191-203.

Wandeler, H., Nentwig, W., & Bacher†, S. (2008). Establishing systemic rust infections in *Cirsium arvense* in the field. *Biocontrol science and technology*, 18(2), 209-214.

Ward, B. G., Henzell, R. F., Holland, P. T., & Spiers, A. G. (1999). Non-spray methods to control invasive weeds in urban areas. In *Proceedings of the New Zealand Plant Protection Conference* (pp. 1-5). New Zealand Plant Protection Society; 1998.

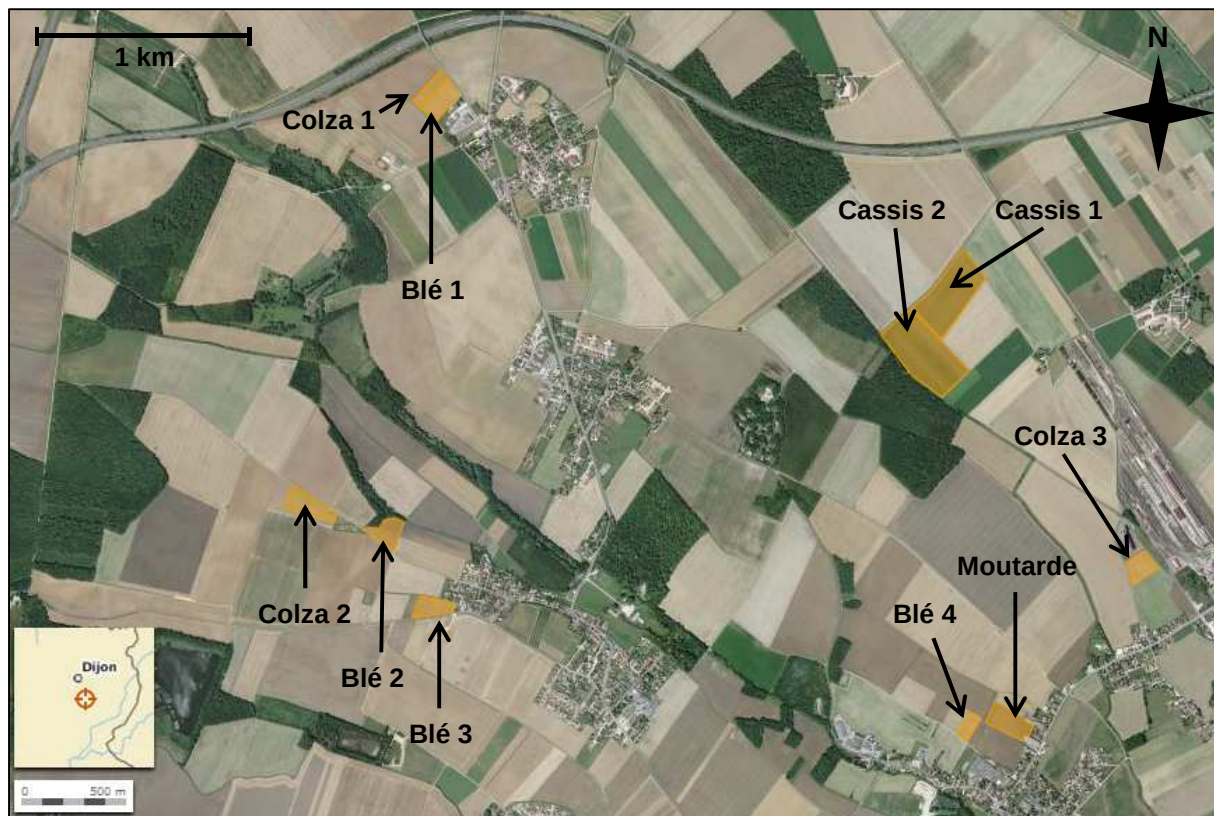
Wayne, P., Foster, S., Connolly, J., Bazzaz, F., & Epstein, P. (2002). Production of allergenic pollen by ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is increased in CO₂-enriched atmospheres. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 88(3), 279-282

Sitographie

- [1] Tela Botanica (2006). Tela Botanica, le réseau de la botanique francophone.
http://www.tela-botanica.org/page:plantes_messicoles_definitions# (consulté le 24/03/2016)
- [2] Ephytia (2015). Ephytia, identifier/connaître/maîtriser.
<http://ephytia.inra.fr/fr/C/11102/hypp-Les-adventices-les-plus-frequentes-en-France> (consulté le 15/03/2016)
- [3] Base nationale des données de ventes, MEDDE (2016). AGRESTE.
http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/donneesventeproduitsphytosanitaires_2011-2014.pdf (consulté le 08/06/2016)
- [4] Plan Ecophyto II, MAAF et MEDDE (2015). Alim'agri.
<http://agriculture.gouv.fr/file/20150606-projet-de-plan-ecophyto-iicle0987b1pdf> (consulté du 18/04/2016 jusqu'au 25/07/2016)
- [5] MAAF (2014). Alim'agri. <http://agriculture.gouv.fr/quest-ce-que-le-biocontrole> (consulté le 05/04/2016)
- [6] FAO (2001). http://web5.uottawa.ca/www5/dcousineau/home/Teaching/PSY1004A/1-NotesCours/PSY1004_11.pdf (consulté le 05/10/2016)
- [7] Infloweb (2012). Infloweb connaître et gérer la flore adventice.
<http://www.infloweb.fr/amarante-reflechie> (consulté le 05/10/2016)
- [8] Infloweb (2012). Infloweb connaître et gérer la flore adventice.
<http://www.infloweb.fr/moutarde-des-champs> (consulté le 05/10/2016)

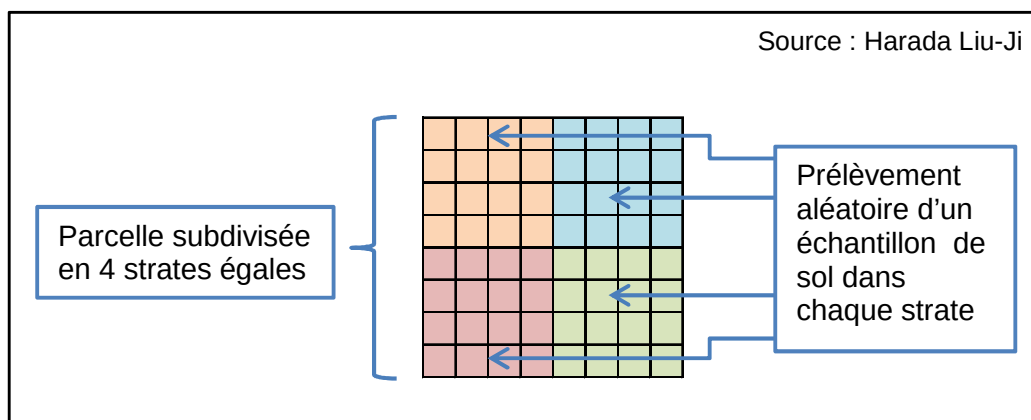
Annexe I : Détails de la prospection en amont: choix des parcelles et des espèces adventices

Une prospection dans la zone de Fénay était préalablement nécessaire pour décider où et quoi échantillonner. Parmi les parcelles sur lesquelles des relevés floristiques avaient été déjà effectués, dix d'entre elles possédant différentes cultures et dont la superficie était comprise entre 1 et 3 hectares ont été choisies aléatoirement pour mener cette prospection.



Parcelles prospectées dans la zone de Fénay. Image obtenue avec Géoportail le 07/09/2016.

L'objectif était d'avoir une idée approximative du contenu du stock semencier sur l'ensemble des différentes parcelles prospectées (Gross, 1990). Pour cela, un échantillonnage aléatoire stratifié a été effectué chaque parcelle en subdivisant ces dernières en 4 sous-unités de même superficie et, si possible, de même forme (les « strates ») dans lesquelles un échantillon de sol était prélevé aléatoirement (Benoit et al., 1989).



Mode d'application de l'échantillonnage aléatoire stratifié

Les échantillons ont été ensuite tamisés, les semences adventices extraites et identifiées. Sur la totalité des échantillons, 22 espèces adventices ont pu être identifiées. Un indicateur basé sur le nombre de semences extraites a été conçu afin d'avoir un aperçu de l'abondance de chaque espèce adventice au sein des différentes parcelles. Seules les semences ayant encore leur amande ont été comptabilisées. Au total, neuf parcelles et huit espèces adventices ont été retenues comme potentiellement intéressantes à échantillonner.

Niveau d'abondance (nombre de semences)		absent	1 à 2	3 à 4	5 à 9	10 à 19	20 ou plus
Couleur assignée							
	Colza 2			Cassis 2			Blé 3
FALCO VIOAR	VIOAR		PICEC			VIOAR SINAR	VIOAR SINAR
FALCO VIOAR	FALCO VIOAR			PICEC		VIOAR SINAR	VIOAR SINAR
	Blé 1			Cassis 1			Moutarde
FALCO AMARE	AMARE PICEC		AMARE Setaria SINAR	Setaria		SOLNI	SOLNI
FALCO AMARE PICEC	FALCO AMARE PICEC		AMARE Setaria ANAAR	ANAAR		SOLNI	SOLNI
	Colza 1			Blé 4			Blé 2
FALCO VIOAR	VIOAR		AMARE	AMARE		SINAR	SINAR
FALCO	FALCO VIOAR		AMARE	AMARE		SINAR	SINAR

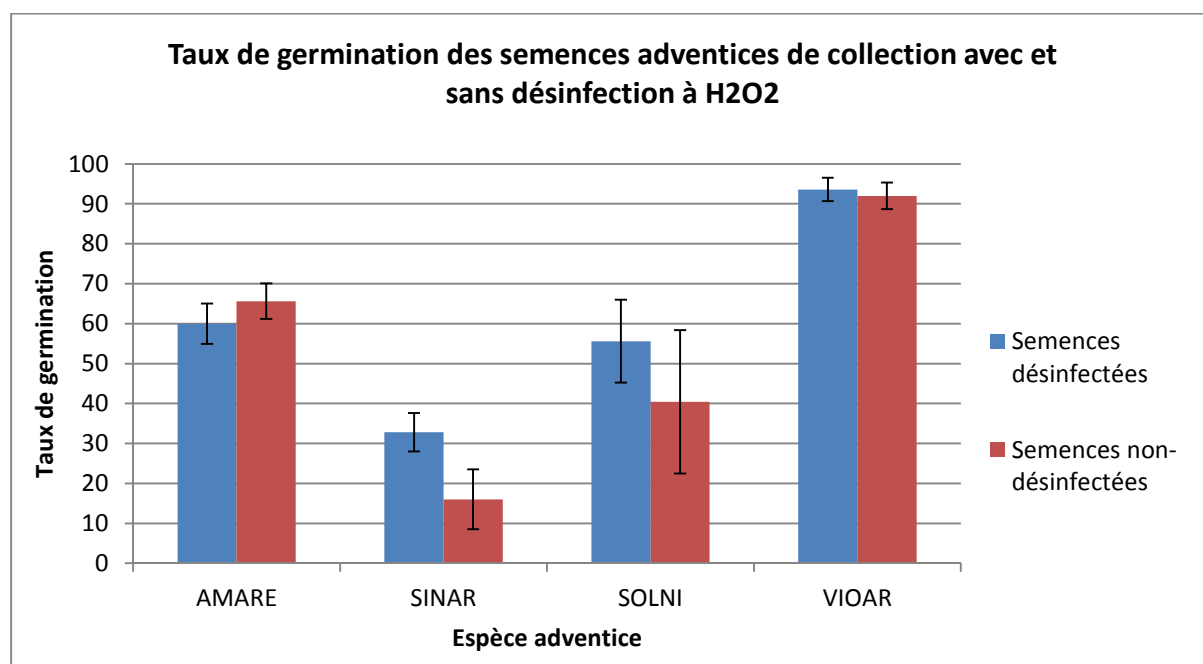
Parcelles et espèces adventices intéressantes à échantillonner. Signification des acronymes (nom Bayer des adventices) : AMARE : *Amaranthus retroflexus* ; ANAAR : *Anagallis arvensis* ; FALCO : *Fallopia convolvulus* ; PICEC : *Picris echinoides* ; SINAR : *Sinapis arvensis* ; SOLNI : *Solanum nigrum* ; VIOAR : *Viola tricolor*. Source : Harada Liu-Ji.

Liste des espèces adventices intéressantes à échantillonner. Source : Harada Liu-Ji, 02/05/2016

Nom commun	Nom scientifique	Famille	Photo de la semence extraite du sol
Amarante réfléchie	<i>Amaranthus retroflexus</i>	AMARANTHACEAE	
Renouée liseron	<i>Fallopia convolvulus</i>	POLYGONACEAE	
Moutarde des champs	<i>Sinapis arvensis</i>	BRASSICACEAE	
Morelle noire	<i>Solanum nigrum</i>	SOLANACEAE	
Picride fausse vipérine	<i>Picris echioides</i>	ASTERACEAE	
Mouron rouge	<i>Lysimachia arvensis</i>	PRIMULACEAE	
Sétaire	<i>Setaria</i>	POACEAE	
Pensée sauvage	<i>Viola tricolor</i>	VIOLACEAE	

Compte tenu de leur faible abondance et de la difficulté à obtenir des semences intactes après le tamisage, *P. echinoides* n'a pas été retenue pour cette étude. Ensuite, les semences ayant été identifiées en tant *Setaria* étaient relativement abondantes dans la parcelle « Cassis 1 », mais très peu d'entre elles possédaient un tégument entièrement intact permettant une identification précise, même avec l'appui des relevés floristiques. Par conséquent, les semences adventices considérées comme *Setaria* n'ont pas été retenues pour notre étude.

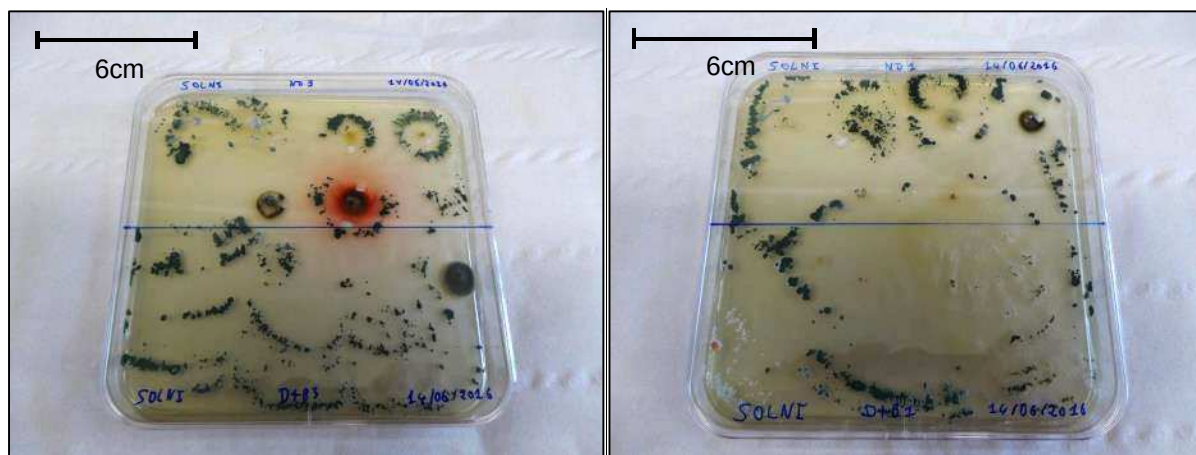
La prospection au champ a également permis d'affiner les techniques et le choix du matériel nécessaire aux manipulations expérimentales de l'échantillonnage (collecte de sol, tamisage et extraction des semences), de l'isolement des microorganismes (choix du Malt-acid antibiotique avec l'ajout de PCNB), et d'estimer la durée de ces manipulations pour l'étude. Les semences adventices d'*A. retroflexus*, de *S. arvensis*, de *S. nigrum* et de *V. tricolor* ont été déposées sur MAA afin d'avoir une idée du nombre de champignon qu'on pouvait obtenir. Tout comme les résultats de l'étude, ces tests ont montré une diversité importante de microorganismes fongiques. D'autre part, pour chacune des espèces adventices retenues, des tests de germination ont également été effectués avec des lots de semences de collection, avec et sans désinfection préalable au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 10%(v/v), sur du papier germination humidifié. Compte tenu de la durée et du caractère fastidieux de la manipulation pour faire germer leurs semences, *L. arvensis* et *F. convolvulus* n'ont pas été retenues pour notre étude.



Résultats de germination obtenus avec les semences adventices de collection, avec et sans désinfection à H_2O_2 à 10%(v/v). AMARE : *Amaranthus retroflexus* ; SINAR : *Sinapis arvensis* ; SOLNI : *Solanum nigrum* ; VIOAR : *Viola tricolor*.

Les résultats de germination ont également permis de voir que la désinfection à H_2O_2 n'avait pas ou très peu d'incidence sur l'aptitude à germer des semences adventices de collection. Un effet positif de la désinfection a même été constaté sur le taux de germination de *S. arvensis*.

Dans l'étude, il a été mentionné que la prospection a été effectuée sur seulement deux parcelles pour *A. retroflexus* et *S. arvensis*. Une troisième parcelle avait été échantillonnée pour *S. nigrum*, la parcelle « moutarde ». Toutefois, comparé à *A. retroflexus* et *S. arvensis*, beaucoup moins de colonies fongiques ont pu se développer sur MAA ; 16 champignons sur les 34 semences déposées ; et l'isolement de chaque colonie n'a pas pu avoir lieu à cause de contaminations importantes au *Trichoderma*. Même si certaines colonies de *Trichoderma* provenaient des semences déposées, une grande partie d'entre elles avaient une autre origine. Toutefois, on peut supposer que ces contaminations peuvent provenir de la manipulation en elle-même. Par exemple : une mauvaise désinfection ; une mauvaise stérilité du pal de travail ; ou alors si des spores de *Trichoderma* se trouvaient déjà sur des semences non-désinfectées, celles-ci auraient pu être dispersées durant le geste de dépôt de ces semences sur le MAA. Par conséquent, *S. nigrum* n'a pas pu être étudiée.



Boîtes de semences de *S. nigrum* sur MAA avec PCNB contaminées par *Trichoderma* .
Source : Harada Liu-Ji, 26/06/2016.

Les semences de *V. tricolor* ont été collectées en même temps que celles de *S. arvensis* sur la parcelle « Blé 3 » en raison de leur forte abondance. De plus, 65 colonies fongiques ont pu être isolées à partir des 97 semences de *V. tricolor* déposées sur MAA. Cependant, pour des raisons de temps et de praticité technique liées aux manipulations, et compte tenu du grand nombre de champignons isolés, il a fallu choisir deux espèces adventices parmi *A. retroflexus*, *S. arvensis* et *V. tricolor*. D'après les relevés floristiques, *V. tricolor* est une espèce adventice qui a été relevée sur un très grand nombre de parcelles de la zone de Féney. Cependant, elle présente un aspect compétitif et un enjeu agronomique nettement moins important qu'*A. retroflexus* et *S. arvensis*. C'est ainsi que les deux espèces adventices retenues ont été *A. retroflexus* et *S. arvensis*, ainsi que les parcelles « Blé 1 » et « Blé 3 » qui ont été notées respectivement P1 et P2 par la suite.

Références bibliographiques :

Benoit, D. L., Kenkel, N. C., & Cavers, P. B. (1989). Factors influencing the precision of soil seed bank estimates. *Canadian Journal of Botany*, 67(10), 2833-2840.

Gross, K. L. (1990). A comparison of methods for estimating seed numbers in the soil. *The Journal of Ecology*, 1079-1093.

Annexe II : Echantillonnage de sol et extraction des semences, matériels et modes opératoires



Matériel d'échantillonnage de sol. Source : Harada Liu-Ji, 30/05/2016



Poste de tamisage équipé d'un jet d'eau de ville. Source : Harada Liu-Ji, 06/06/2016

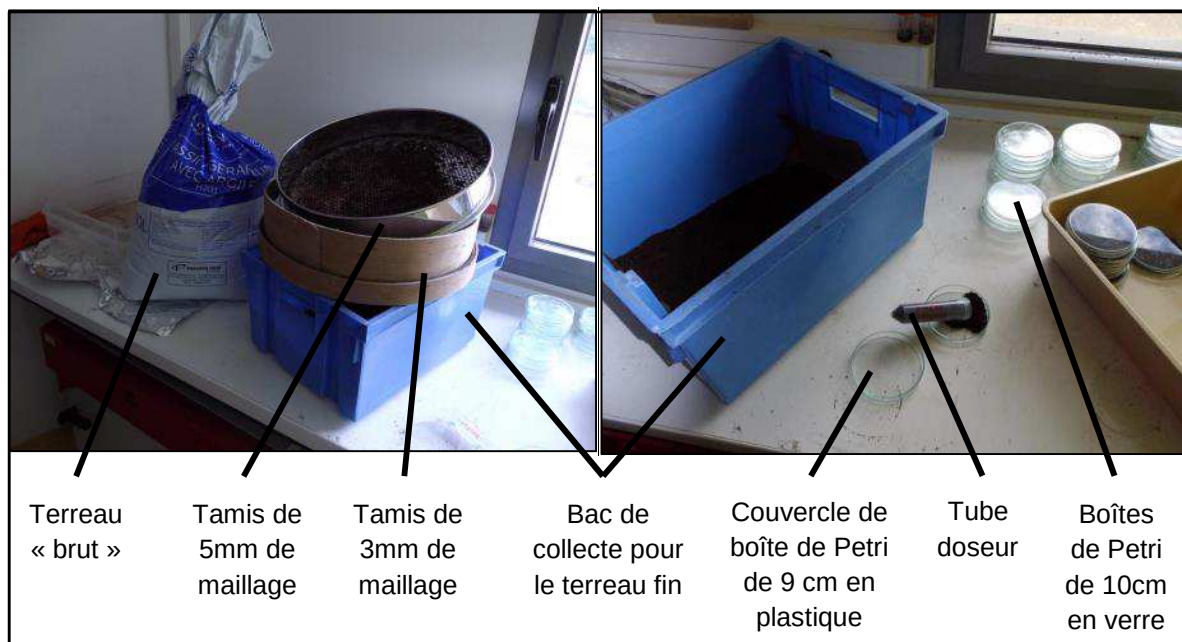


Matériel utilisé lors du tamisage des échantillons de sol. Source : Harada Liu-Ji, 06/06/2016

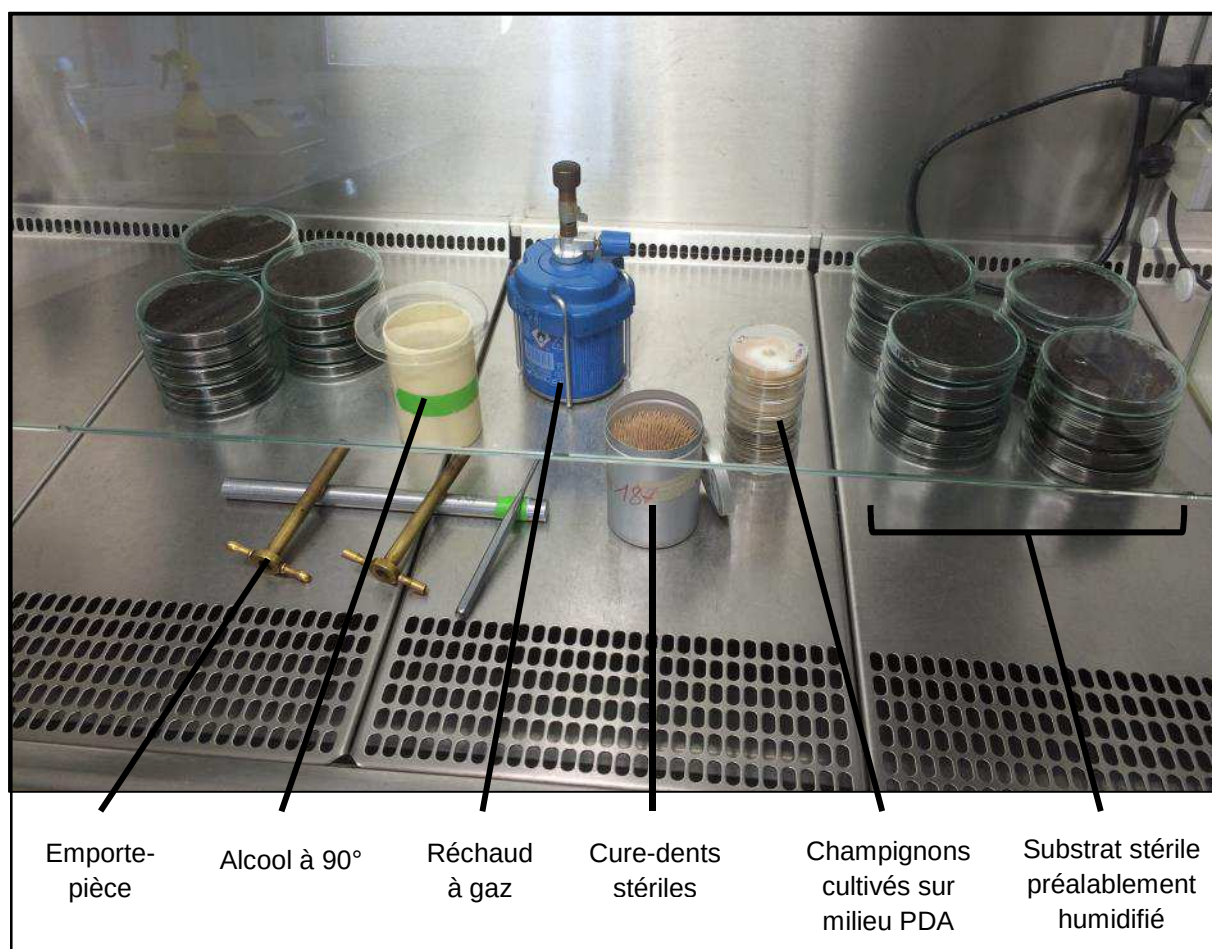
Mode opératoire du tamisage humide :

- 1- Déposer l'échantillon de sol dans une bassine et remplir la bassine tout en démêlant l'échantillon à la main puis le laisser se déliter pendant 5 minutes. Pour les échantillons argileux ou limoneux-argileux, laisser déliter pendant au moins 10 minutes.
- 2- Empiler les deux tamis sur la table de tamisage en plaçant celui de 5mm de maille au-dessus de celui de 400µm.
- 3- Verser le contenu de la bassine sur les deux tamis empilés tout en la rinçant avec le jet d'eau et conserver l'intégralité de l'échantillon.
- 4- Frotter délicatement l'échantillon contre le tamis de 5 mm à la main et de façon répétée tout en activant le jet d'eau jusqu'à ce que la totalité de l'échantillon soit passé à travers les mailles et qu'il ne reste que les éléments grossiers. Veiller à ce que l'échantillon ne reste pas collé en dessous des mailles du tamis de 5mm, dans ce cas utiliser le jet d'eau pour le décoller.
- 5- Retirer le tamis de 5mm. Jeter les éléments grossiers à la poubelle.
- 6- Répéter la même opération avec le tamis de 400µm. Veiller à ce que le maximum de terre fine soit passé à travers les mailles. Maintenir la délicatesse des frottements pour conserver un maximum de semences intactes.
- 7- Incliner légèrement le tamis de 400µm et utiliser le jet d'eau pour regrouper le contenu de l'échantillon sur le côté du tamis
- 8- Pour conserver l'échantillon humide, rincer le tamis de 5mm avec le jet d'eau, déposer à plat une toile en nylon dessus et l'humidifier avec le jet d'eau.
- 9- Verser l'intégralité de l'échantillon tamisé sur la toile en nylon tout en utilisant le jet d'eau. Veiller à bien centrer le dépôt sur la toile pour éviter les pertes. Rajouter les éléments grossiers sur la toile s'ils sont étudiés.
- 10- Plier la toile en nylon de façon à emballer l'échantillon humide puis déposer le tout dans un contenant.

Annexe III : Préparation, stérilisation, humectation et inoculation des substrats : matériels et mode opératoires



Matériel utilisé pour la préparation des boîtes de substrat. Source : Harada Liu-Ji, 30/06/2016.



Matériel utilisé pour l'inoculation des substrats. Matériel photographié à l'intérieur d'une hotte à flux laminaire. Source : Harada Liu-Ji, 08/08/2016.

Mode opératoire de la préparation et la stérilisation des substrats :

- 11- Tamiser le terreau avec les tamis de 5mm et de 3mm au-dessus du bac de collecte
- 12- Utiliser le tube doseur pour remplir de manière uniforme les boîtes de Petri avec 50mL de terreau tamisé. Ici 50mL de terreau fin correspondait à 12g, de quoi remplir une boîte de Petri en verre avec 5mm d'épaisseur de terreau.
- 13- Utiliser le couvercle de boîte de Petri en plastique pour tasser brièvement et uniformément le terreau contenu dans les boîtes. Cette opération permet d'éviter que le substrat ne colle au couvercle de la boîte, notamment après sa stérilisation par autoclavage.
- 14- Constituer des piles de dix boîtes de Petri et emballer ces piles avec deux épaisseurs de papier aluminium. Cette opération permet d'éviter les entrées d'eau trop importantes à l'intérieur des boîtes de Petri lors de l'autoclavage.
- 15- Faire autoclaver les piles de boîtes emballées à 121°C pendant 40min.
- 16- Sortir les piles et laisser les boîtes emballées au moins trois jours avant d'inoculer les substrats. Cette opération permet de s'assurer qu'il n'y ait plus de dégagements de méthane suite à l'autoclavage, gaz pouvant se montrer néfaste aux champignons.

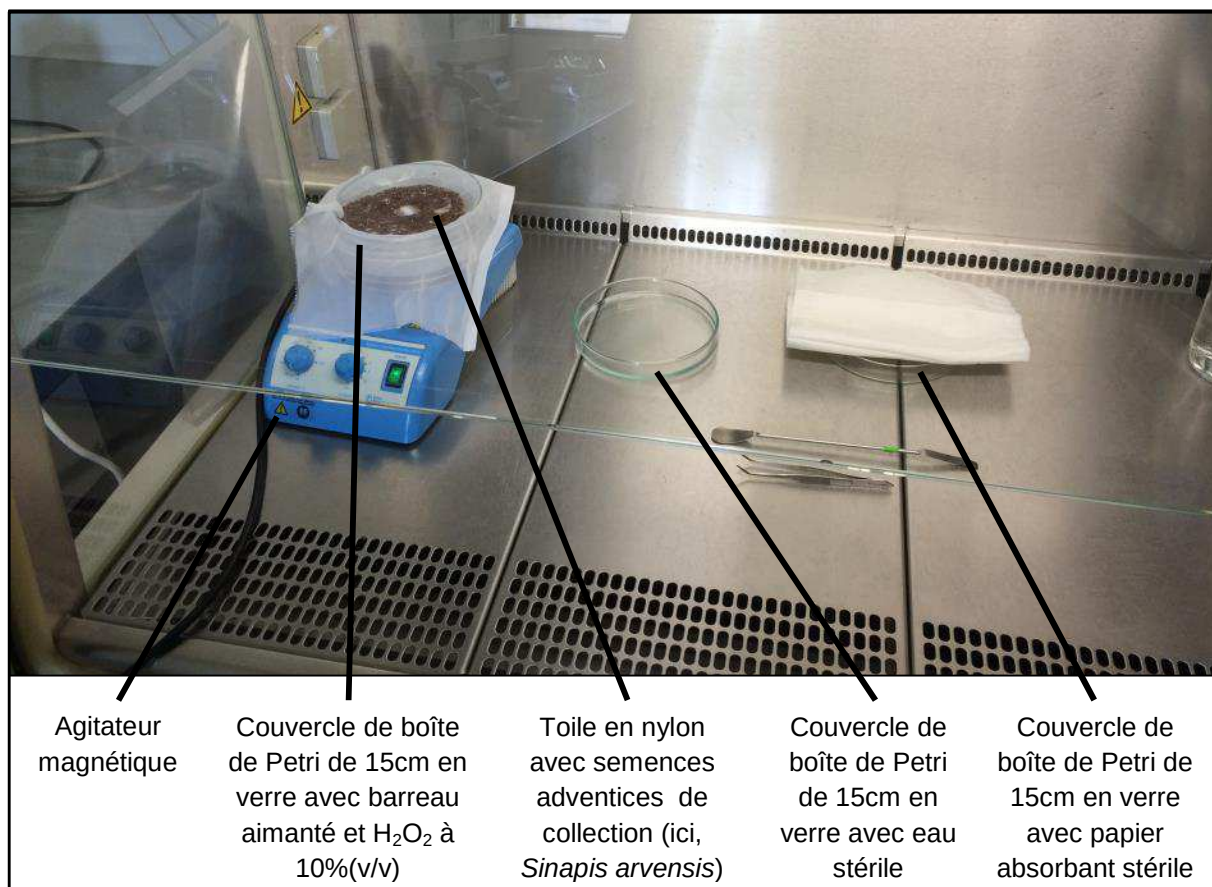
Mode opératoire de l'humectation des substrats :

- 1- Activer la hotte à flux laminaire et désinfecter le plan de travail avec l'alcool à 70°.
- 2- Désinfecter la surface de l'emballage en papier aluminium de chaque pile de boîte de Petri avec de l'alcool à 70° et un papier essuie-tout. Attendre 5min avant de les mettre sous la hotte.
- 3- Préparer un récipient d'eau stérile et une seringue de 10mL à usage unique à l'intérieur de la hotte.
- 4- Humidifier le substrat contenu dans chaque boîte avec 2mL d'eau stérile en utilisant la seringue et en répartissant les 2mL de façon homogène à la surface du substrat. Le volume de 2mL a été choisi de manière à ce que le substrat ne soit ni trop humide (pour éviter qu'il ne devienne trop collant), ni pas assez (pour éviter son dessèchement ou celui du champignon inoculé) 7 jours après son inoculation.
- 5- Une fois toutes les boîtes humidifiées, jeter la seringue. Laisser les boîtes sous la hotte et attendre au moins 2h pour que le substrat soit bien humecté.

Mode opératoire de l'inoculation des substrats :

- 1- Préparer le matériel nécessaire à l'inoculation sous la hotte.
- 2- Stériliser l'emporte-pièce avec l'alcool à 90° et la flamme du réchaud.
- 3- Pour chaque champignon cultivé sur PDA, utiliser l'emporte-pièce dans le milieu colonisé pour faire cinq portions de même calibre. Re-stériliser l'emporte-pièce après chaque champignon en utilisant d'abord le réchaud, puis l'alcool à 90° et le réchaud.
- 4- Utiliser les cure-dents stériles pour déposer les portions de milieu colonisé dans les boîtes de substrat et ce, à raison d'une portion par boîte. Les portions sont déposées au milieu des boîtes, à la surface du substrat et le côté colonisé de la portion est orienté face au substrat. Changer de cure-dent après chaque champignon, et veiller à ce que les portions de PDA ne collent pas au couvercle des boîtes de Petri.

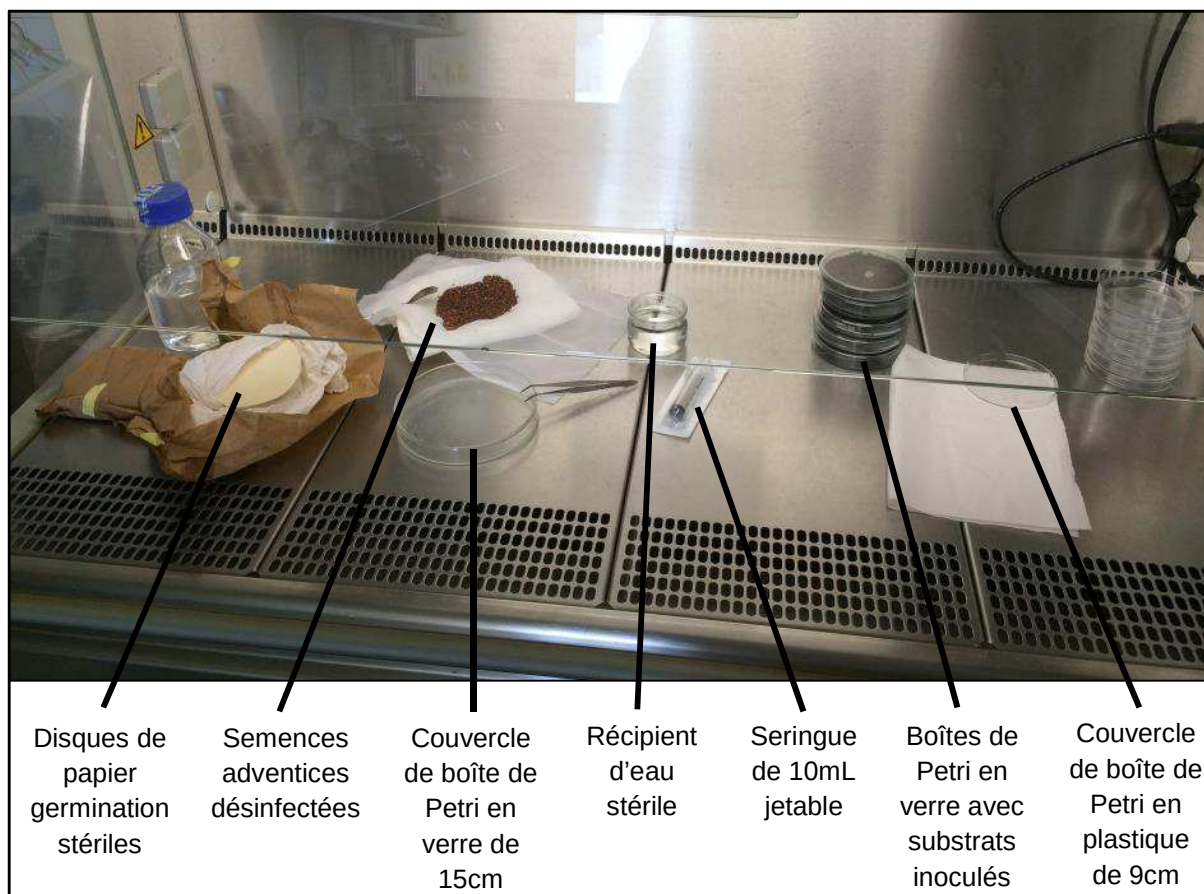
Annexe IV: Désinfection et dépôt des semences adventices dans les substrats inoculés :
matériels et modes opératoires



Matériel utilisé pour la désinfection des semences adventices de collection. Matériel photographié à l'intérieur d'une hotte à flux laminaire. Source : Harada Liu-Ji, 29/08/2016.

Photographies (Source : Harada Liu-Ji, 11/08/2016)	Matériel
	Papier Kraft
	Papier absorbant
	Paire de ciseaux
	Disques de papier germination (9,2cm de diamètre)
	Bande adhésive
	Papier germination emballé dans le papier absorbant puis dans le papier kraft, et prêt à être autoclavé

Matériel utilisé pour l'emballage du papier germination avant son autoclavage



Matériel utilisé pour le dépôt des semences adventices dans les substrats inoculés

Mode opératoire de la stérilisation des semences de collection :

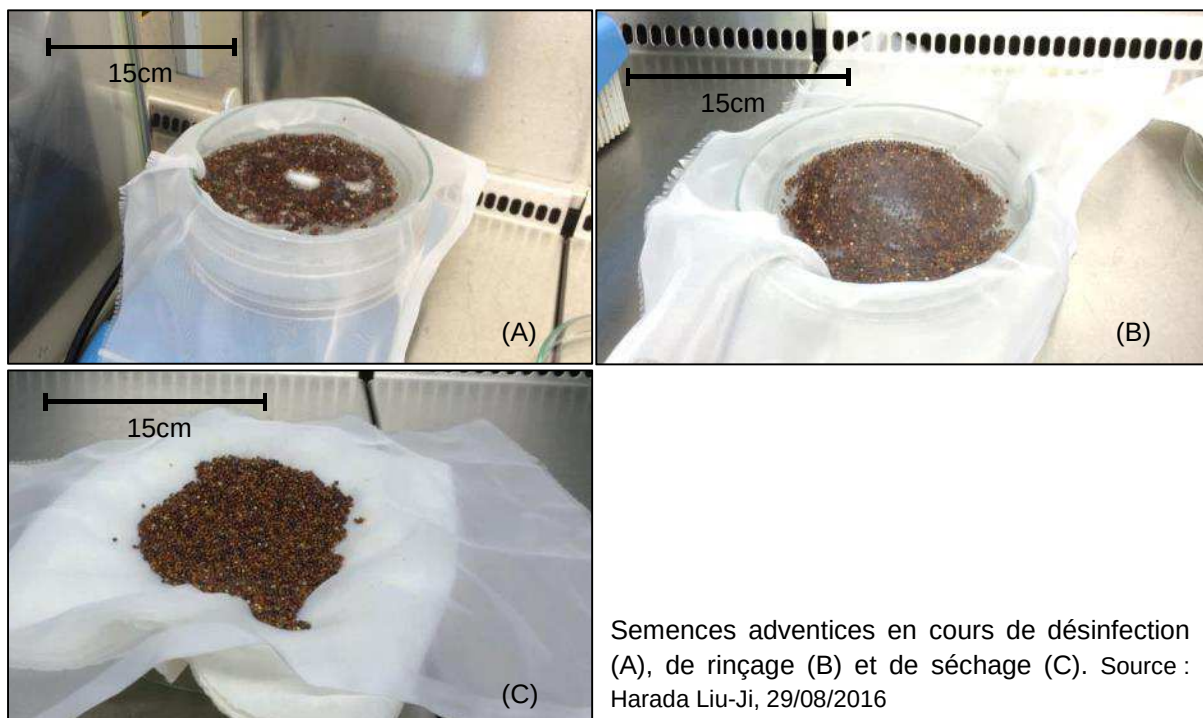
Pour *A. retroflexus*, les semences désinfectées peuvent être conservées dans un contenant préalablement désinfecté puis utilisées dans les jours qui suivent.

Pour *S. arvensis*, les semences doivent être préalablement stratifiées pendant sept jours à 4°C avant d'être désinfectées. Afin de s'assurer d'avoir suffisamment de semences pour le test de pathogénicité, pour chaque isolat inoculé (5 boîte de substrat) on prenait 60mg de semences (environ 300 semences). Les semences désinfectées et rincées doivent être déposées dans les substrats inoculés au cours de la même journée car elles peuvent commencer à germer dès le jour suivant et devenir inutilisables.



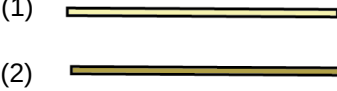
Semences de collection de *S. arvensis* stratifiées. Boîtes de 12x12cm contenant chacune un papier germination humidifié et 60g de semences. Source : Harada Liu-Ji, 29/08/2016

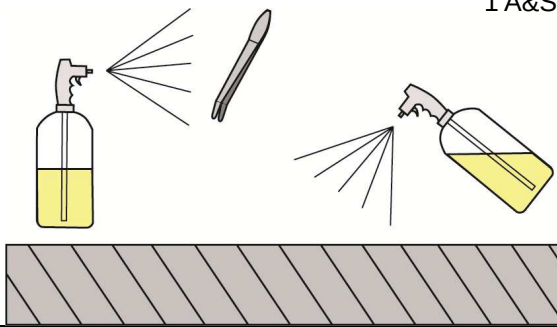
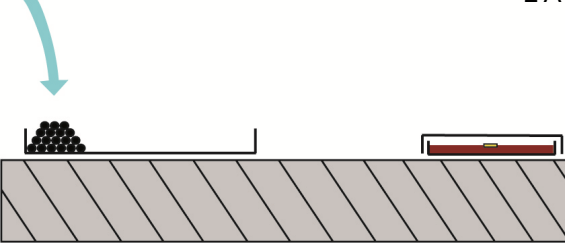
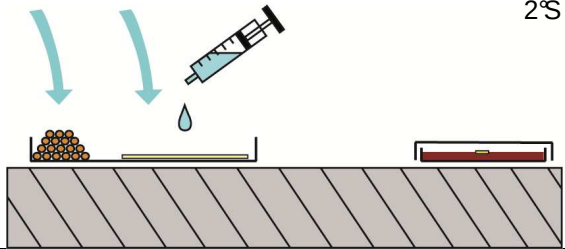
- 1- Activer la hotte et installer l'agitateur magnétique à l'intérieur.
- 2- Désinfecter trois couvercles de boîte de Petri en verre de 15cm ainsi que le barreau aimanté de l'agitateur avec de l'alcool à 70° et la laisser agir quelques minutes. Utiliser un papier essuie-tout avec de l'alcool à 70° pour désinfecter les instruments permettant de manipuler les semences (spatules et/ou pinces)
- 3- Mettre des gants afin de manipuler le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 10%(v/v) sans danger. Poser l'un des trois couvercles de boîte de Petri désinfecté sur l'agitateur, déposer le barreau aimanté et remplir avec l' H_2O_2 (au moins à la moitié).
- 4- Déposer la toile en nylon à plat dans le couvercle avec l' H_2O_2 , sur le barreau aimanté. Veiller à ce que le centre de la toile soit bien immergé dans l' H_2O_2 .
- 5- Verser les semences de collection sur la toile, dans l' H_2O_2 et activer l'agitateur. L'agitation doit être suffisante pour créer un courant d' H_2O_2 dans le couvercle afin que l'ensemble des semences adventice puisse être désinfecté. Utiliser une spatule ou une pince s'il y a besoin de faire bouger les semences.
- 6- Laisser agiter pendant 20min et arrêter l'agitateur.
- 7- Remplir sous la hotte un deuxième couvercle de boîte de Petri en verre avec de l'eau stérile, puis transférer la toile en nylon avec les semences désinfectées de manière à immerger les semences dans l'eau. Laisser tremper pendant 5min. Agiter régulièrement et délicatement le contenu du couvercle avec une spatule ou une pince pour bien rincer les semences.
- 8- Préparer sous la hotte le troisième couvercle de boîte de Petri en y déposant une ou deux feuilles de papier absorbant, puis déposer la toile en nylon avec les semences désinfectées et rincées sur le papier absorbant.
- 9- Pour *A. retroflexus*, une fois les semences sèches, verser les semences dans un contenant préalablement désinfecté. Pour *S. arvensis*, ne pas attendre que les semences sèchent (risque de fissures du tégument et d'abîmement de l'amande), maintenir humides les semences désinfectées en ajoutant ponctuellement des gouttes d'eau stérile (utiliser une seringue jetable).

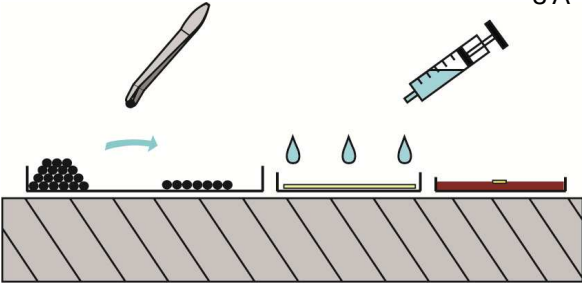
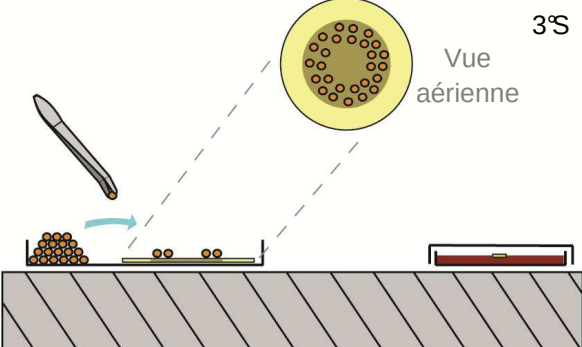
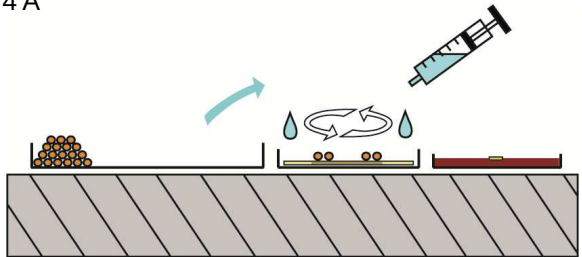
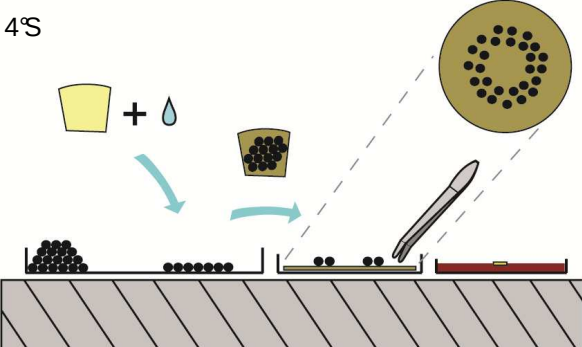
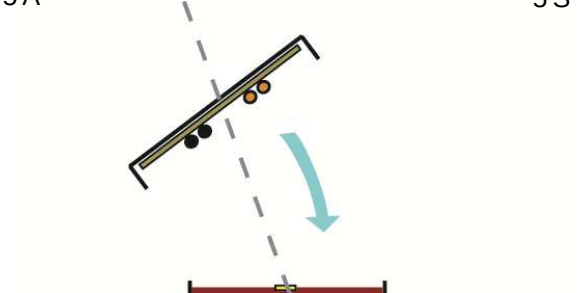


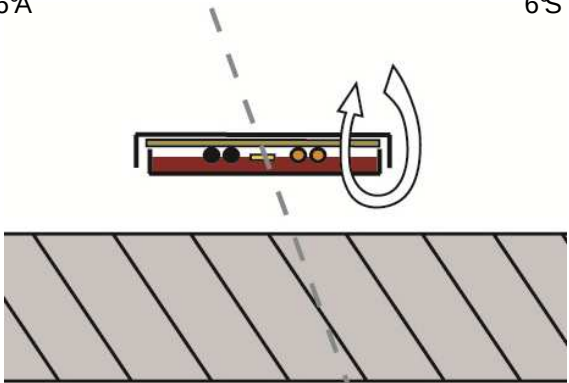
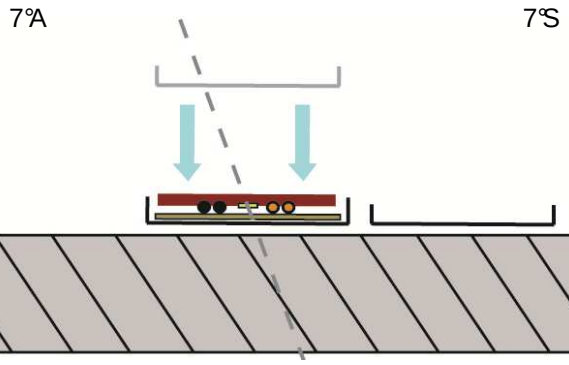
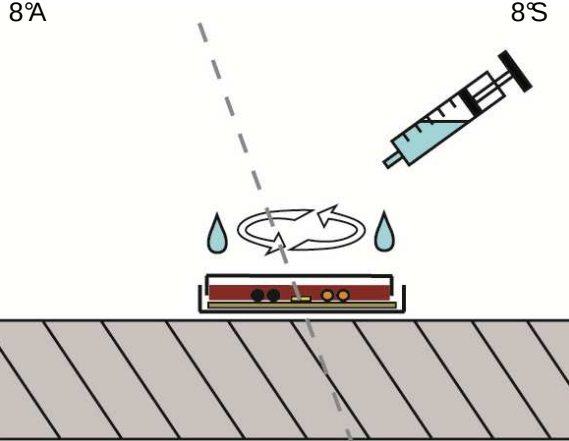
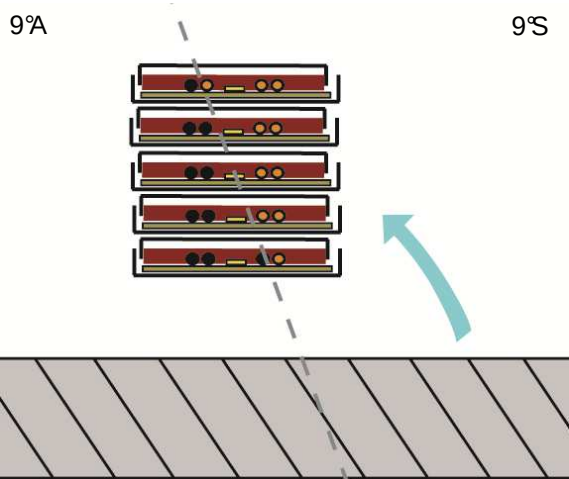
Semences adventices en cours de désinfection (A), de rinçage (B) et de séchage (C). Source : Harada Liu-Ji, 29/08/2016

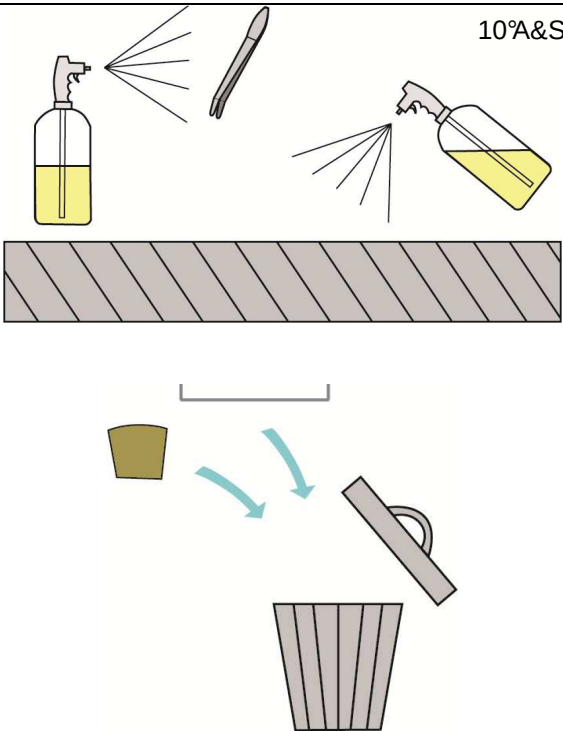
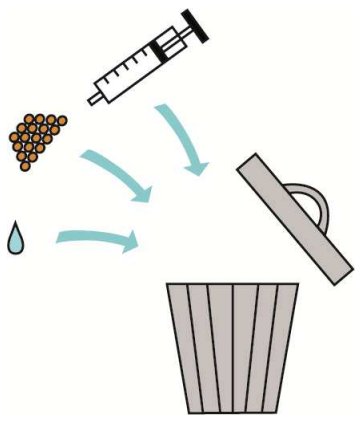
Mode opératoire pour le dépôt des semences dans les substrats inoculés :

Matériel utilisé	Représentation schématique (Source : Harada Liu-Ji, 27/09/2016)
Plan de travail à l'intérieur de la hotte	
Semences d'amarante (A) et de moutarde (S).	
Boîte de Petri en verre contenant du substrat inoculé et le morceau de gélose	
Seringue de 10mL jetable	
Couvercle de boîte de Petri de 15cm en verre	
Couvercle (ou socle) de boîte de Petri de 9cm en plastique	
Disque de papier germination sec (1) et humidifié (2)	
Pince métallique	

Description du mode opératoire	Schéma (Source : Harada Liu-Ji, 27/09/2016)
1°A&S - A l'intérieur de la hotte, désinfecter le plan de travail avec de l'alcool à 70° et un papier essuie-tout. - De la même manière, désinfecter les instruments (pinces et/ou spatules) utilisés pour manipuler les semences ainsi que le couvercle de boîte de Petri de 15cm en verre et le récipient qui contiendra l'eau stérile.	 1°A&S
2°A - Remplir le récipient d'eau stérile - Déposer et rassembler les semences d'amarante près d'un bord du couvercle en verre	 2°A
2°S - Remplir le récipient d'eau stérile - Déposer et rassembler les semences de moutarde près d'un bord du couvercle en verre - Déposer un disque de papier germination stérile dans le couvercle puis verser 1mL d'eau stérile au centre du disque de manière à l'humidifier partiellement (tache de 5-6cm de diamètre environ).	 2°S

3^A - Former un groupe de 50 semences. - Ouvrir la boîte de Petri contenant le substrat inoculé et déposer un disque de papier germination stérile dans son couvercle. - Humidifier la totalité du disque de papier germination avec 3mL d'eau stérile. Ce volume est suffisant pour humidifier la surface du disque tout en limitant les surplus d'eau susceptibles de faire bouger les semences qui y seront déposées. 3^S - Déposer 50 semences de moutarde sur la surface humide du disque de papier germination - Disposer les semences de façon à former un anneau sur le disque de papier	3^A  3^S Vue aérienne 
4^A - Ouvrir la boîte de Petri contenant le substrat inoculé et déposer le disque de papier germination avec les semences dans son couvercle. - Humidifier les abords disque de papier germination avec 2mL d'eau stérile. 4^S - Découper/déchirer un bout de papier germination stérile puis l'imbiber d'eau stérile - Utiliser le bout de papier pour déposer le groupe de 50 semences d'amarante sur le disque de papier germination humidifié. Les semences doivent se coller au bout de papier, répéter l'opération autant de fois que nécessaire avec le même bout de papier si les 50 semences ne se collent pas toutes. - Disposer les semences de façon à former un anneau sur le disque de papier	4^A  4^S 
5^{A&S} - Retourner le couvercle contenant le disque de papier germination humidifié avec les semences adventices. Normalement, le papier et les semences doivent rester collés au couvercle. - Poser le couvercle sur le socle contenant le substrat inoculé. Veiller à ce que le morceau de gélose passe dans le centre de l'anneau formé par les semences adventices.	5^A  5^S 

6°A&S - Retourner rapidement l'ensemble de la boîte afin que le substrat puisse recouvrir uniformément les semences adventices. Le socle de la boîte de Petri se retrouve en haut et le couvercle en bas. - Si du substrat colle encore sur le socle, tapoter dessus jusqu'à ce qu'il se détache.	6°A 6°S 
7°A&S - Retirer le socle de la boîte de Petri - Utiliser le couvercle (ou le socle) de boîte de Petri en plastique pour tasser brièvement le substrat uniformément. Cette opération permet de s'assurer que les semences entrent bien en contact avec le substrat inoculé. - Refermer la boîte de Petri avec le socle en verre.	7°A 7°S 
8°A&S - Verser 2mL d'eau stérile équitablement sur les abords du couvercle de la boîte. Utiliser la seringue jetable pour faire couler avec précision l'eau dans l'ouverture formée par le couvercle et le socle de la boîte de Petri. - Faire pivoter le socle sur lui-même afin de s'assurer que l'eau atteigne le substrat ou le papier germination.	8°A 8°S 
9°A&S - Répéter la manipulation pour les autres boîtes de substrat contenant le même inoculum. Utiliser le même matériel : seringue jetable, morceau de papier germination (pour l'amarante), couvercle de boîte de Petri en plastique. - Sortir de la hotte les 5 boîtes de semences recouvertes par le substrat inoculé.	9°A 9°S 

10°A&S - Désinfecter à nouveau le plan de travail ainsi que les pinces et/ou spatules - Jeter le couvercle (ou socle) de boîte de Petri en plastique utilisé pour tasser le substrat et le morceau de papier germination utilisé pour déplacer les semences (pour l'amarante). - Pour chaque inoculum, répéter la manipulation avec les autres boîtes de substrat inoculé. Avant chaque changement d'inoculum, désinfecter le plan de travail ainsi que les pinces et/ou spatules, et jeter les couvercles (ou socles) de boîte de Petri en plastique et les morceaux de papier germination (pour les semences d'amarante).	10°A&S 
11°A&S - A la fin de la manipulation, jeter la seringue de 10mL, le surplus d'eau stérile versé dans le récipient, ainsi que le surplus de semences adventices de moutarde. - Conserver le surplus de semences d'amarante dans un contenant préalablement désinfecté. Conserver également le surplus de disques de papier germination dans leur emballage en papier Kraft. - Désinfecter et nettoyer le plan de travail de la hotte, le couvercle de 15cm en verre, le récipient à eau stérile ainsi que les instruments utilisés.	11°A&S 

Les étapes relatives aux semences d'amarante et aux semences de moutarde sont respectivement accolées à un « A » et un « S ».

Remarques techniques :

- Au cours de la manipulation, il est conseillé d'utiliser un petit récipient pour l'eau stérile afin d'éviter le gaspillage si l'eau est contaminée par du substrat inoculé. Si c'est le cas, l'eau doit être jetée et le récipient re-désinfecté à l'alcool.
- Si la seringue entre en contact avec du substrat inoculé ou toute autre source de contamination, il faut la jeter et en utiliser une nouvelle.
- Au cours d'une même série d'inoculum, il est recommandé de laisser le couvercle en plastique sur un papier essuie-tout afin d'éviter de disperser des bouts de substrat inoculé sur le plan de travail. Lors du changement de couvercle, il est conseillé d'emballer ce dernier dans le papier essuie-tout puis de jeter l'ensemble.

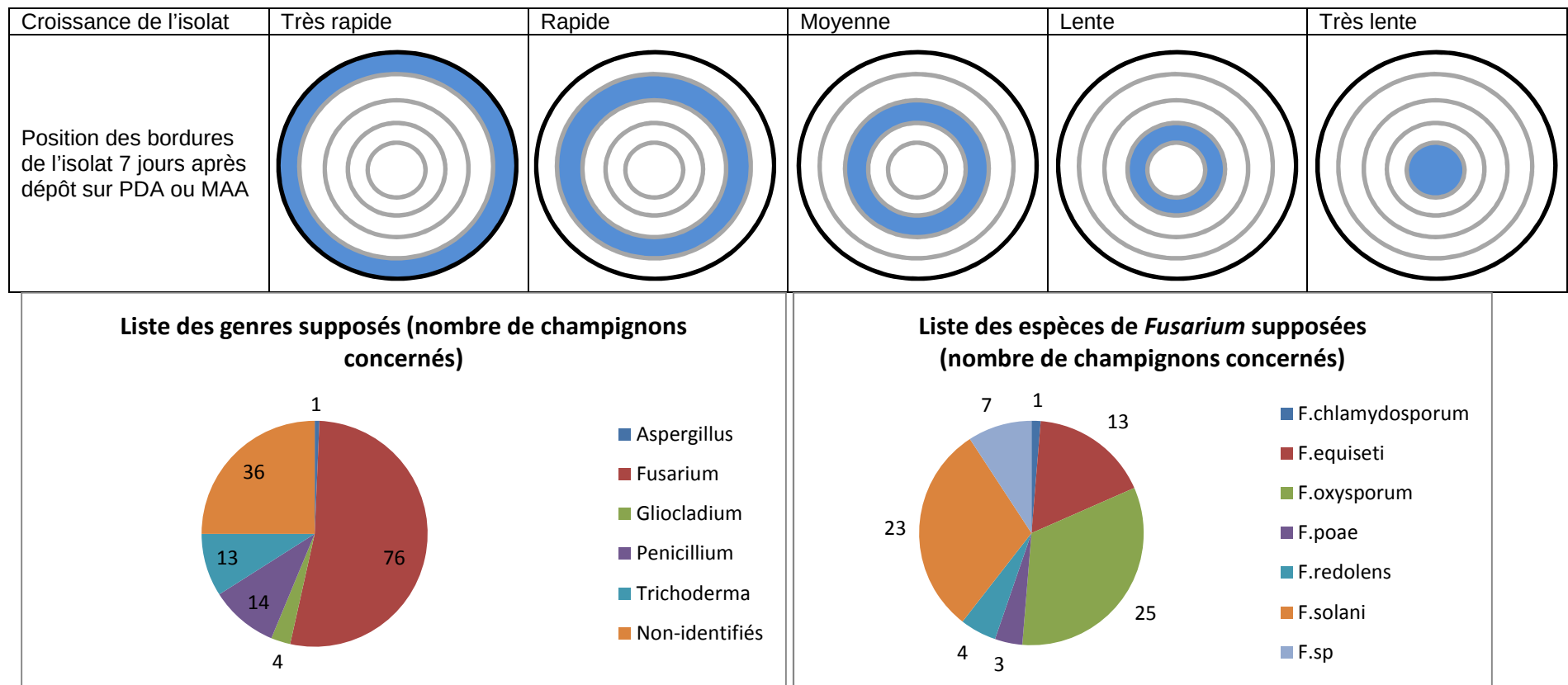
Annexe V: Liste des morphotypes

Le nom de chaque morphotype correspond à la ou les première(s) lettre(s) de la couleur dominante de l'isolat sur PDA après 7 jours de développement:

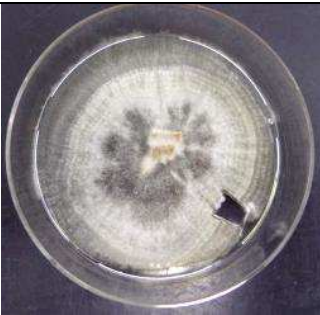
B = Blanc; Be = Beige; J= Jaune ; N = Noir; Oc = Ocre; O = Orange; G = Gris; Ro = Rose; Rg = Rouge; V = Vert

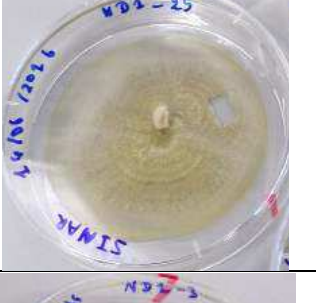
PDA: Potato Dextrose Agar; MAA: Malt Acid Antibiotic; AMARE: *Amaranthus retroflexus*; SINAR: *Sinapis arvensis*

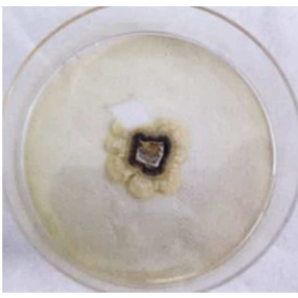
Indicateurs de croissance des isolats



Liste des motphototypes. Source des photographies : Harada Liu-Ji, 04/07/2016 pour les isolats sur PDA et MAA issus de *S. arvensis* ; 27/06/2016 pour les isolats sur PDA et 28/06/2016 pour les isolats sur MAA issus de *A. retroflexus*

Nom	Photographie sur PDA (7 à 10 jours après dépôt)	Photographie sur MAA (14 à 18 jours après dépôt)	Champignon supposé	Adventices et nombre d'isolats concernés	Caractéristiques
B1			<i>Fusarium equiseti</i>	AMARE 12 isolats concernés 8 isolats testés	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, épais et à aspect cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche, peu épais et avec de multiples stries concentriques vers les parties les plus jeunes. Croissance moyenne. - Supposé <i>Fusarium equiseti</i>.
B2			<i>Fusarium oxysporum</i> (?)	SINAR 6 isolats concernés 3 isolats testés	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, très épais, très dense et à aspect cotonneux. Croissance rapide - Sur MAA, isolat de couleur blanche et peu épais. Croissance lente. - Supposé <i>Fusarium oxysporum</i>.
B3			<i>Fusarium oxysporum</i> (?)	AMARE 2 isolats concernés 3 isolats testés SINAR 4 isolats concernés 3 isolats testés	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, relativement épais et à aspect cotonneux. Croissance rapide - Sur MAA, isolat de couleur blanche, les parties les plus âgées ont une couleur plus sombre. Croissance moyenne. - Supposé <i>Fusarium oxysporum</i>.

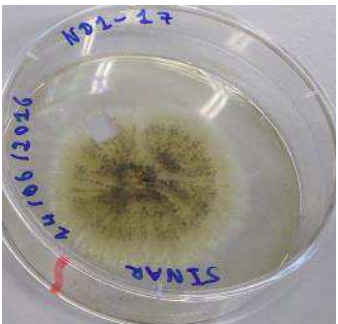
B4			<i>Fusarium solani</i>	AMARE 7 isolats concernés 4 isolats testés SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, épais, dense et avec des teintes ocrées au niveau des parties les plus âgées. Croissance lente. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant ocre après 7 jours. Les parties les plus âgées deviennent blanches avec un aspect cotonneux. Croissance moyenne. - Supposé <i>Fusarium solani</i>
B5			<i>Fusarium oxysporum</i>	SINAR 4 isolats concernés 3 isolats testés	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et les parties les plus âgées ont un aspect cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche avec un léger foncement pourpre/violet sur les parties les plus âgées. Croissance moyenne. - Supposé <i>Fusarium oxysporum</i>.
B6			<i>Gliocladium</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé SINAR 2 isolats concernés et testés	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et avec de multiples stries concentriques. Croissance moyenne. - Sur MAA, isolat de couleur blanche, peu épais et avec de multiples stries concentriques. Croissance moyenne. - Supposé <i>Gliocladium</i>.
B7			<i>Fusarium redolens</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé SINAR 3 isolats concernés 2 isolats testés	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et avec un aspect cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche, très peu épais et avec un léger foncement vers les parties les plus âgées. Croissance moyenne. - Supposé <i>Fusarium redolens</i>.

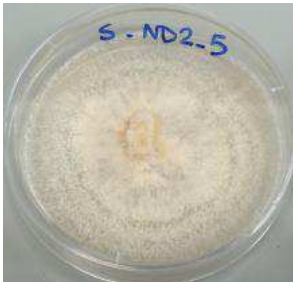
B8			?	AMARE 3 isolats concernés et testés	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais, dense et avec de légères stries concentriques. Croissance moyenne. - Sur MAA, isolat de couleur blanche, aux contours assez difformes et de couleur noire au niveau des parties les plus âgées. Croissance lente. - Non-identifié
B9			<i>Fusarium oxysporum</i>	SINAR 2 isolats concernés 1 isolat testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, relativement épais, dense et à aspect cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur rose très pâle devenant violette une fois plus âgée, peu épais et l'ensemble de l'isolat est porteur de structures blanches à aspect cotonneux. Croissance moyenne. - Supposé <i>Fusarium oxysporum</i>.
B10			<i>Fusarium oxysporum</i>	SINAR 2 isolats concernés et testés	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et les parties les plus âgées ont un aspect cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur violette devenant porteuse d'un duvet blanchâtre après 7 jours. Croissance rapide. - Supposé <i>Fusarium oxysporum</i>.
B11			? (# <i>Fusarium</i>)	SINAR 2 isolats concernés 1 isolat testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche avec un aspect poudreux. Croissance lente mais sporulation importante. - Sur MAA, isolat de couleur blanche avec un aspect poudreux. Croissance très lente mais sporulation assez importante. - Non-identifié. Pas un <i>Fusarium</i>.

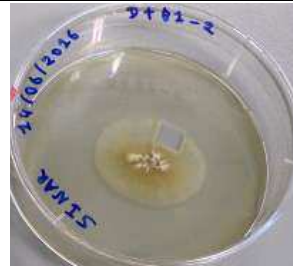
B12			<i>Fusarium solani</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur blanche et peu épais. Les abords de l'isolat brunissent le PDA. Croissance moyenne. • Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant marron-ocre en vieillissant, peu épais et dont les parties les plus âgées sont porteuses de structures blanches à aspect cotonneux. Croissance moyenne. • Supposé <i>Fusarium solani</i>.
B13			?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur blanche, épais au niveau des parties âgées et avec un aspect duveteux. Croissance très rapide. • Sur MAA, isolat au mycélium incolore devenant blanc au niveau des parties les plus âgées et aux abords de l'isolat. Croissance rapide. • Non-identifié
B14			<i>Fusarium oxysporum</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur blanche avec des nuances de rose, peu épais et avec un aspect très filamenteux aux extrémités. Croissance très rapide. • Sur MAA, isolat de couleur rose pâle avec un léger foncement sur les parties les plus âgées. Croissance rapide. • Supposé <i>Fusarium oxysporum</i>.

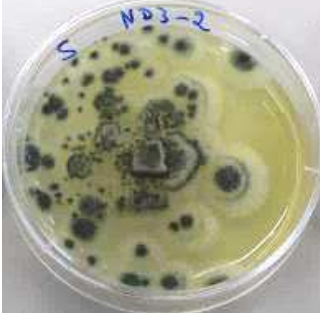
B15			?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais, et dont les parties les plus âgées brunissent. Le PDA brunit. Croissance très lente. • Sur MAA, isolat de couleur brune orangée. Les parties les plus âgées sont porteuses de structures blanches à aspect mousseux. Croissance rapide. • Non-identifié
B16			<i>Fusarium oxysporum</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et avec un aspect très filamenteux aux extrémités. Croissance très rapide. • Sur MAA, isolat de couleur blanche avec un léger foncement pourpre/violet sur les parties les plus âgées. Croissance rapide • Supposé <i>Fusarium oxysporum</i>.
B17			? (# <i>Fusarium</i>)	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et duveteux. Croissance (vraiment) très lente. • Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant de plus en plus jaunâtre en vieillissant, et peu épais. Croissance très lente. • Non-identifié. Pas un <i>Fusarium</i>.

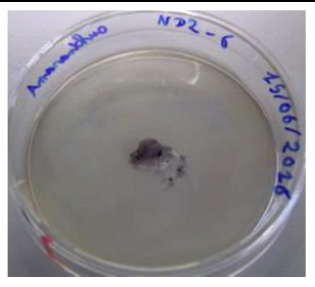
B18			?	AMARE	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais, et dont les parties les plus âgées brunissent. Croissance très lente. - Isolat de couleur brun clair ayant un aspect mousseux. Les parties les plus âgées sont porteuses d'un duvet blanchâtre. Croissance très lente. - Non-identifié. Pas un <i>Fusarium</i>.
B19			?	AMARE	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et duveteux. Croissance (vraiment) très lente. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant brune en vieillissant. Les parties les plus âgées sont porteuses d'un duvet blanchâtre. Croissance très lente. - Non-identifié. Pas un <i>Fusarium</i>.
B20			?	SINAR	- Sur PDA, isolat incolore et peu épais. Croissance très rapide - Sur MAA, isolat incolore et peu épais. Croissance lente. - Non-identifié. Pas un <i>Fusarium</i>.
B21			<i>Fusarium</i> sp	SINAR	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, épais, dense et avec un aspect duveteux. Croissance lente. - Sur MAA, isolat de couleur blanche prenant des teintes ocrées en vieillissant et se recouvrant d'un duvet blanchâtre relativement épais au niveau des parties les plus âgées. Croissance lente. - Supposé <i>Fusarium</i>.

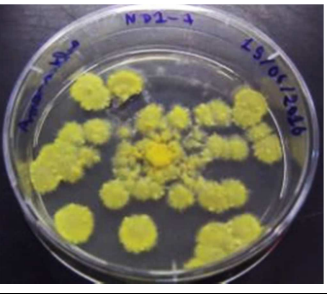
B22			?	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et dont les parties les plus âgées sont de couleur plus foncé et porteuses de fructifications de couleur ocre. Le PDA jaunit. Croissance lente. - Sur MAA, isolat de couleur blanche, peu épais et dont les parties les plus âgées sont de couleur plus foncé et porteuses de fructifications de couleur ocre. Croissance lente. - Non-identifié.
B23			<i>Fusarium oxysporum</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, épais, dense et avec un aspect cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur violette, peu épais et se recouvrant rapidement d'un duvet (fructifications ?) blanc. Croissance moyenne. - Supposé <i>Fusarium oxysporum</i>.
B24			?	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et dont les parties les plus âgées deviennent ocre. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur ocre devenant très vite porteuse de fructifications de couleur ocre foncé. Croissance rapide. - Non-identifié.
B25			<i>Fusarium oxysporum</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et les parties les plus âgées ont un aspect cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur rose clair devenant plus foncée au niveau des parties les plus âgées. Croissance moyenne. - Supposé <i>Fusarium oxysporum</i>.

B26			<i>Gliocladium</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche-beige, peu épais et avec de multiples stries concentriques. Croissance rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche, peu épais et avec de multiples stries concentriques. Croissance rapide. - Supposé <i>Gliocladium</i>.
B27			<i>Fusarium solani</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et ayant un aspect duveteux. Croissance moyenne. - Sur MAA, isolat de couleur blanche et dont les parties les plus âgées brunissent. Croissance très lente. - Supposé <i>Fusarium solani</i>.
B28			?	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, épais, dense et avec un aspect duveteux. Croissance lente. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant porteuse de structures (fructifications ?) blanches cotonneuses à ses abords. Croissance lente. - Non-identifié
B29			<i>Fusarium oxysporum</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, peu épais et recouverte d'un duvet blanchâtre. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur rose clair devenant plus foncée au niveau des parties les plus âgées. Croissance moyenne. - Supposé <i>Fusarium oxysporum</i>

B30			<i>Fusarium</i> ?	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, relativement épais, dense et avec un aspect duveteux. Croissance lente. - Sur MAA, isolat de couleur blanche, peu épais et devenant porteuse d'un duvet blanchâtre. Croissance lente. - Supposé <i>Fusarium</i>.
B31			<i>Fusarium sp</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, relativement épais, dense et à aspect cotonneux. Croissance rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche prenant de légères teintes rosâtres et ocrées en vieillissant. Croissance très lente. - Supposé <i>Fusarium</i>.
B32			? (# <i>Fusarium</i>)	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche (presque incolore) et peu épais. Croissance lente. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant ocre en vieillissant et peu épais. Croissance très lente. - Non-identifié. Pas un <i>Fusarium</i>.
B33			? (# <i>Fusarium</i>)	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche (presque incolore) et peu épais. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat au mycélium quasi-incolore et peu épais. Croissance très rapide. - Non-identifié. Pas un <i>Fusarium</i>.

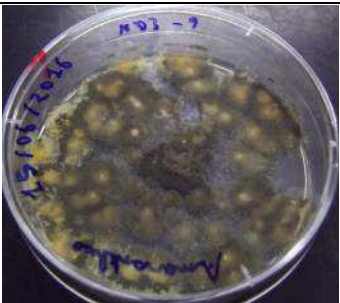
Be1			<i>Fusarium ?</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur beige, peu épais et dont les parties les plus âgées sont porteuses d'un duvet blanc. Croissance moyenne. - Sur MAA, isolat de couleur beige qui se recouvre d'un duvet blanchâtre en vieillissant. Croissance lente. - Supposé <i>Fusarium</i>.
G1			<i>Penicillium</i>	SINAR 6 isolats concernés 4 isolats testés	- Sur PDA, isolat de couleur blanche devenant très rapidement de couleur gris-vert foncé. Croissance moyenne mais sporulation importante. - Sur MAA, isolat de couleur gris-vert foncé, peu épais et avec de multiples stries concentriques. Croissance moyenne mais sporulation importante. - Supposé <i>Penicillium</i>.
G2			<i>Penicillium</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur gris clair avec un aspect mousseux. Les abords de l'isolat sont plus clairs et le PDA brunit. Croissance lente mais sporulation assez importante. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant grise après 7 jours, et avec un aspect mousseux. Croissance lente mais sporulation assez importante. - Supposé <i>Penicillium</i>.

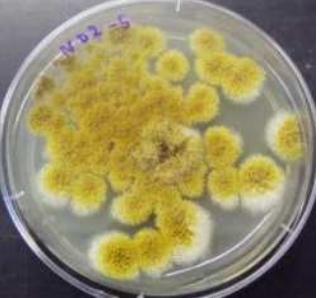
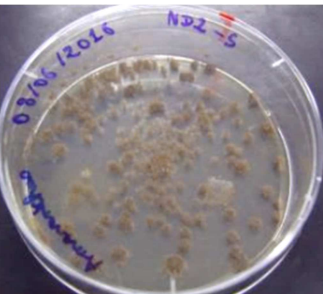
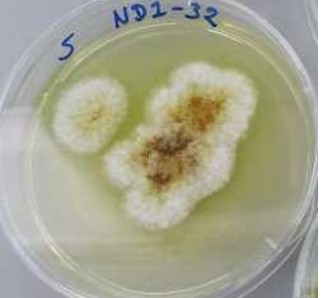
G3			?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur gris-brun, peu épais et avec un aspect duveteux. Croissance très lente. - Sur MAA, isolat de couleur grise, peu épais et avec un aspect duveteux. Croissance (vraiment) très lente. - Non supposé
G4			<i>Penicillium</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur gris clair et avec un aspect duveteux. Croissance très lente mais sporulation importante. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant grisâtre en fructifiant et ayant un aspect duveteux. Croissance très lente mais sporulation importante. - Supposé <i>Penicillium</i>.
G5			<i>Penicillium</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur gris clair et avec un aspect poudreux. Croissance très lente mais sporulation importante. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant grisâtre en fructifiant. Le MAA jaunit. Croissance moyenne et sporulation importante. - Supposé <i>Penicillium</i>.
G6			<i>Penicillium</i>	SINAR 1 isolat seul concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche devenant gris-vert en vieillissant, peu épais et dont les parties blanches ont un aspect cotonneux. Croissance moyenne. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant gris-vert en fructifiant et dont les fructifications sont espacées de manière concentriques. Croissance lente. - Supposé <i>Penicillium</i>.

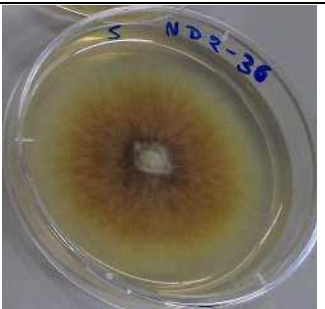
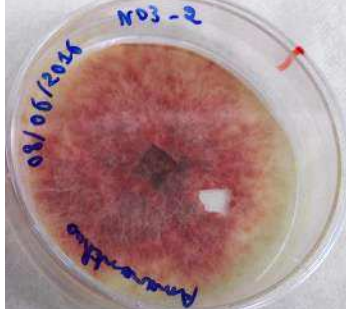
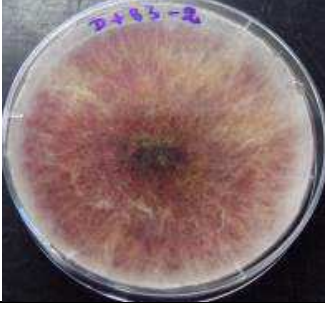
G7			?	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur gris clair, peu épais et ayant un aspect duveteux. Le PDA brunit aux abords de l'isolat. Croissance lente. - Sur MAA, isolat de couleur grise devenant brun-noir en vieillissant, peu épais et ayant un aspect duveteux. Croissance très lente. - Non-identifié.
J1			<i>Penicillium</i>	AMARE 1 isolat seul concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur jaune très clair et avec un aspect mousseux. Croissance lente mais sporulation assez importante. - Sur MAA, isolat de couleur jaune très clair et avec un aspect mousseux. Croissance très lente mais sporulation assez importante. - Supposé <i>Penicillium</i>.
N1			?	AMARE 5 isolats concernés 1 isolat testé SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur noire, très peu épais, et les parties les plus âgées sont porteuses d'un léger duvet grisâtre. Croissance très lente. - Sur MAA, isolat de couleur noire et très peu épais. Croissance très lente. - Non-identifié
N2			?	SINAR 3 isolats concernés 2 isolats testés	- Sur PDA, isolat de couleur blanche et dont les parties les plus âgées deviennent noires et présentent des structures à aspect cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant noire après 7 jours, peu épais et les parties les plus âgées sont porteuses de structures (fructifications ?) à aspect cotonneux. Croissance moyenne. - Non-identifié

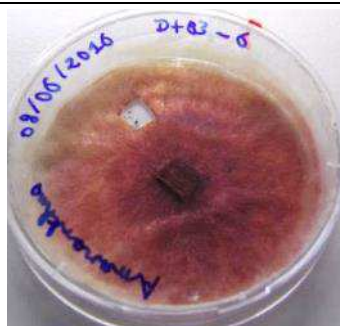
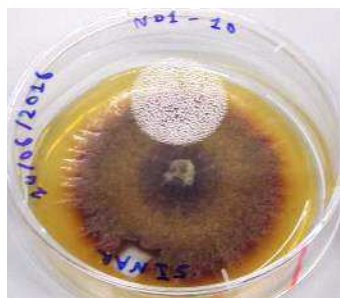
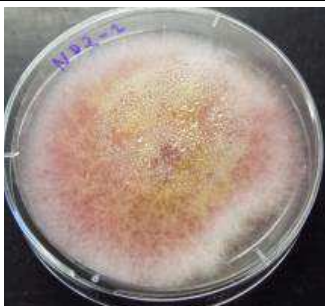
N3			?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé SINAR 2 isolats concernés 1 isolat testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche et dont les parties les plus âgées s'assombrissent et présentent des structures à aspect cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant noire après 7 jours, peu épais et les parties les plus âgées sont porteuses de structures (fructifications ?) à aspect cotonneux. Croissance moyenne. - Non-identifié
N4			?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur noire, peu épais et recouverte d'un duvet blanchâtre. Les abords de l'isolat sont plus clairs. Croissance moyenne. - Sur MAA, isolat de couleur grise devenant noire après 7 jours. Les parties les plus âgées sont porteuses de structures de couleur grise avec un aspect duveteux. Croissance lente. - Non-identifié.
N5			?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur noire, peu épais et recouverte d'un duvet blanchâtre. Croissance moyenne. - Sur MAA, isolat de couleur blanche dont les parties les plus âgées s'assombrissent après 7 jours. Croissance rapide. - Non-identifié.

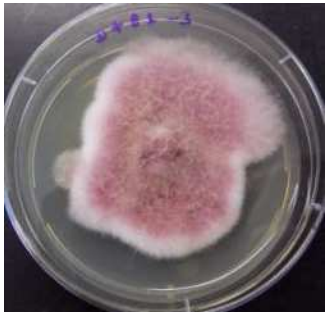
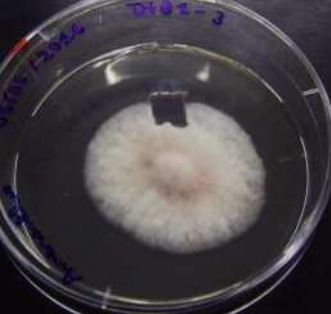
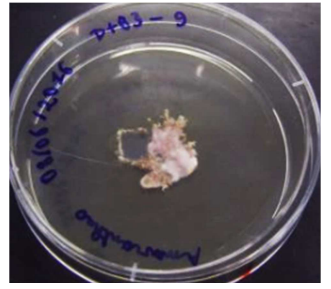
N6			?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur noire, peu épais et dont les parties les plus âgées sont porteuses de structures duveteuses grisâtres. Croissance moyenne. • Sur MAA, isolat de couleur noire, peu épais et dont les parties les plus âgées sont porteuses de structures duveteuses grisâtres. Croissance moyenne. • Non-identifié
N7			?	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur sombre, relativement épais, très dense et fructifiant abondamment (fructifications de couleur noire). Croissance très rapide. • Sur PDA, isolat de couleur sombre, et fructifiant abondamment (fructifications de couleur noire). Croissance très rapide. • Non-identifié
N8			<i>Fusarium solani</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur sombre, noire au niveau des parties les plus âgées et peu épais. Croissance très rapide. • Sur MAA, isolat de couleur blanc-beige et peu épais. Croissance moyenne. • Supposé <i>Fusarium solani</i>.

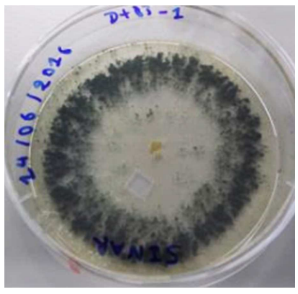
O1			<i>Penicillium</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur orange devenant noire en fructifiant, et peu épais. Croissance moyenne et sporulation importante. • Sur MAA, isolat de couleur orange devenant noire en fructifiant, et peu épais. Croissance très lente mais sporulation importante. • Supposé <i>Penicillium</i>.
Oc1			<i>Fusarium solani</i>	SINAR 11 isolats concernés 6 isolats testés	• Sur PDA, isolat de couleur ocre clair, peu épais et avec un mycélium blanc vers les parties les plus âgées. Croissance très rapide. • Sur MAA, isolat de couleur blanche, peu épais. Les parties les plus âgées sont porteuses de petites structures (fructifications ?) à aspect cotonneux. Croissance rapide. • Supposé <i>Fusarium solani</i>
Oc2			<i>Penicillium</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur blanche devenant gris-ocre avec des tâches jaunes en fructifiant. Croissance moyenne mais sporulation importante. • Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant gris-ocre avec des tâches jaunes en fructifiant. Croissance moyenne mais sporulation importante. • Supposé <i>Penicillium</i>.

Oc3			<i>Penicillium</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur blanche devenant très rapidement ocre en fructifiant. Croissance lente mais sporulation importante. • Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant très rapidement ocre en fructifiant. Croissance très lente mais sporulation importante. • Supposé <i>Penicillium</i>.
Oc4			?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur ocre foncé ayant un aspect poudreux. Les abords de l'isolat sont plus clairs. Croissance rapide. • Sur MAA, isolat de couleur ocre devenant de plus en plus foncé en vieillissant et ayant un aspect poudreux. Croissance rapide et sporulation assez importante. • Non-identifié.
Oc5			<i>Aspergillus</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur blanche devenant ocre en vieillissant, peu épais et dont les parties blanches ont un aspect cotonneux. Croissance moyenne. • Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant très rapidement ocre, fructifiant abondamment et dont les fructifications sont de couleur ocre. Croissance très lente. • Supposé en tant qu'<i>Aspergillus</i>.

Oc6			?	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur ocre devenant, peu épais et dont les parties les plus âgées sont porteuses de structures (fructifications ?) blanchâtres. Croissance rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant ocre. Croissance (vraiment) très lente. - Non-identifié.
Rg1			<i>Fusarium chlamydospo- rum / sporotrichioi- des</i> ?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche devenant rapidement rougeâtre et recouverte d'un épais duvet blanc cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant rapidement rougeâtre et recouverte d'un duvet blanc. Croissance très rapide. - Supposé <i>Fusarium chlamydosporum</i> ou <i>sporotrichioides</i>.
Rg2			<i>Fusarium</i> sp	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche devenant rapidement rougeâtre teintée de jaune, et recouverte d'un duvet blanc cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur jaune-orangé et dont les parties les plus âgées deviennent rouges après 7 jours. Croissance très rapide. - Supposé <i>Fusarium</i>.

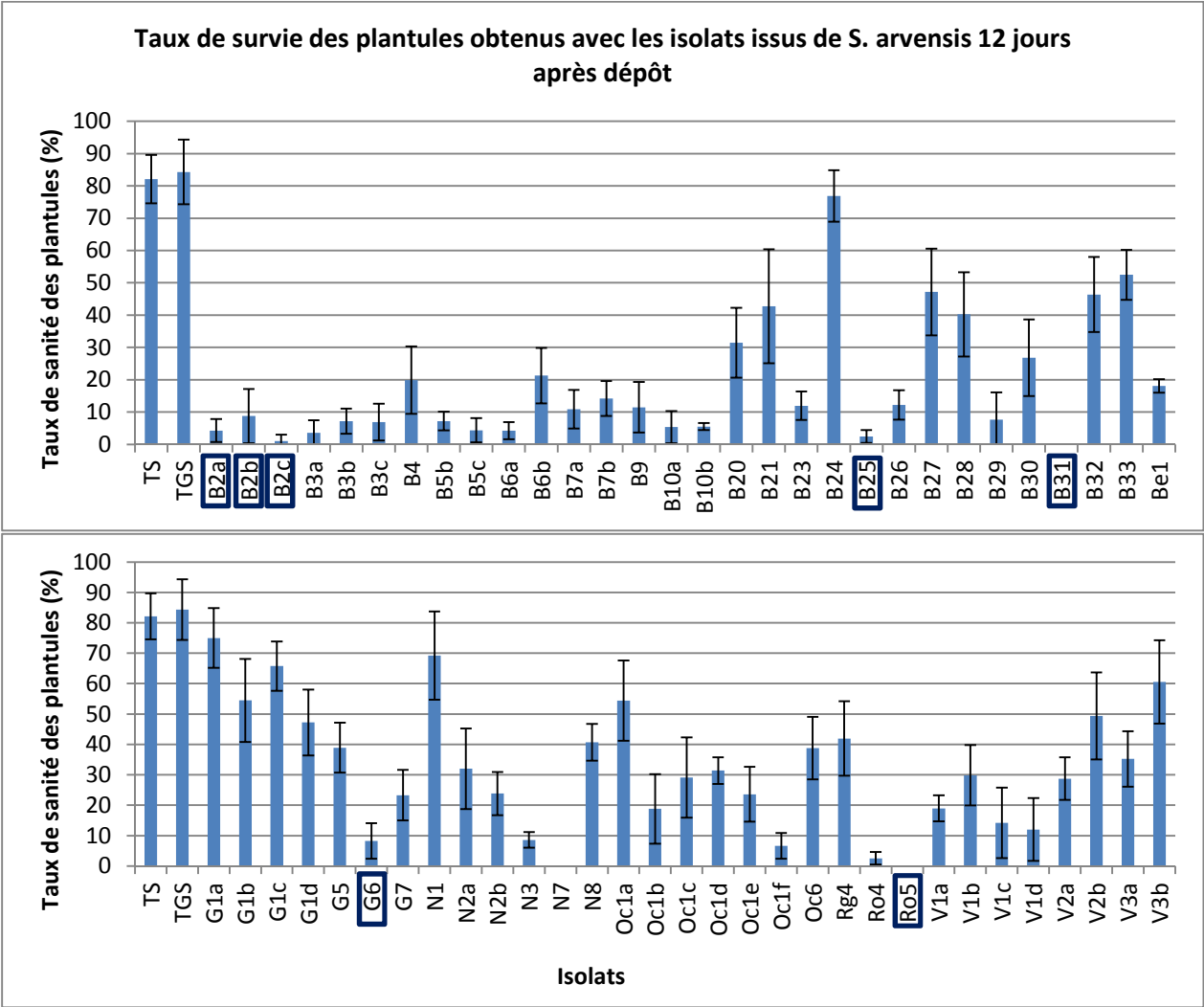
Rg3			<i>Fusarium sp</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche devenant rapidement rougeâtre teintée de jaune, et recouverte d'un duvet blanc cotonneux. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche devenant rapidement rougeâtre teintée de jaune. Croissance très rapide. - Supposé <i>Fusarium</i>.
Rg4			<i>Fusarium solani</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur orange devenant rapidement rouge-orangé, peu épais et dont les parties les plus âgées sont porteuses de structures (fructifications ?) blanchâtres. Le PDA brunit. Croissance lente. - Sur MAA, isolat de couleur orange devenant rapidement rouge-orangé, peu épais et dont les parties les plus âgées sont porteuses de structures (fructifications ?) blanchâtres. Le MAA brunit. Croissance lente. - Supposé <i>Fusarium solani</i>.
Ro1			<i>Fusarium tricinctum/ poae</i> ?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, relativement épais et dont les parties les plus âgées deviennent roses et ocrées. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche légèrement orangée, peu épais, et dont les parties les plus âgées prennent une teinte rosâtre et ocrée. Croissance lente. - Supposé <i>Fusarium poae</i> ou <i>Fusarium tricinctum</i>

Ro2			<i>Fusarium tricinctum/ poae</i> ?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, relativement épais et dont les parties les plus âgées deviennent roses. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur blanche, relativement épais, assez dense et dont les parties les plus âgées prennent une teinte rosâtre. Croissance moyenne. - Supposé <i>Fusarium poae</i> ou <i>Fusarium tricinctum</i>
Ro3			<i>Fusarium tricinctum/ poae</i> ?	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, relativement épais et dont les parties les plus âgées deviennent roses. Croissance rapide. - Sur MAA, isolat de couleur orange, peu épais et dont les parties les plus âgées prennent une teinte rosâtre et ocrée avec des structures blanches cotonneuses. Croissance très lente. - Supposé <i>Fusarium poae</i> ou <i>Fusarium tricinctum</i>
Ro4			<i>Fusarium sp</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat de couleur blanche, relativement épais et dont les parties les plus âgées deviennent roses. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat de couleur orange, peu épais et dont les parties les plus âgées deviennent roses avec des teintes ocrées. Croissance très lente. - Supposé <i>Fusarium</i>.

Ro5			<i>Fusarium sp</i>	SINAR 1 seul isolat concerné et testé	• Sur PDA, isolat de couleur blanche devenant jaune-orangé puis rosâtre en vieillissant, relativement épais et avec un aspect duveteux. Croissance moyenne. • Sur MAA, isolat de couleur de couleur blanche devenant rosâtre teinté de jaune-orangé en vieillissant et ayant un aspect duveteux. Croissance très lente. • Supposé <i>Fusarium</i>.
V1			<i>Trichoderma</i>	AMARE 1 seul isolat concerné et testé SINAR 5 isolats concernés 4 isolats testés	• Sur PDA, isolat au mycélium incolore et aux fructifications concentriques de couleur vert-bleu foncé et nettement marquées. Croissance très rapide. • Sur MAA, isolat au mycélium incolore et aux fructifications concentriques de couleur vert-bleu foncé. Croissance très rapide. • Supposé <i>Trichoderma</i>.
V2			<i>Trichoderma</i>	SINAR 3 isolats concernés 2 isolats testés	• Sur PDA, isolat au mycélium incolore et aux fructifications de couleur vert –bleu dispersées de façon concentrique. Croissance très rapide. • Sur MAA, isolat au mycélium incolore et aux fructifications concentriques de couleur vert-bleu clair et nettement marquées • Supposé <i>Trichoderma</i>.

V3	 	Trichoderma	SINAR 3 isolats concernés 2 isolats testés	- Sur PDA, isolat au mycélium incolore et aux fructifications de couleur vert très clair dispersées de façon radiale. - Sur MAA, isolat au mycélium incolore et aux fructifications concentriques de couleur vert clair et relativement marquées. - Supposé <i>Trichoderma</i>.
V4	 	Trichoderma	AMARE 1 seul isolat concerné et testé	- Sur PDA, isolat au mycélium incolore et aux fructifications de couleur vert-bleu foncé dispersées sur l'ensemble de la boîte. Croissance très rapide. - Sur MAA, isolat au mycélium incolore et aux fructifications de couleur vert-bleu foncé recouvrant la (quasi) totalité de la boîte. Croissance très rapide - Supposé <i>Trichoderma</i>.

Annexe VI : Résultats des taux de survie des plantules chez *Sinapis arvensis*



Isolats pour lesquels les plantules ont été partiellement ou totalement colonisées



	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : Gestion Durable du Végétal (GDV) Enseignant référent : Alexandre Degrave	
Auteur : Liu-Ji Harada Date de naissance* : 19/02/1994	Organisme d'accueil : INRA-Centre Dijon Adresse : 17 Rue Sully, 21000 Dijon, France	
Nb pages : 92 (dont 37 hors-annexes) Annexes : 6	Maître de stage : Jean-Philippe Guillemain	
Année de soutenance : 2016		
Titre français : Bioherbicide fongiques : recherche de champignons telluriques à action pathogène sur les semences d'adventices. Titre anglais : Fungal bioherbicide : researching soil-borne fungi with pathogenic effect on weed seeds		
Résumé : Le biocontrôle des adventices a principalement recours à des organismes vivants. Les champignons font partie des microorganismes qui présentent des potentialités d'usage en tant que bioherbicide, mais très peu ont été recherchés pour maîtriser le stock semencier. L'objectif de notre étude est de mettre en évidence la présence de candidats fongiques à action bioherbicide au sein du microbiote du stock semencier d'adventices en ciblant notre étude sur les deux espèces adventices <i>Amaranthus retroflexus</i> et <i>Sinapis arvensis</i>. Les effets pré-émergence et post-émergence ont été étudiés. 51 champignons ont été isolés de semences d'<i>A. retroflexus</i> extraites de sols agricoles et testés pour leur activité pathogène sur des semences de la même espèce. De même 65 isolats <i>S. arvensis</i> ont été testés sur ces semences. L'analyse des taux d'émergence des plantules a révélé sept champignons ayant des effets inhibiteurs de pré-émergence significatifs sur <i>S. arvensis</i>. Cinq d'entre eux sont capables de réduire le taux d'émergence de 40%, un de 75%, le dernier de 100%. Le dispositif expérimental ne nous a cependant pas permis d'exploiter les résultats d'<i>A. retroflexus</i>, ni de détecter des champignons à effet post-émergence. Bien qu'ils doivent être validés, ces résultats sont encourageants car ils augurent de l'identification de candidats bioherbicides au sein de la communauté fongique d'origine tellurique.		
Abstract : Weed biocontrol requires mostly the use of living organisms. Fungi are part of the microorganisms which have a potential use as bioherbicide, but very few of them were considered for weed seed-bank control. The goal of our study is to find fungal candidates which have a bioherbicidal action in the weed seed-bank microbiota and by focusing our study on the two weed species <i>Amaranthus retroflexus</i> et <i>Sinapis arvensis</i>. Both pre-emergence and post-emergence effects were considered. 51 fungi were isolated from and tested on seeds of <i>A. retroflexus</i> and 65 on <i>S. arvensis</i>. The analysis of the emergence rates results revealed seven fungi which have significant pre-emergence effects on <i>S. arvensis</i>. Five are able to reduce the seedlings emergence rate by 40%, one by 75%, and one by 100%. However, the experimental procedure didn't allow us to exploit the results of <i>A. retroflexus</i> and no fungi exhibiting post-emergence action were detected. Although they need to be validated, the results are encouraging because they predict the coming identification of bioherbicides candidates in the soil-borne fungal community.		
Mots-clés : Endophyte ; microbiote ; taux d'émergence ; <i>Amaranthus retroflexus</i> ; <i>Sinapis arvensis</i> Key Words: Endophytic ; microbiota ; emergence rate ; <i>Amaranthus retroflexus</i> ; <i>Sinapis arvensis</i>		

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