

Comment produire un inoculum de *Fusarium graminearum* en grande quantité pour le criblage de nouvelles sources de résistance à la fusariose de l'épi au champ ?

Cambon Florence[♦], Soudière Olivier[♦]

Résumé. La fusariose de l'épi ou FHB est une maladie d'origine fongique qui affecte le rendement et la qualité sanitaire des céréales. Elle est causée par un complexe d'espèces, appartenant principalement au genre *Fusarium*, l'agent principal étant *Fusarium graminearum*. À ce jour, on ne connaît pas de résistance totale à la maladie. Les méthodes de lutte les plus efficaces associent donc variétés partiellement résistantes, traitements antifongiques et pratiques culturales. Ces méthodes s'avèrent toutefois incapables de contrôler la maladie en cas de fortes pressions parasitaires. Il est donc indispensable d'identifier de nouvelles sources de résistance plus efficaces et plus durables en passant par le criblage de collections et panels de variétés. Cela repose sur notre capacité à mettre en place des essais « maladie » de grande ampleur au champ ou en tunnel, et donc de disposer d'inoculum infectieux de *Fusarium graminearum* en grande quantité. Cet article décrit une méthodologie de production de macroconidies de *Fusarium graminearum*, permettant d'obtenir de façon régulière et pour différentes souches de *F. graminearum*, plus de 20 L d'inoculum à une concentration de 10^5 spores / mL par semaine. Développée à partir d'un protocole utilisé en routine au laboratoire pour de petites productions de spores d'espèces de *Fusarium* diverses (*F. graminearum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*), elle est potentiellement applicable à d'autres espèces.

Mots clés : Fusarioses, *Fusarium graminearum*, macroconidies, inoculum infectieux

Introduction

La culture des céréales, et en particulier celle du blé tendre, est soumise à une forte pression parasitaire, composée de nombreux agents pathogènes et ravageurs. Ceux-ci sont susceptibles d'attaquer les différentes parties de la plante, à tous les stades de son développement, de la graine à l'épi. Les plus importants sont d'origine fongique et sont la cause de maladies qui peuvent provoquer de lourdes pertes. En France, on estime leur nuisibilité, valeur moyenne pluriannuelle sur les quinze dernières années, à 17,5 q / ha soit 20 % du rendement (source Arvalis, 2017a).

La fusariose de l'épi, qui touche principalement le blé au stade floraison, est une de ces maladies à fort impact sur le rendement en blé tendre, les pertes pouvant aller de 30 à 70 % (source Arvalis, 2017b). Elle a pour origine le développement de champignons appartenant aux genres *Fusarium* (> 20 espèces) et *Microdochium* (2 espèces). Les espèces de *Fusarium* étant toutes mycotoxinogènes, la perte de rendement s'accompagne dans ce cas d'un problème de qualité sanitaire des récoltes. En France, l'espèce *Fusarium graminearum*, principalement productrice de deoxynivalenol (DON), est celle qui cause le plus de dommage (Pasquali et al., 2016). L'expression de la maladie est conditionnée par le climat et l'efficacité des traitements mis en place par l'agriculteur. Comme il n'existe pas de résistances génétiques totales dans les variétés actuellement cultivées, l'utilisation combinée de cultivars tolérants et de traitements phytosanitaires reste la méthode de lutte la plus efficace. Toutefois, l'application en France du Plan Ecophyto II implique une réduction de 50 % du recours aux produits phytosanitaires d'ici 2025.

[♦]UMR Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales, INRA, 63000 Clermont-Ferrand, France
florence.cambon@inra.fr ; olivier.soudiere@inra.fr

Cela a pour conséquence le développement de programmes de recherche visant à identifier de nouvelles sources de résistance plus efficaces et plus durables utilisables en sélection.

Pour caractériser de nouvelles sources de résistance à la fusariose de l'épi, à grande échelle, l'équipe MDC de l'UMR GDEC (Centre Inra ARA, Clermont Ferrand), réalise chaque année, en collaboration avec l'équipe DOPM de l'UE PHACC (Centre Inra ARA, Clermont Ferrand), des essais maladies au champ. Le criblage des collections et panels de blé tendre est réalisé en plein champ ou en tunnel par infection artificielle : une suspension de spores (macroconidies, **Figure 1**) issue de souches agressives et mycotoxinogènes de *F. graminearum*, est pulvérisée au stade floraison de l'épi, stade le plus sensible à la maladie. Toutes les variétés de blé ne fleurissant pas en même temps, la période d'infection peut s'étaler sur 4 à 6 semaines. Cela implique que l'on puisse disposer d'un volume important d'inoculum infectieux, pour que l'inoculum utilisé aux différents stades de floraison soit le même.

Au cours de l'année 2016, le criblage de 478 génotypes de blé tendre pour la résistance à la fusariose de l'épi a été réalisé sur le site de Crouël à Clermont-Ferrand (projet européen FP7 Whealbi, 2014 - 2019). Le dispositif expérimental de cet essai (**Figure 1**) se composait de 3 blocs, 2 blocs inoculés et 1 bloc témoin non inoculé, de 478 parcelles de 3 lignes de 30 plantes. L'ensemble, en tenant compte des blocs et des bordures entre chaque parcelle et l'implantation de 30 variétés témoins de niveaux de résistance à la fusariose de l'épi connus, couvrait une surface d'1,6 ha. Pour répondre aux critères de quantité et d'homogénéité nécessaires au bon déroulement de cet essai, nous avons mis au point au sein de l'équipe MDC une méthode de production dite « en masse » de spores de *Fusarium graminearum*. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une bonbonne de 20 L munie d'un système de renouvellement d'air. Elle s'inspire d'un protocole décrit par Bai et Shaner en 1996 auquel est associé une aération continue du milieu de culture favorisant la production de spores (Mesterházy, 1978). L'article ci-dessous détaille les différentes étapes du protocole et les principaux résultats sur les quantités de spores produites. Il est potentiellement applicable à d'autres espèces de *Fusarium*.



Figure 1 . (a) Dispositif expérimental de l'essai Whealbi au champ (photo ©Inra P.Desray) ; **(b)** Symptômes de fusariose sur épi de blé tendre (photo ©Inra P. Desray) ; **(c)** Spores asexuées (macroconidies) de *Fusarium graminearum* (photo ©Inra F.Cambon).

Méthodologie

1- Identification des besoins en inoculum en tenant compte de la viabilité des spores

Pour réaliser les essais « maladie » au champ les équipes MDC (UMR GDEC) et DOPM (UE PHACC) utilisent une lance de 1,8 m de long pour l'application de l'inoculum à raison de 500 mL de suspension à 10^5 spores / mL par bloc de 3 lignes de 30 plantes. Cependant, des tests préliminaires de viabilité, menés par l'équipe DOPM de l'UE PHACC, montrant que la capacité germinative de spores congelées dans l'eau n'est plus que de 70 % après 4 mois de stockage il faut tenir compte de cette perte germinative pour affiner les besoins en inoculum infectieux. Les besoins sont donc estimés en fonction du nombre de génotypes de blé à caractériser, du nombre de répétition (nombre de blocs infectés) et du temps de conservation des suspensions à -20 °C.

Pour l'essai Whealbi, deux blocs de 508 génotypes de blés tendres devaient être infectés. Les besoins en inoculum de *Fusarium graminearum* étaient alors estimés dans un premier temps à 508 L de suspension à 10^5 spores / mL.

Cependant en tenant compte de la perte de capacité germinative des spores après conservation à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, le volume d'inoculum nécessaire à l'essai était revu à la hausse : 660 L de suspension (soit 30 % d'augmentation) devaient être produits dans un délai de 4 mois soit 16 semaines.

2- Préculture de *Fusarium graminearum* sur milieu solide (Jour J – 7/J – 8, Figure 2)

Une semaine avant la mise en place de la bonbonne, du mycélium de *Fusarium graminearum* est mis en culture sur milieu PDA à raison de 6 boîtes de 90 mm de diamètre pour pouvoir ensemercer 12 L de milieu de sporulation (milieu MBB).

Préparation du milieu solide PDA

Trente-neuf grammes de milieu déshydraté PDA (Cat n°1022, Condalab) sont dissouts dans un litre d'eau osmosée. Après stérilisation 20 min à $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 bar, ce milieu est réparti dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre à raison de 25 mL/boîte sous hotte à flux laminaire. Un litre de milieu permet de préparer environ 40 boîtes.

Ensemencement du milieu solide PDA avec *Fusarium graminearum*

La souche est conservée sous forme de « carrés de culture » en glycérol 20 % à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sous hotte à flux laminaire, à l'aide d'un scalpel stérile, 1 carré de culture est placé au centre d'une boîte de PDA. On prépare une dizaine de boîtes. Les boîtes sont scellées avec du film alimentaire, puis incubées à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, à l'obscurité, pendant 7 à 8 jours. Le mycélium doit se développer jusqu'à atteindre les bords de la boîte.

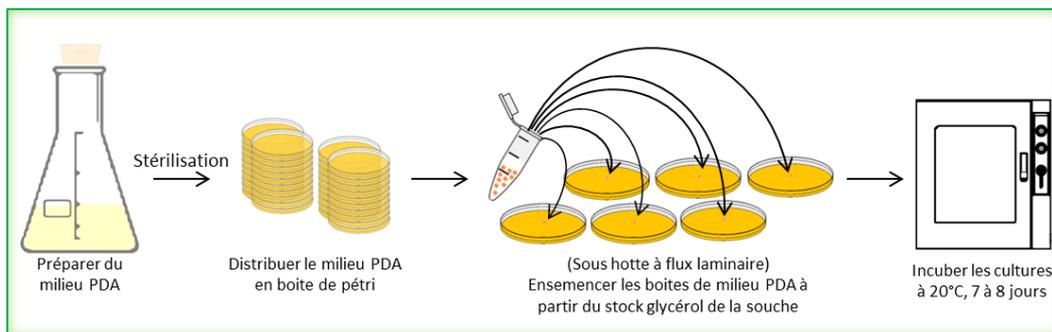


Figure 2. J – 7/J – 8 - Pré-culture de *Fusarium graminearum* sur milieu solide PDA.

3- Culture de *Fusarium graminearum* en milieu liquide MBB

Le milieu de sporulation, milieu Mungo Bean Broth (MBB), correspond à une infusion de haricot mungo dans l'eau. Il est préférable de le préparer extemporanément à raison de 12 L de milieu pour une bonbonne de 20 L.

Préparation et stérilisation de la bonbonne (Jour J – 1 ; Figure 3)

Le système est composé d'une bonbonne en polycarbonate transparent (réf. 029121, Dutscher) et d'un bouchon en polypropylène avec tubulures (réf. 029109, Dutscher) muni de deux embouts externes et de deux tuyaux internes à la bonbonne. Sur les embouts externes sont placés deux tuyaux de diamètre interne 6,4 mm en silicone. L'air arrive dans la bonbonne par un tuyau relié à une pompe à aquarium (type pompe à air TETRA APS 300). Une partie est à l'extérieur de la bonbonne et une partie à l'intérieur. Afin que le tuyau reste bien dans le fond de la bonbonne pendant la culture, le bout de tuyau est attaché à un pilon en porcelaine à l'aide d'une gaze que l'on noue autour de l'ensemble. Le système complet est placé dans un sac à autoclave et stérilisé 20 min à $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 bar. On le laisse ensuite refroidir une nuit à température ambiante avant de procéder à l'inoculation.

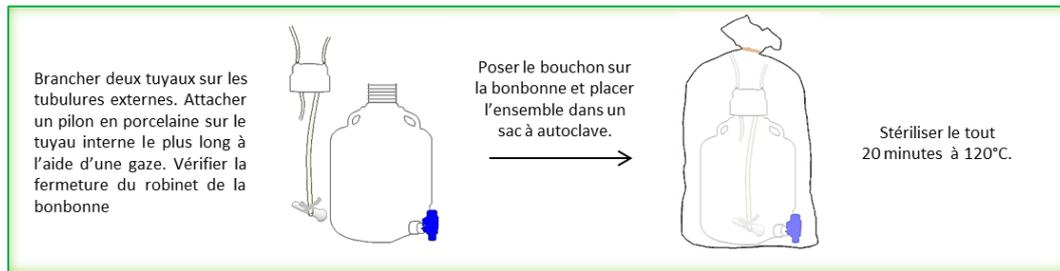


Figure 3. Jour J – 1 - Stérilisation de la bonbonne de culture.

Préparation du milieu liquide MBB (Mung Bean Broth) (Jour J – 1 ; Figure 4)

La bonbonne (réf. 029121, Dutscher) ne pouvant être stérilisée qu'à vide, le milieu MBB est préparé dans un autre type de récipient. Par commodité, en tenant compte du poids des erlenmeyers et de la taille de l'autoclave, la préparation du milieu est réalisée dans 6 erlenmeyers de 3 L, à raison de 2 L de milieu par erlenmeyer.

Pour cela, 2 L d'eau osmosée sont versés dans un erlenmeyer et chauffés sur une plaque de cuisson. Lorsque l'eau est à ébullition, l'erlenmeyer est posé sur une paille et laissé au repos 30 s pour limiter les projections d'eau bouillante lors de l'ajout des graines de haricots mungo. 80 g de grains de haricot mungo non traités (disponible en magasin de produits biologiques) sont ensuite ajoutés et infusés précisément 10 min (une infusion plus longue peut conduire à la libération d'amidon inhibiteur de la sporulation). En parallèle, un large entonnoir couvert d'une couche de myracloth (ref. 475855-1, Calbiochem) est placé sur un autre erlenmeyer de 3 L. Le milieu est alors filtré sur la myracloth et les haricots sont jetés.

La procédure est réalisée de la même manière pour les 5 autres erlenmeyers. Les erlenmeyers sont ensuite bouchés à l'aide de bouchons en mousse de 50 mm de diamètre (ref. 999036, Dutscher) recouverts de papier aluminium et le milieu est stérilisé 20 min à 120 °C, 1 bar. Enfin, on le laisse refroidir une nuit à température ambiante avant de procéder à l'inoculation.

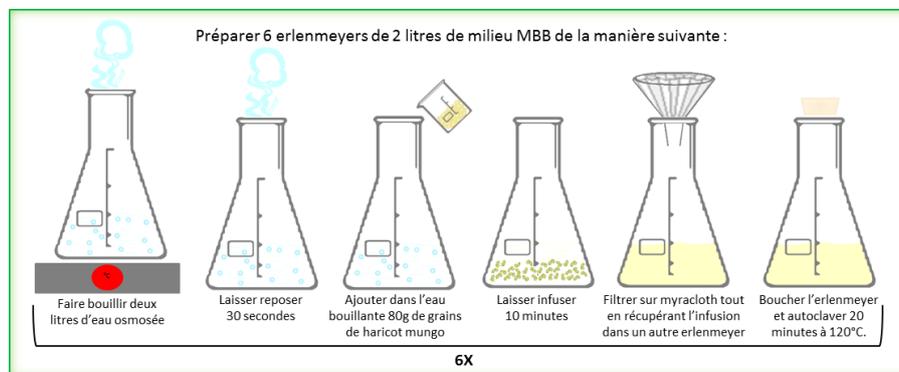


Figure 4. Jour J – 1 - Préparation du milieu liquide MBB.

Ensemencement du milieu liquide MBB (Mung Bean Broth) (jour J ; Figure 5)

La bonbonne stérilisée est placée sous la hotte à flux laminaire et le sac à autoclave est ôté en faisant attention de ne pas souiller le matériel qui sera placé à l'intérieur de la bonbonne. Après avoir vérifié la fermeture du robinet, 11 L de milieu MBB sont versés dans la bonbonne. Les 6 boîtes de culture de *Fusarium graminearum* sur PDA sont alors coupées en petit carré d'environ 25 mm² et transférés dans un bécher stérile contenant un peu de milieu MBB. Le tout est alors transvasé dans la bonbonne. Le bécher est ensuite rincé avec le milieu MBB restant pour bien mettre en suspension les morceaux de culture qui se seraient collés sur les parois, puis le tout est versé dans la bonbonne. Le bouchon est alors vissé à fond et un filtre seringue 0,22 µm (ref. 037044, Dutscher) est placé sur les deux tuyaux de sortie.

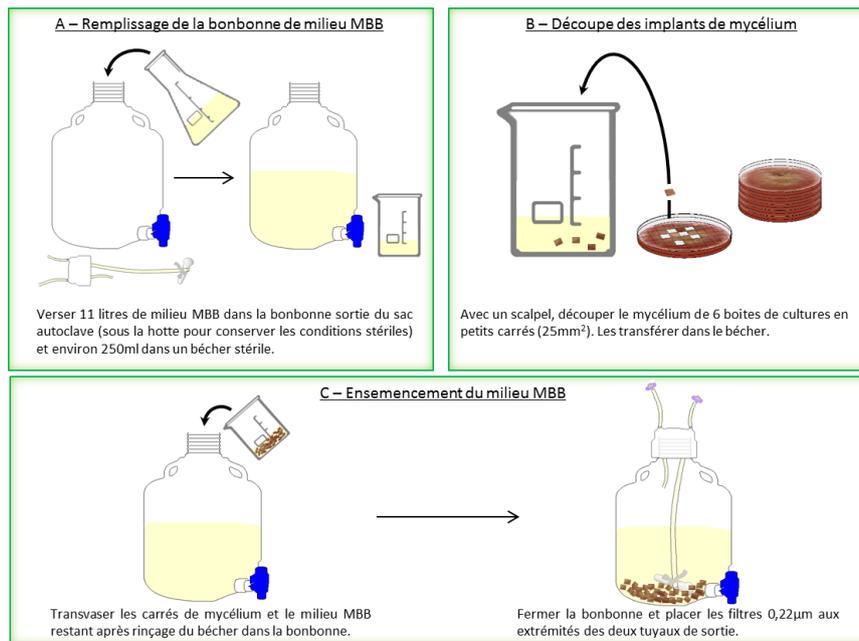


Figure 5. Jour J - Ensemencement du milieu liquide MBB.

Production de spores de *Fusarium graminearum* en milieu de sporulation MBB (Figure 6)

La culture de *Fusarium graminearum* dans le milieu MBB est réalisée dans une chambre de culture à 26 °C et à l'obscurité. La bonbonne est placée sur un agitateur rotatif et fixée avec des tendeurs. Le tuyau de la pompe à aquarium est ensuite relié au filtre « entrée d'air » correspondant au tuyau intérieur le plus long. La pompe est alors branchée et le développement de bulles dans le milieu est vérifié *de visu*. L'agitation est alors mise en place à une vitesse de 90 rpm : l'agitation doit être assez importante pour que le milieu de culture soit bien oxygéné, sans toutefois que le milieu ne puisse remonter dans le tuyau le plus court (risque d'obturation par développement du mycélium et remontée de liquide dans le filtre). La culture se développe ainsi sous agitation pendant 5 jours.

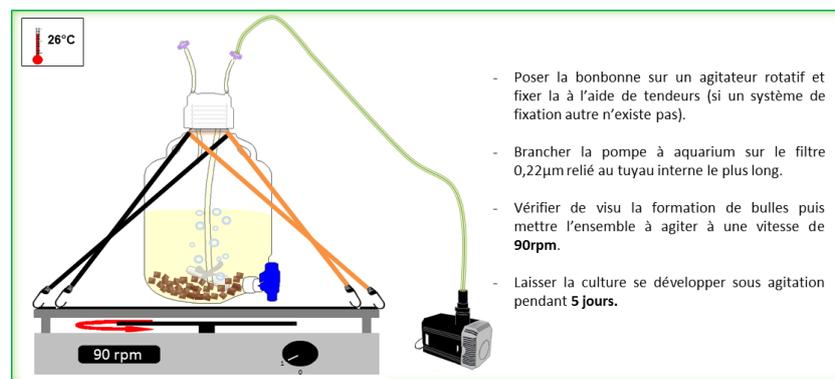


Figure 6. Jour J - Installation de la bonbonne en chambre de culture à 26 °C sous agitation.

4- Extraction et concentration des spores de *Fusarium graminearum* (jour J + 5)

L'ensemble des étapes conduisant à l'extraction des spores et à leur concentration est réalisé en conditions non stériles, les spores étant appliquées en plein champ.

*Remarque : après manipulation, le matériel biologique et les consommables souillés sont placés dans une poubelle « déchets biologiques » pour être autoclavés (30 min à 120 °C, 1 bar) avant rejet dans les poubelles « déchets ménagers ». Les solutions (filtrats, surnageant) et le matériel de laboratoire contaminés par *Fusarium graminearum* sont traités à l'eau de javel 2,6 % selon les recommandations du réseau 3RB et celles décrites dans le cahier de prévention "Risques biologiques" du CNRS, avant rejet dans l'évier ou/et nettoyage au lave-vaisselle.*

Filtration de la culture (Figure 7)

La pompe et le tuyau d'arrivée d'air de la bonbonne sont débranchés et la bonbonne est placée sur le bord d'une paille. En contrebas, un grand béccher de 5 L sur lequel est installé un tamis inox Retsch 200x50 mm de maille 1 mm (réf. 950846, Dutscher) est placé. Le robinet de la bonbonne est alors ouvert et la culture filtrée sur ce premier tamis. Le contenu du béccher est ensuite filtré sur un tamis inox Retsch 200x50 mm de maille 100 µm (réf. 950819, Dutscher) installé sur un entonnoir lui-même déposé sur un erlenmeyer de 5 L. Le filtre est nettoyé régulièrement à l'eau du robinet (conserver les éluats) afin que les débris de culture ne retiennent pas les spores. La totalité de la culture est filtrée ainsi. À cette étape, un aliquot de 25 mL de filtrat est prélevé. La titration en spores de la solution permet d'avoir une estimation de la quantité de spores attendue au final et permet de vérifier le bon déroulement des différentes étapes du mode opératoire.

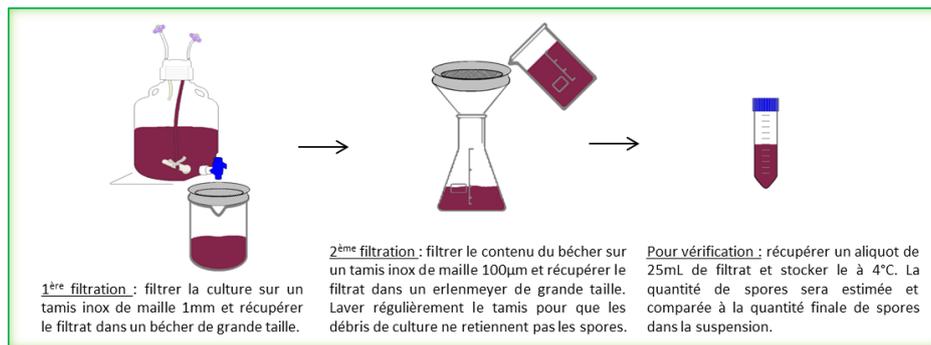


Figure 7. J + 5 - Filtration de la culture de *Fusarium graminearum*.

Concentration des spores (Figure 8)

La culture filtrée est répartie en tubes à fond conique de 50 mL. La capacité de notre centrifugeuse SL40R (*Thermo Scientific*) avec le rotor à godets oscillants TX-750 (ref. 75003607, 4x750 ml ; *Thermo Scientific*) étant de 28 tubes à fond conique de 50 mL, 2 jeux de 28 tubes sont utilisés.

Une première série de tubes est remplie de filtrat et centrifugée à 4700 rpm pendant 10 min à 20 °C pendant que l'on remplit la deuxième série de tubes. Les tubes de la 1^{ère} série sont sortis délicatement de la centrifugeuse pour ne pas remettre les spores en suspension et le surnageant est éliminé à la trompe à vide en veillant à ne pas aspirer le culot. Pendant ce temps, la deuxième série de tubes est centrifugé. Les tubes de la 1^{ère} série sont à nouveau remplis de culture filtrée puis centrifugés ; les surnageants de la deuxième série de tubes sont aspirés. On procède ainsi jusqu'à centrifugation de tout le filtrat. À ce stade on dispose alors de 56 tubes de culots de spores.

Pour concentrer les spores tout en éliminant toutes traces de milieu MBB restant, le nombre de tubes à manipuler est réduit dans les étapes suivantes. Ainsi 40 mL d'eau stérile sont versés dans 28 tubes pour resuspendre les culots, puis les suspensions obtenues sont transférées dans les 28 tubes restants. Ces 28 tubes sont ensuite centrifugés à 4700 rpm pendant 10 min à 20 °C, et le surnageant est éliminé à la trompe à vide. On procède alors à un nouveau lavage des spores et à une réduction du nombre de tubes en versant 40 mL d'eau stérile dans 14 tubes. Les culots sont repris puis transférés dans les 14 tubes restants. Les suspensions de spores sont à nouveau centrifugées à 4700 rpm pendant 10 min à 20 °C puis le surnageant est éliminé à la trompe à vide.

Les culots de 7 tubes sont repris dans 50 mL d'eau stérile puis les suspensions sont transférées dans les 7 tubes restants. Les culots de spores sont repris puis l'ensemble de la suspension obtenue (soit 350 mL) est versé dans un béccher.

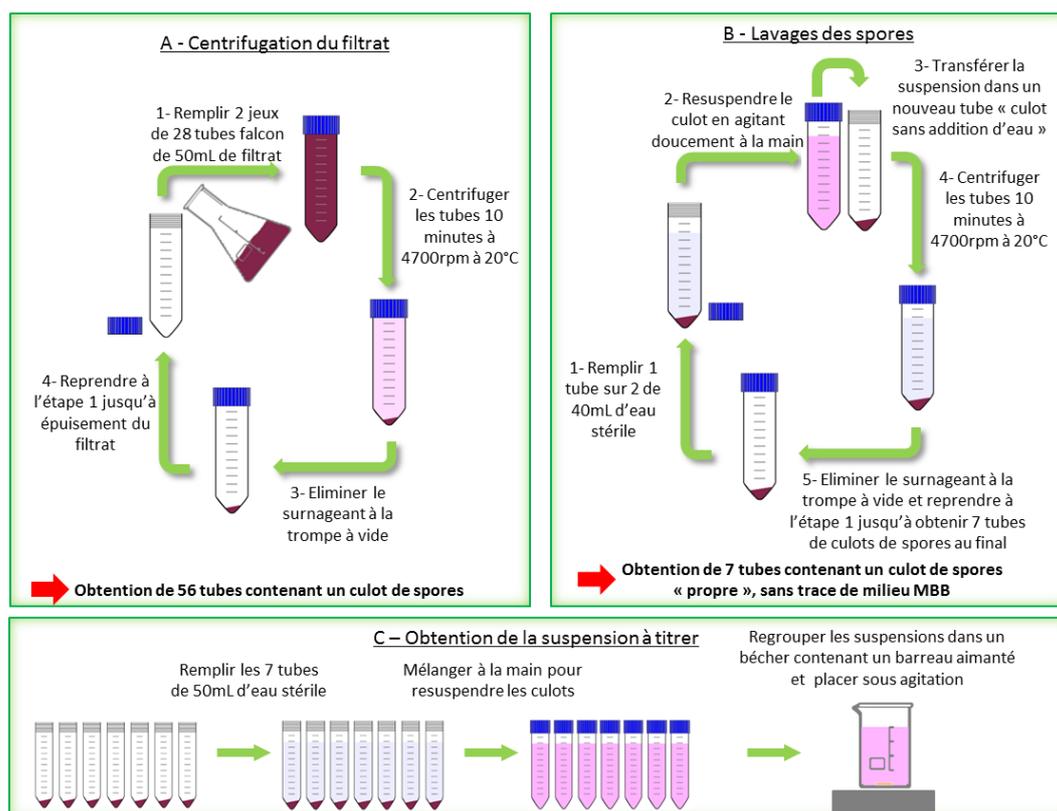


Figure 8. J + 5 - Concentration des spores de *Fusarium graminearum*.

5- Titration de la suspension de spores de *Fusarium graminearum* et stockage (jour J+5)

Estimation de la concentration en spores de l'extrait

La titration de la suspension est réalisée par comptage des spores en cellule de Malassez sous microscope. On titre également le filtrat prélevé avant les étapes de centrifugation pour vérifier le bon déroulement des différentes étapes du protocole en comparant la quantité de spores attendue à celle obtenue. En fonction du résultat de comptage, la suspension est diluée (application d'un facteur de dilution) ou concentrée (par centrifugation et resuspension dans un volume d'eau adapté) pour avoir une concentration finale à 10^7 spores / mL.

Conservation des spores

Pour le stockage, les spores sont conservées à -20 C après répartition dans différents contenants, en fonction du volume considéré : microtubes de 2 mL, tubes falcon de 15 mL et tubes falcon de 50 mL. Ainsi, lors des infections au champ, il sera possible de préparer des inocula de *Fusarium graminearum* à 10^5 spores / mL adaptés au besoin.

6- Organisation des essais de productions en masse

Estimation du temps nécessaire à la production de l'inoculum

En prenant en compte les différents temps de cultures et la préparation du matériel, un essai de production en masse de spores s'étale sur 13 jours. Cependant pour réduire la durée de production, il est possible de faire se chevaucher deux essais de manière à réaliser une extraction de spores par semaine (Figure 9).

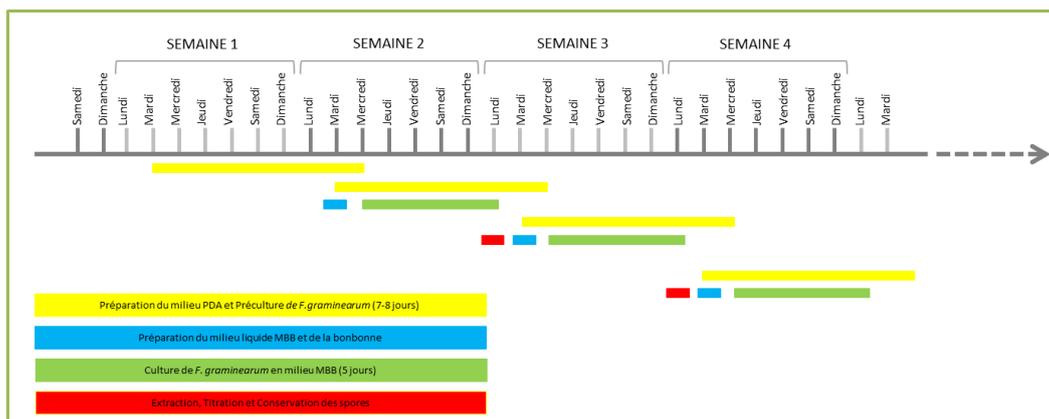


Figure 9. Exemple de planification sur 4 semaines de la production d'inoculum de *Fusarium graminearum*.

Afin d'avoir une forte probabilité de disposer de spores viables et infectieuses cette production doit cependant être limitée dans la durée : sachant que la viabilité des spores n'est plus que de 70% après 4 mois de conservation à -20°C , la durée de production de l'inoculum total souhaitée est fixée à 16 semaines maximum.

Essais de production

Plusieurs essais de production en masse de spores ont été réalisés. Trois essais avec un minimum de trois répétitions ont été menés en faisant varier le nombre de bonbonnes mises en culture en parallèle.

Pour chaque essai, le volume d'inoculum moyen obtenu en 13 jours a été évalué. Le temps nécessaire de production pour répondre à l'ensemble du besoin en inoculum infectieux a ensuite été calculé en se plaçant dans les conditions d'optimisation du planning (1^{ère} extraction de spores après 13 jours de manipulation soit environ 2 semaines puis une extraction par semaine) :

$$\left[\frac{\text{Besoin total en inoculum en litres}}{\text{Volume d'inoculum produit en 13 jours en litre}} + 1 \text{ semaine} = \text{Nombre de semaines nécessaire à la production de l'inoculum total} \right]$$

Résultats

L'objectif de ce travail était de mettre au point un protocole de production d'un inoculum infectieux de *Fusarium graminearum* répondant à deux critères : un critère de quantité permettant la réalisation d'essais « maladie » de grande taille au champ et, un critère d'homogénéité, via la production d'un minimum de lot, tenant compte du décalage de floraison des génotypes criblés et de la viabilité des spores.

Les besoins pour l'essai « maladie » au champ étant définis (660 L de suspension à 10^5 spores / mL à produire dans un délai de 16 semaines maximum), nous avons réalisé un premier essai de production en masse à partir d'une bonbonne de culture en milieu MBB. Les résultats des trois expériences, présentés dans le **Tableau 1**, étaient très reproductibles avec une production moyenne de 228 mL de suspension de spores à 10^7 spores / mL par bonbonne ; soit 23 L d'inoculum disponible à 10^5 spores / mL en 13 jours.

Tableau 1. Quantité de suspension de spores de *Fusarium graminearum* produite à partir d'une bonbonne de culture en milieu MBB

Nombre de bonbonnes	Numéro de lot de spores produites	Date de mise en production	Volume de spores en mL à 1.10^7 spores/mL	Volume d'inoculum en litre à 1.10^5 spores/mL
1	0	nov-15	204	20
1	1	févr-16	215	22
1	2	févr-16	265	27
Production moyenne pour 1 bonbonne			228	23
Ecart-type			25	2

Le Cahier des Techniques de l'INRA 2018 (94)

Compte tenu de nos besoins, estimés à 660 L, le temps nécessaire pour produire la totalité de l'inoculum était donc supérieur à 28 semaines. Les conditions de production ont donc été modifiées début 2016 en traitant deux bonbonnes de culture en parallèle. Sur la base de trois expériences (**Tableau 2**), à raison d'une par semaine, nous avons quasiment doublé notre production avec une moyenne de 38 L d'inoculum infectieux à 10^5 spores / mL obtenus en 13 jours.

Tableau 2. Quantité de suspension de spores de *Fusarium graminearum* produite à partir de deux bonbonnes de culture en milieu MBB traitées en même temps.

Nombre de bonbonnes	Numéro de lot de spores produites	Date de mise en production	Volume de spores en mL à 1.10^7 spores/mL	Volume d'inoculum en litre à 1.10^5 spores/mL
2	3	févr-16	390	39
2	4	mars-16	450	45
2	5	mars-16	300	30
Production moyenne pour 2 bonbonnes			380	38
Écart-type			53	5

Le délai nécessaire à la production de la totalité de l'inoculum infectieux passait donc de 28 semaines à 18 semaines. Jugeant ce délai encore trop long, et faisant l'analyse qu'il était possible de traiter trois bonbonnes dans une même journée, de nouveaux essais ont été conduits avec trois bonbonnes en parallèle. Neuf essais menés entre mars et mai 2016 (**Tableau 3**), nous ont permis de produire de façon régulière une moyenne de 59 L d'inoculum infectieux à 10^5 spores / mL en 13 jours, réduisant très significativement le temps nécessaire à la production de l'inoculum total.

Tableau 3. Quantité de suspension de spores de *Fusarium graminearum* produite à partir de trois bonbonnes de culture en milieu MBB traitées en même temps.

Nombre de bonbonnes	Numéro de lot de spores produites	Date de mise en production	Volume de spores en mL à 1.10^7 spores/mL	Volume d'inoculum en litre à 1.10^5 spores/mL
3	6	mars-16	690	69
3	7	mars-16	505	51
3	8	mars-16	600	60
3	9	avr-16	660	66
3	10	avr-16	516	52
3	11	avr-16	554	55
3	12	mai-16	678	68
3	13	mai-16	510	51
3	14	mai-16	606	61
Production moyenne pour 3 bonbonnes			591	59
Écart-type			62	6

En ne conservant que les suspensions de spores de moins de 4 mois, soit les lots n°1 à 14, produits de février à mai, nous avons réussi à produire la quantité d'inoculum infectieux nécessaire à l'essai Whealbi soit 694 L à 10^5 spores / mL. Cet inoculum se distribuait en 14 lots qui ont pu être répartis de manière homogène sur les 15 dates d'infection réalisée entre le 11/05/2016 et le 15/06/2016.

Conclusion

Ainsi, en adaptant le protocole décrit par Bai et Shaner en 1996, utilisé couramment au laboratoire pour de petites productions de spores, en ajoutant l'aération en continue et en augmentant les volumes de culture nous avons pu augmenter notre capacité de production d'inoculum. Nous sommes aujourd'hui en capacité de produire un inoculum infectieux adapté à nos besoins, d'un essai en chambre de culture avec quelques génotypes à des essais incluant

Florence Cambon, Olivier Soudière

plusieurs centaines de génotypes en plein champ. En tenant compte des différents essais menés au premier semestre 2016, nous avons montré que, dans les conditions définies dans le mode opératoire, il était possible de produire de façon régulière 20 L d'inoculum de *Fusarium graminearum* par essai.

La possibilité offerte par ce protocole de produire de grands volumes d'inoculum en un nombre limité d'essai et sur un pas de temps assez court permet également de répondre à la nécessité d'avoir un inoculum homogène. S'il est quasiment impossible pour un essai de la même ampleur que l'essai Whealbi de disposer d'un lot unique d'inoculum, on peut toutefois en limiter leur nombre. Pour un essai de plus petite taille, si 20 L d'inoculum sont suffisants, on peut envisager de n'utiliser qu'un même lot pour cribler une collection de blés tendres décalés pour leur date de floraison.

Des tests préliminaires de viabilités ont montré que dans nos conditions de stockage, la capacité germinative des spores se réduisait rapidement. En produisant un inoculum en grande quantité en un nombre d'essai limité on pallie ce problème en réalisant une production au plus proche des dates d'infection. Ainsi pour mener à bien nos tests d'infection en routine, nous avons estimé qu'il était possible, avec trois ou quatre productions annuelles (1 ou 2 bonbonnes à chaque fois) de répondre à l'ensemble de nos besoins en inoculum pour les essais réalisés en pièces climatiques, serres et/ou tunnels. Cela permet de gagner en homogénéité sur chacun des essais mais également de gagner du temps de préparation de milieux et de repiquages : il n'est plus nécessaire d'entretenir en continu la ou les souche(s) de *Fusarium graminearum* sur milieu PDA.

Enfin, nous avons réussi à produire au laboratoire avec la méthode décrite par Bai et Shaner en 1996 des inocula d'autres espèces de *Fusarium* comme *F. culmorum*, *F. poae* et *F. tricinctum*. Il est donc possible d'envisager d'utiliser ce protocole pour la production d'inoculum en grande quantité d'autres espèces de *Fusarium*.

Références bibliographiques

Arvalis-Institut du végétal (2017a) « Choisir & décider – Interventions de printemps – Céréales à paille – Synthèse nationale 2016/2017 », page 9. Repéré à <https://www.arvalis-infos.fr/view-23265-arvarticle.html>.

Arvalis-Institut du végétal (2017b) « Un climat humide autour de la floraison favorise les fusarioses », 24 mai 2017. Repéré à <https://www.arvalis-infos.fr/view-10191-arvarticle.html>.

Bai H, Shaner G (1996) Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. *Plant Dis.* **80** : 975–979.

CNRS « Cahier de prévention "Risques biologiques" (4^e édition, mai 2017) ». Fiche 16: Désinfection / stérilisation. Repéré à <http://www.dgdr.cnrs.fr/SST/CNPS/guides/risquebio.htm>

Pasquali M, Beyer M, Logrieco A, Audenaert K, Balmas V, Basler R, Boutigny A-L, Chrpová J, Czembor E, Gagkaeva T, González-Jaén MT, Hofgaard IS, Köycü ND, Hoffmann L, Lević J, Marin P, Miedaner T, Migheli Q, Moretti A, Müller MEH, Munaut F, Parikka P, Pallez-Barthel M, Piec J, Scauflaire J, Scherm B, Stanković S, Thrane U, Uhlig S, Vanheule A, Yli-Mattila T, Vogelgsang S (2016). A European Database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Trichothece Genotypes. *Front. Microbiol.* **7**: 406.

Mesterházy A (1978) Comparative Analysis of Artificial Inoculation Methods with *Fusarium* spp. on Winter Wheat Varieties. *Phytopath Z.* **93** : 12-25.

Réseau Ressource Risque Biologique (3RB) (2010) « Utilisation de l'eau de Javel » Ressource documentaire 3RB-201/06/2010. Repéré à <https://www.esst-inrs.fr/3rb/afftexte.php?p1=pbp04>

Toutes les illustrations du document (Figures 2 à 9) ont été réalisées par F. Cambon ; les dessins ont été élaborés sous Photofiltre, gratuitiel créé par Antonio Da Cruz, puis mis en forme sous Microsoft PowerPoint.

Remerciements

Les auteurs remercient chaleureusement Thierry Langin, responsable de l'équipe MDC, Philippe Lecomte et Cyrille Saintenac pour leur accompagnement dans la rédaction de cet article, pour leurs corrections et leurs remarques constructives. Un grand merci également à Sylvie Roche (DOPM), Marion Cuileyrier et Vincent Hitte (stagiaires de Licence professionnelle OBA, Université de Bordeaux) pour toute l'aide apportée à la production des spores. Merci également à Magali Joannin (DOPM) pour les résultats de tests de viabilité et à Pierre Desray (DOPM) pour les photos d'essais au champ.