



HAL
open science

Problème de Rhizoctone brun sur les principales cultures du maraîchage nantais (mâche, laitue, épinard et radis) : caractérisation d'isolats de Rhizoctonia solani et recherche d'une méthode d'inoculation homogène et reproductible

Gwendoline Theuré

► **To cite this version:**

Gwendoline Theuré. Problème de Rhizoctone brun sur les principales cultures du maraîchage nantais (mâche, laitue, épinard et radis) : caractérisation d'isolats de Rhizoctonia solani et recherche d'une méthode d'inoculation homogène et reproductible. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03596096

HAL Id: dumas-03596096

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03596096v1>

Submitted on 3 Mar 2022

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

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

AGROCAMPUS OUEST

CFR Angers CFR Rennes

Année universitaire : 2019 - 2020

Spécialité/Mention :

Horticulture

Spécialisation/Parcours :

Protection des plantes et environnement
appliquée à l'horticulture (PPEH)

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)

Problème de Rhizoctone brun sur les principales cultures du maraîchage nantais (mâche, laitue, épinard et radis) : Caractérisation d'isolats de *Rhizoctonia solani* et recherche d'une méthode d'inoculation homogène et reproductible

Par : Gwendoline THEURÉ



Soutenu à Angers le 03 septembre 2020

Devant le jury composé de :

Président : M. CHEN Nicolas

Maître de stage : M. GERARD Sylvain

Enseignant référent : Mme BRIARD Mathilde

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Mme MARCHI Muriel, ingénieure de recherche en
Phytopathologie, à INRAE - IRHS

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

Remerciements

Je tiens à remercier Brigitte Pelletier et Sylvain Gérard, mon maître de stage, pour m'avoir permis de faire ce stage fort intéressant au sein du CDDM et avoir suivi mon avancé tout au long du stage. Sylvain m'a poussé à prendre plus de responsabilités lors de mes expérimentations et à mener une réflexion sur la pertinence de mes décisions. Je le remercie grandement pour cela et pour m'avoir aidé et encouragé lors les moments difficiles.

Je remercie aussi Marylou Lorne qui a mené mes premiers essais lors du confirmet et qui m'a aidé pour les expérimentations suivantes.

Un très grand merci pour Séverine Bosseur et Véronique Cerceau, les pathologistes du CDDM, pour leurs précieux conseils et qui m'ont apporté beaucoup de connaissances sur les techniques de laboratoire en pathologie végétale et sur le comportement des champignons telluriques ...

Je tiens également à remercier tout le personnel du CDDM pour leur bonne humeur et tous les bons moments passés en leur compagnie, même en dehors du temps de travail, plus particulièrement, Sidonie Thoraval, Serge Mével, Patrick Verron et Arjuna Ravindirane qui m'ont apporté des informations pour la rédaction du mémoire.

Je remercie Jonathan Gaudin et Dominique Blancard de l'INRAE qui m'ont permis de mieux comprendre la complexité du pathogène et m'ont poussé à la réflexion dans les méthodes d'inoculum et de détection du rhizoctone dans le sol.

Je remercie l'école pour m'avoir permis de réaliser cette formidable expérience, notamment Mathilde Briard, ma tutrice de stage, et Nicolas Chen, un des référents de la spécialisation PPEH, pour avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions et m'avoir donné des conseils avisés.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille de leur soutien, notamment ma mère qui a lu plusieurs fois mon mémoire afin de me donner un avis extérieur.

Table des matières

I. Etat de l'art.....	1
1. Le contexte du maraîchage nantais.....	1
a) <i>Historique du maraîchage nantais</i>	1
b) <i>Quelques chiffres sur la production maraîchère de Loire Atlantique</i>	1
c) <i>Rôle du Comité Départemental de Développement Maraîcher (CDDM)</i>	2
2. Le Rhizoctone brun	4
a) <i>Historique et phylogénie du pathogène</i>	4
b) <i>Cycle biologique du champignon phytopathogène, Rhizoctonia solani</i>	5
c) <i>Aspect du champignon au microscope</i>	6
d) <i>Groupes d'anastomoses présents sur les plantes maraîchères</i>	7
3. Les techniques d'inoculation d'un pathogène tellurique.....	9
a) <i>Principe d'une technique d'inoculation d'un pathogène</i>	9
b) <i>Techniques d'inoculation naturelle</i>	10
c) <i>Techniques d'inoculation artificielle</i>	10
4. La problématique de l'étude.....	11
a) <i>Projet Obioleg</i>	11
b) <i>Problématique et questions subsidiaires des essais 2020</i>	12
c) <i>Hypothèses et méthodes de travail</i>	12
II. Analyse des essais passés et préliminaires sur le <i>Rhizoctonia solani</i> dans le maraîchage nantais.....	13
1. Introduction.....	13
a) <i>Historique des premiers essais mis en place sur le rhizoctone au CDDM</i>	13
b) <i>Origine et premières analyses des différents isolats</i>	13
c) <i>Observations des facteurs climatiques influençant le pathogène</i>	15
d) <i>Essais préliminaires sur les méthodes d'inoculation artificielle</i>	15
2. Matériels et méthodes.....	16
a) <i>Etude sur les températures optimales de croissance des isolats</i>	16
b) <i>Protocole de l'essai préliminaire sur l'inoculation par la gélose</i>	17
3. Résultats.....	18
a) <i>Courbes de croissance des isolats selon la température</i>	18
b) <i>Résultats de l'essai préliminaire sur l'inoculation par de la gélose broyée</i>	19
4. Discussion	21
a) <i>Influence de la température sur les isolats de <i>Rhizoctonia solani</i></i>	21
b) <i>Hypothèses sur les groupes d'anastomose des isolats étudiés</i>	22
c) <i>Limites de l'essai préliminaire sur l'inoculation via la gélose broyée</i>	22
5. Conclusion.....	23

III. Mise au point d'une méthode pour maîtriser l'inoculum du pathogène dans les expérimentations en chambre de culture	24
1. Introduction.....	24
2. Matériels et méthodes.....	24
a) <i>Modalités et déroulement de l'essai.....</i>	<i>24</i>
b) <i>Préparation de l'inoculum.....</i>	<i>26</i>
c) <i>Calculs de densité de l'inoculum via l'Unité Formant des Colonies (CFU)</i>	<i>27</i>
d) <i>Méthode de diagnostic des échantillons de plantes au laboratoire.....</i>	<i>27</i>
e) <i>Analyse statistique des résultats.....</i>	<i>28</i>
3. Résultats.....	28
a) <i>Nombre d'Unité Formant des Colonies (CFU) de chaque modalité.....</i>	<i>28</i>
b) <i>Identification du rhizoctone et d'autres pathogènes</i>	<i>28</i>
c) <i>Résultats finaux de l'essai.....</i>	<i>29</i>
4. Discussion	30
a) <i>Problèmes méthodologiques de l'essai</i>	<i>30</i>
b) <i>Problèmes des conditions de l'essai et du système de notation</i>	<i>31</i>
c) <i>Méthodes d'inoculations et techniques de préparation idéales.....</i>	<i>32</i>
5. Conclusion.....	33
IV. Conclusion générale.....	34
Bibliographie.....	35
Références bibliographiques	35
Références sitographiques	37

Table des figures

Figure 1 : Carte représentant la délocalisation des exploitations maraîchères nantaise durant la 2ème moitié du 20ème siècle.	0
Figure 2 : Carte représentant les principales zones de production maraîchère actuelles en Loire Atlantique.	0
Figure 3 : Cycle biologique de <i>Rhizoctonia solani</i>	4
Figure 4 : Photos d'observations de <i>Rhizoctonia solani</i>	4
Figure 5 : Photos des symptômes provoqués par <i>Rhizoctonia solani</i>	5
Figure 6 : Arbre phylogénétique du genre <i>Rhizoctonia</i>	7
Figure 7 : Résumé des tâches et actions menées dans le cadre du présent projet.	10
Figure 8 : Exemple de mesures prises pour les calculs des vitesses de croissances des isolats à chaque température.	15
Figure 9 : Courbes des vitesses de croissance de chaque isolat selon la température.	17
Figure 10 : Graphique des taux de plantes survivantes à l'isolat 19-599 dans les cultures de mâches inoculées avec de la gélose.	18
Figure 11 : Graphique des taux de plantes survivantes à l'isolat 19-599 dans les cultures de laitues inoculées avec de la gélose.	19
Figure 12 : Graphique des taux de plantes survivantes à l'isolat 19-538 dans les cultures de radis inoculées avec de la gélose.	19
Figure 13 : Graphique des taux de plantes survivantes à l'isolat 19-538 dans les cultures d'épinards inoculées avec de la gélose.	20
Figure 14 : Comparaison morphologique des isolats développés en boîtes de Petri.	21
Figure 15 : Répartition des modalités de l'essai au sein du phytotron du CDDM.	24
Figure 16 : Méthodes de préparation de l'inoculum avec de la gélose broyée, filtrée et diluée pour un isolat (19-599).	25
Figure 17 : Dilution en série de l'échantillon dans une solution stérile et étalement de la suspension sur le milieu de culture.	26
Figure 18 : Graphiques des taux de radis survivants à l'isolat 19-538 de <i>Rhizoctonia solani</i> inoculés avec de la vermiculite ou de la gélose.	28
Figure 19 : Diagramme des symptômes de l'isolat 19-538 de <i>Rhizoctonia solani</i> sur radis. .	29
Figure 20 : Graphiques des moyennes de mâches survivantes à l'isolat 19-599 de <i>Rhizoctonia solani</i> inoculées avec de la vermiculite ou de la gélose.	29
Figure 21 : Schéma global des facteurs influençant le comportement d'un isolat de <i>Rhizoctonia solani</i>	33

Table des tableaux

<i>Tableau 1 : Synthèse des différents groupes d'anastomoses et subdivisions connus pour les souches de Rhizoctonia solani et les plantes hôtes associées</i>	6
<i>Tableau 2 : Liste des cultures et pathogènes ciblés dans les différents départements de la Loire-Atlantique</i>	10
<i>Tableau 3 : Taux d'infestation de cultures maraîchères par différents isolats de Rhizoctonia solani</i>	13
<i>Tableau 4 : Pourcentage de perte estimée par isolats de rhizoctone testés sur différentes cultures en été 2019, sous la serre verre au CDDM</i>	14
<i>Tableau 5 : Pourcentage de perte estimée par isolats de rhizoctone testés sur différentes cultures en conditions printanières (12-17°C) dans un phytotron du CTIFL</i>	14
<i>Tableau 6 : Modalités de l'essai préliminaire sur l'inoculation de Rhizoctonia solani avec de la gélose broyée</i>	16
<i>Tableau 7 : Calendrier des opérations réalisées lors de l'essai préliminaire</i>	16
<i>Tableau 8 : Tableau de synthèse bibliographique sur les groupes d'anastomoses affectant les cultures maraîchères de l'étude comparé aux comportements et la morphologie des isolats analysés</i>	21
<i>Tableau 9 : Modalités de l'essai sur l'inoculation de Rhizoctonia solani avec de la vermiculite et de la gélose</i>	23
<i>Tableau 10 : Calendrier des opérations réalisées lors de l'essai</i>	24
<i>Tableau 11 : Exemple de tableau de calculs de la concentration de CFU</i>	26
<i>Tableau 12 : Modalités de l'essai sur l'inoculation de Rhizoctonia solani avec de la vermiculite et de la gélose avec l'indication des CFU (Unité Formant des Colonies)</i>	27
<i>Tableau 13 : Analyses mycologiques, sur milieux gélosés, des plantes échantillonnées durant l'essai</i>	28
<i>Tableau 14 : Modalités de l'essai sur l'inoculation de Rhizoctonia solani avec de la gélose avec les doses réelles appliquées</i>	30
<i>Tableau 15 : Résultats statistiques des tests d'homoscédasticité (tests de Bartlett et de Levène) pour le nombre de plantes saines à la récolte par méthode d'inoculation et de préparation</i>	31

Table des annexes

Annexe I : Liste d'isolats de *Rhizoctonia solani* analysés par l'unité de pathologistes du CDDM au CTIFL.....I

Annexe II : Enquête sur l'historique des parcelles des isolats de rhizoctoneIII

Annexe III : Fiche de notations et de calculs des vitesses de croissance des isolats selon la température (ex : 19-538 et 19-599)..... VII

Annexe IV : Résultats des tests statistiques de l'essai préliminaire sur l'inoculation avec de la gélose broyée VIII

Annexe V : Techniques d'isolement et de détermination du pathogène au laboratoire XI

Annexe VI : Tableaux de calculs des Unités Formant Colonies (CFU) de chaque méthode d'inoculation XII

Annexe VII : Photos des plantes touchées par *Rhizoctonia solani* comparées aux symptômes physiologiques et à d'autres pathogènes présents dans les essaisXV

Annexe VIII : Résultats des tests statistiques de l'essai sur l'inoculation avec de la vermiculite et de la gélose sous différentes préparationsXVI

Liste des abréviations et acronymes

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AG : Anastomosis Grouping

ANOVA : Analysis Of Variance

AREPAL : Association Régionale d'Expérimentation Légumière des Pays de Loire

CDDM : Comité Départemental de Développement Maraîcher

CFU : Colony Forming Unit

CTIFL : Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes

GAP : Grands Abris Plastiques

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

Obioleg : Optimisation des méthodes de biocontrôle contre les bio-agresseurs en cultures légumières

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Potato Dextrose Agar

PNPP : Préparations Naturelles Peu Préoccupantes

SAU : Surface Agricole Utile



Figure 1 : Carte représentant la délocalisation des exploitations maraîchères nantaise durant la 2ème moitié du 20ème siècle.

Source : (Fédération des Maraichers Nantais, Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2015).

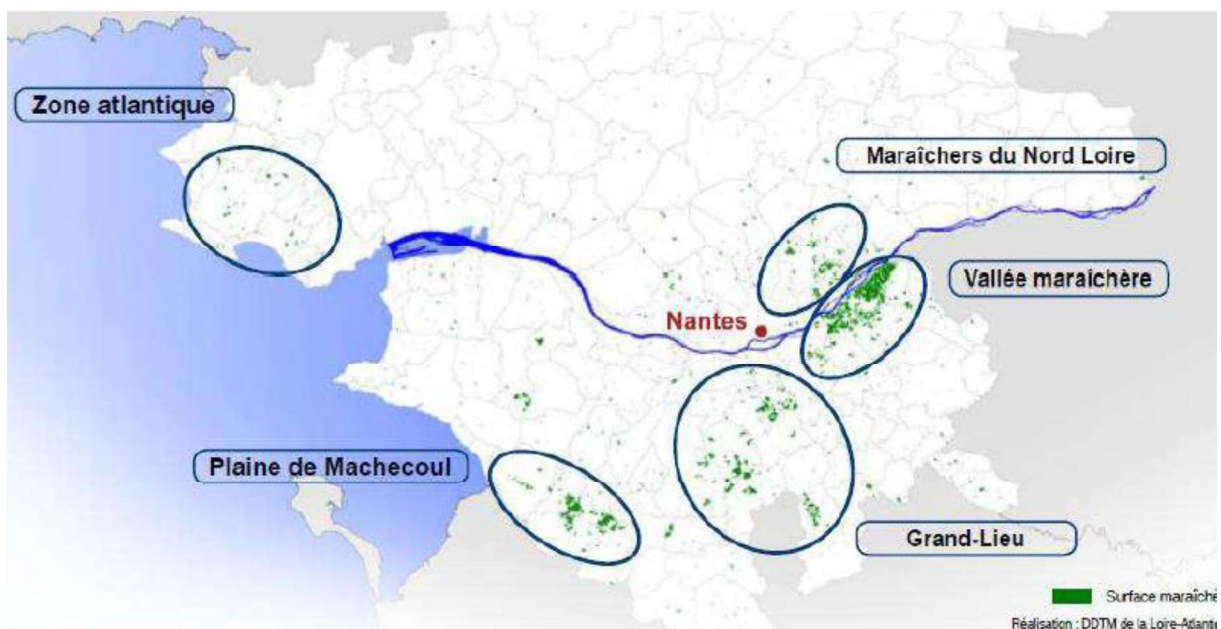


Figure 2 : Carte représentant les principales zones de production maraîchère actuelles en Loire Atlantique.

Source : (Fédération des Maraichers Nantais, Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2015).

I. Etat de l'art

Le maraîchage est une activité économique, sociale et culturelle importante dans la région nantaise. De nombreux projets d'expérimentation régionaux ont été créés pour faire face aux problématiques actuelles, notamment en protection des plantes. Ainsi, dans le cadre du projet Obioleg (Optimisation des méthodes de biocontrôle contre les bio-agresseurs en cultures légumières) porté par l'ARELPAL (Association Régionale d'Expérimentation des Pays de la Loire) et mené au sein du CDDM, l'étude est tournée vers la problématique du Rhizoctone brun, sa détection et son mode d'inoculation. L'objectif est de trouver des méthodes de lutttes alternatives aux produits phytosanitaires de synthèse avec des agents de biocontrôle ou des préparations naturelles peu préoccupantes (PNPP).

1. Le contexte du maraîchage nantais

a) Historique du maraîchage nantais

Avec le climat doux et humide des Pays de la Loire, une grande diversité d'espèces horticoles est cultivée depuis longtemps sur ce territoire. En effet, le maraîchage est une activité pratiquée à Nantes depuis 5 siècles [1]. Ainsi, depuis des années, les maraîchers se rassemblent, tout d'abord, pour répondre aux besoins alimentaires de la population nantaise, puis au marché national et international (depuis le 19^{ème} siècle (Chupin, 2000)).

Initialement, les cultures étaient à proximité du centre-ville de Nantes. Cependant, l'accroissement rapide et fulgurant de la ville dans les années 60 et 70 a provoqué une délocalisation des exploitations (Chupin, 2000). Ces dernières se sont déplacées et ont étendu leurs surfaces cultivées sur 3 bassins : Vallée de la Loire, Grandlieu et Pays de Retz (fig. 1). Le maraîchage nantais comprenait aussi les exploitations de Guérande et de Saint Nazaire (Fédération des Maraîchers Nantais, Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2015).

Malgré tous ces changements, les maraîchers nantais ont su s'adapter et améliorer leur production par la mécanisation et l'installation, autrefois très courante, de châssis en verre ou en plastique (Chupin, 2000). Puis, ils ont peu à peu été remplacés par des grands abris plastiques (GAP), des multi-chapelles et des serres en verre [1], permettant un meilleur accès aux machines et ainsi une plus grande production.

En 2013, à Nantes, élue capitale verte de l'Europe, deux jours de fête ont été organisés pour les 500 ans du maraîchage nantais [2]. Tout cela montre donc l'importance sociale et culturelle du maraîchage dans la région nantaise. De plus, grâce à son expansion géographique et à ses nombreuses évolutions technologiques, le maraîchage nantais continue de conquérir une grande part du marché national et international.

b) Quelques chiffres sur la production maraîchère de Loire Atlantique

Le maraîchage nantais est une agriculture intensive. En effet, sur une SAU de 407 500 ha en Loire Atlantique, 3600 ha sont occupés par du maraîchage, soit seulement environ 0,9 % de la SAU (Fédération des Maraîchers Nantais, Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2015), et fournissent 13.8% de la production agricole française (Chambre d'Agriculture de Loire-Atlantique [3]). Sur les 4 zones de productions principales qui occupent 90% des surfaces maraîchères de la région (fig. 2), la Vallée maraîchère concentre la majorité des surfaces cultivées (1600 ha) (Fédération des Maraîchers Nantais, Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2015) pour apporter 50% de la production.

De plus, le maraichage en Loire Atlantique est leader européen sur le marché de la mâche atteignant 84 % de la production nationale (Région Pays de la Loire, 2019) et 50 % de la production européenne [3] avec 32 000 tonnes/an. Il est aussi leader national dans la culture de radis avec 45 000 000 de bottes/an (Fédération des Maraichers Nantais, Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2015), soit 33 % de la production française (Région Pays de la Loire, 2019). Mais il est aussi leader national de muguet, 80 % de la production nationale avec 60 000 000 de brins/an cultivés sur 150 ha, et co-leader national dans la production de poireau de primeur avec 20 000 tonnes/an.

Etant une région agricole très polyvalente, elle est aussi 2^{ème} productrice nationale (25% de la production française) dans la culture de concombres avec 25 000 tonnes/an pour 43 ha de serre dont 37 ha sous serres chauffées, et 4^{ème} productrice de tomate française (5% de la production nationale) avec 55 000 tonnes/an pour 81 ha de serre dont 70 ha sous serres chauffées ([3] ; (Fédération des Maraichers Nantais, Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2015)). Les maraichers nantais produisent aussi d'autres cultures maraichères importantes dans la région comme le navet, la salade (en jeune pousse) et l'épinard (Région Pays de la Loire, 2019).

Ainsi le maraichage nantais est une activité économique importante en Loire Atlantique, sur un milliard d'euros de chiffre d'affaire agricole départemental, le maraichage apporte 20 % du chiffre d'affaire agricole de la région. De plus, sur les 250 exploitations légumières en 2010, 210 sont des exploitations maraichères (Fédération des Maraichers Nantais, Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2015). Le maraichage crée donc une dynamique économique importante, mais il est également source de nombreuses embauches : 60 % du personnel agricole de Loire Atlantique travaille dans le maraichage avec plus de 4 000 emplois en équivalent temps-plein et environ 40 à 50 postes créés chaque année ([4] ; [5]).

Néanmoins, cette activité économique est menacée par les conséquences actuelles d'une monoculture intensive favorisant l'apparition de bio-agresseurs particulièrement virulents. Cela impose donc l'application de produits phytosanitaires et une désinfection du sol efficace et régulière. Cependant, le gouvernement via le plan Ecophyto a interdit de nombreux produits phytosanitaires dont le métam-sodium qui était très utilisé par les maraichers nantais. Ce dernier permettait de réduire considérablement les adventices et les attaques de pathogènes, mais une mauvaise utilisation de ce produit causait des problèmes de santé (81 cas d'intoxication) provoquant son interdiction en 2018. L'embauche supplémentaire de 5 à 6 personnes par an, pour le désherbage en culture de mâche, est devenue nécessaire afin de maintenir la demande et les exigences sanitaires du marché. Cela a pour conséquence une augmentation des coûts de production pour les maraichers de 30 à 40% amenant à une réévaluation à la hausse du prix de la barquette de mâches. La mâche française devient donc de plus en plus concurrencée par les productions en Allemagne et en Italie [6]. Les maraichers doivent donc repenser leurs systèmes de cultures pour surmonter ces pertes de rendement et garder leur place dans le marché européen.

c) Rôle du Comité Départemental de Développement Maraîcher (CDDM)

Pour devenir et rester une force économique importante, les maraichers ont besoin de se regrouper, notamment pour être conseillés dans leur production et être à la pointe des dernières technologies. Cette partie technique est confiée aux CDDM avec la coordination des expérimentations par l'ARELPAL. Le CDDM, créé en 1970, a pour fonction de transmettre des connaissances agronomiques aux maraichers par des échanges avec les conseillers, des visites (individuelles et collectives), des réunions d'informations et divers ateliers.

L'objectif est d'améliorer la production maraîchère nantaise en aidant les producteurs à surmonter des impasses techniques et économiques [7], tout en limitant les impacts environnementaux (Le Stunff, 2017). De plus, les conseillers ont des missions de Surveillance Biologique du territoire avec la participation aux bulletins de santé du végétal. Ainsi, par leur proximité avec les maraîchers et leur connaissance de la région, le CDDM mène des projets d'expérimentations et de recherches adaptés pour répondre aux besoins des adhérents [8].

Depuis 4 ans, le CDDM siège à la Maison des Maraîchers (construite en 2016), à Pont-Saint-Martin, où il bénéficie du matériel et des nouvelles structures avec une technologie pointue pour réaliser leurs essais en serre, dans des chapelles ou sous GAP. De plus, l'équipe d'expérimentation du CDDM a accès à une chambre de culture récente (appelée plus communément un phytotron), qui leur permet de réaliser des essais quand elle le souhaite, reproduisant n'importe quelle saison par la maîtrise précise de la température, de l'humidité et de la lumière. Ainsi cela permet d'étudier des maladies hivernales (comme le dépérissement de la mâche et le rhizoctone brun) tout au long de l'année [4]. Afin d'accomplir ces différentes fonctions, les 12 personnels du CDDM sont divisés en 3 services : serre, plein champ et agroenvironnement (Le Stunff, 2017). Dans le cadre de cette étude, nous étudierons des enjeux uniquement liés aux cultures de plein champ avec l'équipe de conseillers de ce secteur.

Les cultures légumières nantaises de plein champ subissent les problématiques actuelles causées par l'arrêt de produits phytosanitaires de synthèses comme le Métam-sodium par exemple. En effet, la répétition successive de cultures de plantes de même famille botanique (par exemple 3 à 4 cultures par parcelle et par an) amène à une recrudescence de pathogènes virulents (communication personnelle de Sylvain Gérard). De nombreuses pratiques ont été employées pour limiter les maladies comme la désinfection du sol par la vapeur ou par solarisation, les rotations de cultures ou la mise en place d'engrais verts en interculture ([6] ; (Association des maires de Loire-Atlantique, 2013)). Mais elles ne sont pas assez efficaces contre des pathogènes généralistes résistants. En effet, des essais français démontrent le manque d'efficacité de l'installation d'intercultures pour limiter certaines maladies telluriques, notamment les rhizoctones (Gaucher et al., 2014).

Des études sont donc menées par l'équipe du CDDM qui est impliquée dans le projet de région des Pays de la Loire : Obioleg. Il s'agit de travailler sur la diminution et la disparition des intrants phytosanitaires en recherchant des solutions alternatives comme les produits de biocontrôle et les préparations naturelles peu préoccupantes. C'est dans ce contexte que nous allons étudier les principales maladies cryptogamiques des cultures de plein champ et plus spécifiquement du maraîchage nantais, tels que la mâche (*Valerianella locusta*), le radis (*Raphanus sativus*), la laitue (*Lactuca sativa*) et l'épinard (*Spinacia oleracea*). En effet, ces dernières (fréquemment mises en rotations) peuvent être atteintes par divers pathogènes comme les *Pythium*, le *Phoma*, le *Rhizoctonia*, le *Sclerotinia* et les agents responsables du Mildiou, de l'Oïdium et du Botrytis. Certains sont très préjudiciables pour le maraîchage et sont difficiles à gérer, notamment les pathogènes telluriques.

Des études avancées sur les *Pythium*, le *Phoma* et le *Sclerotinia* ont déjà été menées. Ainsi la partie du projet traitée dans ce rapport abordera la gestion des Rhizoctones et plus particulièrement de *Rhizoctonia solani* qui provoquent des pertes économiques importantes pour les maraîchers (Région Pays de la Loire, 2019).

2. Le Rhizoctone brun

a) Historique et phylogénie du pathogène

La maladie du Rhizoctone brun est due au pathogène tellurique, *Rhizoctonia solani*, qui provoque de nombreux symptômes souterrains et/ou aériens, en plein champs et sous abris. Cette espèce est un champignon du sol très répandu dans le monde, plus particulièrement au niveau des côtes méditerranéennes et en zones tempérées, et provoque des dégâts foliaires importants dans les pays équatoriaux ou tropicaux (climat très humide) [9]. Elle a été décrite pour la première fois par Julius Kühn en 1858 sur des plants de pommes de terre [10].

Rhizoctonia solani représente la forme imparfaite/anamorphe, c'est-à-dire qu'il ne se reproduit que végétativement, via la formation de mycélium et de sclérotés (Messiaen et al., 1991). Il ne produit pas de spores asexués (des conidies) ([11] ; (Motisi, 2009)) contrairement à la plupart des champignons imparfaits. Ne connaissant pas sa forme sexuée, il fut classé dans les Deutéromycètes [12]. La forme parfaite/téléomorphe, permettant une reproduction sexuée, a été caractérisée en 1891 par Prillieux et Delacroix. Le stade sexuel apparaît rarement et est réalisé via la production de basidiospores. Sous sa forme parfaite, le champignon appartient au genre *Thanatephorus*. Cependant, derrière *Rhizoctonia solani* se cache un « complexe d'espèces » (Cubeta, Vilgalys, 1997), c'est-à-dire un groupe très hétérogène morphologiquement, physiologiquement et génétiquement ; et il est composé de nombreuses « formes sexuées » : la majorité des souches sont des *Thanatephorus cucumeris*, mais il y a aussi des *T. sasakii*, des *T. microsclerotium/microsclerotia*, des *T. praticola* ... (Gonzalez Garcia et al., 2006). D'après les bases de données de la classification actuelle, le nom courant de ce champignon est *Rhizoctonia solani* qui se situe actuellement chez les Basidiomycètes, de classe : Agaricomycètes, d'ordre : Cantharellales et de famille : Ceratobasidiaceae ([13] ; [14]).

Ce pathogène, *Rhizoctonia solani*, est très polyphage ; il s'attaque à plus d'une centaine d'espèces différentes, dont la plupart sont légumières [9]. En effet, il peut infecter des cultures : ornementales (ex : cyclamens [11], impatiens, giroflées, chrysanthèmes (Camporota, 1989)...), grandes cultures (ex : pommes de terre, maïs (Camporota, 1989), betteraves, haricots [15], céréales [16] ...) et maraîchères (ex : chicorées, radis (Camporota, 1989), aubergines, tomates, piments, salades, melons, concombres, pastèques, courges, carottes, choux, céleris, navets, patates douces [9]...), mais aussi des adventices (ex : chénopodes, chiendents, pissenlits, ray-grass [15] ...). Pour les semences légumières, il y a plus d'une cinquantaine d'espèces qui peuvent être touchées par *Rhizoctonia solani* ((Richardson, 1990), cité par (Champion, 1997)) et plus particulièrement, les graines de mâche, d'haricot, de pois et de betterave, qui sont les plus sensibles (Champion, 1997). Ainsi, il est fortement préjudiciable pour le maraîchage où il cause des fontes de semis et des nécroses sur différents organes de nombreuses espèces légumières. Malgré sa présence depuis des siècles sur le territoire français, ce n'est que depuis environ deux ans, que *Rhizoctonia solani* devient de plus en plus problématique et agressif dans le maraîchage nantais.

Une hypothèse est émise sur l'augmentation de sa pathogénicité liée à l'interdiction de nombreux produits chimiques. En effet, les produits phytosanitaires de désinfection des sols, les fumigants (par exemple, en 1991, les solutions qui étaient utilisées sont : la chloropicrine, le bromure de méthyle, le méthylisothiocyanate, le formol...) (Messiaen et al., 1991), sont quasiment tous interdits en France [19], notamment le métam-sodium, interdit depuis 2018, qui était très utilisé par les maraîchers nantais [17] (correspondant à la période de réapparition problématique de *Rhizoctonia solani*).

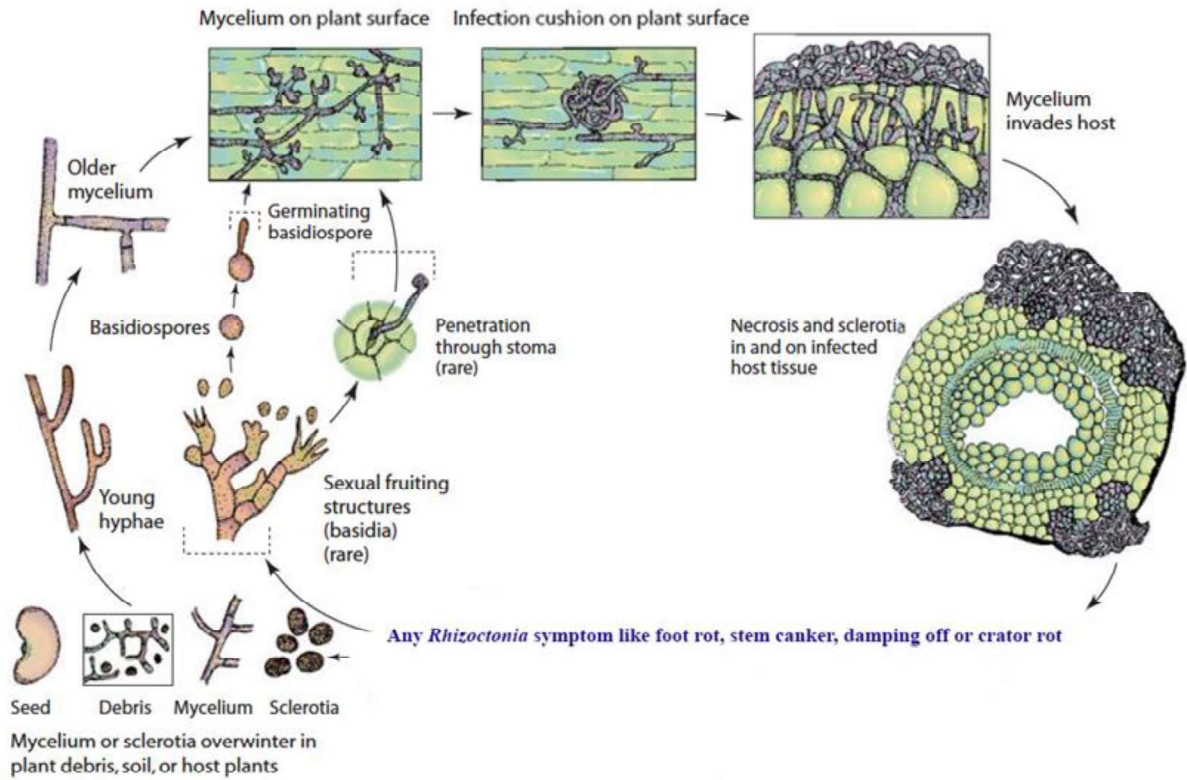
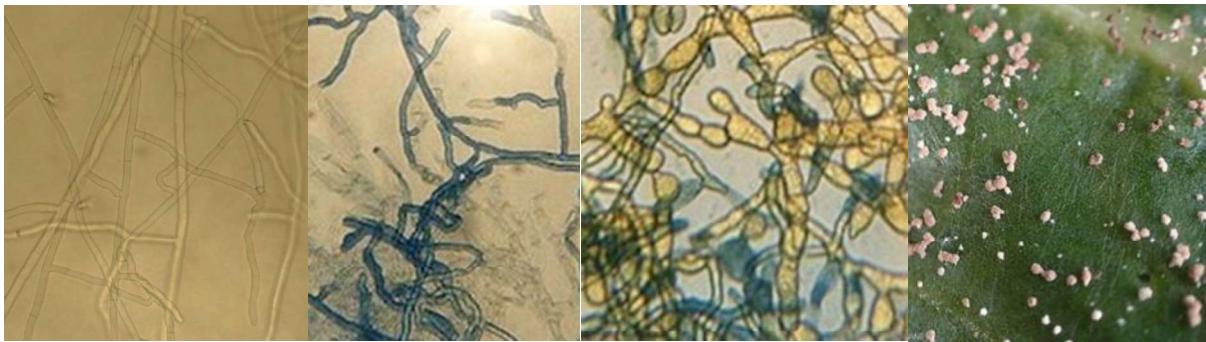


Figure 3 : Cycle biologique de *Rhizoctonia solani*. Source : [18]



1. Hyphes jeunes ¹ 2. Hyphes vieux ² 3. Mycélium sclérotique ² 4. Hyphes et sclérotés ³

Figure 4 : Photos d'observations de *Rhizoctonia solani*. Sources : ¹ S. Bosseur, CTIFL, 2020 ; ² [12] et ³ A. Berton [9]

De plus, de nombreuses substances anti-basidiomycètes ont été interdites aussi (par exemple : le quintozène, l'iprodione, le mépronil, le pencycuron ...), il en reste peu sur le marché ((Messiaen et al., 1991) ; [19]). Actuellement, pour le maraîchage, certains produits contenant de l'azoxystrobine, comme Ortiva, ou un mélange de boscalide et pyraclostrobin, comme Signum, sont utilisables en tant que fongicides. Pour conclure, après l'arrêt de l'utilisation de tous ces produits ayant une plus forte efficacité que les traitements à la vapeur sur les pathogènes telluriques, les problématiques de *Rhizoctonia solani* resurgissent.

b) Cycle biologique du champignon phytopathogène, *Rhizoctonia solani*

Ce champignon se trouve sous forme de mycélium (fig. 4.1-2) dans la phase organique du sol [9], son activité est située essentiellement au niveau de la couche superficielle (0-10 cm de profondeur) (Gouwie, 2019). De plus, lorsque les conditions sont défavorables (températures basses, manque de nutriments...), le champignon est sous sa forme de conservation : sclérotés ou pseudo-sclérotés (fig. 4.4) [9] et peut se situer dans les 30 à 40 cm de profondeur dans le sol (Gouwie, 2019). Ces derniers vont germer lorsque l'environnement redevient favorable, notamment grâce aux signaux des exsudats racinaires de la végétation [11]. Etant saprophyte, il se nourrit de débris végétaux et de matière organique décomposée, ce qui lui permet de survivre plusieurs années sans présence d'hôtes [9]. En effet, il peut vivre une vingtaine de mois dans un sol plutôt sec et 5 à 8 mois lorsque le sol reste humide [16].

Lorsqu'une culture de plantes hôtes est plantée ou semée dans un sol infecté, le champignon contamine l'hôte par ses hyphes présents dans le sol ou provenant de la germination des sclérotés [9]. Cet inoculum peut provenir de la germination des basidiospores qui suit une reproduction sexuée. Néanmoins, ce mode de reproduction est rare, voire exceptionnel, dans la nature chez *Rhizoctonia solani* (Motisi, 2009). Le type de symptômes provoqués et leurs intensités sont divers, selon les souches (leur biologie, leur virulence...), l'environnement et les caractéristiques de la plante cible (âge, espèces, condition de levée...) (Champion, 1997). Il peut y avoir aussi plusieurs phases symptomatiques pour une même espèce. Si cette dernière est sous forme de graine, le mycélium du champignon peut s'attaquer au tégument. Les dégâts provoqués sur les semences ou les jeunes germes, se manifestent par des tâches noires ou brunes et aboutissent à une fonte de semis, c'est-à-dire une perte de la densité de plants levés, soit une levée irrégulière et retardée ((Champion, 1997) ; (Schulthess et al., 2015)). Lorsque les plantes ont réussi à lever malgré la contamination par le pathogène, elles peuvent être frêles, présenter des nécroses et des lésions ou ne pas avoir de symptômes visibles. Les pertes sont très variables d'un champ à un autre (Champion, 1997). Ainsi *Rhizoctonia solani* est capable d'attaquer différentes parties de la plante : les racines, le collet, l'hypocotyle (au stade plantule), les feuilles et les fruits qui touchent le sol. Ils provoquent des lésions brunes ou rougeâtres (plus délimitées que celles réalisées par le genre *Sclerotinia*) (Messiaen et al., 1991), des nécroses et des pourritures brunes [15].

Généralement, comme indiqué sur le cycle (fig. 3), il commence par se développer rapidement (en 10-12h) en surface de l'épiderme puis il forme un « coussin d'infection » composé d'un amas de filaments de mycélium (Motisi, 2009). En environ 5 heures, ces derniers doivent accumuler assez de mélanine, produisant la couleur brune caractéristique au champignon, afin de pouvoir appliquer une pression à la cuticule, notamment grâce à une structure du mycélium en forme de « T » ou un appressorium, puis être assez durcis pour traverser les différentes couches cellulaires de la plante (Gonzalez Garcia et al., 2006). C'est ainsi que le mycélium crée des lésions et, 18 heures après le début de la colonisation, il pénètre entre les cellules ou dans les cellules de l'épiderme jusqu'au cortex (Motisi, 2009).

1. **Nécroses sur racines de radis** (G. Theuré, 04/06/2020)



2. **Pourriture des feuilles et collet sur laitue** (G. Theuré, 20/05-05/06/2020)



3. **Pourriture des feuilles et racines sur mâche** (G. Theuré, 05/06-07/07/2020)



4. **Nécroses sur racines d'épinard** (G. Theuré, 03/06/2020) **et sur cardes** *



Figure 5 : Photos des symptômes provoqués par *Rhizoctonia solani* sur radis, laitues, mâches, épinards et cardes. Source : G. Theuré, CDDM, 2020 et *(Cerceau, Bosseur, 2019)

Durant son développement, le mycélium dissout les cellules et s'en nourrit en libérant des enzymes lytiques [9], ce qui provoque des nécroses brunes de l'organe touché (fig. 5). Par la suite, le mycélium plus âgé va former des sclérotés (et/ou des basides) sur et dans les tissus de la plante (fig. 4.4). Cela mène à la pourriture de l'organe, puis à la contamination d'organes sains par la progression du mycélium dans la plante jusqu'au flétrissement de cette dernière (fig. 5). A l'échelle du champ, les plantes touchées, à l'état flétri et nécrosé, sont réparties en de multiples patchs de forme circulaire ((Cubeta, Vilgalys, 1997) ; [15]). Le champignon va contaminer d'autres plantes par la dissémination de ses sclérotés et mycélium dans le sol, favorisée par le transfert de terre infectée, le travail du sol avec des machines et outils non désinfectés et l'implantation de plants contaminés. Lorsqu'il produit des basides, les basidiospores peuvent être aussi transportés dans l'air et aboutir à des plantes attaquées réparties aléatoirement et uniformément dans les champs ((Cubeta, Vilgalys, 1997) ; [9]).

Rhizoctonia solani est un pathogène de foyer qui se développe dans tous types de sol (avec un pH supérieur à 5,8 [11]), mais il s'attaque fortement aux cultures lorsque les sols sont humides [9]. En effet, les pluies favorisent la dispersion des sclérotés qui peuvent flotter et être transportés par l'eau [16]. Il peut croître entre 5°C et 36°C dans le sol, mais la température optimale à son développement se situe entre 23°C et 27°C [9]. En dessous d'une température de 9°C dans le sol, les contaminations par le pathogène sont limitées. Il faut néanmoins 3 jours d'incubation aux alentours de 20°C pour une propagation rapide du champignon à travers l'hôte [11]. Les dégâts de rhizoctone brun peuvent se rencontrer tout au long de l'année. Cependant, les attaques les plus importantes se produisent essentiellement en période hivernale, lorsque la température est plutôt défavorable pour la plante et la fragilise, ce qui favorise l'entrée du pathogène. En effet, les conditions hivernales (fraîches et humides) ralentissent la levée de la culture, ce qui augmente la période de sensibilité de la plante aux attaques du pathogène lors de la germination [20]. De plus, l'humidité relative est plus élevée en hiver, ce qui favorise le développement du champignon lorsqu'elle atteint 96-100% [16]. Ainsi certaines pratiques culturales peuvent favoriser l'installation du pathogène, notamment lorsque la fertilisation en azote (minérale) est élevée ((Messiaen et al., 1991) ; [16]). Il est aussi considéré comme marqueur biologique d'un sol dit « fatigué », c'est-à-dire qui a été cultivé pendant plusieurs années avec des espèces sensibles [13].

c) Aspect du champignon au microscope

Etant un Basidiomycète, le genre *Rhizoctonia* est composé d'un thalle filamenteux à hyphes septées/cloisonnées (fig. 4.1) contrairement au *Pythium* (Champion, 1997) ; et il forme des sclérotés qui sont des organes globuleux, composés de hyphes entremêlés et compacts, permettant ainsi une longue conservation jusqu'au retour de conditions environnementales plus favorables au champignon ([11] ; [16]).

Pour différencier les espèces de *Rhizoctonia*, divers critères sont principalement observés à partir de leur forme imparfaite car les basides sont particulièrement difficiles à obtenir dans des conditions artificielles, en laboratoire (Gonzalez Garcia et al., 2006). Ainsi la couleur et la forme du thalle permettent de déterminer l'espèce *Rhizoctonia solani*. La coloration du mycélium varie du blanc/hyaline (fig. 4.1), à l'état juvénile, au brun jaunâtre et foncé en vieillissant (fig. 4.2) ([16] ; (voir les vidéos de l'INRAE [21])). Il est visible à l'œil nu, étant assez large, composé de segments de 100 à 250 µm de long et 5 à 15 µm de large avec des ramifications presque perpendiculaires (de 45 à 90°). *Rhizoctonia solani* présente des constriction généralement situées à la base des ramifications latérales et fréquemment au niveau des cloisons (septa) ([22] ; [12] ; (Messiaen et al., 1991)).

Tableau 1 : Synthèse des différents groupes d'anastomoses et subdivisions connus pour les souches de *Rhizoctonia solani* et les plantes hôtes associées. Les familles ou les espèces végétales en gras et italiques sont les cultures étudiées dans le projet Obioleg.

Groupes d'anastomoses et subdivisions	Plantes hôtes
AG 1-1A	Riz, maïs, sorgho, haricot, soja, espèces gazonnantes, plantule de camphre
AG 1-1B	Haricot, riz, soja, légumineuse ligneuse, <i>laitue</i> , hortensia, choux
AG 1-1C	Sarasin, carotte, soja, lin, pin
AG 2-1	Crucifères , fraise, tulipe
AG 2-2 (IIIB)	Riz, jonc, gingembre, espèces gazonnantes, maïs, betterave sucrière, Chrysanthème
AG 2-2 (IV)	Betterave sucrière, espèces gazonnantes
AG 3	Pomme de terre, tabac, tomate, aubergine
AG 4 (HGI, HGII et HGIII)	Tomate, pois, pomme de terre, soja, oignon, coton, haricot mange-tout, plantule de pin taeda
AG 5	Pomme de terre, espèces gazonnantes, pois, soja
AG 6 (HGI et GV)	Non pathogène
AG 7	Soja
AG 8	Poacées
AG 9 (TP et TX)	Crucifères , pomme de terre
AG 10	Non pathogène
AG 11	Blé
AG 12	Chou-fleur, <i>radis</i>
AG 13	Non pathogène
AG BI	Non pathogène

Source : (Gonzalez Garcia et al., 2006).

Lorsque le mycélium devient sclérotique, il a une apparence moniliforme, c'est-à-dire qu'il présente des étranglements et des dilatations de 30 µm de diamètre de certains segments, ayant ainsi une forme de « tonnelet » (fig. 4.3) ([22] ; [12] ; (Messiaen et al., 1991)). Les sclérototes en formation sont blanchâtres (fig. 4.4) et deviennent bruns foncés ou violacés avec le temps [16]. Leurs contours ne sont pas bien définis et sont irréguliers (contrairement aux *Sclerotinia*) (Messiaen et al., 1991), ils sont donc de formes et de tailles très hétérogènes allant de 1 à 6 mm et ils peuvent se regrouper en amas de sclérototes de tailles plus conséquentes. Les mycéliums germant des plus gros sclérototes seront les plus virulents [16].

Le nombre de noyaux permet de différencier certains *Rhizoctonia*. En effet, ceux ayant des hyphes aux cellules binucléés ont une forme sexuée appartenant au genre *Ceratobasidium* (par exemple : *Rhizoctonia fragariae*). Contrairement à ces derniers, d'autres ayant des cellules mycéliennes plurinucléés, ont leur forme parfaite appartenant au genre *Thanatephorus*, comme *Rhizoctonia solani* (Messiaen et al., 1991).

d) Groupes d'anastomoses présents sur les plantes maraîchères

Au sein de l'espèce *Rhizoctonia solani*, les souches sont classées selon les conditions environnementales de leur développement, leurs gammes d'hôtes préférentielles et leurs associations avec d'autres souches appelées « anastomoses » (Messiaen et al., 1991). En effet, nous pouvons observer au microscope si les hyphes de deux souches différentes de *R. solani* se fusionnent entre elles ou non, dans une boîte de Petri. Si ces souches sont compatibles au niveau stomatique, elles forment des soudures au niveau de leur hyphes (anastomoses), elles sont donc classées dans le même groupe d'anastomose (AG = Anastomosis Grouping) ((Messiaen et al., 1991) ; (Leclerc, 2013)) ; sinon il y a un rejet, voire une destruction cellulaire entre les souches, marquant une incompatibilité stomatique (Cubeta, Vilgalys, 1997). Ces groupes et cette réaction d'anastomose sont aussi liés à une ressemblance et une acceptation génétique (Gonzalez Garcia et al., 2006).

Il existe 14 groupes d'anastomoses décrits, dont la majorité sont pathogènes (tab. 1). Certains sont subdivisés selon leurs gammes d'hôtes, leurs fréquences de fusion des hyphes et d'autres critères : morphologiques, biochimiques, pathologiques et génétiques ((Ogoshi, 1987) ; (Cubeta, Vilgalys, 1997) ; (Gonzalez Garcia et al., 2006)). C'est le cas du AG 1, qui est le plus polyphage, composé de 3 sous-groupes : AG 1-1A, AG 1-1B et AG 1-1C (Gonzalez Garcia et al., 2006).

Dans le cadre de notre étude, nous pourrions trouver l'AG 1 attaquant les laitues en France et, plus particulièrement les AG 1-1B et AG 1-1C qui seraient les plus dommageables, notamment de la partie foliaire, sous-abris au printemps et en plein champ en été lors de mois pluvieux et orageux. En effet, il cause parfois des fontes de semis, mais il provoque principalement des pourritures du collet et des feuilles lorsque les laitues deviennent mûres, avant la récolte (fig. 5.2) ([23] ; (Beliard, 2003)). En effet, le pathogène commence par infecter les feuilles au niveau du sol, provoquant des lésions rougeâtres qui atteignent les nervures, puis colonise le pivot et les limbes des feuilles, en les faisant pourrir ((Messiaen et al., 1991) ; (Beliard, 2003)). Ainsi de nombreuses feuilles vont devoir être retirées pour la vente et induire à une perte économique importante [23]. Dans les années 80, il a été remarqué qu'en Floride, AG 1 provoquait des lésions sur les racines de radis (fig. 5.1) (Anderson, 1982). Ce champignon a besoin d'une forte humidité au niveau du sol pour coloniser un hôte, mais aussi d'une température de 18 à 26°C (Beliard, 2003).

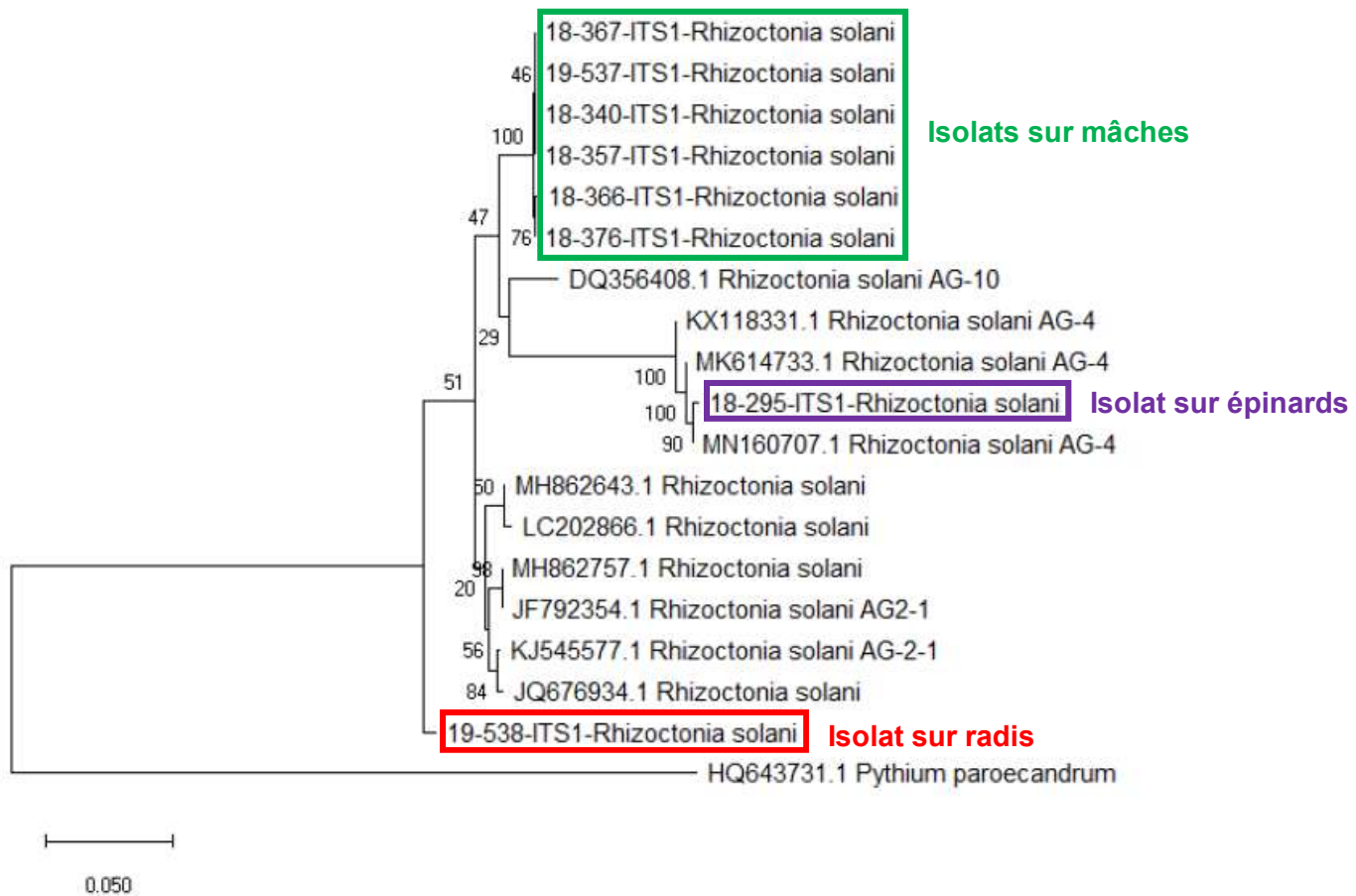


Figure 6 : Arbre phylogénétique du genre Rhizoctonia. Utilisation de la méthode « Neighbor-Joining » et du test « bootstrap » (1000 réplicats). « L'arbre est dessiné à l'échelle, avec des longueurs de branches dans les mêmes unités que celles des distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode des p-distances. Cette analyse a impliqué 34 séquences de nucléotides. Toutes les positions ambiguës ont été supprimées pour chaque paire de séquences. Il y avait un total de 4184 positions dans le jeu de données final. Des analyses évolutives ont été menées sur MEGA X. » (Source : (Jean, 2019))

AG 2 est subdivisé en 2 sous-groupes : AG 2-1 affectant les Brassicacées, et AG 2-2 qui touche essentiellement le maïs et la betterave. Dans notre cas d'étude, AG 2-1 s'attaque aux cultures maraîchères de radis. Il provoque en plus de la fonte de semis, des tâches, voire de la pourriture des tubercules (fig. 5.1) ((Messiaen et al., 1991) ; (Sturrock et al., 2015)). En Provence, il tue les plantules, crée des « cicatrices » brunâtres et déforme les racines, les rendant invendables. Ce groupe d'anastomose se développe parfaitement à une température optimum de 18°C et s'attaque aux plantes lorsque la température se situe entre 15 et 20°C (Messiaen et al., 1991). AG 2-2 peut infecter aussi les salades, provoquant comme AG 1, des symptômes de pourriture basale (fig. 5.2) et de fonte de semis [23], mais aussi les épinards (Gouwie, 2019) et les radis. Sur ce dernier, le pathogène a causé des lésions racinaires dans les cultures du Minnesota (Anderson, 1982). Cependant, cette souche a besoin d'une température optimum plus élevée : de 20 à 30°C (Leclerc, 2013).

AG 3 s'attaque aux Solanacées, essentiellement à la pomme de terre, voire aux cultures de tomates (Camporota, 1989). Dans des études au Minnesota, il a causé quelques pourritures aux graines de radis (Anderson, 1982). Comme pour AG 2-1, sa température optimale est de 18°C (Messiaen et al., 1991). L'activité du pathogène est favorisée lorsque le sol est humide et que sa température se situe entre 16 et 23°C, et au-delà de 25°C, les attaques sont inhibées (Anderson, 1982).

AG 4 est polyphage et subdivisé en 3 groupes : HGI, HGII et HGIII. Il s'attaque à de nombreuses cultures maraîchères nantaises comme les laitues, les mâches, les cardes, les épinards, les radis, les melons, les tomates et d'autres espèces dicotylédones. Il provoque principalement des fontes de semis et des nécroses au niveau du collet (fig. 5), mais peut aussi faire des dégâts sur les parties aériennes (notamment les fruits) si elles touchent le sol. Dans le cas des salades, il cause des fontes de semis et des pourritures basales comme AG 1 et AG 2-2 [23]. Il attaque aussi les cultures d'épinards où il provoque des fontes de semis importantes (Messiaen et al., 1991). De plus, AG 4 (HGIII) a provoqué, dans les cultures d'épinards au Brésil, des pourritures à l'hypocotyle et aux racines (Kuramae et al., 2003). AG 4 infecte aussi les brassicacées comme les radis où il crée de la pourriture au niveau des tubercules (fig. 5.1) (Sturrock et al., 2015). En Italie, les premiers cas d'attaques d'AG 4 sur mâches furent observés en 2005, où il a infecté 50% des plants cultivés dans certaines serres de Lombardie, laissant des patches circulaires de plants flétris (Gilardi et al., 2006). Pour que son développement soit optimal, il a besoin d'une température aux alentours de 28°C. Cependant, il reste pathogène lorsque la température du sol se situe entre 15 et 35°C et cette pathogénicité augmente quand l'humidité au niveau de la surface du sol est importante (Messiaen et al., 1991). Pour finir, AG 5, en plus d'attaquer les pommes de terre, infecte aussi les salades avec une agressivité beaucoup moins forte que AG 1, AG 2-2 et AG 4 [23]. Nous ne traiterons pas les autres groupes d'anastomoses ne concernant pas nos quatre cultures et n'ayant pas les informations nécessaires.

Après l'isolement des souches de *Rhizoctonia solani*, présents dans le maraîchage nantais, des analyses de leur ADN par PCR permettent de vérifier leur identification et de déterminer dans quel groupe d'anastomose ils appartiennent. Des échantillons de nos différents isolats sont envoyés et analysés au CTIFL de Lanxade. Cela aboutit à la réalisation d'arbres phylogénétiques (fig. 6) qui nous permet de confirmer l'appartenance de nos isolats au genre *Rhizoctonia* et à l'espèce *solani* (de 95,44 à 98,81 %). Cependant il n'y a pas assez de séquences analysées pour pouvoir déterminer les groupes d'anastomoses (Jean, 2019), sauf pour l'isolat sur épinard qui est probablement AG 4. C'est ainsi que d'autres analyses sont en cours au CTIFL de Lanxade.

Rhizoctonia solani provoque donc des pertes importantes pour de nombreuses espèces, cela justifie les recherches menées par le CDDM sur les cultures maraichères spécifiques et prépondérantes à Nantes (la mâche, le radis, la laitue et l'épinard). Malgré toutes ces informations sur sa biologie, il n'est pas possible de tester des méthodes de luttés sur ce pathogène car il faudrait déterminer une technique d'inoculation adaptée.

3. Les techniques d'inoculation d'un pathogène tellurique

Pour mieux comprendre l'épidémiologie et étudier les moyens de lutte, il est nécessaire d'inoculer le pathogène artificiellement en conditions contrôlées. Il existe plusieurs méthodes d'inoculations et des tests vont devoir être réalisés pour choisir la méthode adaptée au pathogène.

a) Principe d'une technique d'inoculation d'un pathogène

L'inoculation d'un pathogène est « la réalisation artificielle d'une contamination ; elle a donc pour but d'obtenir le développement du parasite sur, ou dans les tissus-hôtes, et de reproduire ainsi la maladie » (Rapilly, 1968). Quelles soient les méthodes d'inoculation utilisées, elles doivent respecter la condition d'homogénéité de l'inoculum. Il existe une grande diversité de techniques, mais le choix de la méthode dépend essentiellement de la biologie du pathogène et de sa plante-hôte ainsi que l'objectif de l'analyse. Tout d'abord, la source de l'inoculum peut varier selon le type de parasite et le niveau de contamination extérieur toléré.

Dans le cas du *Rhizoctonia solani*, l'inoculum peut être transmis par contamination naturelle, via un sol contaminé ou des végétaux infectés (semences touchées ou déchets de culture). Etant donné que ce pathogène n'est pas un parasite obligatoire, l'inoculum peut aussi provenir d'une culture *in-vitro* du mycélium dans des milieux nutritifs liquides ou solides comme la gélose, la vermiculite, la perlite, du papier, des graines stérilisées... (Rapilly, 1968).

A la suite de l'inoculation, les premiers symptômes apparaissent en général au bout de la 2^{ème} à la 4^{ème} semaine de l'expérimentation pour la plupart des pathogènes (Rapilly, 1968). Néanmoins, certains symptômes peuvent se déclarer plus tardivement à un stade précis de la plante-hôte comme pour le *Rhizoctonia solani* sur laitue provoquant des pourritures basales à la maturité de la culture [23]. Lorsque les premiers symptômes sont visibles, il est essentiel de vérifier le pathogène en cause par isolement et identification de celui-ci en laboratoire. Ainsi, le développement de la maladie est suivi par un système de notation choisi selon le but de l'essai.

Les objectifs de ces méthodes peuvent être diverses. Tout d'abord, elles servent à confirmer la pathogénicité du champignon et identifier les symptômes qu'il provoque sans autres bioagresseurs (postulat de Koch), ainsi qu'à évaluer l'intensité et l'évolution de la maladie. En plus, ces techniques permettent de déterminer l'importance économique de la maladie. D'autres essais peuvent être menés pour identifier ou rechercher une race spécifique du pathogène, ou bien, ils peuvent servir à l'analyse de résistance de certaines variétés cultivées. Pour finir, certaines méthodes permettent de réaliser des tests d'efficacité de moyens de lutte. Ainsi, l'étude de ce dernier point est nécessaire pour le CDDM afin de trouver des produits de biocontrôle et des extraits de plantes efficaces contre le *Rhizoctonia solani*.

Deux types d'inoculation sont possibles ; elles se réalisent soit sur la plante ou un organe spécifique de la plante, soit dans le sol ou dans le substrat de la culture. C'est cette dernière qui sera utilisée car nous voulons surtout étudier la fonte de semis, symptôme le plus préjudiciable provoqué par le rhizoctone.

b) Techniques d'inoculation naturelle

Pour l'inoculation en champ, l'ajout de déchets de végétaux contaminés, incorporés au sol, est la technique la plus simple pour répartir et augmenter l'inoculum du pathogène sur la parcelle étudiée (Rapilly, 1968). Néanmoins, l'objectif des expérimentations est de limiter le taux de *Rhizoctone* brun dans les terrains des maraichers, il est donc préférable de réaliser les essais soit sur des parcelles déjà fortement touchée par la maladie, soit en culture hors-sol dans les serres ou les chambres de cultures.

En culture hors-sol, il est possible d'importer des sols contaminés de différentes parcelles cultivées touchées par le rhizoctone ((Gérard et al., 2018), (Mével et al., 2018a), (Mével et al., 2018b)). Pour limiter l'hétérogénéité de la répartition dans le substrat ce pathogène de foyer, l'ajout de plants infectés dans un substrat stérile peut être aussi employé comme technique d'inoculation ((Mével et al., 2019e) ; (Mével et al., 2019f)).

Cependant, lors des essais au CDDM, ces méthodes n'étaient pas assez homogènes pour des tests de produits phytosanitaires et ne permettaient pas d'assurer que les dégâts étaient uniquement causés par *Rhizoctonia solani*. C'est ainsi que l'inoculation artificielle du rhizoctone après multiplication en laboratoire a été envisagée.

c) Techniques d'inoculation artificielle

Le principe de l'inoculation artificielle en culture hors-sol est d'incorporer le pathogène tellurique préalablement développé dans un substrat stérile. L'application du milieu peut se faire de différentes manières : soit par arrosage ou pulvérisation avec un milieu liquide (Büttner et al., 2004), soit par mélange du substrat avec le milieu ou bien en posant un milieu solide à la surface du sol.

Pour cette dernière, les milieux les plus utilisés sont de la gélose sous forme d'implants (en anglais « plugs of mycelium ») ou des graines inoculées, qui sont réparties de façon homogène sur la surface du substrat ou à une certaine distance précise avec le semis de la culture ((Martin, Lucas, 1984) ; (Tsai et al., 2012) et communication personnelle de D. Blancard). Les semences les plus communément utilisées pour l'inoculation artificielle de *Rhizoctonia solani* sont des graines de céréales (ex : avoine (Kessler, Koehler, 2020)) ou de brassicacées (de choux, chou- fleurs, brocolis...) notamment les graines de colza qui ont permis d'obtenir une répartition de l'inoculum uniforme et une bonne homogénéité des résultats lors d'une expérimentation sur Radis en Taiwan (Tsai et al., 2012). Cependant, les résultats de ces recherches furent pour une forte pathogénicité des plants cultivés, ce que l'équipe du CDDM voudrait éviter.

De plus, les pathologistes du CDDM ont déjà réfléchi à cette méthode et ont relevé un risque de contamination par d'autres pathogènes dans les semences. C'est aussi une méthode plus couteuse et plus laborieuse avec la sélection de lots de graines uniformes et non traitées, leur stérilisation ... C'est ainsi que cette méthode n'est pas étudiée dans cette étude. Néanmoins, il existe d'autres substrats organiques qui sont peut-être plus adaptés et qui ont été utilisés pour la culture et l'inoculation de *Rhizoctonia* sp. comme le son de blé ou les coques de riz pulvérisées (Harris et al., 1993).

L'étude va plutôt concerner des méthodes d'inoculation avec des supports de développement inerte comme la vermiculite et la gélose. Le but de chacun des essais est de contrôler l'inoculum primaire à une pression homogène et stable pour obtenir un taux de plantes cultivées infectées proche de 30%. Cette année d'étude a donc pour objectif final de trouver la méthode d'inoculation adaptée qui doit être homogène et reproductible, en plus d'être simple et rapide pour que, par la suite, de nombreux autres isolats puissent être testés.

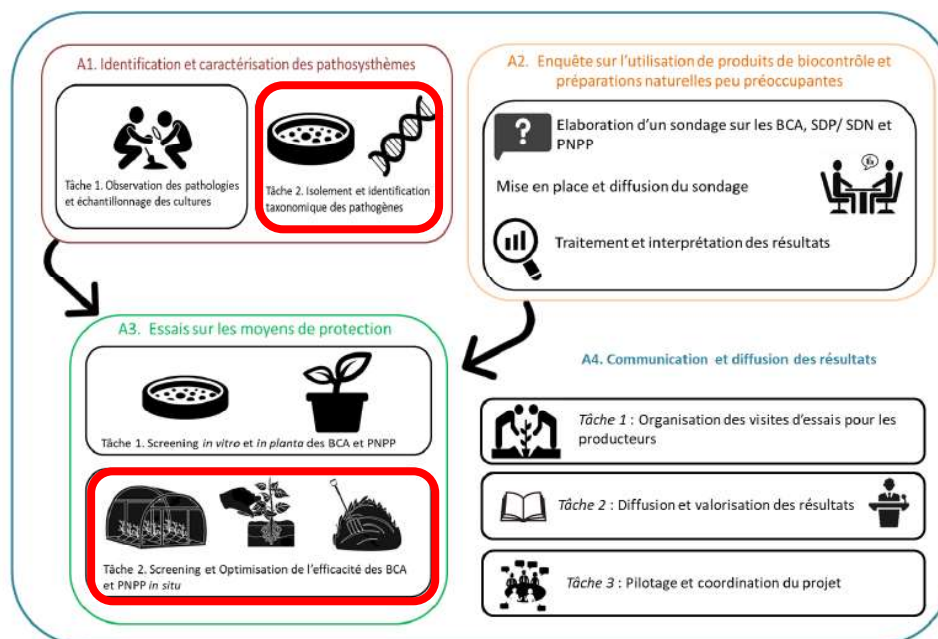


Figure 7 : Résumé des tâches et actions menées dans le cadre du présent projet. BCA : produits de biocontrôle, PNPP : préparation naturelle peu préoccupante, SDP : Substances de Défense des Plantes et SDN : Stimulateurs des Défenses Naturelles. Les tâches réalisées dans le cadre du stage sont encadrées en rouge. Source : (Région Pays de la Loire, 2019).

Tableau 2 : Liste des cultures et pathogènes ciblés dans les différents départements de la Loire-Atlantique. CTIFL : Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes ; CDDM : Comité Départemental de Développement Maraîcher ; CDDL : Comité Départemental de Développement Légumier ; CN : Coopérative de Noirmoutier ; ARELPAL : Association Régionale d'Expérimentation Légumière des Pays de la Loire ; VN : TERRENA - Activité Val Nantais ; FA : Fleuron d'Anjou, RDC : Rosée des Champs, CAB : Coordination AgroBiologique des Pays de la Loire.

Pathogènes	Culture	Localisation	Institut impliqué
Pythium, Phoma, Mildiou, Botrytis	Mâche	44	CDDM, CTIFL, FA
Rhizoctonia, Sclerotinia, Mildiou	Laitue	44, 49	CDDL, CDDM, CTIFL, RDC, VN
Rhizoctonia, Sclerotinia, Mildiou	Jeunes pousses	44	CDDM
Rhizoctonia, Sclerotinia, Mildiou	Roquette	44	CDDM
Rhizoctonia, Sclerotinia, Mildiou	Radis	44, 49	CDDM, RDC, CTIFL, FA
Rhizoctonia, Sclerotinia, Mildiou	Epinard	44	CDDM
Mildiou	Oignon blanc	44	CDDM, FA
Mildiou	Echalion,	49	FA
Mildiou	Persil	44	CDDM
Mildiou,	Pomme de terre	44, 49, 53	CAB,
Rhizoctonia	Pomme de terre primeur	85	CN
Mildiou	Oignon	44, 49, 53, 85	CAB, CDDL, CTIFL
Oidium	Courge	49	CDDL

Source : (Région Pays de la Loire, 2019)

4. La problématique de l'étude

L'enjeu est de limiter la recrudescence problématique du rhizoctone dans le bassin de production nantaise. Cependant, un nombre important de produits chimiques de synthèses efficaces deviennent interdits. Les maraîchers doivent trouver rapidement des alternatives aux produits phytosanitaires, comme les produits de biocontrôles et les substances de bases.

a) Projet Obioleg

C'est dans ce contexte que le projet Obioleg (Optimisation des méthodes de biocontrôle contre les bio-agresseurs en cultures légumières) fut rédigé par la région des Pays de la Loire à partir de janvier 2019, pour une durée de 3 ans. Il est porté par l'ARELPAL et mené en partenariat avec le CTIFL, le CDDM, le CDDL, Fleuron, la CAB, Rosée des Champs, la Coopérative de Noirmoutier et TERRENA - Activité Val Nantais.

Le projet est constitué de quatre actions (fig. 7) :

- L'identification et la caractérisation des pathogènes de cultures maraîchères en Pays de la Loire,
- La détermination et l'utilisation de préparations naturelles peu préoccupantes et de produits de biocontrôle,
- L'efficacité des préparations naturelles peu préoccupantes et des produits de biocontrôle dans différents contextes agropédoclimatiques (du laboratoire aux pleins champs),
- La communication et la diffusion des résultats de ces recherches.

La finalité de ce projet consiste à développer des outils de suivi et de protection vis-à-vis de ces phytopathogènes par des méthodes alternatives aux produits chimiques, adaptées aux cultures maraîchères de la région (Région Pays de la Loire, 2019). Pour démontrer l'efficacité d'une solution, l'inoculation doit permettre d'obtenir des résultats homogènes, stables et reproductibles. Ceci a été trouvé pour tous les pathogènes étudiés autres que le *Rhizoctonia*.

Depuis 2018, ce dernier est étudié principalement par le CDDM et le CTIFL dans le département de Loire Atlantique (tab. 2). Les pathologistes ont fait des observations et des échantillonnages de différents isolats de *Rhizoctonia* (tâche 1 de l'action 1) qui ont été isolés et décrits en milieu gélosé (tâche 2 de l'action 1). De plus, une identification par des méthodes de biologie moléculaire a été réalisée (arbre phylogénétique fig. 6) et a confirmé l'identification morphologique de l'espèce. Des tests en condition contrôlée ont permis l'étude de l'agressivité des isolats sur cultures légumières de la région. L'enquête sur l'utilisation de produits alternatifs (action 2) et un screening des solutions *in vitro* et *in planta* ont été réalisés (tâche 1 de l'action 3). Au CDDM, des essais préliminaires sur des méthodes d'inoculations et l'efficacité de certains produits de biocontrôles ont été menés (tâche 2 de l'action 3).

Ainsi dans cette deuxième année, l'unité de pathologistes du CDDM a étudié plus particulièrement la biologie du pathogène (suite de la tâche 2 de l'action 1) par l'étude de la vitesse de croissance mycélienne en fonction de la température *in vitro* sur une sélection d'isolats. En parallèle, nous avons cherché à déterminer une méthode d'inoculation simple, rapide, homogène, stable et reproductible, en cultures sous conditions contrôlées, afin de pouvoir tester des produits de biocontrôle et des PNPP (suite de la tâche 2 de l'action 3).

b) Problématique et questions subsidiaires des essais 2020

Cette année d'étude nous a apporté des éléments de réponse à la problématique ci-dessous : **Comment contrôler l'inoculum de *Rhizoctonia solani* sur des cultures spécifiques du maraîchage nantais (mâche, laitue, épinard et radis) ?**

Cette dernière se décline sous plusieurs questions :

- Quels sont les facteurs environnementaux qui expliqueraient la pathogénicité des différents isolats d'une même culture dans un milieu naturel et artificiel ?
- Les méthodes pour l'inoculation du pathogène induisent-elles des changements dans la survie et la croissance des cultures étudiées ?
- Les cultures en condition contrôlée permettent-elles l'obtention de résultats proches de la réalité sur le terrain ?
- Quelle est la meilleure méthode d'inoculation pour avoir un inoculum homogène et reproductible ?

c) Hypothèses et méthodes de travail

Pour répondre à la problématique et aux interrogations précédentes, l'étude est séparée en deux parties. La première expose l'analyse des essais passés et préliminaires sur l'inoculation du *Rhizoctonia solani* dans des cultures maraîchères (mâches, radis, laitues et épinards) et des courbes de températures optimales de croissance, ce qui a abouti à une meilleure compréhension du comportement de nos différents isolats. La conclusion de cette dernière a servi à la réalisation du protocole de l'essai suivant. La deuxième partie consiste à mettre au point une méthode d'inoculation pour maîtriser la pression du pathogène en chambre de culture. Cette étude permet aussi de vérifier les hypothèses suivantes.

Pour la partie 1 sur les conditions de développement et de pathogénicités des isolats, nos hypothèses de travail sont les suivantes :

- Les isolats prélevés en automne ont un optimum thermique plus froid que ceux en été.
- Les méthodes d'inoculation artificielles permettent des résultats de pression de rhizoctone homogènes.
- La gélose broyée (non contaminée) n'a pas d'influence sur les cultures étudiées.
- Plus la dose de gélose broyée contaminée est faible, moins il y a de dégâts.
- La méthode d'inoculation avec de la gélose contenant le plus de sclérotas provoque des pertes plus tardivement que de la gélose avec du mycélium jeune.

Pour la partie 2 sur la comparaison des méthodes d'inoculation, nous avons émis ses hypothèses selon les essais précédents :

- Plus la dose de gélose ou de vermiculite est faible, moins il y a de dégâts.
- Plus le CFU est élevé, plus les dégâts de rhizoctone sont importants.
- La vermiculite sèche permet de mieux limiter les attaques que la vermiculite humide.
- La gélose filtrée, sans présence de sclérotas, permet des résultats plus stables et homogènes avec des attaques moins importantes que de la gélose broyée pure.
- La gélose filtrée et diluée de moitié est la moins concentrée en mycélium, et par conséquent, la modalité la moins attaquée.

Les étuves présentes au CTIFL ont été utilisées pour les notations de croissance des isolats sous différentes températures. Le phytotron du CDDM a accueilli les essais sur les méthodes d'inoculations. Les boîtes de géloses et les sachets de vermiculite ont été préparés préalablement dans le laboratoire du CTIFL. Les notations sont portées sur la présence/absence de la maladie de la levée jusqu'à la récolte des différentes cultures.

II. Analyse des essais passés et préliminaires sur le *Rhizoctonia solani* dans le maraîchage nantais

Dans cette partie, nous étudions en détails les expérimentations réalisées sur les isolats en mettant en avant les facteurs influençant leurs développements. Tout d'abord, des tests de croissance à différentes températures ont été réalisés sur les différents isolats afin de déterminer leur optimum thermique. Toutes ces données ont permis de mieux comprendre le pathogène, de le conserver et de le cultiver en laboratoire pour les inoculations. Pour finir, un essai préliminaire sur l'inoculation de mycélium sous forme de gélose a été réalisé et a permis d'affiner le protocole de l'essai suivant.

1. Introduction

a) Historique des premiers essais mis en place sur le rhizoctone au CDDM

Depuis 2018, lorsque le *Rhizoctonia solani* est devenu problématique dans le maraichage nantais, le CDDM a mené diverses expérimentations sur les produits de biocontrôles contre le rhizoctone brun. En effet, des essais ont été réalisés sur des plants, soit en plein terre (généralement sous GAP) chez les producteurs, soit en hors-sol sous serre verre du CDDM ou dans un phytotron (en conditions automnales ou hivernales) du CDDM ou du CTIFL. Le rhizoctone étant généralement plus dommageable en automne et en hiver dans les cultures maraîchères Nantaises, les essais ont donc majoritairement été réalisés durant cette période.

De nombreuses parcelles très touchées par le Rhizoctone ont été utilisées pour des essais de produits de biocontrôles : sur des cultures de radis à Primeurop en hiver 2018-2019 ((Mével et al., 2019d) ; (Mével et al., 2019c)) et sur une culture de laitues à Vendéa en hiver 2019-2020 (Mével et al., 2020). *Rhizoctonia solani* se développant sous forme de foyers localisés ; ce problème d'hétérogénéité très marqué des symptômes a empêché toutes confirmations sur l'efficacité d'une solution. De plus, les conditions d'hydrométrie n'ont pas été stables sur l'ensemble de la parcelle et ont influencé la pression de la maladie, comme à Primalogne où la pression fut la plus en forte à l'endroit le plus humide de la parcelle (Mével et al., 2019c).

Dans un même temps, des essais de produits de biocontrôle, sur cultures de radis en hors sol, ont été menés avec différentes méthodes d'inoculation. En 2018, elle fut réalisée par une importation de terre de différentes origines (Nord Loire ou Vallée maraîchère) et textures (terres lourdes ou sableuses) ((Gérard et al., 2018), (Mével et al., 2018a), (Mével et al., 2018b)). Cependant, les écart-types étaient encore trop grands pour évaluer l'efficacité d'un produit. De plus, une quantification de mycélium présent dans la terre n'a pas pu être effectué, ce qui a donné une limite à l'utilisation de cette technique, n'assurant pas une présence homogène et uniforme du pathogène.

Ainsi, d'autres méthodes d'inoculation ont été testées en 2019. Tout d'abord, l'inoculation de radis contaminés de Primeurop (origine de l'isolat R 19-538) qui a permis une pression plus homogène sur la mâche et le radis sous serre, mais cela n'a pas été assez homogène pour l'analyse de l'efficacité d'un produit ((Mével et al., 2019e) ; (Mével et al., 2019f)). Les méthodes d'inoculations artificielles ont donc été envisagées et les premiers tests avec de la vermiculite ont été réalisés à partir des isolats analysés au CTIFL par les pathologistes du CDDM.

b) Origine et premières analyses des différents isolats

A partir de 2018, le CDDM a procédé à l'échantillonnage de 10 isolats de 8 exploitations différentes sur 4 espèces légumières : la mâche, le radis, l'épinard et la carde (Annexe I). Les premières données sur leur pouvoir pathogène ont été obtenues sur les cultures de mâches, de radis, de laitues et d'épinards.

Tableau 3 : Taux d'infestation de cultures maraîchères par différents isolats de *Rhizoctonia solani* (au bout de 6 à 7 semaines d'essai). (« Afin de distinguer les isolats, la lettre au début de la référence labo CDDM indique la culture d'origine sur laquelle l'isolat a été détecté (E = épinard, L = laitue, M = mâche, R = radis, C = carde, F = fenouil et S pour sorgho) »).

Exploitations			Caracal	Sodiprim	Vendéa		Olive	La Vincée		La Meule
% infestation	TNI 1	TNI 2	E 19-596	E 18-295	L 19-556	L 19-576	L 19-594	L CP 19	F 19-568	S 19-585
Epinard	30	20	10	100	14	5	70	90	80	10
Laitue	10	15	0	75	70	25	100	85	15	0
Mâche	10	15	5	0	10	15	100	5	65	0
Radis	25	5	15	50	5	10	0	50	65	5
Carde		29								

Exploitations	Bouyer	Ducoin			Les Nouelles	Le Levant	La Meule		
% infestation	M 18-351	M 18-319	M 18-357 test 1	M 18-357 test 2	M 18-366	M 18-376	M 18-340	M 18-367	M 19-599
Epinard	85	20	40	30	60	55	75	75	75
Laitue	15	85	100	70	70	100	100	90	100
Mâche	100	55	100	95	80	80	100	100	100
Radis	90	10	40	5	10	25	30	0	10

Exploitations	Primeurop		Ducoin	Layens			Maurat	Corbineau
% infestation	R 18-356	R 19-538	R 19-574	RN 19-539	C Test 1	C Test 2	C 19-581	C 19-593
Epinard	35	60	70	40	100	100	85	10
Laitue	65	30	30	100	100	95	5	0
Mâche	25	55	25	70	95	100	85	0
Radis	75	100	80	70	95	100	0	10
Carde						100		

Source : (Cerceanu, Bosseur, 2020)

En 2019 et en 2020, un rééchantillonnage de certains des isolats a été réalisé pour garder des souches génétiquement proches de ceux du terrain, en ajoutant de nouveaux isolats provenant de laitues, de radis noirs, de fenouils, de sorgho et d'autres cultures de jeunes pousses. Ainsi 18 isolats ont été prélevés en 2019 sur 13 exploitations différentes et 6 ont été prélevés au début de l'année 2020 sur 5 exploitations.

Les premières analyses de 2019 et de 2020 sur l'agressivité montrent qu'il y a des cultures préférentielles selon les isolats (Cerceau, Bosseur, 2020). Généralement ils attaquent la culture dont ils sont originaires et une ou deux autres espèces végétales étudiées (tab. 3). Ces dernières sont variables selon l'isolat ; par exemple, l'isolat M 19-599, en plus d'être très agressifs sur la mâche, attaque la laitue et l'épinard, comme beaucoup d'autres isolats de mâches ; mais certains, tels que l'isolat M 18-351, infectent plutôt l'épinard et le radis... Ce constat est identique pour les isolats de radis qui sont généralement peu agressifs sur la mâche. Le niveau d'agressivité peut différer entre deux isolats de la même parcelle d'origine comme les isolats L 19-556 et L 19-576 de la laitue.

Des isolats originaires d'autres espèces peuvent soit ne montrer aucune agressivité sur les cultures étudiées comme C 19-593 de la cardes ou la S 19-585 du sorgho (rhizoctone proche de celui des céréales), soit provoquer beaucoup de pertes tels que l'isolat de fenouils sur l'épinard et l'isolat de cardes à Layens (appelé « Cardes 4 ») atteignant les 90 à 100% de pertes des 4 cultures étudiées. Ainsi, pour une même culture d'origine, l'isolat ne va pas avoir les mêmes cultures cibles et le même taux d'agressivité. La cause de ces différences est totalement inconnue et amène à se poser plusieurs questions :

- Les différences de taux de pathogénicité entre les isolats sont-elles liées à la fréquence des rotations des cultures sensibles pendant plusieurs années ?
- Le *Rhizoctonia solani* s'adapte-t-il aux cultures de la rotation mises en place sur long terme dans une parcelle ?
- Les traitements du sol et les fongicides ont-ils une influence dans la sélection des isolats agressifs de rhizoctone ?

Pour y répondre, une enquête sur l'historique des parcelles à l'origine des isolats a été menée auprès des maraîchers. Les données sur 12 isolats (Annexe II) ont montré que :

- L'historique des cultures des parcelles ne semble pas être un facteur déterminant de l'agressivité d'un isolat.
- Le rhizoctone s'exprime selon les cultures sensibles, notamment les isolats de radis qui ne peuvent pas attaquer de mâches et inversement. Ainsi un isolat peut réattaquer une culture cible après plusieurs rotations d'espèces non hôtes.
- Les engrais verts, installés sur 5-6 mois, peuvent réduire la pression de rhizoctone mais ils ne diminuent pas son agressivité.
- Les isolats peuvent attaquer une culture qui n'a pas été cultivée sur la parcelle, selon la sensibilité et les méthodes de défense de cette dernière.
- Le rhizoctone est problématique depuis plus de 2 ans, donc l'hypothèse de la réapparition de cette maladie liée à l'arrêt du métam-sodium en 2018 (partie I.2.a)) est fautive. Sa résurgence est causée soit par l'arrêt d'un autre produit phytosanitaire, soit par son évolution génétique due à la pression de certains fongicides.
- L'application d'une grande diversité de solutions phytosanitaires semble augmenter la sélection d'un isolat plus résistant, polyphage et agressif.

L'agressivité du pathogène est donc très spécifique selon l'espèce sensible cultivée et selon la souche présente. Les isolats se comportent différemment selon de nombreux facteurs climatiques.

Tableau 4 : Pourcentage de perte estimée par isolats de rhizoctone testés sur différentes cultures en été 2019, sous la serre verre au CDDM.

Cultures	1 18-357	2 laitue	3 18-295	4 19-539	5 mâche	6 19-538	7 18-340
Radis	-14%	-51%	-66%	-75%	-74%	-15%	-13%
Mâche	-53%	-50%	-72%	-55%	-53%	-38%	-45%
Epinard	-12%	-47%	-97%	-58%	-99%	-24%	-12%
Laitue	-75%	-87%	-97%	-85%	-90%	-48%	-70%

Source : (Mével et al., 2019b)

Tableau 5 : Pourcentage de perte estimée par isolats de rhizoctone testés sur différentes cultures en conditions printanières (12-17°C) dans un phytotron du CTIFL.

Cultures	1 18-357	2 laitue	3 18-295	4 19-539	5 mâche	6 19-538	7 18-340
Radis	-40%	-50%	-50%	-70%	-50%	-100%	-30%
Mâche	-100%	-5%	0%	-70%	-55%	-55%	-100%
Epinard	-40%	-90%	-100%	-40%	-100%	-60%	-75%
Laitue	-100%	-85%	-75%	-100%	-20%	-30%	-100%

Source : (Mével et al., 2019b)

c) Observations des facteurs climatiques influençant le pathogène

À la suite de la détermination de ces différents isolats, des essais ont été aussi menés dans la serre verre du CDDM sur 7 d'entre eux : E 18-295 ; M 18-340 ; M 18-357 ; R 19-538 ; Laitue (CP19) ; Mâche (CDDM) ; RN 19-539. Le premier a été mené durant l'été caniculaire 2019 sur le laitue et l'épinard, puis sur la mâche et le radis (dans le même substrat inoculé). La pression de la maladie a été trop forte pour déterminer l'efficacité des produits de biocontrôle (Mével et al., 2019b). L'observation des taux d'agressivité de cet essai a montré une grande différence par rapport aux essais réalisés au CTIFL (tab. 4 et tab. 5). Les conditions climatiques au sein du phytotron du CTIFL étaient hivernales en température (nuit : 12°C et jour : 17°C) et en luminosité (nuit : 8h éteinte et jour : 16h allumée). Les résultats obtenus dans ces conditions ont été plus proches des observations faites sur les parcelles.

Des isolats attaquant plutôt en période estivale (chaud et sec) et ceux préférant un temps plus froid et humide ont été identifiés. Les isolats E 18-295 et « mâche » ont un taux d'agressivité plus élevé quand il fait plus chaud sur l'ensemble des cultures (sauf l'isolat « mâche » sur les mâches avec un taux restant autour des 50%) (tab. 4). Les isolats « laitue » (CP19) sur les épinards, R 19-538 sur les radis et les épinards, M 18-357 et M 18-340 sur l'ensemble des espèces (mais principalement sur les mâches), préfèrent le froid pour contaminer les cultures (tab. 5). Pour vérifier ces observations et mieux comprendre le pathogène, une étude sur la température optimale de croissance de certains de ces isolats a été réalisée.

Cependant, d'autres facteurs peuvent expliquer cette différence de pathogénicité comme l'humidité du substrat qui n'est pas contrôlée sous la serre et qui a une grande influence sur la maladie comme remarqué sous le GAP à Primalogne. Il faut une irrigation homogène et une humidité atmosphérique stable pour pouvoir comparer les résultats d'un essai. De plus, la luminosité peut aussi jouer un rôle dans le développement de la maladie. Au CTIFL, les néons utilisés dans l'essai de 2019 (test 1) ont donné de moins bons résultats de survie des plants inoculés que les lampes d'iodure et de sodium (probablement plus favorables à la croissance des plantes) de l'essai de 2020 (test 2). Cela mène à l'interrogation suivante :

- Les taux d'agressivité des différents isolats de rhizoctone varient-ils avec le type et le taux de luminosité ou dépendent-ils principalement de la fragilité de la culture ?

Ceci n'est pas étudié dans ce rapport mais ce facteur peut faire l'objet de futurs essais pour mieux comprendre le pathogène.

d) Essais préliminaires sur les méthodes d'inoculation artificielle

Les essais du CTIFL de 2019 et 2020 (précédemment abordés) ont aussi eu pour objectifs de comparer deux méthodes d'inoculation au sein de cultures en pots de 1,5 kg : avec de la gélose (milieu : Malt-Agar) broyée et diluée dans de l'eau stérile (1 boîte de Petri 55, dilution à 1/5 et dilution à 1/10), et avec 3 g, 1 g, 0,5 g et 0,1 g de vermiculite (milieu : Malt). L'expérimentation a duré 11 semaines sur deux isolats très virulents (« Carde 4 » et 19-340) en culture de mâches (Cerceau, Bosseur, 2020). La pression a été plutôt homogène pour la gélose broyée (aux alentours de 60 à 75% de pertes) et équivalent pour n'importe quelles doses testées, contrairement à la vermiculite variant de 0,07 % jusqu'à 93% pour la plus haute dose (3 g). L'effet dose, plus marqué pour l'application de vermiculite, n'a pas été progressif : soit il a provoqué de trop fortes attaques, soit il n'a pas fait pas assez de pertes (trop proches du témoin). L'hypothèse est que la répartition du mycélium dans la vermiculite serait hétérogène et aléatoire pour l'inoculation d'une petite quantité de substrat, et ainsi, cela aurait provoqué cette forte différence entre les répétitions au sein d'une même modalité.

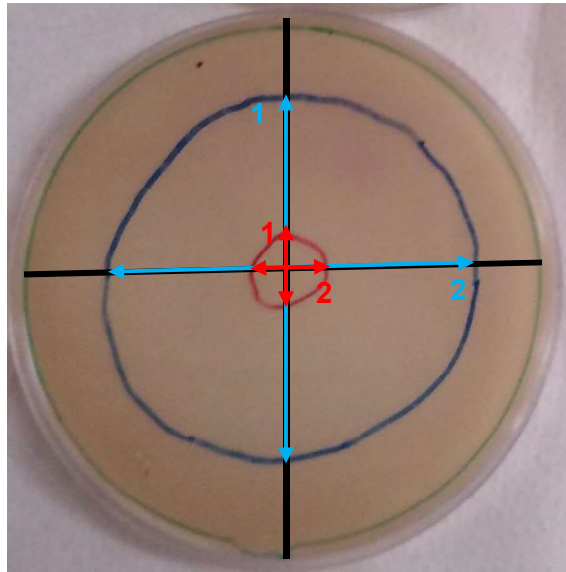


Figure 8 : Exemple de mesures prises pour les calculs des vitesses de croissances des isolats à chaque température (en rouge : diamètre lors de la première notation, en bleu : diamètre lors de la deuxième notation). (Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

À la suite de ces résultats, l'équipe du CDDM a choisi de tester en premier lieu l'inoculation par de la vermiculite en caissette de 15 kg car la préparation de l'inoculum est plus simple et adaptée pour de gros volumes de terre que les boîtes de gélose. Ainsi, cela a été testé lors de l'essai sous serre verre du CDDM en période caniculaire (Mével et al., 2019b). Cependant, la dose de vermiculite de 30 g/caissette de 15 kg de terre, a provoqué une pression beaucoup trop forte pour déterminer l'efficacité des produits de biocontrôle sur le rhizoctone, malgré l'installation d'une deuxième culture dans les mêmes caissettes sans inoculation supplémentaire. Un troisième test de cette méthode a été réalisé dans des conditions climatiques automnales sous la serre du CDDM en 2019. L'inoculation avec 10 g de vermiculite par caissette de 15 kg a été testé sur les cultures d'épinards et de jeunes pousses de laitues. La dose a été encore trop élevée (plus de 60% de mortalité pour 3/5 des isolats étudiés). Elle aurait dû être ajustée pour avoir environ 30% de pertes dans les témoins inoculés pour pouvoir étudier l'efficacité des produits de biocontrôles sur le rhizoctone (Mével et al., 2019a).

La méthode d'inoculation via des grains de vermiculite a ainsi été testée à plusieurs reprises sans détermination d'une dose d'inoculum idéale. Il a fallu donc refaire des essais avec d'autres doses plus faibles. Cependant, plus la dose est petite, plus l'étalement du mycélium dans la caissette devient hétérogène, c'est pour cela qu'une autre méthode d'inoculation artificielle sera travaillée cette année : l'inoculation par de la gélose broyée dans des caissettes de 15 kg. Un essai préliminaire a donc été réalisé, testant différentes durées de cultures du pathogène et différentes doses appliquées (en nombre de boîtes de Petri).

2. Matériels et méthodes

a) Etude sur les températures optimales de croissance des isolats

Cette étude consiste à placer du mycélium jeune de divers isolats à différentes températures. Les isolats sélectionnés pour l'étude sont : E 18-295 d'épinards ; M 18-351, M M 18-357 et M 19-599 de mâches ; R 19-538 et R 19-574 de radis ; L 19-556 et CP 19 de laitues ; F 19-568 de fenouils et l'isolat Carde 4. L'objectif est d'observer leur croissance et de déterminer la température optimale et les températures létales. Pour cela, il faut tout d'abord cultiver les isolats en boîte de Petri en milieu Malt-Agar, puis prélever un implant de gélose de l'extrémité du mycélium, qui est déposé au centre de 3 autres boîtes de Petri de 90mm de diamètre (également en milieu Malt-Agar) par isolat, soit un total de 27 boîtes avec 3 répétitions pour chaque isolat. Ces dernières sont mises dans des étuves à différentes températures : 5 – 10 – 15 – 20 – 25 – 30 – 35 °C qui sont fixes tout au long de l'expérience. Ainsi cet essai nécessite une préparation préliminaire du milieu gélosé d'un total de 189 boîtes de Petri.

Les boîtes restent dans l'étuve pendant 5 jours, puis elles sont mises à température ambiante. Deux notations par jour (à 9h et à 16h-16h30) sont réalisées pendant ces 5 jours (de 16h-16h30 le lundi jusqu'à 9h le vendredi, sauf pour 5°C commençant à 9h le lundi jusqu'à 9h le vendredi). Le système de notation consiste à tracer la délimitation du mycélium sur le dos de la boîte de Petri, dont le diamètre sera mesuré durant la semaine suivante. Deux diamètres sont mesurés permettant de prendre en compte la dimension plutôt ovoïdale de la délimitation du mycélium. Ainsi deux droites sont tracées en passant par le centre du développement du champignon afin de pouvoir donner les diamètres plus rapidement et facilement (fig. 8). Par la suite, les valeurs sont divisées par deux pour obtenir le rayon (en mm). Ce dernier est utilisé pour le calcul de la vitesse de croissance (en mm/h) en moyenne sur l'ensemble des notations par droite, puis par isolat (Annexe III). Par ailleurs, si le mycélium ne s'est pas développé dans l'étuve, la survie est notée par le développement ou non du mycélium à température ambiante. Pour finir, les courbes sont tracées via Excel et elles sont analysées et comparées aux observations précédentes, notamment selon la culture d'origine et la date de prélèvement de l'isolat.

Tableau 6 : Modalités de l'essai préliminaire sur l'inoculation de *Rhizoctonia solani* avec de la gélose broyée :

Cultures	Modalités	Isolats	Agés inoculum	Doses (nb boîtes)
Mâche/Laitue	M1	19-599	Jeune	1
	M2	19-599	Jeune	2
	M3	19-599	Jeune	4
	M4	19-599	Vieux	1
	M5	19-599	Vieux	2
	M6	19-599	Vieux	4
Radis/Epinard	M7	19-538	Jeune	1
	M8	19-538	Jeune	2
	M9	19-538	Jeune	4
	M10	19-538	Vieux	1
	M11	19-538	Vieux	2
	M12	19-538	Vieux	4
Mâche/Laitue	M13	Témoin non inoculé (TNI)	/	0
Radis/Epinard	M14	Témoin non inoculé (TNI)	/	0
Mâche/Laitue Radis/Epinard	M15	Témoin milieu gélosé (TMG)	/	2
	M16	Témoin milieu gélosé (TMG)	/	4

(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 06/2020)

Tableau 7 : Calendrier des opérations réalisées lors de l'essai préliminaire :

Opérations	Date
Inoculation	08/04/20
Semis	10/04/20
Fertilisation	07/04/20
Notations	17/04/20
	21/04/20
	24/04/20
	28/04/20
	06-07/04/20
	11/05/20
	⇒ Récolte radis
	13/05/20
	20/05/20
	03/06/20
	⇒ Récolte épinards
05/06/20	
⇒ Récolte mâches/laitues	

(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 06/2020)

b) Protocole de l'essai préliminaire sur l'inoculation par la gélose

L'objectif de cet essai est de tester l'application de l'inoculum sous forme de gélose broyée à différentes doses (0-1-2-4 boîtes de Petri) et divers âges du rhizoctone (sous forme d'hyphes ou de sclérotés) sur les cultures de mâches (variété 'Gala'), de laitues (jeunes pousses), d'épinards et de radis, dans des caissettes de 15 kg. Il va permettre de déterminer l'apport d'inoculum de *Rhizoctonia solani* nécessaire afin de s'approcher d'une attaque de rhizoctone observée sur le terrain et de pouvoir tester l'efficacité de produits de biocontrôle par la suite (soit un taux de plantes survivantes supérieur ou égal à 70%).

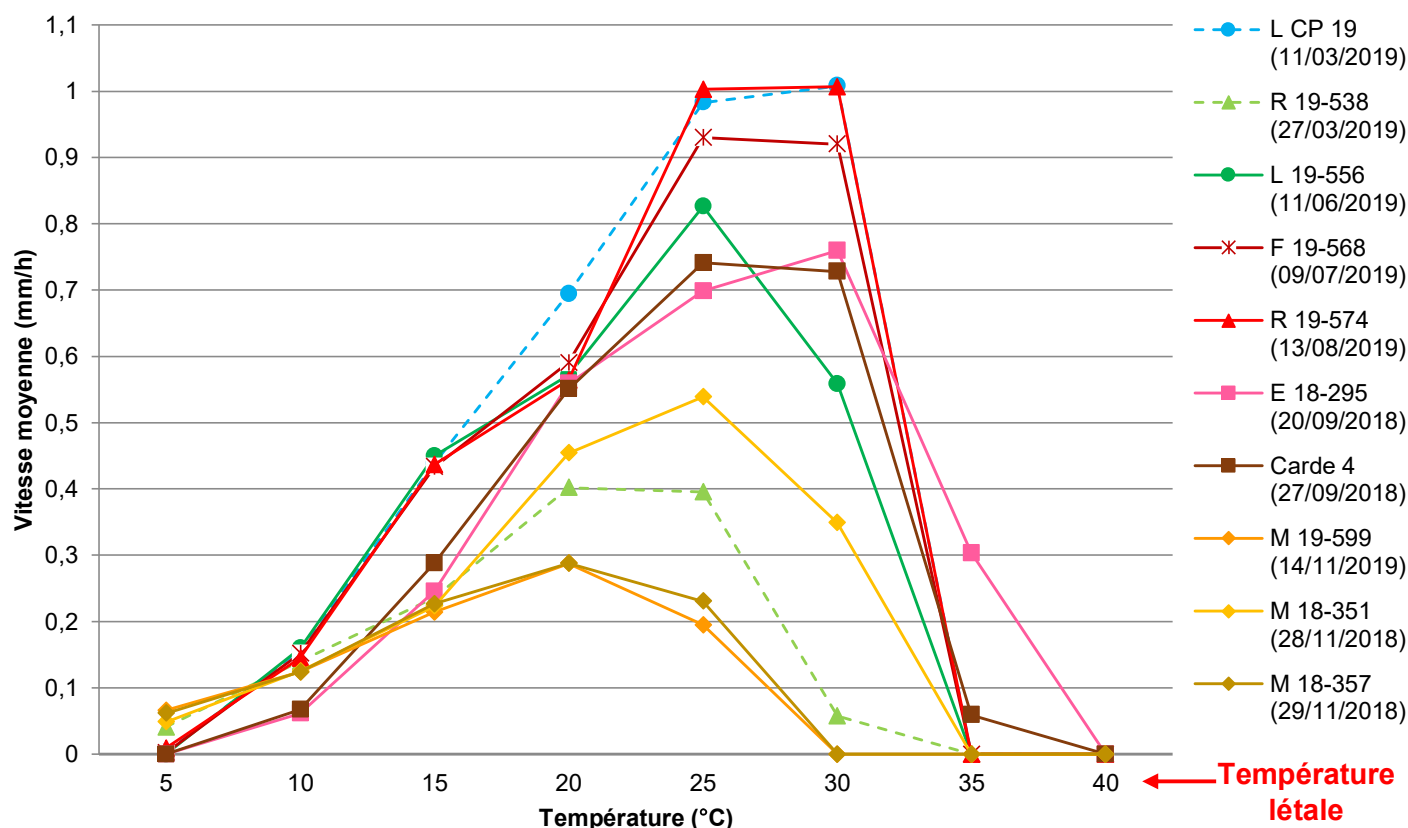
En parallèle, un essai testant des produits de biocontrôle et des PNPP est mené au sein d'une même phytotron avec la même méthode d'inoculation. Par la suite, un protocole d'expérimentation sera construit en s'appuyant sur les résultats de cet essai, pour déterminer la méthode d'inoculations artificielles la plus homogène (Partie III. 2.). L'essai préliminaire est mis en place en phytotron en condition automnale : la température de jour pendant 12 h à 16°C, avec de la lumière allumée produite par 4 tubes de néon, la température de nuit pendant 12h à 12°C (lumière éteinte) et l'humidité relative fixée à 80%. Le substrat est prélevé sur une parcelle stérilisée à la vapeur d'une exploitation maraîchère de plein champ.

Les isolats de *Rhizoctonia solani* sélectionnés sont le 19-599 (provenant d'une culture de mâches de l'exploitation La Meule) sur les cultures associées de mâches et de laitues, et le 19-538 (provenant d'une culture de radis de l'exploitation Primalogne) sur les cultures associées de radis et d'épinards. Ces isolats ont été choisis pour leur fort taux d'agressivité sur ces cultures. L'inoculum est multiplié sur milieu gélosé de Malt-Agar en boîtes de Petri de 55mm de diamètre. Ces dernières ont été préparées au CTIFL le 17/03/20, soit 3 semaines avant inoculation afin d'obtenir des sclérotés (inoculum vieux) ou le 31/03/20, soit 1 semaine avant inoculation afin d'obtenir uniquement des hyphes (inoculum jeune). Les différentes doses d'inoculum (0, 1, 2 et 4 boîtes de Petri) sont incorporées au substrat après broyage à la main dans chaque caissette de terre de 15 kg. Des témoins avec l'ajout de 2 et 4 boîtes de gélose non inoculée sont compris dans l'essai afin de connaître l'impact de la gélose sur les 4 cultures associées (radis, mâche, épinard et laitue).

Les cultures sont semées 2 jours après l'inoculation : 15 graines par rang de radis, d'épinards et de laitues ; et 20 graines par rang de mâches. Les caissettes contiennent 4 rangs, soit 2 rangs de chaque culture, sauf pour les témoins avec l'ajout de gélose ayant 1 rang de chaque espèce maraîchère. L'arrosage se fait manuellement par aspersion (avec un débit d'eau de 0,5 mm/s), 1 à 2 fois par semaine selon les cultures, pendant 5 à 6 secondes par caissette. Une fertilisation, équivalente à 30 unités d'azote minérale, est réalisée une fois durant la 4ème semaine d'essai par pulvérisation du produit Fertimâche (N.P.K 6,5-3-10).

Ainsi 14 modalités vont être testées sur 3 répétitions (caissettes), sauf pour les deux modalités témoins avec l'ajout de gélose non inoculée qui sont répétées 2 fois, soit un total de 40 caissettes (tab. 6). Les variables sont donc la dose d'inoculum en boîte de gélose ayant comme facteur : 0, 1, 2 et 4 ; et l'âge de l'inoculum ayant comme facteur : vieux (3 semaines) et jeune (1 semaines). La répartition des modalités est choisie pour les témoins afin d'éviter de potentielles contaminations entre les caissettes. Pour les autres modalités, chaque côté du phytotron n'est destiné qu'à un seul isolat : 19-599 (reconnu par une étiquette bleue) est du côté droit du phytotron et 19-538 (reconnu par une étiquette jaune) est du côté gauche du phytotron. Au sein des isolats, les modalités sont plus ou moins randomisées. Chaque répétition est située sur le même étage : l'étage du haut désigne la répétition numéro 1, l'étage du milieu désigne la répétition 2 et l'étage du bas, la répétition 3. Chaque modalité représente une colonne sur l'ensemble des étagères afin de faciliter le comptage.

Vitesses de croissances mycéliennes *in vitro* de différents isolats de *Rhizoctonia solani* en fonction de la température



Légende : La lettre au début de la référence indique la culture d'origine de l'isolat : E = épinard, L = laitue, M = mâche, R = radis et F = fenouil. Les couleurs correspondent à la période à laquelle l'isolat a été détecté :

Isolats	Cultures	Dates de détection	Périodes	Couleurs	Sous serre (tirets)
CP 19	Laitues	11/03/2019	Hivers	Bleu	Oui
19-538	Radis	27/03/2019	Printemps	Verts	Oui
19-556	Laitues	11/06/2019	Printemps	Verts	Non
19-568	Fenouil	09/07/2019	Été	Rouge	Non
19-574	Radis	13/08/2019	Été	Rouge	Non
18-295	Epinard	20/09/2018	Été	Rouge	Non
Carde 4	Cardes	27/09/2018	Automne	Jaune	Non
19-599	Mâches	14/11/2019	Automne	Jaune	Non
18-351	Mâches	28/11/2018	Automne	Jaune	Non
18-357	Mâches	29/11/2018	Automne	Jaune	Non

Figure 9 : Courbes des vitesses de croissance de chaque isolat selon la température. (Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

L'essai dure 8 semaines durant lesquelles un système de notation est appliqué afin de suivre le développement de la maladie (Rapilly, 1968). L'intensité de la maladie est évaluée par le comptage de plantes saines de chaque caissette. Le caractère noté dépend d'une reconnaissance visuelle des symptômes causés uniquement par le rhizoctone (fig. 5). Plusieurs notations sont réalisées durant l'essai :

- Après le semis, le premier comptage consiste à dénombrer le nombre de plants levés.
- Par la suite, les comptages de plantes survivantes vont être réalisés 2 fois par semaine, puis 1 fois par semaine lorsque les résultats varient peu (tab. 7).
- Durant la notation finale, le nombre de plantes touchées et non touchées par le *Rhizoctonia solani* est comptabilisé avec l'inspection sanitaire des parties souterraines. Si la plante est touchée par d'autres bioagresseurs (par exemple, la mouche des semis, les virus ou le *Thielaviopsis basicola* sur la mâche), elle n'est pas comptabilisée dans les plants touchés.

Pour analyser les résultats, des graphiques du taux de plantes survivantes (%) selon le temps sont décrits. Le test statistique d'homoscédasticité de Bartlett permet de montrer la présence ou non d'hétérogénéité trop importante des données résultant de la technique d'inoculation. Si tel est le cas, l'analyse se fait via un test non-paramétrique d'analyse des médianes pour voir une idée de la quantité de gélose à tester dans un deuxième essai. Sinon la construction d'un tableau ANOVA et l'utilisation de tests de comparaison multiple (test de Tukey) sont réalisés afin de déterminer la dose idéale pour la poursuite des expérimentations. Tous les résultats statistiques sont obtenus grâce aux fonctions INHP (Analyse de la variance à 1 facteur) de dans le logiciel statistique R.

3. Résultats

a) Courbes de croissance des isolats selon la température

Il est nécessaire de rappeler que chaque isolat de *Rhizoctonia solani* a des périodes préférentielles pour se développer et devenir pathogène. Les résultats (fig. 9) nous indiquent que plus la période de détection de l'isolat est chaude, plus l'isolat est capable de se développer rapidement à 30°C et ne meurt qu'à partir de 40°C ; et inversement, plus la période de détection de l'isolat est fraîche, plus la température optimale de sa croissance s'approche de 20°C et plus il a de risque de mourir à 35°C.

Globalement les isolats estivaux vont croître 3 fois plus vite à leur température optimale que ceux de période fraîche. L'isolat CP19 est une exception car il a été récupéré en hiver et il se comporte comme ceux de période estivale. Ce dernier provient d'une culture de laitue sous serre-verre, ce qui n'est pas représentatif des conditions plus fraîches d'une culture de pleins champs. L'isolat R 19-538 a été récupéré d'un essai sous serre-verre du CDDM, mais l'inoculation fut réalisée par des radis contaminés d'une parcelle en plein champs de Primeurop qui est le véritable lieu d'origine de cet isolat.

Les vitesses relevées dans cet essai dépendent du milieu de culture utilisée, en plus de la température d'incubation, mais elles sont aussi différentes selon l'espèce végétale d'origine et la période de détection. En effet, les isolats de mâches se développent plus lentement et dans des conditions plus froides que l'isolat de Carde, récupéré en début d'automne. Néanmoins des différences entre les isolats de mâches peuvent être notées, comme le M 18-351 qui s'est plus vite développé que le M 18-357, récupéré le lendemain. De plus, pour les isolats M 18-357 de mâches et R 19-538 de radis, la température commence à être létale à 35°C.

**Ratio de mâches survivantes à différentes quantités et âge de
Rhizoctonia solani isolat 19-599**

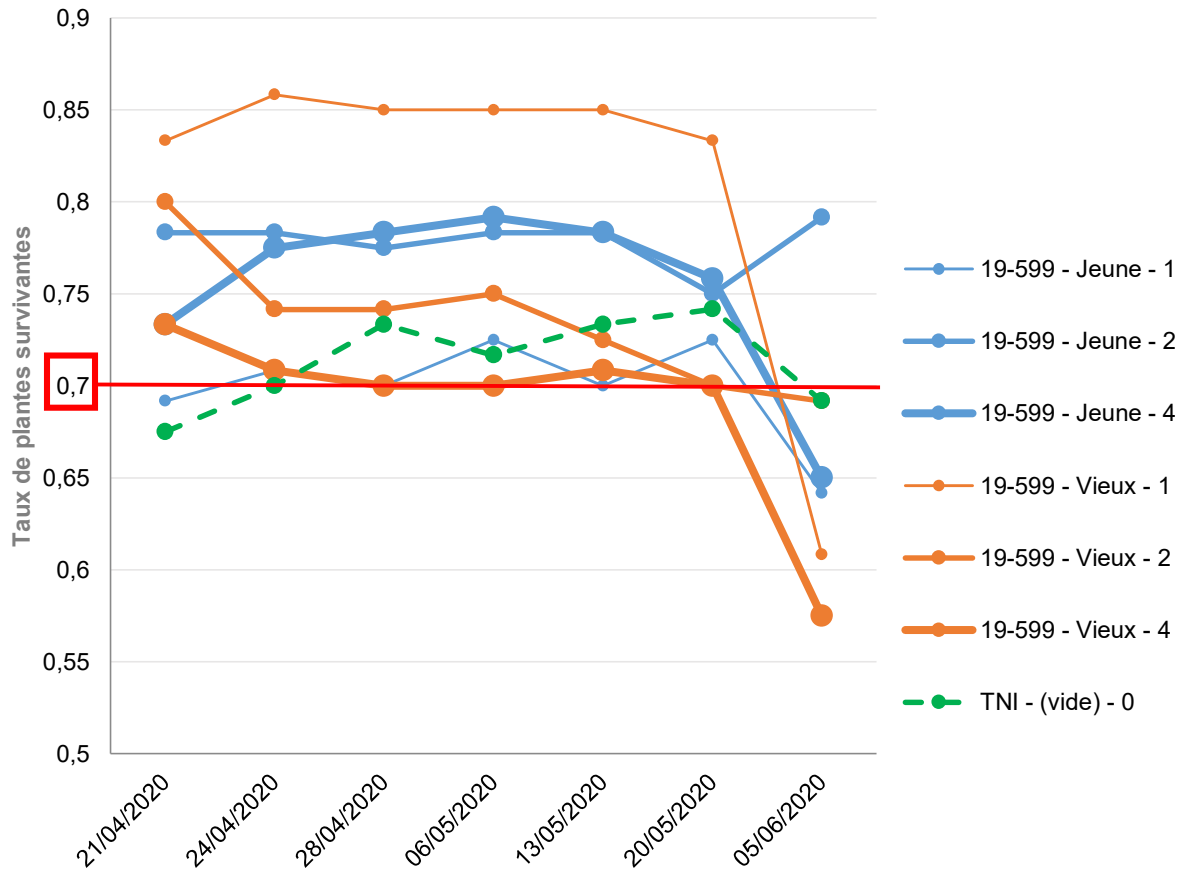


Figure 10 : Graphique des taux de plantes survivantes à l'isolat 19-599 dans les cultures de mâches inoculées avec de la gélose contaminée par du mycélium vieillissant (de 3 semaines) ou jeune (d'une semaine), à différentes doses (0, 1, 2 ou 4 boîtes de Petri de 55). (Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

Ainsi, nous pouvons comprendre pourquoi certains isolats ne vont pas s'exprimer de la même manière en période estivale qu'en période automnale ou printanière (tab. 4 et tab. 5). En effet, lors de l'essai sous serre en période caniculaire (tab. 4), l'isolat R 19-538 n'a pas exprimé d'agressivité, car il n'a pas pu survivre à de fortes températures, contrairement à l'essai dans le phytotron en condition automnale (tab. 5). La même remarque peut être faite pour M 18-351 qui a mieux résisté à de telles températures car il a pu toucher fortement la laitue. De nombreux isolats ont beaucoup touché la laitue, cette culture permet peut-être de conserver plus d'humidité et de fraîcheur dans les caisses. A l'inverse, l'isolat d'épinard E 18-295 avait été plus agressif lors de la période caniculaire qu'en conditions plus fraîches car c'est un isolat que se développe mieux dans la chaleur.

Les isolats étudiés par la suite sont le M 19-599 de mâches et le R 19-538 de radis (Annexe III). Il leur faut donc des conditions automnales ou printanières afin qu'ils puissent exprimer leur pathogénicité sur les cultures de l'étude.

b) Résultats de l'essai préliminaire sur l'inoculation par de la gélose broyée

En reprenant les résultats du CTIFL (tab. 3), l'isolat 19-599, inoculé sur les cultures de laitues et de mâches, est censé être aussi agressif sur les laitues que sur les mâches ; et l'isolat 19-538, inoculé sur les cultures de radis et d'épinards, est censé être plus agressif sur les radis que sur les épinards.

Symptômes des isolats sur les cultures

Tout d'abord, les cultures de mâches et d'épinards ont principalement été atteintes de fontes de semis, que ce soit avec du mycélium vieux ou jeune. Pour les radis et les laitues, le mycélium jeune a provoqué plus de dégâts au semis, tandis que le mycélium plus âgé a attaqué les plantes plus tardivement. Ces symptômes ont été visibles lors de la notation finale.

Impact de la gélose sur les cultures

Statistiquement, il n'y a pas eu de différence entre les témoins milieux gélosés et le témoin non inoculé. Ainsi, la gélose n'a pas eu d'impact sur la survie des cultures. Ces modalités témoins gélosés ne seront donc plus analysées par la suite.

Comportement de l'isolat 19-599 sur cultures de mâches

La fonte de semis a été la principale cause de perte de mâches que ce soit par l'inoculation de mycélium jeune ou vieux (fig. 10). En cours de culture, peu de pertes supplémentaires ont été observées. Ainsi la fonte de semis a provoqué un taux de pertes souhaité de 30% dans l'ensemble des modalités. Les doses d'inoculum apportées par les boîtes de Petri ont été correctes pour l'évaluation de solutions antifongiques. À la levée, il n'y a pas eu de différence significative entre modalités inoculées et celle non inoculée qui a probablement été contaminée. Lors de la notation finale, les racines des mâches ont été observées et certaines mâches, paraissant en bonne santé, ont présenté des symptômes de nécroses sur les racines causées par le *Rhizoctonia solani*. Cela explique la chute du taux de plantes survivantes en fin d'essai pour la plupart des modalités inoculées. Néanmoins, les plantes ont été contaminées aussi par d'autres pathogènes comme *Thielaviopsis basicola* et par un virus, les mâches touchées par ces derniers n'ont pas été comptabilisées.

Ainsi, il n'y a pas eu d'effets significatifs de la dose et de l'âge du mycélium sur les attaques de l'isolat 19-599 de *Rhizoctonia solani* sur mâches. En effet, cela a été confirmé par l'analyse statistique des résultats finaux (Annexe IV). De plus, cette analyse a montré que les résultats ont été homogènes, ce qui signifie que cette méthode est adaptée à l'inoculation de 19-599 sur mâches.

Ratio de laitues survivantes à différentes quantités et âge de *Rhizoctonia solani* isolat 19-599

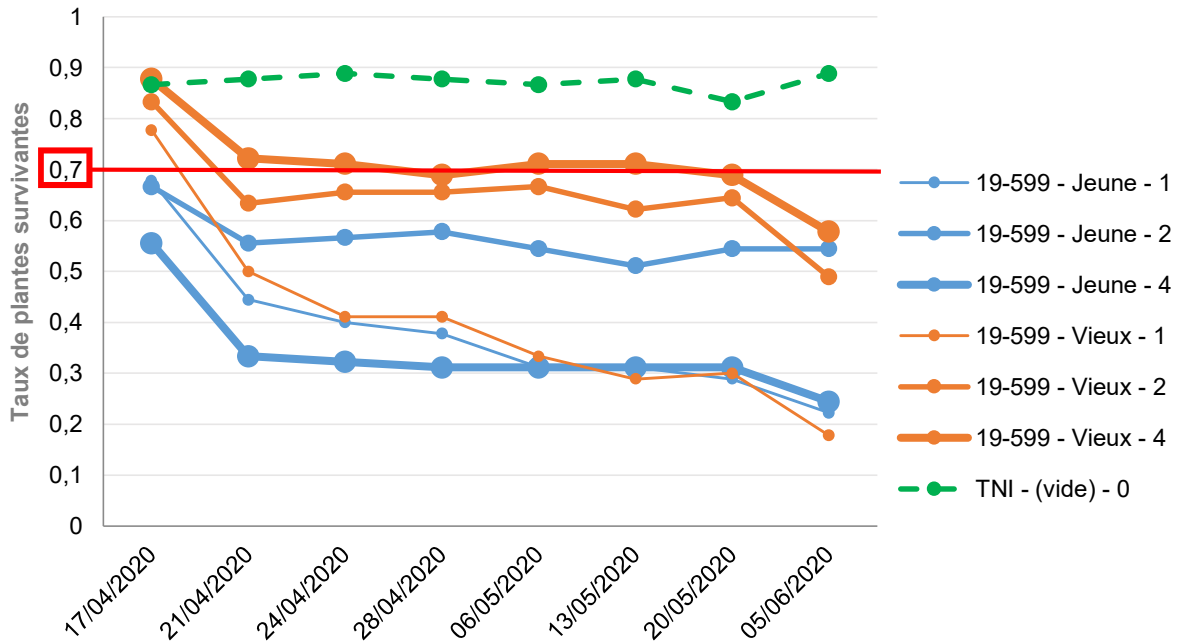


Figure 11 : Graphique des taux de plantes survivantes à l'isolat 19-599 dans les cultures de laitues inoculées avec de la gélose contaminée par du mycélium vieillissant (de 3 semaines) ou jeune (d'une semaine), à différentes doses (0, 1, 2 ou 4 boîtes de Petri de 55). (Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

Ratio de radis survivants à différentes quantités et âge de *Rhizoctonia solani* isolat 19-538

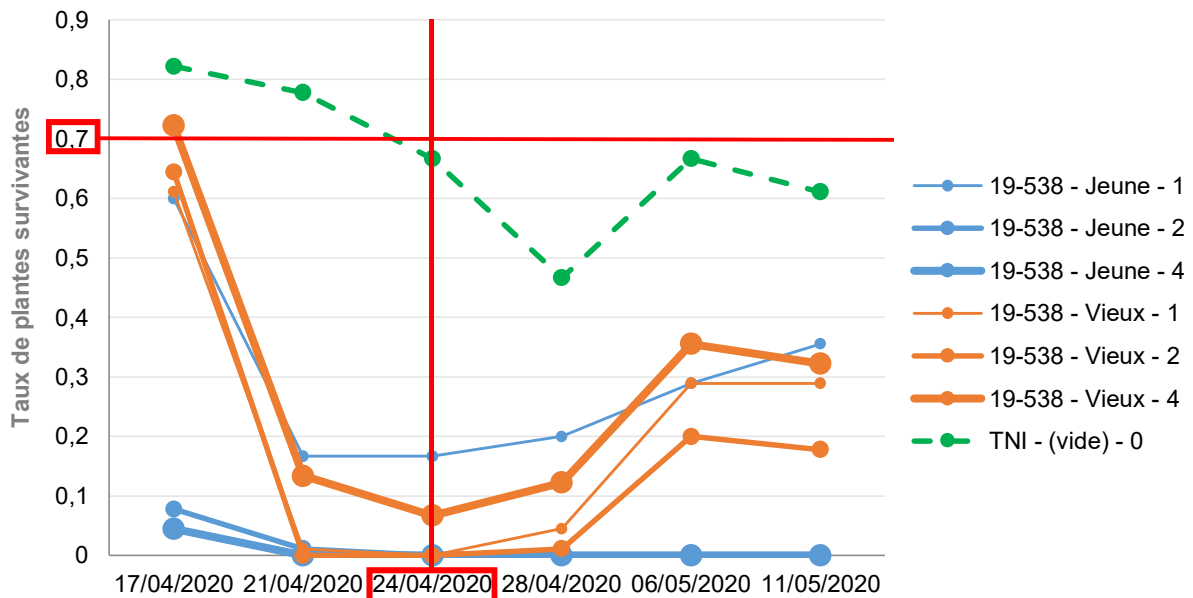


Figure 12 : Graphique des taux de plantes survivantes à l'isolat 19-538 dans les cultures de radis inoculées avec de la gélose contaminée par du mycélium vieillissant (de 3 semaines) ou jeune (d'une semaine), à différentes doses (0, 1, 2 ou 4 boîtes de Petri de 55). (Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

Comportement de l'isolat 19-599 sur cultures de laitues

Au début de l'essai sur la culture de laitues, les modalités inoculées avec du mycélium vieux ont mieux levé que celles avec du mycélium jeune (fig. 11). En effet, l'inoculum jeune a provoqué surtout de la fonte de semis et aura moins de morts par la suite, ayant des résultats plus proches du témoin dans les tests statistiques (Annexe IV). En effet, dès que les sclérotés ont germé, de nombreuses laitues ont été touchées à la racine et au collet par le rhizoctone, ce qui les a fait pourrir et les courbes ont rejoint celles des modalités inoculées par du mycélium jeune.

Nous remarquons que, plus il y a de boîtes contenant des sclérotés ajoutés à l'inoculation, moins les laitues ont tendance à être contaminées. En effet, seule la modalité d'une boîte d'inoculum âgée a provoqué significativement le plus de plantes touchées post-levées. Ceci a pu être dû à la concurrence entre les colonies de *Rhizoctonia solani* pour une même ressource. Néanmoins, les modalités inoculées ont été toutes plus ou moins situées sous la barre des 70% de plantes saines. De plus, il n'y a pas eu de différence significative entre ces modalités (Annexe IV). Statistiquement, les résultats finaux étant homogènes, la méthode est donc adaptée pour l'inoculation de 19-599 sur laitues.

Comportement de l'isolat 19-538 sur cultures de radis

Pour les radis, les notations de la modalité avec 2 boîtes de mycélium jeune se sont arrêtées le 28/04 car les radis ont tous été perdus. En effet, les doses d'inoculum appliquées sur les radis étaient beaucoup trop fortes (fig. 12). Au début de l'essai, les modalités inoculées avec du mycélium vieux ont mieux levé que celles avec du mycélium jeune. Par contre, après la levée, le nombre de plantes saines a chuté brutalement sur une courte période, puis est remonté lentement et progressivement.

La chute pourrait être due aux mauvaises conditions de germination, après semis, la culture a été plongée dans l'obscurité pendant une semaine, le temps de réparer le phytotron, ce qui a pu rendre les radis plus sensibles au rhizoctone. La remontée progressive a été attribuée à un enracinement post-attaque lorsque les radis ont réussi à surmonter les dégâts provoqués par *Rhizoctonia solani*.

Globalement, toutes les modalités inoculées ont bien été en dessous de la barre des 70% du taux de plantes survivantes acceptables, étant toutes inférieures à 20% à partir de la deuxième notation, et n'ayant pas de différences entre elles (fig. 12). Les résultats finaux ont présenté une forte hétérogénéité (Annexe IV). Par l'utilisation d'un test non paramétrique, différentes doses d'inoculum ont pu être notées à la fin de l'essai, notamment que l'ajout de 2 à 4 boîtes de mycélium jeune a été beaucoup trop élevé par rapport à l'ajout d'une seule boîte de mycélium jeune ou de boîtes composées majoritairement de sclérotés.

Néanmoins, l'inoculum plus âgé, avec sclérotés, a provoqué des nécroses racinaires en fin de culture, les sclérotés ont dû germer pour provoquer des dégâts sur la culture, ce qui a expliqué le délai d'attaque plus long. Cette différence du nombre de radis morts plus importants pour des modalités inoculées par du mycélium vieux, est statistiquement confirmée. Il serait donc intéressant d'étudier d'autres techniques de préparation de la gélose pour des doses inférieures à une boîte de Petri de 55.

**Ratio d'épinards survivants à différentes quantités et âge de
Rhizoctonia solani isolat 19-538**

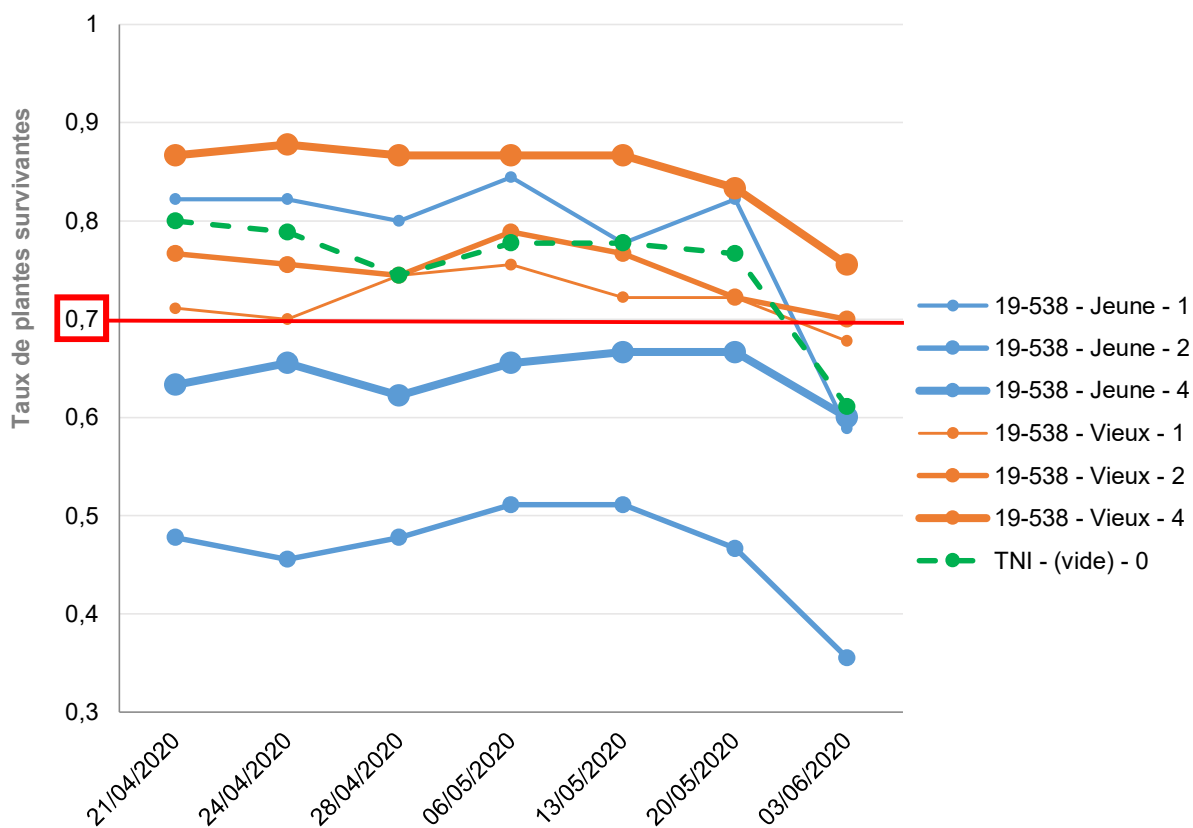


Figure 13 : Graphique des taux de plantes survivantes à l'isolat 19-538 dans les cultures d'épinards inoculées avec de la gélose contaminée par du mycélium vieillissant (de 3 semaines) ou jeune (d'une semaine), à différentes doses (0, 1, 2 ou 4 boîtes de Petri de 55). (Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

Comportement de l'isolat 19-538 sur cultures d'épinards

Les modalités inoculées avec du mycélium vieux ont mieux levé que celles avec du mycélium jeune (fig. 13). La fonte de semis a été la principale cause de la perte d'épinards peu importe l'âge de l'inoculum. En cours de culture, peu de pertes supplémentaires ont été observées. La fonte des semis dans l'ensemble des modalités s'est rapprochée du taux de perte souhaité de 30%, sauf pour la modalité contenant 2 boîtes de mycélium jeune qui ont été très agressives.

Finalement, les résultats ont été homogènes. L'analyse statistique (test de Tukey) a confirmé que les modalités inoculées par du mycélium vieillissant ont provoqué le moins de perte d'épinards (Annexe IV). Les résultats de ces derniers sont restés bien au-dessus de la limite des 70% de plantes survivantes (fig. 13). Les moyennes des autres modalités inoculées ont été généralement proches des écart-types des témoins, sauf la modalité 2 boîtes de mycéliums jeunes qui a eu le plus de morts.

4. Discussion

a) Influence de la température sur les isolats de *Rhizoctonia solani*

Le développement des isolats de rhizoctone selon la température

Par les résultats des courbes de températures, nous pouvons confirmer que le *Rhizoctonia solani* peut croître entre 5°C et 36°C [9], et généralement, la température optimale de nos isolats se situe entre 20°C et 30°C. Cependant, nous ne savons pas à quelle température l'isolat n'est plus pathogène sur la culture. Il serait donc intéressant d'inoculer sur les plantes sensibles les isolats ayant subi certaines températures extrêmes lors de leur croissance (5-10°C et 30-35°C), dans le but de déterminer les limites thermiques de pathogénicité du pathogène. Selon M. Blancard [9], cette limite serait en dessous de 9°C dans le sol, mais elle pourrait varier selon les périodes de détection des isolats. En effet, une différence existe entre les isolats provenant de culture estivale qui se développe plus rapidement à 30°C et ceux de culture automnale dont la température est optimale autour des 20°C et elle devient létale à partir de 35°C. Ainsi, hors des saisons où la température est optimale pour l'isolat, le rhizoctone est probablement sous sa forme de conservation (sclérotés).

Les effets des techniques de désinfection du sol par la chaleur

La température létale des isolats étudiés est située à 35-40°C (fig. 9) ; les traitements de vapeur peuvent donc tuer le rhizoctone avec l'injection de température montant à 90-100°C jusqu'à 10 cm de profondeur (communication personnelle de Marylou Lorne). La solarisation est aussi conseillée (Beliard, 2003) ; cette méthode n'est utilisée qu'à partir de mai jusqu'en juillet (pour des isolats de printemps-été) et atteint difficilement plus de 35-40°C dans les 10 premiers centimètres du sol, sous de grands abris plastiques (communication personnelle de Sidonie Thoraval). Néanmoins, les sclérotés pourraient échapper à la destruction par ces techniques car ils sont souvent présents dans les couches à 30-40 cm de profondeur (Gouwie, 2019) et résistent probablement mieux à la chaleur. Il serait intéressant de tester sur les sclérotés de nos isolats différentes températures (35-40-45°C...) afin de déterminer leur résistance à la chaleur. Ces méthodes seraient peut-être plus efficaces pendant la période de germination des sclérotés du pathogène.

Tableau 8 : Tableau de synthèse bibliographique sur les groupes d'anastomoses affectant les cultures maraîchères de l'étude (Laitues, mâches, épinard et radis) comparé aux comportements (cultures cibles et optimum de températures) et la morphologie des isolats analysés :

Groupes d'anastomoses (AG)	Cultures cibles étudiées	Températures optimales (°C)	Sources	Isolats étudiés (hypothèses)
AG 1	Laitues Radis	18 - 26	(Beliard, 2003) ; [23] (Anderson, 1982)	M 18-357 M 19-599
AG 2	Laitues Épinards Radis	20 - 30	(Leclerc, 2013) ; [23] (Gouwie, 2019) (Anderson, 1982)	R 19-574 CP 19 F 19-568
AG 3	Radis	16 - 23	(Anderson, 1982)	R 19-538
AG 4	Laitues Épinards Radis Mâches	15 - 35	[23] (Messiaen et al., 1991) (Sturrock et al., 2015) (Gilardi et al., 2006)	Carde 4 E 18-295
Autres	Laitues (19-556) Épinards Radis Mâches (18-351)	25	Unités de pathologistes du CDDM, essais 2019-2020	L 19-556 ≠ M 18-351

(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)



Figure 14 : Comparaison morphologique des isolats développés en boîtes de Petri (milieu : Malt-Agar). Les isolats qui se ressemblent sont regroupé sous une même colonne. (V. Cerceau et S. Bosseur, CTIFL, 30/07/2020)

Les préconisations pour les essais des isolats en condition contrôlée

La plupart des isolats ont été détectés en saison plutôt froide (Annexe I), cela a expliqué que les taux de pathogénicité, de l'essai réalisé en phytotron en condition automnale (tab. 5), ont été plus proches des pertes observées sur les parcelles que ceux obtenus en été dans la serre du CDDM (tab. 4). Néanmoins, certains isolats étant de période plutôt estivale, comme R 19-574, F 19-568, E 18-295, L- CP19 et Carde 4, devront être testés à des températures plus élevées afin d'obtenir une pression proche de la réalité. Pour la suite des expérimentations, il est donc important d'adapter les conditions du phytotron aux dates de détection des isolats. Les isolats étudiés par la suite sont M 19-599 et R 19-538 préférant des températures fraîches (autour des 20°C). Ainsi le phytotron, réglé à 12-16°C, n'était pas dans des températures défavorables à leur développement.

b) Hypothèses sur les groupes d'anastomose des isolats étudiés

Nous pouvons essayer de déterminer l'AG de nos isolats par leur morphologie (fig. 14), leurs cultures préférentielles et leur température optimale (tab. 8). En effet, les isolats de mâches (dont M 18-357 ressemblant à M 19-599 (fig.17)) sont regroupés dans un AG pour l'instant inconnu (fig. 6). D'après la bibliographie (partie I.2.b)), ils pourraient faire partie d'AG attaquant préférentiellement la salade comme AG 1-1B, mais l'AG 1 reste très polyphage. Ils sont génétiquement bien séparés de l'isolat d'épinard (E 18-295 qui ressemble morphologiquement au Carde 4 (fig.17)) qui est inclus parmi AG 4 (très polyphage) et ils sont dans un groupe différent de l'isolat radis 19-538. Ce dernier est génétiquement très éloigné d'AG 2 communément trouvé sur d'autres cultures françaises de Brassicacées, mais d'autres isolats touchant le radis (R 19-574, CP 19 et F 19-568 morphologiquement similaires) pourraient en faire partie, notamment dans l'AG 2-2 qui contamine aussi les salades et les épinards. L'AG 3 s'attaque aussi les radis (Anderson, 1982) auquel le R 19-538 correspondrait par rapport à l'optimum thermique. Cet isolat pourrait appartenir à des AG moins étudiés comme AG 9 ou 12 (tab. 1).

Pour confirmer ce regroupement, l'équipe de pathologistes pourraient faire des observations d'anastomoses entre les hyphes des isolats supposés appartenir au même AG. De plus, des analyses de biologie moléculaire sont en cours et pourraient vérifier nos hypothèses. Ainsi, les deux isolats étudiés par la suite (19-538 de radis et 19-599 de mâches) n'ont pas le même comportement et il est probable qu'ils n'appartiennent pas au même AG, ils peuvent se comporter différemment selon la méthode d'inoculation employée.

c) Limites de l'essai préliminaire sur l'inoculation via la gélose broyée

La méthode de la gélose broyée pour inoculer des isolats de *Rhizoctonia solani* semble idéale et permet une pression homogène entre les répétitions des modalités sur les cultures de mâches, de laitues et d'épinards. Cependant, la pression fut hétérogène pour l'isolat 19-538 sur la culture de radis. Cela pourrait être due à la différence de nombre de sclérotés, plus ou moins développés, même dans les boîtes considérées comme jeunes de l'isolat 19-538 contrairement l'isolat 19-599. De plus, la quantité de milieu gélosé, étant dosée à la main, n'a pas été exactement la même entre les boîtes, amenant à une quantité de mycélium différentes.

Pour l'essai suivant, la gélose de chaque boîte a été mélangée, voire même filtrée pour retirer les sclérotés et répartir l'inoculum de façon plus homogène entre les caissettes. Le manque de corrélation entre la croissance des attaques et le nombre de boîtes de mycéliums inoculés peut être expliqué par des quantités trop importantes de colonies. Ces dernières peuvent se concurrencer pour les mêmes ressources, ce qui peut modifier la quantité d'inoculum finale appliquée. C'est ainsi que des doses plus faibles d'inoculum ont été étudiées par la suite et que le nombre de colonies a été déterminé par modalités.

Nous pouvons confirmer en partie les observations réalisées par l'équipe du CDDM sur les essais précédents (Mével et al., 2019b). Elle a conclu que sur les légumes feuilles (épinards, laitues et mâches), le rhizoctone provoque principalement une fonte des semis alors qu'il tue les radis par nécroses au tubercule et au collet tout au long de la culture. Une nuance est donc à noter pour la laitue, pour laquelle notre isolat, sous forme d'hyphe, a causé plus de fontes de semis. La présence importante de sclérotas a provoqué essentiellement des nécroses au collet ([23] ; (Beliard, 2003)).

Les symptômes causés par le rhizoctone et l'intensité des attaques varient selon les souches inoculées, les conditions environnementales et l'état de la plante sensible, notamment la variété, le stade, les conditions de germination (Champion, 1997). Dans notre essai, les conditions n'ont pas été optimales pour la levée des radis. Cela pourrait avoir fragilisé les plants et les rendre plus sensibles au rhizoctone. L'essai suivant a été réalisé dans de meilleures conditions, les résultats ont été comparés avec cet essai préliminaire. Pour améliorer le suivi de la maladie, les plantes considérées comme touchées par le rhizoctone ont été arrachées et des échantillons de plantes ont été envoyés au laboratoire afin de confirmer l'identité du pathogène (Rapilly, 1968). Par ailleurs, une hypothèse est émise sur l'influence des attaques de nos isolats par la combinaison des deux cultures : mâches/laitues et radis/épinards. En effet, une espèce pourrait avoir un effet plus attractif sur le *Rhizoctonia solani*, ou libérer des molécules signales ou de défense, protégeant ainsi l'autre espèce cultivée. Pour éliminer toute ambiguïté, l'expérimentation suivante n'a été réalisée que sur une seule culture : sur radis et sur mâches.

5. Conclusion

Nous allons pouvoir répondre aux interrogations précédentes :

- Quels sont les facteurs environnementaux qui expliqueraient la pathogénicité des différents isolats d'une même culture dans un milieu naturel et artificiel ?

Nous avons pu confirmer l'hypothèse que les isolats prélevés en automne ont un optimum de température plus froid que ceux en été. Les isolats causent des pertes à différentes périodes de l'année selon les conditions climatiques et selon les cultures sensibles installées. Les méthodes d'inoculations doivent être déterminées pour des conditions de températures du phytotron adaptées aux isolats étudiés. D'autres facteurs seront à étudier comme l'influence de lumière et de l'humidité pour améliorer la compréhension du pathogène et réguler au mieux l'inoculum dans les essais en phytotron.

- Les méthodes pour l'inoculation du pathogène induisent-elles des changements dans la survie et la croissance des cultures étudiées ?

Nous avons réfuté l'hypothèse que les méthodes d'inoculation artificielles permettent toutes l'obtention de pression de rhizoctone homogènes. Néanmoins, les résultats ont été plus homogènes et plus précis que par les techniques d'inoculation naturelle, mais les doses d'inoculum apportées par de la vermiculite ont été trop fortes. Contrairement à cette dernière, la méthode d'inoculation par de la gélose contaminée broyée a permis des contaminations plus homogènes et stables dans les cultures de mâches, de laitues et d'épinards, mais cela n'a pas été le cas pour les radis. Nous avons pu valider l'hypothèse que la gélose broyée non contaminée n'a pas d'influence sur le développement des cultures étudiées. Cependant, nous n'avons pas pu confirmer l'effet des doses de gélose car elles ont été trop importantes. Pour finir, l'hypothèse que les sclérotas provoquent des pertes plus tardives a été aussi validée, mais leurs présences seraient source d'hétérogénéité des résultats sur les radis. Ainsi un essai supplémentaire a été nécessaire pour améliorer cette technique.

Tableau 9 : Modalités de l'essai sur l'inoculation de *Rhizoctonia solani* avec de la vermiculite (V) et de la gélose (G) : * La dose pour la gélose correspond à celle de la gélose broyée avant la méthode de préparation. TNI = Témoin non inoculé.

Cultures	Modalités	Isolats	Etat / Préparation	Doses (g)*
Mâches	M1 V	19-599	Humide	10
	M2 V	19-599	Humide	5
	M3 V	19-599	Humide	2,5
	M4 V	19-599	Sec	10
	M5 V	19-599	Sec	5
	M6 V	19-599	Sec	2,5
Radis	M7 V	19-538	Humide	10
	M8 V	19-538	Humide	5
	M9 V	19-538	Humide	2,5
	M10 V	19-538	Sec	10
	M11 V	19-538	Sec	5
	M12 V	19-538	Sec	2,5
Mâches	M1 G	19-599	Broyée	9
	M2 G	19-599	Filtrée	9
	M3 G	19-599	Filtrée et Diluée	9
	M4 G	19-599	Broyée	4,5
	M5 G	19-599	Filtrée	4,5
	M6 G	19-599	Filtrée et Diluée	4,5
	M7 G	19-599	Broyée	2,25
	M8 G	19-599	Filtrée	2,25
	M9 G	19-599	Filtrée et Diluée	2,25
Radis	M10 G	19-538	Broyée	9
	M11 G	19-538	Filtrée	9
	M12 G	19-538	Filtrée et Diluée	9
	M13 G	19-538	Broyée	4,5
	M14 G	19-538	Filtrée	4,5
	M15 G	19-538	Filtrée et Diluée	4,5
	M16 G	19-538	Broyée	2,25
	M17 G	19-538	Filtrée	2,25
	M18 G	19-538	Filtrée et Diluée	2,25
Mâches	M13 V = M19 G	TNI	/	0
Radis	M14 V = M20 G	TNI	/	0

(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 06/2020)

III. Mise au point d'une méthode pour maîtriser l'inoculum du pathogène dans les expérimentations en chambre de culture

1. Introduction

A la suite des expérimentations précédentes, nous avons mené différentes façons d'appliquer l'inoculum de *Rhizoctonia solani* avec les méthodes d'inoculation artificielle étudiées, via un milieu gélosé ou de la vermiculite (tab.10). Des doses plus faibles ont été appliquées : inférieures à 10 g de vermiculite et à 1 boîte de gélose (d'environ 9 g) par caissette. Néanmoins, les petites quantités de grains de vermiculite ont nécessité un brassage important du substrat afin de bien homogénéiser la répartition. De plus, les essais du CTIFL ont déjà montré que la méthode d'inoculation avec un milieu gélosé permettait une pression plus homogène qu'avec la vermiculite pour des petites quantités de substrats (1,5 kg) (Cerceau, Bosseur, 2020). Des résultats plus hétérogènes qu'avec l'inoculation artificielle via la gélose ont été attendus.

Des méthodes de préparation ont été testées pour chacune des méthodes dans un objectif précis. La vermiculite séchée permet d'être conservée sur plus long terme que lorsqu'elle est humide. Ainsi cet essai a permis de savoir si le séchage limite et homogénéise la pression de rhizoctone. Pour la gélose, une filtration a été réalisée pour retirer les sclérotés afin d'obtenir une perte plus stable et homogène. Par la suite, une dilution du filtrat a permis de tester des quantités plus faibles d'inoculum et de trouver un effet dose sur les taux de pertes.

Les objectifs étaient de comparer les doses au sein de chaque méthode, afin de sélectionner celles ayant des résultats proches de 70% de plantes cultivées survivantes, et de comparer l'homogénéité entre les méthodes et les différentes manières d'application de l'inoculum, afin de pouvoir évaluer l'efficacité de produits de biocontrôle dans les prochaines expérimentations. Nous avons donc construit le protocole ci-dessous afin de déterminer la méthode d'inoculation artificielle la plus adaptée pour l'application en caissette de 15 Kg avec 2 isolats virulents (19-599 et 19-538) sur 2 cultures majoritairement cultivées en Loire Atlantique : le radis et la mâche.

2. Matériels et méthodes

Nous avons repris le protocole de l'essai préliminaire sur l'inoculation de la gélose broyée et l'avons amélioré avec les remarques précédentes.

a) Modalités et déroulement de l'essai

L'essai a été mis en place en phytotron dans les mêmes conditions que l'essai préliminaire, c'est-à-dire en condition automnale (le jour : 12 h à 16°C, la nuit : 12h à 12°C, avec une humidité relative de 80%). Le substrat provenait de la terre stérilisée à la vapeur sur une autre exploitation maraîchère que l'essai préliminaire. Les isolats de *Rhizoctonia solani* testés ont été les mêmes que l'essai précédent : le 19-599 sur culture de mâches (variété 'Gala') et le 19-538 sur culture de radis. Les cultures d'épinards et de laitues n'ont pas été testées par manque de place dans le phytotron ; elles n'ont pas été associées aux deux autres cultures, contrairement à l'expérimentation précédente, afin de ne pas induire des erreurs dues à la libération d'exsudats pouvant favoriser ou limiter les attaques sur une des espèces semées.

ESSAI GELOSE

ESSAI VERMICULITE

SOUCHE = 19-538 (Radis)

M10G 9g B (Gélose broyée)	M12G 9g Dil (Gélose diluée)	M14G 4,5g F (Gélose filtrée)	M16G 2,25g B (Gélose broyée)	M18G 2,25g Di (Gélose diluée)	M10V 10g Sec	M11V 5g Sec	M12V 2,5g Sec
M11G 9g F (Gélose filtrée)	M13G 4,5g B (Gélose broyée)	M15G 4,5g Di (Gélose diluée)	M17G 2,25g F (Gélose filtrée)	M7V 10g Humide	M8V 5g Humide	M7V 2,5 Humide	M13V TNI Mâches

Répartition
identique
sur les 3
étages

ALLEE CENTRALE

ENTREE

M2G 9g F (Gélose filtrée)	M4G 4,5g B (Gélose broyée)	M6G 4,5g Di (Gélose diluée)	M8G 2,25g F (Gélose filtrée)	M1V 10g Humide	M2V 5g Humide	M3V 2,5 Humide	M14V TNI Radis
M1G 9g B (Gélose broyée)	M3G 9g Dil (Gélose diluée)	M5G 4,5g F (Gélose filtrée)	M7G 2,25g B (Gélose broyée)	M9G 2,25g Di (Gélose diluée)	M4V 10g Sec	M5V 5g Sec	M6V 2,5g Sec

Répartition
identique
sur les 3
étages

SOUCHE = 19-599 (Mâches)

Figure 15 : Répartition des modalités de l'essai au sein du phytotron du CDDM (G = inoculation par de la gélose, B = gélose broyée, F = gélose filtrée, Dil = gélose filtrée et diluée de moitié, V = inoculation par de la vermiculite, TNI = témoin non inoculé) (Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 06/2020)

Tableau 10 : Calendrier des opérations réalisées lors de l'essai (1 seconde d'irrigation par aspersion vaut 0,5 mm d'eau dans une caissette, la quantité varie selon l'humidité du substrat de cette dernière ; UA = Unité d'Azote) :

N° Semaine	Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi
25	Inoculation		Semis mâche/radis Irrigation : 4'+4'		Irrigation : 8'
26	Notation radis 1 Irrigation : 8'		Irrigation : 4'- 5'	Notation radis 2	Notation mâche 1 Irrigation : 6'
27	Notation radis 3 Irrigation : 10'	Notation mâche 2	Irrigation : 4'- 5'	Notation radis 4	Notation mâche 3 Irrigation : 4'- 8'
28	Notation radis 5 Irrigation : 6'- 8'	Notation mâche 4 Fertilisation mâche (30 UA)	Irrigation : 4'- 5'	Notation radis 6	Notation mâche 5 Irrigation : 4'- 10'
29	Irrigation : 8'		Notation finale radis	Notation finale mâche	

(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 06-07/2020)

Les cultures ont été semées 2 jours après l'introduction de l'inoculum. Pour les modalités de l'isolat 19-538, 15 graines de radis ont été semées pour chaque rang, soit 60 graines par caissette ; tandis que, pour l'isolat 19-599, le semis de mâches a été réalisé via des nappes de 90 à 99 graines (9 par lignes et 10-11 par colonnes). L'arrosage a été fait manuellement par aspersion (avec un débit d'eau de 0,5 mm/s), 3 fois par semaine avec une quantité variant de 4 à 10 secondes par caissette, selon l'état hydrique du substrat (tab. 10). Une fertilisation de 30 unités d'azotes a été aussi réalisée lors de la 4^{ème} semaine de culture par pulvérisation du produit Fertimâche (N.P.K 6,5-3-10) seulement sur la culture de mâches (tab. 10).

L'expérimentation comportait 32 modalités : l'essai Vermiculite composé de 12 modalités et l'essai Gélose composé de 18 modalités, en plus des deux cultures témoins non inoculées (TNI) en commun (tab. 9). Chaque modalité a été répétée trois fois (3 caissettes/modalité), soit un total de 96 caissettes. Les variables étaient basées sur la méthode de préparation : « Broyée », « Filtrée » et « Filtrée et Diluée » pour la gélose ; ou l'état d'application pour la vermiculite : « Sec » ou « Humide » ; et la dose d'inoculum apportée : 0-2,5-5 et 10 g pour la vermiculite (après le changement d'état) et 0-2,25-4,5 et 9 g pour la gélose (avant la méthode de préparation). La dose d'inoculum finale apportée a été mesurée en nombre de CFU.

Comme pour l'essai précédent, chaque côté du phytotron a été destiné à un seul isolat : 19-599 (isolat mâche, étiquette bleue) à gauche et 19-538 (isolat radis, étiquette jaune) à droite. L'emplacement des témoins a été réfléchi afin d'éviter les contaminations entre les caissettes qui ont eu lieu lors de l'essai préliminaire ; les cultures témoins de mâches ont été du côté de l'isolat radis (moins agressif sur les mâches) et les cultures témoins de radis ont été du côté de l'isolat mâche (non virulent sur les radis). Au sein des autres modalités, les caissettes ont été triées : du moins dosées au plus dosées en inoculum, en commençant par les modalités de l'essai Vermiculite (fig. 15). Comme pour l'essai préliminaire : chaque numéro de répétition correspondait à un étage (3^{ème} étage = R1, 2^{ème} étage = R2 et 1^{ère} étage = R3) et chaque modalité a été positionnée au même endroit sur les 3 étages.

Cet essai, plus court que le précédent a duré 4 semaines car le radis (culture à cycle court) est attaqué par le rhizoctone, principalement au stade juvénile, et que les symptômes sur les mâches sont principalement de la fonte de semis (visible après la levée de toutes les graines saines). Le système de notation appliqué a été plus complexe qu'à l'essai précédent afin de mieux suivre le développement de la maladie. En effet, au lieu de compter uniquement les plantes paraissant encore vivantes, le nombre de plantes touchées a été aussi déterminé à chaque notation. Pour cela, ces dernières ont été arrachées et ont subi une inspection sanitaire des parties souterraines. Un premier échantillonnage de plants suspectés comme touchés durant l'essai a été analysé et identifié au CTIFL. Cela a permis de mieux comprendre l'augmentation de radis survivants en milieu de culture. Ainsi le système de notation était à caractère destructif avec l'intensité de la maladie comme critère.

La reconnaissance visuelle de la maladie a été d'autant plus importante car une plante arrachée n'a pas pu être replantée (elle risquait de flétrir). C'est ainsi que de nombreuses photos ont été prises, notamment lors de l'essai préliminaire, afin de déterminer plus facilement et précisément les symptômes de rhizoctone (fig. 5). Comme pour l'essai précédent, le premier comptage a consisté à dénombrer le nombre de plants levés. Les comptages suivants ont été réalisés 2 fois par semaine jusqu'à la récolte (tab. 10). Lors de la notation finale, tous les plants ont été arrachés et comptabilisés comme sains ou touchés. Un dernier échantillonnage a été réalisé pour confirmer ou déterminer le bioagresseur ou les problèmes physiologiques en cause. Toutes plantes qui n'ont pas été attaquées par le rhizoctone ont été comptabilisées dans les plantes vivantes.



**X 18 boîte de Petri/isolat
≈ 160g**

(1 boîte de 55 cm de diamètre
≈ 9 g de gélose)

**Etape 1 :
Passage au mixeur**
Avec 160 ml d'eau
ajoutés



**Etape 2 :
Préparation du filtrat**

Broyat de gélose ≈ 300g
(20 g perdu avec le mixage)

**Après inoculation :
Broyat de gélose ≈ 200 g**

Dans un bécher :
(18 x 6)
110 g

(9 x 6)
55 g

(4,5 x 6)
30 g

+ 640 ml

**+ 695 ml
d'eau ajoutée**

+ 720 ml

Etape 3 : Mixage + Filtration
(par un tissu mousselin stérile)

**165 ml de filtrat x 3
=> M2**

**165 ml de filtrat x 3
=> M5**

**165 ml de filtrat x 3
=> M8**

**165 ml de filtrat x 3
=> M3**

**165 ml de filtrat x 3
=> M6**

**165 ml de filtrat x 3
=> M9**

18 g de broyat ≈ 9 g de gélose
=> Modalités : **M1**

9 g de broyat ≈ 4,5 g de gélose
=> Modalités : **M4**

4,5 g de broyat ≈ 2,25 g de gélose
=> Modalités : **M7**

Avec 140 ml d'eau ajoutés/caissette

**Etape 4 :
Dilution**

**1/3 Filtrat de gélose restant
≈ 250 ml**

+ 250 ml d'eau ajoutée

Figure 16 : Méthodes de préparation de l'inoculum avec de la gélose broyée, filtrée et diluée pour un isolat (19-599). (Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

b) Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été multiplié sur milieu gélosé de Malt-Agar en boîtes de Petri de 55mm de diamètre et sur grains de vermiculite en sachets de 250 g avec un milieu nutritif composé de malt. Les sachets de vermiculites ont été préparés au CTIFL le 25/05/2020, soit 3 semaines avant inoculation et la gélose a été préparée le 08/06/2020, soit 1 semaine avant inoculation (mycélium jeune). L'inoculation a donc eu lieu le 15/06/2020.

Pour la vermiculite, 4 sachets de 250 g par isolat ont été préparés afin de limiter le risque de contamination extérieur ou de problèmes de développement de l'isolat dans l'un des sachets. Au bout des 3 semaines d'ensemencement du pathogène (au CDDM à température ambiante), 2 sachets ont été ouverts et mis à sécher à température ambiante, sur des plaques stérilisées, pendant 3 jours (avant l'inoculation). Cette opération n'a pas pu être réalisée dans une salle stérile à cause de la limite présente des pathologistes du CDDM au sein du CTIFL. Par la suite, les grains de vermiculites ont été mélangés afin de bien homogénéiser la répartition du pathogène, puis ont été pesés (à 2,5-5-10 g) avant d'être répartis et mélangés au substrat des caissettes de la modalité correspondante.

L'ensemble des modalités d'inoculation avec de la gélose a nécessité la préparation de minimum 16 boîtes de Petri de 55cm de diamètre par isolats, contenant environ 9 g de milieu gélosé. Ce dernier a été coulé à la main dans chaque boîte. Pour éviter tous imprévus et pertes dus à la manipulation entre chaque étape, 2 boîtes supplémentaires ont été préparées par isolat, soit un total de 36 boîtes (18 boîtes/isolat). La gélose inoculée sur 1 semaine a été préparée à l'inoculation en 3 étapes permettant l'obtention, dans un premier temps, de la gélose broyée, puis de la gélose filtrée et, pour finir, de la gélose diluée de moitié, à différentes concentrations (2,25-4,5-9 g). Les méthodes de préparation de la gélose contaminée sont expliquées ci-dessous pour un isolat, mais l'opération a été identique pour le deuxième isolat.

La première étape a consisté à préparer le broyat de gélose (fig. 16). Le milieu gélosé des 18 boîtes a été décollé puis placé dans un bécher. L'ensemble de la gélose est pesé, faisant environ 160 g. Pour pouvoir obtenir une préparation homogène, 160 ml d'eau y ont été ajoutés. Le broyage a été réalisé à l'aide d'un pied à soupe stérilisé à l'alcool 90°. Après le mixage, la préparation a eu un poids d'environ 300 g. Ainsi, pour les modalités inoculant de la gélose broyée, 18 g – 9 g – 4,5 g du broyat ont été pesés, qui ont été dilués dans 140 ml d'eau avant d'être mélangés dans la terre stérile des caissettes accueillant l'inoculation de 9 g – 4,5 g – 2,25 g de gélose (quantité initiale) respectivement. L'opération a été répétée pour les 3 répétitions.

Le restant de la préparation a été utilisé pour l'élaboration de filtrat de gélose (fig. 16). Pour les 3 répétitions des doses 9 g – 4,5 g – 2,25 g de gélose filtrée et de filtrat dilué, 110 g – 55 g – 30 g respectivement ont été placés dans un bécher où de l'eau a été ajoutée jusqu'à l'obtention d'une solution à 750 ml. Avant la filtration, la solution a été mélangée à l'aide du pied à soupe jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Cette dernière a ensuite été versée dans un autre bécher couvert d'un tissu mousseline (préalablement stérilisé à l'autoclave) filtrant la solution. Afin de faciliter la filtration, le reste de la préparation dans la mousseline a été gratté à l'aide d'une spatule stérile jusqu'à n'obtenir que le reste de gélose et de sclérotés. Ainsi, 165 ml de la solution finale ont été appliqués par caissette concernée. Pour finir, les 250 ml de filtrat restant (fig. 16), pour chaque dose, ont été pesés et de l'eau y a été ajoutée jusqu'à atteindre les 500 ml de solution. Pour chaque répétition, 165 ml de la solution finale diluée ont été appliqués dans les caissettes des modalités concernées. Les opérations ont été les mêmes pour les isolats 19-599 et 19-538. Néanmoins, pour ce dernier, le total de la gélose broyée pesait 170 g. Ainsi, 10 g de gélose (sans mycélium apparent) ont été retirés afin d'obtenir la même quantité de gélose broyée que l'isolat 19-599.

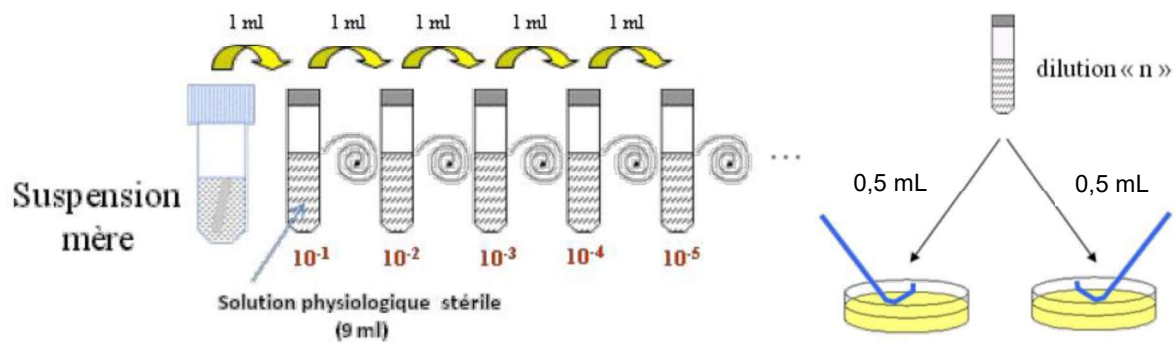



Figure 17 : Dilution en série de l'échantillon dans une solution stérile et étalement de la suspension sur le milieu de culture.  Agitation au vortex. Source : (inrs, [sans date])

Tableau 11 : Exemple de tableau de calculs de la concentration de CFU : (n = nombre de boîtes sélectionnées avec n_1 pour la première dilution et n_2 la deuxième ; d = valeur de la première dilution choisie ; C = somme des résultats de comptage de la première dilution ; N_p = nombre CFU par ml ; « x » dans les résultats de comptage signifie que le CFU n'a pas pu être comptabilisé).

Isolat : ...		Méthode : ...	Préparation : ...	Indices				N_p $= \frac{C}{0,5 \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$	Résultat arrondi (CFU/ml)
Dilutions	N° boîtes	Résultats de comptage	Boîtes retenues	n_1	n_2	d	C		
10^{-1}	1	x		3	3	10^{-4}	56	339393,9394	3,39E+05
10^{-1}	2	x							
10^{-1}	3	x							
10^{-2}	1	x							
10^{-2}	2	x							
10^{-2}	3	x							
10^{-3}	1	x							
10^{-3}	2	x							
10^{-3}	3	x							
10^{-4}	1	13	x						
10^{-4}	2	19	x						
10^{-4}	3	22	x						
10^{-5}	1	0	x						
10^{-5}	2	1	x						
10^{-5}	3	1	x						
10^{-6}	1	0							
10^{-6}	2	0							
10^{-6}	3	0							

(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020, à partir de la référence : (inrs, [sans date]))

À chaque préparation, un échantillon (d'environ 5 ml) a été récupéré, cela était possible. Il a été analysé au laboratoire du CTIFL afin de calculer le CFU appliqué pour chaque méthode d'inoculation et les différentes préparations. Au final, des échantillons n'ont pu être prélevés que pour la vermiculite sèche et humide, le broyat de gélose et les filtrats dilués de moitié pour la modalité 2,25 g de gélose, de chaque isolat.

c) Calculs de densité de l'inoculum via l'Unité Formant des Colonies (CFU)

Pour évaluer de la densité des suspensions d'inoculum de *Rhizoctonia solani*, nous avons décidé de calculer le CFU en nous inspirant de la méthode des suspensions diluées sur milieu gélosé antibiotique, habituellement utilisée pour des microorganismes (inrs, [sans date]). Pour chaque échantillon, 1 g de vermiculite ou 1 ml de préparation de gélose est mis en suspension dans 9 ml solution stérile. Cette dernière a été diluée successivement en prélevant 1 ml de la solution introduite dans 9 ml d'eau stérile. Cette opération a été répétée donc pour réaliser une échelle de dilution de 10^{-1} à 10^{-6} de la solution mère (fig. 17). 0,5 ml de chacune de ces solutions ainsi obtenues ont été étalées uniformément sur milieu gélosé (Malt-Agar) en boîte de Petri. Les boîtes ont ensuite été incubées dans une salle stérile à température ambiante.

Les unités formant les colonies (CFU) de *Rhizoctonia solani* ont commencé à apparaître rapidement, elles ont été comptabilisées une fois par jour jusqu'à l'envahissement total de la boîte de Petri. Si les colonies de *Rhizoctonia solani* n'ont pas été visibles ou concurrencées par le développement de bactéries ou d'autres espèces contaminantes, le CFU n'a pas pu être déterminé. La concentration de CFU a été calculée via les formules proposées par l'Institut national de recherche et de sécurité (tab. 11). La concentration de CFU apportée pour chaque modalité a été ajoutée dans le tableau de données brutes afin de comparer les méthodes d'inoculations et les préparations entre elles.

Le CFU fut déterminé pour la vermiculite sèche et humide, la gélose broyée et la gélose filtrée et diluée pour 1 dose (9 g) et $\frac{1}{4}$ de dose (2,25 g) de gélose broyée. Ainsi pour déterminer le CFU de la gélose filtrée, nous avons multiplié par deux le résultat de la filtration et dilution de moitié. Par la suite, nous avons calculé le coefficient de filtration pour obtenir le CFU des modalités d'une demi-dose (4,5 g) de gélose broyée filtrée et celle filtrée et diluée.

d) Méthode de diagnostic des échantillons de plantes au laboratoire

Durant l'expérimentation, un échantillonnage a été réalisé dans la culture de radis en début d'essai (le 25/06/2020), un second a été mené dans les modalités témoins de radis (le 29/06/2020) et pour finir, un dernier échantillonnage a été prélevé au sein des deux cultures lors des notations finales (le 15 et 16 juillet 2020). Tous les échantillons ont été apportés aux pathologistes du CDDM au CTIFL pour identifier la cause des symptômes observés et évaluer l'exigence du notateur dans l'arrachage de plants contaminés.

Au sein du laboratoire, les échantillons ont été lavés et séchés, et les parties souterraines ont été coupées puis placées dans des boîtes de Petri numérotées par plantes et identifiées par la modalité et la répétition concernée. Ces dernières ont été emmenées sous une hotte aspirante où les racines ont été coupées en petits morceaux avec des outils stérilisés, puis désinfectées dans une coupelle d'alcool à 90°C et ensuite lavées successivement dans 4 coupelles d'eau osmosées stériles. 10 fragments ont ensuite été disposés sur un milieu gélosé (Malt-Agar) dans une boîte de Petri (Annexe V). Les boîtes numérotées et identifiées ont été mises en incubation dans une salle stérile à température ambiante. Lorsque des colonies de mycélium ont commencé à se développer, une identification a été réalisée visuellement puis sous microscope (Partie I. 2.c)). La méthode de diagnostic est expliquée plus en détail dans l'Annexe V. Si la plante échantillonnée n'a pas été contaminée par *Rhizoctonia solani*, elle a été ajoutée aux comptages des plantes survivantes du tableau de données brutes.

Tableau 12 : Modalités de l'essai sur l'inoculation de *Rhizoctonia solani* avec de la vermiculite (V) et de la gélose (G) avec l'indication des CFU (Unité Formant des Colonies) : * La dose pour la gélose correspond à celle de la gélose broyée avant la méthode de préparation. TNI = Témoin non inoculé. Les résultats des CFU en gras sont déterminés par des calculs mathématiques.

Cultures	Modalités	Isolats	Etat/ Préparation	Doses (g)*	CFU apporté (.10 ⁴)
Mâches	M1 V	19-599	Humide	10	23
	M2 V	19-599	Humide	5	11,5
	M3 V	19-599	Humide	2,5	5,8
	M4 V	19-599	Sec	10	26,1
	M5 V	19-599	Sec	5	13
	M6 V	19-599	Sec	2,5	6,5
Radis	M7 V	19-538	Humide	10	54,2
	M8 V	19-538	Humide	5	27,1
	M9 V	19-538	Humide	2,5	13,6
	M10 V	19-538	Sec	10	97
	M11 V	19-538	Sec	5	48,5
	M12 V	19-538	Sec	2,5	24,2
Mâches	M1 G	19-599	Broyée	9	141,8
	M2 G	19-599	Filtrée	9	102
	M3 G	19-599	Filtrée et Diluée	9	51
	M4 G	19-599	Broyée	4,5	70,9
	M5 G	19-599	Filtrée	4,5	41,8
	M6 G	19-599	Filtrée et Diluée	4,5	20,9
	M7 G	19-599	Broyée	2,25	35,5
	M8 G	19-599	Filtrée	2,25	16,2
	M9 G	19-599	Filtrée et Diluée	2,25	8,1
Radis	M10 G	19-538	Broyée	9	610,9
	M11 G	19-538	Filtrée	9	517,7
	M12 G	19-538	Filtrée et Diluée	9	258,8
	M13 G	19-538	Broyée	4,5	305,5
	M14 G	19-538	Filtrée	4,5	290,2
	M15 G	19-538	Filtrée et Diluée	4,5	145,1
	M16 G	19-538	Broyée	2,25	152,7
	M17 G	19-538	Filtrée	2,25	160
	M18 G	19-538	Filtrée et Diluée	2,25	80
Mâches	M13 V = M19 G	TNI	/	0	0
Radis	M14 V = M20 G	TNI	/	0	0

(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

e) Analyse statistique des résultats

L'analyse des résultats a été faite en premier lieu via l'observation de graphiques du nombre de plantes survivantes selon le temps et via des diagrammes indiquant le taux de survie et des différents symptômes tuant la plante (fonte de semis ou nécrose des racines et du collet). Le test statistique de Bartlett a permis d'évaluer l'hétérogénéité au sein des résultats par méthode de préparation de l'inoculum. Cela a permis de déterminer la méthode apportant une pression plus homogène. Si le test statistique de Bartlett n'a pas pu montrer de grande hétérogénéité, un test ANOVA a pu être réalisé afin de déterminer la dose idéale pour la poursuite des expérimentations. Sinon le test non paramétrique a pu être mené afin d'avoir une idée de la dose idéale pour continuer les recherches de méthodes d'inoculations plus adaptées.

3. Résultats

a) Nombre d'Unité Formant des Colonies (CFU) de chaque modalité

Pour les calculs du CFU de la gélose filtrée en demi-dose (4,5 g), nous avons obtenu les coefficients de filtration : environ 0,59 en moyenne pour l'isolat 19-599 de mâche et environ 0,95 en moyenne pour l'isolat 19-538 de radis (Annexe VI).

Ainsi, d'après les résultats (tab. 12), la gélose a eu plus de CFU et a provoqué donc plus de pertes que la vermiculite. La vermiculite sèche appliquée contenait plus de CFU que la vermiculite humide, cette dernière a donc été moins attaquée. Pour les modalités de l'isolat de mâche, la filtration a diminué presque de la moitié de CFU contenu dans la gélose broyée en plus de retirer les sclérotés. Nous avons supposé que cette étape pourrait diminuer la pression sur la mâche. Pour l'isolat 19-538 de radis, la filtration n'a pas changé les CFU entre les modalités de gélose broyée et de gélose filtrée ; la différence de pression a été peu visible.

b) Identification du rhizoctone et d'autres pathogènes

D'après les analyses mycologiques (tab. 13), nous avons pu constater qu'il était difficile d'identifier les symptômes de rhizoctone. Sur radis, les plants ont étioilé par manque de luminosité, ce qui a expliqué que les témoins ont semblé être touchés par la maladie (Annexe VII). Les modalités M16 (1/4 de gélose broyée) et M17 (1/4 de gélose filtrée) ont pourri par un problème d'excès d'eau et ont semblé aussi être attaquées par le rhizoctone (Annexe VII). Néanmoins, l'humidité a pu augmenter le taux de plantes touchées par *Rhizoctonia solani*.

Au sujet des mâches, il n'y a pas eu beaucoup de contamination visible par nécrose du collet dans l'ensemble des modalités. Cependant, l'analyse à la récolte des plants suspectés d'être touchés a montré la présence d'autres pathogènes. Le *Thielaviopsis basicola* avait déjà attaqué les cultures de mâches de l'essai précédent et il était facilement reconnaissable par une nécrose plutôt noirâtre, virant parfois sur le rouge (Annexe VII).

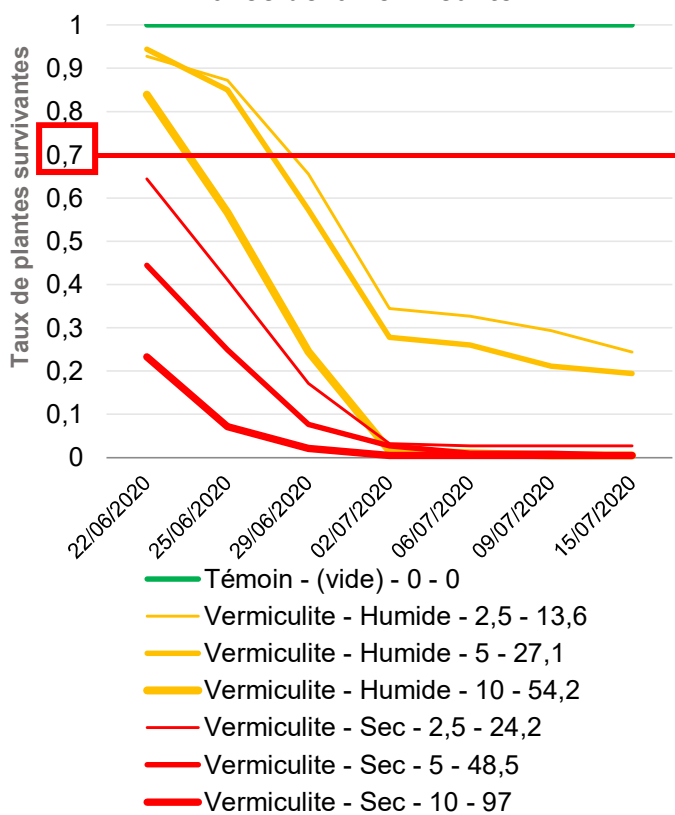
Nous avons aussi pu l'observer à la binoculaire ou même au microscope après étalement de la plante sur un milieu gélosé (Annexe VII). Ce champignon n'a pas causé de fonte de semis, contrairement au *Rhizoctonia solani* et aux pathogènes de la famille Pythiacées. Ainsi, en observant la présence de *Pythium* sp. dans la modalité M6 G (R1) et les témoins non inoculés (TNI) (Annexe VII), nous avons su que, dans l'analyse des résultats dans les cultures de mâches, il y a eu un biais dans les résultats causé par l'hétérogénéité de la répartition de ce pathogène de foyer dans chaque caissette.

Tableau 13 : Analyses mycologiques, sur milieux gélosés, des plantes échantillonnées durant l'essai : (G = gélose ; V = vermiculite ; TNI = témoins non inoculés ; nb = nombre d'échantillon ; *R.s.* = *Rhizoctonia solani* ; *T.b.* = *Thielaviopsis basicola* ; *P.sp.* = *Pythium* ou *Phythiacées*)

Dates échantillonnage	Modalités d'origine	Espèces des plantes analysées	Nombre de plantes analysées	Pathogènes détectés	Taux (nb touché/ nb analysé)	
25/06/2020	M16 G	Radis	1	<i>R.s.</i>	1/1	
	M17 G		4	Non	0/4	
29/06/2020	M14 TNI (R1)		5	Non	0/5	
	M17 G		3	Non	0/5	
	M7-M8-M9 V		5	<i>R.s.</i>	5/5	
15-16/07/2020	M2 V (R2)		Mâches	3	<i>T.b.</i> + <i>R.s.</i>	3/3 + 1/3
	M3 V (R1)			3	<i>T.b.</i>	1/3
	M6 V (R2)			2	Non	0/2
	M6 G (R1)			3	<i>T.b.</i> + <i>P.sp.</i>	3/3 + 2/3
	M6 G (R2)			1	Non	0/1
	M13 TNI (R1)	7		<i>P.sp.</i>	6/7	
	M13 TNI (R2)	5		<i>T.b.</i> + <i>P.sp.</i>	2/5 + 3/5	
	M13 TNI (R3)	5		<i>T.b.</i> + <i>P.sp.</i>	3/5 + 3/5	
	M12 G (R2)	5		<i>R.s.</i>	1/5	
M18 G (R1)	2	Non	0/2			

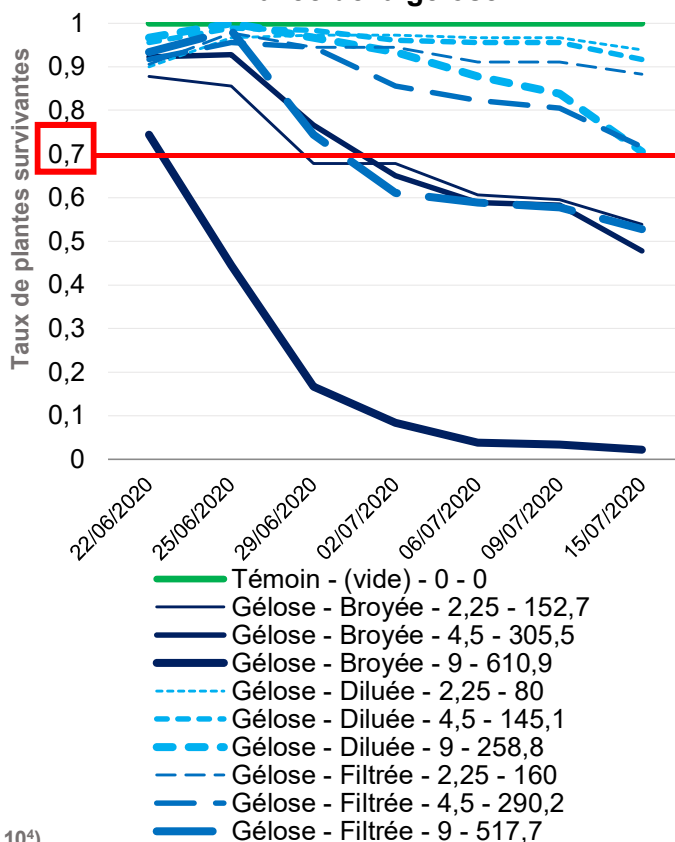
(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

Taux de radis survivants au *Rhizoctonia solani* 19-538 inoculés avec de la vermiculite



Légende : Méthode - Etat/Préparation - Dose (g) - CFU (.10⁴)

Taux de radis survivants au *Rhizoctonia solani* 19-538 inoculés avec de la gélose



Légende : Méthode - Etat/Préparation - Dose (g) - CFU (.10⁴)

Figure 18 : Graphiques des taux de radis survivants à l'isolat 19-538 de *Rhizoctonia solani* inoculés avec de la vermiculite ou de la gélose. (Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

c) Résultats finaux de l'essai

En reprenant les résultats des essais précédents, l'isolat 18-538 provoque plutôt des nécroses sur les racines des radis, mais aussi de la fonte de semis avec l'inoculation par la gélose contaminée par du mycélium jeune (1 semaine d'incubation) ; tandis que l'isolat 19-599 cause, sur les cultures de mâches, une perte principalement par fonte de semis.

Comportement de l'isolat 19-538 sur les cultures de radis

Les résultats en culture de radis (fig. 18 et fig. 19) ont montré que les doses de vermiculites étaient encore trop fortes pour atteindre les 70 % de plantes survivantes nécessaires pour les essais futurs. Au début de l'essai, les modalités inoculées avec de la vermiculite humide ont mieux levé qu'avec de la vermiculite séchée pour un même CFU. Après la levée des radis, le nombre de plantes survivantes a chuté brutalement en deux semaines, puis le nombre de radis touchés a stagné autour des 20% de sains pour les modalités ajoutant 5 g ou 2,5 g de vermiculite humide.

De plus, les analyses statistiques ont montré que la vermiculite sèche a abouti à des résultats plus homogènes que la vermiculite humide ; mais ceci a été biaisé par le peu de radis survivants à l'inoculation par de la vermiculite sèche (Annexe VIII). Malgré ces pertes, un effet de dose a été très visible et significatif, la diminution de la dose pourrait probablement nous rapprocher des 30% de pertes souhaitées.

Au sujet des symptômes provoqués par ces deux méthodes, le séchage de la vermiculite a causé plus de pertes par fonte de semis, que lorsqu'elle était humide, atteignant les 77% pour la dose la plus forte (fig. 19). Cela a aussi été démontré statistiquement par des analyses de variances à un facteur pour la somme des radis récoltés morts et la somme des plantes levées qui ont été calculées tout au long de l'essai (Annexe VIII).

Pour toutes les autres modalités, il y a eu très peu de fonte de semis, c'étaient surtout les nécroses qui ont causé la mort des radis. Globalement, toutes les modalités inoculées par de la gélose ont eu un taux de levée au-dessus de la barre des 70% de radis survivantes (fig. 18). Par la suite, les radis ont dépéri progressivement, sauf pour la modalité ajoutant 9 g de gélose broyée contaminée qui a eu un comportement semblable à la vermiculite humide (10 g).

Ce dernier a confirmé les résultats obtenus dans l'essai préliminaire (partie II.3.c) ; mais dans cette expérimentation, il y a eu un effet dose significatif entre 9 g et 4,5-2,25 g de géloses broyées pour la méthode sans filtration (gélose simplement broyée) comme pour la méthode de préparation filtrée et diluée (Annexe VIII). Nous avons pu remarquer que le CFU était plus élevé qu'en vermiculite. Ainsi cette méthode d'inoculation a limité les contaminations.

Lors de notre essai, les modalités 4,5 g de gélose filtrée et 9 g de gélose filtrée et diluée ont permis un taux de radis survivant autour de 70% (fig. 19). Cependant, les modalités inoculées avec de la gélose filtrée ont eu des résultats moins homogènes que celles inoculées avec de la gélose filtrée et diluée. C'est ainsi que la technique d'inoculation la plus adaptée est la méthode ajoutant 9 g de gélose broyée qui a été filtrée et diluée de moitié.

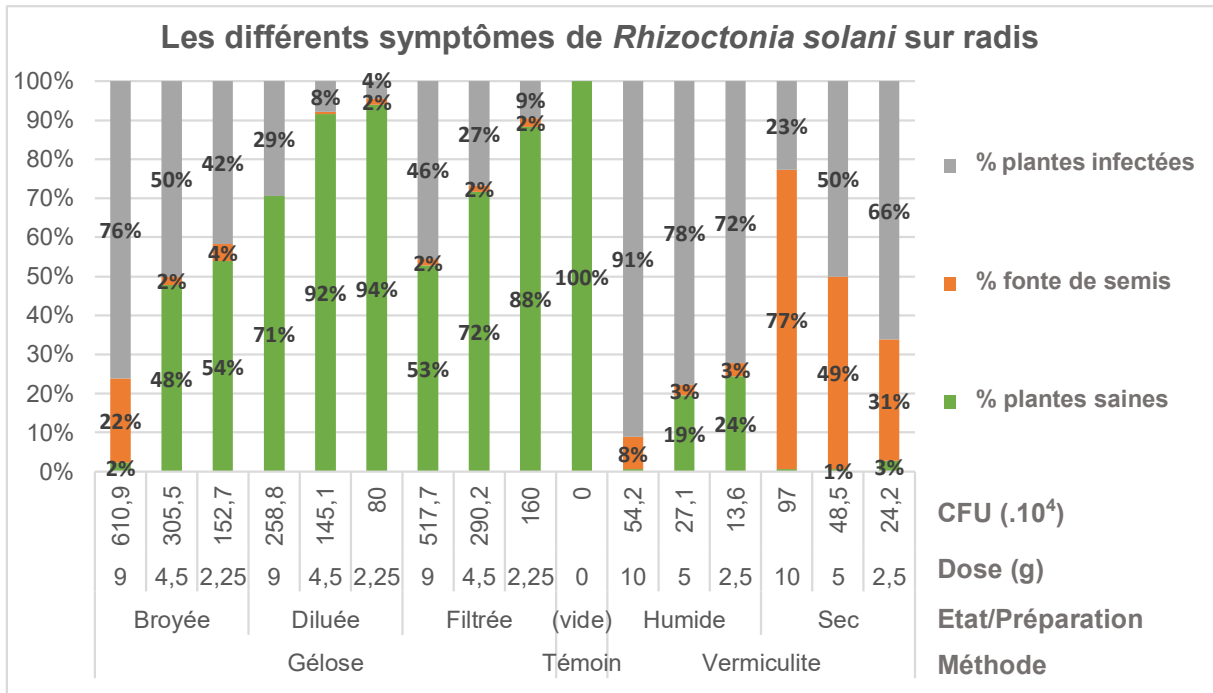
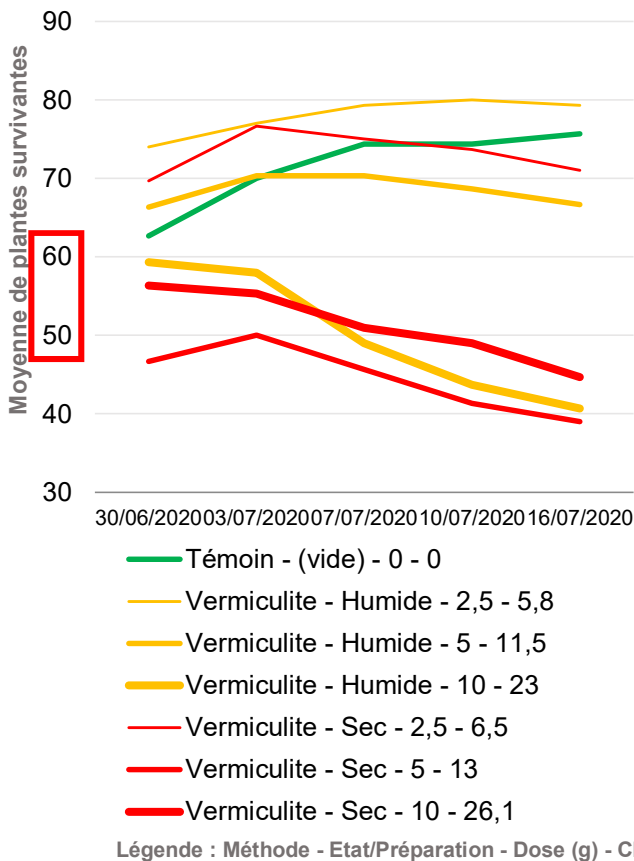


Figure 19 : Diagramme des symptômes de l'isolat 19-538 de *Rhizoctonia solani* sur radis. (Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

Moyennes des mâches survivantes au *Rhizoctonia solani* 19-599 inoculées avec de la vermiculite



Moyennes des mâches survivantes au *Rhizoctonia solani* 19-599 inoculées avec de la gélose

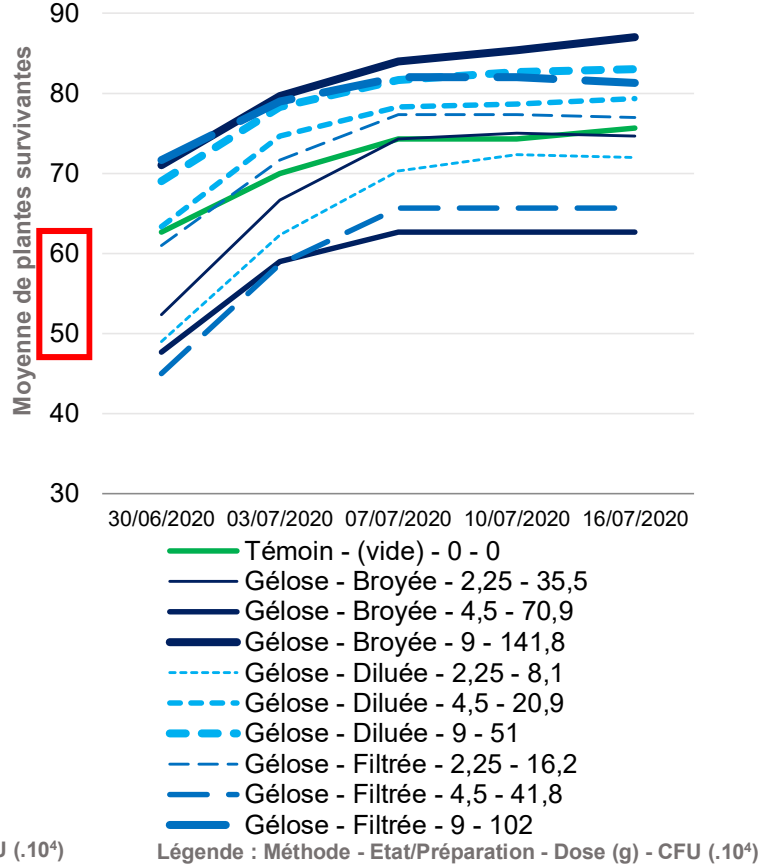


Figure 20 : Graphiques des moyennes de mâches survivantes à l'isolat 19-599 de *Rhizoctonia solani* inoculées avec de la vermiculite ou de la gélose. (Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

Comportement de l'isolat 19-599 sur cultures de mâches

La culture de mâches a eu très peu de pertes si nous comparons les modalités aux résultats des témoins (fig. 20). Pour la vermiculite, il y a eu des dégâts par nécrose du collet variant de 4 à 34 % pour la vermiculite humide et 15 à 25 % pour la vermiculite sèche. La fonte de semis était difficilement évaluable par les différents pathogènes pouvant en être la cause (*Pythium* sp. ou *Rhizoctonia solani*). En effet, le niveau de mâches survivantes souhaitées pouvait être soit de 53 % si nous nous basions sur la moyenne des plantes saines dans les témoins, soit de 63 % si nous nous référons au nombre de graines de mâches semées par caissettes (environ 90 graines). Dans ce dernier cas, nous avons dire que les témoins ont été touchés à 20 % par le *Pythium* sp., tandis que les modalités inoculées par de la gélose ont eu l'air d'être très peu touchées par le *Pythium* sp., mais aussi par le rhizoctone.

Pour les méthodes utilisant la vermiculite, soit la dose a été trop forte quand elle était de 10 g en humide comme en sec ou de 5 g quand la vermiculite était séchée, soit trop faible quand elle était de 2,5 g en humide comme en sec ou de 5 g quand la vermiculite était humide (fig. 20). Néanmoins, les résultats ont été homogènes et ont eu un effet dose significatif pour la vermiculite humide (Annexe VIII). Il serait intéressant de tester des doses entre 5 et 10 g.

Toutes les modalités de la méthode d'inoculation par de la gélose ont eu des résultats homogènes, mais qui étaient proches du témoin (Annexe VIII). Il n'y a pas eu de pertes significatives par nécrose (de 1 à 2 % seulement). Certaines modalités ont même eu des meilleurs résultats de levée que le témoin, notamment celles inoculant 9 g de gélose broyée sans préparation particulière ayant statistiquement la moyenne la plus élevée (Annexe VIII). Ceci a été contraire à nos attentes car cette modalité a provoqué presque 30 % de mâches touchées par fonte de semis (partie II.3.c)). Selon le graphique (fig. 20), les techniques les plus intéressantes sont 4,5 g de gélose broyée avec ou sans filtration (non diluée). Cependant, les tableaux ANOVA, réalisés pour les modalités gélose filtrée ou gélose filtrée et diluée, ont montré qu'il n'y avait aucune différence entre ces modalités et notamment avec le témoin (Annexe VIII). Ainsi la meilleure technique qui est statistiquement éloignée des résultats du témoin est l'application de 4,5 g de gélose broyée sans filtration.

4. Discussion

a) Problèmes méthodologiques de l'essai

Comme observé dans les résultats sur la culture de radis, le séchage de la vermiculite a provoqué plus de pertes, notamment en fonte de semis. Cela n'a pas été le cas pour la mâche car la vermiculite était moins sèche à l'application, ce qui a pu expliquer les valeurs proches de CFU entre la vermiculite sèche et humide pour les mêmes doses. Ainsi, le séchage n'a pas été homogène entre les sachets de vermiculites des deux isolats.

De plus, il a été réalisé dans des conditions non stériles : à l'air libre au sein d'un bureau du CDDM, car les pathologistes n'ont pas pu le réaliser au laboratoire du CTIFL (limitation du personnel à cause du COVID). Cela a eu pour conséquence la contamination de la vermiculite par de nombreux organismes de l'air. Lors des premières observations sur milieu gélosé, nous nous sommes aperçus que le milieu a été vite colonisé par des colonies bactériennes. Ces dernières n'étaient pas pathogènes, cela a été vérifié par l'analyse mycologique des modalités inoculant de la vermiculite sèche (M7-M8-M9 V) montrant que le *Rhizoctonia solani* a été le seul pathogène présent (tab. 13). Ainsi, nous n'avons pas pu déterminer si le séchage a augmenté l'agressivité de l'isolat ou si la contamination bactérienne qui, en se nourrissant du milieu nutritif, a provoqué une attaque précoce du *Rhizoctonia solani* sur les graines semées pour pouvoir s'alimenter.

Tableau 14 : Modalités de l'essai sur l'inoculation de *Rhizoctonia solani* avec de la gélose avec les doses réelles appliquées : * La dose pour la gélose correspond à celle de la gélose broyée voulue avant la méthode de préparation. Les doses réelles appliquées correspondent aux résultats des calculs de masse : $m/V = \rho$.

Cultures	Modalités	Isolats	Etat/ Préparation	Doses (g)*	Doses réelles appliquées (g)
Mâches	M1 G	19-599	Broyée	9	9
	M2 G	19-599	Filtrée	9	12
	M3 G	19-599	Filtrée et Diluée	9	6
	M4 G	19-599	Broyée	4,5	4,5
	M5 G	19-599	Filtrée	4,5	6
	M6 G	19-599	Filtrée et Diluée	4,5	3
	M7 G	19-599	Broyée	2,25	2,25
	M8 G	19-599	Filtrée	2,25	3
	M9 G	19-599	Filtrée et Diluée	2,25	1,5
Radis	M10 G	19-538	Broyée	9	9
	M11 G	19-538	Filtrée	9	12
	M12 G	19-538	Filtrée et Diluée	9	6
	M13 G	19-538	Broyée	4,5	4,5
	M14 G	19-538	Filtrée	4,5	6
	M15 G	19-538	Filtrée et Diluée	4,5	3
	M16 G	19-538	Broyée	2,25	2,25
	M17 G	19-538	Filtrée	2,25	3
M18 G	19-538	Filtrée et Diluée	2,25	1,5	
Mâches	M13 V = M19 G	TNI	/	0	0
Radis	M14 V = M20 G	TNI	/	0	0

(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

De plus, le protocole initial a été de peser les sachets avant et après le séchage afin de pouvoir appliquer la même quantité d'inoculum que lorsqu'il était humide. Cela a été oublié, c'est pourquoi nous nous sommes appuyés sur les CFU pour comparer les résultats. Ainsi, pour montrer que l'humidité de la vermiculite à l'inoculation a été un facteur faisant varier le comportement du rhizoctone, il aurait fallu appliquer la même quantité d'inoculum dans chaque modalité et réaliser ce dernier dans une salle stérile, voire dans une étuve stérilisée pour un séchage homogène. Par ailleurs, la vermiculite pourrait être préparée plus rapidement en la plaçant dans une étuve à la température optimale pour le développement des isolats étudiés (fig. 9), c'est-à-dire à une température de 20°C pour les isolats 19-599 et 19-538.

Une autre erreur a été réalisée dans la méthodologie pour les préparations de la gélose. D'après les calculs de masses ($\rho=m/V$), les quantités de gélose broyée appliquée pour les modalités filtrées et celles filtrées et diluées étaient fausses. En effet, après la filtration (étape 3, fig. 16) nous avons pris 2/3 de la solution pour l'inoculation du filtrat pour chaque dose de gélose, soit 12-6-3 g au lieu de 9-4,5-2,25 g de gélose contaminée inoculée (tab. 14). Il aurait fallu prendre la moitié du filtrat (soit 125 ml de filtrat/caissette) pour garder les mêmes doses dans toutes les modalités. Il faudra donc le prendre en compte dans l'indication des méthodes d'inoculation idéales.

b) Problèmes des conditions de l'essai et du système de notation

Pour les résultats de l'isolat 19-599 sur la culture de mâches, la contamination extérieure du substrat par un Pythiacées pathogène (tab. 13), provoquant les symptômes similaires que le rhizoctone, a été un biais important qui nous a empêché toute conclusion de la technique d'inoculation idéale. Ceci a été probablement causé par une mauvaise désinfection du traitement à la vapeur. Ainsi, pour les prochains essais, il faudra stériliser le substrat à l'autoclave. La présence du *Pythium* sp pourrait avoir un effet notable sur l'isolat 19-599 sur la culture de mâches permettant d'expliquer que l'ajout de 9 g de gélose broyée inoculé a eu le taux de levée et de mâches survivantes le plus important. En effet, les espèces du genre *Pythium* sont des saprophytes comme le *Rhizoctonia solani*, il pourrait donc y avoir une concurrence pour une même ressource nutritive. Ainsi le développement de ces deux pathogènes serait limité, ce qui justifierait que toutes les graines ont levée pour cette modalité.

Pour les cultures de radis inoculées par l'isolat 19-358, il y a eu des problèmes physiologiques importants qui ont pu causer des erreurs dans le comptage de plantes infectées. En effet, le phytotron n'a pas eu assez de lumière pour pouvoir faire pousser des radis sans qu'ils soient étiolés et affaiblis. C'est ainsi que les témoins, qui étaient retombant et très étiolés (Annexe VII), ont été arrachés pour être analysés en pensant à une attaque de rhizoctone (tab. 13). Il est important de préciser que sur le radis, le *Rhizoctonia solani* peut provoquer des dégâts à tout niveau de la racine et pas seulement sur le collet (fig. 5.1). Lorsqu'un radis a été retiré du sol en pensant qu'il était contaminé, il a été replanté mais, fragilisé par cette opération, il a été rapidement flétri et cela a été difficile de déterminer la cause de sa mort. De plus, il y a eu des problèmes de pourriture de racines dus à un souci d'irrigation. Les caissettes des modalités M16G et M17G étaient situées au bout des tablettes où les tuyaux pour l'écoulement des eaux fonctionnaient difficilement. Cela pourrait être la cause de la forte humidité dans ces modalités, ou bien il y a eu un problème de drainage à l'intérieur des caissettes. Ainsi, il serait préférable d'améliorer les tuyaux de sortie d'eau du phytotron et de faire des tests de drainage des caissettes avant utilisation afin d'éviter de favoriser la maladie. Toutes ces erreurs faites dans l'évaluation de la contamination par le rhizoctone ont été rectifiées en grandes parties par des analyses mycologiques (tab. 13), il n'a pas été possible de faire analyser toutes les plantes considérées comme touchées. Ainsi, il reste probablement quelques biais de notation d'appréciation visuelle dans les résultats (Annexe VII).

Tableau 15 : Résultats statistiques des tests d'homoscédasticité (tests de Bartlett et de Levène) pour le nombre de plantes saines à la récolte par méthode d'inoculation et de préparation : (« < 5% » : la pression de rhizoctone est hétérogène ; « > 5% » : la pression de rhizoctone est homogène ; un résultat **en gras** met en avant la meilleure technique de préparation selon les tests).

Cultures	Méthodes	Préparation	Résultats Test Bartlett	Résultats Test Levène
Radis	Vermiculite	Humide	0,001 < 0,05	0,013 < 0,05
		Sec	0,416 > 0,05	0,160 > 0,05
	Gélose	Broyée	0,002 < 0,05	0,004 < 0,05
		Filtrée	0,002 < 0,05	0,015 < 0,05
		Diluée	0,049 ≈ 0,05	0,064 > 0,05
Mâches	Vermiculite	Humide	0,176 > 0,05	0,056 > 0,05
		Sec	0,213 > 0,05	0,064 > 0,05
	Gélose	Broyée	0,445 > 0,05	0,173 > 0,05
		Filtrée	0,192 > 0,05	0,201 > 0,05
		Diluée	0,380 > 0,05	0,114 > 0,05

(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

Le système de notation par arrachage, trop destructif, n'a donc pas été adapté puisque les conditions de développement des radis n'ont pas été optimums. Néanmoins, il a permis de montrer que l'hypothèse faite à l'essai préliminaire (partie II.3.c) au sujet des radis surmontant les dégâts du rhizoctone, a été vérifiée. En effet, les courbes pour la modalité inoculant 9 g de gélose broyée (soit la quantité approximative d'une boîte de gélose) ont eu les mêmes typologies de courbes sur les 4 semaines d'expérimentation (fig. 12 et fig. 18). Les résultats n'ont pas représenté la réalité du terrain pour la culture de radis ; il faudrait refaire des essais avec la mise en place de néons supplémentaires ou de les réaliser sous serre en automne.

Pour les mâches, les conditions de levées et de développement ont été correctes. Le système de notation par arrachage a été même préférable pour cette culture car de nombreuses mâches se sont décomposées rapidement dans le substrat lorsqu'elles ont été attaquées. De plus, la notation visuelle des dégâts de rhizoctones a été facile à détecter (Annexe VII) s'il n'y avait pas de contamination d'autres pathogènes similaires (ex : *Pythium*) ; ce système a permis de suivre plus précisément le développement du *Rhizoctonia solani* dans les cultures de mâches.

c) Méthodes d'inoculations et techniques de préparation idéales

L'objectif de cette expérimentation a été de définir la technique d'inoculation la plus adaptée aux isolats étudiés de *Rhizoctonia solani*. Pour pouvoir comparer les pressions entre l'inoculation avec de la vermiculite et avec de la gélose, nous avons mesuré le CFU de chaque modalité. Cependant, les modalités inoculées avec de la gélose ont eu des CFU très élevés (probablement à cause du broyage), mais une pression plus faible contrairement à celles inoculées via la vermiculite (fig. 18 et fig. 20). Il n'y a eu pas de lien entre la pression de la maladie et le nombre de CFU, la pathogénicité des colonies dépend de la méthode d'inoculation employée. Au sein des modalités utilisant la même méthode, il y a eu un lien entre nombre de colonie (CFU) et de pertes (fig. 18 et fig. 20). Néanmoins, nous avons pu comparer ces deux techniques d'inoculation par l'homogénéité de leurs résultats (tab. 15).

Globalement, que ce soient dans les essais précédents ou durant cette expérimentation, l'inoculation de l'isolats 19-538 avec de la vermiculite a induit des pertes trop importantes et pas assez homogènes sur les cultures de radis. Pour tester de plus petites doses, il faudrait diluer la vermiculite dans de l'eau stérile afin d'appliquer une inoculation homogènement répartie au sein de la caissette. Dans le cas contraire, l'inoculation de l'isolat 19-599 sur les cultures de mâches, la vermiculite a donné des résultats statistiquement homogènes, mais des tests sur des doses se situant entre 5 et 10 g de vermiculite humide seraient nécessaires pour s'approcher des 30% de pertes souhaitées. Néanmoins, cette méthode d'inoculation resterait moins homogène que celle utilisant de la gélose.

Ainsi, selon les résultats de l'essai préliminaire et de l'expérimentation finale, les techniques d'inoculation adaptées pour l'évaluation de solutions antifongiques ont été : pour l'isolat 19-538, l'inoculation de 6 g de gélose broyée, filtrée puis diluée de moitié sur la culture de radis (tab. 14), et, pour l'isolat 19-599, l'inoculation de 4,5 à 9 g de gélose simplement broyée.

5. Conclusion

Nous allons essayer de répondre aux questions suivantes :

- Les cultures en condition contrôlée permettent-elles l'obtention de résultats proches de la réalité sur le terrain ?

Le type de méthode d'inoculation (vermiculite ou gélose), le niveau d'humidité de la méthode d'inoculation via la vermiculite et la dose appliquée influence le développement des isolats (19-599 et 19-538) dans les cultures étudiées. La concurrence par un autre pathogène tellurique a influencé fortement l'isolat 19-599 en limitant fortement sa contamination. Par cet essai, nous avons pu déterminer la meilleure méthode d'inoculation pour avoir un inoculum homogène, stable et reproductible pour chacun de ces isolats. Des tests supplémentaires seront à réaliser pour confirmer nos résultats, notamment pour les cultures de mâches qui ont été contaminées par du *Pythium* sp. De plus, des améliorations, pour augmenter la luminosité et limiter l'humidité, doivent être menées dans le phytotron pour que les radis poussent normalement, sans être fragilisés, afin d'obtenir des résultats plus proches de la réalité sur le terrain en condition contrôlée. Ceci a été réalisable pour les cultures de mâches.

- Quelle est la meilleure méthode d'inoculation pour avoir un inoculum homogène et reproductible ?

Ainsi, pour revenir sur nos hypothèses de la partie introductive (partie I.4.c)), la première a été que le nombre de CFU serait corrélé positivement aux dégâts de rhizoctone, ce qui n'a pas été le cas. Cette hypothèse n'a donc pas été validée. Par la suite, nous avons supposé que la vermiculite sèche permettrait de mieux limiter les attaques que la vermiculite humide, l'hypothèse a été aussi réfutée. Néanmoins, pour l'isolat 19-538, nous avons pu valider les hypothèses suivantes :

- Plus la dose de gélose ou de vermiculite est faible, moins il y a de dégâts ;
- La gélose filtrée, sans présence de sclérotas, permet des résultats plus stables et homogènes avec des attaques moins importantes que de la gélose broyée pure ;
- La gélose filtrée et diluée de moitié est la moins concentrée en mycélium, et par conséquent, la modalité la moins attaquée.

Les cultures de mâches étant contaminées par un pathogène extérieur, nous n'avons pas pu valider, ni réfuter ces hypothèses. Cependant, nous avons pu noter que le fait de placer les témoins du côté de l'isolat le moins agressif pour la culture a permis d'éviter les contaminations de ces derniers par le rhizoctone des caissettes voisines.

La meilleure méthode d'inoculation pour avoir une pression d'inoculum homogène et reproductible est celle appliquant de la gélose contaminée. Cette dernière peut nécessiter une filtration et une dilution, comme l'isolat 19-358 sur radis, ou peut être simplement appliquée après un broyage, comme l'isolat 19-599 sur mâche.

Ainsi, nous allons pouvoir tester des méthodes de lutte comme les produits de biocontrôle et les PNPP sur ces isolats et ces espèces cultivées. D'autres essais vont devoir être réalisés pour trouver les préparations idéales pour chaque isolat d'intérêt et adaptées aux cultures sensibles étudiées.

Facteurs influençant le comportement d'un isolat de *Rhizoctonia solani*

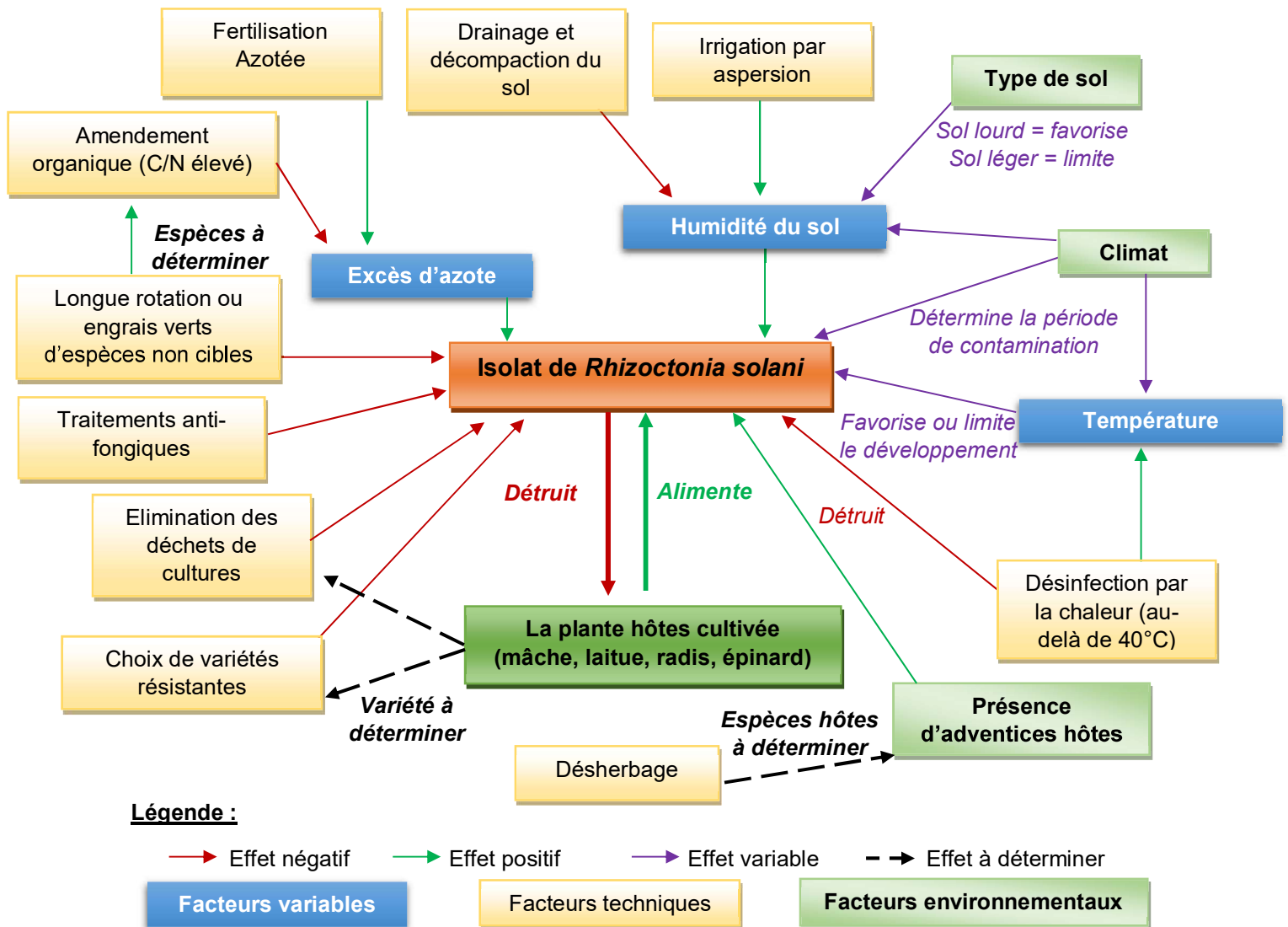


Figure 21 : Schéma global des facteurs influençant le comportement d'un isolat de *Rhizoctonia solani* (réalisé par THEURE Gwendoline, CDDM, 08/2020, à partir des informations de l'enquête et des sources bibliographiques : (Messiaen et al., 1991) ; (Beliard, 2003) ; [9]).

IV. Conclusion générale

Nous avons tenté de répondre à toutes nos hypothèses et nos questions subsidiaires dans les conclusions précédentes. Ainsi, nous pouvons d'apporter des éléments de réponses à la problématique : **Comment contrôler l'inoculum de *Rhizoctonia solani* sur des cultures spécifiques du maraîchage nantais (mâche, laitue, épinard et radis) ?**

Le *Rhizoctonia solani* est très influencé par le climat, notamment la température (fig. 21). Les souches de période estivale se développent plutôt à 30°C et celles de période hivernale préfèrent les températures autour des 20°C. La température létale étant à 40°C, un traitement à la vapeur pourrait être conseillé avant la mise en place de la culture sensible, lorsque l'isolat sort de sa période de conservation. Sachant que les sclérotes se situent plus profondément dans le sol, cela ne suffit pas à contrôler totalement le rhizoctone dans la culture. Ainsi nous pouvons limiter les autres facteurs comme l'humidité dans le sol ou la fertilisation azotée, mais cela ne sera pas favorable à de nombreuses cultures maraîchères.

Les maraîchers mettent en place des rotations des espèces cultivées pour limiter le développement de tels pathogènes, mais le rhizoctone est polyphage et peut se conserver dans le sol à l'état saprophytes pendant des mois. Les engrais verts peuvent permettre de limiter l'apparition du rhizoctone s'ils sont réalisés avec des familles différentes que les cultures sensibles (fig. 21), comme les céréales ou les graminées (Messiaen et al., 1991). Ils doivent être installés sur 5-6 mois pour limiter les attaques de rhizoctone. Néanmoins, les maraîchers doivent respecter les demandes du marché, exigeant en quantité de rendement et de production, et ne peuvent pas monopoliser longtemps une parcelle en couvert. L'usage de produits phytosanitaires serait une des solutions les plus efficaces pour contrôler l'inoculum du rhizoctone. Néanmoins, certaines méthodes de lutte chimique pourraient sélectionner des isolats plus résistants et agressifs. Nous choisirons donc des méthodes de lutte plus durables.

Pour tester ces solutions, la meilleure méthode d'inoculation des isolats de *Rhizoctonia solani* étudiés est celle utilisant un milieu gélosé. Cette dernière est assez homogène et ne modifie pas le développement des cultures. Il est parfois nécessaire que la gélose broyée soit filtrée et diluée pour s'approcher d'une homogénéité idéale ; des essais doivent donc être réalisés au cas par cas afin de déterminer les techniques d'inoculations adaptées à chaque souche et à chaque culture. Par la suite, nous vérifierons l'efficacité des PNPP : les extraits végétaux à base de feuilles de noyer, de plantes de bourdaine ou de rhubarbe, qui ont été efficaces contre le *Rhizoctonia solani* lors de tests au laboratoire (Berthelot, 2019).

Des produits de biocontrôle seront testés de nouveau tels que le Myco-Up (une souche mycorhizienne) et l'Amylo-X (à base de *Bacillus amyloliquefaciens*) qui ont montré une certaine efficacité dans les essais passés du CDDM. Ces organismes mycéliens et bactériens ralentissent la progression du rhizoctone en rentrant en compétition trophique. Par ailleurs, nous pourrions expérimenter des souches de *Rhizoctonia solani* non pathogènes de groupe d'anastomose AG 6, AG 10 ou AG 13 (tab.1), et qui seraient capables de détruire le mycélium les isolats pathogènes. Pour cela, l'isolat E 19-596 pourrait être étudié car il n'avait montré aucune pathogénicité sur nos cultures. Il faudrait vérifier son appartenance aux AG ci-dessus par des analyses génétiques. Si c'est bien le cas, cela pourrait être un nouveau produit de biocontrôle. Par ailleurs, la sélection de variétés résistantes (ex : les laitues hâtives et érigées : la laitue romaine... (Messiaen et al., 1991)) pourrait être menée par cet méthode d'inoculation.

Ainsi, par la combinaison de toutes ces méthodes de luttés, physiques (fig. 21) et biologiques, nous pourrions développer des systèmes de cultures durables et adaptés pour contrôler l'inoculum de *Rhizoctonia solani* sur les cultures spécifiques du maraîchage nantais (mâche, laitue, épinard et radis).

Bibliographie

Références bibliographiques

ANDERSON, N A, 1982. The Genetics and Pathology of *Rhizoctonia Solani*. In : *Annual Review of Phytopathology*. 1982. Vol. 20, n° 1, p. 329-347. DOI 10.1146/annurev.py.20.090182.001553.

ASSOCIATION DES MAIRES DE LOIRE-ATLANTIQUE, 2013. *Charte pour la prise en compte de l'Agriculture dans l'Aménagement du territoire - Volet maraîchage* [en ligne]. août 2013. S.l. : Association des maires de Loire-Atlantique. [Consulté le 8 juillet 2020]. Disponible à l'adresse : http://www.loire-atlantique.gouv.fr/content/download/11601/64559/file/charte_maraichage_151013_web.pdf.

BELIARD, Eric, 2003. Maladies et ravageurs de la laitue et de la chicorée à salade en AB. In : *TECHNITAB maraîchage*. janvier 2003. p. 6.

BERTHELOT, Charlotte, 2019. *Compte rendu annuel - projet OBIOLEG*. S.l. CTIFL.

BÜTTNER, G., PFÄHLER, B. et MÄRLÄNDER, B., 2004. Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to *Rhizoctonia* root and crown rot. In : *Plant Breeding*. 2004. Vol. 123, n° 2, p. 158-166. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00967.x.

CAMPOROTA, P., 1989. Maladies des plantes dues à *Rhizoctonia solani* (Kühn) : stratégie et techniques d'étude - résultats. In : *Agronomie*. 1989. Vol. 9, n° 4, p. 327-334. DOI 10.1051/agro:19890402.

CERCEAU, Véronique et BOSSEUR, Sévrine, 2019. *Travaux d'expérimentation en phytopathologie 2019*. CTIFL. CDDM / ARELPAL / Ctifl.

CERCEAU, Véronique et BOSSEUR, Sévrine, 2020. *Travaux d'expérimentation en phytopathologie 2020*. CTIFL. CDDM / ARELPAL / Ctifl.

CHAMPION, Rémi, 1997. *Identifier les champignons transmis par les semences*. Paris : Institut National de la Recherche Agronomique. ISBN 2-7380-0702-3.

CHUPIN, Olivier, 2000. Place et évolution du maraîchage nantais en Loire-Atlantique. In : *Méditerranée*. 2000. Vol. 95, n° 3, p. 43-50. DOI 10.3406/medit.2000.3174.

CUBETA, M. A. et VILGALYS, R., 1997. Population Biology of the *Rhizoctonia solani* Complex. In : *Phytopathology*®. 1 avril 1997. Vol. 87, n° 4, p. 480-484. DOI 10.1094/PHYTO.1997.87.4.480.

FÉDÉRATION DES MARAÎCHERS NANTAIS et AGENCE DE L'EAU LOIRE-BRETAGNE, 2015. Contrat filière. In : [en ligne]. S.l. 15 septembre 2015. [Consulté le 8 avril 2020]. Disponible à l'adresse : http://www.sage-estuaire-loire.org/files/tableau_decisions/2015_11_03/presentation-contrat-filiere.sage.pdf.

GAUCHER, D., CHAMPEIL, A., LE HINGRAT, Y., MILLE, B., GARSON, S., PORTENEUVE, C., LHOUE, J.M., RUER, D., PATOUX, V., CHATOT, C. et BOUCHEK-MECHICHE, K., 2014. Réduire l'impact des maladies telluriques dans les systèmes de cultures par une protection intégrée et durable des grandes cultures. In : *Innovations Agronomiques*. 2014. n° 34, p. 51-65.

GÉRARD, Sylvain, MÉVEL, Serge, VERRON, Patrick, PARME, William et LORNE, Marylou, 2018. *Gestion du *Rhizoctonia* sur radis avec des produits de biocontrôle*. Compte rendu Expérimentation. Maison des maraîchers. CDDM.

GILARDI, G., TURCO, A., GULLINO, M. L. et GARIBALDI, A., 2006. Attacks of *Rhizoctonia solani* on *Valerianella olitoria* (L.) Laterr. in Northern Italy. In : *Informatore Fitopatologico*. 2006. Vol. 56, n° 5, p. 48-49.

GONZALEZ GARCIA, V., PORTAL ONCO, M.A. et RUBIO SUSAN, V., 2006. Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. In : *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1 mars 2006. Vol. 4, n° 1, p. 55. DOI 10.5424/sjar/2006041-178.

GOUWIE, Céline, 2019. Gestion intégrée des maladies - Rhizoctone brun. In : *ITB (Institut Technique de la Betterave)* [en ligne]. juillet 2019. [Consulté le 29 avril 2020]. Disponible à l'adresse :

http://www.itbfr.org/fileadmin/user_upload/PDF/Fiches_Bioagresseurs/Gestion_integree_-_rhizoctone_brun_web.pdf.

HARRIS, A. R., SCHISLER, D. A. et NEATE, S. M., 1993. Culture of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* spp on organic substrates for inoculation of seedlings in containers. In : *Soil Biology and Biochemistry*. 1 mars 1993. Vol. 25, n° 3, p. 337-341. DOI 10.1016/0038-0717(93)90132-U.

INRS, MétroPol, [sans date]. *MétroPol - Préparation de l'analyse de microorganismes aérobies* [en ligne]. S.I. : Institut national de recherche et de sécurité. [Consulté le 21 juillet 2020]. Disponible à l'adresse :

http://www.inrs.fr/dms/metropol/MethodeAnalyseMetropol/METHANALYSE_91-1/MetroPol-Methode-Analyse-METHANALYSE_91.pdf.

JEAN, Romane, 2019. *Optimisation de méthodes alternatives contre des bio-agresseurs en cultures légumières*. S.I. CTIFL.

KESSLER, Alexandra C et KOEHLER, Alyssa M, 2020. First report of *Rhizoctonia solani* AG 4 causing root and stem rot of stevia in Delaware and Maryland. In : *Plant Disease* [en ligne]. 21 mai 2020. [Consulté le 10 juillet 2020]. DOI 10.1094/PDIS-01-20-0214-PDN. Disponible à l'adresse : <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-01-20-0214-PDN>.

KURAMAE, Eiko E., BUZETO, Alexandre L., CIAMPI, Maisa B. et SOUZA, Nilton L., 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in Lettuce, AG 4 HG-I in Tomato and Melon, and AG 4 HG-III in Broccoli and Spinach, in Brazil. In : *European Journal of Plant Pathology*. 1 mai 2003. Vol. 109, n° 4, p. 391-395. DOI 10.1023/A:1023591520981.

LE STUNFF, Morane, 2017. *Dépérissement de la mâche en région Nantaise - Recherche de premières options de protection en biocontrôle*. Mémoire de fin d'étude. S.I. Université d'Angers.

LECLERC, Melen, 2013. Approche par modélisation et expérimentation du développement spatio-temporel des maladies telluriques: le cas du pathosystème betterave à sucre *Rhizoctonia solani*. In : . 2013. p. 201.

MARTIN, S.B. et LUCAS, L.T., 1984. Characterization and Pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. and Binucleate *Rhizoctonia*-like Fungi from Turfgrasses in North Carolina. In : *Etiology*. 1984. n° 74, p. 170-175.

MESSIAEN, Charles-Marie, BLANCARD, Dominique et ROUXEL, Francis, 1991. *Les maladies des plantes maraîchères*. 3. éd. Paris : Institut National de la Recherche Agronomique. ISBN 978-2-7380-0286-0.

MÉVEL, Serge, VERRON, Patrick, GÉRARD, Sylvain et LORNE, Marylou, 2018a. *Gestion du rhizoctone sur radis avec des produits de biocontrôle - n°1*. Compte rendu Expérimentation. Maison des maraîchers. CDDM.

- MÉVEL, Serge, VERRON, Patrick, GÉRARD, Sylvain et LORNE, Marylou, 2018b. *Gestion du rhizoctone sur radis avec des produits de biocontrôle - n°2*. Compte rendu Expérimentation. Maison des maraîchers. CDDM.
- MÉVEL, Serge, VERRON, Patrick, GÉRARD, Sylvain et LORNE, Marylou, 2019a. *Essai rhizoctone sur cultures d'épinard et jeunes pousses de laitue*. Compte rendu Expérimentation. Maison des maraîchers. CDDM.
- MÉVEL, Serge, VERRON, Patrick, GÉRARD, Sylvain et LORNE, Marylou, 2019b. *Evaluation de solutions de biocontrôle contre rhizoctone sur cultures d'épinard, jeunes pousses de laitue, mâche et radis*. Compte rendu Expérimentation. Maison des maraîchers. CDDM.
- MÉVEL, Serge, VERRON, Patrick, GÉRARD, Sylvain et LORNE, Marylou, 2019c. *Gestion du rhizoctone sur radis avec des produits de biocontrôle - Primalogne*. Compte rendu Expérimentation. Primalogne. CDDM.
- MÉVEL, Serge, VERRON, Patrick, GÉRARD, Sylvain et LORNE, Marylou, 2019d. *Gestion du rhizoctone sur radis avec des produits de biocontrôle - Primeurop*. Compte rendu Expérimentation. Primeurop. CDDM.
- MÉVEL, Serge, VERRON, Patrick, GÉRARD, Sylvain et LORNE, Marylou, 2019e. *Gestion du rhizoctone sur radis et mâche avec des produits de biocontrôle - n°1*. Compte rendu Expérimentation. Maison des maraîchers. CDDM.
- MÉVEL, Serge, VERRON, Patrick, GÉRARD, Sylvain et LORNE, Marylou, 2019f. *Gestion du rhizoctone sur radis et mâche avec des produits de biocontrôle - n°2*. Compte rendu Expérimentation. Maison des maraîchers. CDDM.
- MÉVEL, Serge, VERRON, Patrick, GÉRARD, Sylvain et LORNE, Marylou, 2020. *Lutte contre rhizoctone sur cultures de jeunes pousses de laitue avec des biocontrôles*. Compte rendu Expérimentation. Vendéa. CDDM.
- MOTISI, Natacha, 2009. Réguler les maladies d'origine tellurique par une culture intermédiaire de Brassicacées: mécanismes d'action et conditions d'expression dans une rotation betterave-blé. In : . 2009. p. 267.
- OGOSHI, A, 1987. Ecology and Pathogenicity of Anastomosis and Intraspecific Groups of *Rhizoctonia Solani* Kuhn. In : *Annual Review of Phytopathology*. 1987. Vol. 25, n° 1, p. 125-143. DOI 10.1146/annurev.py.25.090187.001013.
- RAPILLY, F., 1968. *Les techniques de mycologie en pathologie végétale*. S.l. : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Annales des épiphyties, hors série.
- RÉGION PAYS DE LA LOIRE, 2019. *Appel à projet 2019 - Programmes agricoles de recherche appliquée et expérimentation de la Région des Pays de la Loire - OBIOLEG*. 2019. S.l. : s.n.
- SCHULTHESS, Andrin, ARNOLD, Bruno, DUGON, Jacques, GERBER, Christa et HELLER, Christine, 2015. *Fiche qualité : Rhizoctone brun (Rhizoctonia solani)* [en ligne]. 2015. S.l. : swisspatat. [Consulté le 24 avril 2020]. Disponible à l'adresse : https://www.kartoffel.ch/_Resources/Persistent/685159aea69c9f5a266707f95933ce8f254af9a9/01_F_15_Rhizoctonia_def.pdf.
- STURROCK, Craig J., WOODHALL, James, BROWN, Matthew, WALKER, Catherine, MOONEY, Sacha J. et RAY, Rumiana V., 2015. Effects of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2-1 on roots of wheat and oil seed rape quantified using X-ray Computed Tomography and real-time PCR. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 2015. Vol. 6. [Consulté le 30 avril 2020]. DOI 10.3389/fpls.2015.00461. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00461/full#B1>.

TSAI, Yun-Nung, LIN, Mei-Ju et KO, Wen-Hsiung, 2012. A simple method for production of uniform inoculum of *Rhizoctonia solani* with strong pathogenicity. In : *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1 janvier 2012. Vol. 1, n° 1, p. 85-88. DOI 10.1016/j.bcab.2011.08.006.

Références sitographiques

[1] : OUEST-FRANCE, 2013. Nantes, terre de culture légumière depuis cinq siècles. In : *Ouest-France.fr* [en ligne]. 29 août 2013. [Consulté le 8 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.ouest-france.fr/economie/agroalimentaire/nantes-terre-de-culture-legumiere-depuis-cinq-siecles-4478384>.

[2] : TURGIS, Christophe, 2013. Nantes : la capitale verte de l'Europe fête les 500 ans du maraîchage nantais. In : *France 3 Pays de la Loire* [en ligne]. 29 août 2013. [Consulté le 8 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://france3-regions.francetvinfo.fr/pays-de-la-loire/2013/08/29/nantes-la-capitale-verte-de-leurope-fete-les-500-ans-du-maraichage-nantais-308835.html>.

[3] : CDDM, Comité Départemental de Développement Maraîcher, 2009. Le maraîchage en Loire-Atlantique. In : *COMITÉ DÉPARTEMENTAL DE DÉVELOPPEMENT MARAÎCHER* [en ligne]. 2009. [Consulté le 5 février 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.cddm.fr/page/le-mara%C3%AEchage-en-loire-atlantique>.

[4] : TIERS, Nathalie, 2016. Maraîchers Nantais. Un site dédié à l'innovation et la formation. In : *Ouest-France.fr* [en ligne]. 3 octobre 2016. [Consulté le 9 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.ouest-france.fr/economie/agriculture/maraichers-nantais-un-site-dedie-l-innovation-et-la-formation-4535169>.

[5] : FÉDÉRATION DES MARAÎCHERS NANTAIS, [sans date]. A propos des Maraîchers Nantais. In : *Fédération des Maraîchers Nantais* [en ligne]. [Consulté le 9 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.maraichersnantais.fr/la-filiere-maraichers-nantais/>.

[6] : AFP, 2019. Après l'interdiction du métam-sodium Les maraîchers nantais obligés de revoir leur modèle. In : *Terre-net* [en ligne]. 13 mars 2019. [Consulté le 8 juillet 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.terre-net.fr/actualite-agricole/economie-social/article/les-maraichers-nantais-obliges-de-revoir-leur-modele-202-146306.html>.

[7] : GRALON, [sans date]. Comité Départemental de Développement Maraîcher. In : *Gralon* [en ligne]. [Consulté le 9 avril 2020]. Disponible à l'adresse : https://www.gralon.net/mairies-france/loire-atlantique/association-comite-departemental-de-developpement-maraicher-pont-saint-martin_W442009692.htm.

[8] : CDDM, Comité Départemental de Développement Maraîcher, [sans date]. Les activités du Comité Départemental de Développement Maraîcher. In : *COMITÉ DÉPARTEMENTAL DE DÉVELOPPEMENT MARAÎCHER* [en ligne]. [Consulté le 10 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.cddm.fr/page/les-activit%C3%A9s>.

[9] : BLANCARD, D. (INRA), 2019. Tropilé - Rhizoctone brun (*Rhizoctonia solani*). In : *Ephytia* [en ligne]. 26 avril 2019. [Consulté le 15 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/23066/Tropilé-Rhizoctone-brun-Rhizoctonia-solani>.

[10] : CERESINI, Paulo, 1999. *Rhizoctonia solani*. In : *NC State University* [en ligne]. 1999. [Consulté le 14 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Rhizoctonia/Rhizoctonia.html>.

[11] : MOREL, cyclamen.com, 2015. Les champignons - *Rhizoctonia solani*. In : *Morel cyclamen.com* [en ligne]. 2015. [Consulté le 14 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.cyclamen.com/fr/professionnel/maladies/8/22>.

[12] : ESIAB, [sans date]. *Rhizoctonia solani*. In : *Université de Bretagne Occidentale* [en ligne]. [Consulté le 16 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <http://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Les+fiches+pratiques/R.+solani>.

- [13] : BLANCARD, D. (INRA), 2018. Tomate - *Thanatephorus cucumeris* (rhizoctone brun). In : *Ephytia* [en ligne]. 13 juillet 2018. [Consulté le 16 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5010/Tomate-Thanatephorus-cucumeris-rhizoctone-brun>
- [14] : RBG, Kew, [sans date]. Species Fungorum - GSD Species. In : *Index Fungorum* [en ligne]. [Consulté le 30 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <http://www.speciesfungorum.org/Names/GSDSpecies.asp?RecordID=229666>.
- [15] : INRAE, 2019. Vigi-Semences - *Rhizoctonia solani* (Rhizoctone brun sur betterave). In : *Ephytia* [en ligne]. 9 avril 2019. [Consulté le 24 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/22681/Vigi-Semences-Rhizoctonia-solani-Rhizoctone-brun-sur-betterave>
- [16] : TNAU, 2016. Sheath Blight: *Rhizoctonia solani*. In : *TNAU Agritech Portal* [en ligne]. 2016. [Consulté le 23 avril 2020]. Disponible à l'adresse : http://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/rice_diseases/rice_6.html.
- [17] : ARGENTINI, Corinne, 2018. Métam-sodium interdit. Les maraîchers nantais veulent être entendus. In : *Ouest-France.fr* [en ligne]. 5 novembre 2018. [Consulté le 15 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.ouest-france.fr/pays-de-la-loire/nantes-44000/metam-sodium-interdit-les-maraichers-nantais-veulent-etre-entendus-6052704>.
- [18] : TNAU, [sans date]. Sheath blight life cycle. In : *TNAU Agritech Portal* [en ligne]. [Consulté le 23 avril 2020]. Disponible à l'adresse : http://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/images/rice_diseases/sheathblight_lifecycle.jpg.
- [19] : ANSES, [sans date]. ephy |. In : *E-Phy* [en ligne]. [Consulté le 15 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://ephy.anses.fr/>.
- [20] : BEAUVALLET, Guillaume, HANNON, Cyril et VANNETZEL, Elise, 2012. Des risques d'attaque de Rhizoctone brun. In : *ARVALIS-infos.fr* [en ligne]. 16 mai 2012. [Consulté le 24 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.arvalis-infos.fr/des-conditions-actuelles-favorables-au-developpement-du-rhizoctone-@/view-10192-arvarticle.html>.
- [21] : BLANCARD, D. (INRA), 2015a. *Bioagresseurs du sol - Rhizoctonia solani* (vidéo) [en ligne]. 30 novembre 2015. [Consulté le 30 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/10670/Bioagresseurs-du-sol-Rhizoctonia-solani-video>.
- [22] : BLANCARD, D. (INRA), 2015b. Bioagresseurs du sol - *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*). In : *Ephytia* [en ligne]. 27 novembre 2015. [Consulté le 30 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/10610/Bioagresseurs-du-sol-Thanatephorus-cucumeris-Rhizoctonia-solani>.
- [23] : BLANCARD, D. (INRA), 2013. Salades - *Thanatephorus cucumeris* (fontes de semis, pourritures basales). In : *Ephytia* [en ligne]. 25 juin 2013. [Consulté le 30 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5414/Salades-Thanatephorus-cucumeris-fontes-de-semis-pourritures-basales>.

AGROCAMPUS OUEST

CFR Angers CFR Rennes

Année universitaire : 2019 - 2020

Spécialité/Mention :

Horticulture

Spécialisation/Parcours :

Protection des plantes et environnement
appliquée à l'horticulture (PPEH)

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)

Problème de Rhizoctone brun sur les principales cultures du maraîchage nantais (mâche, laitue, épinard et radis) :

Caractérisation d'isolats de *Rhizoctonia solani* et recherche d'une méthode d'inoculation homogène et reproductible

- ANNEXES -

Par : Gwendoline THEURÉ



Soutenu à Angers le 03 septembre 2020

Devant le jury composé de :

Président : M. CHEN Nicolas

Maître de stage : M. GERARD Sylvain

Enseignant référent : Mme BRIARD Mathilde

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Mme MARCHI Muriel, ingénieure de recherche en
Phytopathologie, à INRAE - IRHS

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

Annexe I : Liste d'isolats de *Rhizoctonia solani* analysés par l'unité de pathologistes du CDDM au CTIFL

Isolats de <i>Rhizoctonia solani</i> 2018									
Réf labo	Dates de détection	Cultures d'origine	Productions	Symptômes	Test de pouvoir pathogène sur épinard, laitue, mâche et radis (% infestation à 7s)				Entreprise
					E	L	M	R	
18-295	20/09/2018	Epinard	Sodiprim	Fonte semis	100	75	0	50	
Cardes 4	27/09/2018	Cardes	Layens	Collets et bas plantes nécrosés	100	95-100	95-100	95-100	Layens
18-319	15/11/2018	Mâche Cirilla	Ducoin	Coty nécrosés	20	85	55	10	Ducoin
18-340	22/11/2018	Mâche après EV	Pouvreau F	Coty et feuilles base nécrosés	75	100	100	30	La Meule
		Sans désinfection	Arthon						
18-351	28/11/2018	Mâche DP	Bois Viaud	Racines	85	15	100	90	Bouyer
18-356	29/11/2018	Radis rond rouge	Primeurop	Tubercule pourri	35	65	25	75	Primeurop
			La Limouzière						
18-357	29/11/2018	Mâche jeune	Ducoin	Attaques jeunes plantes	30-40	70-100	95-100	5-40	Ducoin
18-366	06/12/2018	Mâche Amélie	Les Nouelles	Coty et feuilles base nécrosés	60	70	80	10	Les Nouelles
18-367	07/12/2018	Mâche	Pouvreau F	Collets nécrosés qui remontent vers cœur des plantes	75	90	100	0	La Meule
18-376	11/12/2018	Mâche	Gaec du Levant	Coty et feuilles base nécrosés	55	100	80	25	Le Levant
Fin de la liste des isolats de 2018									

Isolats de *Rhizoctonia solani* 2019

Réf labo	Dates de détection	Cultures d'origine	Productions	Symptômes	Test de pouvoir pathogène sur épinard, laitue, mâche et radis (% infestation à 7s)				Entreprise
					E	L	M	R	
19-483	26/02/2019	Radis	Acothem Marais	Nécroses tubercule					
19-536	21/03/2019	Mâche contrôle non désinfectée	Essai Clause serre cddm	Stade coty					
19-537	21/03/2019	Mâche Ref Thirame	Essai Clause serre cddm	Stade coty					
19-538	27/03/2019	Radis (inoculation par broyat de radis)	Essai serre cddm	Nécrose noire / partie basse racines	60	30	55	100	Primeurop
CP 19	11/03/2019	Laitues	Essai serre cddm BCA (mycoup)		90	85	5	50	
	09/04/2019	Terre essai cddm (PV mâche TNT)	Essai serre cddm BCA		100	20	55	50	
19-539	26/04/2019	Radis noir	Layens Alain	Nécroses pourries molles sur haut de racines	40	100	70	70	Layens
19-556	11/06/2019	Laitues	Vendéa Essai 1 JPV33	Fontes semis	14	70	10	5	
			Bonduelle	Nécroses brunes des racines					
19-568	09/07/2019	Fenouil	Pogu	Nécroses brunes / bulbes	80	15	65	65	La Vincée

Suite de l'annexe I

19-574	13/08/2019	Radis	Ducoin	Pustules noires (avec aphano)	70	30	25	80	Ducoin
19-576	28/08/2019	Essais Bonduelle laitues	Suite de 19-556	Collets et racines nécrosés brun	5	25	15	10	
19-581	02/09/2019	Cardes mottes	Maurat Charles Carquefou	Collet nécrosé noir	85	5	85	0	Maurat
			GAP monocultures	Propagation sur racines					
				Flétrissement plantes (avec PCR)					
19-585	17/09/2019	Sorgho (EV)	Pouvreau F	Nécroses noires des racines	10	0	0	5	La Meule
19-593	20/10/2019	Cardes	Corbineau	Collet externe et racine nécrosés brun	10	0	0	10	Corbineau
19-594	25/10/2019	Laitues	Olive PC	Nécrose brune des côtes de feuilles basales	70	100	100	0	Olive et Fils
19-596	04/11/2019	Épinard	Caracal	Nécroses brunes des racines (avec FO)	10	0	5	15	Caracal
19-599	14/11/2019	Mâche	Pouvreau F. La Meule Arthon PC	Nécrose brune petite plante	75	100	100	10	La Meule
19-607	25/11/2019	Mâche	Essai serre cddm Sodiprim Cosson	Cotylédons nécrosés					Sodiprim
Fin de la liste des isolats de 2019									

Isolats de *Rhizoctonia solani* 2020

Réf labo	Dates de détection	Cultures d'origine	Productions	Symptômes	Test de pouvoir pathogène sur épinard, laitue, mâche et radis (% infestation à 7s)				Entreprise
					E	L	M	R	
20-615	07/01/2020	JP laitues	Fleury GAP	Nécroses brunes du collet et pétioles des feuilles					Fleury
			Serre LCO2						
20-620	09/01/2020	Radis GAP	Primeurs de Retz	Tubercules pourris avec feutrage					Primeurs de Retz
			P. Briand						
			Machecoul						
20-625	16/01/2020	Radis rond rouge	Vendéa	Collet et pétioles feuilles nécrosés					Vendéa
				Evolution vers nécrose totale des tubercules					
20-628	23/01/2020	Mâche	Ducoin	Collet et feuilles base nécrosés					Ducoin
			Leguerdre B3						
20-629	24/01/2020	Radis rond rouge	Les Oliviers	Nécrose totale des tubercules et base pétioles					Les Oliviers
			Multi 3						
20-630	24/01/2020	Jeunes pousses	Vendéa	Collet et feuilles base nécrosés					Vendéa
			Serre G						

Fin de la liste des isolats de 2020

Annexe II : Enquête sur l'historique des parcelles des isolats de rhizoctone

Numéro	Isolats	Cultures	Dates prélèvements	Entreprises	Parcelle	Maraichage (ans)	Type de terrain	Cultures sensibles 1	Cultures sensibles 2	Cultures sensibles 3	Cultures sensibles 4	Cultures sensibles 5	Cultures sensibles 6
1	18-319	Mâches	15/11/2018	Ducoin	Tunnel Franck Chenneau	20	Maraichage						
2	18-340	Mâches	22/11/2018	La Meule	Arthon en Retz	30	Maraichage	Mâches	Carottes				
3	18-356	Radis rond rouge	29/11/2018	Primeurop	n.a	15	Grandes cultures	Mâches	Jeunes pousses				
4	18-357	Mâches	29/11/2018	Ducoin	Tunnel Franck Chenneau	20	Maraichage						
5	18-366	Mâches	06/12/2018	Les Nouelles	n.a	22	Polyculture élevage						
6	18-367	Mâches	07/12/2018	La Meule	Arthon en Retz	30	Maraichage	Mâches	Carottes				
7	18-376	Mâches	11/12/2018	Le Levant	La Davière	42	n.a	Mâches	Carottes	Tomates	Navet	Radis	Salades
8	19-538	Radis	27/03/2019	Primeurop	n.a	15	Grandes cultures	Mâches	Jeunes pousses				
9	19-574	Radis	13/08/2019	Ducoin	Tournebride plein champ	40	Maraichage	Radis					
10	19-593	Cardes	20/10/2019	Corbineau	Tunnels Pont St Martin	75	Sablonneux	Radis	Navets				
11	19-594	Laitues	25/10/2019	Olive et Fils	Château Thebault - llot : 12-13	80	Maraichage						
12	19-599	Mâches	14/11/2019	La Meule	Arthon en Retz	30	Maraichage	Mâches	Carottes				

Numéro	Isolats	Monoculture	Culture en monoculture	Nombre de culture en rotation	Culture en rotations 1	Culture en rotation 2	Culture en rotation 3	Culture en rotation 4	Culture en rotation 5	Attaques R.s.	Cultures attaquées 1	Cultures attaquées 2
1	18-319	Non		3	Radis	Mâches	Epinards			Oui	Mâches	
2	18-340	Non		4	Mâches	Carottes	Panais	Couverts		Oui	Mâches	
3	18-356	Non		2	Mâches	Radis				Oui	Radis	
4	18-357	Non		3	Radis	Mâches	Epinards			Oui	Mâches	
5	18-366	Oui	Mâches							Oui	Mâches	
6	18-367	Non		4	Mâches	Carottes	Panais	Couverts		Oui	Mâches	
7	18-376	Non		3	Mâches	Salades	Fenouil			Oui	Mâches	Salades
8	19-538	Non		2	Mâches	Radis				Oui	Radis	
9	19-574	Non		4	Mâches	Radis	Oignons	Persil		Oui	Mâches	Radis
10	19-593	Oui	Cardes							Oui	Cardes	
11	19-594	Non		5	Salades	Radis	Epinards	Pommes de terre	Betteraves	Oui	Salades	Radis
12	19-599	Non		4	Mâches	Carottes	Panais	Couverts		Oui	Mâches	

Numéro	Isolats	Pb récurrent	Depuis (ans)	Niveau	Variation	Désinfection sol	Utilisation Métam avant interdiction	Fongicides	Produits 1	Produits 2	Produits 3
1	18-319	Oui	n.a	Faible	Augmente	Solarisation	Non	Non			
2	18-340	Oui	10	Elevé	Augmente	Couverts	Oui	Oui	Signum	Ortiva	
3	18-356	Oui	2	Elevé	Augmente	Vapeur	Non	Oui	Prévicur		
4	18-357	Oui	n.a	Faible	Augmente	Solarisation	Non	Non			
5	18-366	Oui	6	Faible	Aucune	Couverts	Oui	Oui	Signum	Switch	
6	18-367	Oui	10	Elevé	Augmente	Couverts	Oui	Oui	Signum	Ortiva	
7	18-376	Oui	22	Variable	n.a	Vapeur	Oui	Oui	Signum	Switch	
8	19-538	Oui	2	Elevé	Augmente	Vapeur	Non	Oui	Prévicur		
9	19-574	Oui	n.a	Moyen	Aucune	Vapeur	Non	Non			
10	19-593	Oui	n.a	Moyen	n.a	Aucune	Oui	Oui	Prévicur	Ortiva	Autre
11	19-594	Oui	27	Variable	n.a	Aucune	Non	Oui	Signum	Prévicur	
12	19-599	Oui	10	Elevé	Augmente	Couverts	Oui	Oui	Signum	Ortiva	

Numéro	Isolats	Biocontrôles	Produits 1	Depuis (ans)	Effet sur R.s.	Produits 2	Depuis (ans)	Effet sur R.s.	Produits 3	Depuis (ans)	Effet sur R.s.	Produits 4	Depuis (ans)	Effet sur R.s.	Type d'effet (efficacité)	Arrêt ?
1	18-319	Oui	MycoUp	2	Non	Amylo-X	2	Non								Non
2	18-340	Oui	MycoUp	2	Non	Trisoil	2	Non	Prestop	2	Non	Rhapsody	2	Non		Oui
3	18-356	Oui	MycoUp	2	Non	Amylo-X	2	Non	Traegro	2	Non	Contans	2	Oui	Faible	Non
4	18-357	Oui	MycoUp	2	Non	Amylo-X	2	Non								Non
5	18-366	Non														
6	18-367	Oui	MycoUp	2	Non	Trisoil	2	Non	Prestop	2	Non	Rhapsody	2	Non		Oui
7	18-376	Non														
8	19-538	Oui	MycoUp	2	Non	Amylo-X	2	Non	Traegro	2	Non	Contans	2	Oui	Faible	Non
9	19-574	Oui	MycoUp	n.a	n.a											Non
10	19-593	Non														
11	19-594	Oui	Trisoil	1	n.a											Non
12	19-599	Oui	MycoUp	2	Non	Trisoil	2	Non	Prestop	2	Non	Rhapsody	2	Non		Oui

Annexe II : Enquête sur l'historique des parcelles des isolats de rhizoctone (suite) - Analyse des données de l'enquête

Sur les 11 exploitants contactés, 7 ont répondu à l'enquête et ont donné des informations sur 12 isolats. Tout d'abord, il est essentiel de noter que toutes les parcelles sont en conventionnelles et que les semences des plantes cultivées sont traitées. Les données ont confirmé que les attaques de rhizoctone sont un problème récurrent, mais le niveau d'attaque est variable selon la parcelle ; il est élevé pour 25% des exploitants interrogés, faible pour 25% autres, moyen pour 25% des maraîchers puis, pour les 25% restants, la pression est plutôt variable selon les années et les cultures atteintes (tab. 1). Pour 38% des personnes interrogées, la pression de la maladie augmente avec les années, tandis que pour 25% des autres exploitants, elle est plutôt stable.

L'influence de l'historique des cultures sur l'agressivité des isolats

Dans l'ensemble, l'historique des terrains est semblable. La majorité des parcelles (58%) ont été cultivées en maraîchage avant l'installation des exploitations. Tous les exploitants enquêtés ont mené des cultures maraîchères depuis plus de 10 ans sur les parcelles de l'étude. Nous avons obtenu les informations sur 7 isolats de mâches (18-319, 18-340, 18-357, 18-366, 18-367, 18-376 et 19-599), 3 isolats de radis (18-356, 19-538 et 19-574), 1 isolat de laitues (19-594) et 1 isolat de cardes (19-593). Les taux d'agressivité de ces isolats s'appuient sur les résultats au CTIFL qui sont assez proches des conditions climatiques automnales lors des attaques sur le terrain (tab. 1). Ils sont comparés aux données de l'enquête en traitant au cas par cas les quatre cultures sensibles étudiées : mâches, laitues, épinards et radis.

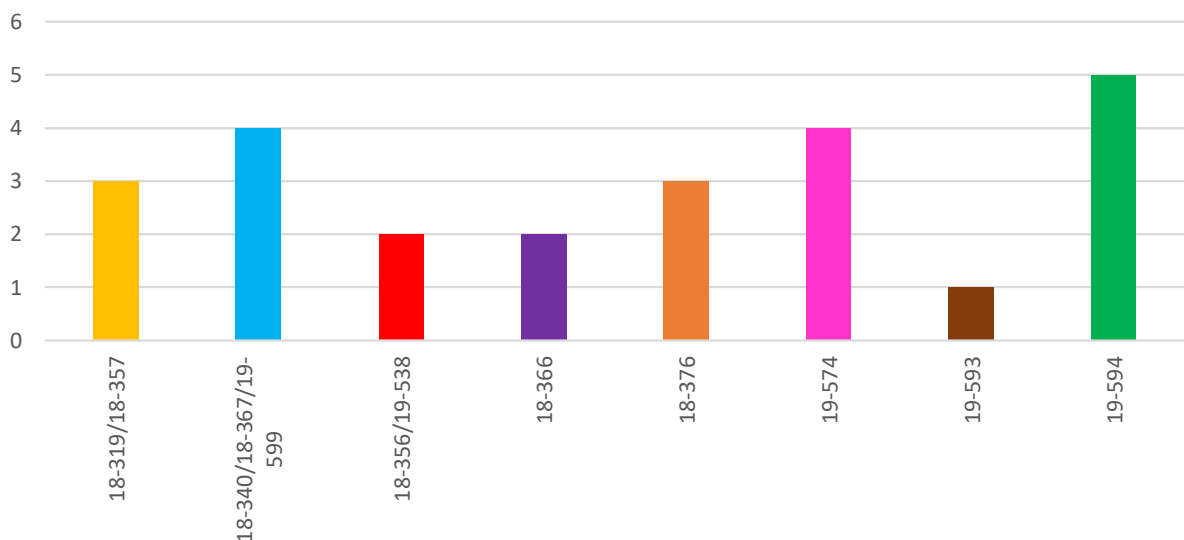
Tableau 1 : Comparaison de l'agressivité des isolats selon l'avis des exploitants enquêtés et les résultats au laboratoire :

Isolats	Avis de l'exploitant	Mâches	Laitues	Epinards	Radis
M 18-319	M -	+	++	-	-
M 18-357	M -	++	++	-	-
M 18-340	M ++	++	++	++	-
M 18-367	M ++	++	++	++	-
M 19-599	M ++	++	++	++	-
M 18-366	M -	++	+	+	-
M 18-376	M et L +/-	++	++	+	-
L 19-594	R et L +/-	++	++	+	-
R 18-356	R ++	-	+	-	++
R 19-538	R ++	+	-	+	++
R 19-574	M et R +	-	-	+	++
Cardes 19-593	Cardes +	-	-	-	-
Légende					
Mâches	M	Laitues		L	
Epinards	E	Radis		R	
Agressivité variable	+/-	Agressivité élevé		++	
Agressivité moyen	+	Agressivité faible		-	

(Réalisé par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

Avec les données de l'enquête, nous ne sommes pas parvenus à trouver un lien avec l'historique des cultures sur la parcelle de l'isolat. Il peut ne pas y avoir d'épinards cultivés dans la rotation actuelle, comme celles passées, et l'isolat de cette parcelle pourra causer beaucoup de pertes sur l'épinard, comme pour les isolats de La Meule (8-340, 18-367 et 19-599). La même remarque peut être faite pour la laitue, mais aussi pour le faible taux d'agressivité sur les radis chez les isolats de mâches (ex : 18-356) et celui sur les mâches chez les isolats de radis (ex : 19-574) ; pourtant ces deux espèces sont souvent cultivées successivement en rotation sur plusieurs parcelles notamment à Primeurop (18-356, 19-538). Ainsi les espèces des plantes cultivées sur une parcelle n'a pas forcément d'impacts sur les attaques des isolats. Et seuls les 3 isolats de radis ont un fort niveau d'agressivité sur la culture de radis, il n'y a aucuns autres isolats étudiés dans l'enquête qui montrent une pathogénicité envers celui-ci. Ainsi nous pouvons faire l'hypothèse que ces isolats sont spécifiques aux cultures de radis et n'attaquent pas ou peu les mâches et les laitues, et inversement pour les isolats de mâches et de laitues.

Nombre d'espèces cultivées actuellement sur les parcelles des isolats étudiés



*Figure 1 : Histogramme du nombre d'espèces cultivées par parcelles étudiées.
(Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)*

La diversité de cultures sensibles dans une rotation augmente le risque que l'isolat soit agressif sur plusieurs espèces (fig. 1). En effet, la parcelle de l'isolat 19-593 est la seule à être en monoculture de cardes depuis plusieurs années, ce qui pourrait expliquer le faible taux d'agressivité de cet isolat sur les 4 cultures étudiées. Il est important de préciser qu'il y a un autre isolat de cardes appelé « Carde 4 » très agressif sur toutes les espèces maraîchères étudiées (Annexe 1). Cet isolat n'est pas analysé dans l'enquête car l'exploitant n'a pas répondu à l'enquête. Néanmoins, les conseillers du CDDM savent que la « Carde 4 » provient d'une parcelle qui a été cultivée en maraichage depuis longtemps et qui accueille actuellement de nombreuses cultures très diversifiées vendues sur le marché : radis, choux, pomme de terre, navet... Ainsi la diversité de cultures sensibles sur une parcelle semble augmenter le risque de pathogénicité du rhizoctone sur les espèces maraîchères étudiées, il y a peut-être une sélection d'isolats plus polyphages par cette diversité.

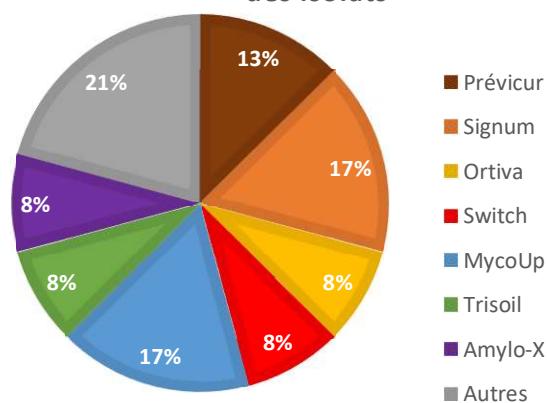
L'influence des techniques de désinfection du sol sur l'agressivité des isolats

La moitié des producteurs ont utilisé métam-sodium avant son interdiction. Finalement, les attaques de rhizoctone étaient problématiques des années avant l'arrêt de son application, surtout pour l'entreprise La Meule qui a subi de fortes pertes sur les mâches depuis environ 10 ans. Ainsi l'utilisation de métam-sodium ne semble pas avoir changé les agressivités des isolats. Actuellement, les maraîchers essaient de limiter la pression en désinfectant leur sol par des méthodes physiques comme le traitement vapeur, la solarisation ou la mise en place d'intercultures d'engrais verts. Les parcelles traitées à la vapeur sont celles des isolats de radis et le maraîcher de Primeurop a constaté une bonne efficacité de ce traitement sur le *Rhizoctonia solani* en hiver. Cette technique serait peut-être la cause de l'agressivité élevée de ces isolats sur radis. Pour valider cette hypothèse, il faudrait interroger d'autres exploitants dont les isolats proviennent de parcelles non traitées à la vapeur.

Pour les autres isolats, la solarisation (pratiquée seulement par Ducoin) ou l'installation de couverts ne semblent pas avoir d'influence sur leur agressivité. Néanmoins, le maraîcher des Nouelles (isolat 18-366) évalue le niveau d'attaques de rhizoctone comme faible et n'augmentant pas dans le temps grâce à ses engrais verts. En effet, la parcelle est en monoculture de mâches (2-3 cultures successives) qui est suivie de 5-6 mois d'engrais vert (surtout des Poacées : avoine et sorgo). Pourtant, l'isolat 18-366 présente une forte agressivité sur la mâche en laboratoire. Au final, deux des exploitants interrogés ne désinfectent plus leur sol, notamment la parcelle de l'isolat de laitues (19-594) qui n'a pas des taux d'agressivité plus élevés que les autres isolats. Ainsi les méthodes de désinfection des sols ne semblent pas expliquer les taux d'agressivité des isolats.

L'influence des fongicides chimiques et biologiques sur l'agressivité des isolats

Pourcentage des traitements utilisés dans les parcelles d'origines des isolats



Nombre de traitements sur les parcelles de chaque isolat

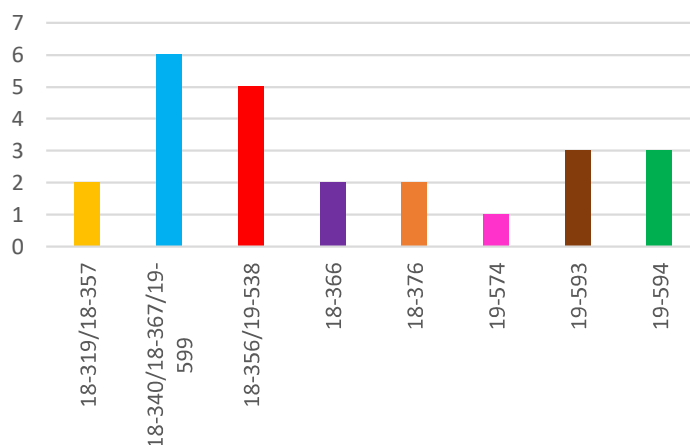


Figure 2 : Nombre et type de traitements utilisés sur les parcelles des 12 isolats étudiés. (Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 08/2020)

La majorité des maraîchers (75%) traitent avec des fongicides de synthèse : 13% avec du Prévicur, 17 % avec du Signum, 8 % avec du Switch et 8 % avec Ortiva (fig. 2). La plupart des producteurs utilisent aussi des biocontrôles (75%), généralement depuis 1 ou 2 ans. Ils n'ont pas observé d'effet sur le rhizoctone avec ces produits, sauf pour le Contans ayant apparemment une faible efficacité selon l'exploitant de Primeurop (isolats de radis 19-538 et 18-356) ; tandis que le maraîcher de La Meule a arrêté l'utilisation de biocontrôle (du Trisoil, du Prestop et du Rhapsody) par manque d'efficacité.

Cependant, une grande diversité de fongicides a été appliquée sur les parcelles des isolats de La Meule (18-340, 18-367 et 19-599) (fig. 2), qui sont les plus agressifs sur la majorité des cultures étudiées, notamment sur épinard où ils sont les plus agressifs (tab. 1). Nous supposons que l'application de nombreux fongicides différents sur la parcelle sélectionnerait des isolats plus agressifs et polyphages sur des cultures très sensibles comme la laitue et l'épinard. En effet, ce dernier est moins affecté par les isolats de mâches de Ducoin (18-319 et 18-357) qui n'utilise pas de produits de synthèse (fig. 2). Cependant, l'isolat de radis de Ducoin 19-574 touche l'épinard tandis que la parcelle subit moins de traitement. Il serait intéressant d'obtenir des réponses supplémentaires à l'enquête sur d'autres parcelles, notamment sur celles des isolats qui sont très agressifs sur les épinards comme à la Vincées, à Bouyer, à Maurat, à Layens et celles de l'isolat d'épinard 18-295 de Sodiprim (Annexe 1).

Il y a probablement d'autres facteurs pouvant influencer le taux d'agressivité d'un isolat de *Rhizoctonia solani* et qui expliqueraient la diversité de comportements de ces isolats. Nous aurions pu prendre connaissance de la topologie de la parcelle, du type de sol, de l'irrigation au sein des parcelles... Tout cela pourrait nous donner des indications sur l'humidité et la température présentes dans le sol ; c'est cette dernière que nous allons étudier par la suite.

Annexe III : Fiche de notations et de calculs des vitesses de croissance des isolats selon la température (ex : 19-538 et 19-599)

Souche	T°C	Répétition	N° Rayons	T-0	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	Vitesse (mm/h)	Vitesse Moyenne (mm/h)	
19-538	Temps (h)			0				48				48			
	5°C	1	1	4					5				7,5	0,04	0,04
			2	3,5					4,5				8	0,05	
		2	1	4,5					6,5				9	0,05	
			2	4					6				8	0,04	
		3	1	4,5					6				7,5	0,03	
			2	4					6				8	0,04	
	Temps (h)				0	16,5			24		24		24	mm/h	mm/h
	10°C	1	1			4,5			7,5		11,5		14	0,13	0,14
			2			5			8		12		13,5	0,12	
		2	1			5			8,5		13		15,5	0,15	
			2			5,5			8,5		12		14,5	0,13	
		3	1			4,5			8		12		15,5	0,15	
			2			4			8		12		16	0,17	
	Temps (h)				0	16,5			24		24		24	mm/h	mm/h
	15°C	1	1			5,5			10,5		17		22,5	0,24	0,24
			2			7			12		18,5		25	0,25	
		2	1			6			11		17		23	0,24	
			2			7			12		18		24,5	0,24	
		3	1			8			12,5		18,5		24,5	0,23	
			2			7,5			11		17,5		23,5	0,22	
	Temps (h)			0	7	17	7	17	7	17	7	17	mm/h	mm/h	
	20°C	1	1		3	7,5	10	15,5	18	24	27,5	35	0,37	0,4	
			2		3	7,5	9,5	15,5	17,5	19	27,5	34,5	0,41		
		2	1		3	9	12,5	17,5	20,5	26,5	30	37,5	0,41		
			2		3,5	9	11,5	16,5	20	27	30,5	37,5	0,4		
		3	1		3,5	8,5	11,5	17,5	20,5	27	31	37	0,4		
			2		3	9,5	13	18	20,5	27	31	38	0,41		
	Temps (h)			0	16,5	7,5	16,5	7,5	16,5	7,5	16,5	7,5	16,5	mm/h	mm/h
	25°C	1	1			9,5	11,5	17,5	20,5	27,5	31	38	0,39	0,4	
2					8,5	11	17	20	27,5	30	37,5	0,39			
2		1			8,5	11,5	17,5	21	28	31	38	0,41			
		2			9	11,5	17,5	21,5	28,5	31	38,5	0,41			
3		1			9,5	12	17	20	27	30	37,5	0,39			
		2			9,5	11,5	16,5	20	27,5	30,5	37,5	0,39			
Temps (h)			0	16,5		24	7,5	16,5		24		mm/h	mm/h		
30°C	1	1			2			2	3,5	4		4	0,06	0,06	
		2			2,5			2,5	3	4		5	0,04		
	2	1			2			3	4,5	4,5		5,5	0,07		
		2			2,5			3,5	4,5	5		5,5	0,06		
	3	1			2,5			3,5	4,5	4,5		6,5	0,06		
		2			2,5			3	3,5	5,5		5,5	0,05		
Temps (h)			0									mm/h	mm/h		
35°C	1	1			Non développé (mais vivant)							0	0		
		2			Non développé (mais vivant)							0			
	2	1			Mort							0			
		2			Mort							0			
	3	1			Non développé (mais vivant)							0			
		2			Non développé (mais vivant)							0			
												mm/h	mm/h		

Souche	T°C	Répétition	N° Rayons	T-0	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	Vitesse (mm/h)	Vitesse Moyenne (mm/h)	
19-599	Temps (h)			0				48				48			
	5°C	1	1	5,5				9				11	0,06	0,07	
			2	5				8,5				12	0,07		
		2	1	5				9				11,5	0,07		
			2	5				8,5				11,5	0,07		
		3	1	4,5				8				10,5	0,06		
			2	4,5				9				11	0,07		
	Temps (h)				0	16,5		24		24		24	mm/h	mm/h	
	10°C	1	1			4,5		7,5		10,5		13,5	0,12	0,12	
			2			4,5		7		10		13,5	0,12		
		2	1			4,5		7		10,5		13,5	0,12		
			2			5		7		10		14	0,12		
		3	1			5		7,5		11		13,5	0,12		
			2			5		7,5		10,5		14	0,12		
	Temps (h)				0	16,5		24		24		24	mm/h	mm/h	
	15°C	1	1			5,5		10		15		20,5	0,21	0,21	
			2			6		9,5		15		21	0,21		
		2	1			5,5		9		15,5		21	0,21		
			2			5,5		9		15		21	0,21		
		3	1			5		9,5		15		21	0,22		
			2			6		10		15,5		21,5	0,21		
	Temps (h)			0	7	17	7	17	7	17	7	17	mm/h	mm/h	
	20°C	1	1		3	7	8,5	12	14	18,5	21	26,5	0,27	0,29	
			2		3	7	9	13	14,5	19,5	21,5	27,5	0,27		
		2	1		2,5	7	8,5	13,5	15	20,5	23,5	29	0,29		
			2		2,5	7	8	12	14,5	20	23	28,5	0,30		
		3	1		3	6,5	7,5	11,5	14	20	22,5	28	0,28		
			2		3	7	9,5	12,5	15	20	23	28,5	0,31		
	Temps (h)			0	16,5	7,5	16,5	7,5	16,5	7,5	16,5	7,5	16,5	mm/h	mm/h
	25°C	1	1			5,5	7	10	11,5	16,5	16,5	22,5	0,21	0,2	
			2			5,5	7	10,5	11,5	15,5	15,5	21,5	0,19		
		2	1			5	6,5	10	11,5	15,5	15,5	21,5	0,20		
			2			5,5	7	10,5	12	16,5	16,5	22	0,20		
		3	1			6	7,5	10	11,5	16	16	21	0,19		
			2			5	7	10	11,5	15	15	18	0,17		
	Temps (h)			0									mm/h	mm/h	
	30°C	1	1			Non développé (mais vivant)							0	0	
			2			Non développé (mais vivant)							0		
		2	1			Non développé (mais vivant)							0		
			2			Non développé (mais vivant)							0		
		3	1			Non développé (mais vivant)							0		
			2			Non développé (mais vivant)							0		
Temps (h)			0									mm/h	mm/h		
35°C	1	1			Non développé (mais vivant)							0	0		
		2			Non développé (mais vivant)							0			
	2	1			Non développé (mais vivant)							0			
		2			Non développé (mais vivant)							0			
	3	1			Non développé (mais vivant)							0			
		2			Non développé (mais vivant)							0			
												mm/h	mm/h		

Annexe IV : Résultats des tests statistiques de l'essai préliminaire sur l'inoculation avec de la gélose broyée

Pour l'isolat 19-599 sur mâches

- Description des données (variable : nombre de plantes survivantes)

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M1	3	25.667	4.333	24.000	28.000
M13	3	27.667	4.333	26.000	30.000
M2	3	31.667	10.333	28.000	34.000
M3	3	26.000	129.000	13.000	34.000
M4	3	24.333	44.333	17.000	30.000
M5	3	27.667	6.333	25.000	30.000
M6	3	23.000	7.000	20.000	25.000

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	21	-13.000	-1.667	1.000	2.333	8.000	0.000
		Variance	Ecart type				
Résidus		20.567	4.535				

- Tests de normalité Shapiro-Wilk et d'homogénéité Bartlett

Normalité des résidus : tests de Kolmogorov-Smirnov, et de Shapiro-Wilk

	Statistique	p-valeur	
Kolmogorov-Smirnov	0.161	0.595	> 0,05 Normalité des résidus validée
Shapiro-Wilk	0.925	0.107	

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur	
Test de Bartlett	9.998	0.125	> 0,05 Homoscédasticité validée
Test de Levene	4.887	0.00684	

Pour le test de normalité Shapiro-Wilk, la p-valeur est bien supérieure à 0.05 donc l'hypothèse nulle $H_0 = \text{« la courbe de Freq est une courbe Gaussienne. Freq est normale »}$ est acceptée.

Pour le test d'homogénéité Bartlett, la p-valeur est bien supérieure à 0.05 donc l'hypothèse nulle $H_0 = \text{« Var}(e_{i,r}) = \sigma^2 \text{ pour individus } i \text{ »}$ est acceptée. L'hypothèse nulle peut être aussi formulée ainsi : $H_0 = \text{« La variance de l'écart } e_{i,r} \text{ ne dépend pas de l'échantillon de la population } i \text{ (individus indépendants), ni de la placette } r \text{ (la répétition) »}$.

Les deux conditions de normalité et d'homogénéité sont acceptées. Par conséquent, le test ANOVA est possible.

- Test de Fisher d'AV 1 (Analyse de variance à un facteur) : Tableau ANOVA

TABLE D'ANALYSE DE LA VARIANCE

	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Statistique F	p-valeur
Modalités	141.810	6	23.635	0.804	0.583
Résidus	411.333	14	29.381		

> 0.05 H_0 acceptée

L'hypothèse nulle est : $H_0 =$ « Les moyennes des modalités sont égales. Il n'y a pas d'effet significatif entre les modalités ».

La p-valeur est bien supérieure à 0.05 donc l'hypothèse H_0 est acceptée. Les moyennes des modalités sont toutes égales.

La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes mortes, les postulats ont aussi été validés et les moyennes des modalités sont aussi toutes égales.

Pour l'Isolat 19-599 sur laitues

- Description des données (variable : nombre de plantes survivantes)

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M1	3	6.667	114.333	0.000	19.000
M13	3	26.667	6.333	24.000	29.000
M2	3	16.333	121.333	5.000	27.000
M3	3	7.333	30.333	2.000	13.000
M4	3	5.333	6.333	3.000	8.000
M5	3	14.667	82.333	5.000	23.000
M6	3	17.333	105.333	6.000	26.000

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	21	-11.333	-5.333	0.333	2.667	12.333	0.000
		Variance	Ecart type				
Résidus		46.633	6.829				

- Tests de normalité Shapiro-Wilk et d'homogénéité Bartlett

Normalité des résidus : tests de Kolmogorov-Smirnov, et de Shapiro-Wilk

	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.110	0.937
Shapiro-Wilk	0.968	0.686

> 0,05 Normalité des résidus validée

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	6.188	0.402
Test de Levene	1.642	0.208

> 0,05 Homoscédasticité validée

Pour le test de normalité Shapiro-Wilk, la p-valeur est bien supérieure à 0.05 donc l'hypothèse nulle $H_0 =$ « la courbe de Freq est une courbe Gaussienne. Freq est normale » est acceptée.

Pour le test d'homogénéité Bartlett, la p-valeur est bien supérieure à 0.05 donc l'hypothèse nulle $H_0 =$ « $\text{Var}(e_{i,r}) = \sigma^2$ pour individus i » est acceptée. L'hypothèse nulle peut être aussi formulée ainsi : $H_0 =$ « La variance de l'écart $e_{i,r}$ ne dépend pas de l'échantillon de la population i (individus indépendants), ni de la placette r (la répétition) ».

Les deux conditions de normalité et d'homogénéité sont acceptées. Par conséquent, le test ANOVA est possible.

- **Test de Fisher d'AV 1 (Analyse de variance à un facteur) : Tableau ANOVA**

TABLE D'ANALYSE DE LA VARIANCE

	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Statistique F	p-valeur
Modalités	1046.571	6	174.429	2.618	0.0646
Résidus	932.667	14	66.619		

> 0.05 H0 acceptée

L'hypothèse nulle est : $H_0 =$ « Les moyennes des modalités sont égales. Il n'y a pas d'effet significatif entre les modalités ».

La p-valeur est supérieure à 0.05 donc l'hypothèse H_0 est acceptée. Les moyennes des modalités sont toutes égales.

La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes mortes, les postulats ont aussi été validés. Néanmoins, le tableau ANOVA indique que les moyennes des modalités ne sont pas toutes égales (p -valeur = 0.0264 < 0.05 donc H_0 est rejeté).

- **Test de comparaison 2 à 2 (test de Tukey)**

Tukey HSD (différence significative : 13.793)

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Groupe
M4	3	19.667	a
M1	3	14.000	a b
M5	3	12.333	a b
M3	3	11.000	a b
M6	3	10.667	a b
M2	3	6.667	a b
M13	3	3.000	b

→ Témoin

Toutes les moyennes sont en réalité proches, mais le test de Tukey montre que la modalité 4 (1 boîte d'inoculum vieux) aurait le plus de plantes mortes que les autres modalités. Et la modalité témoin aurait le moins de plantes mortes, elle serait moins touchée que les témoins mâches par la contamination extérieure.

Pour l'Isolat 19-538 sur radis

- **Description des données (variable : nombre de plantes survivantes)**

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M10	3	8.667	5.333	6.000	10.000
M11	3	5.333	8.333	2.000	7.000
M12	3	9.667	10.333	6.000	12.000
M14	3	18.333	14.333	14.000	21.000
M7	3	10.667	54.333	5.000	19.000
M8	3	0.000	0.000	0.000	0.000
M9	3	0.000	0.000	0.000	0.000

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	21	-5.667	-2.667	0.000	1.667	8.333	0.000
		Variance	Ecart type				
Résidus	9.267	3.044					

- **Tests de normalité Shapiro-Wilk et d'homogénéité Bartlett**

Normalité des résidus : tests de Kolmogorov-Smirnov, et de Shapiro-Wilk

Warning in ks.test(X, pnorm, mean(X), sd(X)) :

ties should not be present for the Kolmogorov-Smirnov test

	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.214	0.290
Shapiro-Wilk	0.915	0.0698

> 0,05 Normalité des résidus validée

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	236.239	3.57e-48
Test de Levene	5.938	0.00291

< 0,05 Homoscédasticité refusée

Pour le test de normalité Shapiro-Wilk, la p-valeur est supérieure à 0.05 donc l'hypothèse nulle $H_0 = \text{« la courbe de Freq est une courbe Gaussienne. Freq est normale »}$ est acceptée.

Pour le test d'homogénéité Bartlett, la p-valeur est bien inférieure à 0.05 donc l'hypothèse nulle $H_0 = \text{« Var}(e_{i,r}) = \sigma^2 \text{ pour individus } i \text{»}$ est refusée. L'hypothèse nulle peut être aussi formulée ainsi : $H_0 = \text{« La variance de l'écart } e_{i,r} \text{ ne dépend pas de l'échantillon de la population } i \text{ (individus indépendants), ni de la placette } r \text{ (la répétition) »}$.

Les deux conditions de normalité et d'homogénéité ne sont pas acceptées. Par conséquent, le test ANOVA n'est pas possible, nous ferons donc un test non paramétrique (test de Kruskal-Wallis).

- **Kruskal-Wallis (test non paramétrique)**

TESTS NON PARAMETRIQUES :

Comparaison des médianes : test de Kruskal-Wallis

	Statistique	p-valeur
Kruskal-Wallis	16.573	0.011

< 0.05 H_0 refusée

L'hypothèse nulle est $H_0 = \text{« les médianes des modalités sont égales. Il n'y a pas d'effet significatif entre les modalités »}$.

La p-valeur est inférieure à 0.05 donc H_0 est rejetée, les médianes ne sont pas toutes égales.

- **Test de comparaison des médianes**

Modalités COMPARAISONS MULTIPLES basées sur les rangs (alpha : 0.05)
(plus petite différence significative : 5.309)

facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe
M14	3	19.667	a
M12	3	14.167	b
M7	3	13.333	b
M10	3	12.833	b
M11	3	10.000	b
M8	3	3.500	c
M9	3	3.500	c

→ Témoin

Les médianes sont rassemblées sous 3 groupes distincts : le témoin aurait le nombre plus important de plantes survivantes ; les modalités d'inoculum vieux affecteraient autant de plantes que la modalité M7 (1 boîte d'inoculum jeune) ; les modalités 8 et 9 (2 et 4 boîtes d'inoculum jeune) seraient les plus agressives.

La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes mortes, les postulats ont été validés. Le tableau ANOVA indique que les moyennes des modalités ne sont pas toutes égales (p -valeur = 0.000458 < 0.05 donc H_0 est rejetée).

- **Test de comparaison 2 à 2 (test de Tukey)**

```
Tukey HSD (différence significative : 13.385 )
Modalités | Nombre | Moyenne | Groupe
| d'observations |
-----|-----|-----|-----
M12 | 3 | 21.333 | a
M11 | 3 | 20.000 | a
M10 | 3 | 18.667 | a
M14 | 3 | 13.000 | a b → Témoin
M7 | 3 | 13.000 | a b
M8 | 3 | 2.333 | b
M9 | 3 | 1.333 | b
```

Les moyennes sont rassemblées en 3 groupes dont 1 intermédiaire (a-b), mais le test de Tukey montre que les modalités d'inoculum vieux auraient le plus de plantes mortes que les autres modalités. Et la modalité témoin aurait le même nombre de plantes mortes que la modalité 7 (1 boîte d'inoculum jeune). Les autres modalités d'inoculum jeune (2 et 4 boîtes d'inoculum jeune) auraient le moins de plantes mortes (post-levée).

Pour l'Isolat 19-538 sur épinards

- **Description des données (variable : nombre de plantes survivantes)**

```
RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :
Modalités | Nombre | Moyenne | Variance | Minimum | Maximum
| d'observations |
-----|-----|-----|-----|-----|-----
M10 | 3 | 20.333 | 5.333 | 19.000 | 23.000
M11 | 3 | 21.000 | 13.000 | 18.000 | 25.000
M12 | 3 | 22.667 | 9.333 | 20.000 | 26.000
M14 | 3 | 18.333 | 4.333 | 16.000 | 20.000
M7 | 3 | 17.667 | 4.333 | 16.000 | 20.000
M8 | 3 | 10.667 | 9.333 | 8.000 | 14.000
M9 | 3 | 18.000 | 19.000 | 13.000 | 21.000
```

```
ETUDE DES RESIDUS :
| Nombre | Minimum | 1er | Mediane | 3e | Maximum | Moyenne | Variance | Ecart
| d'obs. | | quartile | quartile | quartile | | | | type
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----
Résidus | 21 | -5.000 | -1.667 | -0.667 | 2.333 | 4.000 | 0.000 | 6.467 | 2.543
```

- **Tests de normalité Shapiro-Wilk et d'homogénéité Bartlett**

```
Normalité des résidus : tests de Kolmogorov-Smirnov, et de Shapiro-Wilk
Warning in ks.test(X, pnorm, mean(X), sd(X)) :
ties should not be present for the Kolmogorov-Smirnov test
| Statistique | p-valeur
-----|-----|-----
Kolmogorov-Smirnov | 0.175 | 0.542 > 0,05 Normalité des résidus validée
Shapiro-Wilk | 0.945 | 0.274
```

```
Homoscédasticité des résidus
| Statistique | p-valeur
-----|-----|-----
Test de Bartlett | 1.647 | 0.949 > 0,05 Homoscédasticité validée
Test de Levene | 0.836 | 0.562
```

Pour le test de normalité Shapiro-Wilk, la p-valeur est bien supérieure à 0.05 donc l'hypothèse nulle $H_0 = \ll \text{la courbe de Freq est une courbe Gaussienne. Freq est normale} \gg$ est acceptée.

Pour le test d'homogénéité Bartlett, la p-valeur est bien supérieure à 0.05 donc l'hypothèse nulle $H_0 = \ll \text{Var}(e_{i,r}) = \sigma^2 \text{ pour individus } i \gg$ est acceptée. L'hypothèse nulle peut être aussi formulée ainsi : $H_0 = \ll \text{La variance de l'écart } e_{i,r} \text{ ne dépend pas de l'échantillon de la population } i \text{ (individus indépendants), ni de la placette } r \text{ (la répétition)} \gg$.

Les deux conditions de normalité et d'homogénéité sont acceptées. Par conséquent, le test ANOVA est possible.

- **Test de Fisher d'AV 1 (Analyse de variance à un facteur) : Tableau ANOVA**

TABLE D'ANALYSE DE LA VARIANCE

	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Statistique F	p-valeur
Modalités	267.619	6	44.603	4.828	0.00719 < 0.05 H0 refusée
Résidus	129.333	14	9.238		

L'hypothèse nulle est : $H_0 = \ll \text{Les moyennes des modalités sont égales. Il n'y a pas d'effet significatif entre les modalités} \gg$.

La p-valeur est inférieure à 0.05 donc l'hypothèse H_0 est refusée. Les moyennes des modalités ne sont pas toutes égales.

- **Test de comparaison 2 à 2 (test de Tukey)**

Tukey HSD (différence significative : 8.474)

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Groupe
M12	3	22.667	a
M11	3	21.000	a
M10	3	20.333	a
M14	3	18.333	a b → Témoin
M9	3	18.000	a b
M7	3	17.667	a b
M8	3	10.667	b

Les moyennes sont rassemblées en 3 groupes dont 1 intermédiaire (a-b), mais le test de Tukey montre que les modalités d'inoculum vieux auraient plus de plantes vivantes que les autres modalités. Et la modalité témoin aurait été touchée et aurait le même nombre de plantes survivantes que les modalités 7 et 9 (1 boîte et 4 boîtes d'inoculum jeune). La modalité 8 (2 boîtes d'inoculum jeune) aurait le moins de plantes survivantes.

La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes mortes, les postulats ont aussi été validés. Néanmoins, le tableau ANOVA indique la p-valeur (0.0489) est proche de 0.05 et le test de Tukey indique l'égalité des moyennes.

Annexe V : Techniques d'isolement et de détermination du pathogène au laboratoire

Des méthodes de détection et d'isolement ont été appliquées sur les souches de *R. solani*, prélevées dans des cultures maraîchères nantaises par les pathologistes du CDDM dans le laboratoire du CTIFL (communication personnelle de Sévrine Bosseur et Véronique Cerceau).

La méthode pasteurienne sur milieu gélosé

L'isolement des différents isolats de *Rhizoctonia solani* est réalisé par les pathologistes du CDDM, détachés au laboratoire du CTIFL de Carquefou. Afin de diagnostiquer le pathogène responsable des symptômes, les organes de plantes attaquées (feuilles ou racines de mâches, tubercule de radis...) sont analysés sur milieu nutritif gélosé par prélèvement, de préférence à la périphérie des lésions ou des parties peu attaquées. En effet, si les parties végétales sont trop nécrosées par la maladie, d'autres micro-organismes s'installent et peuvent rendre l'identification et l'isolement plus complexes.

Les parties végétales sélectionnées sont préalablement lavées, désinfectées au bain d'alcool à 96° dans le cas des racines, rincées à l'eau osmosée stérile et séchées sur du papier-filtre, puis découpées en morceaux de 1 à 2 mm. Ces derniers vont être placés sur un milieu généraliste composé de malt-agar ou à base de gélose de pomme de terre PDA (complétée d'un antibiotique contre les bactéries indésirables pour l'isolement).

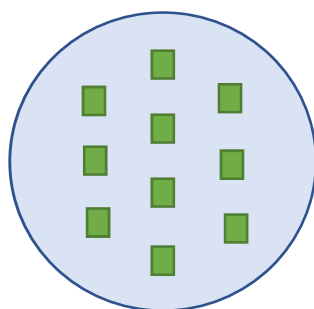


Figure 1 : Répartition des 10 fragments de plantes sur le milieu de la boîte de Pétri.
(Réalisée par Gwendoline Theuré, CDDM, 07/2020)

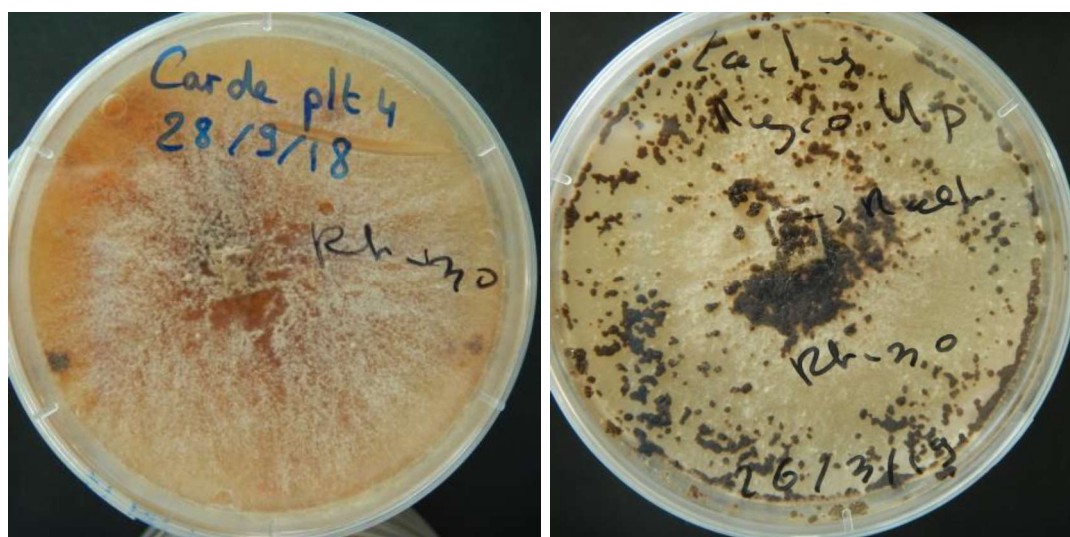
Le mélange gélosé de ces milieux est préalablement stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C. La chaleur humide et la haute pression de l'autoclave détruisent les pathogènes et d'autres micro-organismes. Après la stérilisation, les antibiotiques, comme le sulfate de streptomycine, sont ajoutés en surfusion (étant sensibles à la chaleur) pour limiter le développement de bactéries. Le milieu est ensuite réparti en boîtes de Petri sous hotte à flux laminaire et se gélifie en 20-30 minutes à température ambiante. Ces milieux généralistes permettent le développement d'un grand nombre de champignons y compris des saprophytes et de l'ensemble des parasites cryptogamiques contenus dans la plante.

Sur ces milieux, sont ensuite déposés 10 fragments de plantes (préalablement découpés) par boîte de Petri (fig. 1), dans des conditions stériles sous la hotte. Une foisensemencées, les boîtes sont placées dans une salle à 18°C (éclairée ou non). Le développement sur gélose est vérifié tous les jours par une observation visuelle, et complétée par une observation microscopique (Annexe VII). Sur un milieu de Malt-Agar, *Rhizoctonia solani* forme des colonies brunâtres et circulaires, puis des sclérotés de différents morphologie (fig. 2).



Type 1 : Sclérotés brun éparses

Type 2 : Sclérotés brun clair centrés



Type 3 : Mycélium très clair
(Peu de sclérotés)

Type 4 : Sclérotés brun foncé

Figure 2 : Photos de de *Rhizoctonia solani* de différents types de morphologies sur milieu Malt-Agar. Source : CERCEAU, Véronique et BOSSEUR, Sévrine, 2019. Travaux d'expérimentation en phytopathologie 2019. CTIFL. CDDM / ARELPAL / Ctifl.

Lorsque le pathogène se développe, il est repiqué, avant l'apparition et le développement de contaminants, sous la hotte sur un nouveau milieu gélosé. Cette étape peut être réalisée plusieurs fois jusqu'à la purification du pathogène. *Rhizoctonia solani* a une croissance rapide, ce qui facilite cette étape de purification. Les isolats risquent de perdre leur pouvoir pathogène et leur vigueur en vieillissant. Ainsi des tests de vérification de la pathogénicité sont essentiels. De plus, ils risquent de ne plus être représentatifs du pathogène qui continue à évoluer au champ, c'est pourquoi la récupération de nouveaux isolats de la même origine est réalisée tous les ans.

Annexe VI : Tableaux de calculs des Unités Formant Colonies (CFU) de chaque méthode d'inoculation

M-19-599		Vermiculite	Sec	Indices					Résultats arrondis (CFU/ml)	Résultats arrondis (CFU/g)	Inoculation (g)		
Dilution	N° boîtes	Résultats de comptage	Boîte retenue	n1	n2	d	C	Np			10	5	2,5
10 ⁻³	1	9	x	3	3	0,001	43	26060,6061	2,61E+04	2,61E+04	2,61E+05	1,30E+05	6,52E+04
10 ⁻³	2	12	x										
10 ⁻³	3	18	x										
10 ⁻⁴	1	0	x										
10 ⁻⁴	2	3	x										
10 ⁻⁴	3	1	x										
10 ⁻⁵	1	0											
10 ⁻⁵	2	2											
10 ⁻⁵	3	0											

M-19-599		Vermiculite	Humide	Indices					Résultats arrondis (CFU/ml)	Résultats arrondis (CFU/g)	Inoculation (g)		
Dilution	N° boîtes	Résultats de comptage	Boîte retenue	n1	n2	d	C	Np			10	5	2,5
10 ⁻³	1	17	x	3	3	0,001	38	23030,303	2,30E+04	2,30E+04	2,30E+05	1,15E+05	5,76E+04
10 ⁻³	2	11	x										
10 ⁻³	3	5	x										
10 ⁻⁴	1	0	x										
10 ⁻⁴	2	2	x										
10 ⁻⁴	3	3	x										
10 ⁻⁵	1	0											
10 ⁻⁵	2	1											
10 ⁻⁵	3	0											

M-19-599		Gélose	1/4 boîte	Filtrée + Diluée					Résultats arrondis (CFU/ml)	Taux de CFU filtrée	Inoculation (ml)	
Dilution	N° boîtes	Résultats de comptage	Boîte retenue	n1	n2	d	C	Np		165	Filtrée seule (165ml)	
10 ⁻¹	1	24	x	3	3	0,1	81	490,909091	4,91E+02	4,57E-01	8,10E+04	1,62E+05
10 ⁻¹	2	16	x									
10 ⁻¹	3	24	x									
10 ⁻²	1	7	x									
10 ⁻²	2	8	x									
10 ⁻²	3	2	x									

R-19-538		Gélose	1/4 boîte	Filtrée + Diluée					Résultats arrondis (CFU/ml)	Taux de CFU filtrée	Inoculation (ml)	
Dilution	N° boîtes	Résultats de comptage	Boîte retenue	n1	n2	d	C	Np		165	Filtrée seule (165ml)	
10 ⁻²	1	24	x	3	3	0,01	80	4848,484848	4,85E+03	1,05E+00	8,00E+05	1,60E+06
10 ⁻²	2	20	x									
10 ⁻²	3	30	x									
10 ⁻³	1	3	x									
10 ⁻³	2	3	x									
10 ⁻³	3	0	x									
10 ⁻⁴	1	1										
10 ⁻⁴	2	0										
10 ⁻⁴	3	0										

R-19-538		Gélose	1 boîte	Filtrée + Diluée					Résultats arrondis (CFU/ml)	Taux de CFU filtrée	Inoculation (ml)	
Dilution	N° boîtes	Résultats de comptage	Boîte retenue	n1	n2	d	C	Np			165	Filtrée seule (165ml)
10 ⁻²	1	83	x	3	2	0,01	251	15687,5	1,57E+04	8,47E-01	2,59E+06	5,18E+06
10 ⁻²	2	75	x									
10 ⁻²	3	71	x									
10 ⁻³	1	10	x									
10 ⁻³	2	-										
10 ⁻³	3	12	x									
10 ⁻⁴	1	0										
10 ⁻⁴	2	2										
10 ⁻⁴	3	1										
10 ⁻⁵	1	1										
10 ⁻⁵	2	0										
10 ⁻⁵	3	0										

R-19-538		Gélose	Broyée	Indices					Résultats arrondis (CFU/ml)	Résultats arrondis (CFU/g gélose)	Inoculation (g)	
Dilution	N° boîtes	Résultats de comptage	Boîte retenue	n1	n2	d	C	Np			9	4,5
10 ⁻⁴	1	13	x	3	3	1E-04	56	339393,9394	3,39E+05	6,79E+05	6,11E+06	3,05E+06
10 ⁻⁴	2	19	x									
10 ⁻⁴	3	22	x									
10 ⁻⁵	1	0	x									
10 ⁻⁵	2	1	x									
10 ⁻⁵	3	1	x									

R-19-538		Vermiculite	Humide	Dilution $2 \cdot 10^{-1}=0,2$ donc Résultat/2					Résultats arrondis (CFU/ml)	Résultats arrondis (CFU/g)	Inoculation (g)	
Dilution	N° boîtes	Résultats de comptage	Boite retenue	n1	n2	d	C	Np			10	5
10^{-3}	1	49	x	3	3	0,001	179	108484,8485	1,08E+05	5,42E+04	5,42E+05	2,71E+05
10^{-3}	2	60	x									
10^{-3}	3	56	x									
10^{-4}	1	5	x									
10^{-4}	2	3	x									
10^{-4}	3	6	x									
10^{-5}	1	0										
10^{-5}	2	0										
10^{-5}	3	1										

R-19-538		Vermiculite	Sec	Dilution $2 \cdot 10^{-1}=0,2$ donc Résultat/2					Résultats arrondis (CFU/ml)	Résultats arrondis (CFU/g)	Inoculation (g)	
Dilution	N° boîtes	Résultats de comptage	Boite retenue	n1	n2	d	C	Np			10	5
10^{-4}	1	11	x	3	3	1E-04	32	193939,3939	1,94E+05	9,70E+04	9,70E+05	4,85E+05
10^{-4}	2	3	x									
10^{-4}	3	12	x									
10^{-5}	1	2	x									
10^{-5}	2	3	x									
10^{-5}	3	1	x									
10^{-6}	1	1										
10^{-6}	2	0										
10^{-6}	3	1										

Annexe VII : Photos des plantes touchées par *Rhizoctonia solani* comparées aux symptômes physiologiques et à d'autres pathogènes présents dans les essais

1. Photos à différentes échelles des symptômes de *Rhizoctonia solani* comparés à l'étiollement (manque de lumière) et l'excès d'eau sur radis

Photos avant l'arrachage de caissettes touchée (1-) et non touchées (2- et 3-) :

(Gwendoline Theuré, CDDM, 1- et 2- 29/06/2020, 3- 03/07/2020)



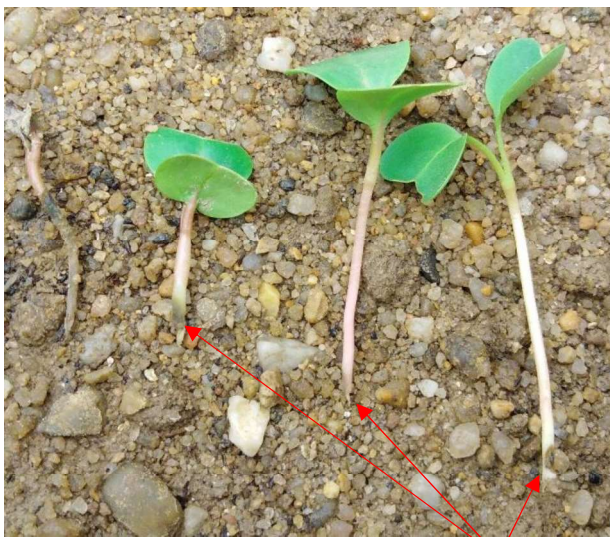
1- Rhizoctone

2- Etiollement (peu de lumière)

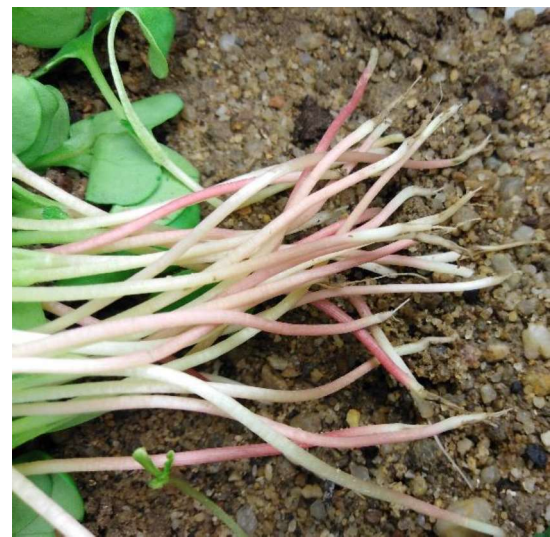
3- Excès d'eau

Photos après l'arrachage de caissettes touchées (1-) et non touchées (2-) :

(Gwendoline Theuré, CDDM, 1- 25/06/2020, 3- 29/06/2020)



1. Radis touchés par le rhizoctone



2. Radis étiolés par le manque de lumière

2. Photos des observations macroscopiques et microscopiques du *Rhizoctonia solani*, du *Thielaviopsis basicola* et du *Phytium sp.* sur la mâche

Photos macroscopiques du *Thielaviopsis b.* (1-) et du *Rhizoctonia s.* (2- et 3-) :

(Gwendoline Theuré, CDDM, 1- et 2- 05/06/2020, 3- 07/07/2020)



1- Nécrose noir-rougeâtre



2- Nécrose brun foncée



3- Pourrissement

Photos microscopiques du *Thielaviopsis b.* (1- et 2-) et du *Rhizoctonia s.* (3-) :

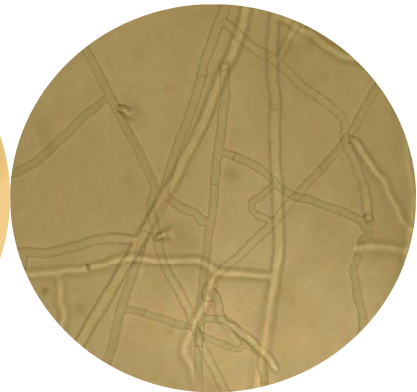
(Sévrine Bosseur, CTIFL, 21/07/2020)



1- Chlamydospores



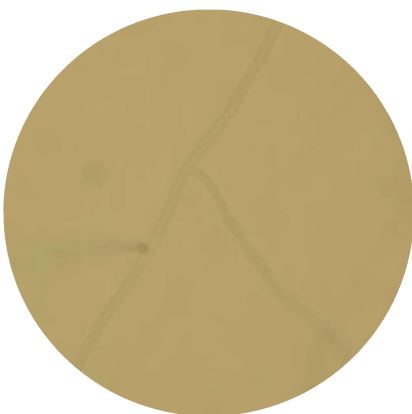
2- Endoconidies



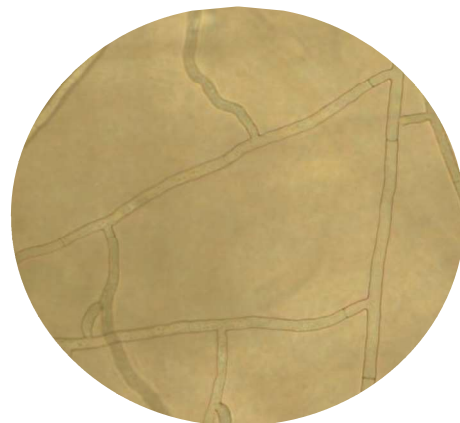
3- Hyphes cloisonnés en « T »

Photos microscopiques du *Phytium* (1-) et du *Rhizoctonia s.* (2-) :

(Sévrine Bosseur, CTIFL, 21/07/2020)



1- Hyphes non cloisonnés



2- Hyphes cloisonnés

Annexe VIII : Résultats des tests statistiques de l'essai sur l'inoculation avec de la vermiculite et de la gélose sous différentes préparations

Pour l'isolat 19-538 sur radis : Inoculation avec de la vermiculite

- **Description des données (variable : nombre de plantes survivantes)**
Humide Sèche

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M14V/M20G	3	60.667	0.333	60.000	61.000
M7V	3	0.333	0.333	0.000	1.000
M9V	3	11.667	234.333	0.000	29.000
M9V	3	14.667	185.333	4.000	30.000

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M10V	3	0.333	0.333	0.000	1.000
M11V	3	0.333	0.333	0.000	1.000
M12V	3	1.667	2.333	0.000	3.000
M14V/M20G	3	60.667	0.333	60.000	61.000

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	12	-11.667	-4.917	-0.333	0.417	17.333	0.000
		Variance	Ecart type				
Résidus	76.424	8.742					

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	12	-1.667	-0.333	0.000	0.417	1.333	0.000
		Variance	Ecart type				
Résidus	0.606	0.778					

- **Tests de normalité Shapiro-Wilk et d'homogénéité Bartlett**
Humide Sèche

Normalité des résidus : tests de Kolmogorov-Smirnov, et de Shapiro-Wilk

Warning in ks.test(X, pnorm, mean(X), sd(X)) : ties should not be present for the Kolmogorov-Smirnov test

	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.303	0.221
Shapiro-Wilk	0.860	0.0495

Warning in ks.test(X, pnorm, mean(X), sd(X)) : ties should not be present for the Kolmogorov-Smirnov test

	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.168	0.889
Shapiro-Wilk	0.944	0.545

> 0,05 Normalité des résidus validée

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	16.779	0.000785
Test de Levene	7.016	0.0125

< 0,05 Homoscédasticité refusée

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	2.846	0.416
Test de Levene	2.250	0.160

> 0,05 Homoscédasticité validée

- **Kruskal-Wallis (test non paramétrique)** **Test de Fisher d'AV 1**
Humide Sèche

TESTS NON PARAMETRIQUES :

Comparaison des médianes : test de Kruskal-Wallis

	Statistique	p-valeur
Kruskal-Wallis	8.586	0.0353

< 0.05 H0 refusée

TABLE D'ANALYSE DE LA VARIANCE

	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Statistique F	p-valeur
Modalités	8073.583	3	2691.194	3229.433	1.14e-14
Résidus	6.667	8	0.833		

L'hypothèse nulle est $H_0 =$ « les médianes/les moyennes des modalités sont égales. Il n'y a pas d'effet significatif entre les modalités ». La p-valeur est inférieure à 0.05 donc H_0 est rejetée, les médianes/les moyennes ne sont pas toutes égales.

- **Tests de comparaisons multiples**
Humide

Sèche

Modalités COMPARAISONS MULTIPLES basées sur les rangs (alpha : 0.05)
(plus petite différence significative : 3.696)

Tukey HSD (différence significative : 2.387)

facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe	Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Groupe
M14V/M20G	3	11.000	a	Témoin M14V/M20G	3	60.667	a
M9V	3	7.000	b	M12V	3	1.667	b
M8V	3	5.333	b c	M10V	3	0.333	b
M7V	3	2.667	c	M11V	3	0.333	b

Pour la vermiculite humide, les médianes sont rassemblées sous 3 groupes distincts : le témoin aurait le nombre le plus important de plantes survivantes ; les modalités auraient un effet dose : de M9 (2,5 g) la moins attaquée à M7 (10 g) qui serait la plus touchée. La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes mortes, les postulats n'ont pas été validés.

Néanmoins, le test de Kruskal-Wallis indique que les variances des modalités sont toutes différentes. Avec le tableau des comparaisons multiples, seul le témoin a eu le moins de morts comparé aux autres modalités ayant des moyennes égales. La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes levées, les postulats ont été validés. Le tableau ANOVA indique que les moyennes des modalités sont toutes égales au témoin.

Pour la vermiculite sèche, la moyenne du témoin aurait le nombre le plus important de plantes survivantes tandis que les autres modalités ont une moyenne plus faible et sont dans le même groupe statistique (b). La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes levée et le nombre de morts, les postulats n'ont pas été validés. Néanmoins, les tests de Kruskal-Wallis indiquent que les variances des modalités sont toutes différentes.

Nombre de plantes levées

Nombre de plantes mortes

Modalités COMPARAISONS MULTIPLES basées sur les rangs (alpha : 0.05)
(plus petite différence significative : 3.646)

(plus petite différence significative : 3.726)

facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe	facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe
M14V/M20G	3	11.000	a	M12V	3	10.000	a
M12V	3	7.167	b	M11V	3	8.333	a b
M11V	3	5.167	b c	M10V	3	5.667	b c
M10V	3	2.667	c	M14V/M20G	3	2.000	c

La modalité témoin est celle qui a le plus de levées et le moins de morts. Pour les autres modalités, un effet dose est remarquable : plus il y a de vermiculite, plus il y a de plantes levées et plus il y a de morts (nécrosés). Ceci explique l'égalité finale des modalités pour le nombre de plantes saines.

Pour l'Isolat 19-538 sur radis : Inoculation avec de la gélose broyée

- **Description des données (variable : nombre de plantes survivantes)**

```
RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :
```

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M10G	3	1.333	2.333	0.000	3.000
M13G	3	28.667	52.333	24.000	37.000
M14V/M20G	3	60.667	0.333	60.000	61.000
M16G	3	32.333	345.333	11.000	45.000

```
ETUDE DES RESIDUS :
```

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	12	-21.333	-1.917	0.000	3.333	12.667	0.000

	Variance	Ecart type
Résidus	72.788	8.532

- **Tests de normalité Shapiro-Wilk et d'homogénéité Bartlett**

Normalité des résidus : tests de Kolmogorov-Smirnov, et de Shapiro-Wilk

```
Warning in ks.test(X, pnorm, mean(X), sd(X)) :
ties should not be present for the Kolmogorov-Smirnov test
```

	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.209	0.672
Shapiro-Wilk	0.874	0.0731

> 0,05 Normalité des résidus validée

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	14.687	0.0021
Test de Levene	9.966	0.00445

< 0,05 Homoscédasticité refusée

- **Test de Kruskal-Wallis (test non paramétrique)**

Comparaison des médianes : test de Kruskal-Wallis

	Statistique	p-valeur
Kruskal-Wallis	9.495	0.0234

< 0.05 H0 refusée

L'hypothèse nulle est : H0 = « Les médianes des modalités sont égales. Il n'y a pas d'effet significatif entre les modalités ». La p-valeur est inférieure à 0.05 donc l'hypothèse H0 est refusée. Les médianes des modalités ne sont pas toutes égales.

- **Test de comparaisons multiples**

Modalités COMPARAISONS MULTIPLES basées sur les rangs (alpha : 0.05)
(plus petite différence significative : 2.94)

facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe
M14V/M20G	3	11.000	a
M16G	3	7.000	b
M13G	3	6.000	b
M10G	3	2.000	c

→ Témoin

La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes levées et le nombre de morts, les postulats n'ont pas été validés. Néanmoins, les tests de Kruskal-Wallis indiquent que les variances des modalités sont toutes différentes.

Nombre de plantes levées

Nombre de plantes mortes

Modalités COMPARAISONS MULTIPLES basées sur les rangs (alpha : 0.05)
(plus petite différence significative : 3.736 (plus petite différence significative : 3.48)

facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe	facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe
M14V/M20G	3	10.833	a	M10G	3	10.667	a
M16G	3	6.500	b	M13G	3	7.000	b
M13G	3	6.333	b	M16G	3	6.333	b
M10G	3	2.333	c	M14V/M20G	3	2.000	c

Les médianes sont rassemblées en 3 groupes, les tests de comparaisons multiples montrent que le témoin aurait le plus de plantes vivantes/levées et le moins de morts. Et les modalités M16 (2,25 g) et M13 (5 g) auraient le même nombre de plantes survivantes/levées et de morts. La modalité 10 (10 g) auraient le moins de plantes survivantes/levées et le plus de morts.

Pour l'Isolat 19-538 sur radis : Inoculation avec de la gélose filtrée et la gélose filtrée et diluée

- **Description des données (variable : nombre de plantes survivantes)**

Gélose Filtrée

Gélose Filtrée et Diluée

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M16G	3	32.000	133.000	21.000	44.000
M14G	3	43.000	403.000	20.000	57.000
M14V/M20G	3	60.667	0.333	60.000	61.000
M17G	3	53.000	3.000	51.000	54.000

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M12G	3	42.333	114.333	33.000	54.000
M14V/M20G	3	60.667	0.333	60.000	61.000
M15G	3	55.000	37.000	48.000	59.000
M18G	3	56.333	21.333	51.000	59.000

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	12	-23.000	-1.250	0.333	3.000	14.000	0.000

Variance : 98.061 | Ecart type : 9.903

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	12	-9.333	-3.083	0.333	2.750	11.667	0.000

Variance : 31.455 | Ecart type : 5.608

- **Tests de normalité Shapiro-Wilk et d'homogénéité Bartlett**

Gélose Filtrée

Gélose Filtrée et Diluée

Normalité des résidus : tests de Kolmogorov-Smirnov, et de Shapiro-Wilk

Warning in ks.test(X, pnorm, mean(X), sd(X)) : ties should not be present for the Kolmogorov-Smirnov test

	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.253	0.425
Shapiro-Wilk	0.888	0.112

Warning in ks.test(X, pnorm, mean(X), sd(X)) : ties should not be present for the Kolmogorov-Smirnov test

	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.155	0.937
Shapiro-Wilk	0.959	0.763

> 0,05 Normalité des résidus validée

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	14.444	0.00236
Test de Levene	6.542	0.0152

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	7.872	0.0487
Test de Levene	3.627	0.0644

< 0,05 Homoscédasticité refusée

≈ 0,05 Homoscédasticité validée

- **Kruskal-Wallis (test non paramétrique)**

Test de Fisher d'AV 1

Gélose Filtrée

Gélose Filtrée et Diluée

TESTS NON PARAMETRIQUES :

TABLE D'ANALYSE DE LA VARIANCE

Comparaison des médianes : test de Kruskal-Wallis		
	Statistique	p-valeur
Kruskal-Wallis	7.876	0.0487

	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Statistique F	p-valeur
Modalités	558.917	3	186.306	4.308	0.0438
Résidus	346.000	8	43.250		

< 0.05 H0 refusée

L'hypothèse nulle est H0 = « les médianes/les moyennes des modalités sont égales. Il n'y a pas d'effet significatif entre les modalités ». La p-valeur est inférieure à 0.05 donc H0 est rejetée, les médianes/les moyennes ne sont pas toutes égales.

- Tests de comparaisons multiples

Gélose Filtrée

Gélose Filtrée et Diluée

Modalités COMPARAISONS MULTIPLES basées sur les rangs (alpha : 0.05)
(plus petite différence significative : 4.228)

facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe
M14V/M20G	3	11.000	a
M17G	3	6.667	b
M14G	3	5.333	b
M11G	3	3.000	b

Tukey HSD (différence significative : 17.196)

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Groupe
M14V/M20G	3	60.667	a
M18G	3	56.333	a b
M15G	3	55.000	a b
M12G	3	42.333	b

Pour la gélose filtrée, la médiane du témoin aurait le nombre plus important de plantes survivantes tandis que les autres modalités ont une pression d'attaque identique. La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes mortes, les postulats n'ont pas été validés. Néanmoins, le test de Kruskal-Wallis indique que les variances des modalités sont toutes différentes. Avec le tableau des comparaisons multiples, seul le témoin a eu le moins des morts comparé aux autres modalités ayant des médianes égales. La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes levées, les postulats ont été validés. Le tableau ANOVA indique que les moyennes des modalités sont toutes égales au témoin.

Pour la gélose filtrée et diluée, les moyennes montrent un effet dose : plus il y a de gélose broyée avant la préparation, moins il y a de plantes survivantes. Nous pouvons noter que la modalité 12 (9 g) est donc la plus attaquée, elle est dans un groupe distinct à celui du témoin (le moins attaqué). La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes levées et le nombre de morts, les postulats n'ont pas été validés. Néanmoins, les tests de Kruskal-Wallis indiquent que les variances des modalités sont toutes différentes.

Nombre de plantes levées

Nombre de plantes mortes

Modalités COMPARAISONS MULTIPLES basées sur les rangs (alpha : 0.05)
(plus petite différence significative : 3.48)

facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe
M14V/M20G	3	10.167	a
M12G	3	7.500	a b
M15G	3	5.833	b c
M18G	3	2.500	c

(plus petite différence significative : 4.707)

facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe
M12G	3	10.333	a
M15G	3	6.833	a b
M18G	3	5.333	b
M14V/M20G	3	3.500	b

La modalité témoin est celle qui a le plus de levées et le moins de morts. Pour les autres modalités, un effet dose est remarquable : plus il y a de gélose, plus il y a de plantes levées et plus il y a de morts (nécrosés). Ceci explique l'égalité finale entre certaines modalités (M15 et M18) pour la moyenne de plantes saines.

Pour l'Isolat 19-599 sur mâches : Inoculation avec de la vermiculite

- **Description des données (variable : nombre de plantes survivantes)**
Humide **Sèche**

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M13V/M19G	3	75.667	9.333	73.000	79.000
M1V	3	40.667	140.333	27.000	48.000
M2V	3	66.667	56.333	59.000	74.000
M3V	3	79.333	5.333	78.000	82.000

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M13V/M19G	3	75.667	9.333	73.000	79.000
M4V	3	44.667	24.333	39.000	48.000
M5V	3	39.000	247.000	21.000	50.000
M6V	3	71.000	124.000	61.000	83.000

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	12	-13.667	-1.667	-0.167	4.083	7.333	0.000
		Variance	Ecart type				
Résidus		38.424	6.199				

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	12	-18.000	-3.417	0.833	4.250	12.000	0.000
		Variance	Ecart type				
Résidus		73.576	8.578				

- **Tests de normalité Shapiro-Wilk et d'homogénéité Bartlett**
Humide **Sèche**

Normalité des résidus : tests de Kolmogorov-Smirnov, et de Shapiro-Wilk

Warning in ks.test(X, pnorm, mean(X), sd(X)) :

ties should not be present for the Kolmogorov-Smirnov test

	Statistique	p-valeur	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.167	0.892	0.128	0.975
Shapiro-Wilk	0.922	0.300	0.963	0.823

> 0,05 Normalité des résidus validée

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	4.942	0.176	4.489	0.213
Test de Levene	3.858	0.0563	3.647	0.0637

> 0,05 Homoscédasticité validée

> 0,05 Homoscédasticité validée

- **Test de Fisher d'AV 1 (Analyse de variance à un facteur) : Tableau ANOVA**
Humide **Sèche**

TABLE D'ANALYSE DE LA VARIANCE

	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Statistique F	p-valeur
Modalités	2738.250	3	912.750	17.276	0.000743
Résidus	422.667	8	52.833		

< 0.05 H0 refusée

TABLE D'ANALYSE DE LA VARIANCE

	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Statistique F	p-valeur
Modalités	3057.583	3	1019.194	10.074	0.00431
Résidus	809.333	8	101.167		

< 0.05 H0 refusée

L'hypothèse nulle est H0 = « les moyennes des modalités sont égales. Il n'y a pas d'effet significatif entre les modalités ». La p-valeur est inférieure à 0.05 donc H0 est rejetée, les moyennes ne sont pas toutes égales.

- **Tests de comparaisons multiples (Tests de Tukey)**
Humide **Sèche**

Tukey HSD (différence significative : 19.005)

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Groupe
M3V	3	79.333	a
M13V/M19G	3	75.667	a
M2V	3	66.667	a
M1V	3	40.667	b

Tukey HSD (différence significative : 26.299)

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Groupe
M13V/M19G	3	75.667	a
M6V	3	71.000	a
M4V	3	44.667	b
M5V	3	39.000	b

Pour la vermiculite humide, la modalité M1 (10 g) aurait le nombre le moins important de plantes survivantes tandis que les autres modalités ont une moyenne plus élevée et sont dans le même groupe statistique que le témoin (a). La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes levées, les postulats ont été validés. Le tableau ANOVA indique que les moyennes des modalités sont différentes. La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes mortes, les postulats n'ont pas été validés. Néanmoins, les tests de Kruskal-Wallis indiquent que les variances des modalités sont toutes différentes.

Nombre de plantes levées

Tukey HSD (différence significative : 14.906)				Modalités				COMPARAISONS MULTIPLES basées sur les rangs (plus petite différence significative : 2.157)			
Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Groupe	facteur	Nombre d'observations	Moyenne des rangs	Groupe				
M3V	3	82.000	a	M1V	3	11.000	a				
M2V	3	78.333	a b	M2V	3	8.000	b				
M13V/M19G	3	75.667	a b	M3V	3	4.500	c				
M1V	3	66.333	b	M13V/M19G	3	2.500	c				

Pour les plantes levées, les tests de comparaisons multiples montrent que la modalité M3 (2.5 g de vermiculite) aurait le plus de plantes levées/saines et le moins de morts (autant que le témoin du groupe (c)) que les autres modalités. Et la modalité M1 aurait le moins de plantes levées/saines et le plus de morts (suivie de M2). Les témoins mâches ont été touchés par le *Phytium*, ce qui explique qu'ils se situent au milieu pour le nombre de plants levés (a b).

Pour la vermiculite sèche, les moyennes sont rassemblées en 2 groupes, les tests de comparaisons multiples montrent que le témoin et M6 (2,5 g) auraient le plus de plantes vivantes (a), tandis que M5 (5 g) et M4 (10 g) auraient la même moyenne de survivants inférieure au témoin (b). La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes levées, les postulats ont été validés. Le tableau ANOVA indique que les moyennes des modalités sont différentes. La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes mortes, les postulats n'ont pas été validés. Néanmoins, le test de Kruskal-Wallis indique que les variances des modalités sont toutes égales.

Nombre de plantes levées

Tukey HSD (différence significative : 10.701)			
Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Groupe
M6V	3	82.000	a
M13V/M19G	3	75.667	a
M4V	3	63.667	b
M5V	3	56.333	b

La modalité témoin et la modalité M6 (2,5 g) auraient le plus de levées (a), contrairement aux modalités M5 (5 g) et M4 (10 g).

Pour l'Isolat 19-599 sur mâches : Inoculation avec de la gélose broyée

- **Description des données (variable : nombre de plantes survivantes)**

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M13V/M19G	3	75.667	9.333	73.000	79.000
M1G	3	87.000	28.000	81.000	91.000
M4G	3	62.667	94.333	52.000	71.000
M7G	3	74.667	14.333	72.000	79.000

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	12	-10.667	-2.667	0.667	3.500	8.333	0.000
		Variance	Ecart type				
Résidus		26.545	5.152				

- **Tests de normalité Shapiro-Wilk et d'homogénéité Bartlett**

Normalité des résidus : tests de Kolmogorov-Smirnov, et de Shapiro-Wilk

	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.151	0.910
Shapiro-Wilk	0.967	0.879

> 0,05 Normalité des résidus validée

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	2.671	0.445
Test de Levene	2.145	0.173

> 0,05 Homoscédasticité validée

- **Test de Fisher d'AV 1 (Analyse de variance à un facteur) : Tableau ANOVA**

	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Statistique F	p-valeur
Modalités	890.000	3	296.667	8.128	0.00821
Résidus	292.000	8	36.500		

< 0.05 H0 refusée

L'hypothèse nulle est : H0 = « Les moyennes des modalités sont égales. Il n'y a pas d'effet significatif entre les modalités ». La p-valeur est inférieure à 0.05 donc l'hypothèse H0 est refusée. Les moyennes des modalités ne sont pas toutes égales.

La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes levées, les postulats ont été validés. Le tableau ANOVA indique que les moyennes des modalités sont différentes. Pour le nombre de plantes mortes, les postulats n'ont pas été validés. Néanmoins, le test de Kruskal-Wallis indique que les variances des modalités sont toutes égales.

- **Test de comparaisons multiples (Test de Tukey)**

Nombre de plantes survivantes

Nombre de plantes levées

Tukey HSD (différence significative : 15.797)				Tukey HSD (différence significative : 15.869)			
Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Groupe	Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Groupe
M1G	3	87.000	a	M1G	3	87.667	a
M13V/M19G	3	75.667	a b	M13V/M19G	3	75.667	a b
M7G	3	74.667	a b	M7G	3	75.333	a b
M4G	3	62.667	b	M4G	3	63.667	b

Les moyennes du nombre de plantes survivantes et du nombre de plantes levées sont similaires, il n'y a pas eu beaucoup de mortalité dans ces modalités. Les moyennes sont rassemblées en 3 groupes (a, a b et b), les tests de Tukey montrent que la modalité M1 (9 g de géloses) aurait le plus de plantes levées/saines que les autres modalités. Et la modalité M4 (1/2 dose de gélose broyée) auraient le moins de plantes levées/saines, elles sont peut-être plus touchées par la contamination extérieure (*Phytium*) comme les témoins mâches.

Pour l'Isolat 19-599 sur mâche : Inoculation avec de la gélose filtrée et la gélose filtrée et diluée

- **Description des données (variable : nombre de plantes survivantes)**

Gélose Filtrée

Gélose Filtrée et Diluée

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M13V/M19G	3	75.667	9.333	73.000	79.000
M2G	3	81.333	9.333	78.000	84.000
M5G	3	65.667	129.333	53.000	75.000
M8G	3	77.000	144.000	65.000	89.000

RESUME DES DONNEES, selon le facteur Modalités :

Modalités	Nombre d'observations	Moyenne	Variance	Minimum	Maximum
M13V/M19G	3	75.667	9.333	73.000	79.000
M3G	3	83.000	16.000	79.000	87.000
M6G	3	79.333	8.333	76.000	81.000
M9G	3	72.000	79.000	65.000	82.000

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	12	-12.667	-2.833	0.333	3.333	12.000	0.000
		Variance	Ecart type				
Résidus	53.091	7.286					

ETUDE DES RESIDUS :

	Nombre d'obs.	Minimum	1er quartile	Mediane	3e quartile	Maximum	Moyenne
Résidus	12	-7.000	-3.083	-0.333	2.083	10.000	0.000
		Variance	Ecart type				
Résidus	20.485	4.526					

- **Tests de normalité Shapiro-Wilk et d'homogénéité Bartlett**

Gélose Filtrée

Gélose Filtrée et Diluée

Normalité des résidus : tests de Kolmogorov-Smirnov, et de Shapiro-Wilk

	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.157	0.885
Shapiro-Wilk	0.941	0.512

Warning in ks.test(X, pnorm, mean(X), sd(X)) : ties should not be present for the Kolmogorov-Smirnov test

	Statistique	p-valeur
Kolmogorov-Smirnov	0.139	0.975
Shapiro-Wilk	0.958	0.755

Homoscédasticité des résidus

> 0,05 Normalité des résidus validée

Homoscédasticité des résidus

	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	4.738	0.192
Test de Levene	1.945	0.201

	Statistique	p-valeur
Test de Bartlett	3.073	0.380
Test de Levene	2.724	0.114

> 0,05 Homoscédasticité validée

- **Test de Fisher d'AV 1(Analyse de variance à un facteur) : Tableau ANOVA**

Gélose Filtrée



Gélose Filtrée et Diluée

	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Statistique F	p-valeur	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Statistique F	p-valeur
Modalités	394.917	3	131.639	1.803	0.224	201.667	3	67.222	2.387	0.145
Résidus	584.000	8	73.000			225.333	8	28.167		

> 0.05 H0 acceptée

L'hypothèse nulle est H0 = « Les moyennes des modalités sont égales. Il n'y a pas d'effet significatif entre les modalités ». La p-valeur est supérieure à 0.05 donc H0 est acceptée, les moyennes sont toutes égales.

La même démarche fut réalisée pour le nombre de plantes levées et nous obtenons le même résultat : les moyennes des modalités sont toutes égales au témoin que ce soit pour la gélose filtrée comme la gélose filtrée et diluée. Pour le nombre de plantes mortes, les postulats n'ont pas été validés. Néanmoins, le test de Kruskal-Wallis indique que les variances des modalités sont égales. Ainsi il y a eu trop peu de pertes par ces méthodes de préparation.

 agriculture • alimentation • environnement 	Diplôme : Diplôme d'ingénieur de l'institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires Horticoles et du Paysage Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : Protection des plantes et environnement appliquée à l'horticulture (PPEH) Enseignant référent : Mathilde Briard
Auteur(s) : Gwendoline Theuré Date de naissance* : 21/11/1996	Organisme d'accueil : CDDM Adresse : La Métairie Neuve
Nb pages : 57 Annexe(s) : 8	44860 Pont Saint Martin
Année de soutenance : 2020	Maître de stage : Sylvain Gérard
Titre français : Problème de Rhizoctone brun sur les principales cultures du maraîchage nantais (mâche, laitue, épinard et radis) : Caractérisation d'isolats de <i>Rhizoctonia solani</i> et recherche d'une méthode d'inoculation homogène et reproductible.	
Titre anglais : Rhizoctonia root rot on the main Nantes market gardening crops (lamb's lettuce, lettuce, spinach and radish): Characterization of <i>Rhizoctonia solani</i> isolates and search for a homogeneous and reproducible inoculation method.	
Résumé : Le <i>Rhizoctonia solani</i> est un pathogène tellurique très dommageable sur de nombreuses cultures maraîchères nantaises. Il était facilement contrôlé par des produits phytosanitaires de synthèses qui sont interdits aujourd'hui. Les souches de ce pathogène sont devenues très agressives et difficiles à anticiper par leur grande diversité génétique. Dans le but de trouver des moyens de protection biologique efficaces (produits de biocontrôle ou extraits végétaux), il est nécessaire d'obtenir des résultats homogènes et reproductibles de pression de la maladie. Pour ce faire, différentes techniques d'inoculation sont testées afin de déterminer celles qui sont adaptées à chaque isolat étudié. Dans cette étude, trois expérimentations ont été réalisées, dont une sur les températures optimales de croissance et deux sur les méthodes d'inoculation, pour améliorer les connaissances sur les différents isolats de <i>Rhizoctonia solani</i> . La technique d'inoculation via la gélose sous différentes préparations est concluante sur les deux isolats étudiés sur la mâche, la laitue, l'épinard et le radis. Cette méthode doit être testée sur la diversité de souches de rhizoctone dans le maraîchage nantais afin d'identifier la solution biologique efficace à chaque isolat.	
Abstract: <i>Rhizoctonia solani</i> is a soil-borne pathogen that is very damaging to many market garden crops in Nantes. It was easily controlled by synthetic phytosanitary products which are banned today. The strains of this pathogen have become very aggressive and difficult to anticipate due to their great genetic diversity. In order to find effective biological control methods (biocontrol products or plant extracts), it is necessary to obtain homogeneous and reproducible disease pressure results. To achieve that, each isolate studied must be tested with a variety of inoculation techniques. In this study, three experiments were carried out, one on optimal growth temperatures and two on inoculation methods, to improve the knowledge on the different isolates of <i>Rhizoctonia solani</i> . The agar inoculation method in different forms is successful on the two isolates studied on lamb's lettuce, lettuce, spinach and radish. This method must be tested on the diversity of rhizoctonia strains in Nantes market gardening, in order to identify the effective biological solution for each isolate.	
Mots-clés : Rhizoctone, <i>Rhizoctonia solani</i> , Inoculation, Mâches, Radis, Epinards, Laitues Key Words: Rhizoctonia, <i>Rhizoctonia solani</i> , Inoculation, Lamb lettuce, Radish, Spinach, Lettuce	

