

Effets de différents milieux de culture sur la croissance et la conservation *in vitro* de *Phytophthora infestans*

K. ALAOUÏ¹, Z. CHAFIK², A. KHOULATI¹, H. MIKDAM³, E. SAALAOUÏ¹, E. KHARMACH¹

(Reçu le 02/02/2022; Accepté le 09/04/2022)

Résumé

Des prospections de *Phytophthora infestans*, agent responsable du mildiou, ont été effectuées au champ dans six localités productrices de la pomme de terre dans la région de Berkane, et deux autres dans les banlieues d'Oujda. Des échantillons de tubercules de pomme de terre ont également été ramenés de cinq chambres froides. Sur un total de 49 échantillons récoltés, dont 34 échantillons feuilles et 15 échantillons tubercule, seulement 23 isolats ont été identifiés, dont 22 isolats issus des feuilles et un isolat issu des tubercules. La méthode de repiquage directe des sporocystes a été la plus fiable et la plus réussie par rapport aux autres méthodes. Le milieu de culture PP congelé a été utilisé dans ce travail pour l'isolement et la purification de *P. infestans* sans antibiotique. Cinq milieux de culture ont été utilisés (PDA, DFPDT, PP, CMA et NYDA) pour suivre différents paramètres caractérisant le champignon, entre autres la couleur, l'aspect, le diamètre des colonies mycéliennes, la vitesse quotidienne de croissance mycélienne, la survie du mycélium à 4°C et à 20°C et le taux de sporulation. Tous ces paramètres précités sont plutôt meilleurs dans les milieux DFPDT, PP et PDA, moyens dans NYDA et faibles dans CMA. La vitesse de croissance mycélienne des isolats sur milieu PP gélosé la plus élevée a été enregistré pour l'isolat ISOSLM avec 9,51 mm/jour et la plus faible a été enregistré pour l'isolat ISOACH avec 3,64 mm/jour.

Mots clés: *Phytophthora infestans*, pomme de terre, milieu de culture, isolement, Oriental, Maroc

Effects of different culture media on growth and *in vitro* preservation of *Phytophthora infestans*

Abstract

Prospecting for *Phytophthora infestans*, the causative agent of downy mildew, was carried out in the field in six potato-producing localities in the Berkane region and four in the suburbs of Oujda. Samples of potato tubers were also brought from five cold storage rooms. Out of a total of 49 samples collected, including 34 from leaves and 15 from tubers, only 23 isolates were identified, including 22 from leaves and one from tubers. The direct sporocyst passage method was the most reliable and successful compared to other methods. Frozen PP culture medium was used for the isolation and purification of *P. infestans*. Five culture media (PDA, DFPDT, PP, CMA and NYDA) were used to monitor the various parameters characterizing the fungus, including color, appearance, diameter of mycelial colonies, daily rate of mycelial growth, the survival of the mycelium at 4°C and at 20°C and the rate of sporulation. All these parameters are rather better in the DFPDT, PP and PDA media, average in NYDA and weak in CMA.

Keywords: *Phytophthora infestans*, potato, culture medium, isolation, Oriental, Morocco

INTRODUCTION

La pomme de terre constitue la principale spéculation maraîchère pratiquée dans le périmètre irrigué de la Moulouya, pour son adaptation aux sols et au climat de la région, pour sa rentabilité et pour la facilité d'écoulement de sa production. Elle est cultivée dans tout le périmètre de la Moulouya, avec 95 % des superficies se trouvant dans la plaine de Triffa, en raison spécialement à la qualité des sols, au climat favorable, à l'abondance de l'eau d'irrigation du barrage et la nappe phréatique pour les irrigations d'appoint ainsi qu'à la bonne maîtrise des techniques de production par la majorité des agriculteurs (ORMVAM, 2019).

La pomme de terre est sujette à tout un éventail d'ennemis qui alourdissent le coût de production, dont le mildiou causé par *P. infestans*, une épidémie redoutable de la culture. La maladie a marqué l'histoire de l'Irlande au 17^{ème} siècle en provoquant un effondrement de la production de pomme de terre, causant ainsi la mort d'un million d'habitants et l'exode d'un autre million vers le continent américain (chute de plus de 20% de la population) (Guyader, 2020).

P. infestans appartient à la Classe des Oomycètes, à l'Ordre des Péronosporales et à la Famille des Pythiacées, est une espèce hétérothallique, c'est-à-dire que sa reproduction sexuée nécessite l'interaction entre deux thalles distincts (Cabi, 2019).

P. infestans possède un mycélium coenocétique hyalin et à développement endogène (intercellulaire et intracellulaire) via la formation d'haustoria (Thurston et Shultz, 1981). Le pathogène a un cycle majoritairement aérien, il attaque les plants dès le champ, où les propagules du champignon peuvent se conserver dans le sol sur les débris des fanes et sur les repousses en zone à climat doux (Paitier, 1980) et suit la culture jusqu'au locaux de stockage, où le mycélium se trouve hiverné dans les yeux et/ou les blessures des tubercules, ce qui constitue la source principale d'inoculum primaire (Paitier, 1980; Gregory 1983; Davidse et al., 1983).

Dans la nature, *Phytophthora infestans* se comporte comme un hémibiotrophe qui commence par une phase biotrophe avant de devenir nécrotrophe (Sang-Jik et Jocelyn, 2010), sans capacité de survie saprophyte (Andrivon, 1995), mais il peut tout de même être isolé et cultivé en milieu de culture artificiel. Pour pouvoir le prélever de son environnement et le cultiver dans un environnement synthétique (*in vitro*), Il est indispensable d'avoir des milieux de cultures adaptés à ses besoins pour sa croissance et son développement et pour la sporulation, sans oublier les autres facteurs de développement, tels que la température et la photopériode.

La température optimale pour la croissance mycélienne et la sporulation en laboratoire est de 20 – 25°C (Fry, 2008). Le pathogène se développe mieux à l'obscurité (Kim et

¹ Laboratoire de Bio-ressource, Biotechnologie, Ethno-pharmacologie et Santé, Faculté des Sciences, Université Mohamed Premier, Oujda, Maroc

² Laboratoire de Biologie Végétale et des Micro-organismes, Faculté des sciences, Université Mohamed Premier, Oujda, Maroc

³ Laboratoire d'Électrochimie, Modélisation et Ingénierie de l'Environnement, Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc

Jeun, 2006; Ho, 1970; Fry, 2008; *Phytophthora* Database, 2016). Dans la littérature, plusieurs milieux de cultures ont été utilisés pour l'isolement et la mise en culture de *P. infestans*. Dans cette étude, nous avons choisi 5 milieux de culture (PP, CMA, NYDA, PDA et DFPDT).

L'objectif principal de cette étude est d'isoler certaines souches de *Phytophthora infestans* à partir de différents organes des plants de pomme de terre (Feuilles et tubercules) présentant suffisamment les symptômes de la maladie (Le mildiou); en utilisant différentes méthodes. Ensuite, sélectionner le(s) milieu(x) et le(s) plus favorable à la croissance mycélienne et à la conservation du pathogène.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Prospection et collecte des échantillons

La collecte des échantillons concerne les feuilles et les tubercules de pomme de terre, les feuilles ont été collectées des champs, tandis que les tubercules ont été ramenés des chambres froides. Les régions prospectées sont Berkane (N 34°55.2', W 2° 19.2') (6 Centre de Mise en Valeur Agricole: 101, 103, 106, 107, 108 et 109) (Figure 1) et Oujda (N 34° 41' 12.001", W 1° 54' 41").

34 éventuels isolats sont collectés des feuilles (variété Spunta) attaquées sur des pieds de pomme de terre au champ espacées de 50 à 100 m. La méthode d'échantillonnage utilisée est celle de Hafidi *et al.*, (2005) et les exploitations choisies sont bien éloignées les unes des autres, soit à une distance approximative entre champs consécutifs dépassant 1000 m. Parfois, deux échantillons sont prélevés de la même parcelle, et même de la même plante.

Cinq chambres froides de la région de Berkane ont fait l'objet de collecte des échantillons de tubercules de pomme de terre, avec 3 tubercules (variété Spunta) par station frigorifique, soit un total de 15 éventuels isolats. Les échantillons des feuilles et tubercules récoltés sont mis dans des sacs en tissus, portant les informations qui facilitent leur traçabilité, puis placés dans une glacière et transférés directement au laboratoire pour l'isolement du pathogène.

Isolements de l'agent pathogène

P. infestans est considéré parmi les champignons difficiles à isoler sans l'utilisation des antibiotiques. Ceci est dû à ses caractéristiques particulières, à savoir sa faible compétitivité et ses exigences nutritives strictes (Hammi, 2003). Dans ce travail, on va pouvoir mettre en culture le champignon sans l'utilisation des antibiotiques.

Préparation des milieux de culture

Dans la littérature, plusieurs milieux de culture sont utilisés pour la mise en culture de *P. infestans*. Dans cette étude, 5 milieux ont été utilisés afin de choisir le meilleur pour la croissance et la conservation du champignon. Les milieux de culture testés sont préparés selon les méthodes décrites au tableau 1. Ils sont autoclavés à 121°C pendant 20 min et le pH est ajusté à 5,7 à 6. Une quantité de 15 à 20 ml de chaque milieu de culture est versée dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre.

Techniques d'isolement

Méthode directe

Technique 1

La méthode directe consiste à isoler des souches de *Phytophthora infestans* directement à partir des fragments (feuilles et tubercules) issus de jeunes lésions de mildiou. Les feuilles et les tubercules montrant les symptômes du mildiou sont désinfectés avec la solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 2 à 3 minutes. Ensuite, elles sont rincées 3 fois avec de l'eau distillée stérile, puis laissées séchées sur un papier filtre stérile (Bastin, 2020). À l'aide d'une pince stérile, des petits fragments sont prélevés au front d'avancement de la lésion puis placés dans des boîtes de pétries contenant le milieu de culture PP gélosé (Caten et Jinks, 1968).



Figure 1: Localisation de la région de l'étude (ORMVAM, 2019)

Technique 2

Les organes infectés sont lavés, désinfectés et séchés comme décrit précédemment. Ils sont ensuite incubés dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm contenant du papier filtre humidifié à 20°C à l'obscurité pendant 24 h pour favoriser la fructification du champignon (Hammi, 2003).

Les sporocystes formés lors de la fructification du champignon ont été prélevés aseptiquement à l'aide d'une aiguille stérile dont l'extrémité contient un fragment de la gélose de 1 à 2 mm de diamètre. Ce prélèvement est effectué au front d'avancement de la lésion et la manipulation est réalisée sous la loupe. Les fragments de gélose inoculés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture PP gélosé et incubées 20°C à l'obscurité (Hammi, 2003).

Méthode indirecte (un appât)

La méthode indirecte, comme son nom l'indique, consiste à isoler le champignon indirectement à travers un intermédiaire qui sont des tranches des tubercules. L'isolement du champignon s'est fait suivant le protocole décrit par Zhu et al., (2001) avec quelque modification. Des fragments issus de tissus malades sont prélevés à la limite de la nécrose, désinfectés et séchés comme décrit précédemment, puis déposés sur des tranches de pomme de terre saine et sensible (variété Spunta) de même diamètre et épaisseur qui sont préalablement désinfectés à l'hypochlorite de sodium à 1% et lavés à l'eau distillée stérile, en mettant la face sporulante en contact avec la tranche du tubercule. Le test est conduit dans des boîtes de Pétri stériles contenant du papier filtre imbibé d'eau distillée stérile.

Des repiquages successifs réguliers et rapides sur milieu PP gélosé sans antibiotique ont permis de purifier le pathogène (Djeugap et al., 2011). Huit isolats de ces cultures pures ont été choisis au hasard, soit 1 isolat de chaque localité (1ISOTW, 1ISOHF, 1ISOACH, 1ISOCM, 1ISOMD, 1ISOSLM, 1ISOWJ, 1ISOCMF) ont été transférés dans des boîtes de Pétri contenant les 5 différents milieux de culture (PDA, PP, DFPDT, CMA, NYDA) afin de suivre et contrôler différents paramètres liés au pathogène. Les exemplaires ont été conservés dans des tubes inclinés à 4°C pour des études ultérieures.

Identification

Un fragment de thalle de chaque isolat est prélevé à l'aide d'une aiguille lancéolée et déposé sur la lame contenant une goutte d'eau distillée stérile est fixé avec de la glycérine pour éviter l'évaporation ainsi que son dessèchement sous l'effet de la chaleur émise par le microscope optique, le frottis est recouvert avec la lamelle (Kerroum, 2019). L'identification du pathogène s'est faite en se basant sur l'observation des caractéristiques macroscopiques et microscopiques du champignon. Ces techniques classiques d'observation des souches sont largement suffisantes pour déterminer le genre des moisissures isolées (Bourgeois et Leveau, 1980).

Les paramètres mesurés

- L'observation périodique de la couleur et de l'aspect des colonies à 4°C et à 20°C;
- Le diamètre des colonies mycéliennes après dix jours d'incubation à une température de 20°C et à l'obscurité, le paramètre a été mesuré le 5^{ème} et le 10^{ème} jour;
- La croissance mycélienne quotidienne jusqu'au 10^{ème} jour;
- La survie du mycélium à 4°C et à 20°C;
- L'intensité de sporulation;
- La vitesse de croissance mycélienne des isolats sur milieu PP gélosé.

Intensité de sporulation

La détermination des intensités de sporulation de 8 isolats, collectés des différentes localités de la région de Berkane et d'Oujda, est effectuée à partir des cultures mycéliennes âgées de 10 jours. Une quantité de 10 ml d'eau distillée stérile est versée dans la boîte contenant la colonie de l'isolat afin de préparer une suspension sporangiale. Celui-ci est lavé soigneusement de manière à ne pas blesser la gélose. La suspension sporangiale récupérée est filtrée, puis dénombrées en utilisant la cellule de THOMA. Tout le test est répété trois fois et 3 mesures sont effectuées pour chaque échantillon.

Tableau 1: Milieux de culture testés pour la mise en culture de différents isolats de *P. infestans*

Milieux	Composition	Préparation
PDA	200 g de pomme de terre, 20 g de dextrose, 15 g Agar	500 ml d'eau distillé ajouté sur 19,5 g de PDA commercialisé. Puis stérilisé à l'autoclave
DFPDT	200 g Feuilles de pomme de terre, 12 g Glucose, 20 g Agar-agar	Les feuilles de pomme de terre sont découpées en morceaux puis infusées dans un ballon avec couvercle dans environ 800 ml d'eau distillée pendant 15 min. Après cuisson le liquide est filtré à travers une étamine et mélangé au glucose et à l'agar-agar, le volume final et ajusté à 1 litre puis stérilisé à l'autoclave.
CMA	Farine de maïs, 500 ml d'eau distillée, 17g Agar	7,5 g de CMA + 500 ml de l'eau distillée, verser la solution dans une bouteille contenant 17 g d'agar. Puis stérilisé à l'autoclave
NYDA	3 g Peptone, 0,6 g d'extrait de viande, 6,2 g d'extrait de levure, 3 g NaCl, 5 g Dextrose, 15 g Agar	500 ml d'eau distillée à diviser dans 2 bouteilles autoclavables, ajouter le dextrose dans l'une et les autres composants dans la deuxième. Après autoclavage, les deux préparations sont mélangées.
PP	Petits pois congelés, 15 g Agar, 1000 ml d'eau distillée	140 g de petits pois sont bouillis dans 500 ml d'eau distillée pendant 20 à 30 min. La solution obtenue est filtrée à travers une mousseline dans un flacon contenant 15 g d'agar. Le volume final et ajusté à 500 ml puis stérilisé à l'autoclave.

PDA: Potato Dextrose Agar, DFPDT: Milieux à base de décoction des feuilles de pomme de terre, CMA: Corn Meal Agar, PP: Petits pois congelé, NYDA: Nutrient Yeast Dextrose Agar

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Collecte des échantillons

Différentes localités de la région de l'Oriental Marocain ont fait l'objet des prospections en 2018, dont 18 exploitations et 5 chambres froides de stockage. Le nombre d'échantillons récoltés ainsi que le nombre d'exploitations prospectées sont reportés dans le tableau 2.

Techniques d'isolement

La méthode indirecte par appât à partir des fragments infectés semble difficile à réaliser, peu efficace et non fiable. Les tranches de pomme de terre incubées, ont presque tous développés des pourritures à leur surface, ce qui rend l'isolement difficile et nécessite obligatoirement un milieu sélectif avec antibiotique. L'apparition de l'amas mycélien sur les tranches des tubercules est très faible environ un amas par 8 tranches incubées. Cette méthode est jugée non fiable par certains auteurs comme Hammi (2003). Néanmoins, elle est préconisée par d'autres pour l'isolement de *P. infestans* (Corbière et Glais, 2005), mais nécessite lors du repiquage du mycélium un milieu de culture sélectif riche en amidon et contenant les antibiotiques adéquats (Beninal, 2009).

La méthode directe à partir des fragments infectés semble aussi un peu difficile à réaliser. En effet, le dépôt de frag-

ments infectés directement sur milieu artificiel sans antibiotique s'avère impossible pour isoler le pathogène. Ceci peut être expliqué par l'utilisation du milieu de culture à base de petits pois qui est non sélectif et aussi dû aux exigences nutritives strictes et par la faible compétitivité de *P. infestans* vis à vis des champignons saprophytes et des bactéries développées sur le milieu de culture (Beninal, 2011). Pourtant, la méthode du repiquage directe des sporocystes semble la plus facile, le champignon fructifie rapidement, et l'isolement est réussi facilement. Ces résultats sont en accord avec ceux de Beninal, (2011) et Hammi (2003) qui ont rapporté que seule la technique de repiquage directe des sporocystes développés sur les lésions des tâches du mildiou sur feuilles permet d'isoler plus facilement le *Phytophthora infestans*, par rapport aux autres méthodes.

Les taux de réussite d'isolement du pathogène à partir des différents fragments de pomme de terre analysés sont montrés dans le tableau 3. Ce dernier montre que l'isolement de *P. infestans* à partir du feuillage infecté est plus réussi que celui effectué à partir des tubercules. Ceci peut être essentiellement expliqué par la présence d'une fructification abondante du pathogène sur le feuillage que sur les tubercules, ce qui rend le repiquage des sporocystes plus facile. Sur un total de 49 éventuels isolats, nous avons réussi l'isolement de 23 isolats, dont 22 isolats issus des feuilles et 1 isolat issu des tubercules.

Tableau 2: Dénomination et origine des isolats étudiés

Hôte	Date de prélèvement	Organe prélevé	Localités	Isolats	Nombre d'échantillons	Nombre de parcelles / Frigo prospectées
Pomme de terre	01/04/2018	Feuilles	Berkane, Aïn Regâda	ISOTW	5	2
	05/04/2018		Berkane Ahfir	ISOFH	5	2
	01/04/2018		Berkane, Aïn Chebbak	ISOACH	5	3
	01/04/2018		Berkane, Laâtamna	ISOCM	5	3
	01/04/2018		Berkane, Madagh	ISOMD	5	3
	03/04/2018		Berkane, Slimania	ISOSLM	5	3
	03/04/2018		Oujda (Banlieue)	ISOWJ	4	2
	21/06/2018	Tubercules	Chambre froide Laâtamna Tarifit	ISO CMF	3	1
	21/06/2018		Chambre froide Sadiki Laâtamna	ISOCMF	3	1
	21/06/2018		Chambre froide Gasmî Berkane	ISOBRF	3	1
	21/06/2018		Chambre froide Hadi Laâtamna	ISOCMF	3	1
	21/06/2018		Chambre froide Bouayad Zegzel	ISOZGF	3	1

Tableau 3: Nombres d'isolats réussis à partir de différents organes préservés

Organe	Nom d'isolat	Nombres d'échantillons	Nombres d'isolats réussis
Feuilles	ISOTW	5	3
	ISOHF	5	3
	ISOACH	5	3
	ISOCM	5	3
	ISOMD	5	3
	ISOSLM	5	3
	ISOWJ	4	4
Tubercules	ISO CM	3	0
	ISOCMF	3	0
	ISOBRF	3	0
	ISOCMF	3	1
	ISOZGF	3	0
Total		49	23

Observation morphologique et microscopique du *Phytophthora infestans*

Après purification de *P. infestans*, le champignon apparaît sous forme des colonies claires qui poussent de façon radiale, compacte sans marge nette, elles sont duveteuses et présentent de courts hyphes aériens (Figure 2) (Kerroum, 2019). Le mycélium est siphonné et les sporocystes de forme citronnés. Le caractère morphologique principal de ce pathogène est la présence de renflements au niveau des sites de ramification, en particulier aux points de la formation des sporocystes (Thurston et Shultz, 1981). Ces derniers, en position terminale ont une forme souvent citronnée et possèdent une papille apicale. Leur paroi est mince et leurs dimensions sont de 21-38 x 12-23 μm (Thurston et Shultz, 1981). Ce mycélium permet de distinguer le mildiou d'autres maladies foliaires de la pomme de terre (Agrios, 2010).

Paramètres mesurés

Couleur et aspect du champignon dans différents milieux

Milieu PDA

Les milieux de culture DFPDT et PDA semblent favorables à la croissance et au développement du champignon, l'aspect nuageux et cotonneux du mycélium et la couleur blanche du champignon n'ont pas été changés même après une durée importante d'incubation, à différents température 4°C et 20°C (Figure 3).

Milieu DFPDT

Le milieu de culture DFPDT semble favorable à la croissance et au développement du champignon. L'aspect nuageux et cotonneux du mycélium et la couleur blanche du champignon n'ont pas été changés même après une longue durée d'incubation, à différents température 4°C et 20°C (Figure 3).

Milieu PP

Le milieu de culture PP congelé est aussi favorable à la croissance et au développement du champignon, l'aspect et la couleur du champignon n'ont pas été changés à différents température 4°C et 20°C (Figure 3). De plus, ce milieu de culture contient un facteur stéroïde qui stimule davantage la croissance végétative et la production de sporange de *P. infestans* qui pousse la plupart des auteurs à l'utiliser (Glais et Corbière, 2005).

Milieu CMA

Le développement du champignon est significativement très faible par rapport aux autres milieux de culture, même après une période d'incubation importante. L'aspect macroscopique du champignon dans ce milieu diffère de celui des autres, le mycélium reste transparent et plat. Après 20 jours d'incubation à 20 °C, le champignon change de couleur du blanc au violet, cela peut être dû soit à l'épuisement rapide des nutriments soit à la dépigmentation du champignon après 62 jours à 4°C (Figure 3). La qualité

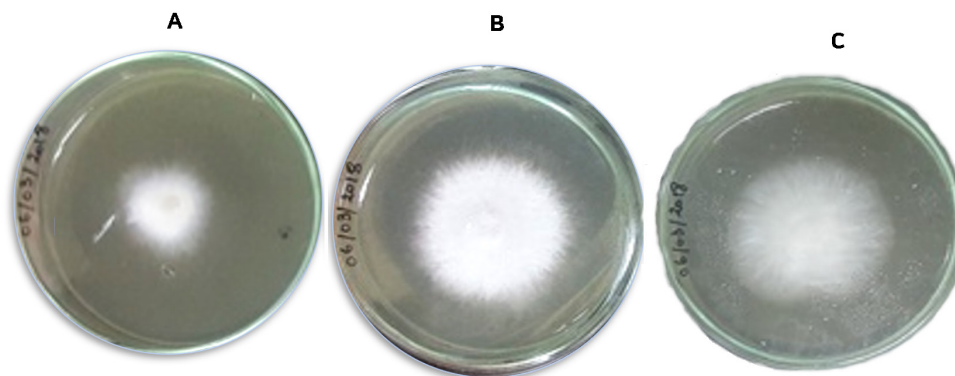


Figure 2: Aspect macroscopique des isolats de *P. infestans*: (A) ISOSLM, (B) ISOMD et (C) ISOCM

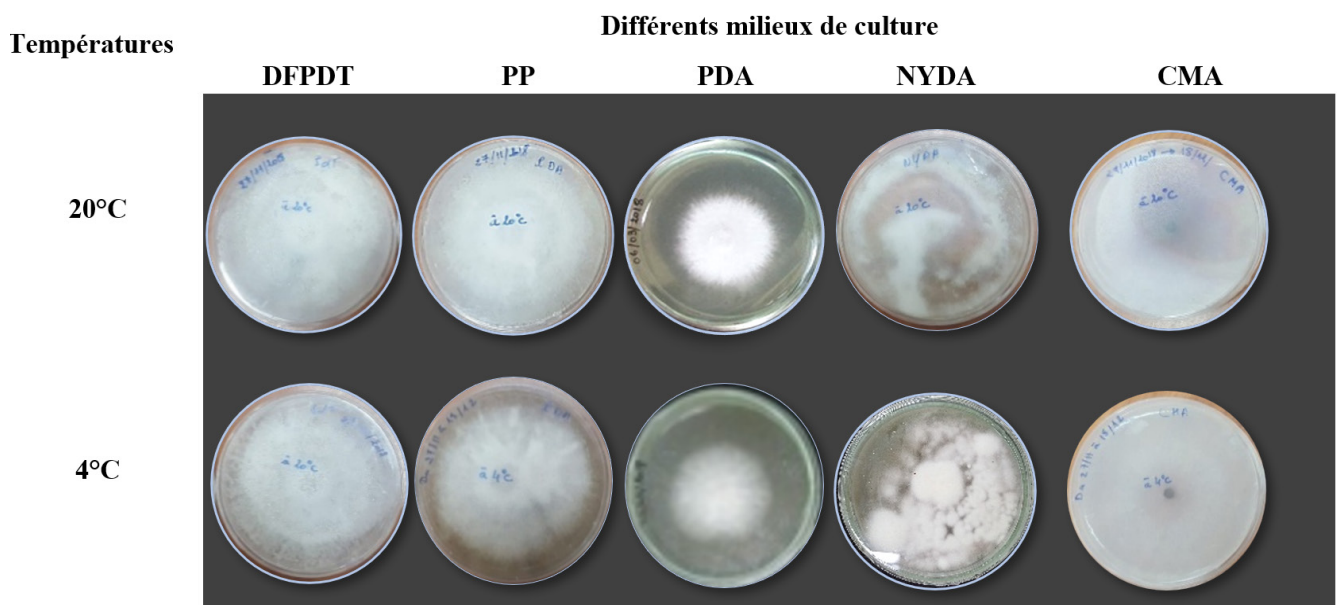


Figure 3: Développement du *P. infestans* à 20°C et 4°C dans différents milieux de culture

PDA Potato Dextrose Agare, DFPDT Milieux à base de décoction des feuilles de pomme de terre, CMA Corn Meal Agar, PP Petits pois congelé, NYDA

d'image prise ne montre pas bien la couleur violette du mycélium, pourtant le milieu est préconisé par plusieurs auteurs pour la culture de *P. infestans*.

Milieu NYDA

Ce milieu de culture est très peu cité par les auteurs. Il n'est pas le meilleur mais dans notre cas il a été favorable à la croissance et au développement du champignon, l'aspect et la couleur de champignon n'ont subi aucun changement (Figure 3).

Diamètre des colonies

La croissance mycélienne moyenne, testée sur 5 milieux de culture à base de PP, CMA, NYDA, PDA et DFPDT a été appréciée par la mesure du diamètre des colonies. Les résultats représentent la moyenne des 8 isolats choisis au hasard (1ISOTW, 1ISOHF, 1ISOACH, 1ISOCM, 1ISOMD, 1ISOSLM, 1ISOWJ, ISOCMF). L'analyse de variance des résultats obtenus a révélé une différence significative ($P < 0.05$) du facteur milieu et interaction isolat-milieu.

Les mesures diamétrales des colonies sont réalisées selon deux directions perpendiculaires. Le diamètre des colonies

après 10 jours d'incubation à 20°C et à l'obscurité, s'avère meilleur dans les milieux DFPDT, PP et PDA respectivement avec 82 mm, 80 mm et 79,5 mm, moyennement élevé dans le milieu NYDA soit 42,5 mm et très faible pour le milieu CMA avec 2,98 mm (Figure 4).

Vitesse de croissance mycélienne

La croissance mycélienne moyenne/jour les plus importantes ont été obtenues pour les milieux de culture DFPDT, PP et PDA, respectivement 9,3 mm/j, 8,2 mm/j et 8,0 mm/j et moyennement rapides à faibles successivement dans NYDA et CMA avec 4,33 mm/j et 0,5 mm/j (Figure 5). Ceci est en concordance avec les constats de Shaw (1991) et Medina et Platt (1999), qui ont signalé l'existence d'une relation étroite entre le pouvoir de croissance mycélienne et le milieu de culture.

Les milieux de culture utilisés, à l'exception du CMA, s'avèrent convenables à la croissance et au développement de *Phytophthora infestans*, du fait qu'ils favorisent une très bonne croissance mycélienne.

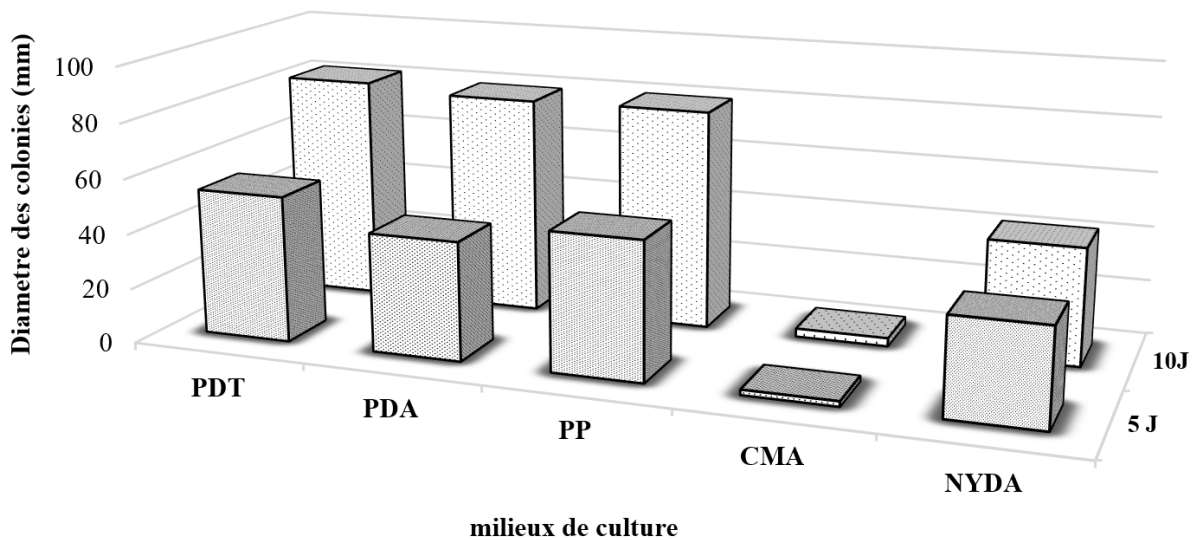


Figure 4: Diamètres des colonies mycéliennes de *P. infestans* sur différents substrats après 5 et 10 jours d'incubation à 20°C à l'obscurité (PP= Petits pois, NYDA= Milieu NYDA, DFPDT Milieux à base de décoction des feuilles de pomme de terre, PDA= PDA synthétique, CMA= Corn meal agar)

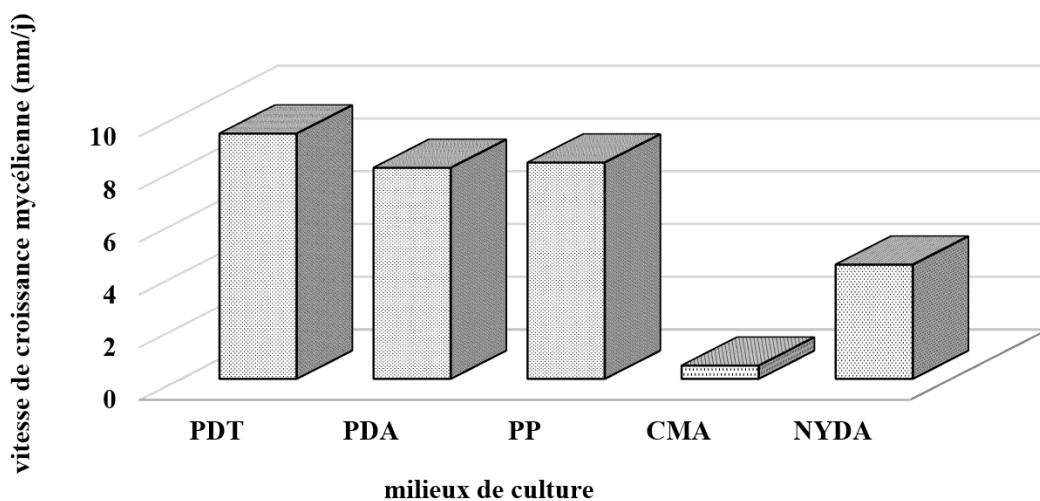


Figure 5: vitesse de la croissance mycélienne selon le type de substrat (PP= Petit pois, NYDA= Milieu NYDA, DFPDT Milieux à base de décoction des feuilles de pomme de terre, PDA= PDA synthétique, CMA= Corn Meal agar)

La survie du mycélium

La période de survie du mycélium sur les milieux de culture gélosés sans transfert correspond au temps nécessaire pour l'épuisement des besoins trophiques du pathogène contenu dans le substrat. A 4°C, et quel que soit le milieu de culture, la survie du champignon est remarquablement élevée. C'est très élevé dans le milieu DFPDT, PP et PDA, plus de 200 jour, moyennement élevée dans le milieu NYDA et sensiblement faible dans CMA respectivement 130 et 62 jours. Réciproquement, à 20°C la longévité du mycélium est moyenne à faible et varie de 20 jours pour le CMA à 56 jours pour le PDT (Figure 6).

De plus, la rapide détérioration du mycélium lorsqu'il est incubé à 20°C et à l'obscurité, dû à un certain nombre de contaminants, champignons de différentes formes et couleurs et des bactéries qui se développent à l'égard du champignon *P. infestans* (Figure 7). Cela dû à la faible compétitivité du champignon par rapport aux saprophytes.

Dans le présent test, les milieux de culture DFPDT, PP et PDA ont donc confirmé leur performance pour la croissance et la conservation du pathogène. Pourtant, le milieu de culture CMA ne s'est pas révélé favorable pour la croissance mycélienne de nos isolats. Les milieux DFPDT, PP, et PDA seront donc utilisés dans les différents tests conduits dans cette étude.

Intensité de sporulation *in-vitro*

L'intensité de sporulation *in vitro* des différents isolats a été déterminée sur des colonies ayant poussé sur les milieux de culture étudiés précédemment (DFPDT, PDA, CMA, NYDA et PP) pendant 10 jours. La sporulation *in-vitro* des isolats dépend du substrat. Les analyses statistiques ont montré l'existence d'une différence significative ($P < 0.05$) du facteur substrat. En effet, les souches cultivées sur milieu de culture DFPDT sporulent beaucoup plus que celles qui sont cultivées sur les autres. Le milieu de culture CMA a enregistré la sporulation la plus faible (Figure 8).

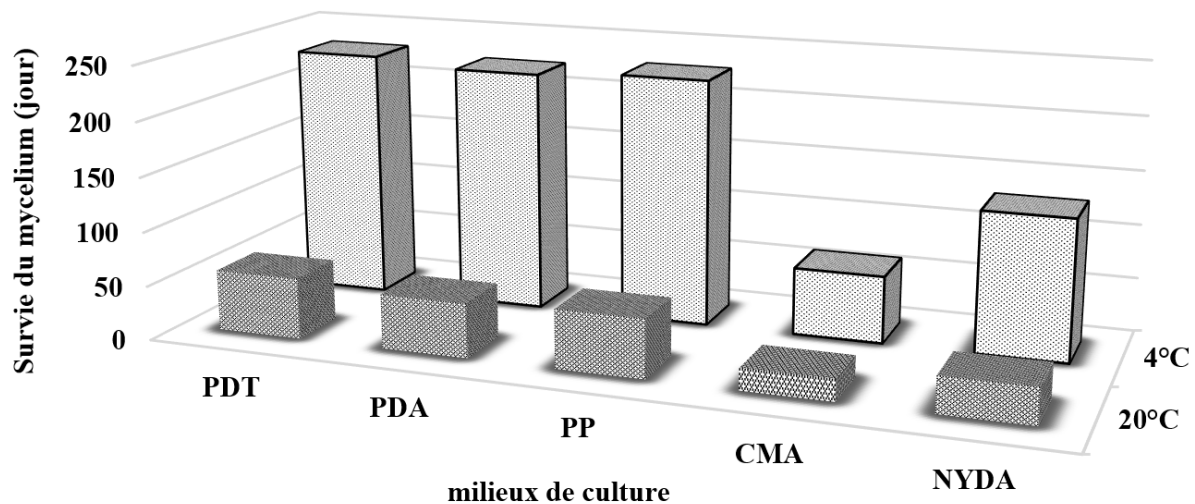


Figure 6: Survie du mycelium de *P. infestans* dans différents milieux de culture (PP= Petit pois, NYDA= Milieu NYDA, DFPDT Milieux à base de décoction des feuilles de pomme de terre, PDA= PDA synthétique, CMA = Corn Meal agar)

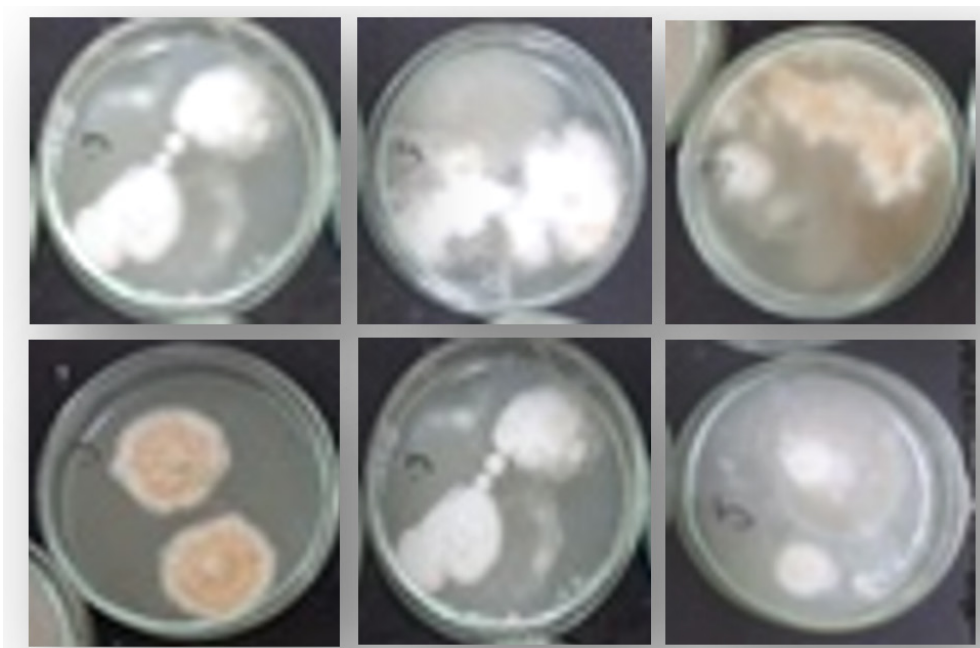


Figure 7: Contamination des boîtes de pétrie contenant différents isolats de *P. infestans* à 20°C

La vitesse de croissance mycélienne des isolats sur milieu PP gélosé

La vitesse de croissance mycélienne des huit isolats a été mesurée chaque jour. Un explant de culture pure de chaque isolat a été mis au centre de boîte de pétrie contenant le milieu de culture PP gélosé. Tous les isolats commencent à se développer sur milieu PP gélosé à la deuxième journée. L'isolat ISOACH a enregistré la vitesse de croissance mycélienne la plus élevée avec 9,51 mm/jour, suivi de ISOAH avec 9,45 mm/jour et ISOTW avec 7,22 mm/jour. Les isolats ISOCM, ISOCMF, ISOMD et ISOWJ ont enregistré respectivement les vitesses moyennes de 5,43 mm/jour, 5,62 mm/jour, 6 mm/jour et 6,22 mm/jour. Cependant, l'isolat ISOACH a enregistré la vitesse la plus faible avec 3,64 mm/jour.

CONCLUSION

Les prospections qui ont été réalisées dans les exploitations de pomme de terre et dans les chambres frigorifiques, dans la région de Berkane et Oujda, ont permis d'obtenir 23 isolats dont 22 issus des feuilles et 1 isolat issu de tubercule. L'isolement du pathogène est réalisé à partir des fragments de tissus malades des tubercules et feuilles et la technique de repiquage directe des sporocystes est la seule qui semble efficace et fiable. Le pathogène a été identifié sur la base des observations macroscopique et microscopique. La culture pure obtenue a été cultivé sur cinq milieux de culture (DFPDT, PDA, CMA, PP, NYDA) afin de suivre et contrôler différents paramètres liés au champignon.

Les mesures ont concerné l'observation périodique de la couleur et de l'aspect des colonies à 4°C et 20°C, le

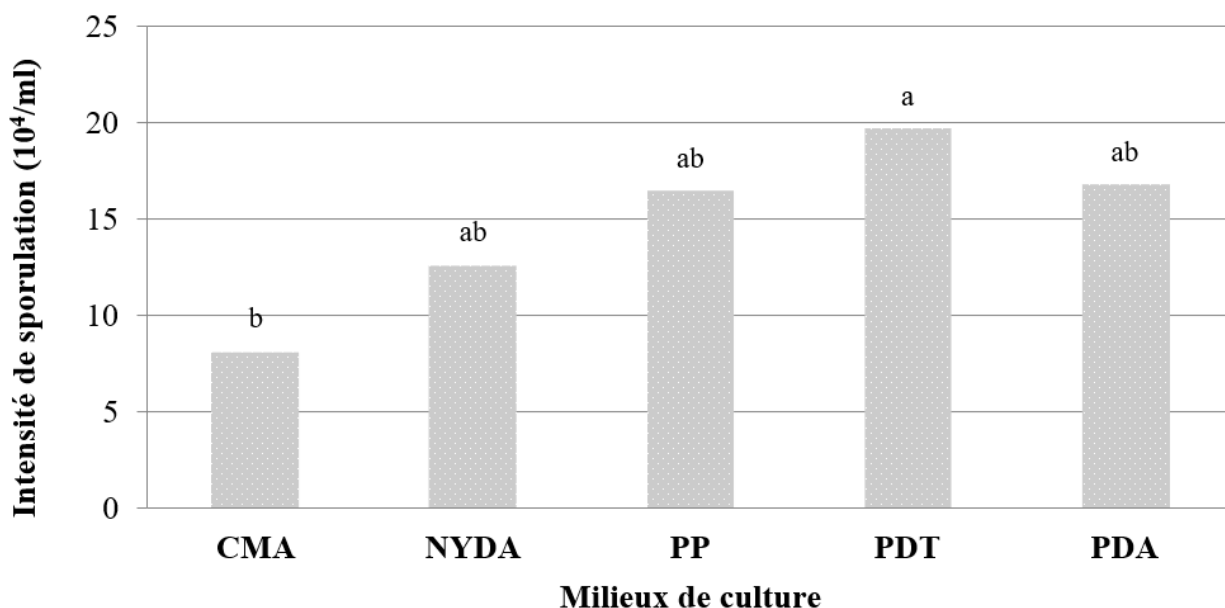


Figure 8: la moyenne de sporulation des isolats en fonction de substrat (les points marqués par les mêmes lettres ne se sont pas significativement différents à (P< 0.05))

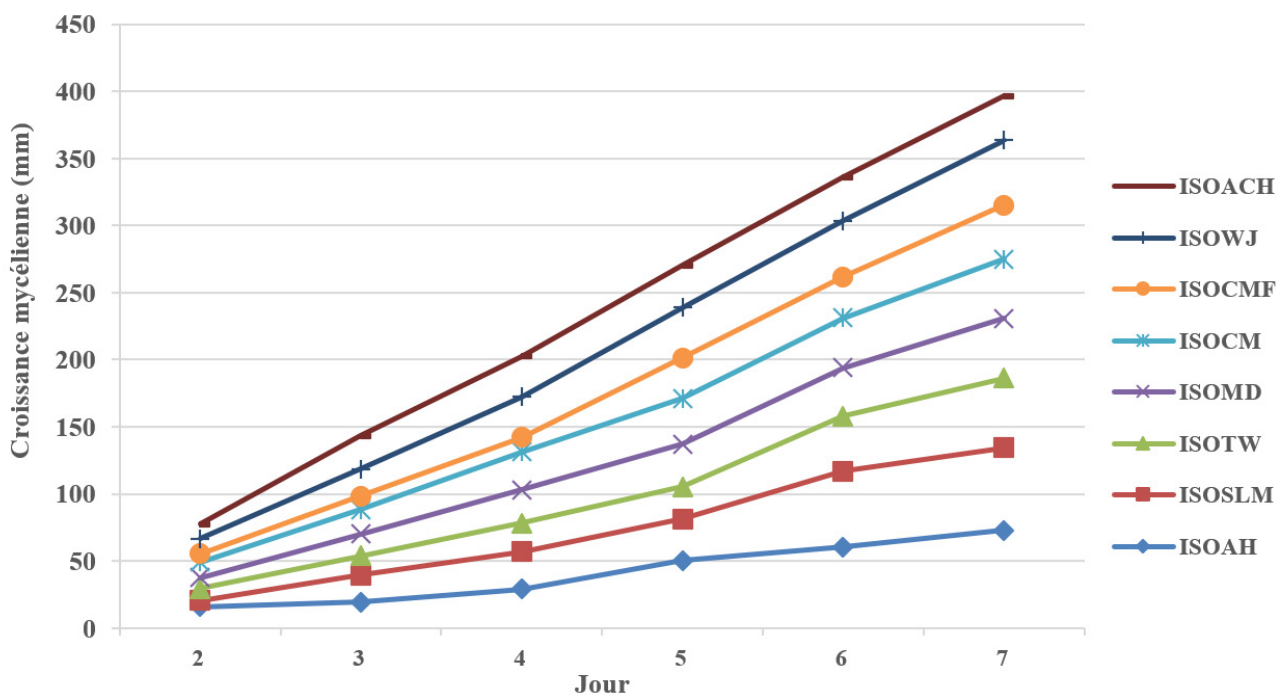


Figure 9: la vitesse de croissance mycélienne des isolats sur milieu PP gélosé

diamètre des colonies et la vitesse de la croissance mycélienne à 20 °C, la survie du mycélium à 4°C et à 20°C et la sporulation des isolats dans chaque milieu de culture. Tous ces paramètres sont meilleurs dans le milieu DFPDT, suivie par les milieux PP et PDA, moyenne dans le milieu NYDA et faible dans le milieu CMA. Seul le milieu de culture CMA a conduit à un changement d'aspect et de couleur du champignon. Les milieux de culture PDT, PP et PDA, pourront donc être utilisés pour une meilleure croissance, conservation et sporulation de *P. infestans*.

La vitesse de croissance mycélienne des isolats sur milieu PP gélosé la plus élevée a été enregistrée pour l'isolat ISOSLM avec 9,51 mm/jour et la plus faible a été enregistrée pour l'isolat ISOACH avec 3,64 mm/jour.

RÉFÉRENCES

- Agrios G. N. (2010). Plant Pathology. 2^e éd. Academic Press.
- Andrivon D. (1995) Biology, ecology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology*, 85: 1053-1056.
- Bastin L-A. (2020). Étude de l'interaction entre *Phytophthora infestans* et *Solanum tuberosum*. Faculté des bioingénieurs, Université catholique de Louvain, Prom.: Legrève, Anne; Colau, Gil. <http://hdl.handle.net/2078.1/thesis:27158>.
- Beninal L., Corbiere R., Kedad A., Andrivon, D., Bouznad, Z. (2009). A2 mating type, metalaxyl resistance and complex virulence profiles: common features in some *Phytophthora infestans* isolates from Algeria. *PPO-Special Report*, 13: 237-242.
- Beninal L. (2011). Diversité génétique de *Phytophthora infestans* agent du mildiou de la pomme de terre en Algérie. Thèse de doctorat. École nationale supérieure agronomique d'El Harrach.
- Bourgeois C. M., Leveau J. Y. (1980). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires: Le contrôle microbiologique, Collection Sciences et techniques agro-alimentaires, 3: 331p.
- Cabi (2019). Invasive Species Compendium - *Phytophthora infestans* (*Phytophthora* blight) <https://www.cabi.org/isc/dataset/40970#totaxonomicTree>.
- Caten C. E, Jinks, J. L. (1968). Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. *Can. J. Bot.*, 46: 329-348.
- Corbiere R., Glais I. (2005). Évaluation du comportement de génotype de pomme de terre vis-à-vis de la forme sexuée de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou. In "Méthode d'appréciation du comportement variétal vis-à-vis des bioagresseurs". Cahier des techniques de l'INRA, France: 149-152.
- Davidse L.C., Hofman A.E., Velthuis G.C.M. (1983). Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma*. *Experimental Mycology*, 7: 344-361.
- Djeugap J., Fovo E.T., Fontem D.A., Tapondjou A.L. (2011). Efficacité *in vitro* et *in vivo* des extraits de plantes contre le mildiou (*Phytophthora infestans*) de la morelle noire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5: 2205-2213.
- Fry W. (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 9: 385-402.
- Glais I., Corbiere R. (2005). Inoculation en conditions contrôlées de folioles détachées de pomme de terre, pour déterminer l'agressivité et la virulence d'isolats de *Phytophthora infestans*. In "Méthode d'appréciation du comportement variétal vis-à-vis des bioagresseurs..Le cahier des techniques de l'INRA". France: 143-147.
- Gregory P. H. (1983). Some major epidemics caused by *Phytophthora*. In "Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology", 271-278.
- Guyader S. (2020). Maladies cryptogamiques: Méthodes de lutte. Thèse de Doctorat, Université des Antilles-Site de Guadeloupe (UA). <https://hal.inrae.fr/hal-02791127>
- Hafidi M., Andrivon D., Achbani El. H., El Bouamin F. (2005). Caractérisation des populations marocaines de *Phytophthora infestans* agent du mildiou de la pomme de terre (virulence et type sexuel). *Al Awamia*, 114: 44-57.
- Hammi A. (2003). Caractérisation des populations de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary dans la région de Saïs. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ibn Abdellah, Fès, Maroc. 272 pp.
- Ho H. (1970). A study on the growth and sporulation of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Sydowia*, 24: 51-58. http://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_24_0051-0058.pdf
- Kerroum F. (2019). Identification et Caractérisation du *Phytophthora infestans* agent pathogène du mildiou de la pomme de terre et essai de lutte biologique. Doctorat de L'université D'Oran 1 Ahmed Ben Bella.
- Kim H., Jeun Y. (2006). Resistance Induction and Enhanced Tuber Production by Pre-inoculation with Bacterial Strains in Potato Plants against *Phytophthora infestans*. *Microbiology*, 34: 67-72.
- Kumbar B. (2017). Standardisation of specific media for *Phytophthora infestans*. *Global Journal of Bio-science and Biotechnology*, 6: 37476.
- Medina M.V., Platt H.W. (1999). Viability of oospores of *Phytophthora infestans* under field conditions in northeastern North America. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21: 137-143.
- ORMVAM (Office Régional de Mise en Valeur Agricole de la Moulouya) (2019). Service de la production végétale. Document de travail.
- Paitier G. (1980). Le mildiou de la pomme de terre. *Phytoma*, 23-27.
- Phytophthora Database (2016). Species list. <http://www.phytophthoradb.org/species.php>
- Sang-Jik L, Jocelyn K.C.R. (2010). Mediation of the transition from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic plant pathogens by secreted effector proteins. *Plant Signaling and Behavior*, 5: 769-772.
- Shaw D.S. (1991). Genetics of *Phytophthora infestans*. *Advances in Plant Pathology*, 7: 131-167.
- Thurston H.D., Schltz O. (1981). Late blight. In "Compendium in potato disease". Hooker editions. APS Press Michigan, USA. 40-42.
- Tran C., Tappy L. (2012). Sucrose, glucose, fructose: quels sont les effets des sucres sur la santé métabolique ? *Revue Médicale Suisse*, 8: 51318.
- Zhu J., Zhang Z., Yang Z. (2001). General research methods on pathogen of potato late blight (*Phytophthora infestans*). *Journal of Agricultural Sciences*, 24: 112- 114.