	LABO - PATHOLOGIE	2017
	Test Précoce de sensibilité à <i>Sclerotinia</i> sur plantule de <i>Cichorium</i>	

Matériel :

Préparation des plantules et semis :

- Bacs plastique multi-usage 600 x 400 x 210 mm (Arca-systems)
- Racks (boîtes) pour 50 pointes de pipettes 5ml (Gilson D5000 ou autres)
- Pointes (cônes) de pipettes stériles 5 ml (D5000 ou autres)
- Sacs autoclavables
- Perlite horticole
- Boîtes de Pétri vides
- Pinces Brucelle
- Salle de culture climatique (type Phytotron)

Préparation de l'inoculum mycélien :

- Milieu Potato Dextrose Agar (PDA) en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre
- Emporte-pièce de 2 mm de diamètre
- Erlenmeyers de 250 ml
- Bouillon Potato Dextrose
- Eau Distillée Stérile
- Agitateur orbital
- Broyeur Waring Blender à bol en verre de 500 ml
- Compresses médicales stériles
- Spectrophotomètre
- Microscope
- Cellule de Malessez
- Agitateur magnétique et barreaux aimantés
- Bécher de 1 litre
- Pipette à répétition
- Pointes de Pipette stériles

Préparation des locaux et du matériel végétal :

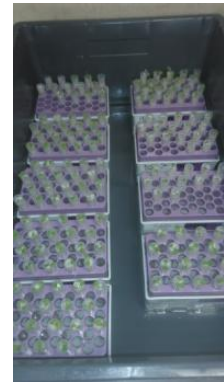
- Mettre en route la salle de culture à l'avance afin que les paramètres soient stabilisés avant le semis.
Thermo période jour/nuit 21°C/16°C, photopériode : 12 h/12 h
- Stériliser les racks, les cônes et la perlite à l'autoclave selon un cycle de 20 minutes à 120°C. Attention, ne pas fermer les sacs de perlite hermétiquement pour éviter qu'ils n'éclatent.
- Après refroidissement du matériel, remplir au maximum les pointes de pipettes avec la perlite. Ne pas laisser d'espace vide pour permettre l'irrigation par remontée capillaire.
- Tapoter les pointes pour tasser la perlite. Le niveau de perlite baisse d'environ 0,5 cm ce qui facilitera le semis.
- Prévoir 3 boîtes (répétitions) de 50 cônes par génotype testé, référencées avec le nom du lot et la répétition.
- **Prévoir des génotypes de référence pour pouvoir comparer entre eux les génotypes testés au cours d'essais différents.**



Semis :

- Semer à 0.5 cm de profondeur dans la perlite, de 1 à 3 graines par cône (en fonction du taux de germination des lots de semences) à l'aide d'une pince Brucelle. Au final, le test utilisera 3 répétitions de 20 plantules.
- Déposer 400 ml d'eau osmosée dans le fond des racks avant de remettre le support avec les cônes en place. La base des cônes trempe dans l'eau qui va remonter par capillarité dans la perlite.
- Ajouter 1 ml d'eau à la pipette automatique au dessus de chaque graine pour favoriser une germination la plus rapide et homogène possible.

- Les racks ainsi préparés sont disposés dans les bacs plastiques multi-usage, à raison de 10 racks maximum par bac de 600 x 400. On dépose dans le fond des bacs, 1 litre d'eau qui assure le maintien d'une hygrométrie suffisante autour du dispositif.
- Les bacs sont ensuite disposés sur les tables de culture dans la salle Phytotron préalablement paramétrée.
- Vérifier régulièrement la présence d'eau au fond des bacs, et compléter si nécessaire.



NB : Pour éviter des problèmes liés à une hétérogénéité d'éclairage, de ventilation ou de température, ne pas disposer les différentes répétitions d'un même lot dans un même bac. Etablir un plan d'essai selon le modèle d'étude statistique utilisé pour l'exploitation des résultats (analyses par blocs).



Tri et sélection des plantules :

- Le 1^{er} tri est réalisé à J+12 après le semis.
- Les tubes avec des graines non germées, des plantules chétives, malades ou mal formées sont éliminés.
- L'eau au fond des boîtes est remplacée par 300 ml de solution nutritive complète.
- A J+20, veille du jour d'inoculation, un 2^{ème} tri est réalisé selon les mêmes modalités pour conserver au final 60 plantules saines et de stade homogène.
- Les cônes sont disposés en quinconce à raison de 20 par rack.



Préparation de l'inoculum :

- **Attention**, l'inoculation est réalisée 21 jours après le semis mais nécessite d'anticiper les étapes successives de culture des souches du pathogène.
- Nous recommandons de planifier et coordonner les différentes étapes de ce test suivant un calendrier précis.
- 8 jours avant inoculation, des sclérotés de la souche de *Sclerotinia* utilisée pour le test (Souche RZ) sont déposés en conditions aseptiques sur une gélose PDA en boîte de Pétri. Les sclérotés peuvent être coupés en 2 de façon stérile afin de faciliter la reprise de la croissance.
- Les boîtes sont laissées à température ambiante ou à 21°C pour favoriser la germination des sclérotés et la relance de la culture du champignon.

NB : La germination étant +/- longue et aléatoire, les relances sont réalisées idéalement le jeudi ou vendredi de la semaine précédent l'inoculation. Prévoir plusieurs boîtes de relance par précaution.

- 5 jours avant inoculation, et selon la reprise de la culture du champignon, procéder à un repiquage intermédiaire pour utiliser le mycélium en phase optimale pour la relance de la culture en milieu liquide. Idéalement, le mycélium prélevé ne doit pas être à moins d'1 cm du bord des boîtes de Pétri.
- 2 jours avant inoculation, 7 plugs de 2mm de diamètre sont prélevés, en conditions aseptiques, en marge du front de culture du mycélium sur le milieu PDA. Les plugs sont transférés dans un Erlenmeyer bouchant contenant 75 ml de bouillon Potato-Dextrose stérile. Deux flacons sont ensemencés pour « assurer » la manipulation. Les flacons sont mis en culture à température ambiante sur une table d'agitation (New-Brunswick Excella E1) réglée 120-140 rpm.

- Le jour de l'inoculation, les « pelotes » de mycélium de *Sclerotinia sclerotiorum* sont récupérées sur un tamis de maille 315 µm, lavées dans de l'eau stérile, transférées dans 75 ml de bouillon Potato-Dextrose stérile, broyées au Blender 15 s à vitesse lente puis 15 s à vitesse rapide dans un bol en verre de 500 ml.
- Le broyat est filtré sur 3 épaisseurs d'une compresse stérile.
- La Densité Optique de la suspension est mesurée au spectrophotomètre à 600 nm. La suspension est diluée jusqu'à obtenir une DO de 0,1 à 600 nm pour atteindre une concentration proche de $2 \cdot 10^4$ UFC/ml.
- Un contrôle sur Cellule de Malassez est réalisé pour valider la concentration. Si la dilution est validée, le volume d'inoculum nécessaire est préparé à raison de 0.5 ml par plantule.

$Vi\ mini = \text{nombre de cultivars étudiés} \times 3\ rep \times 20\ plantes \times 0,5\ ml$

- Arrondir le volume à la centaine supérieure pour faciliter les calculs de dilution:

Exemple : 620 ml => préparation de 700ml

- L'inoculum est préparé comme suit :

Volume calculé de suspension mère

+ Eau distillée stérile qsp pour 100 ml de suspension fille

+ PDA à 10% d'agar en surfusion à 55°C qsp jusqu'au volume final d'inoculum.

- Les trois composants sont mélangés ensemble et mis sous agitation magnétique pendant 30 à 60 minutes pour évacuer le maximum de bulles d'air. Après ce délai, maintenir l'inoculum sous agitation et en prélever une fraction à la pipette automatique répétitive.
- Déposer 0,5 ml de l'inoculum au collet de chaque plantule, en évitant les projections et les contacts sur le feuillage.
- Un complément de 100 ml de solution nutritive est apporté au fond des racks
- Les racks sont ensuite replacés dans les bacs multi-usage (vérifier qu'ils contiennent encore de l'eau et en ajouter si nécessaire). Placer les bacs dans la salle de culture selon le plan d'essai prévu.
- Pour maintenir une hygrométrie indispensable au développement du champignon, chaque bac multi-usage est couvert d'une plaque de plexiglas limitant l'évaporation et saturant ainsi l'atmosphère en humidité.
- Tester la viabilité de l'inoculum préparé par dépôt de 0,5 ml sur plusieurs boîtes de milieu PDA pour contrôler l'apparition de mycélium après 2-3 jours.
- Diluer 1ml d'inoculum en cascade jusqu'à la dilution 10^{-3} , puis étaler 1 ml des différentes solutions sur milieu PDA afin de contrôler a posteriori la calibration de l'inoculum par dénombrement des colonies apparues.

Notations du test :

- L'apparition des symptômes est suivie régulièrement à J+3, J+5, J+7, J+10, J+12 et J+14.
- Les plantules mortes sont dénombrées et éliminées au fur et à mesure de l'avancée du test afin d'éviter les contaminations de proche en proche par contact des tissus lésés.
- Les symptômes se caractérisent par un brunissement des tissus au collet, un affaissement de la plantule, une propagation des nécroses à l'ensemble des tissus puis la mort de la plante.
- A l'apparition des symptômes, on teste donc la fragilité du collet en tirant très précautionneusement sur les feuilles de la plantule. Si le bouquet foliaire se détache du collet, la plantule est comptée comme morte et le tube est éliminé. Un collet totalement nécrosé entraîne la mort certaine de la plantule.
- Tant que le bouquet foliaire ne se détache pas, la plantule est laissée en place pour obtenir une cinétique de mortalité la plus représentative possible.
- Le pourcentage de mortalité ainsi que l'arcsinus du pourcentage de mortalité sont calculés.

Analyse des résultats:

- Les résultats obtenus sont analysés statistiquement.
- Les notations à 5 et/ou 7 jours sont souvent les plus discriminantes.

Protocole simplifié du test précoce de sensibilité à *Sclerotinia sclerotiorum* sur plantules en laboratoire

Méthode du test.

Le test repose sur la préparation d'une pépinière de plantules, élevées à partir de semis direct dans des cônes Eppendorf (5 ml) individuels remplis de perlite stérile (photo 1).

L'irrigation fertilisante se fait par capillarité. Les cônes sont posés sur leurs supports disposés dans des bacs (multi usages Alibert 60x40x21cm) contenant un litre d'eau pour maintenir une hygrométrie suffisante.

Les caisses sont disposées dans une enceinte climatique à 21°C et une photopériode de 16 heures.

Deux tris successifs sont réalisés après 1 et 2 semaines pour disposer de 3 répétitions (« boîtes ») de 20 plantules de stade homogène par génotype.

Les cônes sont à ce moment espacés sur les supports pour faciliter les manipulations, l'aération entre les tubes et éviter le contact de plante à plante.

L'inoculation intervient sur des plantules âgées de 21 jours. Les caisses contenant les boîtes de cônes sont alors recouvertes d'une plaque de plexiglas pour saturer l'atmosphère d'humidité.



Photo 1 : Dispositif du test « plantule ».

Préparation de l'inoculum

Dix jours avant l'inoculation, un sclérote stérile de *S. sclerotiorum* est mis en culture sur un milieu PDA.

Après 3 jours, 7 implants de gélose (Ø2 mm) sont prélevés en marge de la culture mycélienne et mis sous agitation pendant 3 jours dans 75 ml d'un milieu Potato-Dextrose liquide.

Le mycélium obtenu est filtré sur un tamis (315 µm) et rincé à l'eau stérile.

Il est récupéré et broyé au Blender (15'' à vitesse rapide puis 15'' à vitesse lente) dans 75 ml de milieu Potato-Dextrose neuf.

Le broyat obtenu est passé sur une compresse pliée sur 3 épaisseurs.

Le filtrat est dilué avec le milieu PDA en surfusion à 50°C jusqu'à obtention d'une DO de 0.1 à 600 nm.

Les plantules sont inoculées par dépôt de 0,5 ml de cette suspension calibrée déposée au niveau du collet.

Notations

Les plantes mortes ou atteintes au collet sont dénombrées tous les 2 jours et éliminées pour éviter les contaminations par contact.

Les notations se font jusqu'à 14 jours après l'inoculation.