

Lutte contre *Rhizoctonia solani* Kühn, parasite du cotonnier par le nématode *Aphelenchus avenae* Bastian

Georges CAUBEL *, Bernard JOUAN *, Patrick QUÉNÉHERVÉ * ⁽¹⁾
et Jamal RADWAN **

* I.N.R.A.-E.N.S.A., Domaine de la Motte-au-Vicomte, B.P. 29, 35650 Le Rheu, France.

** Station de Recherches Agronomiques, Bureau du Coton, Alep, Syrie.

RÉSUMÉ

La lutte biologique contre l'agent de la fonte des semis, *Rhizoctonia solani*, peut s'envisager en utilisant un nématode mycéliophage, *Aphelenchus avenae*. L'utilisation d'*A. avenae* pour limiter la fonte des semis sur cotonnier a été expérimentée en serre selon divers modes d'application. L'espèce et la souche du champignon ont une importante influence sur le taux de développement du nématode. Des différences du simple au décuple ont été constatées entre diverses souches de *R. solani*. La production d'*A. avenae* est possible sur des cultures de champignons réalisées en milieu liquide dans un fermenteur expérimental. Une bonne survie du nématode est assurée par stockage au sec des individus en anhydrobiose. Les essais d'utilisation d'*A. avenae* pour lutter contre *R. solani* en culture de cotonnier montrent que si l'incorporation dans le sol ne donne pas de très bons résultats, l'enrobage des semences avec 5 000 individus par plante permet de réduire les fontes de semis (levée à 87% contre 47% dans le témoin). L'application d'*A. avenae* par enrobage de graines semble être un procédé biologique de lutte intéressant pour protéger les plantes contre certaines maladies fongiques.

SUMMARY

Control of Rhizoctonia solani Kühn, parasitic on cotton, with the nematode Aphelenchus avenae Bastian

Studies were carried out to improve techniques for mass production of the nematode *Aphelenchus avenae* and to determine optimum levels of application to control *Rhizoctonia solani* on cotton. *In vitro* multiplication of *A. avenae* was influenced by several factors. The nematode rate of multiplication varied not only with the species, but also with the strains of the fungus, and could be ten times higher on some fungal strains than on others. Differences were observed between nematode populations. Two parthenogenetic populations reproduced well, while an amphimictic population reproduced poorly. *A. avenae* could also be raised on fungal cultures in liquid medium in an experimental fermentation unit. The nematode inoculum was preserved in liquid medium fungal cultures at 5°, or in anhydrobiosis which required slow dehydration and rehydration. Experiments with biological control of *R. solani* were done in pots. The nematode inoculum was incorporated into the soil or coated on seeds. Seed coating gave good results, and a reduction in disease severity was obtained with 1 000 nematodes per cotton seed. However, 5 000 nematodes per cotton seed were necessary to give significant differences in germination : 87% for treated seeds, against 47% for untreated seeds.

Aphelenchus avenae, espèce mycéliophage cosmopolite, semble être un nématode intéressant pour la lutte contre le champignon, *Rhizoctonia solani*, agent, entre autres, de la fonte des semis du cotonnier. Sa reproduction, généralement parthénogénétique et son développement rapide en facilitent en effet la production de masse. L'éle-

vage en est possible, dans des conditions monoxéniques, sur champignons (Pillai & Taylor, 1963 ; Evans, 1970 ; Caubel, Bossis & Sanson, 1972) ou sur culture de tissus (Barker & Darling, 1965), voire même en conditions axéniques (Hansen, Buecher & Evans, 1970). Il peut être conservé pendant au moins un an, à l'état dessé-

(1) Adresse actuelle : Laboratoire de Nématologie, ORSTOM, B.P. V 51, Abidjan, Côte d'Ivoire.

ché, sur gélose (Townshend, 1964), voire plus, en conditions d'hygrométrie contrôlée (Crowe & Madin, 1974; Demeure, Freckman & Van Gundy, 1979).

Un nombre limité de travaux concerne les relations entre *A. avenae* et champignons phytopathogènes; l'apport d'*A. avenae* réduit les attaques de *Pythium arrhenomanes* sur maïs (Rhoades & Linfoord, 1959) et de *R. solani* sur pois (Klink & Barker, 1968), tomate (Roy, 1973), radis (Lemaire, Jouan & Saily, 1972) et cotonnier (Jouan *et al.*, 1972; Radwan, 1974); il agit également sur *Armillariella mellea* (Cayrol, Dubos & Guillaumin, 1978).

Le présent article a traité à l'élevage en masse d'*A. avenae* et à son action dans le sol contre les attaques de *Rhizoctonia solani* sur cotonnier.

Matériel et méthodes

L'étude de la multiplication d'*Aphelenchus avenae* sur diverses souches de *Rhizoctonia solani* a été effectuée en culture monoxénique réalisée selon des modalités précédemment décrites (Caubel, Bossis & Sanson, 1972). La souche de *R. solani* influence le taux de multiplication d'*A. avenae* (Tab. 1). La souche du nématode utilisée provient d'un sol de Syrie ayant porté du cotonnier; souche thélytoque (strictement parthénogénétique), elle est maintenue en élevage à Rennes depuis 1972. Différents milieux gélosés à 15‰ sont utilisés pour cultiver le champignon: malt à 20 g par litre, pomme de terre à 200 g par litre additionnée de glucose à 20 g par litre. Les élevages sont menés, soit en boîtes de Petri sur milieu nutritif gélosé, soit en fioles d'Erlenmeyer sur grain de blé ou mélange de paille et de malt, soit enfin en fermenteur. Dans ce dernier cas, on utilise une unité de fermentation de 2 litres, du type Biolafitte®: le milieu liquide est stérilisé dans la cuve même du fermenteur, champignon et nématodes sont incorporés avec une seringue stérile par la sonde d'inoculation. Le milieu est alors placé dans un bain thermostaté (26,5°) et aéré à l'aide d'une pompe débitant 40 ml à la minute. Les nématodes sont extraits des cultures par broyage de l'ensemble du contenu des boîtes de Petri, dans un mixeur, puis comptés dans une partie aliquote de la suspension. Les populations de

nématodes sont évaluées trois semaines après l'inoculation de dix femelles. Ce délai, à 20°, correspond généralement au plateau observé dans les courbes de développement de cette espèce en boîtes de Petri.

Tableau 1

Multiplication d'*Aphelenchus avenae* sur diverses souches de *Rhizoctonia solani* cultivées en boîtes de Petri sur milieu glucose/pomme de terre (Inoculum: 10 femelles; comptage après 21 jours). Les chiffres affectés de lettres différentes sont significativement différents ($P = 0,05$)

Multiplication of Aphelenchus avenae on various strains of Rhizoctonia solani grown in Petri dishes on potato-dextrose agar medium (Inoculum: 10 females; observation after 21 days). Figures bearing different letters are significantly different ($P = 0.05$)

Origine de la souche de <i>R. solani</i> Origin of <i>R. solani</i> strain	Effectifs d' <i>A. avenae</i> Numbers of <i>A. avenae</i>
Blé (<i>wheat</i>)	2 100 a
Tomate (<i>tomato</i>)	4 200 a
Radis (<i>radish</i>)	4 800 a
Pomme de terre (<i>potato</i>)	10 700 a
Iris (<i>Iris</i>)	34 400 a
Chou-fleur (<i>cauliflower</i>)	36 800 a
Chrysanthème (<i>chrysanthemum</i>)	37 100 a
Poivron (<i>sweet pepper</i>)	70 300 a b
Coton (<i>cotton</i>)	89 900 b
Lin (<i>flax</i>)	121 100 b
Orge (<i>barley</i>)	145 600 b c
Laitue (<i>lettuce</i>)	226 700 c

La conservation des nématodes a été testée par maintien à basse température (5°) et par dessiccation dans des enceintes à humidité relative contrôlée; l'humidité relative de 0% est obtenue avec l'acide sulfurique, celle de 97% avec une solution saturée de K_2SO_4 .

Les expériences de lutte ont été effectuées à 25°, température optimale de croissance de la majorité des souches de *R. solani* (Beyries & Messiaen, 1969). Les nématodes sont apportés par enrobage des graines de cotonnier (*Gossypium hirsutum*, cv. Coker Carolina Queen ou cv. Alep I), ou par incorporation dans le sol. Pour l'enrobage, une suspension aqueuse dosée de nématodes est répartie de manière homogène sur les graines, non délintées, dont les soies s'imbibent: 30 graines retiennent ainsi aisément 3 ml de suspension. La terre utilisée est

infestée ou non avec *R. solani*, souche cotonnier, cinq jours avant le semis.

Pour l'apport direct des nématodes au sol, la suspension est homogénéisée avec de la perlite avant mélange à la terre dans un pot de 11 cm de diamètre. Chaque traitement constitué par la terre, infestée ou non, par *R. solani*, avec ou sans *A. avenae*, est répété six fois à raison de cinq graines par pot. La culture est réalisée en serre, à une température de 25 à 30°.

Ont été aussi étudiés, l'effet du mode d'apport du nématode (enrobage des graines de cotonnier ou incorporation directe au sol), l'influence de la valeur de l'inoculum d'*A. avenae*, ainsi que l'effet de ce traitement sur un deuxième semis.

Les résultats sont évalués par examen de l'état végétatif des plantes dès la levée, dix jours et trois semaines après le semis. Les critères utilisés sont le nombre de plants survivants, leur poids et leur état sanitaire. Ce dernier est affecté d'un indice (*I*) permettant de chiffrer l'importance des symptômes : une note de 0 à 5 est attribuée à chaque plant, la note zéro correspondant à l'absence d'attaque, la note cinq à une plantule détruite avant la levée (fonte de préémergence), la note quatre à une très forte attaque conduisant à la mort de la plantule après la levée (fonte de post-émergence) ; les notes intermédiaires correspondent à des symptômes de nécroses sans mortalité des plantes. Cet indice est déterminé en fonction du nombre *N* de plants sur lequel portent les notations et la fréquence *fi* relative à chaque note considérée *i* suivant la formule :

$$I = \frac{\sum (i \times fi)}{N \times 5} \times 100$$

L'indice *I* peut varier ainsi de zéro (plantes toutes indemnes) à 100 (plantes toutes mortes avant la levée).

L'effet éventuel des traitements est testé sur un deuxième semis, effectué quelques jours après l'examen des plants issus du premier semis ; lors de ce deuxième semis, il n'y a pas enrobage des graines avec les nématodes.

Résultats et discussion

PRODUCTION EN MASSE D'*Aphelenchus avenae*

S'il est possible d'utiliser diverses espèces de champignons, tels *Fusarium roseum* et *F. oxys-*

porum pour élever *A. avenae*, les meilleurs résultats sont obtenus avec *Rhizoctonia solani* (Mankau & Mankau, 1963 ; Townshend, 1964 ; Evans, 1970). Comme il l'a été confirmé, il existe des différences marquées dans le taux de multiplication du nématode selon les souches de ce champignon (Tab. 1) ; ceci serait dû à une attractivité plus ou moins intense envers le nématode (Townshend, 1964 ; Mankau & Mankau, 1963) ou à des différences dans la taille des hyphes mycéliens (Cayrol, 1970).

D'autre part, il existe également des différences de comportement entre les souches d'*A. avenae*, différences soupçonnées par Townshend (1964), ce qui rend difficiles les comparaisons entre les différents travaux. La plupart des souches qui ont été étudiées sont parthénogénétiques, d'autres produisent des mâles dans certaines conditions de milieu, d'autres enfin sont diéciques avec fécondation obligatoire. Selon Triantaphyllou (1973), *A. avenae* serait en fait un complexe d'espèces en état d'évolution très active.

Une bonne production de nématodes est obtenue en utilisant un milieu à base de paille de blé additionnée ou non de malt : dans un Erlenmeyer d'un litre, on peut ainsi obtenir plusieurs millions de nématodes. La production d'*A. avenae* est également possible en milieu liquide (fermenteur) ; l'inoculation simultanée du champignon et du nématode en milieu au malt gélosé à 15 % permet d'y obtenir jusqu'à 2,8 millions de nématodes pour un litre de milieu, après 21 jours.

Cette possibilité d'élevage en fermenteur sur milieu liquide simple (pomme de terre et glucose, par exemple) permet d'envisager une production à l'échelon semi-industriel. La stérilité du milieu doit être maintenue pour obtenir le meilleur rendement ; une baisse très notable de la multiplication est en effet observée s'il y a contamination par *Aspergillus niger* ou divers *Penicillium*. *A. avenae* peut, en fait, se nourrir de ces champignons mais meurt rapidement lors de leur fructification.

A. avenae survit pendant plusieurs mois si les cultures sur extrait de malt gélosé se dessèchent au laboratoire sans précautions particulières. Les nématodes s'enroulent alors en spirale et forment des amas à la surface du milieu ; ils reprennent rapidement leur activité

Tableau 2

Comparaison de l'effet de l'inoculation d'*Aphelenchus avenae* par enrobage des graines de cotonnier et par incorporation au sol. *Rhizoctonia solani* est apporté au sol cinq jours avant le semis

Effects of inoculations of Aphelenchus avenae by cotton seed dressing or incorporation in soil. Rhizoctonia solani is added to the soil five days before sowing

Mode d'application Application method	Nématodes par graine ou par pot Nematodes per seed or per pot	Infestation avec <i>R. solani</i> Infestation with <i>R. solani</i>	Plants levés Shot plants	Plants survivants après 3 semaines Plants still alive after 3 weeks	Poids moyen des plants Average weight of plants	Intensité de la maladie Disease intensity
			%	%	g	I
Enrobage des graines <i>Seed dressing</i>	0	0	97	97	71	10
	5 000	0	100	100	73	11
	0	+	47	23	23	83
	1 000	+	47	30	23	78
	2 000	+	70	47	41	66
	3 000	+	53	47	42	71
	4 000	+	77	63	45	59
	5 000	+	87	63	47	58
Incorporation au sol <i>Incorporation in soil</i>	5 000	+	20	10	10	92
	15 000	+	47	30	30	76
	25 000	+	40	10	8	89

lorsque le milieu desséché est placé dans une boîte de Petri contenant un milieu gélosé à 2%. La survie du nématode, lors du stockage au sec dans un dessiccateur à l'acide sulfurique, est améliorée si la dessiccation et la réhydratation sont progressives, par passage à une humidité relative de 97% pendant 72 h avant dessiccation et pendant 24 h avant la réhydratation (Crowe & Madin, 1974). Des études de physiologie, telles celles de Freckman, Demeure et Van Gundy (1979) permettront certainement de mieux maîtriser l'anhydrobiose en vue de cette utilisation pratique éventuelle.

A basse température (5°), et en milieu liquide, l'activité du nématode est très ralentie, mais il n'entre pas en quiescence et peut continuer à s'alimenter pendant 18 mois au moins. En l'absence de champignon, *A. avenae* reste vivant pendant plusieurs semaines en suspension aqueuse, à condition que celle-ci soit aérée : lors d'un élevage semi-industriel, la conservation tant de l'inoculum que du produit ne poserait donc pas de problèmes.

UTILISATION D'*A. avenae* POUR LUTTER CONTRE *R. solani*

L'enrobage des semences par les nématodes s'est révélé meilleur que leur incorporation

directe au sol infesté par *R. solani* ; en inoculant 25 000 nématodes par pot contenant chacun cinq graines, les résultats sont médiocres, alors qu'à partir de 4 000 nématodes par graine enrobée, ils sont significatifs pour la levée, le nombre de plants survivants, leur poids et l'intensité de la maladie (Tab. 2). L'effet de l'enrobage des graines avec *A. avenae* se manifeste par une réduction de la fonte des semis tant en pré-émergence qu'en post-émergence ; cet effet est d'autant plus important que l'inoculum est plus fort (Tab. 2 & 3) : nul pour 1 000 nématodes par graine, il est faible pour 2 000 et 3 000 et une protection n'est bien assurée qu'à la dose de 5 000 nématodes par graine. Cependant, l'intensité de la maladie n'est pas nulle, même pour les traitements qui assurent une bonne protection. Sur le deuxième semis, toutefois, l'attaque de *R. solani* est moins forte. En aucun cas, le traitement n'a affecté la faculté germinative ou la végétation du cotonnier.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Klink et Barker (1968) qui inoculent les graines directement dans les trous de semis avec le nématode et le champignon pathogène. La réussite de cet enrobage est peut-être due à l'action rapide du nématode, nécessaire étant donné que la période de protection à assurer est relativement courte et précoce pour le coton-

Tableau 3

Influence de différents taux d'inoculations par enrobage des graines de cotonnier avec *Aphelenchus avenae* en sol infesté par *Rhizoctonia solani*
Influence of different levels of inoculation of Aphelenchus avenae by cotton seed dressing in soil infested by Rhizoctonia solani

	Nombre d' <i>A. avenae</i> par graine Number of <i>A. avenae</i> per seed	Infestation par <i>R. solani</i> Infestation with <i>R. solani</i>	Plants levés Shot plants %	Plants survivants après 3 semaines Plants still alive after 3 weeks %	Poids moyen des plants Average weight of plants g
Premier semis <i>First sowing</i>	0	0	95	90	67,5
	0	+	35	23	30,0
	500	+	58	48	53,0
	1 000	+	67	55	54,5
	5 000	+	97	93	88,5
Deuxième semis <i>Second sowing</i>	0	0	75	65	49,5
	0	+	67	42	26,0
	500	+	70	47	33,0
	1 000	+	83	67	48,5
	5 000	+	87	85	52,5

nier. L'arrière-effet observé lors du deuxième semis reste difficile à interpréter en raison notamment du phénomène de mycostase observé chez *R. solani*, ce qui conduit à une réduction de la maladie après une première infestation. La bonne réussite de l'expérimentation a été favorisée par les conditions de milieu, puisqu'à 25-30° se situent non seulement l'optimum de croissance de *R. solani*, mais aussi ceux de la germination des graines de cotonnier et de la multiplication d'*A. avenae*.

Il pourrait être intéressant de combiner l'apport d'*A. avenae* à un amendement organique ; on a observé en effet une réduction des fontes de semis dues à *R. solani* après incorporation de certains substrats protéiniques (Radwan, 1974). D'une façon plus générale, les matières organiques à décomposition rapide semblent favoriser les nématodes mycophages (Mankau, 1962). En plusieurs occasions, nous avons d'ailleurs observé des pullulations d'*A. avenae* à proximité de chaumes de blé après la récolte ; Norton (1959) a constaté le même phénomène après enfouissement des pailles de cette céréale.

En conclusion, il semble donc possible d'intervenir efficacement sur les fontes de semis occasionnées par *R. solani* au cotonnier en enrobant

les graines avec *A. avenae*. L'élevage de masse en fermenteur est envisageable sur des substrats peu coûteux. Restent à préciser l'efficacité et la rentabilité d'un tel traitement dans diverses conditions édaphiques et culturales.

RÉFÉRENCES

- BARKER, K.R. & DARLING, H.M. (1965). Reproduction of *Aphelenchus avenae* on plant tissues in culture. *Nematologica*, 11 : 162-166.
- BEYRIES, A. & MESSIAEN, C.M. (1969). Virulence et spécificité de quelques souches de *Rhizoctonia solani* vis-à-vis des plantes maraîchères. *Annls Phytopathol.*, 1 : 37-54.
- CAUBEL, G., BOSSIS, M. & SANSON, M.T. (1972). Observations sur l'élevage monoxénique *in vitro*, du nématode mycophage, *Aphelenchus avenae*, sur diverses souches de *Rhizoctonia solani*. *Annls Phytopathol.*, 4 : 411.
- CAYROL, J.C. (1970). Mise en évidence d'un facteur de résistance mécanique des champignons, à l'égard des nématodes mycophages. *C.r. heb. Séanc. Acad. Sci. Paris*, Sér.D, 270 : 813-816.
- CAYROL, J.C., DUBOS, B. & GUILLAUMIN, J.J. (1978). Etude préliminaire *in vitro* de l'agressivité de quelques nématodes mycophages vis-à-vis de *Trichoderma viride* Pers., *T. polysporum* (Link. ex. Pers.) Rifrai et *Armillariella mellea* (Vahl.) Karst. *Annls Phytopathol.*, 10 : 177-185.

- CROWE, J.H. & MADIN, K.A.C. (1974). Anhydrobiosis in nematodes : evaporative water loss and survival. *J. exp. Zool.*, 193 : 323-334.
- DEMEURE, Y., FRECKMAN, D.W. & VAN GUNDY, S.D. (1979). *In vitro* response of four species of nematodes to desiccation and discussion of this and related phenomena. *Revue Nématol.*, 2 : 203-210.
- EVANS, A.A.F. (1970). Mass culture of mycophagous nematodes. *J. Nematol.*, 2 : 99-100.
- HANSEN, E.L., BUECHER, E.J. & EVANS, A.A.F. (1970). Axenic culture of *Aphelenchus avenae*. *Nematologica*, 16 : 328-329.
- JOUAN, B., RADWAN, J., LEMAIRE, J.M. & BOSSIS, M. (1972). Résultats préliminaires concernant les possibilités d'utilisation d'*Aphelenchus avenae*, pour lutter contre *Rhizoctonia solani*. *Annls Phytopathol.*, 4 : 411-412.
- KLINK, J.M. & BARKER, K.R. (1968). Effect of *Aphelenchus avenae* on the survival and pathogenic activity of root - rotting fungi. *Phytopathology*, 58 : 228-232.
- LEMAIRE, J.M., JOUAN, B. & SAILLY, M. (1972). Diminution de la progression du *Rhizoctonia solani* en sol désinfecté, par le traitement à l'aide d'*Aphelenchus avenae*. *Annls Phytopathol.*, 4 : 11.
- MANKAU, R. (1962). The effect of some organic additives upon a soil nematode population and associated natural enemies. *Nematologica*, 7 : 65-73.
- MANKAU, R. & MANKAU, S.K. (1963). The role of mycophagous nematodes in the soil. In : Doeksen J. & Van der Drift J. (Eds) *Soils organisms*. Amsterdam, North Holland Publ. Co. : 271-280.
- NORTON, D.C. (1959). Relationship of nematodes to small grains and native grasses in north and central Texas. *Pl. Dis. Repr.*, 43 : 227-235.
- PILLAI, J.K., TAYLOR, D.P. (1963). Influence of fungi on host preference, host suitability, and morphometrics of five mycophagous nematodes. *Nematologica*, 13 : 529-540.
- RADWAN, J. (1974). Contribution à l'étude de possibilités de lutte contre *Rhizoctonia solani*, principal agent de fonte de semis du cotonnier en Syrie. *Thèse, Univ. Faculté Sciences, Rennes*, 150 p.
- RHOADES, W. & LINFORD, O. (1959). Control of *Pythium* root-rot by the nematode *Aphelenchus avenae*. *Pl. Dis. Repr.*, 43 : 323-328.
- ROY, A.K. (1973). Effects of *Aphelenchus avenae* on tomato plants infected with *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum coccodes*. *Z. PflKrankh. PflPath. PflSchutz*, 80 : 23-33.
- TOWNSHEND, J.L. (1964). Fungus hosts of *Aphelenchus avenae* and *Bursaphelenchus fungivorus* and their attractiveness to these nematode species. *Can. J. Microbiol.*, 10 : 727-737.
- TRIANTAPHYLLOU, A.C. (1973). Environmental sex differentiation of nematodes in relation to pest management. *A. Rev. Phytopath.*, 11 : 441-462.

Accepté pour publication le 2 octobre 1980.