



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

**Effet de la température et de l'activité de l'eau sur
la croissance mycélienne de *Phythopythium vexans***

Présenté par :

LBOUKHRISSI CHAYMAE

Encadré par :

- Pr. LAHLALI Rachid (ENA-MEKNES)
- Pr. AMRANI JOUTEI Khalid (FST -Fès)

Membres de jury :

- Pr. AL FIGUIGUI Jamila (FST -Fès)
- Pr. LAHLALI Rachid (ENA-MEKNES)
- Pr. AMRANI JOUTEI Khalid (FST -Fès)

Soutenu le : 12 / 06 / 2019

Année universitaire :

2018 /2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وما اوتيتم من العلم الا قليلا

صدق الله العلي العظيم

Remerciements

La réalisation de ce document a été possible grâce à l'action conjuguée d'un certain nombre de personnes. Qu'elles trouvent à travers ces pages l'expression de ma reconnaissance.

Dans un premier lieu, j'exprime ma profonde gratitude à **DIEU**, pour m'avoir permis de réaliser ce travail et pour m'avoir guidée tout au long de mon trajet.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et gratitudes les plus cordiales aux encadrants : **Mr LAHLALI Rachid** et **Mr AMRANI JOUTEI Khalid** pour leurs conseils, leurs informations et leurs encadrements afin de réussir ce travail.

Je tiens à remercier également **Mme AL FIGUIGUI Jamila**, d'avoir accepté de lire et de juger ce travail, qu'elle trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Je tiens à remercier **Mlle JABIRI Salma**, Doctorante au Laboratoire de Phytopathologie de l'ENA-Meknès, qui effectue sa thèse de Doctorat sur la même thématique en question, pour ses efforts fournis et pour ses riches informations qui m'ont été très utiles.

Sans oublier de remercier les deux Doctorants de Laboratoire de Phytopathologie de L'ENA-Meknès, **EZRARI Saïd** et **RADOUANE Nabil**, qui étaient toujours présents pour répondre à mes questions et élucider mes interrogations.

Et j'en viens à ma famille, à ma mère et mon père, à ceux qui sont toujours présents et continuent à l'être, pour faire mon bonheur. Merci pour s'être sacrifiés pour que vos enfants grandissent et prospèrent. Merci aussi à mes frères et sœurs, d'être toujours à mes côtés pour donner du goût et du sens à notre vie de famille.

Dédicaces

Je dédie ce travail

À

*Ma très chère honorable mère, qui représente pour moi le
Symbole de la bonté par excellence, je te dédie ce travail en
Témoignage de mon profond amour, puisse Dieu le tout puissant, te
Préserver et t'accorder santé.*

À

*Mon très cher père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,
L'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi.
Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon
Education et mon bien être.*

Je souhaite de tout mon cœur que Dieu les garde près de moi

À

Mes frères et sœurs, je leur souhaite tout le succès... Tout le bonheur.

À

*Mes amis Hanae, Soundous, Ikram, Assia, Meryem, Omar, Mammon,
Ayoub, Yassine, Anas... pour une sincérité si merveilleuse, en leur
souhaitant tout le succès... Tout le bonheur.*

LBOUKHRISSI Chaymae
LBOUKHRISSI Chaymae

Aimablement

Liste des abréviations :

PIB : Produit Intérieur Brut

FAO: Food and Agriculture Organization

Aw: Water Activity

CMA: Corn Meal Agar

HER : Humidité Relative d'Equilibre

HR : Humidité Relative

PDA: Potato Dextrose Agar

PCNB: PentaChloroNitrobenzène

Mm : Millimètre

Liste des figures :

Figure 1 : Reproduction sexuée et asexuée chez les oomycètes.

Figure 2 : Exemple d'isotherme de sorption d'un aliment

Figure 3 : Croissance mycélienne des isolats de *P. vexans* aux différentes températures

Figure 4 : Croissance mycélienne des isolats de *P. vexans* aux différentes activités d'eau et différentes températures

Sommaire :

Introduction générale

Partie 1 : Revue bibliographique

1. Généralités

- **Agent pathogène**

- 1- Description
- 2- Taxonomie
- 3- Cycle de vie
- 4- Symptômes et dégâts

2. Effet de certains facteurs sur la croissance de *Phythopytium Vexans*

- 1- Humidité
- 2- pH
- 3- Température
- 4- Activité d'eau

Partie 2 : Matériel et méthodes

1. Préparations des isolats
2. Préparation du milieu de culture (PDA)
3. Repiquage du champignon
4. Incubation
5. Mesures de croissance

Partie 3 : Résultats et discussion

1. Relevés de la température et du potentiel hydrique
2. Résultats de l'effet de température
3. Résultats de l'effet de l'activité d'eau
4. Discussion
5. Conclusion
6. Références bibliographiques
7. Annexes

Introduction générale

En 50 ans, l'agriculture marocaine a accompli de grands progrès en termes de modernisation et de diversification. Hier comme aujourd'hui, l'activité agricole représente d'ailleurs l'un des piliers fondateurs de l'économie nationale.

La part de l'amont agricole dans l'économie nationale est considérable avec 74 milliards de dirhams, ce qui correspond à 14% du Produit intérieur brut (PIB).

Le Maroc a également amélioré son autosuffisance concernant certaines denrées alimentaires, dans un contexte marqué par une intégration grandissante du marché international. Aujourd'hui, Le Royaume assure ainsi 100% de ses besoins ainsi que Par son mode de gouvernance structuré et responsable, le Plan Maroc Vert a créé une nouvelle dynamique dans le secteur agricole qui commence déjà à porter ses fruits, un investissement estimé à près de 30 milliards Dhs a été drainé dans le secteur, (FAO ,2016). En outre, une valeur ajoutée additionnelle moyenne de plus de 23 milliards Dhs a été réalisée entre la période 2003-2007 et la période 2008-2012.Même au niveau des exportations agricoles le Maroc représentent entre 15% et 21% des exportations globales. Parmi ces exportations, on trouve la filière de la pomme.

Au Maroc, le pommier occupe actuellement une superficie d'environ 29788 ha et se place au 2ème rang des rosacées après l'amandier. Les premiers vergers commerciaux ont été développés en zones de montagne où les conditions climatiques sont favorables au développement et à la fructification de cette espèce.

Malheureusement ce secteur connaît des difficultés et des problèmes dus soit aux ravageurs ou aux maladies qui attaquent leurs arbres, entraînant des pertes matérielles, une baisse de la productivité et de la production, et donc une diminution des exportations ainsi qu'un recul des quantités importées. C'est pour cette raison que cette culture à haute valeur a fait l'objet de plusieurs recherches, parmi elles s'installe notre étude qui a comme but d'étudier l'effet de la température et le potentiel hydrique sur la croissance mycélienne du *Phytophthora vexans* agent causal de la pourriture racinaire des rosacées à pépins.

Partie 1 : Revue bibliographique

I. Généralités

1.1- *Phytophthora vexans* :

Phytophthora vexans est un genre d'oomycètes phytopathogènes infectant un grand nombre de végétaux parmi lesquels se trouvent plusieurs plantes ou arbres cultivés tels la pomme de terre, la vigne, le châtaignier ou le pommier. Le *Phytophthora vexans* a été identifié comme intermédiaire entre les genres *Phytophthora* et *Pythium*, étant plus étroitement apparenté à *Phytophthora*. Les espèces de *Phytophthora* et de *Pythium* comme étant les agents pathogènes du sol les plus répandus, ce sont des maladies courantes et destructrices des arbres du pommier à travers le monde. Ce champignon sévit aussi bien en pépinière qu'en verger dans les secteurs humides ou mal drainés. Les arbres infectés flétrissent et s'effondrent soudainement. Au fur et à mesure que la maladie progresse à la base du tronc et sur le collet, un chancre violet peut se former à la base des arbres atteints.

Les champignons du genre *Phytophthora* sont des Phycomycètes, caractérisés par un mycélium dépourvu de cloisons. Ces champignons sont obligatoirement inféodés aux végétaux. Leur développement s'effectue à l'intérieur des tissus de la plante. Le mycélium circule entre les cellules et émet des suçoirs appelés haustoria à l'intérieur de celles-ci pour se nourrir. Les *Phytophthora* appartiennent à la classe des Oomycètes. Ce sont des champignons primitifs caractérisés par le fait que l'eau liquide leur est indispensable pour se développer (eau à la surface du sol). Ils font partie de l'ordre des Péronosporales, de la famille des Pythiacées. Ils sont capables de se reproduire sexuellement (sous forme d'oospores) en plus d'une reproduction asexuée.

Les Pythiacées sont considérées comme des parasites de faiblesse qui profitent de conditions physiologiques défavorables à la plante. Les *Pythium* existent pratiquement toujours dans le milieu racinaire.

Ces champignons, sont aujourd'hui rattachés aux straménopiles. Le genre *Phytophthora* comprend de nombreuses espèces parasites de plantes et quelques arbres fruitiers. Le genre *Phytophthora*, qui comprend actuellement 18 espèces formellement caractérisées, a récemment été séparé du genre *Pythium* (**de Cock et al. 2015**). De nombreuses espèces de *Phytophthora* sont également des agents pathogènes importants, tels que la *Pp. hélicoïdes* et

Pp. vexans, causant la pourriture des racines, la pourriture des semences, la fonte des semis et l'atténuation de nombreuses plantes ornementales. Cette maladie cause la décomposition de la couronne et de la racine. Quand la température environnementale augmente et que les jours deviennent chauds ce champignon peut commencer son activité. Les feuilles supérieures se fanent durant le jour et au départ elles peuvent se récupérer la nuit, mais avec le temps la plante meurt. Les symptômes initiaux dans le système racinaire développent des lésions aux pointes des racines et commencent à proliférer entraînant le blocage de l'absorption de nutriments par le système racinaire. On peut également voir ses symptômes dans les tissus, dans la couronne de la base du tronc. Elle peut s'étendre jusqu'à 10 centimètre au-dessus de la base du tronc de la plante.

1.2- Taxonomie :

Le *Phytopythium* est un nouveau genre de la famille *Pythiaceae*, ordre Péronosporales, qui a été décrit avec *Phytopythium sindhum* comme espèce type par (Bala et al. 2010).

Il faut noter que jusqu'à ces dernières années que ce champignon a été identifié sous le nom du *Phytopythium vexans* avant il porter l'identification de *Pythium vexans*.

- **Super phylum :** Heterokonta
- **Classe :** Oomycètes
- **Ordre :** Pythiales
- **Famille :** Pythiacées
- **Genre :** *Pythium*
- **Espèce :** *Phytopythium vexans*

1.3 - Cycle de vie :

Le *Phytopythium* peut se développer en serre, sur des greffes, restes végétaux, dans l'eau d'arrosage et dans les substrats de culture. Les insectes d'effet de serre, comme les moustiques ou les mouches de terre, peuvent également le transmettre.

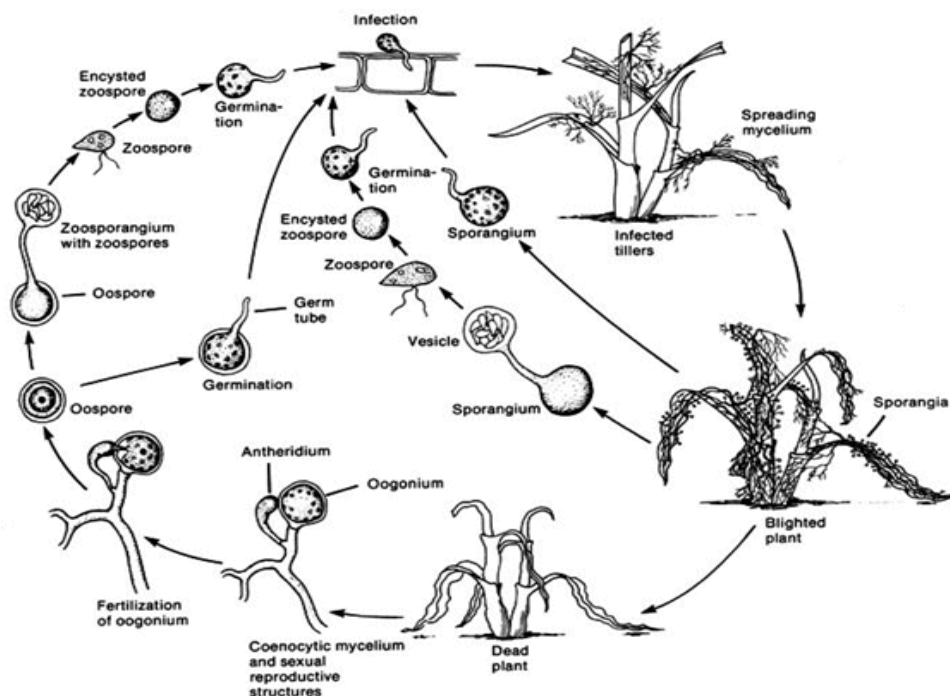
Le cycle du champignon comprend deux phases. La première est une phase de reproduction sexuée, avec formation d'oospores qui assurent la conservation des agents pathogènes en fin de cycle et en conditions défavorables. Ces oospores, bien protégées par une paroi épaisse,

permettent au parasite d'attendre le retour d'un milieu plus propice à son développement. L'autre phase, liée à la reproduction asexuée, assure la dissémination, la croissance et le développement du pathogène.

Les oospores se conservent dans le sol, les tissus végétaux, l'eau d'arrosage, le matériel utilisé pour la multiplication (caissettes, tablettes...). Lorsque les conditions sont favorables, ces formes de persistance germent reproduisant le mycélium. Sur celui-ci, à l'extrémité de certains hyphes se forment des vésicules. Ce sont des conidies (reproduction asexuée). Quand l'humidité est faible, celles-ci germent en donnant directement un filament mycélien. Lorsque l'humidité est forte, la conidie évolue en sporangium dans lequel des zoospores biflagellées se différencient.

En règle générale, il faut savoir que les formes du champignon type zoospores, conidies, mycélium ont une vie courte.

Ces spores sont mobiles en milieu aqueux. Elles vont donc se déplacer en nageant dans les gouttes d'eau de surface. Quand ces zoospores entrent en contact avec le collet de la plante, elles s'immobilisent, perdent leurs flagelles et forment un mycélium. Celui-ci pénètre dans les tissus de la plante à ce niveau. Cette contamination primaire constitue la première phase du cycle du champignon. Après incubation puis apparition des symptômes, le pathogène bourgeonne pour reproduire des spores de multiplication asexuée : le cycle continue. Ces conidies seront les agents des disséminations secondaires.



(Courtesy R.W. Smiley, P.H. Dernoeden, and B.B. Clarke), *Compendium of Turfgrass diseases*, 2nd edition, Page 47.)

Figure 1 : la reproduction sexuée et asexuée chez les oomycètes.

La méthode de propagation se réalise à travers la formation de sporanges, une structure en forme de capsule. Les centaines de sacs libèrent les zoospores qui arrivent directement à la racine où ils s'accrochent, germent et colonisent le tissu de la racine à travers la production de fines structures similaires à des fils appelés communément mycélium. Le *Phytophthium* forme des spores et des chlamydospores dans les racines des plantes en décomposition où elles peuvent survivre longtemps, des années même, en sol avec des conditions défavorables, dans le substrat de culture et dans l'eau, donnant lieux à des infections postérieures.

1.4- Symptômes et dégâts

Le *Phytophthium vexans* comme le pythium produit des enzymes pectinolytiques (dépolymérase, protopectinase) permettant l'installation du pathogène.

Les symptômes sont constatés sur semis et jeunes plantules repiquées.

- Sur semis, la graine ou un stade plus avancé avec apparition de la racine et de la tige peuvent être envahis avant leur émergence. La destruction par le champignon est alors totale, et l'attaque se traduit par un manque à la levée (fonte de pré-émergence).
- Sur les jeunes plants, l'infection se manifeste d'abord à partir des racines. Ensuite, ils présentent, au niveau du collet et du petit tubercule, une pourriture vitreuse marron et humide. Les tissus se désorganisent, perdent de leur résistance en prenant un aspect aqueux. Fragilisée, la jeune tige se couche entraînant toute la partie aérienne. A ce stade on parle de la maladie de la verse ou de la maladie des jeunes plants de semis. La progression de la maladie peut être telle que les plants fondent littéralement et disparaissent de la surface des substrats, d'où le nom de fonte des semis (cas de fonte de post-émergence).
- Les plantes plus grosses peuvent surmonter une attaque grâce à leur croissance en signalant une attaque par le fanage d'une ou quelques feuilles. Les feuilles peuvent également jaunir.

On peut donc regrouper les symptômes en trois grands groupes :

- Ils entraînent des pourritures du collet et des racines, ce qui est le cas le plus fréquent, qui causent le dépérissement des plantes attaquées. On observe alors un pourrissement au niveau du collet qui se prolonge au niveau des racines et habituellement au bas de la tige.
- Sur certaines espèces d'arbres qui y sont sensibles, les *phytophthiums* finissent par envahir progressivement l'ensemble du tronc et des branches, entraînant leur mort. On observe alors un dessèchement des feuilles et une pourriture (par l'intérieur) du tronc, qui devient cassant.
- Il peut en outre y avoir une atteinte, des parties aériennes (feuilles et fruits). Qui affaiblissent, par diminution de la photosynthèse et jusqu'à les tuer (sans traitement), les plants attaqués.

Ce champignon peut être la cause de la perte totale de la production de la culture. Nous pouvons trouver deux attaques bien distinctes :

- **Attaque pré-émergente** : Cela se produit durant le processus de germination avant que la graine n'ait germé. Durant ce processus le champignon profite de l'hydratation de la graine pour s'introduire à l'intérieur de cette dernière et l'infecter. Cela diminue le taux de germination, arrivant même à empêcher la germination totale des graines utilisées. L'attaque dépend des conditions environnementales lesquelles peuvent être très variées.
- **Attaque post-émergente** : Cette attaque se produit sur le tronc de la plante où l'on peut observer un rétrécissement au niveau du cou en contact avec le substrat. La prolifération du mycélium sur ces zones des cellules se fait en s'alimentant de ses contenus.

Le *Phytophthium vexans* Provoquent des dégâts tout au long du cycle de production des légumes, aussi bien dans les pépinières sur plantules que dans les cultures sur plantes adultes, qu'ils soient cultivés en sol comme en hors-sol (où ils sont particulièrement dommageables).

Parmi ces dégâts on peut citer :

- Retard de croissance.
- Fontes de semis.
- Les extrémités des racines sont brunes et en voie de mourir. Plus la maladie se développe, plus le brunissement monte des racines vers les tiges.

- Le cortex racinaire externe se détache des tissus vasculaires internes, ne laissant qu'un mince fil.
- Les plantes flétrissent au soleil en raison des dommages aux racines et d'une absorption limitée de l'eau, mais deviennent gonflées pendant la nuit lorsque la demande en eau diminue. Ce qui donne un effondrement, et mort des plantules.
- De petites portions de la culture peuvent montrer des signes de carences en micronutriments. Les nutriments sont absorbés par les extrémités des racines, donc si elles sont pourries, elles ne peuvent absorber les nutriments, particulièrement les micronutriments
- Brunissement et pourriture du cortex des racines principales et du pivot qui finit également par pourrir plus ou moins localement.
- Jaunissements foliaires et flétrissements plus ou moins marqués et réversibles.
- Pourriture des tissus foliaires et des fruits au contact du sol ou ayant subi des éclaboussures, etc.

2-Effet de certains facteurs sur le développement *du Phytophthium vexans*

Les conditions environnementales jouent un grand rôle dans l'expression d'une maladie. Ce sont les facteurs climatiques qui sont le plus souvent impliqués. Traditionnellement, le climat se définit comme l'ensemble des conditions atmosphériques propres à une région du globe et caractérisé par les états habituels du temps et leurs fluctuations au cours de leur succession saisonnière.

Dans le système épidémique, les facteurs climatiques correspondent aux variables de flux de premier rang tout particulièrement dans les régions à saisons contrastées ; celles de second rang correspondent aux pratiques culturales. C'est le climat qui gouverne en grande partie les changements quantitatifs d'états aux niveaux du parasite, de la maladie, de l'épidémie mais aussi de la population hôte (**Rapilly, 1991**)

1. Humidité

L'humidité peut se matérialiser par la présence de rosée, d'eau de pluie ou d'irrigation sur la surface de la plante ou dans le sol, ou par la présence de fines gouttelettes d'eau dans l'air

(Humidité Relative) ou encore comme vapeur. Sous ces différentes formes, elle peut être déterminante dans l'expression et le développement d'une maladie (**Parry, 1990**). Les parasites fongiques et les épidémies qu'ils provoquent requièrent, pour au moins une séquence de leur cycle infectieux, de l'eau liquide ou vapeur. Ce facteur, qui peut être limitant, est donc un élément essentiel à la compréhension des épidémies. Son absence peut provoquer un arrêt parfois irréversible des événements biologiques. Inversement, sa présence, son abondance, sa persistance peuvent, à partir des seuils spécifiques à chaque parasite ou type de parasite, accélérer ou freiner les vitesses de déroulement des phénomènes (**Rapilly, 1991**).

Presque tous ces champignons ont encore conservé la possibilité de mener une vie aquatique ; elle reste même nécessaire à un stade particulier de leur cycle biologique. L'eau et l'humidité sont en effet indispensables pour les infections à *Phytophthora vexans* intervenant sur les plantes (**Brasier et Hansen 1992**). Lors d'une étude de l'impact de différents facteurs environnementaux sur le développement de la pourriture brune (due à *Phytophthora palmivora*) en Côte d'Ivoire, a noté qu'une augmentation de la teneur en eau des tissus du péricarpe était en relation avec l'augmentation de la sensibilité du fruit. Il a également observé qu'une humidité relative élevée augmente la sensibilité du fruit, de même qu'elle exerce une action favorable sur le développement du champignon.

2. pH

Les effets du pH sur la croissance fongique sont plutôt complexes, car un pH initial peut affecter la croissance, ce qui, par la suite, aura une incidence sur le pH en raison de l'accumulation de métabolites dans l'environnement. Les Champignons sont capables de modifier le pH de leur environnement, en particulier, par la consommation de certains ions du substrat (**Adan, 1994**). **Gaudy (1980)**, attribue l'augmentation du pH, au métabolisme des protéines. Généralement, la vitesse de croissance fongique est maximum pour des substrats de pH acides à neutres (entre 4 et 7). La gamme de pH permettant la croissance est toutefois bien plus étendue avec des valeurs limites comprises entre 2,2 et 9,6 pour les espèces les plus communes,

En 1980, **Curran**, étudie l'effet du pH sur la croissance de plusieurs espèces fongiques Il constate que le pH agit différemment sur le développement selon l'espèce considérée. Les effets du pH du milieu sur la vitesse de croissance et la viabilité fongique ne sont pas encore connus. Toutefois, on le soupçonne de conditionner l'activité enzymatique ou encore

d'inhiber le système de transport membranaire notamment en modifiant la configuration de protéines responsables du transfert de composés.

3. Température

La température joue un rôle important dans toutes les phases de développement du parasite (**Friesland et Schrödter, 1988**). Trois températures sont prises en compte en épidémiologie : la température de l'air, celle qui correspond au point de rosée et celle de l'organe sensible ou malade. Celle-ci est plus difficile à connaître, mais combinée avec celle du point de rosée elle conditionne, pour partie, la formation ou la disparition d'un film d'eau dont la présence sur les organes végétaux est importante pour de nombreux parasites (**Rapilly, 1991**). Les fluctuations saisonnières et journalières des températures influencent le taux de développement de certaines maladies (**Kushalappa, 1990**). Elles sont directement dépendantes de la qualité et de la quantité de rayonnement. Lors des inoculations artificielles, des optimums de température favorisant le développement des symptômes ont été déterminés à la suite de plusieurs expérimentations (**Brasier et Griffin, 1979**).

4. Activité d'eau

L'eau, élément essentiel à toute forme de vie, est présente en quantité variable dans les aliments que nous consommons et bien qu'elle n'apporte pas de valeur énergétique, elle en influence leurs caractéristiques et notamment leur susceptibilité à la dégradation.

L'activité de l'eau ou A_w représente l'eau libre contenue dans un produit, il ne s'agit pas d'une mesure de teneur en eau appelée aussi taux d'humidité, mais de la disponibilité de cette eau. Cette eau qui n'est pas liée fortement avec le produit d'un point de vue physico-chimique, influence directement la croissance et la toxinogénèse de micro-organismes tels que bactéries, levures, moisissures... ainsi que le développement de réactions enzymatiques et d'oxydations...

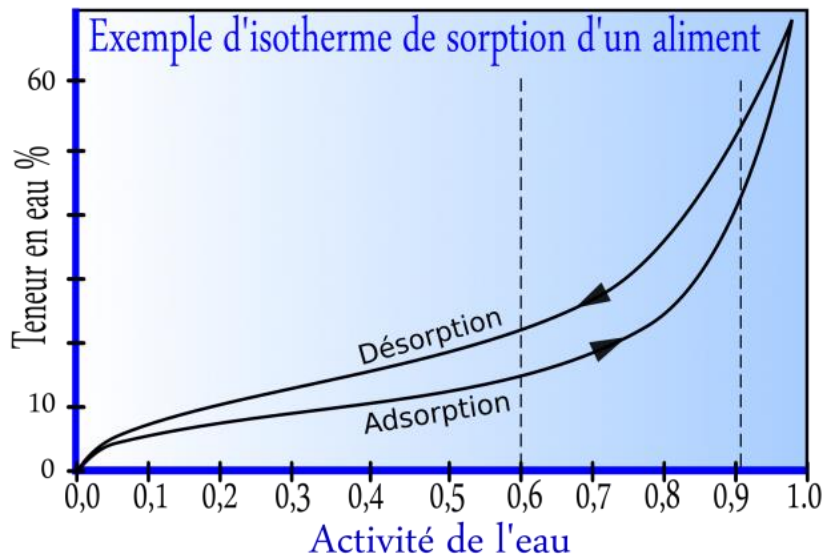


Figure 2 : exemple d'isotherme de sorption d'un aliment

Bien que l'activité de l'eau soit en corrélation avec la teneur en eau d'un produit, le rapport entre ces deux grandeurs n'est pas linéaire, et dépend étroitement de la nature du produit considéré. On appelle, isotherme de sorption, la relation entre la teneur en eau et l'activité de l'eau d'un produit à température constante. L'isotherme de sorption présente deux courbes distinctes (phénomène appelé hystérésis). Une courbe de désorption si on part d'un produit saturé en eau avec une opération de séchage. Une courbe d'adsorption si on part d'un produit sec avec une addition d'eau. L'eau présente dans le produit se lie donc d'une manière plus forte avec sa matrice lors d'un séchage que lors d'une réhydratation. Ce qui signifie que la teneur en eau ne suffit pas à qualifier un produit en regard de son aptitude à la conservation. Autrement dit, la mesure de l'activité de l'eau est beaucoup plus précise que la mesure de teneur en eau concernant la maîtrise de la qualité et de la sécurité sanitaire.

Sur un plan théorique, l'activité de l'eau peut se définir comme un rapport de pressions de vapeur. L'activité de l'eau est égale à la pression partielle de vapeur d'eau d'un produit humide divisée par la pression de vapeur saturante de l'eau pure à la même température.

$$A_w = p(T) / p_0(T)$$

L'activité de l'eau évolue donc dans une gamme comprise entre 0 et 1, l'eau pure ayant une valeur d'activité de l'eau de 1. Cependant l' A_w est rarement calculé à partir d'une mesure manométrique, il existe plusieurs méthodes et technologies pour la déterminer.

L'activité de l'eau est parfois exprimée en pourcentage on l'appelle alors l'humidité relative d'équilibre (HRE) :

$$\mathbf{HRE (\%) = 100 \times A_w}$$

Elle permet une mise en parallèle directe avec l'humidité relative ambiante (HR) mesurée et contrôlée couramment lors d'une opération de séchage ou de stockage.

La croissance fongique et la production de mycotoxines sont fortement influencées par l'interaction complexe de plusieurs facteurs environnementaux comme la température, l'activité d'eau et le substrat.

Partie 2 : Matériel et méthodes

1. Origines des isolats

Cinquante vergers de pommiers et poiriers situés dans les cinq zones de la région Meknès-Tafilalet (Meknès, El Hajeb, Séfrou, Imouzer et Azrou) ont fait l'objet d'une enquête sur la présence de *Phytophthium vexans*. La plupart des vergers ont été sélectionnés sur la base des informations relatives à la santé des arbres fournies par les producteurs et les conseillers techniques de coopératives agricoles, qui ont observé des symptômes précoces de dépérissement des arbres (réduction de la croissance et de la vigueur, chlorose foliaire) ou d'autres symptômes plus évidents, tels que flétrissement, perte de feuillage, et dépérissement des pousses et des branches. Ces critères de sélection ont été appliqués dans toutes les zones d'échantillonnage.

Cinq isolats de *Phytophthium vexans* (**I5 – S2 – A7 – E4 – M2**), ont été isolés à partir des rhizosphères de pommiers de 5 régions différentes du Maroc en 2018. Les isolats ont été maintenus en culture sur un milieu PDA et conservés à 4 °C.

2. Préparations des isolats

Les cinq isolats du *Phytophthium vexans* ont été conservés par congélation à 4°C, un rajeunissement a été effectué en les laissant décongeler, puis on les repiquant sur un milieu CMA sélectifs qui contient 1g de pénicilline G, 1g de polymixine B, 1g de PCNB et 0.5ml d'hyméxazol. Les souches ont été incubées par la suite à 25° pendant 7 jours à l'obscurité.

Une fois que le champignon envahit la boîte, il est repiqué en coupant un morceau de l'extrémité et le placé au milieu de la boîte contenant du PDA. Puis incubées à 25° pendant 72 heures.

3. Préparation du milieu de culture (PDA)

Le milieu de culture PDA est favorable pour la croissance des champignons phytopathogènes.

Afin d'étudier l'activité d'eau, six litres de PDA ont été préparés, dans chaque litre une concentration de glycérol croissantes a été ajoutées ou chaque concentration donne une activité d'eau différente.

Tableau 1 : Relation entre les différentes concentrations de glycérol et l'activité d'eau :

Aw	Concentration de glycérol
0.995	PDA (sans glycérol)
0.98	40 ml
0.96	181.66 ml
0.93	265 ml
0.91	346.66 ml
0.89	406.66 ml

Milieu de culture :

PDA (Potato Dextrose Agar).

La préparation passe par l'ébullition des tranches de Pomme de terre (250 gramme) pelées dans 700 ml d'eau distillée. Le liquide obtenu est filtré avec une passoire simple dans un erlenmeyer puis avec 15 gramme de dextrose et 20 gramme d'agar le mélange est comblé par de l'eau distillée pour atteindre 1000 ml. Il est ensuite mis sur plaque chauffante sous agitation magnétique.

Lorsque le mélange devient homogène il est ensuite couvert par de l'aluminium et mis pour stérilisation à la température de 125°C, la pression de 1,4 bar pendant 15 minutes.

2. Repiquage et Incubation

Sous hotte à flux laminaire, et à l'aide d'un emporte-pièce (5mm de diamètre), le fragment du champignon a été repiqué à l'envers sur milieu PDA qui contient des différentes concentrations de glycérol. Les boîtes ont été incubées à différentes températures (**5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C**) à l'obscurité.

3. Mesure de croissance

Le développement radial de cinq isolats cultivés sur des milieux PDA modifiés avec différentes concentrations de glycérol, afin de contrôler l'activité de l'eau, a été enregistré quotidiennement pour une durée de **25 jours**. Ensuite la croissance journalière a été définie

pour chaque température et chaque combinaison soluté-température. Cette croissance journalière a été calculée selon la formule suivante :

Croissance journalière = la moyenne ($\phi_{jn+1} - \phi_{jn}$)

Partie 3 : Résultats et discussion

Les essais effectués sur les 5 isolats en provenance de différentes régions du Maroc vis-à-vis de différentes activités de l'eau et incubés à des températures allant de 5 à 30 °C puis nous avons calculé la croissance journalière (mm/jour).

Dans cette étude nous allons traiter deux volets/aspects, le premier volet centré sur la réponse de différents isolats à des températures allant de 5 à 30 °C. Le deuxième volet sera consacré pour l'étude du comportement des isolats vis-à-vis différentes activités d'eau incubés à différentes températures.

1. Effet de la température :

1.1 Croissance journalière des isolats à différentes températures

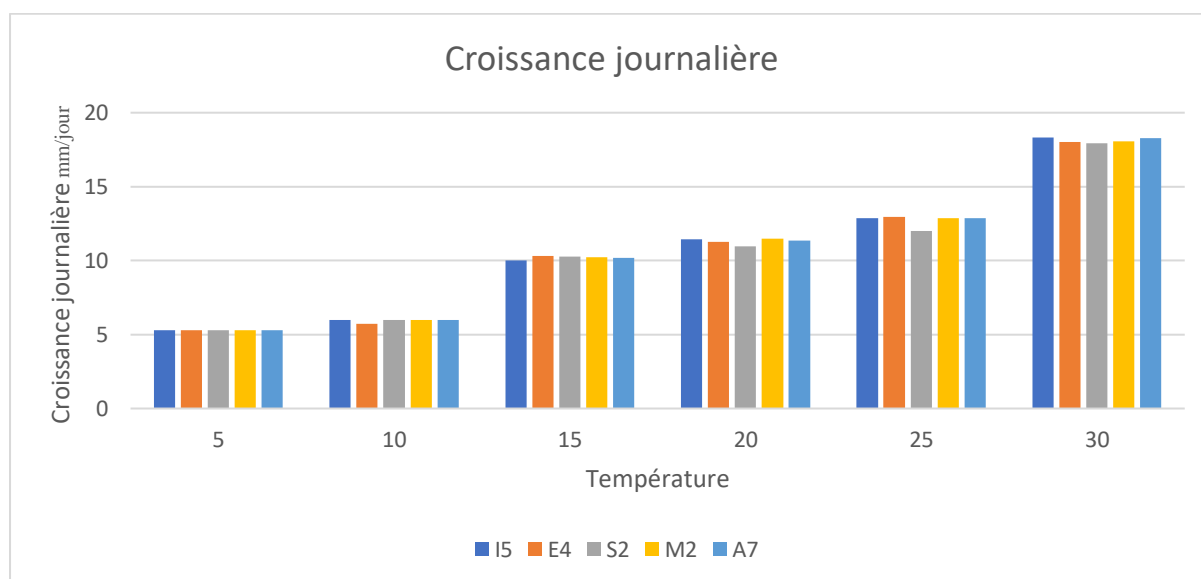
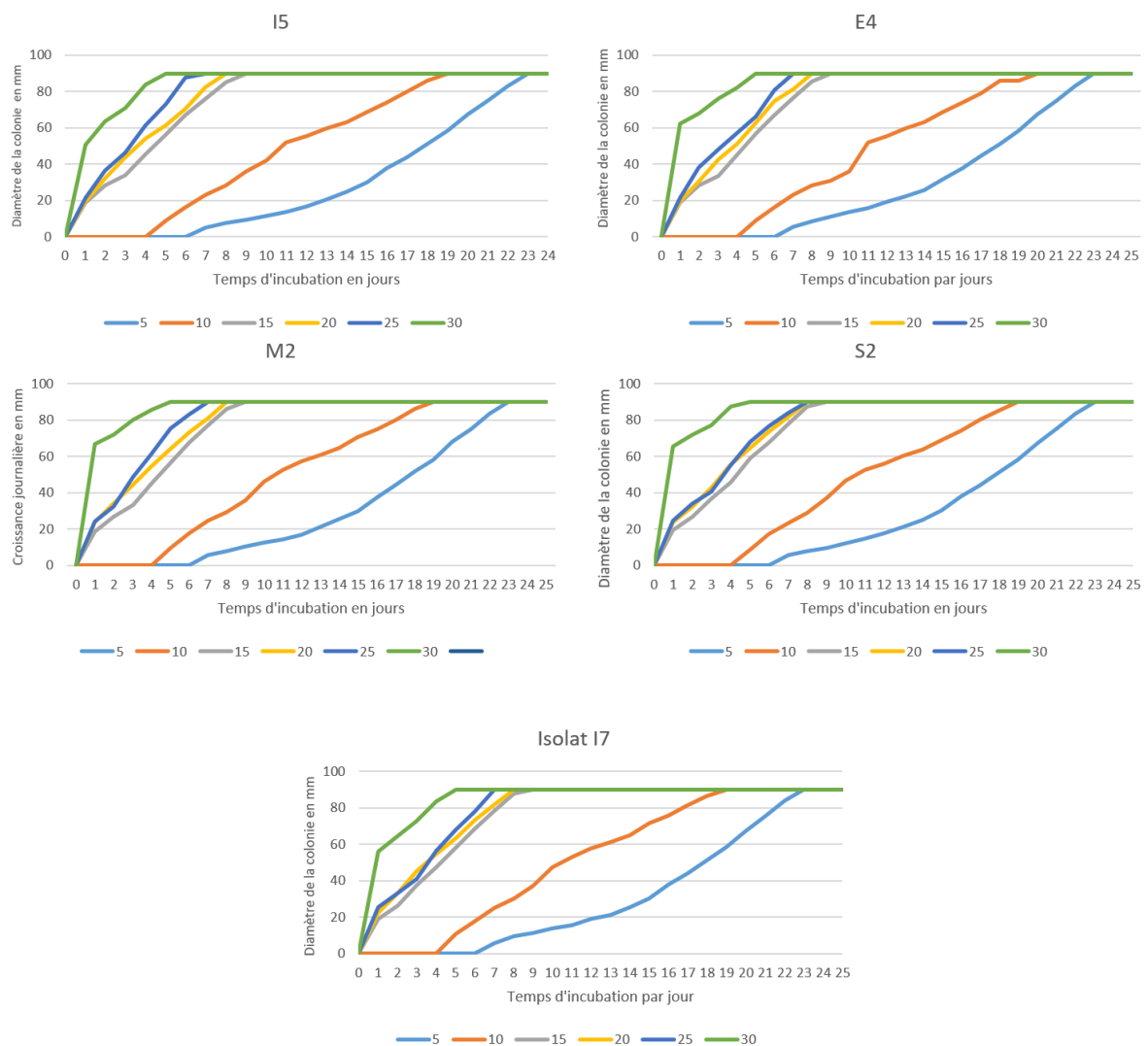


Figure 3. Croissance mycélienne des isolats de *Phytophthium vexans* à différentes températures

La figure 3 montre que les isolats répondent de la même manière vis-à-vis des différentes Températures. Ainsi, leur croissance journalière (mm/jour) augmente proportionnellement avec l'élévation de la température. La croissance journalière des cinq isolats à 5 °C ne

dépasse pas 5.3 mm/jour. Pour 10 °C, ce paramètre a montré une légère augmentation, il continue à augmenter avec l'augmentation de la température (15 °C, 20 °C, 30 °C), avec une meilleure croissance observée à 30 °C.

1.2 - Comportement de *Phytophthium vexans* au cours d'incubations aux différentes températures :



Graphes : Diamètre de croissance (mm) en fonction du temps pour les cinq isolats q différentes températures

Le graphe représente le diamètre de croissance (mm) en fonction du temps (jour) pour les cinq isolats aux différentes températures (5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C). Le diamètre de

croissance, la phase de latence et la durée nécessaire pour que le champignon envahisse toute la boîte changent d'une température à une autre. A **5 °C**, les isolats manifestent presque le même comportement lors d'incubation. La phase de latence des différents isolats dure 6 jours. Puis ils commencent à croître avec une moyenne journalière qui ne dépasse pas 5,3 mm/jour (voir le graphe 1). Le mycélium des isolats n'envahit toute la boîte qu'après 23 jours d'incubation. A **10° C**, les isolats croissent de la même manière au cours d'incubation. La phase de latence des différents isolats dure 4 jours et le mycélium envahit toute la boîte après 19 jours d'incubation

Cependant à des températures au-delà de **15 °C**, la colonie d'isolat commence à croître dès le premier jour d'incubation sans passer par une phase de latence. A **15° C**, les isolats manifestent presque le même comportement lors d'incubation, le mycélium envahit toute la boîte au 10^{ème} jour après l'incubation. A **20°C**, les isolats se multiplient de la même manière, la croissance commence dès le premier jour d'incubation. Ainsi que le mycélium envahit toute la boîte après 8 jours d'incubation. Une légère variation s'observe entre les isolats après les deux premiers jours d'incubation, dont le mycélium de quatre isolats (**I5, E4, M2, A7**) a colonisé toute la boîte après 7 jours d'incubation, tandis que le mycélium de l'isolat **S2** nécessite un jour de plus.

A **30°C**, les isolats commencent à croître juste après l'incubation, avec une légère différence entre le diamètre des isolats, cette différence a pris fin le 5^{ème} jour d'incubation, où on observe un envahissement total des boîtes par le mycélium.

Dans le même contexte, plusieurs études ont été effectuées montrant l'effet de la température sur la croissance mycélienne des champignons. Une étude similaire est menée par **whiting et al. (2001)** sur la réponse de deux espèces appartenant au genre *Phaeoconiella* (*P. chlamydospora* et *P. aleophilum*) a montré que les températures optimums pour la croissance de ces deux espèces sont à **25 °C** et à **30 °C**.

Des graphes comparant les isolats à chaque température évaluée sont présentés au niveau de **l'annexe 1**

2 - Effet de l'activité d'eau sur la croissance mycélienne de *phytophthium vexans* à différentes températures :

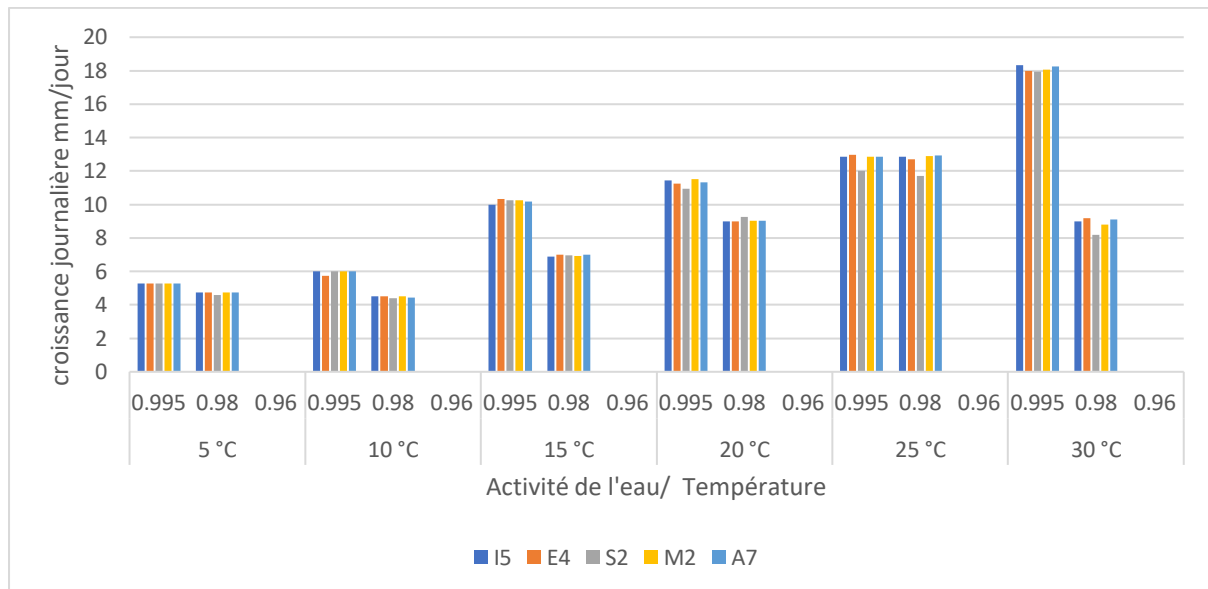


Figure 4. Croissance journalière des isolats de *P. vexans* aux différentes températures et différentes activités d'eau

Durant l'incubation des isolats aux 6 températures évaluées, le mycélium ne se développe qu'à l'activité **0.995** et **0.98** en manifestant le même comportement. Ainsi, La croissance journalière augmente avec l'élévation de l'activité de l'eau, c'est-à-dire la disponibilité de l'eau libre au niveau de milieu de croissance. A l'exception de la température **25°C** dont les valeurs de la croissance journalière ne changent pas à l'égard de ces deux activités, les valeurs de la croissance journalière des 5 isolats testés à l'activité de l'eau **0.995** sont supérieures à ceux de l'activité de l'eau **0.98** (Fig.4).

Oviedo et al. (2011) sur l'effet d'une gamme d'activité de l'eau (**0,90-0,99**) sur la croissance mycélienne d'*Alternaria alternata* ont trouvé que le taux de croissance maximum a été obtenu à **0,98** et **25 °C**. Cependant ils ont trouvé que souches testées peut se développer à une activité de l'eau de **0,90**. De même **Slivina et al. 2018** ont trouvé que le taux de croissance le plus rapide de *Fusarium sudanense* s'observe à la forte activité de l'eau et à **25 °C**.

Exemple de l'isolat I5

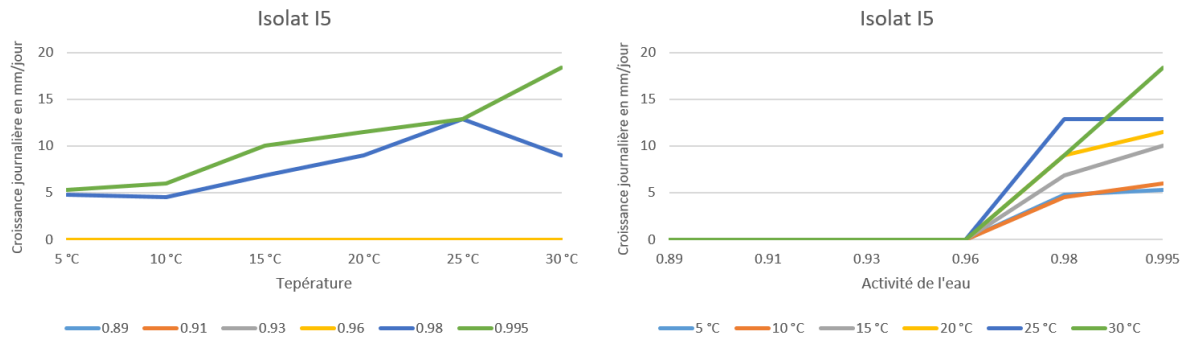


Figure 4. Réponse de l'isolat I5 aux différentes activités de l'eau à différentes températures.

Les graphes représentent la réponse de l'isolat **I5** aux différentes activités de l'eau à différentes températures. Seulement deux activités de l'eau (**0,995** et **0,98**), aux différentes températures, ont permis la croissance du champignon .

Conclusion et perspectives

L'étude de l'effet de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance de *Phytopythium vexans* permet une investigation sur les exigences de ce champignon in vitro.

A la lumière des résultats obtenus, nous remarquons qu'à des températures inférieures à **10 °C**, *Phytopythium vexans* nécessite une phase de latence avant de démarrer sa croissance. Ainsi, il demande une longue durée pour envahir toute la boîte à cause de sa faible croissance journalière. A des températures au-delà de **15°C**, cette espèce champignon commence sa croissance juste après l'incubation, le mycélium. La durée d'envahissement est réduite avec l'augmentation de la température dont la température idéale pour sa croissance est **30 °C**.

Cette espèce ne se croit qu'à une activité de l'eau supérieure à **0,98**. La meilleure activité de l'eau est celle de **0,995**. Cependant, une diminution de la l'activité de l'eau affecte la croissance du champignon.

Perspectives :

Cette étude n'est que le préambule pour d'autres études plus approfondies telles que :

L'étude de l'effet des autres paramètres tels que le pH et la salinité sur la croissance mycélienne, la formation des sporanges et la libération des zoospores de ce champignon.

Références bibliographiques

ANON - 1954 - The economic development of Nigeria Fed. Government Printer, p. 136.

DADE (H.A.) 1927 - Factors determining the incidence of diseases of cocoa pods. Yr Bk. Dept. Agric. G'Coast 1926, Bull. 7, 28-34.

EVANS (H.) - 1971 - Transmission of Phytophthora pod rot of Cocoa by investebates. Nature 232 (5309), 346-347.

FILANI (G.A.) - 1972 - Further studies on the chemical control of Phytophthora pulmivoru. (Butl.) Butl. on Cocoa I.A. critical appraisal of efficiency of Copper spray for the control of black- pod in cocoa. In press.

FURTADO (I.) - 1969 - Effect of copper fungicides on the occurrence of the pathogenic form of Colletotrichum coffeunum. Trans. Br. Mycol. Soc. 53(2), 325-328.

GALLETTI (R.), BLADWIN (K.D.S.), DINA (I.O.) - 1956 - Nigerian Cocoa Farmers, Oxford Uni. Press, p. 744. **GORENZ (A.)** - 1968 - Spread of Phytophthoru pod rot from the tree base to pods in the Canopy. Half yearly Report CRIN, 15-16.

GORENZ (A.) - 1971 - The use of very high lime Bordeaux mixture for the control of Phytophthoru palmivoru. Communication no 21. Première réunion du sous-groupe de Travail Afrique sur Phytophthoru pulmivora.

GORENZ (A.), OKAISABOR (E.K.) - 1971 - Progress in Tree Crop Research in Nigeria. CRIN, pp. 124- 133.

HISLOP (E.C.), PARK (P.O.) - 1962 a - Studies on the chemical control of Phytophthoru pulmiuora (Butl.) Butl. on Theobromu cacao L. in Nigeria. 1. Laboratory bio-assay of fungicides on detached pods. Ann. appl. Biol., 50, 57-65.

Oviedo (M. S.), Ramirez (M. L.), Barros (G. G.) & Chulze (S. N.) -2011. Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by Alternaria alternata on irradiated soya beans. International journal of food microbiology, 149(2), 127-132.

PARK (P.O.) - 1962 a - Studies on the chemical control of Phytophthoru palmivora (Butl.) Butl. on Theobroma cacao L. in Nigeria. II. Persistence of fungicides on pods. Ann. appl. Biol., 50, 67-76.

PARK (P.O.) - 1962 c - Studies on the chemical control. of Phytophthoru pulmivoru (Butl.) Butl. on Theobroma cacao L. in Nigeria. III. Field trials. Ann. appl. Biol. 50, 77-88.

Lévesque C.A. and A.W.A.M. De Cock, 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus Pythium. Mycological Research 108, 1363–1383.

Machado M., C. Collazo, M. Peña, M.A. Renaud, M.O. López, O. Coto, V. Zamora, R.I. Cabrera, M. Aranguren and G.J. Boland, 2012. First report of *Phytophthora palmivora* Butler causing root rot on avocado (*Persea americana*) in Cuba. *Canadian Journal of Plant Pathology* 34, 338.

Machado M., C. Collazo, M. Peña, O. Coto and M.O. López, 2013. First report of root rot caused by *Phytophthora nicotianae* in avocado trees (*Persea americana*) in Cuba. *New Disease Reports* 28, 9.

Martín-Sánchez P.M., T. Zea-Bonilla and R.M. Pérez-Jiménez, 2008. Nuevas enfermedades del aguacate causadas por hongos y oomicetes descritas en Andalucía. In: XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Lugo, Spain. 84.

Martin F.N., Z.G. Abad, Y. Balci and K. Ivors, 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease* 96, 1080–1103. McLeod A., W.J. Botha, J.C. Meitz, C.F.J. Spies, Y.T. Tewoldemedhin and L.

Mostert, 2009. Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. *Mycological Research* 113, 933–951. Moralejo E., A.M. Pérez-Sierra, L.A. Álvarez, L. Belbahri, F. Lefort and E. Descals, 2009.

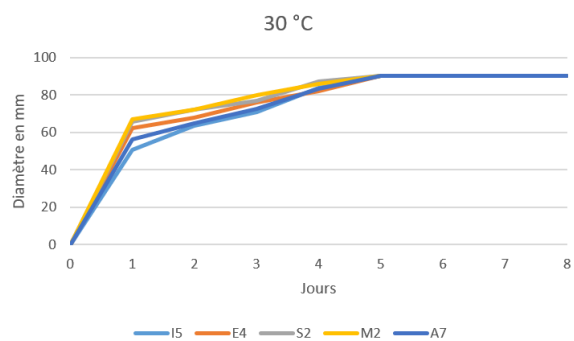
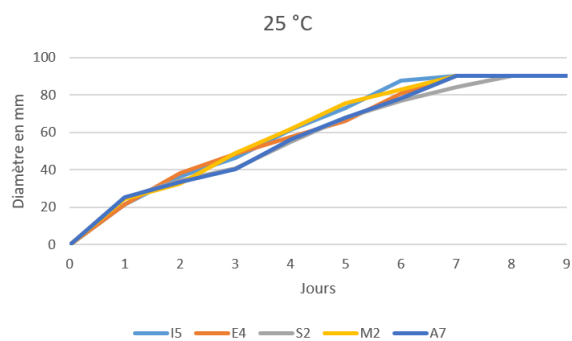
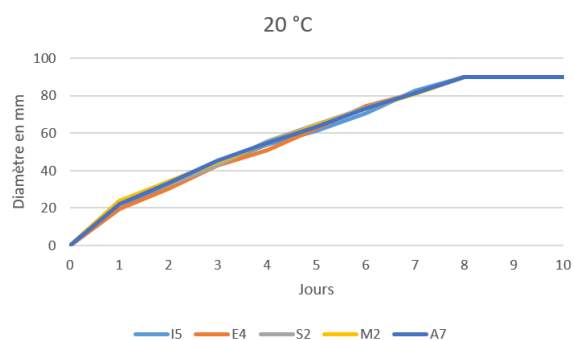
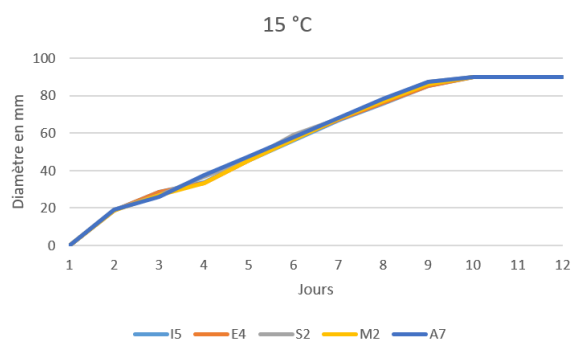
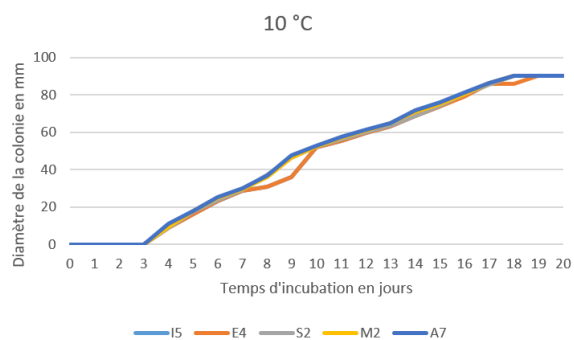
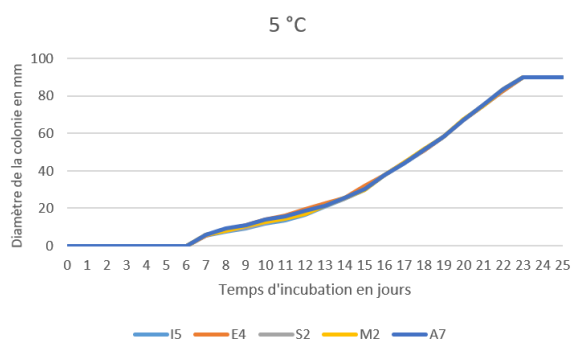
Robideau G.P., A.W.A.M. De Cock, M.D. Coffey, H. Voglmayr, H. Brouwer, K. Bala, D.W. Chitty, N. Désaulniers, Q.A. Eggertson, C.M.M. Gachon, C.H. Hu, F.C. Küpper, T.L. Rintoul, E. Sarhan, E.C.P. Verstappen, Y. Zhang, P.J.M. Bonants, J.B. Ristaino and C.A. Lévesque, 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11, 1002–1011.

Whitin, E. C., Khan, A., & Gubler, W. D. (2001). Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Disease*, 85(2), 195-201.

Annexes

Annexe 1

Développements de différents isolats en fonction du temps pour chaque température :



Annexe 2

Croissance journalière de différents isolats à différentes activités de l'eau pour chaque température :

