

Projet Interdisciplinaire

**Effet de la pression en fongicide et de
l'accès à la ressource nutritive sur la
croissance mycélienne de champignons
phytopathogènes nécrotrophes**

Clara Borel
Mario Serouart
Clémentine Denis

M1 - 2019



I. Introduction

L'Ascochytose, anciennement Anthracnose, est une des maladies aériennes la plus dévastatrice sur les cultures de pois, pouvant entraîner des pertes de rendement de l'ordre de 30 à 40%. Cette maladie est due à un complexe de trois champignons nécrotrophes dont l'espèce la plus dommageable est *Didymella pinodes* (*D. pinodes*), qui fait l'objet de notre étude.

La lutte chimique se fait classiquement à base de Chlorothalonil. Dans notre cas, le produit utilisé est le Banko, qui constitue actuellement le meilleur moyen de lutte contre cette maladie et une des solutions présentée comme la plus économique.

Notre groupe s'intéresse à la croissance mycélienne d'une souche de *D. pinodes* et aux éventuelles résistances au fongicide utilisé. Nous pourrions également utiliser les données des autres groupes de travail qui utilisent les espèces suivantes avec diverses souches : *D. pinodes* et *Phoma medicaginis pinodella* (*P. pinodella*) afin de pouvoir élaborer un modèle épidémiologique.

L'objectif de l'étude est de déterminer si la présence de ce fongicide et la limitation de l'accès à la ressource nutritive modifient les capacités de développement de l'ascochytose.

Pour cela, nous proposerons un modèle visant à estimer la croissance radiale du champignon. Puis dans un second temps, nous allons comparer les deux espèces de champignons entre elles quant à leur résistance au fongicide.

II. Matériel et méthode

1. Objectifs

Nous prévoyons d'exploiter les données de la manière suivante :

(1) les données "agents pathogènes" : Nous testerons l'espèce *D. pinodes*, et ensuite nous comparerons notre espèce avec l'autre.

(2) les données "fongicide" : Différentes concentrations de fongicides sont testées (Témoin, 300, 250, 200, 100, 50 mg.L-1).

Dans chaque cas, nous suivrons, après inoculation en conditions contrôlées (T = 20° C, lumière) :

1- La cinétique de développement du mycélium, mesure du diamètre en millimètres et estimation de la surface radiale.

2- Evaluation de la CI50 (concentration pour laquelle on observe 50% de réduction de la croissance), cela s'avère en réalité inexploitable, en effet la vitesse passe de 1,5 (mm/jour) pour 100 mg/L, à 4 pour 200 mg/L, puis de nouveau à 2 pour 250 mg/L, les mesures ne sont pas harmonieuses pour que l'on puisse interpréter, il aurait fallu une population décroissante quand on augmente le dosage du fongicide.

2. Protocole expérimental

a. Collecte des données

Préparation des boîtes de Petri :

La solution de spores est préparée pour une concentration de 105 spores.mL⁻¹. Ensuite, on dépose une goutte de 20μL de la suspension au centre de la boîte de culture (3 répétitions par modalité)

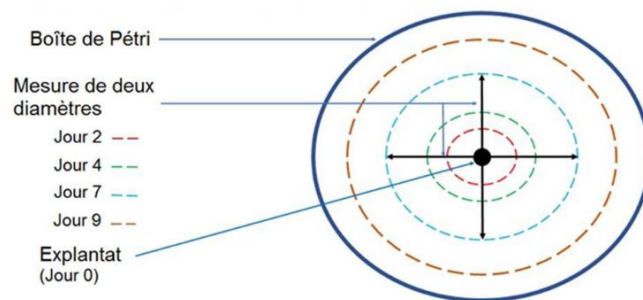


Figure 1 : Schéma du protocole de mesure de la croissance mycélienne

Pour effectuer le suivi de la croissance mycélienne il faut mesurer tous les deux jours le diamètre du mycélium développé sur le milieu de culture, et ce pendant 14 jours (voir Figure 1). Deux diamètres sont mesurés, l'un de manière perpendiculaire à l'autre, afin d'obtenir une moyenne.

b. Analyse statistique et modélisation

Dans un premier temps, nous allons étudier l'effet du temps sur la croissance de la souche dont nous avons récolté les données (Groupe 8, Dp 28), ainsi que l'effet du temps et de la quantité de fongicide (qualitatif) sur la croissance par des ANOVA. Dans toutes nos analyses de variance à facteurs multiples, l'interaction des facteurs entre eux est toujours prise en compte. On formule deux hypothèses sur les résidus : (H0) les résidus (E) suivent une loi normale centrée réduite et (H1) que leur variance est constante. L'évolution de la croissance suit le modèle linéaire suivant:

$$Dt = v * t + D0 + E (1)$$

avec $Dt = \text{diamètre en fonction du temps}$, $v = \text{vitesse de croissance} = \mu_v$, $D0 = \text{diamètre initial} = \mu_{R0}$.

L'évolution de la croissance en fonction de la dose de fongicide et du temps suit le modèle linéaire suivant:

$$Dt = v * t + D0 + E (2)$$

On considère toujours les hypothèses H0 et H1 avec $Dt = \text{diamètre en fonction du temps et de la dose de fongicide}$, $v = \text{vitesse de croissance} = \mu_v * \alpha_v$, $D0 = \text{diamètre initial} = \mu_{R0} * \alpha_{R0}$ avec α effet fongicide

Dans un deuxième temps, nous allons travailler sur les jeux de données de tous les groupes. On commence par une ANOVA pour étudier l'effet du temps sur la croissance (1). Puis, pour comparer les deux espèces, nous réalisons deux ANOVA, l'effet du temps sur la croissance de Dp (1) et l'effet du temps sur la croissance de Pp (1) en prenant les données de tous les groupes, en ne prenant pas en compte les différences entre les souches.

Si l'effet est significatif, nous évaluerons l'influence du temps (quantitatif) et de l'espèce (qualitatif; *D. pinodes* et *P. pinodella*, respectivement Dp et Pp) sur la croissance par une ANCOVA. L'évolution de la croissance suivra donc le modèle linéaire suivant:

$$Dt = v * t + D0 + E (3)$$

$v = \text{vitesse de croissance} = \mu_v * b_v$, $D0 = \text{diamètre initial} = \mu_{R0} * b_{R0}$ avec b effet espèce.

Ensuite, on compare l'effet de la souche (qualitatif) (Pp18, Pp10, Pp17, Pp8, Dp28, Dp1, Dp91, Dp5 et Dp20) et du temps sur la croissance de chaque espèce.

$$Dt = v * t + D0 + E (4)$$

$v = \text{vitesse de croissance} = \mu_v * c_v$, $D0 = \text{diamètre initial} = \mu_{R0} * c_{R0}$ avec c effet souche.

Dans un dernier temps, on regardera l'effet des fongicides sur la croissance. D'abord en réalisant une anova pour évaluer l'effet du temps et de la quantité de fongicide (qualitatif) sur la croissance. (2)

Puis, en réalisant une ANOVA de l'effet de la quantité de fongicide, de l'espèce et du temps sur la croissance.

$$Dt = v * t + D0 + E (5)$$

$v = \text{vitesse de croissance} = \mu_v * \alpha_v * b_v$, $D0 = \text{diamètre initial} = \mu_{R0} * b_{R0} * \alpha_{R0}$ avec α effet fongicide et b effet espèce.

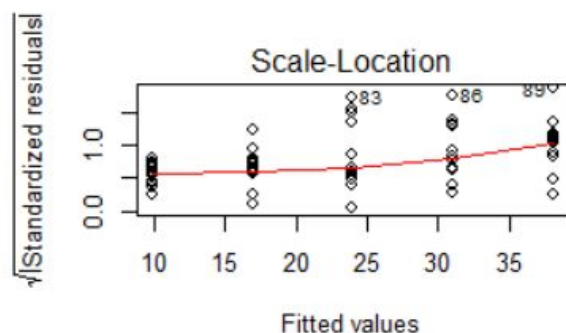
Enfin, en évaluant l'effet de la quantité de fongicide, de la souche et du temps sur la croissance fongique.

$$Dt = v * t + D0 + E \quad (6)$$

v =vitesse de croissance = $\mu_v * \alpha_v * c_v$, $D0$ = diamètre initial = $\mu_{R0} * \alpha_{R0} * c_{R0}$ avec c effet souche et α effet fongicide

III. Résultats

Résultats de l'analyse de la souche Dp28



Après avoir centré et réduit les données, on regarde si les résidus suivent un modèle linéaire, on considère que les hypothèses sont vérifiées (voir Figure 2).

Figure 2 : centrage - réduction des résidus

On réalise une première Anova pour observer l'effet temps (voir Figure 3). L'effet temps est significatif et a un effet positif sur la croissance mycélienne.

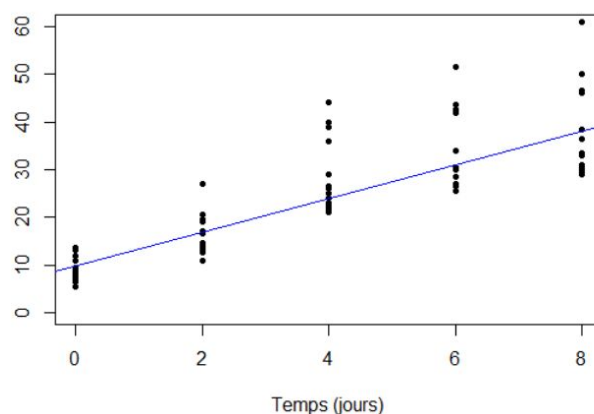


Figure 3: Evolution de la croissance mycélienne (ordonnées: mesures du diamètre en mm) en fonction du temps (jours)

L'Anova qui étudie l'effet du temps et du fongicide (et leur interaction) nous permet de dire que le fongicide a également un effet significatif sur la croissance du mycélium. Pour

connaître les modalités de cet effet, nous regardons les coefficients en fonction des doses de fongicides (Tableau 1 suivant).

Coefficients:					
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	10.85052	1.27432	8.515	1.86e-12	***
temps	2.93557	0.28260	10.388	6.80e-16	***
fongicide100mg	-1.98385	1.78136	-1.114	0.2692	
fongicide200mg	-0.95052	1.78136	-0.534	0.5953	
fongicide250mg	-1.48385	1.78136	-0.833	0.4076	
fongicide300mg	1.94317	1.82102	1.067	0.2896	
fongicide50mg	-3.95052	1.78136	-2.218	0.0298	*
temps:fongicide100mg	-0.03557	0.38003	-0.094	0.9257	
temps:fongicide200mg	0.28943	0.38003	0.762	0.4488	
temps:fongicide250mg	0.21443	0.38003	0.564	0.5744	
temps:fongicide300mg	1.88118	0.42811	4.394	3.81e-05	***
temps:fongicide50mg	0.13110	0.38003	0.345	0.7311	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Tableau 1 : Coefficients de l'ANOVA avec effet du temps et de la dose de fongicide sur la croissance du mycélium

La dose de fongicide à 50 mg a un effet significatif et négatif sur le diamètre de la colonie, on constate que l'estimate pour cet effet est de -3,95, si on compare à l'ordonnée à l'origine (Intercept = 10,85). L'interaction temps:fongicide300mg présente également un résultat significatif. L'estimate (= 1,88). Ce résultat indique que au fil du temps, avec un dose de 300mg de fongicide, il y a un effet positif sur la croissance.

Résultats de l'analyse de toutes les souches

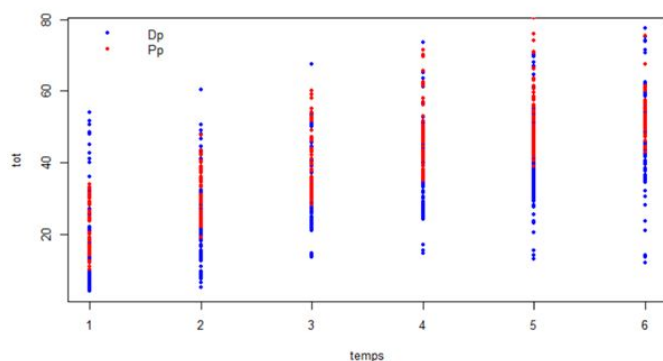
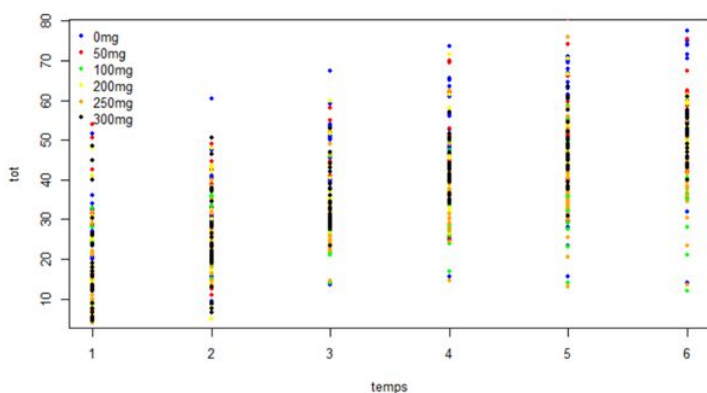


Figure 4 et 5 : Evolution de la croissance mycélienne de toutes les souches (tot= diamètre en mm) en fonction du temps (en jours)

Les résidus sont normalement distribués et les conditions de l'utilisation de l'ANOVA sont remplies. La Figure 4 ci-contre présente les résultats de l'évolution de la croissance mycélienne en fonction du temps avec les données des deux espèces et de toutes les souches. En rouge est représentée l'espèce *P. pinodella* et en bleu *D. pinodes*. Comme précédemment on observe un effet



significatif positif du temps sur la croissance. Dp semble avoir une plus grande amplitude alors que Pp semble plus rapide à croître. Le modèle linéaire ne semble cependant pas être toujours le meilleur pour modéliser la croissance du pathogène.

Les Figures 7 et 8 représentent l'évolution des mycélium en fonction du temps, mais cette fois-ci on a traité les espèces séparément. Comme nous l'avons vu sur la Figure 4, l'espèce Dp semble une plus grande amplitude, c'est-à-dire qu'il a plus de variations dans la croissance du mycélium. L'espèce Pp ne possède pas autant de variation mais semble avoir une vitesse de croissance plus élevée. Cette hypothèse peut être vérifiée en modélisant les deux courbes.

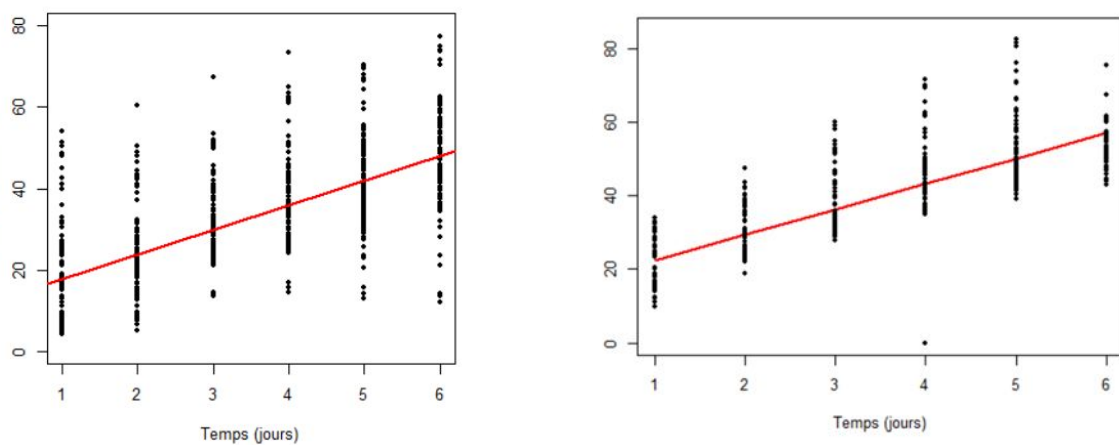


Figure 6 et 7 : Evolution de la croissance mycélienne de l'espèce *D.pinodes* (à gauche) et de *P. pinodella* (à droite) (mesure du diamètre en mm) en fonction du temps (jours)

C'est donc ce qui a été réalisé et est présenté en Figure 8. La pente de Pp est effectivement plus prononcée que celle de Dp mais pour savoir si cet effet est significatif on réalise une ANCOVA.

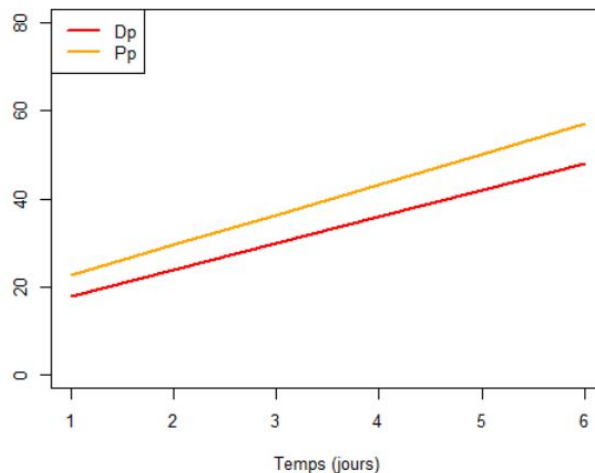
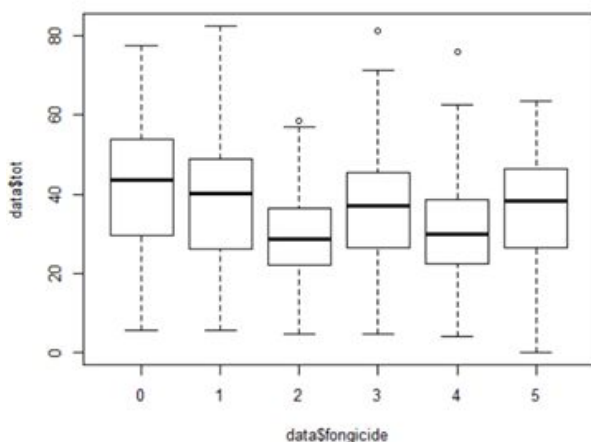


Figure 8 : Modélisation linéaire des souches *D.pinodes* (Dp) et de *P. pinodella* (Pp) en fonction du temps

Cette dernière révèle que les facteurs temps et espèce ont un effet significatif sur la croissance.

On obtient ensuite que les effets de la souche et du temps sont significatifs sur la croissance du champignon. Par le summary, on remarque que certaines souches comme la 18 ont une pente (estimate souche:temps) négative, leur croissance est donc moindre que la moyenne.

On réalise ensuite une ANOVA en incluant l'effet fongicide. La Figure 9 ci-contre permet de visualiser l'évolution de la croissance mycélienne en fonction du temps et de la dose de fongicide.



Les diagrammes ci-contre détaillent pour chaque concentration en pesticide (de 0, 1=50mg à 5=300mg). Il semble que la croissance commence par diminuer pour les plus faibles concentrations en fongicide et qu'ensuite, pour les concentrations plus élevée, la croissance soit environ équivalente au témoin.

Figure 9: Evolution de la croissance mycélienne de toutes les souches en fonction du temps et de la dose de fongicide.

Enfin, les dernières ANOVAs révèlent que les effets fongicide, temps et espèce sont significatifs sur la croissance mycélienne ainsi que les effets fongicide, temps et souche. Le summary, de cette dernière ANOVA, nous donne par exemple les estimates pour les effets dose fongicide:une souche:temps, ce qui nous donne une information sur la pente, donc sur la vitesse de croissance de cette souche. Certaines de ces valeurs sont négatives pour certaines

souches, et de plus en plus négatives avec l'augmentation de la dose en fongicide (d'autres ont la vitesse qui augmente de nouveau à partir d'une certaine dose de pesticide, effet discuter ensuite) ce qui signifie que leur vitesse de croissance diminue avec l'augmentation de la dose, elles sont donc significativement sensibles au fongicide.

IV. Discussion

Etude de la souche Dp28

Comme on l'attend, le mycélium du pathogène croît au fil du temps. Les effets des fongicides sont quant à eux moins triviaux mais l'effet reste significatif. On a un effet négatif sur la croissance seulement pour la dose de fongicide de 50mg. Au contraire, pour une dose de 300mg (la plus haute dose), le pathogène croît tout de même au fil du temps. Ces résultats statistiques peuvent être le résultat d'une mauvaise manipulation (erreur humaine), ce qui rend l'analyse compliquée. On peut également émettre l'hypothèse que notre souche est résistante au fongicide Banko. Une autre possibilité est que, comme le pathogène est placé dans un milieu déjà stressant vis-à-vis de la ressource en nutriments et une forte dose en fongicide, le mycélium se développe d'autant plus et concentre toute son énergie pour assurer sa survie et augmente donc sa biomasse.

Etude de toutes les souches

Pour ce qui est des espèces, il semblerait que l'espèce Pp croît plus vite que l'espèce Dp, de plus la sensibilité des deux espèces est significativement différente, on peut donc supposer que l'espèce Pp est plus résistante au fongicide.

Quant aux souches, nous avons observé que les souches n'ont significativement pas la même sensibilité, et donc vitesse de croissance, face au fongicide. Cela signifie donc que certaines souches sont résistantes, comme la nôtre, Dp28, semblait l'être.

Ainsi, en cas d'infection à certaines souches de ce pathogène, le fongicide utilisé pour l'expérience ne pourra pas lutter contre le développement de ce champignon. Il faudra donc mettre en place des méthodes alternatives de traitement et surtout des méthodes préventives pour éviter l'infection.

Les boîtes à moustache, de l'effet de la dose de fongicide sur le diamètre des colonies, semblent indiquer qu'une trop grande quantité de fongicide augmente leur croissance. Ceci

pourrait être dû au fait qu'un trop fort stress induit une réaction d'augmentation de la biomasse fongique. Cela peut aussi simplement être dû à des erreurs de manipulations, les différentes mesures ayant été réalisées par des opérateurs différents pour chaque souche. Il faudrait réaliser d'autres expérimentations afin de vérifier ce résultat. Cependant, si le phénomène que nous observons n'est pas dû à une erreur de manipulation, cela pourrait être d'un grand intérêt aussi bien économique que écologique. En effet, si l'application de surdose de fongicide implique une croissance du pathogène, il serait intéressant de pouvoir déterminer cette dose maximale. Ceci permettrait des économies, ainsi que des pratiques plus respectueuses de l'environnement. Cependant, cette hypothèse ne s'applique pas à toutes les souches, certaines semblaient en effet être ralenties par l'augmentation de la dose de fongicide car potentiellement sensibles.

Conclusion

Pour conclure, globalement le fongicide semble avoir un effet sur la limitation de la croissance des colonies fongiques, le produit peut donc être utilisé dans la lutte contre ce pathogène, du moins dans certains cas.

Les espèces et les souches de chacune de ces espèces n'ont pas la même sensibilité au fongicide. Certaines infections ne pourront donc pas être traitées par ce produit. Il faudra alors un autre traitement et une mise en place de mesures préventives afin d'éviter la contamination par des souches résistantes.

Déterminer précisément les souches résistantes et sensibles ainsi que des moyens de lutter contre les souches résistantes peuvent être des pistes de futures recherches.

La souche Dp28 semble résistante au fongicide utilisé.

A partir de la dose de 200mg.L⁻¹ de fongicide, il semblerait que la biomasse de champignons ré-augmente dans certains cas. Ce résultat pourrait être vérifié par d'autres expériences, car il serait d'un grand intérêt pour le dosage des fongicides utilisés dans la lutte contre ce pathogène, en déterminant des doses optimales de pesticide utilisables.

Une autre voie de recherche pourrait être de prendre l'interaction, de la sensibilité au fongicide et la croissance en général des champignons, à d'autres facteurs environnementaux comme la température, l'humidité...etc afin de se rapprocher au plus des conditions réelles potentielles.