



HAL
open science

Recherche de microorganismes d'origine tellurique à action herbicide

Lucie Guinchard

► **To cite this version:**

Lucie Guinchard. Recherche de microorganismes d'origine tellurique à action herbicide. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01644305

HAL Id: dumas-01644305

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01644305>

Submitted on 22 Nov 2017

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

**AGROCAMPUS
OUEST**

CFR Angers

CFR Rennes



Année universitaire : 2016-2017

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)

Recherche de microorganismes d'origine tellurique à action herbicide

Par : Lucie GUINCHARD

Soutenu à Angers le 26/09/2017

Devant le jury composé de :

Président : Patrice CANNAVO, Enseignant-chercheur
Agrocampus Ouest

Maître de stage : Jean-Philippe GUILLEMIN,
Enseignant-chercheur Agrosup Dijon

Enseignant référent : Nicolas CHEN, Enseignant-
chercheur Agrocampus Ouest

Josiane LE CORFF, Enseignante-chercheuse
Agrocampus Ouest

Christophe LEMAIRE, Enseignant-chercheur
Université d'Angers

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

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»

disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

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

Date et signature du maître de stage ⁽²⁾ : 18/09/2017



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

Droits d'auteur

L'auteur ⁽³⁾ Guinchard Lucie

autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement ⁽⁴⁾

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

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

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

Date et signature de l'auteur : 18/09/2017

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

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

Oui Non

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

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement ⁽⁴⁾

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

(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

Table des matières

Fiche de confidentialité	
Table des matières	
Remerciements	
Liste des figures et tableaux	
Prologue : Présentation de la structure d'accueil	1
Introduction	1
I. Adventices et stock semencier	1
I.1) Les divers problèmes causés par les adventices dans les cultures	1
I.2) Méthodes de gestion du stock semencier	2
I.2.1) Produits phytopharmaceutiques	2
I.2.2) Pratiques culturales et méthodes mécaniques	3
I.2.3) Biocontrôle.....	3
II. Interactions champignon-semence.....	6
II.1) Mécanismes de colonisation des semences par les champignons.....	6
II.2) Mécanismes de défense des semences.....	7
II.3) Des microorganismes fongiques pathogènes des semences adventices	7
III. Présentation du contexte, de la problématique du stage et de la démarche	8
Matériel et méthode	10
I. Matériel vivant	10
I.1) Souches fongiques utilisées	10
I.2) Semences utilisées	10
I.2.1) <i>Sinapis arvensis</i>	11
I.2.2) <i>Amaranthus retroflexus</i>	11
I.2.3) <i>Lolium perenne</i>	12
I.2.4) <i>Brassica napus</i>	12
II. Tests de pathogénicité et de sensibilité.....	12
II.1) Inhibition de germination	12
II.2) Sensibilité des candidats à la viabilité et à la diversité spécifique des semences	14
II.3) Fontes de semis sur plantules	15
III. Analyses statistiques.....	16
Résultats	17
I. Tests de pathogénicité.....	17
I.1) Fontes de semis sur plantules	17
I.2) Inhibition de germination	17
II. Sensibilité des candidats à la viabilité et à la diversité spécifique des semences	20
Discussion	23
I. Test d'induction de fontes de semis sur plantules.....	23
II. Test d'inhibition de germination.....	23
III. Sensibilité des candidats à la viabilité et à la diversité spécifique des semences.....	24
Conclusion	25
Bibliographie	26

Sitographie	31
Annexes	32

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Philippe Guillemain et Christian Steinberg pour leur encadrement, leur disponibilité et leurs conseils qui ont fait de ce stage une expérience extrêmement riche en apprentissages. Je souhaite également remercier l'ensemble des membres de l'équipe Foxy pour leur accueil chaleureux, en particulier Nadine Gautheron pour son aide dans les manipulations expérimentales, son expérience, sa patience et sa pédagogie, Elodie Gautheron pour son aide, sa bienveillance et le meilleur cadeau de pendaison de crémaillère qui puisse exister, et Véronique Edel-Hermann pour ses conseils avisés et sa bonne humeur. Un grand merci à Carole Reibel et Marion Triolet qui en plus d'avoir été de bonne compagnie ont toujours été de très bon conseil. Merci à Karine et Damien pour leur aide.

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Nombre de produits de biocontrôle contre les adventices introduits sur le marché mondial par décennie.....	4
Figure 2 : Différents facteurs pouvant influencer l'évolution d'un stock semencier.....	6
Figure 3 : Plant et semences de <i>Sinapis arvensis</i>	11
Figure 4 : Plant et semences d' <i>Amaranthus retroflexus</i>	11
Figure 5 : Plant et semences de <i>Lolium perenne</i>	12
Figure 6 : Plant et semences de <i>Brassica napus</i>	12
Figure 7 : Méthode du test d'inhibition de germination.....	13
Figure 8 : Disposition des éléments dans une boîte du test d'évaluation de la sensibilité des souches fongiques à la viabilité des semences.....	15
Figure 9 : Contenu d'une chambre climatique.....	15
Figure 10 : Méthode d'inoculation des mini-mottes.....	16
Figure 11 : Nombre de semences de <i>S.arvensis</i> germées après 14 jours en présence de chacune des souches fongiques testées.....	17
Figure 12 : Nombre de semences de <i>A.retroflexus</i> germées après 14 jours en présence de chacune des souches fongiques testées.....	18
Figure 13 : Nombre de semences de <i>L.perenne</i> germées après 14 jours en présence de chacune des souches fongiques testées.....	18
Figure 14 : Nombre de semences de <i>B.napus</i> germées après 14 jours en présence de chacune des souches fongiques testées.....	19
Figure 15 : Effet de la souche 1964 sur les semences du test d'inhibition de germination en comparaison avec une boîte témoin.....	19
Figure 16 : Test de sélectivité sur <i>Penicillium</i> après 3 et 7 jours.....	20
Figure 17 : Sensibilité des souches fongiques à la viabilité des semences.....	20
Figure 18 : Sensibilité des différentes souches fongiques à la diversité spécifique des semences.....	21
Figure 19 : Souche 1964 : Croissance plus importante du côté des semences de moutarde que du côté des semences d'amarante en comparaison avec une boîte témoin sans semences.....	21
Tableau 1 : Récapitulatif des champignons testés en 2017.....	10
Tableau 2 : Résultats du test HSD de Tukey pour les souches ayant eu des résultats significatifs aux tests de sensibilité.....	22

PROLOGUE : présentation de la structure d'accueil

L'UMR Agro-écologie est une Unité Mixte de Recherche placée sous la triple tutelle d'AgroSup Dijon, de l'INRA et de l'Université de Bourgogne. Elle accueille actuellement environ 220 personnes titulaires et une centaine de personnes non titulaires, incluant doctorants, post-doctorants et CDD. Sa mission vise à progresser dans la connaissance des interactions biotiques (en particulier plantes-plantes et plantes-microorganismes) au sein des agrosystèmes afin de concevoir des systèmes de culture innovants respectueux de l'environnement. Les recherches sont conduites à différents niveaux d'intégration (de la molécule à la communauté) et d'échelles spatio-temporelles (microcosme, parcelle, paysage, cycle de culture, rotation,...). Elles mettent en œuvre des expertises complémentaires dans les domaines de l'agronomie, l'écologie, la biologie, la physiologie et l'écophysiologie, la génétique, la microbiologie et la modélisation.

L'UMR est organisée autour de quatre pôles scientifiques de recherche: BIOme (Biologie et fonctions écosystémiques des sols), GEAPSI (Déterminismes génétiques et environnementaux de l'adaptation des plantes à des systèmes de culture innovants), GESTAD (Gestion durable des adventices) et IPM (Mécanismes et gestion des interactions plantes microorganismes). Il existe une transversalité et des interactions entre ces différents pôles. C'est dans le cadre de cette transversalité que j'ai effectué mon stage, au sein d'une part de l'équipe "Ecologie des champignons phytopathogènes d'origine tellurique" (Foxy), animée par Christian Steinberg et appartenant au pôle IPM, et d'autre part au sein de l'équipe "Ecologie, évolution et adaptation des adventices" (E2A2) animée par Jean Philippe Guillemain et appartenant au pôle GESTAD. Ces deux équipes interagissent pour promouvoir l'utilisation des champignons du sol comme levier de gestion des adventices.

INTRODUCTION

La protection des cultures est l'un des enjeux majeurs du monde agricole actuel. En effet, la diversité des agents pathogènes et des ravageurs capables de menacer la bonne conduite des cultures est large, allant des microorganismes aux animaux en passant par les plantes adventices. Ces bioagresseurs peuvent être à l'origine de dommages parfois irréversibles aux cultures ou d'une diminution significative de la production. Leur gestion doit donc concilier des problématiques économiques, sociales et sanitaires. Depuis les années 1970, la recherche se tourne de plus en plus vers des moyens de lutte plus respectueux de l'environnement et de la santé humaine, et privilégiant des approches système.

I. Adventices et stock semencier

I.1) Les divers problèmes causés par les adventices dans les cultures

On qualifie d'adventice toute espèce végétale se développant accidentellement dans les cultures (Boullard, 1965). Du fait de leur bonne adaptation à leur milieu, les adventices représentent une compétition pour et les ressources nutritives de la culture. Dans certains cas, comme celui de l'orobanche, de la cuscute ou du striga, les adventices sont parasites et se nourrissent directement des ressources produites par leur plante-hôte jusqu'à sa mort. A titre d'exemple, dans les parcelles de colza très infestées, l'orobanche rameuse peut entraîner plus

de 90% de perte de production [1]. Certaines plantes adventices sont également très attractives pour des ravageurs de cultures ou des insectes vecteurs d'agents pathogènes. Cela entraîne l'apparition de foyers de maladies au sein des parcelles agricoles pouvant s'attaquer à la culture et/ou se maintenir entre deux périodes de culture (Van Bogaert et al., 2015, Thompson et al., 2015). Dans les cultures porte-graines, l'abondante production de semences des adventices peut polluer les lots de récolte et ainsi diminuer la qualité de la production. Ainsi, *Solanum nigrum*, la morelle noire, est une adventice très problématique dans les cultures de pois et de soja dont la récolte est mécanisée. En effet, les baies toxiques de cette plante sont de même dimension que les graines récoltées, ce qui rend les opérations de tri difficiles (Bithell et al., 2014). Certaines adventices représentent un enjeu sanitaire pour l'alimentation humaine et animale. On peut notamment citer le cas de *Datura stramonium*, une Solanacée originaire d'Amérique latine présente en Europe dans les cultures de maïs. Toutes les parties de cette plante, en particulier la tige et les semences, contiennent des alcaloïdes. Ces métabolites secondaires agissent sur le système nerveux entraînant entre autres symptômes des troubles respiratoires et cardiaques. Le datura conserve sa toxicité après fauche et plusieurs cas d'empoisonnement de bétail dus à la contamination des fourrages sont dénombrés chaque année (Cortinovis et Caloni, 2015).

Du fait de leur présence importante en fin de cycle de la culture, certaines adventices peuvent représenter une gêne à la récolte, surtout dans les parcelles où la récolte est mécanisée. La présence des adventices peut également provoquer l'apparition d'un microclimat dans les parcelles agricoles en entretenant une humidité favorable aux maladies ou en augmentant le taux d'humidité des grains, engendrant ainsi des difficultés de conservation post-récolte (Pousset, 2003).

Les adventices sont majoritairement des espèces annuelles avec, pour de nombreuses espèces, une importante production de semences. L'amarante réfléchie (*Amaranthus retroflexus*) par exemple peut produire jusqu'à 40 000 graines par plant [2]. De plus, ces graines sont parfois capables de se conserver dans le sol pendant des décennies, comme les graines de moutarde qui peuvent rester viables pendant 60 ans [3]. L'accumulation de semences dans le sol constitue et accroît au fil des années ce que l'on appelle le stock semencier du sol, permettant ainsi l'émergence d'un nombre toujours plus important d'adventices. Une lutte durable contre les adventices passe donc par la gestion du stock semencier du sol.

I.2) Méthodes de gestion du stock semencier

I.2.1) Produits phytopharmaceutiques

Les produits phytopharmaceutiques utilisés pour réduire le stock semencier sont les herbicides de pré-levée. Ils sont appliqués sur le sol avant la levée de la culture, de façon à éliminer les adventices dès leur germination. Efficaces, peu coûteux et faciles d'utilisation, les herbicides de synthèse sont utilisés massivement dans les cultures depuis leur introduction à la fin des années 1940. Cependant, après la découverte en 1968 de séneçon (*Senecio vulgaris*) résistant à la triazine, les cas de plantes adventices résistantes à diverses substances actives se sont multipliés (Duke, 2011 ; Shaner, 2014 ; Délye et al., 2015). Cela s'explique par une double pression sélective exercée par l'utilisation répétée d'une même substance active. D'une part, l'élimination d'une partie de la flore adventice entraîne une diminution de la compétition pour l'espace et les ressources nutritives pour d'autres espèces adventices non atteintes par la substance active utilisée, facilitant ainsi leur développement. D'autre part, au sein de la population ciblée par la substance active, l'apparition et la reproduction d'individus résistants par mutation génétique est favorisée. En effet, une telle mutation représente un

avantage évolutif conséquent permettant la survie de l'individu résistant jusqu'au stade adulte, lui donnant ainsi la possibilité de se reproduire et donc de transmettre le gène de résistance à ses descendants (Busi et al., 2013). Par ailleurs, il a également été prouvé que certains résidus de ces herbicides sont persistants dans le sol, causant des baisses de rendement pour la culture de l'année suivante (Greenland, 2003) et des dommages environnementaux. En effet, outre la pollution des sols, le lessivage de ces résidus de substances actives par les eaux de pluie et d'irrigation entraîne une pollution des eaux superficielles et souterraines ainsi que d'importants impacts sur la faune et la flore (Marin-Morales, 2013). En réponse à une prise de conscience sociale et à un intérêt croissant pour l'influence des pesticides de synthèse sur l'environnement et la santé publique, des substances actives sont retirées du marché chaque année. Ainsi, la recherche de solutions alternatives se développe.

I.2.2) Pratiques culturales et méthodes mécaniques

Pour réduire le stock semencier du sol, deux types de pratiques culturales sont utilisés : le labour et le faux-semis. Le faux-semis consiste à stimuler la germination des adventices grâce à un travail superficiel du sol puis à détruire les plantules émergées. Il s'effectue avant le semis.

Le labour est un travail du sol à 20-25 cm de profondeur. Il permet l'enfouissement d'environ 90% des semences situées en surface dans le but de réduire voire d'empêcher leur germination et, pour partie, de leur faire perdre leur viabilité (Soltani et al. 2016). En effet, si les semences de certaines dicotylédones peuvent rester dormantes pendant de nombreuses années, les semences de monocotylédones survivent généralement beaucoup moins longtemps (Cardina et al., 2002). En revanche, le labour fait remonter à la surface certaines semences dormantes enfouies au cours des précédentes opérations culturales. S'il a été démontré qu'un labour fréquent associé à l'implantation de cultures de couverture permettait une diminution du nombre de semences adventices présentes dans le sol, allant pour certaines espèces jusqu'à 80% (Mirsky et al., 2010), la pratique du labour présente des inconvénients. En effet, en modifiant la structure du sol, le labour a un fort impact sur sa biodiversité. Sur le long terme, le labour associé à d'autres pratiques culturales peut avoir pour conséquence une diminution significative du taux de matière organique du sol (Sheibani et al., 2013).

I.2.3) Biocontrôle

Le biocontrôle se définit par l'utilisation d'organismes vivants ou de substances d'origine naturelle pour lutter contre les ravageurs, agents pathogènes et adventices des cultures [4]. Parmi les organismes vivants, macroorganismes et microorganismes constituent des approches très différentes de par leur mode de fonctionnement et sont considérés de façon distincte. Depuis les années 1960, on note une augmentation des produits de biocontrôle sur le marché mondial (Figure 1).

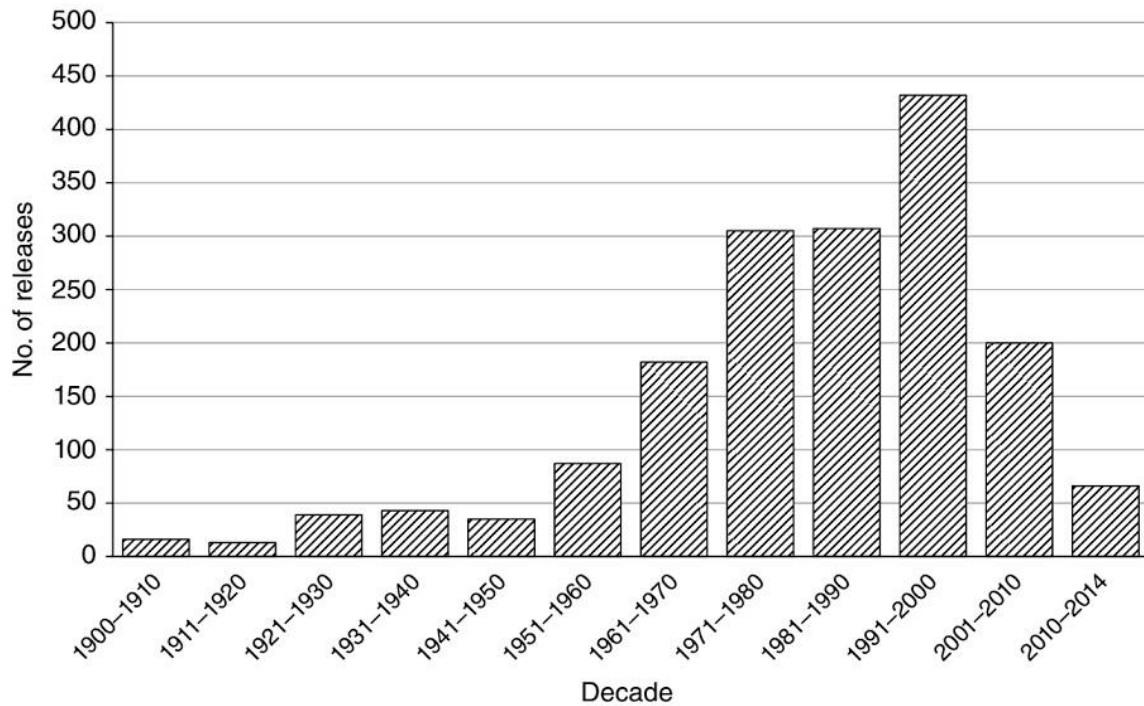


Figure 1 : Nombre de produits de biocontrôle contre les adventices introduits sur le marché mondial par décennie (Shaw et Hatcher, 2017)

Macroorganismes

Les macroorganismes participant à la réduction du stock semencier du sol sont les animaux se nourrissant de semences, c'est-à-dire certains oiseaux, rongeurs et insectes. Parmi les insectes, les Carabidae en particulier font l'objet de recherches dans la lutte contre les adventices par prédation de semences. La réduction du stock semencier par ces insectes serait de 5% en moyenne toutes espèces confondues, selon une étude menée au Royaume-Uni entre 2000 et 2004 sur des parcelles de betterave, maïs et colza (Bohan et al., 2011). Cependant, cette réduction est dépendante des conditions climatiques et impacte plus certaines espèces d'adventices choisies préférentiellement par les insectes (Honek et al., 2003 ; Petit et al., 2014). De plus, la consommation de semences par les Carabidae est fluctuante selon les saisons. Elle est maximale au printemps (Honek et al., 2006). Enfin, il semblerait que les insectes granivores contribuent moins à diminuer le stock semencier du sol qu'à empêcher sa croissance. En effet, une étude sur la prédation par les oiseaux de *Harpalus rufipes* (Coleoptera, Carabidae) conclut qu'une prédation secondaire de 2,8% de la population de *H. rufipes* entraînerait une augmentation du stock semencier de plus de 17% par an (Birthisel et al., 2014).

Substances d'origine naturelle

Les substances d'origine naturelle regroupent une vaste gamme de produits pouvant être d'origine animale, végétale, fongique ou minérale. Les plus étudiées actuellement en tant qu'outil de régulation du stock semencier sont les huiles essentielles, les phytotoxines produites par certains microorganismes et les acides aminés naturels. Ainsi, la méthionine et l'arginine, deux acides aminés, inhibent totalement la germination des graines de *Phelipanche ramosa* L. (une adventice parasite) à une concentration inférieure à 1mM (Vurro et al., 2009).

L'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum* L.) est capable de réduire de plus de 90% le taux de germination des semences de moutarde des champs (*Sinapis arvensis* L.), d'amarante réfléchie (*Amaranthus retroflexus* L.) et de *Lolium* spp. à une concentration de

345,6 mg/L (Campiglia et al., 2007). Autre exemple, l'huile essentielle d'eucalyptus (*Eucalyptus erythrocorys*) de concentration 1,5 µL/mL inhibe à 100% la germination de semences de *S. arvensis* et de *Phalaris canariensis* (Ghnaya et al., 2013).

Il est cependant important de noter que ces résultats prometteurs proviennent d'études réalisées en conditions contrôlées sans application en parcelle cultivée. Des recherches plus poussées concernant l'impact de ces produits sur l'environnement, les plantes cultivées et la santé humaine et animale restent à réaliser (Dayan et Duke, 2014).

Microorganismes

Les microorganismes rassemblent les bactéries, les archeas, les microorganismes filamenteux (champignons et oomycètes) et les virus. Cette catégorie de produits de biocontrôle est de loin la plus explorée par la recherche à l'heure actuelle. Cela s'explique par la diversité de leurs mécanismes d'action et à la possibilité de produire des bioherbicides applicables en champ avec les mêmes dispositifs que les herbicides de synthèse (Brodeur, 2012). Les microorganismes présentent l'avantage d'être plus spécifiques, moins persistants dans le sol (donc plus respectueux de l'environnement) et généralement moins coûteux à produire que les herbicides de synthèse (Harding et Raizada, 2015). L'utilisation de microorganismes pathogènes des semences peut s'effectuer soit par inoculation inondative, soit par une gestion des sols favorable au développement de microorganismes pathogènes des semences adventices déjà présents (Müller-Stöver et al., 2016). Les microorganismes candidats présentés dans la littérature sont généralement issus d'isolements réalisés à partir de plantes symptomatiques (Harding et Raizada, 2015).

Les recherches sur les virus en tant qu'agent de gestion des stocks semenciers du sol sont très marginales, les infections par des virus se faisant sur plantule ou individu adulte. En revanche, de nombreuses études de pathogénicité de bactéries sur semences ont été réalisées. Les espèces *Xanthomonas campestris* et *Pseudomonas fluorescens* en particulier possèdent plusieurs souches ayant fait leurs preuves en tant qu'inhibiteurs de germination de certaines espèces adventices (Harding et Raizada, 2015). *X. campestris* pv. *poae* par exemple est commercialisée au Japon pour lutter contre le pâturin annuel (*Poa annua* L.) (Trognitz et al., 2016). Au sein de l'espèce *P. fluorescens*, trois souches synthétisent des métabolites secondaires responsables d'inhibition de germination pour diverses espèces d'adventices (Banowitz et al., 2008 ; Harding et Razaida, 2015 ; Trognitz et al. 2016).

La recherche d'agents de biocontrôle des adventices parmi les champignons et oomycètes est également très active. Souvent moins spécifiques et moins faciles de production (du fait d'une croissance plus lente) que les bactéries, les microorganismes fongiques comptent néanmoins le plus grand panel de candidats (Harding et Raizada, 2015 ; Trognitz et al., 2016).

Ainsi, il existe une palette de leviers permettant de faire évoluer le stock semencier d'un sol (Figure 2). L'intérêt croissant pour les enjeux environnementaux et les résultats prometteurs obtenus ces dernières années laisse présager de nouvelles avancées dans la recherche de solutions de biocontrôle des semences des adventices.

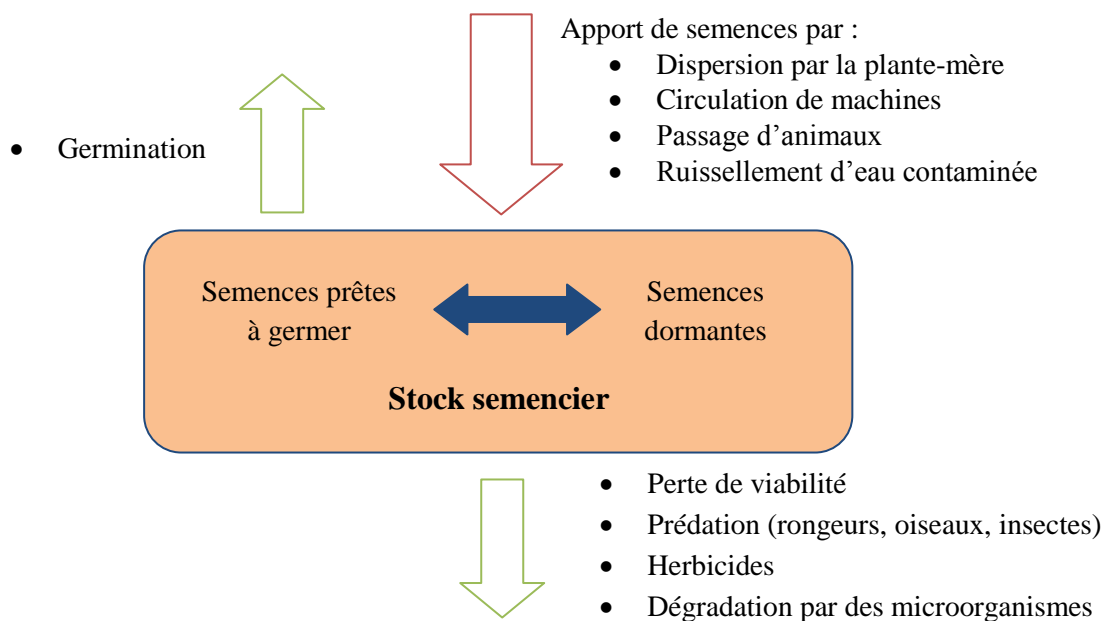


Figure 2 : Différents facteurs pouvant influencer l'évolution d'un stock semencier (production personnelle)

Une large variété de genres de microorganismes fongiques est capable d'inhiber la germination des semences. Cela pose la question des modalités et mécanismes d'interaction entre microorganismes fongiques et semences.

II. Interactions champignon-semence

II.1) Mécanismes de colonisation des semences par les champignons

L'observation des interactions entre le genre *Pythium* et des semences en cours de germination est l'un des premiers modèles permettant l'étude du rôle des molécules exsudées par les semences dans la stimulation des propagules fongiques du sol (Nelson, 1990). Parmi ces molécules, deux groupes sont principalement étudiés pour leur rôle dans l'induction d'une interaction entre semences et champignons pathogènes : les flavonoïdes et les strigolactones. Les flavonoïdes sont connus pour générer un chimiotactisme attractif chez certains oomycètes comme *Phytophthora sojae*, un pathogène du soja (Steinkellner et al., 2007). Des effets spécifiques de stimulation de germination de macroconidies (un type de spore) chez *Fusarium solani* f.sp. *pisi* liés à la présence de flavonoïdes dans les exsudats de racines de pois ont également été observés (Straney et al., 2002). Si les strigolactones ont un rôle dans la signalisation préalable à la mise en place de mycorhizes, aucune étude mettant en évidence leur importance dans la colonisation des semences par les champignons pathogènes du sol n'a été publiée à ce jour (Steinkeller et al., 2007 ; Lopez-Raez et al., 2017).

Une étude réalisée en 2014 s'est intéressée au processus de colonisation par *Fusarium tricinctum* de semences d'*Anisantha tectorum* L. Nevski grâce à la microscopie électronique à balayage. D'après les conclusions de cette étude, les hyphes fongiques se concentrent au

niveau de la cicatrice de rattachement à la plante-mère. Les hyphes pénètrent au niveau de la paroi du caryopse jusqu'à l'embryon puis produisent des ramifications au sein de l'endosperme, entraînant ainsi la destruction de la semence (Franke et al., 2014). La pénétration dans la semence est facilitée par la production d'enzymes telles que l'amylase, la cellulase ou la polyphénol-oxydase par le champignon (Kovacek et al., 2016). Le faible taux de semences dormantes attaquées comparé au fort taux de semences non dormantes colonisées suggère l'importance du rôle d'exsudats dans la mise en place d'interactions pathogène-semence (Franke et al., 2014).

II.2) Mécanismes de défense des semences

Les graines sont l'une des parties les plus protégées des plantes. Pourtant, contrairement aux plantes émergées qui peuvent ajuster leur apport en ressources, elles ne peuvent se défendre contre les bioagresseurs qu'avec des ressources limitées qui diminuent au cours du temps. La germination est la phase critique pendant laquelle les semences sont le plus vulnérables aux agents pathogènes du sol. L'une des stratégies de défense fréquemment rencontrées parmi les semences est donc un processus de germination très rapide. Il en existe trois autres : (i) la disposition de barrières physiques imperméables aux agents pathogènes, (ii) une protection due à une association entre la semence et d'autres microorganismes et (iii) un système de défenses chimiques endogènes (Dalling et al., 2011). Les défenses chimiques citées dans ce dernier point sont situées majoritairement dans le tégument et incluent principalement des composés phénoliques, des alcaloïdes et des protéines antifongiques (Veldman et al., 2007). Une production d'enzymes de défense induite par la présence de microorganismes fongiques pathogènes a en effet été démontrée sur les semences de plusieurs espèces végétales. Ainsi, la folle-avoine (*Avena fatua* L.) placée en présence de *Fusarium avenaceum* produit de la polyphénol-oxydase. Cette réaction se produit aussi bien dans les semences non dormantes que dans les semences dormantes (Fuerst et al., 2014 ; Anderson et al., 2010).

II.3) Des microorganismes fongiques pathogènes des semences adventices

Pour les plantes cultivées, de nombreuses maladies sont dues à des microorganismes fongiques telluriques se développant à la surface ou à l'intérieur des tissus des semences. On peut notamment citer le cas de l'espèce *Fusarium oxysporum*, qui comprend une vaste diversité de formes spéciales et cause d'importants dommages sur plus d'une centaine de cultures d'espèces végétales différentes [5]. Cependant, l'existence même de ces microorganismes fongiques pathogènes et leur capacité à coloniser des semences cultivées représente une source de pistes pour la recherche de formes spéciales spécifiques d'espèces adventices. Un intérêt particulier est apporté dans la littérature à la lutte biologique contre les semences d'adventices parasites. Cela s'explique par le fait que, contrairement au cas des adventices non parasites, la majorité des dommages infligés à la plante par les parasites obligatoires est réalisée avant l'émergence de l'adventice, ce qui implique de porter une attention spéciale à la gestion du stock semencier du sol (Sauerborn et al., 2007 ; Shaw et Hatcher, 2017).

L'une des voies explorées par la recherche est la combinaison de microorganismes fongiques avec des substances stimulant la germination, de manière à favoriser l'attaque des semences dès l'initiation de leur germination. Ainsi, *Fusarium oxysporum* combiné à l'éthéphon entraîne une mortalité de 40% des semences de l'espèce adventice *Abutilon*

theophrasti (Kremer et Schulte, 1989). Cependant, les études réalisées sur semences concernent principalement des champignons ayant des propriétés inhibitrices de germination, comme la souche 4-3-B de *Fusarium oxysporum* qui peut causer une réduction de 30% de la germination de *Striga hermonthica*, ainsi qu'un retard d'émergence de plus de 9 jours (Yonli et al., 2004). Ce phénomène d'inhibition de germination passe par une diversité de mécanismes encore peu connus à l'heure actuelle. Par exemple, certaines souches de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Trichoderma harzianum* et *Botrytis cinerea* sont capables de dégrader la strigolactone, une hormone végétale impliquée dans la germination des semences (Boari et al., 2016). La souche 94-44B du champignon *Phoma macrostoma* commercialisée au Canada produit des macrocidines, des métabolites secondaires inhibiteurs de croissance racinaire. Elle a été isolée à partir de plants symptomatiques de *Cirsium arvense* Scop. et permet le biocontrôle de plus de 38 espèces appartenant à 12 familles de dicotylédones (Bailey et al., 2011).

D'autres microorganismes fongiques pathogènes des semences peuvent provoquer l'apparition de symptômes à divers stades de développement. Pathogène des semences dormantes et non-dormantes, *Aspergillus alliaceus* peut néanmoins attaquer les tissus de l'adventice parasite *Orobanche cernua* Loefl. tout au long de son cycle de vie (Aybecke et al., 2014).

Certains bioherbicides commercialisés comme LockDown™, un produit composé de conidies en suspension de *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* utilisé contre *Aeschynomene virginica* L. dans les cultures de riz et de soja, sont capables entre autres de coloniser ses semences (Hersenhorn et al., 2016). Cependant, aucun bioherbicide fongique n'a encore été développé pour un usage spécifique contre le stock semencier. En effet, les recherches de pathogénicité sur semences, bien que porteuses de résultats encourageants, restent marginales par rapport aux recherches effectuées sur plantules et individus adultes (Shaw et Hatcher, 2017).

III. Présentation du contexte, de la problématique du stage et de la démarche

Cette étude prend la suite d'un stage réalisé en 2016 au cours duquel des semences d'amarante (*Amaranthus retroflexus*) et de moutarde (*Sinapis arvensis*) ont été prélevées dans des parcelles agricoles. Ces graines ont ensuite été utilisées pour en isoler les populations fongiques. Une collection correspondant à un total de 144 souches a ainsi pu être constituée. Après isolement, ces 144 champignons ont été soumis à un test d'inhibition de germination sur graines de moutarde.

Les résultats de ce premier test ont permis de dégager 18 candidats potentiels de lutte biologique. Ces souches ont été purifiées par obtention de monospores (protocole en annexe I) et séquencées pour identification génétique. L'objectif de la présente étude est dans un premier temps de qualifier la pathogénicité potentielle des 18 candidats retenus l'année précédente sur un panel d'espèces végétales élargi par rapport à l'étude préliminaire de 2016. Quatre espèces végétales ont été retenues pour ces expérimentations : les deux espèces étudiées en 2016, (l'amarante et la moutarde) et deux autres espèces, l'ivraie (*Lolium perenne*) et le colza (*Brassica napus* L.).

La moutarde des champs (également appelée sanve) est une dicotylédone annuelle de la famille des Brassicacées. Il s'agit d'une adventice pouvant être problématique dans certaines cultures comme le colza, le tournesol, le pois, le maïs ou diverses céréales. Sa croissance rapide lui confère un fort pouvoir compétitif vis-à-vis de ces cultures. De plus *Sinapis arvensis* est capable de produire 500 à 5 000 graines par individu. Cette forte

production de semences entraîne à la fois un taux de reproduction élevée et une diminution de la qualité des lots de récolte dans les cultures porte-graines. Cette espèce représente en outre une plante-hôte pour certains insectes ravageurs comme les altises ou la mouche du chou (*Delia radicum*) [3].

L'amarante réfléchie est une adventice dicotylédone annuelle de la famille des Amaranthacées. Elle est surtout problématique pour les cultures de fin de printemps ou d'été comme la betterave, la pomme de terre, le maïs, le soja et le tournesol. Sa nuisibilité est principalement due à sa capacité à produire de très nombreuses semences (plus de 10 000 semences par individu) et à la persistance de ces semences dans le sol [2].

L'ivraie (également appelée ray-grass commun) est une monocotylédone annuelle de la famille des Poacées. Il s'agit d'une adventice présente en France notamment dans les vignes, les vergers et les cultures céréalières [6]. Contrairement à *Sinapis arvensis* et *Amaranthus retroflexus*, *Lolium perenne* ne fait pas partie des espèces végétales « d'origine », c'est-à-dire des espèces à partir desquelles les souches fongiques présentées précédemment ont été isolées. L'étude de cette espèce dans les tests de pathogénicité et surtout de sélectivité présente un intérêt car il s'agit d'une monocotylédone, à la différence de la moutarde et de l'amarante étudiées en 2016, et d'une espèce très présente dans les cultures de céréales d'hiver et avec de nombreuses situations décrites de résistance aux herbicides (Salas et al., 2012 ; Liu et al., 2014).

Le colza est une plante annuelle de la famille des Brassicacées. Il s'agit d'une plante cultivée de la même famille que *Sinapis arvensis*. L'intérêt de l'ajouter à la liste des espèces végétales étudiées est de déterminer le degré de spécificité d'action des souches fongiques au sein d'une même famille végétale, entre une adventice et une plante cultivée.

Les expérimentations conduites durant ce stage visent donc à répondre à deux objectifs. Le premier est de caractériser le mode d'action des 18 candidats retenus en 2016, à savoir l'inhibition de germination des semences et/ou la fonte de semis post émergence sur plantules. Les expérimentations seront conduites *in vitro* en laboratoire et sur minimottes en chambres climatiques. Le second est de caractériser la spécificité de l'interaction entre souches fongiques et semences et plus précisément de mesurer la sensibilité des souches fongiques à l'état de dormance ou de non-dormance ainsi qu'à la diversité spécifique des semences. Les expérimentations seront conduites *in vitro* en laboratoire.

MATERIEL ET METHODE

I. Matériel vivant

I.1) Souches fongiques utilisées

Les 18 souches fongiques utilisées sont les candidats potentiels de lutte biologique retenus en 2016 (Tableau 1). A chaque souche a été attribué un numéro MIAE (Microorganisme d'intérêt agronomique ou environnemental). Elles ont été identifiées par séquençage de l'ITS (Internal Transcribed Spacer) au niveau du genre ou de l'espèce. Une souche, MIAE 1963, n'a pas pu être identifiée.

Tableau 1 : Récapitulatif des champignons testés en 2017

N°MIAE de la souche	Genre ou espèce	Plante d'origine
1962	<i>Fusarium solani</i>	<i>Amaranthus retroflexus</i>
1963	Non déterminé	<i>Amaranthus retroflexus</i>
1964	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Amaranthus retroflexus</i>
1965	<i>Talaromyces</i> sp	<i>Amaranthus retroflexus</i>
1966	<i>Penicillium</i> sp	<i>Amaranthus retroflexus</i>
1967	<i>Fusarium solani</i>	<i>Amaranthus retroflexus</i>
1968	<i>Fusarium solani</i>	<i>Amaranthus retroflexus</i>
1970	<i>Fusarium solani</i>	<i>Amaranthus retroflexus</i>
1971	<i>Fusarium solani</i>	<i>Amaranthus retroflexus</i>
1972	<i>Botrytis</i> sp	<i>Sinapis arvensis</i>
1973	<i>Penicillium bilaiae</i>	<i>Sinapis arvensis</i>
1974	<i>Fusarium</i> sp	<i>Sinapis arvensis</i>
1975	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Sinapis arvensis</i>
1977	<i>Trichoderma</i> sp	<i>Sinapis arvensis</i>
1978	<i>Fusarium acuminatum</i>	<i>Sinapis arvensis</i>
1979	<i>Gliocladium</i> sp	<i>Sinapis arvensis</i>
1980	<i>Penicillium</i> sp	<i>Sinapis arvensis</i>
1981	<i>Fusarium solani</i>	<i>Sinapis arvensis</i>

Les souches sont conservées par repiquages successifs sur PDA (Potato Dextrose Agar, 39 g/L), dans des boîtes de Pétri de 45mm de diamètre et incubant à 20°C.

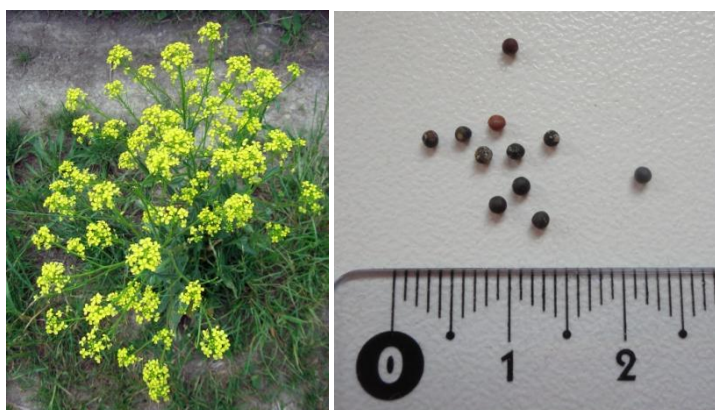
I.2) Semences utilisées

Les semences sont désinfectées quelques heures avant leur utilisation par un bain de 5 minutes dans une solution bactéricide (composée de 50mg/L de chlortetracycline et de 100mg/L de streptomycine dans de l'eau osmosée) suivi de deux bains de 4 minutes constitués respectivement d'éthanol à 70% et d'une solution d'hypochlorite de calcium à 3% + Tween 20. Enfin, les semences sont plongées pendant 5 minutes dans un bain d'eau osmosée stérilisée par autoclavage (20 minutes à 120°C) avant d'être placées dans un pilulier stérile. L'intégralité du processus de désinfection se fait sous agitation constante.

Quatre espèces végétales ont été étudiées : les deux espèces adventices utilisées en 2016 (*Amaranthus retroflexus* et *Sinapis arvensis*) et deux autres espèces dont *Lolium perenne*, le ray-grass, une adventice monocotylédone, et *Brassica napus*, le colza, une plante cultivée de la famille des Brassicacées.

I.2.1) Sinapis arvensis

Les semences de moutarde utilisées proviennent de la société Herbiseed (fournisseur basé au Royaume-Uni) (Figure 3). Elles ont été récoltées en 2006.



Source : Jena Ackersenf, wikicommons, 11/05/2007

Source : production personnelle, 28/08/2017

Figure 3 : Plant (à gauche) et semences (à droite) de *Sinapis arvensis*

Afin de lever leur dormance, les semences de moutarde sont placées pour chacune des expérimentations à l'obscurité à 4°C sur papier de germination humide pendant 14 jours avant le test.

I.2.2) Amaranthus retroflexus

Les semences d'amarante réfléchie utilisées proviennent de la collection de l'INRA (Figure 4). Elles ont été prélevées le 04/11/2005 dans un champ d'asperges sur la commune de Brétigny-sur-Orge (91).



Source : wikicommons, 22/08/2007

Source : production personnelle, 28/08/2017

Figure 4 : Plant (à gauche) et semences (à droite) d'*Amaranthus retroflexus*

I.2.3) Lolium perenne

Les semences d'ivraie utilisées proviennent de la collection de l'INRA (Figure 5). Elles ont été récoltées en 2008 dans une parcelle d'expérimentation de la commune de Puiseaux (45).



Source : wikicommons, 20/04/2007

Source : production personnelle, 28/08/2017

Figure 5 : Plant (à gauche) et semences (à droite) de *Lolium perenne*

I.2.4) Brassica napus

Les semences de colza utilisées ont été récoltées en 2012 sur une parcelle de colza située en Côte d'Or (21) (Figure 6).



Source : pixabay, 10/04/2016

Source : production personnelle, 28/08/2017

Figure 6 : Plant (à gauche) et semences (à droite) de *Brassica napus*

II. Tests de pathogénicité et de sensibilité

II.1) Inhibition de germination

Pour chaque souche fongique : A l'issue de 7 jours de culture à 20°C sur PDA, la colonie est recouverte de 5 mL d'eau stérile puis la surface du milieu est grattée à l'aide d'un cône stérile pour mettre les propagules en suspension (mycélium et spores).

Pour chaque souche, 20 boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant 20 mL de milieu minimum, un milieu minéral gélosé pauvre en carbone (2,5 g de glucose/L, composition en

annexe II) et à la surface duquel une douzaine de billes de verre stérile (diamètre 2 mm) ont été préalablement déposées, sont inoculées avec 100 µL d'inoculat. Le milieu minimum permet une croissance rase du champignon. Les boîtes de Pétri sont agitées à plat et la suspension est étalée à l'aide des billes de manière à former un tapis homogène. Les billes sont ensuite retirées de la boîte et plongées dans la javel pendant environ 12 h puis rincées et autoclavées.

Les boîtes inoculées sont incubées pendant 7 jours à 20°C et à l'obscurité. Après ce délai, un morceau de soie à bluter stérile découpé selon les dimensions de la boîte est déposé sur la surface du milieu sur lequel le champignon s'est développé et plaqué au milieu à l'aide de quelques gouttes d'eau stérile. La soie à bluter permet de créer une barrière physique entre le mycélium et les graines, permettant aux seuls métabolites d'origine fongique et végétale de passer à travers la soie. 10 semences désinfectées de chaque espèce végétale sont déposées sur la soie. L'inoculation ainsi que la mise en place du contenu des boîtes s'effectue sous hotte à flux laminaire. 2 mL d'eau stérile par boîte sont apportés puis les boîtes sont regroupées en piles de 5 et entourées de cellophane pour éviter le dessèchement du milieu. Les boîtes sont incubées à 20°C à l'obscurité (Figure 7). La présence de graines de chaque espèce dans toutes les boîtes permet à la fois d'éviter un biais dans les résultats dû à un effet boîte et d'observer plus facilement, du fait du milieu minimum pauvre en carbone, une stimulation différentielle du métabolisme fongique par les semences se traduisant en retour par une inhibition de germination sélective.

On procède à un premier comptage du nombre de graines germées au bout de 7 jours puis à un second au bout de 14 jours.

Les 18 souches sont testées par groupes de 4 ou 5 souches à la fois, soit 4 groupes. 20 boîtes témoin contenant du milieu minimum non inoculé mais contenant la soie à bluter et les semences sont réalisées pour chaque groupe de champignons, ce qui représente un total de 80 boîtes témoin sur toute la durée du test.

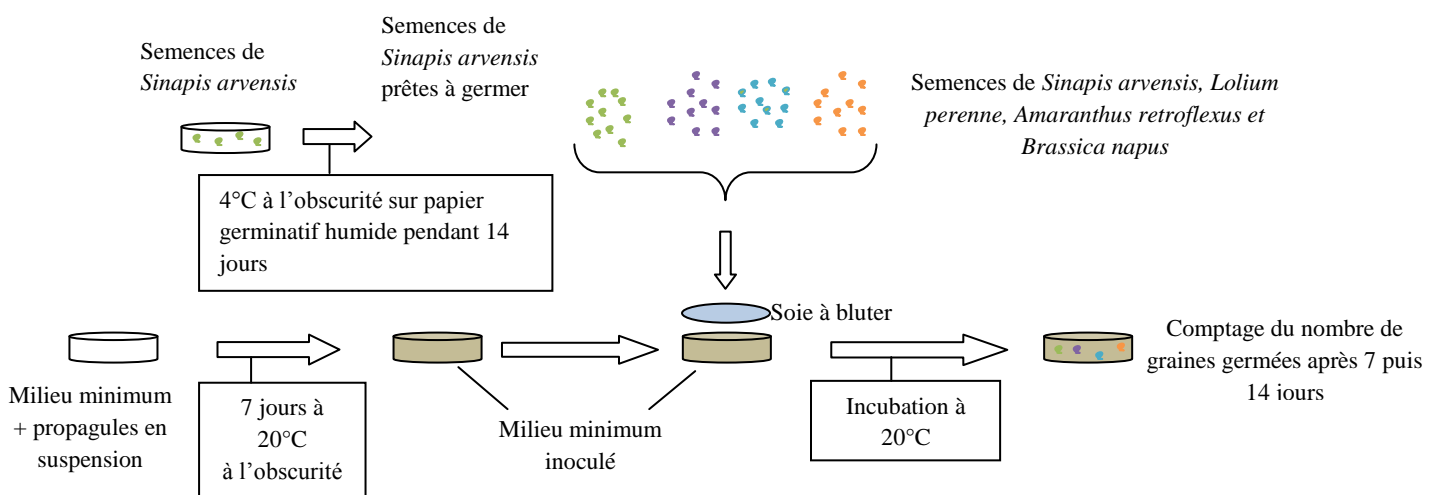


Figure 7 : Méthode du test d'inhibition de germination (production personnelle)

II.2) Sensibilité des candidats à la viabilité et à la diversité spécifique des semences

Un test de sensibilité des champignons à la dormance des semences était initialement prévu. L'évaluation de l'état de dormance ou non-dormance des semences proposé par Schutte et al. (2010) n'étant pas concluant, il a été remplacé par un test de sensibilité des champignons à la viabilité des semences. Le principe consiste à donner au champignon la possibilité de croître en direction d'une semence viable ou d'une semence morte.

La viabilité des semences préalablement désinfectées a été vérifiée en plaçant une centaine de semences de chacune des espèces sur un papier de germination humide pendant 8 jours.

Les semences mortes ont été obtenues en les stérilisant par passage à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes, à l'issue de quoi, un test de viabilité a été conduit comme précédemment pour s'assurer de leur mortalité.

De la même manière, un test de sensibilité des candidats à la diversité spécifique des semences a été conduit en donnant aux champignons la possibilité de croître en direction d'une semence viable d'une espèce ou d'une semence viable d'une autre espèce. Le colza n'a pas été utilisé.

Un explant (diamètre 1 cm) prélevé d'une culture de la souche fongique sur milieu minimum inoculé (7 jours) est placé au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu minimum. Deux axes perpendiculaires ont été préalablement tracés au verso de la boîte. 5 graines viables d'un côté et 5 graines mortes de l'autre sont alignées sur un axe de chaque côté de la rondelle de façon à ce que la première graine soit placée à 1,5 cm du centre de la boîte et que les graines soient espacées de 5 mm entre elles (Figure 8). La préparation des boîtes s'effectue sous hotte à flux laminaire. Les deux lots de 5 graines sont constitués de semences différentes selon 5 modalités :

- Semences de moutarde viables d'un côté et semences de moutarde mortes de l'autre
- Semences d'ivraie viables d'un côté et semences d'ivraie mortes de l'autre
- Semences d'amarante viables d'un côté et semences d'amarante mortes de l'autre
- Semences de moutarde d'un côté et semences d'ivraie de l'autre
- Semences de moutarde d'un côté et semences d'amarante de l'autre

5 modalités de témoins sont également considérées pour chacun des tests présentés ci-avant :

- Semences du lot 1 de chaque côté
- Semences du lot 2 de chaque côté
- Semences du lot 1 d'un côté, pas de semence de l'autre
- Semences du lot 2 d'un côté, pas de semence de l'autre
- Pas de semence dans la boîte, seule un explant de milieu inoculé est placé au centre de la boîte de Pétri

30 répétitions sont réalisées par modalité. Après mise en place du contenu, les boîtes sont incubées dans une étuve à l'obscurité à 20°C. Le développement de chaque souche est suivi quotidiennement et les graines sont retirées de la boîte lorsqu'elles sont situées à moins d'un millimètre de la bordure de colonie du champignon. Après 7 à 13 jours selon la vitesse de croissance de chaque souche, la croissance radiale du champignon est mesurée sur chacun des 4 axes de la boîte entre le bord de la rondelle de milieu inoculé et la lisière du champignon.

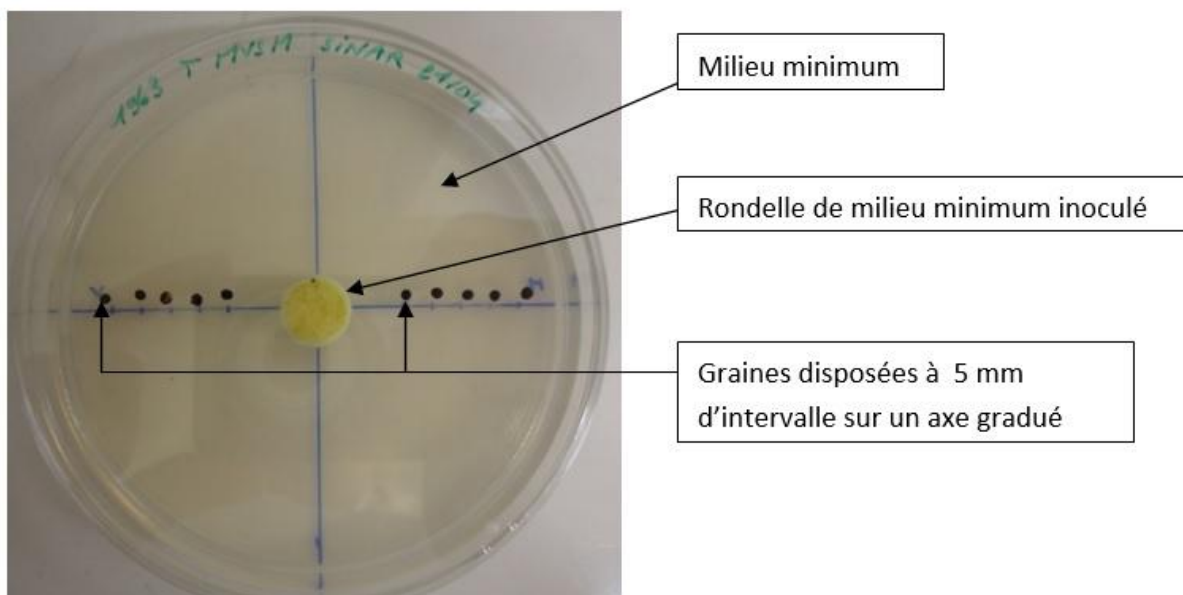


Figure 8 : Disposition des éléments dans une boîte du test d'évaluation de la sensibilité des souches fongiques à la viabilité des semences (production personnelle)

Pour des raisons pratiques, seules les souches 1962, 1963, 1964, 1968, 1972, 1975, 1979 et 1981 ont été considérées pour cette expérience (Tableau 1).

II.3) Fontes de semis sur plantules

Ce second test de pathogénicité se concentre sur l'effet des souches candidates sur les plantules des quatre espèces végétales étudiées. Les graines désinfectées sont semées dans des mini-mottes composées de tourbe dans des plaques de culture de 4 x 10 puits préalablement imbibées d'eau osmosée. Après semis, les plaques sont placées en chambre climatique à 55% d'hygrométrie avec 8 h de lumière à 22°C et 16 h d'obscurité à 18°C par jour. Les mini-mottes sont arrosées régulièrement avec de l'eau osmosée à l'aide d'un pulvérisateur.

12 répétitions de 10 plantes par espèce et par souche testée sont effectuées. Deux répétitions sont conduites simultanément dans deux chambres climatiques séparées. Chaque chambre climatique contient 19 plaques de culture : une pour chaque champignon candidat testé et une plaque témoin (Figure 9).

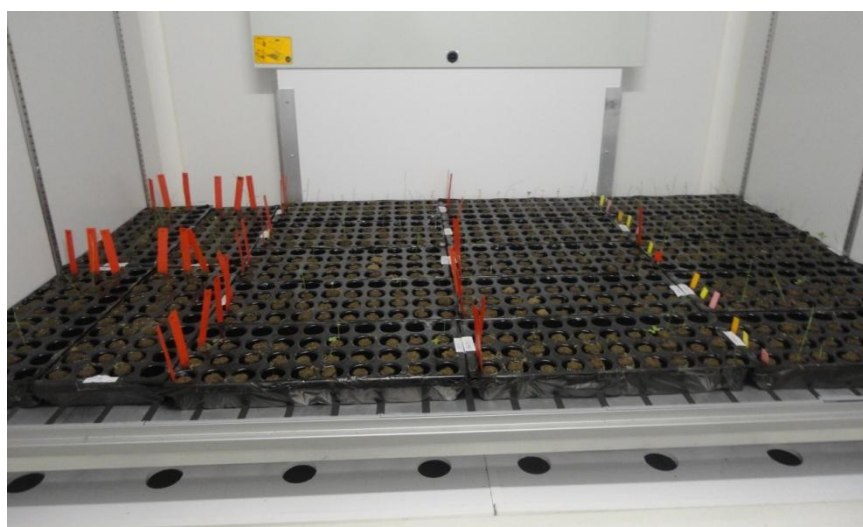


Figure 9 : Contenu d'une chambre climatique (production personnelle)

Parallèlement au semis, 3 boîtes de Pétri de 90mm de diamètre contenant du PDA sont inoculées par souche (soit 54 boîtes en tout) à l'aide de billes de verre stérile sous hotte à flux laminaire. Les boîtes inoculées sont incubées dans une étuve à 20°C à l'obscurité.

Après 7 jours, 15 mL d'eau osmosée stérile sont ajoutés dans chaque boîte et la surface du milieu est grattée à l'aide d'un cône stérile. La suspension de propagules est récupérée dans un flacon gradué, puis le niveau de liquide dans le flacon est ajusté à 85 mL par ajout d'eau osmosée stérile. 1 mL de suspension est apporté par mini-motte pour les 18 souches testées (Figure 10). Les mini-mottes de la plaque témoin reçoivent 1 mL d'eau osmosée.

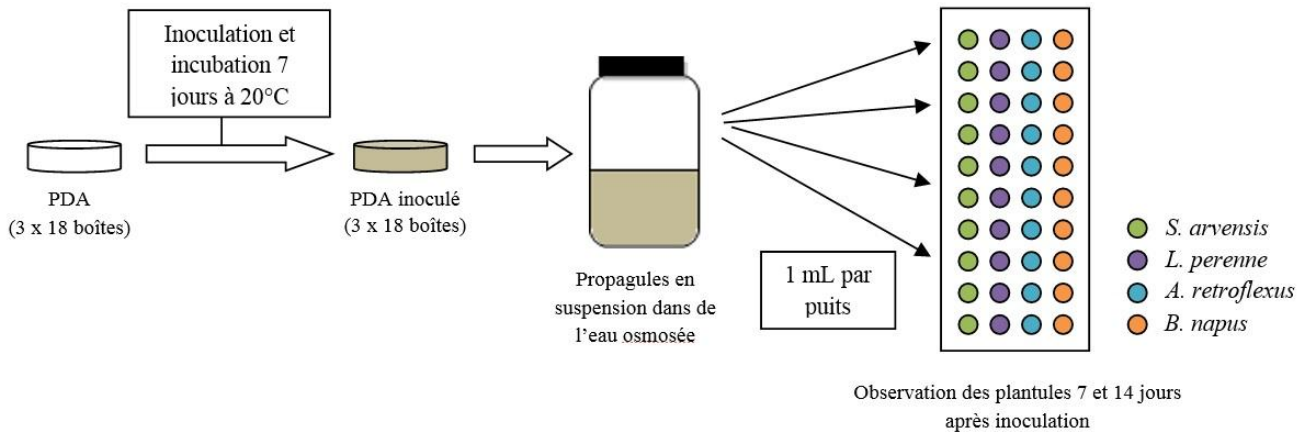


Figure 10 : Méthode d'inoculation des mini-mottes (production personnelle)

7 puis 14 jours après l'inoculation, les collets des plantules sont examinés et comparés avec ceux des plantules témoin pour déterminer la présence ou l'absence de fontes de semis causées par les champignons testés. Après 14 jours, les plantules sont éliminées et les plaques sont stérilisées par trempage dans un bain de javel pendant 12h.

III. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel *Rstudio*. Les données du test d'inhibition de germination ont été normalisées à l'aide d'une transformation angulaire. Par la suite, une ANOVA a été réalisée suivie d'un test HSD (Honestly Significant Difference) de Tukey permettant de comparer les différentes souches et les témoins deux à deux pour chaque espèce végétale.

En ce qui concerne les tests de sensibilité à la viabilité et à la diversité spécifique des semences, la croissance des champignons en direction de chaque lot de semences a été comparée en calculant pour chaque modalité d'une part les rapports $\frac{\text{Croissance en direction des semences mortes}}{\text{Croissance en direction des semences viables}}$ et $\frac{\text{Croissance mesurée sur l'axe "Nord"}}{\text{Croissance mesurée sur l'axe "Sud"}}$ pour les tests de sensibilité à la viabilité des semences et d'autre part les rapports $\frac{\text{Croissance en direction des semences de moutarde}}{\text{Croissance en direction des semences d'amarante ou d'ivraie}}$ et $\frac{\text{Croissance mesurée sur l'axe "Nord"}}{\text{Croissance mesurée sur l'axe "Sud"}}$ pour les tests de sensibilité à la diversité spécifique des semences. Une ANOVA a ensuite été réalisée sur les données de chaque souche suivie également d'un test HSD de Tukey permettant de comparer deux à deux pour chaque souche les modalités testées avec les modalités témoins correspondantes.

RESULTATS

I. Tests de pathogénicité

I.1) Fontes de semis sur plantules

Le test de pathogénicité sur plantules a été abandonné après quatre répétitions en raison du faible nombre de plantules émergées de colza, moutarde et ivraie 7 jours après le semis. Aucune fonte de semis n'a été observée sur les plantules d'amarante.

I.2) Inhibition de germination

Le taux de germination de la moutarde, d'environ 40% sur papier germinatif, s'est révélé de 30% pour les semences placées en conditions expérimentales sur milieu minimum non inoculé. Le test HSD de Tukey a néanmoins permis de dégager 5 souches ayant un effet inhibiteur significatif sur la germination des semences de *S. arvensis* par comparaison de la moyenne du nombre de semences germées après 14 jours avec celle des semences témoin (Annexe III, Figure 11).

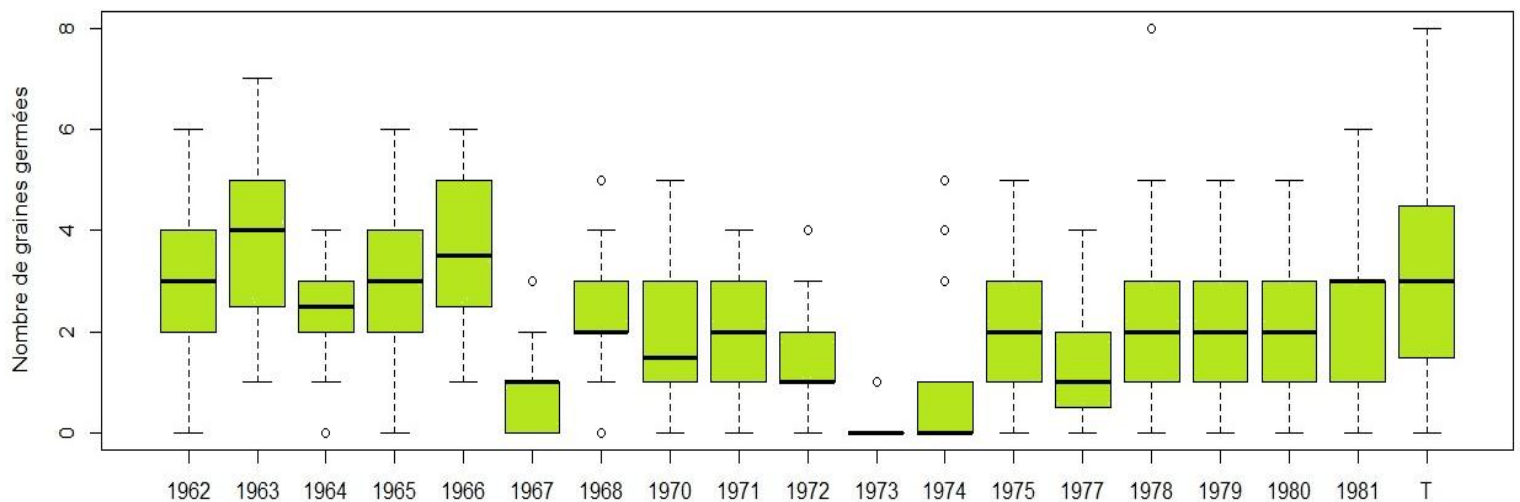


Figure 11 : Nombre de semences de *S.arvensis* germées après 14 jours en présence de chacune des souches fongiques testées

Pour l'amarante, le taux de germination des semences témoin est de plus de 90%. Deux souches ont un effet inhibiteur de germination significatif (Annexe IV, Figure 12).

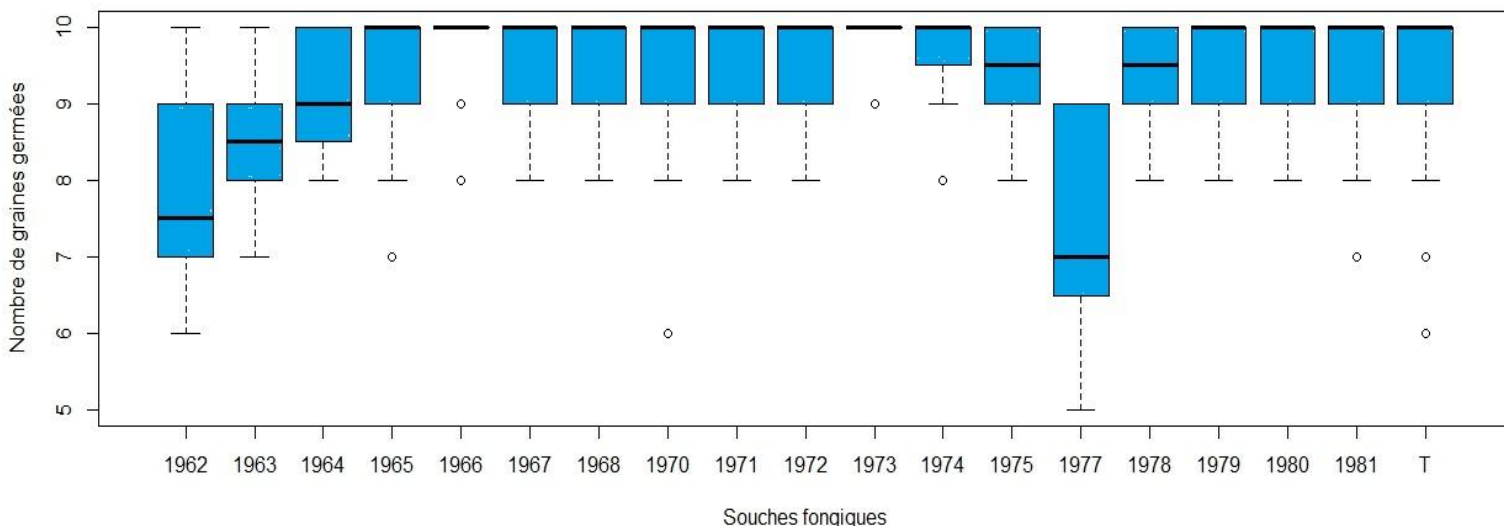


Figure 12 : Nombre de semences de *A. retroflexus* germées après 14 jours en présence de chacune des souches fongiques testées

La majorité des souches testées inhibent la germination des semences d'ivraie. Deux souches se démarquent avec des taux d'inhibition de germination supérieurs à 95%. Il s'agit des souches 1970 et 1971 (Annexe V, Figure 13).

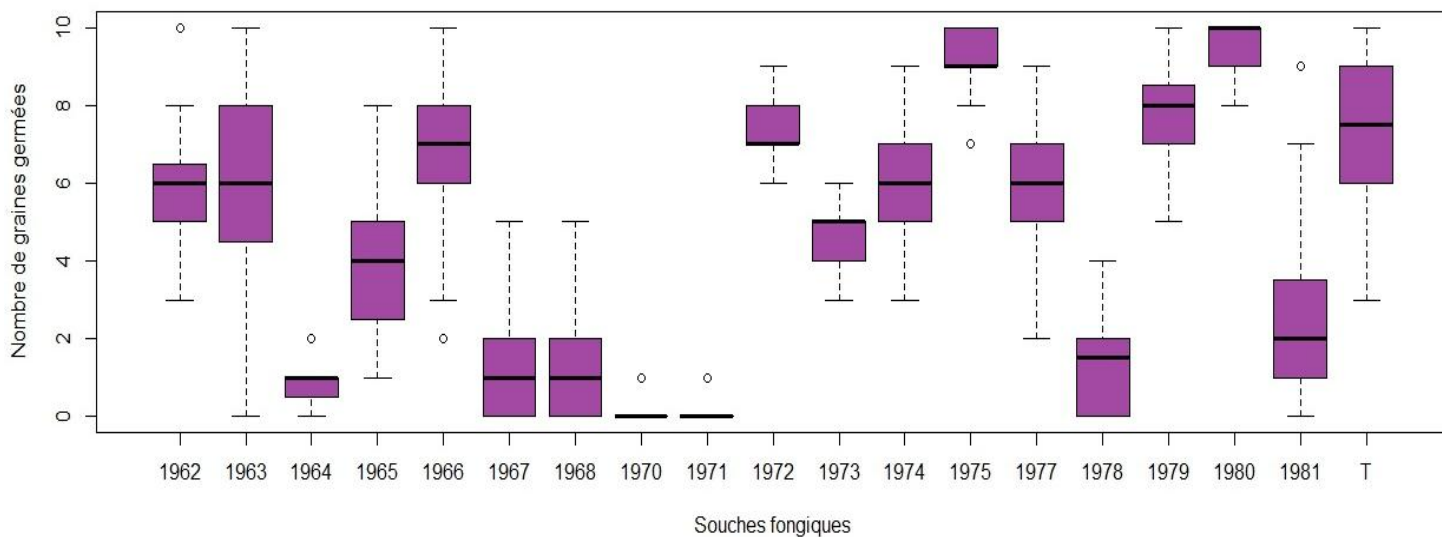


Figure 13 : Nombre de semences de *L. perenne* germées après 14 jours en présence de chacune des souches fongiques testées

Malgré une germination de plus de 90% des semences sur papier de germination, seulement 50% des graines de colza témoins ont germé dans les conditions expérimentales. Seules cinq des souches fongiques testées ne présentent pas d'effet inhibiteur significatif sur colza (Annexe VI, Figure 14). Parmi ces souches, le champignon 1977, du genre *Trichoderma*, est le seul candidat ayant un effet inhibiteur significatif sur les trois espèces adventices considérées avec un taux d'inhibition de germination de 56.6% sur moutarde, 19.5% sur amarante et 19.3% sur ivraie.

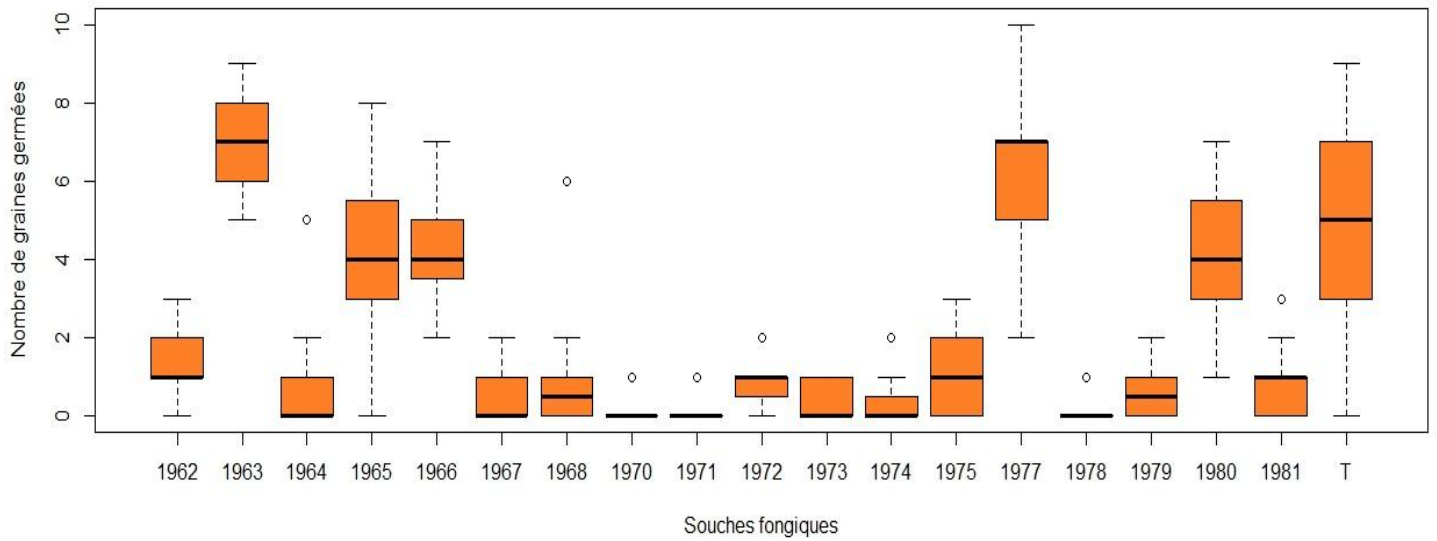


Figure 14 : Nombre de semences de *B.napus* germées après 14 jours en présence de chacune des souches fongiques testées

On remarque que certains champignons comme la souche 1964 présentent une croissance plus importante au contact des semences de colza et de moutarde, allant jusqu'à se développer au point de les recouvrir intégralement (Figure 15). Ce phénomène a été observé uniquement pour des souches de champignons appartenant au genre *Fusarium*.

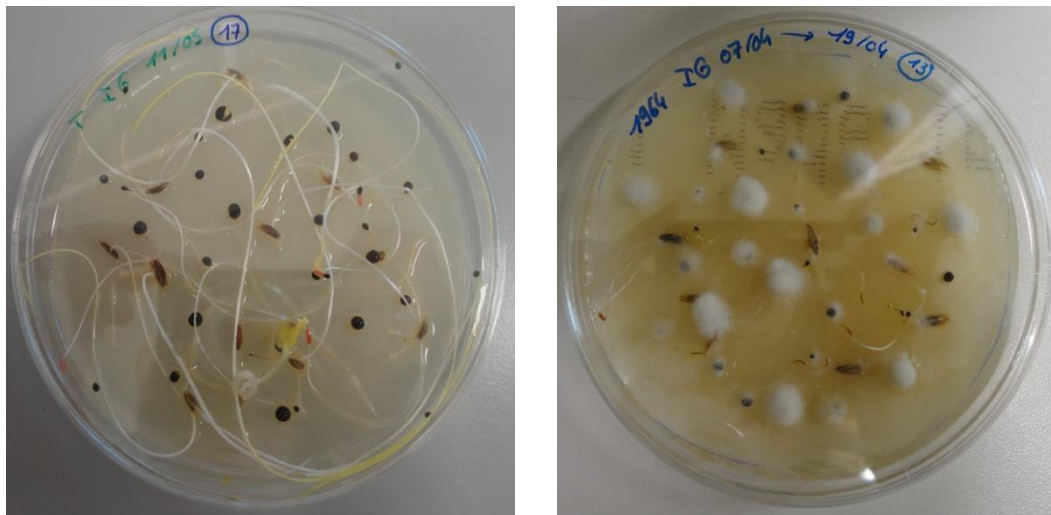


Figure 15 : Effet de la souche 1964 sur les semences du test d'inhibition de germination (à droite) en comparaison avec une boîte témoin (à gauche) (production personnelle)

II. Sensibilité des candidats à la viabilité et à la diversité spécifique des semences

Les champignons à spores sèches comme les souches du genre *Penicillium* ou *Talaromyces* ont été exclus de ce test car, les spores se dispersant dans la boîte au moindre mouvement, le développement du champignon ne pouvait pas être mesuré selon des axes (Figure 16).

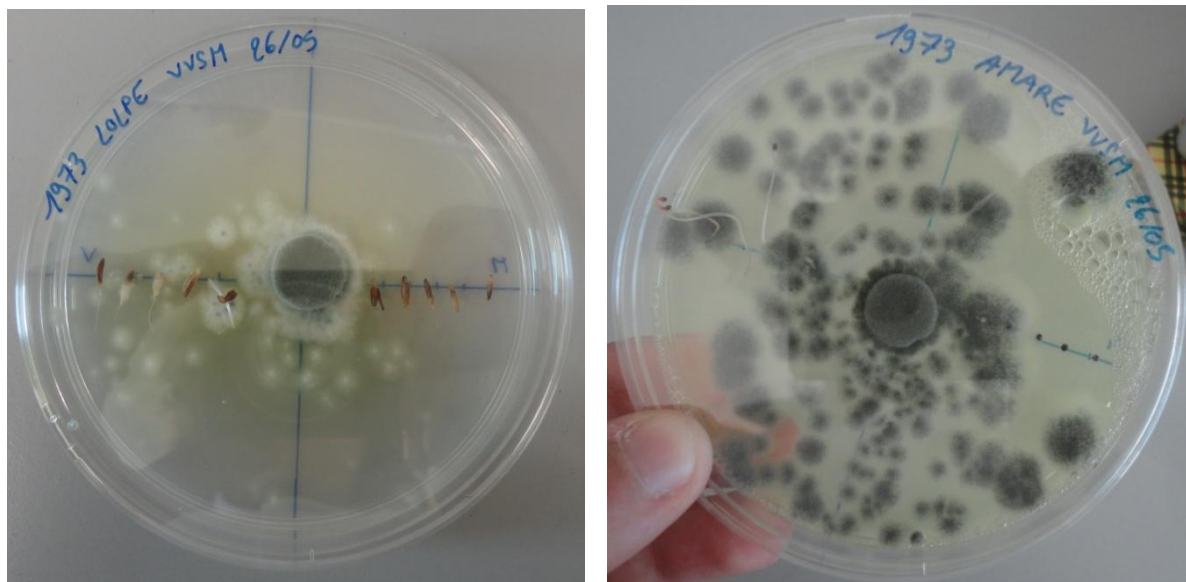


Figure 26 : Test de sélectivité sur *Penicillium* après 3 (à gauche) et 7 (à droite) jours (production personnelle)

L'ANOVA réalisée à partir des rapports concernant les axes sur lesquels aucune semence n'a été déposée ne montre aucune différence significative entre les différentes modalités.

Parmi les différents tests de sensibilité à la viabilité des semences, seule la souche 1975, *Fusarium equiseti*, a fait preuve d'une croissance significativement plus importante du côté des semences d'ivraie mortes que de celui des semences d'ivraie viables (Figure 17, Tableau 6). On peut donc émettre l'hypothèse d'une inhibition de croissance exercée par les semences viables d'ivraie sur la souche 1975.

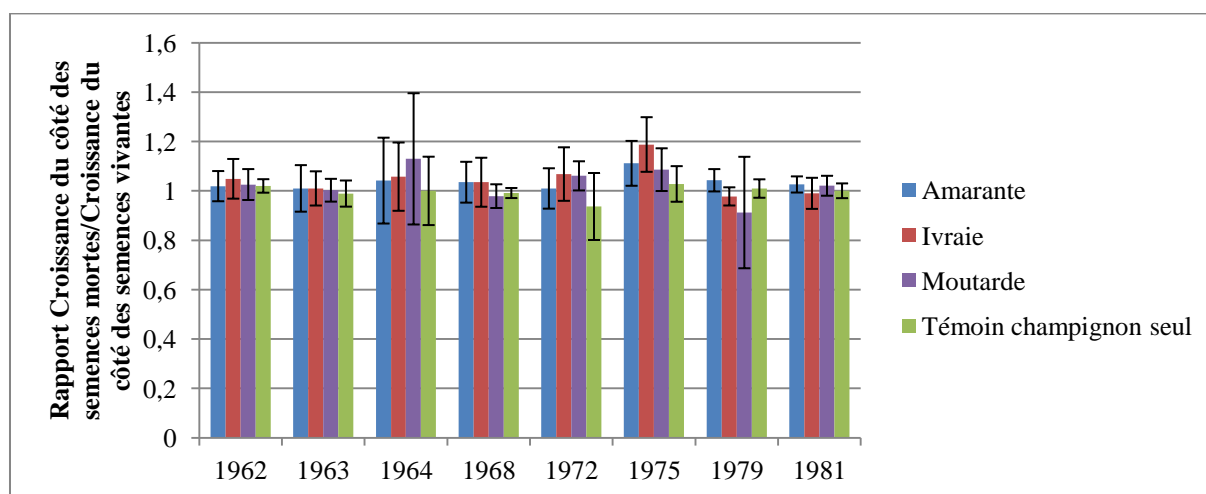


Figure 17 : Sensibilité des souches fongiques à la viabilité des semences. Barres d'erreur : écarts-type

Lors des tests de sensibilité à la diversité spécifique des semences, deux souches ont eu des croissances significativement différentes en direction des lots de graines. Il s'agit des souches 1964 (*Fusarium oxysporum*) et 1975 (Figure 18, Tableau 6). Le test comparant ivraie et moutarde n'a pas pu être mené à terme pour les souches 1963 et 1979 en raison de contaminations du milieu de culture.

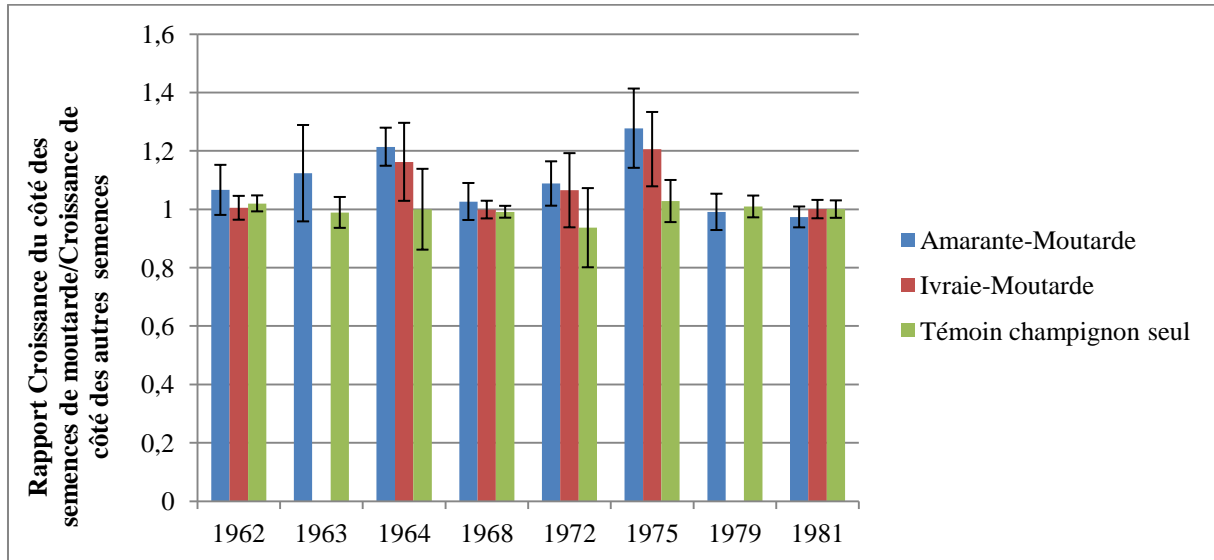


Figure 18 : Sensibilité des différentes souches fongiques à la diversité spécifique des semences. Barres d'erreur : écarts-types

En présence de semences viables d'amarante d'un côté et de moutarde de l'autre, la souche 1964 se développait plus du côté de la moutarde que du côté de l'amarante (Figure 19).

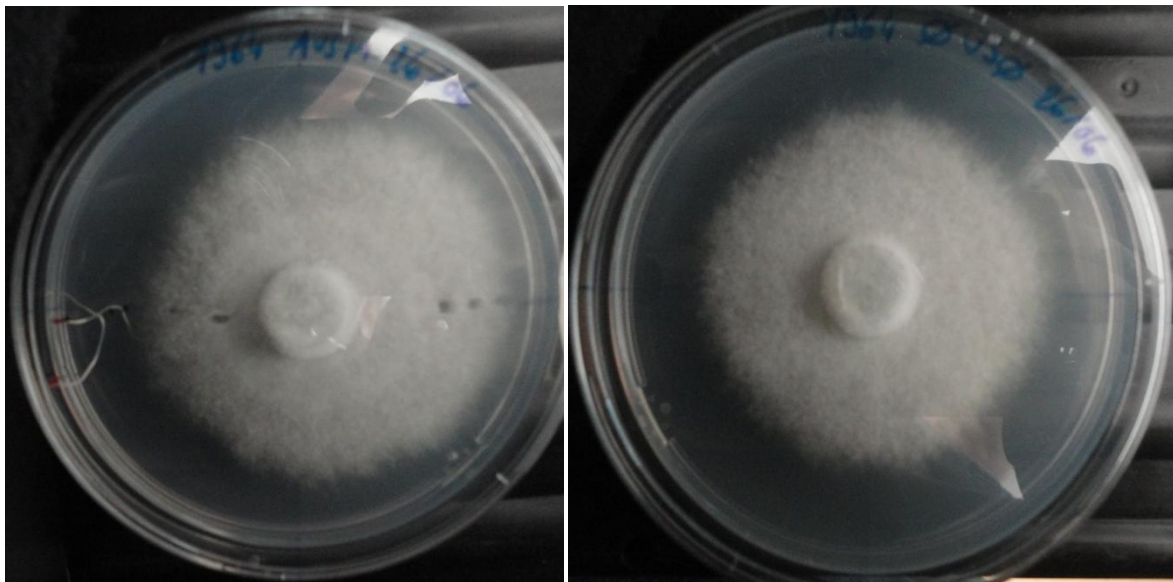


Figure 19 : Souche 1964 : Croissance plus importante du côté des semences de moutarde que du côté des semences d'amarante en comparaison avec une boîte témoin sans semences (production personnelle)

La souche 1975 avait le même comportement pour les deux tests de diversité spécifique réalisés avec une croissance plus importante du côté des semences de moutarde que du côté des semences d'ivraie ou d'amarante (Figure 18, Tableau 6).

Un test HSD de Tukey a permis de comparer deux à deux les rapports de mesures de croissance en direction des différents lots de semences des modalités testées avec les ceux des modalités de témoin correspondantes pour les souches 1964 et 1975 (Tableau 2). Dans le cas des tests de sensibilité à la diversité spécifique des semences, on observe que la seule modalité témoin qui ne soit pas significativement différente des modalités testées (amarante-moutarde et ivraie-moutarde) est la modalité « Semences de moutarde d'un seul côté ». Cela appuie l'hypothèse d'une attraction exercée par les semences de moutarde et non d'une inhibition de croissance exercée par les autres semences.

Tableau 2 : Résultats du test HSD de Tukey pour les souches ayant eu des résultats significatifs aux tests de sensibilité

Souche	Modalités comparées	Différence de rapport de croissance	p-valeur
1964	Amarante-Moutarde/Champignon seul	0,082	$4,76.10^{-4}$
	Amarante-Moutarde/Amarante seule d'un côté	0,105	$2,81.10^{-6}$
	Amarante-Moutarde/Amarante de chaque côté	0,079	$7,67.10^{-4}$
	Amarante-Moutarde/Moutarde seule d'un côté	-0,037	0,38
	Amarante-Moutarde/Moutarde de chaque côté	-0,098	$1,44.10^{-5}$
1975	Ivraie-Moutarde/Champignon seul	0,080	0,07
	Ivraie-Moutarde/Moutarde seule d'un côté	-0,091	0,11
	Ivraie-Moutarde/Moutarde de chaque côté	-0,076	0,03
	Ivraie-Moutarde/Ivraie seule d'un côté	0,211	$2,36.10^{-9}$
	Ivraie-Moutarde/Ivraie de chaque côté	-0,132	$2,78.10^{-4}$
1975	Amarante-Moutarde/Champignon seul	0,110	0,03
	Amarante-Moutarde/Amarante seule d'un côté	0,130	$6,23.10^{-3}$
	Amarante-Moutarde/Amarante de chaque côté	0,148	$1,11.10^{-3}$
	Amarante-Moutarde/Moutarde de chaque côté	-0,126	$8,61.10^{-3}$
	Amarante-Moutarde/Moutarde seule d'un côté	0,013	0,99
1975	Ivraie : semences viables-semences mortes/Champignon seul	0,105	$6,65.10^{-4}$
	Ivraie : semences viables-semences mortes/Semences mortes d'ivraie de chaque côté	0,091	$2,84.10^{-2}$
	Ivraie : semences viables-semences mortes/Semences d'ivraie mortes seules d'un côté	-0,073	0,14
	Ivraie : semences viables-semences mortes/Semences d'ivraie viables seules d'un côté	0,210	$2,20.10^{-9}$
	Ivraie : semences viables-semences mortes/Semences d'ivraie viables de chaque côté	-0,116	$1,94.10^{-3}$

DISCUSSION

Le but de ce stage était d'évaluer la pathogénicité sur semences et plantules et la sensibilité à la viabilité et à la diversité spécifique des semences de 18 souches fongiques. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une inhibition de germination par certains champignons sur les semences des quatre espèces végétales étudiées et l'existence d'une influence exercée par les semences sur le développement de deux souches fongiques : la souche 1964 et la souche 1975. Ces résultats prometteurs sont cependant à nuancer.

I. Test d'induction de fontes de semis sur plantules

Le faible taux de germination des semences amène à repenser le protocole d'expérimentation. L'obtention d'un plus grand nombre de plantules peut s'envisager soit en modifiant les conditions de semis par exemple en utilisant un substrat différent comme un mélange de terreau et de perlite soit en utilisant des semences ayant germé en amont sur papier germinatif.

Par ailleurs, aucune fonte de semis n'a été observée sur les plantules ayant émergé dans les chambres climatiques. Cela peut s'expliquer soit par une absence d'induction de fontes de semis par les candidats testés soit par une absence d'installation des champignons dans le milieu expérimental liée au mode d'inoculation utilisé. En effet, il est possible que les microorganismes apportés en suspension aient été lessivés par un arrosage sans avoir eu assez de temps pour s'installer dans le substrat. Cette dernière hypothèse peut être testée en utilisant un témoin positif, c'est-à-dire un microorganisme fongique inoculé de la même façon que les champignons candidats connu pour être pathogène d'une espèce végétale donnée. C'est le cas notamment de *Rhizoctonia solani*, un champignon connu pour induire des fontes de semis sur plantules de pin (Mehrota 1990 ; Huang et Kuhlman 1991 ; Scheuerell et al., 2005). Le mode d'inoculation peut être modifié en plaçant dans le milieu expérimental une couche de substrat relativement absorbante favorisant l'installation du champignon.

II. Test d'inhibition de germination

Parmi les six candidats ayant eu des résultats d'inhibition de germination significatifs sur moutarde lors des tests de 2016, quatre ont obtenu des résultats significatifs cette année : les souches 1972, 1973, 1974 et 1977 avec des différences dans les taux d'inhibition de germination. Cette disparité de résultats s'explique à la fois par un protocole expérimental différent et par un biais apporté par le faible pourcentage global de semences germées. En effet, seulement 30% des semences de *S. arvensis* ont germé dans les conditions expérimentales contre environ 60% en 2016. Ainsi, bien qu'un effet significatif sur la germination des semences ait été mis en évidence pour ces souches, le faible nombre de semences germées peut avoir entraîné une surestimation du taux d'inhibition de germination induit par ces champignons candidats. De plus, les tests d'inhibition de germination de 2016 étaient réalisés dans du terreau et non sur gélose comme dans cette étude. Les ressources trophiques apportées aux champignons étant différentes, il est possible que leur comportement en ait été modifié (Gao et al., 2014).

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence d'une inhibition de germination sélective réalisée par les souches fongiques sur les semences. En effet, les semences des quatre espèces végétales utilisées pour ce test étaient placées ensemble dans les boîtes en présence d'une souche fongique. Or certaines souches présentent des taux d'inhibition de

germination significativement importants sur certaines semences et nuls sur d'autres. C'est par exemple le cas de la souche 1973 qui inhibe la germination de plus de 90% des semences de moutarde et de colza sans avoir d'effet significatif sur la germination des semences d'amarante. Par ailleurs, certains *Fusarium* parmi les souches étudiées ont fait preuve d'une croissance particulièrement importante sur les semences de colza et de moutarde. Or, le champignon étant physiquement séparé des semences par un morceau de soie à bluter, ce phénomène semble indiquer un développement du champignon accru induit par des métabolites produits par ces deux Brassicacées. Ces observations sont cohérentes avec les résultats présentés par Straney et al. en 2002 et Pusztahelyi et al. en 2015 concernant l'existence d'une stimulation de propagules fongiques par des métabolites secondaires d'origine végétale.

La majorité des candidats testés avait une influence significative sur la germination des semences de colza. Cela pose la question de l'impact des candidats sur les plantes cultivées. On note néanmoins que la souche 1977 a un effet inhibiteur significatif sur la germination de l'ivraie, de la moutarde et de l'amarante sans en avoir un sur celle du colza. Des tests complémentaires seraient donc à effectuer sur cette souche pour en déterminer le degré de spécificité d'hôte. Les effets des microorganismes fongiques ont été examinés séparément. On peut cependant envisager l'existence d'un effet conjugué de certaines de ces souches qu'il pourrait être intéressant d'étudier, bien qu'à l'heure actuelle peu d'études aient été réalisées sur ce sujet du fait des problèmes pratiques posés par l'élaboration de « cocktails fongiques » (Hersenhorn et al., 2016).

III. Sensibilité des candidats à la viabilité et à la diversité spécifique des semences

L'étude de la sensibilité des microorganismes fongiques candidats à la viabilité et à la diversité spécifique des semences a permis de dégager deux souches ayant eu une croissance différenciée selon la présence de lots semences différents d'un côté ou de l'autre de la boîte de Pétri. Cependant, seules cinq semences étaient disposées de chaque côté des boîtes de Pétri, espacées entre elles de 5 mm. Les exsudats produits par les semences étaient donc présents en faible quantité dans la gélose. Il pourrait être intéressant d'observer le comportement de microorganismes fongiques mis en présence de concentrations plus importantes, par exemple en augmentant la quantité de semences utilisées. Cette étude a été mise en place en se concentrant sur le rôle des exsudats. L'utilisation de boîtes de Pétri ne permet pas de prendre en compte l'influence potentielle des composés volatils émis par les semences sur la croissance des champignons.

Pour les tests de sensibilité à la viabilité des semences, le but initial était de comparer l'attractivité pour chacun des champignons de graines prêtes à germer à celle de graines dormantes. Cependant, du fait de la difficulté de différencier les semences dormantes des semences prêtes à germer, des graines autoclavées (donc mortes) ont été utilisées à la place des graines dormantes. Ce choix s'est basé sur l'hypothèse selon laquelle les semences dormantes produisent moins d'exsudats que les semences non dormantes. Il est donc fortement probable que des semences dormantes aient été déposées sur gélose avec les semences non dormantes, en particulier pour les semences de moutarde qui, malgré un traitement préliminaire visant à lever la dormance, conservent un pourcentage de germination faible.

Les semences de moutarde, viables comme mortes, produisent un mucilage lorsqu'elles sont placées en milieu humide. Or plusieurs études dans la littérature réalisées sur *Arabidopsis thaliana* suggèrent que les polysaccharides issus du mucilage des semences stimulent la production d'enzymes fongiques (Macquet et al., 2007 ; Yang et al., 2012). Les

tests de sensibilité à la viabilité des semences de moutarde des souches 1964 et 1975 n'ayant pas eu de résultats significatifs, on peut émettre l'hypothèse que la sensibilité aux semences de moutarde mise en évidence pendant cette étude soit due aux substances présentes dans le mucilage de ces semences et non à des exsudats. Des expériences complémentaires permettraient de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Enfin, par manque de temps, cette étude n'a pas pu inclure de tests opposant semences de moutarde et semences de colza. Cette comparaison permettrait d'évaluer le degré de sensibilité des souches 1964 et 1975 à la diversité spécifique des semences au sein d'une même famille.

CONCLUSION

Ce stage avait pour objectif d'étudier la pathogénicité et la sensibilité à la viabilité et à la diversité spécifique de semences de 18 champignons candidats potentiels de lutte biologique contre les adventices. Les 18 souches fongiques étudiées ont été obtenues à partir de semences d'amarante et de moutarde récoltées dans des parcelles agricoles. Elles ont été retenues à partir des résultats d'un test d'inhibition de germination réalisé sur semences de moutarde parmi un panel de 144 champignons. Quatre espèces végétales ont été prises en considération dans cette étude dont trois espèces adventices (*Sinapis arvensis*, *Amaranthus retroflexus* et *Lolium perenne*) et une espèce cultivée (le colza, *Brassica napus*).

Deux tests de pathogénicité ont été mis en place. Le premier, un test d'induction de fontes de semis sur plantules, n'a pas donné de résultats exploitables. Le second, un test d'inhibition de germination, a permis de mettre en évidence un effet inhibiteur de germination de certaines souches sur les semences étudiées. Pour les semences d'ivraie, deux souches ont obtenu des taux d'inhibition de germination supérieurs à 90%. Cependant, seules cinq souches fongiques parmi les souches testées n'ont pas eu d'effet inhibiteur significatif sur la germination des semences de colza. Parmi ces cinq souches, la souche 1977 est la seule ayant eu des résultats prometteurs sur les semences des trois espèces adventices considérées.

Les analyses statistiques des données obtenues à l'issue des tests de sensibilité des souches fongiques à la viabilité et à la diversité des semences adventices ont permis de dégager deux souches prometteuses : les souches 1964 et 1975. Lors des tests de sensibilité à la viabilité des semences, la souche 1975 a eu une croissance plus importante du côté des semences d'ivraie mortes que des semences viables, ce qui laisse supposer l'existence d'une inhibition de croissance de ce champignon induite par les semences vivantes de *L. perenne*. Lors des tests de sensibilité à la diversité spécifique des semences, les souches 1964 et 1975 ont fait preuve d'une croissance significativement plus importante du côté des semences de moutarde que du côté des autres semences. La comparaison avec les différentes modalités témoin permet d'émettre l'hypothèse que les semences de moutarde sont attractives pour ces deux souches.

Les travaux mis en œuvre pendant ce stage constituent une approche de la problématique complexe et encore peu explorée à ce jour qu'est l'interaction entre microorganismes fongiques et semences. Les résultats obtenus posent la question des mécanismes entrant en jeu dans ces interactions et de leur spécificité.

BIBLIOGRAPHIE

- Anderson J., Fuerst E., Tedrow T., Hulke B., Kennedy A. (2010). Activation of Polyphenol Oxidase in Dormant Wild Oat Caryopses by a Seed-Decay Isolate of *Fusarium avenaceum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp.10597-10605.
- Aybeke M., Sen B., Okten S. (2014). *Aspergillus alliaceus*, a new potential biological control of the root parasitic weed Orobanche. *Journal of Basic Microbiology*, 54, pp.93-101.
- Bailey K., Pitt W., Falk S., Derby J. (2011). The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. *Biological Control*, 58, pp.379-386.
- Banowitz, 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, pp.380-390.
- Bithell S., Hill G., McKenzie B, Wratten S. (2014). Influence of black nightshade (*Solanum nigrum*) and hairy nightshade (*Solanum physalifolium*) phenology on processed pea contamination. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 42, pp.38-49.
- Birthisel S., Gallandt E., Jabbour R. (2014). Habitat effects on second-order predation of the seed predator *Harpalus rufipes* and implications for weed seedbank management. *Biological Control*, 70, pp.65-72.
- Boari A., Ciasca B., Pineda-Martos R., Lattanzio V., Yoneyama K., Vurro M. (2016). Parasitic weed management by using strigolactone-degrading fungi. *Pest Management Science*, 72, pp.2043-2047.
- 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, pp.888-898.
- Boullard B. (1965). La connaissance des phénomènes de symbiose mycorrhizienne peut-elle s'avérer utile pour l'étude des adventices ? *II^e Colloque sur la biologie des mauvaises herbes*, 29 novembre (Seine-et-Oise), 19 pp.
- Brodeur J. (2012). Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evolutionary Applications*, 5, pp.470-480.
- Busi R., Vila-Aiub M., Beckie H., Gaines T., Goggin D., Kaundun S., Lacoste M., Neve P., Nissen S., Norsworthy J., Renton M., Shaner D., Tranel P., Wright T., Yu Q., Powles S. (2013). Herbicide-resistant weeds: from research and knowledge to future needs. *Evolutionary Applications*, 6, pp.1218-1221.
- Campiglia E., Mancinelli R., Cavalieri A., Caporali F. (2007). Use of Essential Oils of Cinnamon, Lavender and Peppermint for Weed Control. *Italian Journal of Agronomy*, 2, pp.171-175.

- Cardina J., Herms C., Doohan D. (2002). Crop rotation and tillage system effects on weed seedbanks. *Weed Science*, 50, pp.448-460.
- Cortinovis C. et Caloni F. (2015). Alkaloid-Containing Plants Poisonous to Cattle and Horses in Europe. *Toxins*, 7, pp.5301-5307.
- Dalling J., Davis A., Schutte B., Arnold E. (2011). Seed survival in soil: interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *Journal of Ecology*, 99, pp.89-95.
- Dayan F. et Duke S. (2014). Natural Compounds as Next Generation Herbicides. *Plant Physiology*, 166, pp.1090-105.
- Délye C., Causse R., Michel S. (2015). Genetic basis, evolutionary origin and spread of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Pest Management Science*, 72, pp.89-102.
- Duke S. (2011). Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest Management Science*, 68, pp.505-512.
- Franke J., Geary B., Meyer S. (2014). Identification of the Infection Route of a *Fusarium* Seed Pathogen into Nondormant *Bromus tectorum* Seeds. *American Phytopathological Society Journals*, 104, pp.1306-1313.
- Fuerst E., Okubara P., Anderson J., Morris C. (2014). Polyphenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. *Frontiers in Plant Science*, 5, pp.57-66.
- Gao L., Sun M.H., Liu X., Che Y. (2014). Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research*, 111, pp.87-92.
- 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, pp.571-577.
- Greenland R. (2003). Injury to Vegetable Crops from Herbicides Applied in Previous Years. *Weed Technology*, 17, pp.73-78.
- Harding D. et Raizada M. (2015). Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Frontiers in Plant Science*, 6, pp.659-668.
- Hersenhorn J., Casella F., Vurro M. (2016). Weed biocontrol with fungi: past, present and future. *Biocontrol Science and Technology*, 26, pp.1313-1328.
- Honek A., Martinkova Z., Jarosik V. (2003). Ground beetles (Carabidae) as seed predators. *European Journal of Entomology*, 100, pp.531-544.
- Honek A., Saska P., Martinkova Z. (2006). Seasonal variation in seed predation by adult carabid beetles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 118, pp.157-162.

- Huang J.W et Kuhlman E. (1991). Formation of a Soil Amendment to Control Damping-off of Slash Pine Seedlings. *Disease Control and Pest Management*, 81, pp.163-170.
- Kovacec E., Likar M., Regvar M. (2016). Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. *Fungal Biology*, 120, pp.666-678.
- Kremer R. et Schulte L. (1989). Influence of Chemical Treatment and *Fusarium oxysporum* on Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Weed Technology*, 3, pp.369-374.
- Liu M., Hulting AG., Mallory-Smith CA. (2014). Characterization of multiple-herbicide-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* spp *multiflorum*). *Pest Management Science*, 70, pp.1145-1150.
- Lopez-Raez J., Shirasu K., Foo E. (2017). Strigolactones in Plant Interactions with Beneficial and Detrimental Organisms: The Yin and Yang. *Trends in Plant Science*, 22, pp.527-537.
- Macquet A., Ralet M., Kronenberger J., Marion-Poll A., North H. (2007). *In situ*, Chemical and Macromolecular Study of the Composition of *Arabidopsis thaliana* Seed Coat Mucilage. *Plant and Cell Physiology*, 48, pp.984-999.
- Marin-Morales M. (2013). Toxicity of Herbicides: Impact on Aquatic and Soil Biota and Human Health in *Herbicides – Current Research and Case Studies in Use*, InTech, pp 399-444.
- Mehrota M. (1990). *Rhizoctonia solani*, a potentially dangerous pathogen of khasi pine and hardwoods in forest nurseries in India. *Forest Pathology*, 20, pp.329-338.
- Mirsky S., Gallandt E., Mortensen D., Curran W., Shumway D. (2010). Reducing the germinable weed seedbank with soil disturbance and cover crops. *Weed Research*, 50, pp.341-352.
- Müller-Stöver D., Nybroe O., Baraibar B., Loddos D., Eizenberg H., French K., Sonderskov M., Neve P., Peltzer D., Maczey N., Christensen S. (2016). Contribution of the seed microbiome to weed management. *Weed Research*, 55, pp.335-339.
- Nelson E. (1990). Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant and Soil*, 129, pp.61-73.
- Petit S., Boursault A., Bohan D. (2014). Weed seed choice by carabid beetles (Coleoptera : Carabidae): Linking field measurements with laboratory diet assessments. *European Journal of Entomology*, 111, pp.615-620.
- Pousset J. (2003). *Agricultures sans herbicides*, Agridéciisions pp.71-73.
- Pusztahelyi T., Holb I., Pócsi I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6, pp.573.
- Salas R., Dayan F., Pan Z., Watson S., Dickson J., Scott R., Burgos N., (2012). *EPSPS* gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas. *Pest Management Science*, 68, pp.1223-1230.

- Sauerborn J., Müller-Stöver D., Hershenhorn J. (2007). The role of biological control in managing parasitic weeds. *Crop Protection*, 26, pp.246-254.
- Scheuerell S., Sullivan D., Mahaffee W. (2005). Suppression of Seedling Damping-Off Caused by *Pythium ultimum*, *P. irregular* and *Rhizoctonia solani* in Container Media Amended with a Diverse Range of Pacific Northwest Compost Sources. *Phytopathology*, 95, pp.306-315.
- Schutte B., Haramoto E., Davis A. (2010). Methods for Optimizing Seed Mortality Experiments. *Weed Technology*, 24, pp.599-606.
- Shaner D. (2014). Lessons Learned From the History of Herbicide Resistance. *Weed Science*, 62, pp.427-431.
- Shaw R., Hatcher P. (2017). Weed biological control in *Weed Research: Expanding Horizons*, Wiley, pp 215-220.
- Sheibani S., Ahangar A. (2013). Effect of tillage on soil biodiversity. *Journal of Novel Applied Sciences*, 2, pp.273-281.
- Soltani E., Baskin C., Baskin J., Soltani A., Galeshi S., Ghaderi-far F., Zeinali E. (2016). A quantitative analysis of seed dormancy and germination in the winter annual weed *Sinapis arvensis* (*Brassicaceae*). *Botany*, 94, pp.289-300.
- Steinkellner S., Lenzemo V., Langer I., Schweiger P., Khaosaad T., Toussaint JP, Vierheilig H. (2007). Flavonoids and Strigolactones in Root Exudates as Signals in Symbiotic and Pathogenic Plant-Fungus Interactions. *Molecules*, 12, pp.1290-1306.
- Straney D., Khan R., Tan R., Bagga S. (2002). Host recognition by pathogenic fungi through plant flavonoids in *Flavonoids in cell function*. Plenum Publishers, pp 9-22.
- Thompson S., Tan Y., Shivas R., Neate S., Morin L.; Bissett A., Aitken E. (2015). Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia. *Persoonia*, 35, pp.39-49.
- Trognitz F., Hackl E., Widhalm S., Sessitsch A. (2016). The role of plant-microbiome interactions in weed establishment and control. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, pp.67-79.
- Van Bogaert, N., Smagghe, G., & De Jonghe, K. (2015). The role of weeds in the epidemiology of pospiviroids. *Weed Research*, 55, 631-638.
- Veldman J., Murray K., Hull A., Garcia M. (2007). Chemical Defense and the Persistence of Pioneer Plant Seeds in the Soil of a Tropical Cloud Forest. *Biotropica*, 39, pp.89-93.
- Vurro M., Boari A., Evidente A., Andolfi A., Zermane N. (2009). Natural metabolites for parasitic weed management. *Pest Management Science*, 65, pp.566-571.
- Yang X., Baskin J., Baskin C., Huang Z. (2012). More than just a coating: Ecological importance, taxonomic occurrence and phylogenetic relationships of seed coat mucilage. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14, pp.434-442.

Yonli D., Traoré H., Hess D., Abbasher A., Boussim I. (2004). Effect of Growth Medium and Method of Application of *Fusarium oxysporum* on Infestation of Sorghum by *Striga hermonthica* in Burkina Faso. *Biocontrol Science and Technology*, 14, pp.417-421.

SITOGRAPHIE

[1] INRA. URL : <http://www.spe.inra.fr/Toutes-les-actualites/orobanche-rameuse> (consulté le 05/09/2017)

[2] URL : <http://www.infloweb.fr/amarante-reflechie> (consulté le 21/08/2017)

[3] URL : <http://www.infloweb.fr/moutarde-des-champs> (consulté le 21/08/2017)

[4] INRA. URL : <http://www.inra.fr/Grand-public/Sante-des-plantes/Tous-les-dossiers/Biocontrole> (consulté le 15/09/2017)

[5] NCBI :

URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lin=s&p=has_linkout&iid=5507 (consulté le 07/09/2017)

[6] <http://ephytia.inra.fr/fr/C/17109/hypp-Biologie-de-la-plante> (consulté le 21/08/2017)



Année universitaire : 2016 - 2017

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)

Annexes

Par : Lucie GUINCHARD

Soutenu à Angers le 26/09/2017

Devant le jury composé de :

Président : Patrice CANNAVO, Enseignant-chercheur
Agrocampus Ouest

Maître de stage : Jean-Philippe GUILLEMIN,
Enseignant-chercheur Agrosup Dijon

Enseignant référent : Nicolas CHEN, Enseignant-
chercheur Agrocampus Ouest

Josiane LE CORFF, Enseignante-chercheuse
Agrocampus Ouest

Christophe LEMAIRE, Enseignant-chercheur
Université d'Angers

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


Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»

disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Annexe I : Protocole d'obtention de monospores

 <p>INRA Institut National de la Recherche Agronomique</p> <p>UMR MGS Microbiologie et Géochimie des Sols</p> <p>17 rue Sully – BP86510 21065 Dijon Cedex</p>	MODE OPERATOIRE	Code : MO-010
	Monospores de champignon	Date d'émission : juillet 2005 Version : 1 Nombre de pages : 2

Suivi des modifications du mode opératoire : ce MO correspond à MO-01-Mono-1 (2001).

1- Mots clés : monospores.

2- Objectif / Principe :

Permet d'obtenir une culture à partir d'une seule spore fongique par étalement sur malt triton.

3- Matériel nécessaire :

- ✓ malt acide triton : acide citrique : 250 mg/l
Triton : 3g / l (équivalent utilisé : 3 ml/l)
- ✓ filtres n°2 stériles.
- ✓ tubes d'eau stériles de 9 ml/tube.
- ✓ billes stériles.

4- Méthode :

- repiquer la souche à monosporer sur PDA (MI-012) : petite boîte de Pétri Ø 5cm.
- laisser la colonie se développer sur la totalité de la surface de la boîte (≈ 5 à 6 jours).
- sous une hotte à flux laminaire :
 - ✓ introduire 2 ml d'eau stérile par boîte,
 - ✓ à l'aide de la pointe du cône "gratter" le mycélium de la colonie pour libérer les micro-conidies,
 - ✓ filtrer le mélange eau + spores sur filtre n°2. Récupérer le filtrat dans un tube STERILE (tube de 12ml à bouchon rouge),
 - ✓ effectuer des dilutions au dixième à partir du filtrat → dilution 10^{-4} ,
 - ✓ étaler les dilutions 10^{-2} et 10^{-4} sur malt acide triton : prélever 100 µl de chacune des dilutions et étaler sur le milieu à l'aide de billes,

5- Réactifs chimiques, éléments de sécurité

	Formule chimique	Type de danger	Protection	Phrases de risque*	Phrases de conseil de prudence*
acide citrique	C ₆ H ₈ O ₇	irritant	Masque/lunette gants	R36/37/38	S 26- 37/39

*E-HYS-002

Rédigé par : Nadine Gautheron	Vérifié par : Véronique Edel-Hermann	Approuvé par : Dominique Chèneby
----------------------------------	---	-------------------------------------

6- Evacuation des déchets

Déchets solides, microbiologiques et moléculaires : ils doivent être entreposés dans des sacs à autoclave dans votre laboratoire.

Pour la destruction des champignons, ces sacs seront fermés avec du scotch, et emmenés par vos soins dans le conteneur situé vers le hangar de la serre.

Déchets chimiques : entreposer dans les contenants spécifiques dans chaque laboratoire, veiller à séparer les toxiques des non toxiques.

Annexe II : Composition du milieu minimum

 <p>UMR MGS Microbiologie et Géochimie des Sols 17 rue Sully – BP86510 21065 Dijon Cedex</p>	MILIEU DE CULTURE	Code : MI-041
	Milieu minimum liquide	Date d'émission : 23/02/05 Date de révision : 23/02/05 Version : 1 Nombre de pages : 1

Référence bibliographique : CORREL, J.C., KLITTICH, C.J.R. & LESLIE, J.F. (1987). Nitrate non utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77, 1640-1646.

Type de milieux :
 Dénombrement Isolement Identification production de Biomasse Conservation

Type de Germes : *Fusarium oxysporum*
 Aérobies stricts Aérobies x Aérobies facultatifs Anaérobies stricts Anaérobies Anaérobies facultatifs

Utilisation : pour culture en milieu agité à 25°C : établissement de courbes de croissance, calcul des paramètres de croissance.

Préparation :
 Formule pour 1 L d'eau distillée:

Na(NO ₃)	:	2 g
KH ₂ PO ₄	:	1 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	:	2.5 g
KCl	:	0.5 g
Glucose	:	5 g
Solution d'oligo éléments	:	2 mL

Composition de la solution d'oligo-éléments, par litre d'eau distillée :
 (Ne préparer que 100 mL de la solution qui peut être conservée à l'abri de la lumière, après stérilisation par filtration 0.2 µm ou autoclavage 20 min à 120°C).

Acide citrique	:	5 g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	:	5 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	:	4.75 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ , 6 H ₂ O	:	1 g
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	:	0.25 g
MnSO ₄ , H ₂ O	:	0.05 g
H ₃ BO ₃	:	0.05 g
NaMoO ₄ , 2 H ₂ O	:	0.05 g

Stérilisation :
 Autoclavage 45 min à 110°C.

Rédigé par : N. Gautheron (10/97) et L. Vienet	Vérifié par : N. Gautheron	Approuvé par : D. Chêneby
---	-------------------------------	------------------------------

Annexe III : Résultats du test d'inhibition de germination sur moutarde

Espèce végétale	Souche	Moyenne du nombre de graines germées après 14 jours	Taux d'inhibition de germination moyen (%)	Ecart-type du nombre de graines germées	p-valeur donnée par le test HSD de Tukey en comparaison avec le témoin
<i>Sinapis arvensis</i>	1962	2,75	11,6	1,74	1
	1963	3,85	0	1,73	0,99
	1964	2,4	22,9	1,09	0,99
	1965	3,2	0	1,44	1
	1966	3,55	0	1,47	1
	1967	0,8	74,3	0,77	2,16.10⁻⁸
	1968	2,45	21,3	1,19	0,99
	1970	1,95	37,3	1,36	0,42
	1971	1,95	37,3	1,23	0,42
	1972	1,35	56,6	1,09	4,29.10⁻⁴
	1973	0,15	95,2	0,37	1,95.10⁻¹²
	1974	0,95	69,5	1,54	4,18.10⁻⁷
	1975	2,35	24,5	1,31	0,99
	1977	1,35	56,6	1,14	4,29.10⁻⁴
	1978	2,35	24,5	1,81	0,99
	1979	1,9	38,9	1,37	0,30
	1980	1,9	38,9	1,37	0,30
	1981	2,55	18,1	1,50	0,99
	Témoins	3,11	0	1,96	

Annexe IV : Résultats du test d'inhibition de germination sur amarante


Espèce végétale	Souche	Moyenne du nombre de graines germées après 14 jours	Taux d'inhibition de germination moyen (%)	Ecart-type du nombre de graines germées	p-valeur donnée par le test HSD de Tukey en comparaison avec le témoin
<i>Amaranthus retroflexus</i>	1962	7,8	16,2	1,15	0,01
	1963	8,45	9,3	0,99	0,98
	1964	9,15	1,7	0,81	1
	1965	9,25	0,67	1,02	1
	1966	9,8	0	0,52	0,99
	1967	9,4	0	0,75	1
	1968	9,55	0	0,60	1
	1970	9,3	0,13	1,03	1
	1971	9,5	0	0,69	1
	1972	9,35	0	0,81	1
	1973	9,9	0	0,31	0,99
	1974	9,7	0	0,57	1
	1975	9,4	0	0,68	1
	1977	7,5	19,5	1,32	1,95.10⁻⁴
	1978	9,4	0	0,68	1
	1979	9,45	0	0,76	1
	1980	9,65	0	0,59	1
	1981	9,4	0	0,88	1
Témoins	9,31	0	0,88	1	

Annexe V : Résultats du test d'inhibition de germination sur ivraie

Espèce végétale	Souche	Moyenne du nombre de graines germées après 14 jours	Taux d'inhibition de germination moyen (%)	Ecart-type du nombre de graines germées	p-valeur donnée par le test HSD de Tukey en comparaison avec le témoin
<i>Lolium perenne</i>	1962	5,85	21,3	1,60	$5,40 \cdot 10^{-3}$
	1963	6	19,3	2,68	0,03
	1964	0,9	87,9	0,64	$1,30 \cdot 10^{-12}$
	1965	3,8	48,9	1,64	$1,93 \cdot 10^{-12}$
	1966	6,75	9,2	1,94	0,99
	1967	1,3	82,5	1,42	$1,30 \cdot 10^{-12}$
	1968	1,4	81,2	1,64	$1,30 \cdot 10^{-12}$
	1970	0,15	97,9	0,37	$1,30 \cdot 10^{-12}$
	1971	0,05	99,3	0,22	$1,30 \cdot 10^{-12}$
	1972	7,25	2,5	0,79	1
	1973	4,75	36,1	0,79	$8,13 \cdot 10^{-12}$
	1974	6,2	16,6	1,44	0,25
	1975	9,15	0	0,88	$9,16 \cdot 10^{-4}$
	1977	6	19,3	1,65	0,03
	1978	1,35	81,8	1,14	$1,30 \cdot 10^{-12}$
	1979	7,6	0	1,27	1
	1980	9,55	0	0,76	$1,08 \cdot 10^{-6}$
	1981	2,75	63	2,20	$1,30 \cdot 10^{-12}$
Témoins	7,44	0	1,77		

Annexe VI : Résultats du test d'inhibition de germination sur colza

Espèce végétale	Souche	Moyenne du nombre de graines germées après 14 jours	Taux d'inhibition de germination moyen (%)	Ecart-type du nombre de graines germées	p-valeur donnée par le test HSD de Tukey en comparaison avec le témoin
<i>Brassica napus</i>	1962	1,3	73,4	0,73	$2,02.10^{-12}$
	1963	7,1	0	1,29	$1,59.10^{-7}$
	1964	0,75	84,6	1,25	$1,30.10^{-12}$
	1965	4,25	13	2,05	0,99
	1966	4,25	13	1,29	0,99
	1967	0,5	89,8	0,69	$1,30.10^{-12}$
	1968	0,85	82,6	1,39	$1,30.10^{-12}$
	1970	0,1	97,9	0,31	$1,30.10^{-12}$
	1971	0,1	97,9	0,31	$1,30.10^{-12}$
	1972	0,85	82,6	0,59	$1,30.10^{-12}$
	1973	0,35	92,8	0,49	$1,30.10^{-12}$
	1974	0,4	91,8	0,75	$1,30.10^{-12}$
	1975	1,1	77,5	1,07	$1,45.10^{-12}$
	1977	6,05	0	1,88	0,42
	1978	0,05	98,9	0,22	$1,30.10^{-12}$
	1979	0,55	88,7	0,60	$1,30.10^{-12}$
	1980	4,05	17,1	1,76	0,99
	1981	0,9	81,6	0,97	$1,30.10^{-12}$
Témoins	4,89	0	2,37		

	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : Gestion Durable du Végétal (GDV) Enseignant référent : Nicolas CHEN
Auteur(s) : Lucie GUINCHARD Date de naissance* : 10/01/1995	Organisme d'accueil : INRA UMR Agroécologie Adresse : 17 rue Sully 21 000 Dijon, France
Nb pages : 46 Annexe(s) : 6	
Année de soutenance : 2017	Maître de stage : Jean-Philippe GUILLEMIN
Titre français : Recherche de microorganismes fongiques d'origine tellurique à action herbicide	
Titre anglais : Researching soil-borne fungi with herbicidal activity	
Résumé (1600 caractères maximum) : Les solutions de lutte contre les adventices alternatives aux herbicides de synthèse se développent, mais le domaine des produits de biocontrôle dirigés spécifiquement contre le stock semencier du sol reste encore peu exploré. Cette étude s'est intéressée à la sensibilité à la viabilité et à la diversité spécifique des semences et à la pathogénicité sur semences et plantules de 18 souches fongiques obtenues lors d'un screening réalisé en 2016. Quatre espèces végétales ont été utilisées, dont trois adventices (<i>Sinapis arvensis</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> et <i>Lolium perenne</i>) et une cultivée (<i>Brassica napus</i>). Les tests d'inhibition de germination des semences de ces quatre espèces ont montré que la majorité des souches testées inhibaient la germination des semences de <i>B. napus</i> . Seule la souche 1977, du genre <i>Trichoderma</i> , n'a pas eu d'impact sur la germination des semences de colza, mais a eu un effet inhibiteur de germination significatif sur les semences des trois espèces adventices étudiées. Les tests de sensibilité des champignons à la viabilité et à la diversité spécifique des semences ont permis de mettre en évidence une influence de la présence de semences d'ivraie viables sur la croissance de la souche fongique 1975 (<i>Fusarium equiseti</i>) et de semences de moutarde sur le développement des souches 1964 (<i>Fusarium oxysporum</i>) et 1975. Une meilleure compréhension des mécanismes associés à ces interactions entre microorganismes fongiques et semences nécessite la mise en place de nouvelles expérimentations.	
Abstract (1600 caractères maximum) : Non-phytopharmaceutical means of controlling weed populations are being developed. However, the field of biocontrol products specifically aimed against the soil seed bank is yet little explored. This study focused on the sensitivity to viability and specific diversity of seeds and pathogenicity on seeds and seedlings of 18 fungal strains that were obtained during a screening phase conducted in 2016. Four vegetal species were used, including three weed species (<i>Sinapis arvensis</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> and <i>Lolium perenne</i>) and one cultivated species (<i>Brassica napus</i>). Seed germination inhibition tests made on these four species showed that the majority of the tested fungal strains inhibited the germination of the seeds of <i>B. napus</i> . Only the strain 1977, belonging to the genus <i>Trichoderma</i> , did not have an impact on the germination of <i>B. napus</i> seeds, but had a significant inhibiting effect on the germination of the three studied weed species seeds. The sensitivity to viability and specific diversity of seeds tests showed an influence of the presence of <i>L. perenne</i> seeds on the growth of the fungal strain 1975 (<i>Fusarium equiseti</i>) and of <i>S. arvensis</i> seeds on the development of fungal strains 1964 (<i>Fusarium oxysporum</i>) and 1975. A better understanding of the mechanisms associated to the interactions between fungi and seeds requires further experimentations.	
Mots-clés : Biocontrôle ; pathogénicité ; champignon tellurique ; adventice ; sensibilité	
Key Words: Biocontrol ; pathogenicity ; soil-borne fungi ; weed ; sensitivity	

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