



Maîtriser l'oïdium du fraisier au laboratoire pour mieux le combattre



▲ **Plants de fraisier 'Darselect' ayant atteint un stade de développement optimal pour le prélèvement de folioles (photo A. Sombardier).**

Ces dernières années, l'aggravation des épidémies d'oïdium du fraisier dans les cultures sous abri, malgré une lutte chimique intensive, nécessite de mieux connaître le champignon responsable. Plusieurs méthodes de laboratoire ont été mises au point afin de permettre sa conservation, sa multiplication et son inoculation sur fraisier, mais aussi d'étudier sa biologie. Présentation de ces méthodes et exemples d'applications.

par Audrey Sombardier ** , Laetitia Willocquet*,
Marie-France Corio-Costet*, Aurélie Petit ***,
Serge Savary* et Dominique Blancard**

En France, l'oïdium du fraisier (*Podosphaera aphanis* var. *aphanis*) est devenu la principale maladie du fraisier cultivé sous abri. Devant le manque de connaissances disponibles sur ce champignon, un projet pluridisciplinaire, associant recherche fondamentale (Inra, Ciref**), expérimentation (C.T.I.F.L.***, Hortis Aquitaine) et développement (chambres d'agriculture-24, 29, 38, 41, 47, 84), a été construit en 2005. Afin d'atteindre les objectifs de ce projet, il convenait de maîtriser, *in vitro*, la survie du champignon responsable. L'étude d'un agent pathogène parasite obligatoire est souvent une opération complexe, principalement à cause des difficultés rencontrées pour le conserver et le manipuler au laboratoire. *P. aphanis* var. *aphanis* entre dans la catégorie de ces bioagresseurs. Comme les autres oïdiums, il n'est cultivable sur aucun des milieux de culture à la disposition des myco-

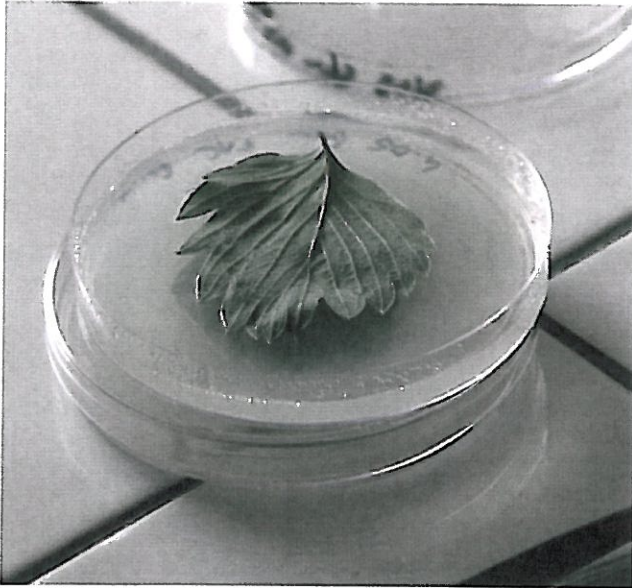
*Inra, U.M.R. Santé végétale, B.P. 81, 33881 Villenave d'Ornon cedex.

**C.T.I.F.L., 22 rue Bergère, 75009 Paris.

***Ciref, Création variétale fraises fruits rouges, Maison Jeannette, 24140 Douville.

*Création variétale fraises fruits rouges

**Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes.



▲ 2 Foliote désinfectée déposée en boîte de Petri sur milieu gélosé contenant du benzimidazole (photo A. Sombardier).

logues. Aussi, un ensemble de méthodes a été mis au point à l'Inra-Bordeaux (33) afin de conserver, multiplier, inoculer ce champignon, et mesurer ses paramètres biologiques.

UN SUPPORT DE CULTURE VIVANT : LA FEUILLE DE FRAISIER

P. aphanis var. *aphanis* ne se développant que sur son hôte vivant, il est indispensable de disposer d'un matériel végétal de qualité. Dans le cas du fraisier, des jeunes plants frigo* des variétés 'Darselect' et 'Gariguettes' sont élevés en pot toute l'année en serre verre, dans un substrat à base de tourbe et de sable. Les plantes produites doivent être indemnes d'oïdium. Pour cela, elles sont protégées par des traitements préventifs

*plants de fraisier récoltés en période de repos végétatif durant l'hiver et conservés plusieurs mois à -2 °C.

ÉCRAN THERMIQUE HYGROFILM®

Nouvelle conception qui offre

- Economie d'énergie de l'ordre de 40 % mesurés*
- Transmission lumineuse maximale supérieure de 10 % par rapport au témoin*
- Hygrométrie régulée grâce aux fils véhiculant la vapeur d'eau

* Source Hortis Aquitaine, Hiver 2009, sur tomates

www.texinov.fr
info@texinov.fr

Tel : 04 37 05 05 24
Fax : 04 74 97 37 54

texinov
AGROTEXTILES

à base de soufre. Lorsque les plants ont entre 1 et 3 mois, il est possible de prélever des **jeunes feuilles** (ou **folioles**) âgées de 2 semaines et de les utiliser (photo 1). Celles-ci sont dans un 1^{er} temps rincées à l'eau permutée. Par la suite, le travail s'effectue sous hotte stérile à flux laminaire horizontal. Les feuilles (ou folioles) sont désinfectées dans une solution d'hypochlorite de calcium 65 % (20 à 50 g/l) pendant 10 min, rincées à l'eau stérile pendant 10 min, séchées entre 2 feuilles de papier-filtre stérile, et déposées, face supérieure contre le milieu gélosé (contenant 20 g/l d'agar supplémenté avec du benzimidazole 98 % à 30 mg/l), dans des boîtes de Petri (photo 2). D'autres supports végétaux peuvent être utilisés pour étudier le comportement de cet oïdium au laboratoire ou pour le conserver : des **plantules de différents génotypes issues d'akènes** permettant par exemple d'étudier leur sensibilité à ce champignon, des **vitroplants** (photo 3) fournis par le C.T.I.E.L.-Balandran (30) assurant une conservation de plusieurs mois de nos différentes souches.

CLONAGE ET PRODUCTION DE L'OÏDIUM *IN VITRO*

Les souches de *P. aphanis* var. *aphanis* sont récupérées à partir d'échantillons de feuilles (photo 4) ou d'inflorescences oïdiées collectés durant toute l'année dans les 4 principaux bassins de production (Bretagne, Val de Loire, Sud-Est, Sud-Ouest). L'obtention d'une souche monoconidienne consiste à prélever, dans un environnement axénique, une conidie à l'aide d'un cil humain et sous le contrôle d'observations à la loupe binoculaire. Cette conidie est déposée sur la face inférieure d'une foliole désinfectée et maintenue en survie sur milieu agar-benzimidazole. Plusieurs isollements sont réalisés/échantillon, selon la même procédure, afin d'être certain de récupérer au moins 1 souche/site de prélèvement. Les boîtes sont fermées, scellées avec un ruban de film alimentaire et mises à incuber à 22 °C avec une photopériode de 12 h (1 500 lux). Après 10 j, une colonie sporulante apparaît sur un nombre variable de folioles. Chaque souche ainsi obtenue peut être multipliée sur d'autres folioles pour produire de l'inoculum en masse.

La conservation des souches a lieu sur vitroplant. Pour cela, des conidies sont déposées sur des jeunes feuilles de vitroplants en y frottant légèrement une foliole oïdiée sporulante. Après une période d'incubation de 8 j à 22 °C, les vitroplants oïdiés sont maintenus à basses températures, avec une thermopériode de 9 °C jour/7 °C nuit (16 h de jour, 1 500 lux). Chaque souche conservée dans ces conditions doit être repiquée tous les 3 à 4 mois.

QUELQUES MÉTHODES D'INOCULATION

La réalisation de contaminations nécessite de disposer d'un inoculum de qualité. Il est produit à partir de folioles contaminées mises à incuber une quinzaine de jours, celles-ci disposant à terme de suffisamment de spores pour réaliser des infections. Deux techniques d'inoculation peuvent être mises en œuvre selon les objectifs recherchés :

- l'**inoculation oligospore** ; l'inoculum est localisé sur l'organe à l'aide d'une pointe fine en déposant quelques dizaines



▲ 4 Souche de *Podosphaera aphanis* var. *aphanis* conservée sur un vitroplant (photo Inra).

de conidies sur la surface à infecter ; l'inoculation peut se faire à l'aide d'une loupe binoculaire ou à l'œil nu, après avoir maîtrisé les gestes assurant le prélèvement et le dépôt des spores sans altérer la feuille ; cette méthode permet par exemple d'obtenir des colonies isolées et de suivre dans le temps leur croissance individuelle ;

- l'**inoculation généralisée** ; l'inoculum est saupoudré sur l'ensemble de l'organe ; pour cela, une tour d'inoculation en PLEXIGLAS* est utilisée (photo 5) ; dans ce cas, des conidies d'oïdium sont détachées de folioles sporulantes, grâce à un souffle d'air généré par un bulleur d'aquarium, et dispersées dans la tour ; la densité de spores obtenue est mesurée à l'aide d'une cellule de Malassez* placée à

*lame de verre quadrillée permettant de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution.

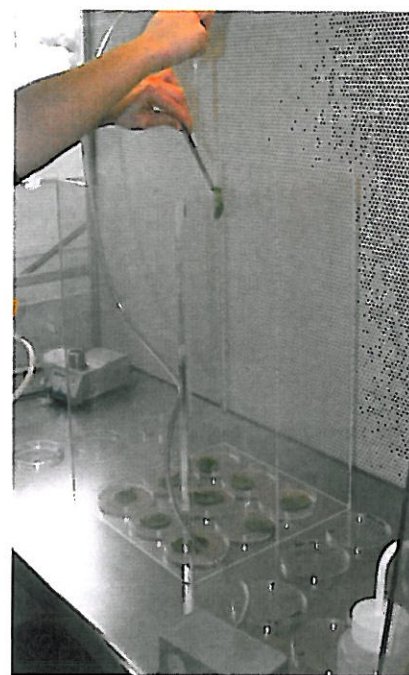


▲ 4 Feuille de fraisier oïdiée à partir de laquelle une souche de *Podosphaera aphanis* var. *aphanis* va être clonée (photo D. Blancard).

la base de la tour, à proximité des supports végétaux inoculés ; après un laps de temps de 3 min, assurant le dépôt complet des conidies sur l'organe à inoculer et la cellule de Malassez, des observations au microscope photonique permettent de quantifier le nombre de conidies déposées/unité de surface ; pour ce type d'inoculation, la qualité de l'inoculum est primordiale ; la culture d'oïdium doit être âgée de 10 à 15 j afin de disposer d'un maximum de conidies viables, et être indemne de contaminations ; à titre d'exemple, une foliole oïdiée de qualité permet d'inoculer 10 folioles et d'obtenir une densité d'inoculum de l'ordre de 500 spores/cm².

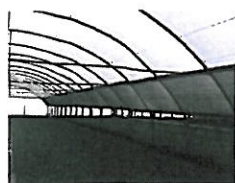
MESURE DE PARAMÈTRES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Grâce à la maîtrise de *P. aphanis* var. *aphanis in vitro*, il est possible, entre autres, d'observer et de quantifier les étapes essentielles de son cycle de développement.



▲ 5 Inoculation de plusieurs folioles de fraisier par saupoudrage à l'aide d'une tour (photo D. Blancard).

FILETS DE PROTECTION POUR L'AGRICULTURE

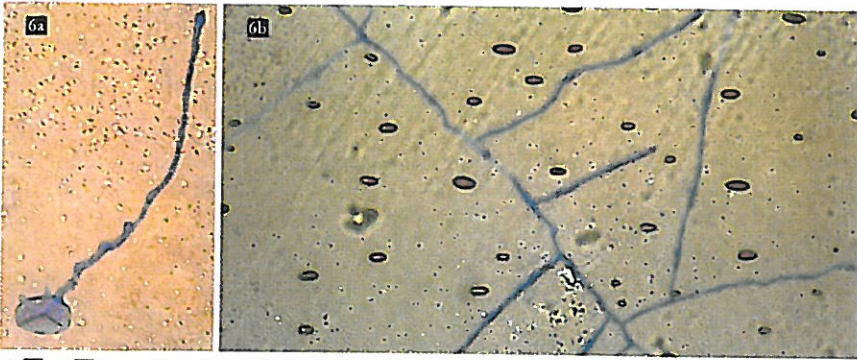


DIATEX
FABRICANT DE TISSUS TECHNIQUES

Une large gamme de
filets de qualité

- Filets brise-vent
- Filets à ramer
- Filets d'ombrage
- Filets anti-grêle
- Filets insect-proof
- Toiles hors-sol
- Filets anti-oiseaux
- Filets de récolte

58 chemin des Sources - 69230 Saint-Genis Laval - Tél. 00 33 (0)4 78 86 85 00 - Fax 00 33 (0)4 78 51 26 38 - www.diatex.com - email : info@diatex.com

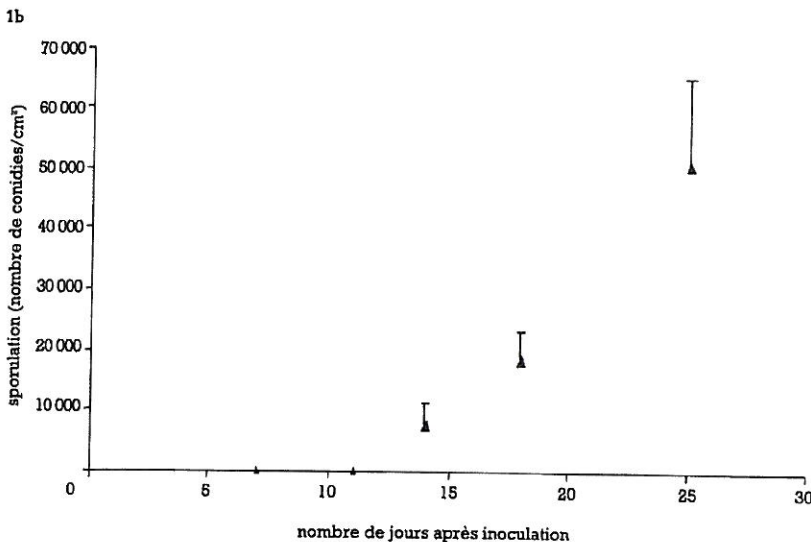
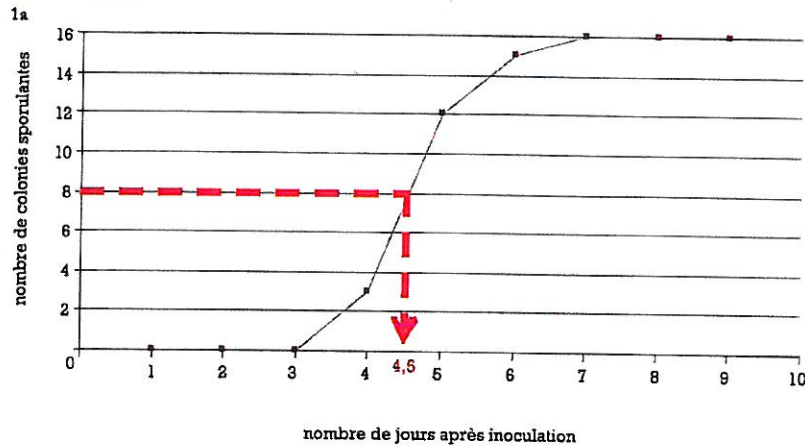


▲ 6a et 6b Premières étapes du cycle biologique de *Podosphaera aphanis* var. *aphanis*.
6a. Une conidie germée, dont l'hyphe mycélienne présente par la suite (6b) plusieurs ramifications (photos A. Sombardier).

Figure 1. Exemples de paramètres épidémiologiques mesurés grâce aux méthodes mises au point pour étudier l'oïdium du fraisier.

1a. Évolution du nombre de colonies sporulantes sur des folioles de la variété 'Darselect'. La période de latence minimale de *Podosphaera aphanis* var. *aphanis* est de 3 j. Dans cette expérimentation, la latence 50 (LP50) est de 4,5 j.

1b. Évolution de la sporulation d'une colonie de *P. aphanis* sur foliole de fraisier de la variété 'Darselect'. Après 25 j d'incubation, la densité de conidies est de l'ordre de 60 000/cm².



Les 1^{res} étapes du cycle, la germination (photo 6a) et la ramification des hyphes (photo 6b), sont suivies par la "technique du ruban adhésif". Cette dernière consiste à prélever les conidies plus ou moins germées en les faisant adhérer à un ruban adhésif mis en contact avec la feuille inoculée, à le décoller de la feuille, et à le plaquer à une lame de verre sur laquelle une goutte de bleu coton lactophénol a été déposée. La préparation est observée à l'aide d'un microscope photographique (grossissement 200), afin d'apprécier et de quantifier le nombre de spores germées, la formation d'hyphes ramifiées, la présence d'appressoria*... Les pourcentages de germination et d'infection peuvent être ainsi calculés. Dans le cas de l'oïdium du fraisier, nous considérons qu'il y a eu infection si l'hyphe issue de la germination s'est ramifiée et présente donc des hyphes secondaires. Dans nos conditions expérimentales (22 °C et 80 % d'humidité), les pourcentages de germination mesurés peuvent atteindre plus de 80 % en 24 h ; les pourcentages de filaments germinatifs ramifiés (et donc d'infection) sont de l'ordre d'à peine 20 %, 3 j après dépôt des conidies.

La **croissance mycélienne** est évaluée en mesurant au cours du temps le diamètre des colonies (correspondant aux lésions). Une observation quotidienne de ces dernières permet d'évaluer la progression radiale du mycélium (hyphes rasant la feuille), et de détecter l'apparition des 1^{res} conidies (portées par les conidiophores), initiant la sporulation. La **période de latence** peut être calculée, et plus particulièrement la LP50 qui correspond au laps de temps après inoculation permettant d'obtenir 50 % de lésions sporulantes (figure 1a). Enfin, l'**intensité de sporulation** peut être estimée à l'aide d'une échelle visuelle étalonnée** (figure 1b).

Les modalités expérimentales qui permettent d'apprécier l'ensemble des paramètres biologiques de *P. aphanis* var. *aphanis* sont synthétisées tableau 1. Ces méthodes permettent aussi de

*Appressorium (appressoria au pluriel) est l'extrémité d'une hyphe ou d'un tube germinatif permettant la fixation d'un champignon sur son hôte et sa pénétration
**échelle variant de 0 (absence de sporulation) à 11 (très forte sporulation correspondant à 147 200 ± 26 200 conidies/cm²)

Tableau 1. Synthèse des modalités expérimentales permettant d'étudier les caractéristiques biologiques de *Podosphaera aphanis* var. *aphanis* responsable de l'oïdium du fraisier.

paramètre mesuré	méthode d'inoculation	matériel végétal utilisé	nombre de répétitions	méthode ou moyen d'observation	nombre et fréquence des observations
pourcentage de germination	- inoculation par saupoudrage dans une tour - faible densité de conidies (100-200 spores/cm ²)	- disques foliaires - folioles	5-6 (faible variabilité)	"test du ruban adhésif"	une seule lecture (destructive) réalisée entre 24 h et 3 j une seule lecture (destructive) réalisée entre 2 et 3 j
ramification des hyphes			5-10 (variabilité moyenne)		
efficacité d'infection	inoculation localisée (1-3 spores)	- disques foliaires d'assez grande taille - folioles	15-20	observation à la loupe binoculaire	lecture tous les jours (prévoir l'inoculation le vendredi pour ne pas rater la phase la plus importante qui intervient à partir de 4-5 j) lecture 2 fois/semaine
période de latence					
croissance de la colonie					
évolution de la sporulation					
pourcentage de surface sporulante	- inoculation par saupoudrage dans une tour - densité moyenne de conidies (200-500 spores/cm ²)	- disques foliaires - petites folioles - plantes entières	10-15	estimation à la loupe binoculaire ou à l'œil nu	une seule lecture à une date donnée, ou 1 à 2 lecture(s)/semaine
intensité de sporulation	- inoculation localisée (1-5 spores) - inoculation par saupoudrage dans une tour (200-500 spores/cm ²)	- disques foliaires - folioles - plantes entières	15-20	estimation à la loupe binoculaire suivant une échelle de notation (notes de 0 à 11), ou comptage à la cellule de Malassez ou au compteur à particules*	une seule lecture (destructive)

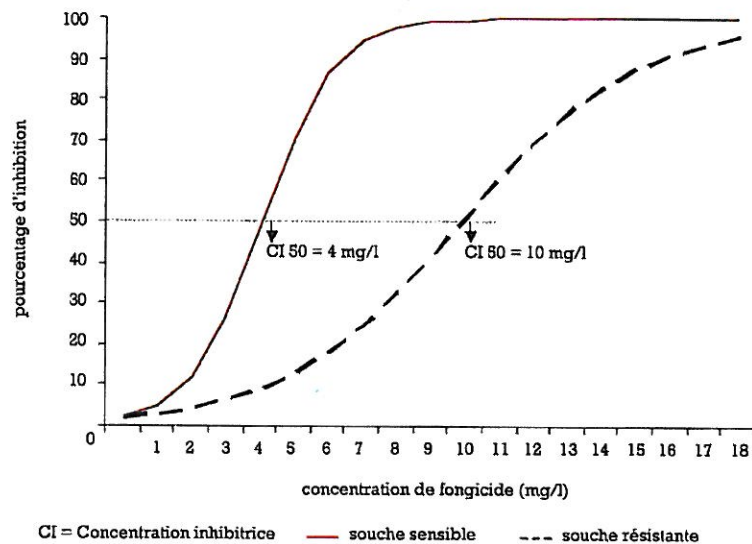
*matériel de laboratoire permettant le dénombrement automatique de particules en suspension dans un liquide conducteur.

quantifier l'influence de facteurs variés (conditions climatiques et en particulier la température, effets de fongicides, réceptivité de l'hôte...) sur le développement du champignon.

ÉVALUER LA SENSIBILITÉ AUX FONGICIDES

Face à l'ampleur de certaines épidémies d'oïdium observées sur fraisier dans certains abris, l'hypothèse d'une perte de sensibilité de *P. aphanis* var. *aphanis* à certains fongicides a été émise. Une méthode a été mise au point afin de tester la sensibilité de populations ou de souches d'oïdium. Pour ce faire, des échantillons ont été prélevés notamment dans des parcelles où l'oïdium était difficilement maîtrisé malgré de nombreux traitements, en particulier à base de fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols. Par la suite, des souches monoconidiennes ont été obtenues selon les modalités décrites précédemment et des gammes de concentrations mises au point afin de déterminer le niveau de sensibilité des souches aux

Figure 2. Influence de la concentration en myclobutanil sur le développement* de *Podosphaera aphanis* var. *aphanis* sur des disques foliaires de fraisier.



CI = Concentration inhibitrice — souche sensible --- souche résistante
*résultats exprimés en pourcentage moyen d'inhibition de la colonisation des disques foliaires par *Podosphaera aphanis*, ceci en tenant compte du développement de ce champignon sur des disques témoins non-traités

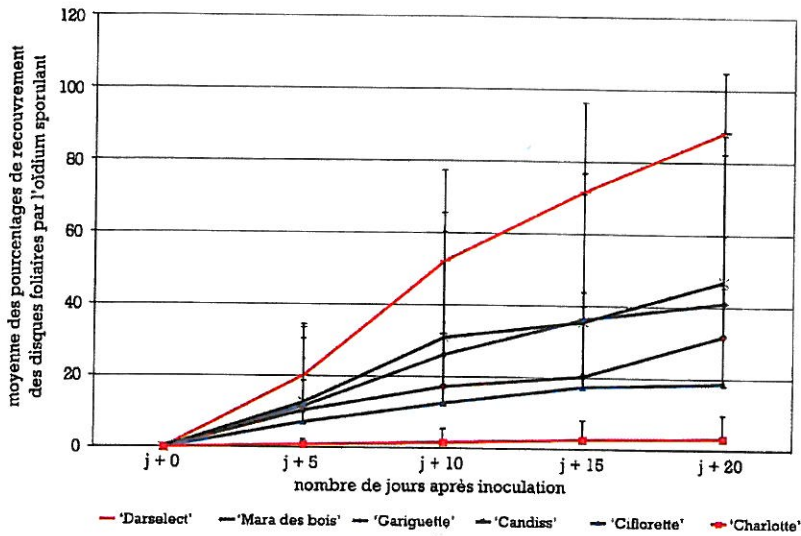
D.M.I.* (inhibiteur de la 14-stérol déméthylase). Pour chaque concentration en D.M.I.,

*inhibiteur de la déméthylase

des disques foliaires de 16 mm de diamètre sont préparés comme décrit précédemment, à raison de 8 disques/concentration. Ils sont ensuite déposés face supérieure



Figure 3. Évolution de la surface sporulante de *Podosphaera aphanis* var. *aphanis* sur des disques foliaires de 6 variétés de fraisier cultivé (moyenne de 5 tests de sensibilité variétale) inoculés artificiellement en conditions contrôlées.



au contact du disque de papier-filtre imbibé d'eau stérile apporté préalablement dans chaque boîte de Petri. Après pulvérisation des disques avec les solutions de fongicides à différentes concentrations, les boîtes sont incubées une nuit à 22 °C (16 h de jour, 1 500 lux), puis séchées sous une hotte à flux laminaire, avant d'être inoculées dans une tour d'inoculation à l'aide de folioles sporulantes de la variété 'Darselect', à raison de 400 à 600 spores d'oïdium/cm². Les boîtes de Petri ainsi préparées sont fermées et mises à incuber 8 j à 22 °C. Passé ce laps de temps, une lecture visuelle est réalisée, complétée par une observation à l'aide d'une loupe binoculaire, afin d'évaluer le pourcentage de surface foliaire de chaque disque recouvert par du mycélium sporulant. Notons que le choix de ce test a été guidé par le mode d'action connu des D.M.I. sur l'élongation mycélienne des champignons, et c'est pour cela que les observations ont été effectuées sur des phases de développement de *P. aphanis* postérieures à la germination des conidies.

Les mesures réalisées permettent de déterminer, pour chaque souche, les indices CI (Concentration inhibitrice) 50, CI 90 et CMI (Concentration minimale inhibitrice) correspondant aux doses de fongicide

inhibant respectivement 50 %, 90 % et totalement la croissance du champignon. À titre d'exemple, les comportements de 2 souches à l'égard du myclobutanil, une sensible et l'autre résistante, sont présentés figure 2.

SÉLECTION VARIÉTALE

L'obtention de variétés de fraisier résistantes apparaît comme le moyen le plus adéquat pour limiter le développement de l'oïdium à un niveau économiquement supportable. Cette méthode de protection permet aussi de réduire les intrants phytosanitaires.

L'étude de la résistance du fraisier à l'oïdium nécessite la mise au point de tests permettant de cribler des variétés en conditions de contamination contrôlées (densité* et répartition de l'inoculum parmi les plants de fraisier homogènes, limitation des contaminations parasites...) et en s'affranchissant des contraintes environnementales (humidité, luminosité, température, vent...). Deux tests biologiques avec "inoculation généralisée" ont été mis au point en 2007 conjointement par l'Inra et le Cifref :

- sur la face inférieure de disques foliaires, afin de déterminer au sein des

*nombre de spores d'oïdium/cm² sur feuille de fraisier

ressources génétiques les variétés résistantes utilisables comme géniteurs ; l'oïdium sporulant est observé sur la face inférieure des disques foliaires, car leurs tissus sont plus "tendres" et l'oïdium s'y installe préférentiellement ;

- sur la face supérieure de jeunes feuilles trifoliées de plantules (tissus jeunes et réceptifs) issues d'akènes, afin d'éliminer les hybrides sensibles dès la 1^{re} année d'un programme de sélection, sans attendre la formation de plants de fraisier de production par multiplication végétative.

Les notations sont effectuées tous les 5 j pendant 20 j après inoculation. Le pourcentage de recouvrement de chaque disque foliaire ou de chaque jeune feuille trifoliée de plantule par le mycélium d'oïdium sporulant est estimé respectivement sous loupe binoculaire ou à l'œil nu.

Ces 2 tests (figure 3) permettent de différencier les comportements extrêmes des variétés : 'Darselect' est sensible, 'Mara des bois', 'Gariguette', 'Candiss' et 'Ciflorette' sont moyennement sensibles, et 'Charlotte' est tolérante.

D'ores et déjà, les méthodes présentées ont permis de préciser plusieurs paramètres épidémiologiques pertinents de *P. aphanis* var. *aphanis*, de détecter sa résistance à une famille de fongicides et de fournir au sélectionneur les moyens de réaliser des criblages variétaux. Ces méthodes sont maintenant transférées à plusieurs organismes, et notamment au C.T.I.F.L., afin de leur permettre, par exemple, de valider un modèle de prévision, d'évaluer l'efficacité de S.D.N.*... Elles contribueront, à terme, à la mise au point et au développement de stratégies permettant de mieux maîtriser l'oïdium du fraisier au champ et sous abri. ■

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce au financement du Casdar (Compte d'affectation spéciale pour le développement agricole et rural).

*Stimulateurs des défenses naturelles