

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
 République Algérienne Démocratique et Populaire
 Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila



MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences
 Département des Sciences Agronomiques

Pour obtenir le Diplôme de

Master Académique en Protection des Végétaux

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Agronomiques

Thème

Effet de la forme d'azote et du pH sur la croissance et le développement de *Rhizoctonia solani* Kühn, agent du rhizoctone brun de la pomme de terre *Solanum tuberosum* L.

Présenté par :

M^{elle} Fatiha MEKKI et M^{elle} Sabrina MAME

Devant le Jury :

Président	F. MMECHE	Pr.	Université M ^{ed} Boudiaf de M'sila
Encadreur	A. TIAIBA	MCB	Université M ^{ed} Boudiaf de M'sila
Examineur	F. HOCEINI	MCA	Université M ^{ed} Boudiaf de M'sila

ملخص

هذا العمل عبارة عن دراسة تأثير شكل النيتروجين ودرجة الحموضة للوسط على نمو وتطور عزلتين من غرب الجزائر لفطر *Rhizoctonia solani* Kühn المسبب للتقرح والقشرة السوداء لنبات البطاطس *Solanum tuberosum* L. أظهرت النتائج أن نمو العزلات يتبع نفس الاتجاه ولكنه يتأثر بشكل كبير بالشكل النيتروجيني ودرجة الحموضة للوسط. وكان النيتروجين المعدني (نترات الصوديوم) أكثر ملاءمة من الشكل العضوي المتمثل في البرولين. بالنسبة للحموضة، تظهر العزلات المأخوذة بشكل منفصل نموًا أفضل عند 5.5 من 6.5. فيما يتعلق بتكوين التصلب، يبدو أن العزلات لا تختلف كثيرًا، ولكن، بشكل مستقل عن الحموضة، فإنها تنتج التصلب في وقت مبكر في وسط نيتروجين النترات مقارنة بالوسط المحتوي على البرولين. أظهرت النتائج أيضًا أن عدد التصلب لكل سم مربع يختلف قليلاً اعتمادًا على العزلة وشكل النيتروجين ودرجة الحموضة، إلا أن هذه الاختلافات تظل غير ذات دلالة إحصائية.

الكلمات المفتاحية: التقرح والقشرة السوداء، البطاطا، التطور و النمو، شكل الأزوت، درجة الحموضة *Rhizoctonia solani* Kühn

Résumé

Ce travail est une étude des effets de la forme d'azote et du pH du milieu sur la croissance et le développement de deux isolats originaires de l'ouest algérien de *Rhizoctonia solani* Kühn, agent du rhizoctone brun de la pomme de terre *Solanum tuberosum* L. Les résultats obtenus révèlent que la croissance des deux isolats suit la même tendance mais elle est significativement influencée par la forme de l'azote et le pH du milieu. L'azote minéral sous forme de nitrates de Na s'est montré plus favorable que la forme organique représenté par la proline. S'agissant du pH, les isolats pris séparément présentent une croissance meilleure à un pH de 5,5 que 6,5. En ce qui concerne la formation des sclérotés, il paraît que les isolats ne diffèrent pas beaucoup, mais, indépendamment du pH, ils produisent des sclérotés plus tôt dans un milieu à azote avec des nitrates que celui contenant la proline. Les résultats montre également que le nombre de sclérotés par cm² diffère légèrement suivant l'isolat, la forme de l'azote et le pH, néanmoins ces différences restent insignifiantes statistiquement.

Mots clés : *Rhizoctonia solani* Kühn Rhizoctone brun, pomme de terre, croissance et développement, Forme de l'azote, pH.

Abstract

This work is a study of the effects of the form of nitrogen and the pH of the medium on the growth and development of two isolates from western Algeria of *Rhizoctonia solani* Kühn, causative agent of canker and black scurf of potato *Solanum tuberosum* L.. The results reveal that the growth of the isolates follows the same trend but, it is significantly influenced by the nitrogen form and the pH of the medium. Mineral nitrogen (Na nitrates) was more favorable than the organic form represented by proline. For a pH, the isolates taken separately show better growth at 5.5 than 6.5. Regarding sclerotia formation, it appears that the isolates do not differ much, but, independently of pH, they produce sclerotia earlier in a nitrogen medium with nitrates than in one containing proline. The results also show that the number of sclerotia per cm² differs slightly depending on the isolate, the form of nitrogen and the pH, however these differences remain statistically insignificant.

Key words: *Rhizoctonia solani* Kühn, canker and black scurf, potato, growth and development, Form of nitrogen, pH.

"وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَالِمٌ"

صدق الله العظيم.

سورة يوسف آية 76.

Dédicacés

إلى من أفضلهما على نفسي، ولم لا فلقد ضحيا من أجلي ولم يدخرا جهداً في سبيل إسعادي على
الدوام جدي لعموري و جدتي عائشة

Sabrina

Je dédie ce travail à tous ceux qui m'ont offert un coup
de main de bonne foi sans préjudice ni préjudice, en
particulier à mon estimé frère Sofiane.

Fatiha

Remerciement

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Dr. Ammar TIAIBA, enseignant au département des sciences agronomiques de l'université de M'sila, nous le remercions pour son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur, sa disponibilité, pour son aide pratique, son soutien morale et ses encouragements durant notre travail et la préparation de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également à :

Dr. Fateh MIMECHE, enseignant au département des sciences agronomiques de l'université de M'sila, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance et d'examiner notre travail,

Dr. Faiza HOCIENI, enseignante au département des sciences agronomiques de l'université de M'sila, d'avoir accepté l'examinasson et le jugement de notre travail,

En fin, nos remerciements vont à toutes les personnes qui nous ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Classification de <i>Thanatephorus cucumeris</i> , anamorphe <i>R. solani</i> Kühn	12
02	Composition chimique du tubercule	21
03	<i>Principales maladies de la pomme de terre</i>	22
04	Principaux ravageurs de la pomme de terre	24
05	Caractéristiques des variétés de pomme de terre, source d'isolats	27
06	Composition du milieu Potato Dextrose Agar (PDA)	29
07	Composition du milieu Czapek Dox Agar (CDA)	29
08	Identification des lots expérimentaux	32
09	Dispositif statistique relatif à la variable Viabilité des sclérotés.	35
10	Dispositif statistique relatif à la variable Croissance mycélienne.	36
11	Dispositif statistique relatif aux variables Formation et nombre de sclérotés.	36

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Caractéristiques morphologiques de <i>Rhizoctonia solani</i> . A : Vue microscopique du mycélium montrant les septa, les ramifications et les constriction.	13
02	Baside mûre de <i>Thanatephorus cucumeris</i> , montrant stigmates et basidiospores	14
03	<i>Tubercules montrant des sclérotés</i>	16
04	Formation de petits tubercules aériens au voisinage de la surface du sol	16
05	Bouquets foliaire terminal dont les feuilles de coloration rougeâtre à violacée ont tendance à s'enrouler.	16
06	Tiges montrant des chancres	16
07	Le rhizoctone brun des tubercules (<i>Rhizoctonia solani</i>); cycle et méthodes de lutte	18
08	Caractéristiques morphologiques et cycle végétatif de la pomme de terre	20
09	Localisation sur la plante des principales maladies de la pomme de terre	22
10	tubercules de pomme de terre portant les symptômes du rhizoctone brun ; gauche, variété Spunta ; droite, variété Désirée	26
11	<i>Rhizoctonia solani</i> , isolats IPJ27 (gauche) et IPR27 (droite), cultures âgées de 15 jours, milieu de culture PDA	28
12	Récupération (gauche) et désinfection (droite) des sclérotés.	31
13	Mise en culture des sclérotés	33
14	Evaluation de la croissance mycélienne.	35
15	Viabilité des sclérotés de deux isolats de <i>Rhizoctonia solani</i> .	37
16	Effet de la source d'azote et du pH du milieu sur la croissance mycélienne de <i>Rhizoctonia solani</i> , isolat IPJ27	38
17	Effet de la source d'azote et du pH du milieu sur la croissance mycélienne de <i>R. solani</i> , isolat IPR27	38
18	Culture sur milieu CDA de <i>R. solani</i> , âge : 27 jours, S : sclérotés	41
19	Effet de la source d'azote et du pH du milieu sur le temps nécessaire à l'apparition des sclérotés chez deux isolats de <i>R. solani</i> .	41
20	Effet de la source d'azote et du pH du milieu sur le nombre de sclérotés produits par deux isolats de <i>R. Solani</i> .	42

Table des Matières

المُلخَص.....	<i>i</i>
Résumé.....	<i>i</i>
Abstract.....	<i>i</i>
Dédicace.....	<i>ii</i>
Remerciements.....	<i>iii</i>
Listes des tableaux et des figures.....	<i>iv</i>
Table des matières.....	<i>vi</i>
Introduction Générale.....	<i>viii</i>

Chapitre premier : Revue Bibliographique 10

I	La maladie : le rhizoctone brun de la pomme de terre	10
I. 1	Introduction	10
I. 2	Agent causal : <i>Rhizoctonia solani</i>	10
I. 2.1	Classification	12
I. 2.2	Description du pathogène	12
I. 2.3	Reproduction	13
I. 3	Symptomatologie	14
I. 4	Epidémiologie	16
I. 4.1	Cycle de la maladie	16
I. 4.2	Conservation de l'inoculum	17
II	La plante hôte : la pomme de terre <i>Solanum tuberosum</i> L.	18
II. 1.	Origine et historique de la pomme de terre	18
II. 2	Description de la plante	18
II. 3	Valeur nutritionnelle	20
II. 4	Maladies de la pomme de terre	20
	Objectif du travail.....	25

Chapitre deuxième : Matériel et Méthodes 26

II. 1	Matériel végétal	26
II. 2.	Matériel fongique	27
II. 3.	Milieus de culture	28
III. 1.1	Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)	28
III. 1.2	Milieu CDA (Czapek Dox Agar)	29
II. 4	Isolement de l'agent pathogène	30
II. 5	Conduite des essais	30
II. 5.1	Protocole expérimental	31
II. 5.2	Viabilité des sclérotés	31
II. 5.3	Croissance mycélienne	32
II. 5.4	Formation des sclérotés	33
II. 5.5	Nombre de sclérotés	33
II. 6	Traitement statistique	33

Table des matières

II. 6.1	Analyse de variance et comparaison des moyennes	33
II. 6.2	Dispositifs statistiques	34
	<i>Chapitre troisième : Résultats et Discussion</i>	36
III. 1.	Résultats	36
III.1.1.	Viabilité des sclérotés	36
III.1.2.	Croissance mycélienne	36
III.1.3.	Formation des sclérotés	38
III.1.4.	Nombre des sclérotés	40
III. 2.	Discussion	41
	Conclusion et perspectives	43
	Références bibliographiques	44
	Annexes	47

Introduction générale

Conséquence du développement agricole, la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) a pris une place de premier rang dans la consommation de l'algérien et dans l'économie agricole de notre pays. A nos jours, la culture de pomme de terre occupe le deuxième rang parmi les vingt cultures vivrières. Néanmoins ce développement ne peut continuer dans cette allure sans qu'il y ait des contraintes de différentes natures qui peuvent influencer négativement cette activité. Entre autres, il y a lieu de citer les contraintes d'ordre sanitaire qui se manifestent par le développement de ravageurs et de maladies causées par des organismes de différentes sortes.

Parmi les maladies les plus récurrentes et qui causent de dégâts considérables, se traduisant par des pertes de rendement et une dépréciation de la qualité marchande des tubercules, nous citons le rhizoctone brun qui est une maladie cryptogamique causée par le champignon *Rhizoctonia solani* Kühn. Ce dernier est un champignon à large gamme d'hôte incluant en plus de la pomme de terre, surtout la betterave sucrière, la carotte, ...etc.

Afin de bien lutter et gérer les maladies des cultures, il est impératif de connaître et de caractériser les agents pathogènes qui en sont la cause. En effet, l'étude de la biologie, de l'écologie et les conditions de croissance et de développement des pathogènes, constitue un pas important dans la compréhension de la relation hôte-pathogène et facilite à terme la mise en place d'une stratégie de gestion et de lutte contre les aléas phytosanitaires

C'est dans cet objectif que nous nous sommes proposé à caractériser des isolats de *R. solani*, agent causal du rhizoctone brun de la pomme de terre. La caractérisation porte sur l'étude de l'effet de deux formes d'azote combinées à deux points de pH du milieu de culture sur la croissance et le développement d'isolats de *R. solani* Kühn. Les isolats sont récupérés de deux variétés de pomme de terre de saison, largement cultivées et consommées en Algérie et produite dans la région de Mostaganem (Algérie), il s'est agi de la variété *Spunta*, qui est une variété à peau jaune et la variété *Désirée* ; variété à peau rouge.

Le présent document conçu en trois chapitre distincts, il rapporte quelques connaissances bibliographiques concernant l'agent pathogène, la plante hôte et les principaux résultats obtenus au terme des expérimentations ; expérimentations réalisées au niveau des laboratoires du département des sciences agronomiques de l'université Med Boudiaf de M'sila (Algérie).

Chapitre premier : Revue Bibliographique

I. La maladie : le rhizoctone brun de la pomme de terre

I.1. Introduction

Le rhizoctone brun est une maladie cryptogamique et cosmopolite affectant la pomme de terre, elle est considérée comme l'une des maladies les plus économiquement importantes. Elle intervient au moment de la levée sur les jeunes pousses de la pomme de terre et déprécie fortement les tubercules récoltés. La maladie est connue aussi sous d'autres noms tels que le rhizoctone noir, la variole des tubercules ou encore maladie des manchettes.

I.2. Agent causal : *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani est en fait le stade asexué ou l'anamorphe de *Thanatephorus cucumeris* qui se classe parmi les Basidiomycètes, ordre Homomycetales et famille *Corticaceae*. *R. solani* est un champignon thermophile, en dessous de 9°C, il ne peut pas se développer. Par contre, à 20°C, la période de croissance n'est que de 3 jours et à ce moment, la propagation de l'infection est très rapide. C'est principalement un champignon d'été ou de saison chaude. Le champignon se situe dans les couches supérieures du sol en pleine terre, et il peut se conserver plusieurs années en l'absence de végétaux ou de conditions propices à son développement.

I.2.1. Classification

Tableau 01 : Classification de *Thanatephorus cucumeris*, anamorphe *R. solani* Kühn

<https://www.mycobank.org/page/Simple%20names>, (Consulté le 27/06/2021)

Règne	<i>Fungi</i>
Embranchement	<i>Basidiomycota</i>
Phylum	<i>Agaricomycotina</i>
Classe	<i>Agaricomycetes</i>
Ordre	<i>Cantharellales</i>
Famille	<i>Ceratobasidiaceae</i>

Genre	<i>Thanatephorus</i>
Espèce	<i>Thanatephorus cucumeris</i> , téléomorphe (anamorphe <i>Rhizoctonia solani</i>)

I-3. Symptomatologie

Les symptômes du rhizoctone brun concernent les germes, les feuilles, les tiges et les parties souterraines de la pomme de terre, y compris les tubercules (fig. 03, 04, 05 et 06). L'attaque intervient souvent lors de la germination des tubercules, en se manifestant par des manques à la levée. Le pathogène cause des lésions brunâtres sur les germes blancs et les nouveaux germes qui apparaissent à l'aisselle des précédents, sont également attaqués, ce qui donne un aspect buissonnant aux pousses.

Les attaques en culture se traduisent par un enroulement des feuilles, une formation de tubercules aériens et une apparition d'une gaine gris-blanc de mycélium à la base des tiges en conditions humides d'où le nom de maladie des manchettes. Suivant l'organe, Trehorel et Jouan (2001), décrivent les symptômes suivant :

- ✓ **Germe** : mortalité des germes, manque à la levée, levée inégale ou tardive des plants, lésions ou chancres brun foncé sur les nouveaux germes.
- ✓ **Feuille** : jaunissement des marges, rosissement à rougissement du limbe, enroulement et flétrissement. Présence de petits tubercules aériens à l'aisselle des feuilles basales.
- ✓ **Tige** : présence d'une coloration brun rougeâtre à brun foncé de l'épiderme conduisant à la formation de chancres. Réduction du nombre de tiges par plant. Dans le cas d'infection grave et en conditions humides, présence d'un mycélium blanc grisâtre (stade sexué du champignon) dans la partie basale de la tige près du sol. Le mycélium est superficiel et facilement enlevé par frottement. Parfois les chancres ceinturent toute la tige, interférant avec le transport de l'eau et des éléments minéraux. Production de tubercules groupés à la base de la tige.
- ✓ **Racine** : sur endroits. Production de tubercules aériens à la surface du sol.
- ✓ **Stolon** : avortement, présence de taches brun rougeâtre à brun foncé, profondes et fendues, qui cause des retards de croissance ou la mortalité. Interfère dans la translocation de l'amidon vers les tubercules.

- ✓ **Tubercule** : réduction de la grosseur et du nombre de tubercules, présence de sclérotés bruns à noirs à la surface du périderme et parfois au point d'attache du stolon au tubercule. Les sclérotés sont très visibles sur les tubercules lavés, car ils résistent au lavage. La pelure est rugueuse et la chair n'est pas atteinte. Dans le cas de fortes infestations, les tubercules sont déformés (fossette, aspect réticulé de la pelure, boulage, fendu, etc.) où il y a la formation de tubercules aériens.

I. 4. Epidémiologie

Rhizoctonia solani est un champignon tellurique, il se conserve dans le sol sous forme de sclérotés et/ou sous forme de fragments de mycélium. Ces formes de conservation et les sclérotés sur les tubercules de pomme de terre forment les principales sources de contamination et d'inoculation.

I.4.1. Cycle de la maladie

Les sclérotés hivernent dans le sol et sur les tubercules de semence ou sous la forme de mycélium sur les résidus de cultures (figure 07). Notons que *R. solani* survie en saprophyte pour longtemps en colonisant des déchets végétaux.

Au printemps, les sclérotés germent et infectent, tout au long de la saison de croissance, les tubercules, les stolons, les racines. Les germes des tubercules semis constituent le stade de développement le plus critique pour les infections car elles sont souvent causées par le mycélium présent sur les tubercules de semence. Le champignon pénètre directement et souvent via les blessures. Une fois que l'infection ait lieu, elle se propage des tubercules et des germes aux autres organes, aériens surtout, où le stade téléomorphe du pathogène se développe (Rivera et al., 2013).

I.4.2. Conservation de l'inoculum

R. solani est très fréquent dans les sols ayant porté à plusieurs reprises des cultures légumières. Sa capacité de se maintenir comme saprophyte et sa polyphagie lui permettent de se conserver dans le sol en absence d'hôtes sensibles. On le retrouve à l'état de mycélium et de pseudo-sclérotés, souvent dans la matière organique et les débris végétaux les plus divers et qu'il les colonise aisément. (Grosch et al., 2005). Le champignon peut se conserver dans le sol sous forme de mycélium ou de petits sclérotés noirs typiques, très adhérents à l'épiderme des tubercules contaminés. (Rivera et al., 2013 ; Scherwinski et al., 2008).

II. La plante hôte : la pomme de terre *Solanum tuberosum* L.

II.1. Origine et historique de la pomme de terre

La pomme de terre est une plante imposée comme légume universel et du premier plan dans le monde entier. Elle est originaire de l'Amérique de sud. La première culture de la pomme de terre a commencé il y a 8000 ans en Amérique du sud, dans le sud du Pérou à la frontière de Bolivie, ensuite cette culture a été généralisée dans plusieurs régions des Andes (Polèse, 2006). Après la découverte du nouveau monde, les espagnols découvraient la pomme de terre vers l'an 1530. Depuis l'Espagne, cette plante est diffusée dans les jardins européens, et ce n'est qu'entre 1564 et 1573 que la culture de la pomme de terre a commencé réellement, ensuite elle est introduite en France puis en Algérie pendant la période coloniale (Rousselle et *al.*, 1996).

En Algérie la pomme de terre est devenue de plus en plus importante dans le régime alimentaire. La consommation annuelle de ce tubercule était de 35 kg/habitant en 1990, elle est passée à 57 kg en 2005 (FAO, 2008). Les dernières décennies, la culture de pomme de terre n'a cessé de consolider sa place dans l'agriculture, l'économie et les habitudes alimentaires de l'algérien occupant ainsi le deuxième rang sur les vingt principales cultures vivrières. Cependant, elle est cultivée presque le long de l'année et à travers toutes les régions du pays en se déclinant en cultures de primeurs, cultures de saison et en cultures d'arrière-saison.

II.3. Valeur nutritionnelle

Tableau02 : Composition chimique du tubercule (Gravouelle, 1997).

Constituants	Valeur moyenne en % du poids frais	Écarts
Eau	77,5	63 – 86
Matière Sèche totale	22,5	13 – 36
Glucides totaux	19,4*	13 – 30
Protides	2,0	0.7 – 4.6
Lipides	0,1	0.02 – 0.96
Cendres	1,0	0.4 – 1.9

* Dont 0.6% (écart 0.2–3.5) de non-extractibles (fibres) comprenant la cellulose, l'hémicellulose, les substances pectiques, les subérines et les lignines.

Chapitre deuxième : Matériel et Méthodes

II.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de tubercules de pomme de terre (*Solanum Tuberosum* L.) appartenant à deux variétés largement cultivées et consommées en Algérie. Il s'agit de la *Désirée* qui est une variété à peau rouge et de la *Spunta* qui est une variété à peau jaune. Les caractéristiques de ces deux variétés sont répertoriées dans le tableau 05.

L'origine géographique des deux variétés est la région de Mostaganem (Algérie) ; région où la culture de la pomme de terre est très pratiquée. En vue d'étudier l'agent causal du rhizoctone brun, le choix des tubercules a concerné ceux présentant des symptômes de la maladie, autrement dit, des tubercules portant des sclérotés (figure 10).

II.2. Matériel fongique

Rhizoctonia solani Kühn, agent du rhizoctone brun de la pomme de terre (figure 15) est le matériel fongique objet de l'étude. Il s'agit d'isolats obtenus par isolement direct à partir de tubercules portant des sclérotés (*cf.* Isolement de l'agent pathogène).

II.3. Milieux de culture

Pour l'ensemble des manipulations mycologiques, deux milieux de cultures sont utilisés, le milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*), utilisé pour l'isolement, l'évaluation de la viabilité des sclérotés et la purification des cultures de l'agent pathogène. Pour le suivi de la croissance et le développement des cultures fongiques, le milieu *Czapek Dox Agar* (CDA) est retenu. Excepté sa source de carbone, le milieu CDA est un milieu minéral permettant ainsi de modifier la source d'azote. Selon Rapilly (1968), la composition de ces deux milieux est la suivante :

III.1.1. Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*)

a. Composition

La composition du milieu PDA est rapportée dans le tableau 06.

Tableau 06 : Composition du milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Ingrédient	Quantité
Pomme de terre	200g
Glucose	15g
Agar agar	15g
Eau q.s.p.	1000ml

b. Préparation

Peler, laver, couper en tranche la pomme de terre. Cuire 15 à 20 minutes dans 200ml d'eau, filtrer sur mousseline et presser. Ajouter le glucose au filtrat, compléter le volume à 1000ml, ajouter l'agar agar, la bien dissoudre en agitant. Autoclaver pendant 20 minutes à 121° C.

III.1.3. Milieu CDA (*Czapek Dox Agar*)

a. Composition

La composition du milieu CDA est rapportée dans le tableau 07.

Tableau 07 : Composition du milieu Czapek Dox Agar (CDA)

Ingrédient	Quantité
NaNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄	0.5g
KCl	0.5g
FeSO ₄	0.01g
Saccharose	30g
Agar agar	15g
Eau q.s.p.	1000ml

b. Préparation

Dans différents volume d'eau distillée faire dissoudre séparément les substances minérales, une fois dissoutes mélanger l'ensemble des solutions. Ajouter le saccharose toute en chauffant et en agitant, compléter le volume à 1000ml, ajouter l'agar agar, la bien dissoudre. Autoclaver pendant 20 minutes à 121° C.

En guise de milieu de base qui servira à modifier la source d'azote, le milieu CDA est préparé sans les nitrates de sodium (NaNO_3). Au terme du mélange de l'ensemble des ingrédients, un litre du milieu est scindé en deux parties, l'une est additionnée de 01g de NaNO_3 pour un milieu CDA avec source minérale d'azote, alors que, la deuxième partie est additionnée de 1g de proline (α -aminoacide), constituant ainsi la forme organique de l'azote dans le milieu.

***NB** : Au terme de la préparation du milieu, son pH est ajusté à 5,5. Le même milieu avec ses deux sources d'azotes est également préparé pour un point de pH de 6,5.*

II.4. Isolement de l'agent pathogène

L'isolement du *R. solani* est effectué sur des tubercules portant à leur surface des sclérotés du champignon (figure 11). Préalablement à l'isolement, les tubercules des deux variétés pris séparément, sont bien lavés à l'eau courante pour les débarrasser de la terre adhérente. Une fois bien propres, ils sont lavés de nouveau à l'eau stérile, essuyés à l'alcool éthylique pour les désinfecter de surface et puis bien rincer une autre fois à l'eau stérile. A l'aide du papier buvard, les tubercules sont enfin séchés.

A l'aide d'un scalpel stérilisé préalablement, les sclérotés sont délogés de la surface des tubercules de chacune des variétés (figure 12). A la fin de leur récupération, ils sont directement mis dans deux bains d'hypochlorite de sodium à 02% pendant 02minutes en vue de leur désinfection. Les bains d'hypochlorite de sodium sont intercalés par des bains de rinçage à l'eau distillée stérile et ce pendant 05minutes par bain (figure 13). A la fin de la désinfection, les sclérotés sont alors séchés sur papier whatman stérile.

II.5.1. Protocol expérimental

Afin d'étudier l'effet de la source de l'azote dans le milieu de culture et du point de pH sur la croissance mycélienne, la formation et le nombre de sclérotés formés chez deux isolats de *R. solani*, 08 lots expérimentaux sont

constitués (tableau 08) sur la base des critères suivants :

- ✓ Deux isolats de *R. solani*, l'un isolé à partir de la variété *Spunta* et l'autre de la variété *Désirée*. En référence à la couleur de la peau des tubercules et la région d'origine des isolats, les deux isolats sont respectivement baptisés IPJ27 et IPR27.
- ✓ Deux sources d'azote *i.e.* une source minérale (NaNO_3) et une source organique (Proline)
- ✓ Deux points de pH, à savoir 5,5 et 6,5.

Cependant, la combinaison 02 isolats x 02 sources d'azote x 02 point de pH fait ressortir 08 lots. En guise de répétition de traitement, chaque lot expérimental est constitué de trois boites de Pétri.

Tableau 08 : Identification des lots expérimentaux

Source d'azote	NaNO_3				Proline			
	5,5		6,5		5,5		6,5	
Lot	IPJ27	IPR27	IPJ27	IPR27	IPJ27	IPR27	IPJ27	IPR27

II.5.2. Viabilité des sclérotés

La viabilité des sclérotés des deux isolats de l'agent pathogène est testée en mettant en culture sur milieu PDA les sclérotés désinfectés. A cet effet, 21 sclérotés par variété de pomme de terre ou par isolat sont mis en culture dans des boites de Pétri de 85mm de diamètre, coulées préalablement de 10ml du milieu PDA, à raison de 07 sclérotés par boite (figure 13). Les boites sont alors incubées à 23° C. 48heures après, les sclérotés germés (émission d'hyphes) sont compté et le pourcentage de viabilité est alors calculé en se rapportant au nombre de sclérotés mise en culture. Notons que les cultures en boite sont conservées est utilisées comme cultures stocks pour les essais ultérieures.

II.5.3. Croissance mycélienne

La croissance mycélienne des isolats IPJ27 et IPR27 est évaluée dans le temps en fonction de la source d'azote et du pH du milieu de culture. A cet effet, des disques mycéliens de 08 mm de diamètre chacun, pris aseptiquement à l'aide d'un emporte-pièce, de la périphérie croissante de la culture de chacun des isolats, sont déposés au centre des boîtes de Pétri, préalablement coulées séparément avec 10 ml des milieux en tenant compte la source d'azote et le point de pH du milieu. Les boitesensemencées sont ensuite mises à incuber à 23° C.

La croissance mycélienne dans l'ensemble des boîtes est alors évaluée tous les trois jours en mesurant au moins deux diamètres perpendiculaires de la colonie (figure 14) et ce jusqu'à ce que les cultures fongiques atteignent les bords des boites de Pétri (Tegegne & *al.*, 2008).

II.5.4. Formation des sclérotés

Courant les mesures de la croissance mycélienne, les boites de Pétri sont minutieusement auscultées une à une à fin de relever ou de détecter l'apparition des sclérotés. Une fois apparus, le nombre de jours écoulés comptant de la date de la mise en culture est noté.

II.5.5. Nombre de sclérotés

Au terme de la cinétique de croissance et suite au dénombrement des sclérotés, la densité de ces derniers par cm² est calculée suivant la formule ci-après :

$$\text{Nombre de Sclérotés/cm}^2 = \frac{\text{Number de Sclérotés par boite}}{S}$$

Dont S est la surface de la boite de Pétri = $\pi \cdot R^2 = 56,71\text{cm}^2$

II.6. Traitement statistique

II.6.1. Analyse de variance et comparaison des moyennes

Les résultats de l'ensemble des variables mesurées ont subi des traitements statistiques en utilisant le software Statbox 6.4, (*Optima*®, Floirac, France.). Les effets

des différents facteurs étudiés, de leurs interactions ainsi que les données des différentes variables mesurées ont fait l'objet d'une analyse de variance (*ANOVA*).

Le test de Newman et Keuls au seuil de 5% est appliqué pour la comparaison des moyennes des différents traitements (Vessereau, 1992).

III.6.2. Dispositifs statistiques

Suivant l'essai et la variable mesurée, différents dispositifs statistiques sont adoptés.

- ✓ Un dispositif à un seul critère de classification, à savoir le facteur Isolat (factoriel en randomisation totale avec répétitions) a été adopté pour l'analyse de variance relative à la variable viabilité des sclérotés (tableau 09) ;
- ✓ Un dispositif à quatre critères de classification à savoir les facteurs Isolat, Source d'azote, pH du milieu et Temps (factoriel en randomisation totale avec répétitions) a été adopté pour l'analyse de variance relative à la variable croissance mycélienne (tableau 10) ;
- ✓ Un dispositif à trois critères de classification à savoir les facteurs Isolat, le facteur source d'azote et le facteur pH du milieu (factoriel en randomisation totale avec répétitions) a été adopté pour l'analyse de variance relative aux variables Formation des sclérotés et le nombre de sclérotés par cm² (tableau 11).

Tableau 09 : Dispositif statistique relatif à la variable Viabilité des sclérotés.

Facteur 1 (F1)	
Isolat	
Modalité 1	Modalité 2
<i>IPJ27</i>	<i>IPR27</i>

Tableau 10 : Dispositif statistique relatif à la variable Croissance mycélienne.

Facteur 1 (F1)	Facteur 2 (F2)	Facteur 3 (F3)	Facteur 4 (F4)
Isolat	Source d'azote	pH	Temps (jour)

Md 1	Md 2	Md1	Md2	Nv1	Nv2	N 1	N 2	N 3	N 4	N 5	N 6	N 7	N 8	N 9	N 10
<i>IPJ</i> 27	<i>IP</i> <i>R</i> 27	<i>NaNo₃</i>	<i>Proline</i>	5,5	6,5	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27

Md : Modalité ; *N* : Niveau.

Tableau 11 : Dispositif statistique relatif aux variables Formation et nombre de sclérotés.

Facteur 1 (F1)		Facteur 2 (F2)		Facteur 2 (F2)	
Isolat		Source d'azote		pH	
Md1	Md2	Md1	Md2	N1	N2
<i>IPJ27</i>	<i>IPR27</i>	<i>NaNo₃</i>	<i>Proline</i>	5,5	6,5

Md : Modalité ; *N* : Niveau.

Chapitre troisième : Résultats et discussion

III. 1. Résultats

III.1.1. Viabilité des sclérotés

La figure 13 représente les résultats relatifs à l'évaluation de la viabilité des sclérotés des isolats IPJ27 et IPR27.

Les résultats de l'analyse relèvent que les sclérotés de *Rhizoctonia solani* survivent sur les tubercules quel que soit la variété à partir de laquelle sont isolés. Cependant, la totalité des sclérotés mis en culture sur milieu PDA gardent leur viabilité indépendamment de la variété de pomme de terre à partir de laquelle sont tirés.

III.1.3. Formation des sclérotés

Au fur et à mesure du suivi de la cinétique de la croissance mycélienne des deux isolats, le temps écoulé entre la mise en culture et l'émergence des premiers sclérotés a été noté en comptant le nombre de jours pour l'ensemble des lots expérimentaux (Figure 18). Les résultats obtenus sont rapportés dans la figure 19.

Figure 18 : Culture sur milieu CDA de *R. solani*, âge : 27 jours, S : sclérotés
(Originale 2023)

Figure 19 : Effet de la source d'azote et du pH du milieu sur le temps nécessaire à l'apparition des sclérotés chez deux isolats de *R. solani*.

III.1.4. Nombre des sclérotés

Les résultats du dénombrement des sclérotés produits par *R. solani* sont illustrés dans la figure 20. Cependant, il est clair que l'isolat IPJ27 produit un peu plus de sclérotés que l'IPR27 quel que soit le milieu de culture, excepté le milieu à 6,5 de pH et dont la source d'azote est minérale où le nombre de sclérotés issus de l'IPJ27 ; 1,3 sclérotés par cm² en moyenne, dépasse celui de l'IPR27 avec une moyenne générale de 0,93 sclérotés par cm². Néanmoins, cette différence entre les deux isolats en matière de l'abondance des sclérotés reste statistiquement insignifiante ($P > 0,05$).

III. 1. Discussion

Rhizoctonia est un genre de champignon qui peut se développer comme saprophyte sur les débris végétaux en décomposition et dans le sol et comme parasite engendrant des maladies sur une large gamme de plantes cultivées. Ce champignon est un phytopathogène formant des mycéliums et des sclérotés dans le sol et sur le matériel végétal résiduel (Frank et Leach, 1980). *R. solani* entraîne d'importantes pertes de rendement pour la pomme de terre en raison d'un certain nombre de processus néfastes, notamment la formation de sclérotés sur les tubercules récoltés, qui entraînent la maladie du rhizoctone brun. Dans certains cas, cette maladie entraîne des pertes de rendement commercialisable allant jusqu'à 30 % (Salamone et Okubara, 2020). Les sclérotés des tubercules en décomposition et les mycéliums présents dans la matière organique restent viables dans le sol pendant de nombreuses années et servent d'inoculum aux maladies à *Rhizoctonia* sur les cultures de pommes de terre ultérieures (Salamone et Okubara, 2020). Le pathogène se propage et se conserve grâce aux sclérotés qu'il peut. Les sclérotés sont des propagules très résistantes aux conditions défavorables à la croissance et au développement de cet agent phytopathogène. Leur viabilité dans le temps et dans l'espace assure alors la propagation et la dissémination des maladies qu'il cause.

Conclusion et perspectives

Le rhizoctone brun de pomme de terre, causé par *Rhizoctonia solani* Kühn est une maladie cryptogamique qui cause des dégâts considérables se traduisant par des pertes de rendement et une dépréciation de la qualité marchande des stocks. L'étude du pathosystème *Solanum tuberosum*/*Rhizoctonia solani* et la maîtrise de la gestion de cette maladie passe par la connaissance et la caractérisation de l'agent causal sur le plan biologique, écologiques et épidémiologique.

Dans ce sens, l'étude l'effet de la forme de l'azote combinée au point du milieu de culture sur la croissance et le développement de ce pathogène nous laisse mettre davantage l'accent sur les conditions nutritionnelles sur sa biologie et son écologie. En effet, lorsque l'azote du milieu est minéral, il semble qu'il est mieux et facilement assimilé que s'il est organique, ce qui s'est traduit clairement sur la cinétique de la croissance et développement. Le mode asexué de propagation de *R. solani* via les sclérotés, qui est le mode dominant, limite fortement l'apparition de variabilité intra spécifique, ce qui génère des isolats fortement semblables et qui se comportent identiquement à l'égard des facteurs étudiés, arguant davantage que souvent les isolats issus des pommes de terre à peau jaune ne diffèrent guère de ceux isolés des pommes de terre à peau rouge.

En fin et dans la continuité nous suggérons que cette étude soit suivie en étudiant d'autres sources de nutriment séparément et combinées en plus de d'autres facteurs physicochimiques que le pH.

Références bibliographiques

- Attrassi K., Benkirane R., Attarassi B., Badoc A. & Douira A. Effet de la source de carbone et d'azote sur la Croissance et la sporulation de moisissures des pommes en conservation. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 2007, 146, 211-2
- Bedin P. 1994. Pomme de terre. Bien connaître les principaux ravageurs et maladies. Perspectives Agricoles N°189, ITPT et ITCF : pp 36-39.
- Bedin P. 1996. Les ennemis ; le rhizoctone brun de la pomme de terre. in. La pomme de terre, production, amélioration, ennemis et maladies et utilisation (Rousselle P., Robert Y. et Crosnier J.C., ed.): pp 291-295. INRA Editions Paris.
- Camporota P. 1986. Obtention de la forme sexuée de *Rhizoctonia solani* Kühn : *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk . *agronomie*, EDP Science , ,6 (3):305-307.
- FAO.2008. Statistique Agricole. Food and Agricultural Organisation.
- Fauconnier M.L., Rojas-beltran J., Delcarte J., Dejaeghere F., Marlier M. et Du jardin P. 2002. Lipoxygenase pathway and membrane permeability and composition during storage of potato tuber (*Solanum tuberosum* L. cv Bintje and Désirée) in different conditions. *Plant Biol.* 4: pp 77-85.
- Frank, J.A., Leach, S.S., 1980. Comparison of tuberborne and soilborne inoculum in the *Rhizoctonia* disease of potato. *Phytopathology* 70, 51–53.
- Gaucher D .1997. Pomme de terre. le point sur les maladies en végétation. perspectives agricoles N°224, ITPT et ITCF: pp94-99.
- Gaucher D. 1997. Pomme de terre. Gros plan sur quelques maladies de tubercules. Perspectives Agricoles N°220, ITPT et ITCF : pp 67-74
- Gravouelle J.M. 1996. Utilisations et débouchés ; utilisation pour l'alimentation humaine. in. La pomme de terre, production, amélioration, ennemis et maladies et utilisation (Rousselle P., Robert Y. et Crosnier J.C., ed.) : pp 451-493. INRA Editions Paris.
- Gravouelle J.M. 1997. Pomme de terre à "chair ferme". Les facteurs qui conditionnent la qualité. Perspectives Agricoles N°221, ITPT et ITCF : pp 91-97.

- Grosch R., Faltin F., Lottmann J., Kofot A. & Berg G. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani* with bacterial antagonists in organic farming. International Workshop : development of biocontrol agents of diseases for commercial applications in food production systems Sevilla -Spain 24-27 March 2004.
- Lepoivre P., 2003. Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. Ed. De Boeck, Presse. Agronomique de Gembloux, Gembloux, Belgique.
- Moor R.T. 1987. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi. Mycotaxon, 29:99–91
- Muzhinji N., Truter M.W., Oodhall J.W. & Van Der Waals J. E. 2015. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* from potato in South Africa. Plant Dis. 99:1790-1802.
- Polise J.M. 2006. La culture des pommes de terre. Ed. Artémis, Paris. 95p.
- Rapilly (1968). Les techniques de mycologie en pathologie végétal. Annales des epiphytes, INRA, Paris, France. 102p.
- Rivera M.C., Wright E.R., Fabrizio M.C., Freixá G., Cabalini R., Lopez S.E. 2013. Control of seedling damping off caused by *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* using onion broths. International Journal of Experimental Botany. 82: 227-234.
- Rossignol L. et Rousselle-Bourgeois F. 1996. La plante ; Botanique, morphologie et taxonomie. in. La pomme de terre, production, amélioration, ennemis et maladies et utilisation (Rousselle P., Robert Y. et Crosnier J.C., ed.) : pp 49-68. INRA Editions Paris
- Rousselle P., Robert Y. et Crosnier J.C., ed. 1996. La pomme de terre, production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. INRA Editions. Paris 607p.
- Salamone A.L. & Okubara P.A. 2020. Real-time PCR quantification of *Rhizoctonia solani* AG-3 from soil samples. Journal of Microbiological methods 172: 105914.
- Scherwinski K., Grosch R. & Berg G. 2008. Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms. FEMS Microbiology Ecology, 64 (1), 106–116.

- Smiley, R.W., Ogg, A.G. Jr., and Cook, R.J. (1992) Influence of glyphosate on Rhizoctonia root rot, growth and yield of barley [archive]. *Plant Disease* 76: 937-942 (Notice/résumé INIST-CNRS).
- Soltner D. 1998, les grandes productions végétales : céréales. Plantes sarclées .Sciences et technique agricole.
- Tegege G.,Pretorius J.C.& Swart W.j.(2008). antifungal propertie of Agapanthus africanus L.extracts against plant pathogens . *Groprotection* 27:1052-1060.
- Treholer F. et Jouan B. 2001. Des méthodes de lutte contre le rhizoctone de la pomme de terre en agriculture biologiques. *Alter Agri*. 13 N° 49: pp 11-15. INRA. Paris
- Wharton, P., Kirk, W., Berry, D et snapp, S .2007. Rhizoctonia stem canker and black scurf of potato. *Bulletin E 2994*. Michigan state university .6p.
- Wharton, P., Kirk, W., Berry, D et Snapp, S(2007).Rhizoctonia stem canker and black scurf of potato. *Bulletin E2994*.Mitchigan state university.6PP.

Analyses de variance de la variable Croissance Mycélienne

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	Effet du traitement
Variation Totale	184610.5	239	772.429			
Isolat	44.203	1	44.203	0.633	0.43314	Non significatif
Source d'azote	4498.328	1	4498.328	64.395	0	Hautement significatif
pH	1188.516	1	1188.516	17.014	0.0001	Hautement significatif
Temps	153237	9	17026.34	243.737	0	Hautement significatif

Comparaison des moyennes de la variable Croissance Mycélienne. (Facteurs 1*2*3)

Isolar/S.A/pH	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES		
2.0 1.0 1.0	IPR Min P5	73.36	A		
2.0 1.0 2.0	IPR Min P5	73.31	A		
1.0 1.0 2.0	IPJ Min P5	72.187	A		
2.0 2.0 1.0	IPR Org P5	71.395	A		
1.0 1.0 1.0	IPJ Min P5	70.753	A		
1.0 2.0 1.0	IPJ Org P5	65.685		B	
1.0 2.0 2.0	IPJ Org P5	65.383		B	
2.0 2.0 2.0	IPR Org P5	52.512			C

Analyse de variance de la variable Formation des Sclérotés.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	Effet du traitement
Variation Totale	975.333	23	42.406			

Isolat	0.167	1	0.167	0.019	0.88763	Non significatif
Source D'azote	816.667	1	816.667	92.453	0	Hautement significatif
pH	10.667	1	10.667	1.208	0.28834	Non significatif

Comparaison des moyennes de la variable Formation de sclérotés : (Facteurs 1*2*3)

S. A	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES	
2.0	Org	18.5	A	
1.0	Min	6.833		B

Analyses de variance de la variable Nombreux de sclérotés

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	Signification
VAR.TOTALE	17.189	23	0.747			
Isolat	0.842	1	0.842	1.094	0.31227	Non significatif
Source d'azote	0.19	1	0.19	0.246	0.63118	Non significatif
pH	1.669	1	1.669	2.168	0.15717	Non significatif

S. A: Source D'Azote