

**MATÉRIEL
ET
MÉTHODES**

I. Matériel

1 - Matériel de laboratoire

- Marmite de Richard
- Microscope optique
- Loupe binoculaire
- Etuve
- Autoclave
- Bec bunsen
- Balance de précision
- pH mètre
- Agitateur magnétique chauffant
- Thermomètre
- Cellule de comptage de Thoma
- Pipettes (0.5ml ,1ml ,10ml)
- Béchers
- Erlenmeyer
- Flacons
- Boîtes de Petri
- Scalpel
- Aiguilles.

2 - Matériel biologique

Notre matériel biologique est une souche fongique de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 (notée *F.o.l*) ; elle nous a été fournie gracieusement par le laboratoire de mycologie de la station régionale de la protection des végétaux (SRPV) de Ghardaïa.



Marmite de Richard



Etuve



Balance de précision



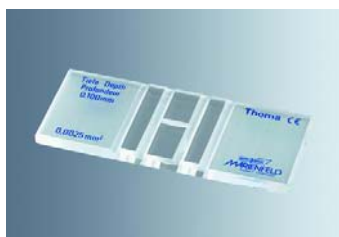
Autoclave horizontale



Bec Bunsen



Loupe binoculaire



Cellule de comptage de Thoma



Agitateur magnétique chauffant

Fig.10 - Présentation de quelques éléments du matériel de laboratoire utilisé

3. Milieux de culture utilisés:

L'étude de la vitesse de croissance de la spore a été réalisée sur les milieux de cultures suivants:

- **Milieu PDA**

Pomme de terre	200 g
Dextrose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

On fait bouillir 200g de pomme de terre, non pelée et coupée en petits morceaux, dans 1l d'eau distillée pendant 25 min. On filtre le bouillon pour extraire le jus de pomme de terre. Sur un agitateur on ajoute 20g de glucose et 20g d'agar. On complète à 1l. On autoclave pendant 20 min à 120°C.

- **Milieu Czapeck-Dox**

NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0.50 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.50 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
Saccharose	30 g
Agar-agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Ces deux milieux ont été parfois utilisés sous forme liquide, c'est-à-dire sans ajout d'agar à la composition du milieu.

II. Méthodes

II.1 –Evaluation de la croissance mycélienne

1. Culture monospore

La technique de la culture monospore permet d'obtenir un matériel génétiquement pur à partir d'une seule spore fongique.

Elle est effectuée de la manière suivante : dans des conditions stériles, un fragment de thalle d'une colonie est prélevé, puis mis dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau distillée

stérile. Le tube doit être bien agité. A partir de cette suspension mère, une série de dilutions est effectuée jusqu'à obtention d'une suspension de 10^2 et de 10^3 spore/ml. De ces dernières, on prélève à l'aide d'une pipette stérile 0,5 ml qu'on étale dans des boîtes de Petri contenant un milieu d'eau gélosée à 3%.

Après 16h d'incubation à 25°C, on examine les boîtes sous une loupe binoculaire, ou sous un microscope optique à faible grossissement, afin de repérer les spores qui sont en état de germination. Un bloc de gélose contenant la spore repérée est alors coupé avec un scalpel stérile puis prélevé aseptiquement à l'aide d'une aiguille fine et stérile et repiqué sur milieu de cultures (Djekiref, 1995).

2. Evaluation de la croissance mycélienne

L'évaluation de la croissance mycélienne a été effectuée selon deux procédures. La première consiste à mesurer le diamètre des colonies à l'aide d'une règle graduée La seconde par la mesure du poids du mycélium. La vitesse de croissance exprimée en cm/jr.

2.1 - Effet de la température d'incubation

L'objectif de cette manipulation est de déterminer les températures minimale, optimale et maximale de croissance de notre souche. Ce test a été effectué sur deux milieux de culture différents. Pour se faire, quatre boîtes de Petri, contenant le milieu de culture PDA et quatre autres le milieu Czapeck-Dox, ont étéensemencées au centre par une spore de la souche *F.o.l* étudiée. Les boîtes sont mises ensuite sous incubation à différentes températures : 15°C, 22°C, 27°C, 32°C et 37°C pendant 10jours. La quantification de la croissance mycélienne est réalisée par la mesure du diamètre des chacune des colonies poussées.

D'autre part, quatre flacons contenant 150 ml du milieu PDA et quatre autres comprenant 150 ml du milieu Czapeck-Dox sous forme liquide, ont étéensemencés par un inoculum. Ce dernier a été prélevé, à partir d'une culture sur boîte, par un emporte-pièce rond, sous forme de pastilles d'agar portant l'isolat fongique. L'incubation a été réalisée dans les mêmes conditions décrites précédemment.

L'évaluation de la croissance mycélienne est effectuée par la mesure du poids sec du mycélium de chaque colonie. Après filtration, à l'aide d'une compresse stérile, du milieu liquide dans le quel l'isolat a pris naissance, le mycélium est récupéré puis desséché dans une étuve à 80°C pendant 24H.

2.2 - Effet du milieu de culture

Pour sa spécificité, le milieu Czapeck-Dox a été retenu pour étudier l'effet du facteur en question. Pour déterminer les sources d'azote et de carbone qui seraient les mieux assimilées par la souche fongique étudiée, on a procédé à la variation de ces deux composants en qualité et en quantité. Les milieux ont été ajustés à pH 5.

2.2.1 - Influence de la source d'azote:

Différentes sources d'azote ont été utilisées pour désigner la source la plus assimilable la souche de *F.o.l* étudiée. Dans milieu Czapeck-Dox, la source d'azote le NaNO_3 (Nitrate de Sodium) est remplacée une fois par le KNO_3 (Nitrate de Potassium) et une autre fois par le CaNO_3 (Nitrate de calcium).

2.2.2 – Influence de la source de carbone

Pour connaître la nature du sucre dans lequel le champignon se développe le mieux, la source de carbone originale dans le milieu Czapeck-Dox, à savoir le saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), a été remplacée une fois par le glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), et une deuxième fois par le glucose également mais en substituant la source d'azote aussi ; une fois par le nitrate de calcium (CaNO_3), et une seconde par le nitrate de potassium (KNO_3).

Les différentes combinaisons citées au-dessus sont rassemblées dans le tableau 7. Quatre flacons contenant 150ml d'un des six milieux sous forme liquide, soit 24 flacons, ont été autoclavés à 120°C pendant 20 min. Après refroidissement, un ensemencement, par un inoculum sous forme de pastilles, comme cité ci-dessus, a eu lieu au niveau de chaque flacon. L'incubation est réalisée à 27°C pendant 15 jours. Une mesure du pH a eu lieu chaque trois jours. L'évaluation de la croissance mycélienne est effectuée par la mesure du poids sec du mycélium de chaque colonie.

Tableau 7 : Composition des six milieux de culture utilisés

<i>Milieu liquide</i>	<i>Composition</i>
M1	Czapeck-Dox (NaNO_3)
M2	Czapeck-Dox avec nitrate de calcium (CaNO_3)
M3	Czapeck-Dox avec nitrate de potassium (KNO_3)
M4	Czapeck-Dox avec glucose
M5	Czapeck-Dox avec glucose+nitrate de calcium (CaNO_3)
M6	Czapeck-Dox avec glucose + nitrate de potassium (KNO_3)



Fig. 11 - Incubation à 27°C d'une souche de *F.o.l* sur milieu Czapeck-Dox liquide



Fig. 12 - Dessiccation à 80°C du mycélium d'une souche de *F.o.l*

2.3 - Effet de PH:

Pour estimer le pH optimal à la croissance de la souche du *F.o.l.*, on a fait pousser un isolat sur un milieu Czapeck-Dox à base de KNO_3 . Cette dernière nous servira comme inoculum. Quatre flacons ont été préparés comme précédemment pour chaque valeur de PH à tester. Des solutions de tampons ont été ajoutées ; à base de borate (pour les valeurs de PH 7,8 - 8,8 - 9,8) et à base de phosphate-citrate (pour les valeurs 2,8 - 4,8 - 5,8) .

L'incubation a été effectuée à 27°C pendant 10 jours.

2.4 - Effet de NaCl :

L'objectif de cet essai est d'évaluer l'effet de la salinité sur la croissance végétative de la souche de *F.o.l* étudiée, des boîtes de Petri avec un milieu PDA ont été préparées. Du chlorure de sodium (NaCl) a été incorporé à des concentrations variables (g/l), à ce milieu . L'ensemencement de la souche fongique a été effectué par dépôt de disque au centre des boites. L'évaluation de la croissance mycélienne a été effectuée par la mesure du diamètre des colonies.

Trois boîtes pour chaque concentration de NaCl choisi ont étéensemencées. L'incubation est faite dans les mêmes conditions décrites précédemment.

2.5 - Effet de la pression et du type de sol

Le but est d'examiner les effets de la pression et du type de sol sur la prolifération de *F.o.lycopersici*. Pour ce faire, deux types de sol ont été choisis ; un sol argileux et un autre sableux. Les échantillons du sol, en provenance de la région de Laghrousse, ont été prélevés à une profondeur de 20cm.

2.5.1. Préparation de l'inoculum

Un Erlenmeyer, contenant 500 ml d'un milieu PDA liquide, estensemencé avec des implants mycéliens (disque de 4mm de diamètre) prélevés à partir de notre souche. Le système est laissé en agitation continue pendant 30 jours.

2.5.2. Préparation des sols

Les échantillons du sol ont été nettoyés des débris puis tamisés avec un tamis de (0.5 cm). Chaque échantillon a été stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 40 min. Quatre pesées de 28 g de chaque type de sol ont été effectuées. Chacune a été chargée dans des bouchons coniques en plastiques (4,5 cm de diamètre) perforés. (Fig.13)

A l'aide d'une pipette stérile, chaque bouchon chargé de sol a reçu 5ml de l'inoculum préparé auparavant. La concentration de l'inoculum a été ajustée à 10^6 spore/ml à l'aide d'une cellule de Thoma. Un bouchon témoin a reçu 5ml d'eau distillé stérile. L'ensemble a été mis dans le Marmite de Richard réglée à deux pressions différentes (0.5bar et 12bar).

Après 48h, des isolements de souche à partir de chaque échantillon du sol ont eu lieu. Pour cette fin, on a appliqué la technique d'isolement classique décrite par **Rapilly (1968)**.

Les boîtesensemencées ont été incubées dans un incubateur pendant deux jours à un température de 23°C. Le nombre des colonies a été déterminé sous une loupe binoculaire ou un microscope optique à faible grossissement.



Fig.13 – Echantillons des 2 types de sol placés dans la marmite de Richard

II.2 - Analyse statistique

L'analyse des mesures des paramètres étudiés a été effectuée par les logiciels Excel (Microsoft).