

## Piégeage des ascospores et suivi de la maturation des périthèces du phoma

### **A / Mise en œuvre des situations**

#### 1- Piégeage des ascospore

Mettre en place le piège dynamique JFC dans une parcelle de colza, si possible sous le vent d'un précédent colza (dès le 25/08 et au plus tard 24h après le semis du colza et jusqu'au 20 décembre). Avant le semis du colza, le piège pourra être placé dans le chaume de colza adjacent et sera transféré dans la parcelle de colza immédiatement après le semis de la culture.

Choisir une situation « moyenne » (éviter toute situation extrême) afin d'obtenir des piégeages ayant une représentativité régionale répondant aux caractéristiques suivantes :

- si possible en plaine ou en plateau ; éviter les reliefs (source de microclimats par rapport à l'ensoleillement et à la circulation d'air),
- éviter les bordures de bois, les haies et la proximité de cours d'eau (ombrage et humidité qui perturbent la circulation d'air)
- éviter les parcelles extrêmes, très hydromorphes par exemple.

Lors du changement régulier (conseillé tous les 2 mais possible à 3 jours) des lames, veiller au bon état de la batterie et de la turbine du capteur de spores pour limiter toute interruption du piégeage.

De préférence, effectuer les lectures au moins une fois par semaine pour ne pas prendre du retard sur les lectures suivantes. Les lames, une fois retirées du capteur, peuvent être placées au réfrigérateur à 4°C pour conservation dans le cas où les lectures ne peuvent pas être réalisées de suite.

#### 2- Maturation des périthèces

Collecter environ 500 pailles de colza locales porteuses de nécroses (même à l'état de traces) en provision suffisante,

Placer (dès le 25/08 et jusqu'au 20 décembre ou dès qu'on observe plus de 50% de périthèces en classe E) les pailles au contact du sol, dans un endroit qui permette de recréer les conditions d'environnement d'un chaume de colza (préférer un sol de terre battue à un sol gravillonné ou goudronné). Ces pailles doivent subir les conditions climatiques de l'année et en aucun cas être irriguées ou brumisées.

#### **Méthode d'observation des périthèces**

- **Surveillance de l'apparition des périthèces**  
Une fois par semaine, sur une vingtaine de pailles nécrosées prises au hasard, observer la présence ou l'absence de périthèces, en s'aidant d'une loupe.
- **Suivi de la maturation des périthèces**  
Dès que les premiers périthèces sont observés, prélever **2 fois par semaine 5 pailles porteuses de périthèces** (5 pailles nouvelles chaque fois, les pailles une fois observées étant éliminées).  
Sur **chaque paille**, prélever **5 périthèces au hasard** et observer leur stade de différenciation selon le mode opératoire indiqué en annexe. Chaque périthèce sera affecté dans l'une des 5 classes de différenciation définies en annexe.



au niveau du prélèvement des périthèces, ne surtout pas éliminer les périthèces vidés mais bien les prendre en compte comme stade E.

## **B / Mode opératoire de lecture de lames sous microscope**

### 1- Matériels :

- lames porte-objet pour microscopie (26 x 76mm)
- lamelles couvre-objet carrées (24 x 36mm)
- boîtes de rangement pour lames
- vaseline
- bleu de méthyle à 0.5%
- microscope avec l'objectif 25 ou 40.

### 2- Préparation des lames pour le capteur dynamique « JFC »

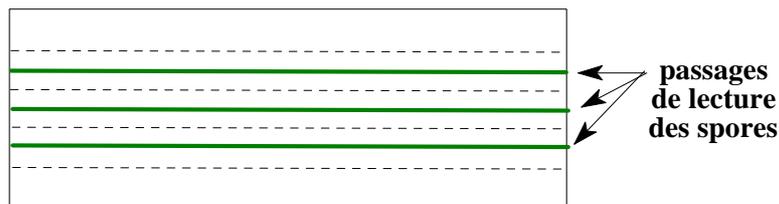
- Prendre des lames porte-objet propres
- Déposer quelques gouttes de vaseline sur le bord de la lame puis l'étaler avec une autre lame, d'une extrémité à l'autre (comme pour un frottis sanguin) pour obtenir un fin film homogène
- Laisser sécher la lame vaselinée quelques minutes
- Repérer le côté vaseliné de la lame par un point au stylo indélébile, en haut à gauche
- Diviser la lame en deux par un trait au stylo indélébile, une demi-lame correspondant à une journée de capture
- Placer les lames vaselinées dans des boîtes de rangement pour lames au réfrigérateur à 4°C

### 3- Préparation d'une lame repère des passages de lecture

Les lectures de lames des capteurs sont réalisées sur 3 passages identifiés sur la lame. Pour cela, il est nécessaire de disposer d'une lame « repère » qui permettra de repérer chaque passage.

- ◆ Prendre une lame porte-objet propre
- ◆ Centrer les axes de passage entre les traits tracés en pointillé selon le schéma ci-après:

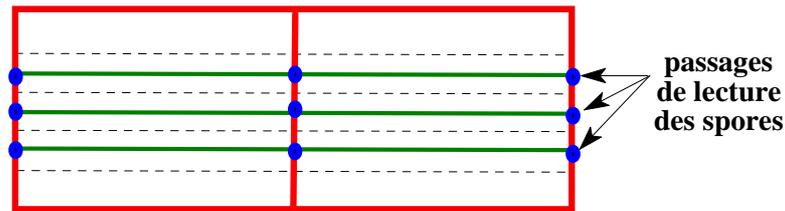
**Lame couvre-objet (26x76mm)**



### 4- Préparation des lames de capture avant lecture

- ◆ Prendre une lame de capture récupérée après piégeage,
- ◆ Placer la lame « repère » sous la lame de capture; repérer sur la lame de capture les passages de lecture par des points au stylo indélébile au niveau des deux extrémités de la lame et sur le trait divisant la lame en deux d'après le modèle suivant:

### Lame "repère" placée sous la lame de capture

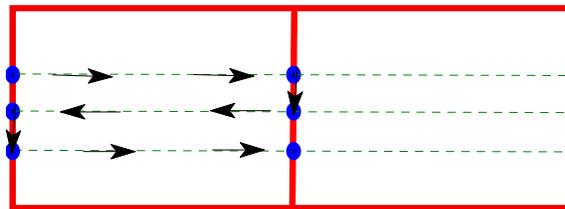


- ◆ Déposer des gouttes de bleu de méthyle sur toute la surface de la lame
- ◆ Placer 3 lamelles couvre-objet l'une à côté de l'autre sur le colorant afin de recouvrir l'ensemble de la lame; appuyer légèrement sur les lamelles sans les casser afin de chasser les bulles d'air; essuyer légèrement l'excès de colorant avec un papier absorbant.

### 5- Lecture des lames sous microscope

- ◆ Placer la lame sur la platine du microscope
- ◆ Choisir l'objectif 25 ou à défaut, l'objectif 40
- ◆ Régler la platine afin de positionner la préparation sur l'un des points correspondant au début de lecture
- ◆ Déplacer horizontalement la platine de ce point au point situé au milieu de la lame en comptabilisant les ascospores de phoma (schéma ci-après)

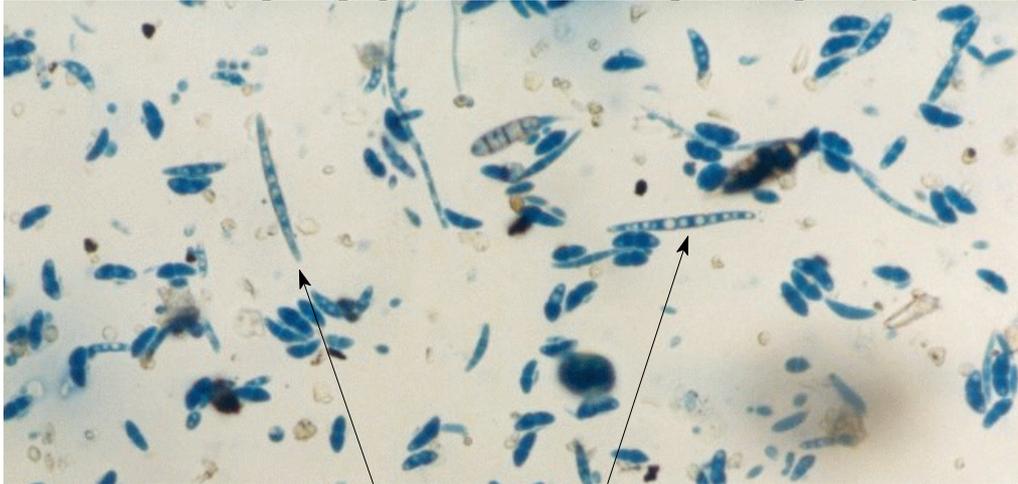
### Sens de lecture d'une demi-lame



- ◆ Réaliser la même opération pour le 2ème et 3ème passage
- ◆ Comptabiliser le nombre total de spores lues pour les 3 passages
- ◆ Pour obtenir une estimation du nombre total d'ascospores piégées par jour :
  - avec l'objectif 25, multiplier le nombre total de spores lues par un coefficient de **6,5**
  - avec l'objectif 40, multiplier le nombre total de spores lues par un coefficient **10,5**.
- ◆ Pour convertir en **nombre de spores/j/m<sup>3</sup> air**, diviser le nombre total d'ascospores piégées/jour par le volume d'air journalier aspiré par le capteur soit 14.4 m<sup>3</sup>.
- ◆ Réaliser les lectures de la même manière pour chaque demi-lame correspondant à une journée de capture.

## Identification des ascospores de *Leptosphaeria* spp

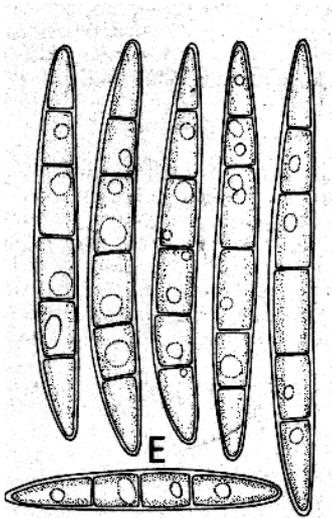
**Photo 1 : Spores piégées sur une lame de capteur de spores (objectif 25)**



Les ascospores de *L. maculans* sont repérables par leur nombre de cellules (6 au total) et leur taille (50-60 x 6-7 $\mu$ ) (photo 2) mais sans micromètre ne peuvent être facilement distinguées des ascospores de *L. biglobosa* de forme similaire mais de dimension légèrement plus faible (42-48 x 6-7 $\mu$ ). Toute spore ayant moins de 6 cellules ne doit pas être comptabilisée.

**Attention :** Les ascospores de *L. maculans* ou *L. biglobosa* peuvent être confondues avec des spores de *Fusarium* sp. Ces dernières sont identifiables par leur forme arquée et leurs extrémités effilées.

**Photo 2: Ascospores de *L. maculans***



ascospore non comptabilisée  
lors des lectures de lame  
(moins de 6 cellules)

**Photo 3: Ascospore germée de *Leptosphaeria* spp**



Il est possible que certaines ascospores soient germées lors des lectures. Dans ce cas, un ou plusieurs tubes germinatifs sont visibles (photo 3). Ces ascospores doivent être comptabilisées si elles ont 6 cellules.

### **Remarques :**

De préférence, effectuer les lectures au moins une fois par semaine pour ne pas prendre du retard sur les lectures suivantes. Les lames, une fois retirées du capteur, peuvent être placées au réfrigérateur à 4°C pour conservation dans le cas où les lectures ne peuvent pas être réalisées de suite. La coloration doit être faite juste avant lecture.

## C / Mode opératoire d'observation du stade de maturation des périthèces de *Leptosphaeria* sp.

- prélever un périthèce sur une paille à l'aide d'une épingle ou d'une aiguille à dissocier
- déposer le périthèce dans une goutte d'eau sur une lame
- extirper le contenu du périthèce à l'aide de 2 aiguilles fines
- ajouter une goutte de Bleu de Methylene avant de placer la lamelle (exercer une pression sur la lamelle afin d'écraser les asques et de chasser les bulles d'air)
- observer au microscope et classer le périthèce en fonction de l'état de différenciation de ses asques et ascospores selon la grille ci-dessous :

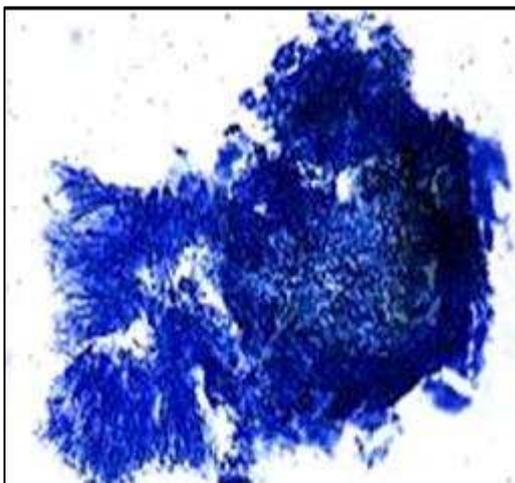
classe	périthèce	asques	ascospores
<b>A</b>	<b>différencié non mûr</b>	indifférenciés <small>Présence d'un tissu pseudoparaphysioïde</small>	indifférenciées
<b>B</b>	<b>différencié non mûr</b>	<b>différenciés</b>	indifférenciées
<b>C</b>	<b>différencié non mûr</b>	différenciés	<b>différenciées :</b> < 8 spores/asque < 4 cellules/spore
<b>D</b>	<b>différencié mûr</b>	<b>différenciés</b>	<b>différenciées :</b> 8 spores/asque ≥ 4 cellules/spore
<b>E</b>	<b>vide</b>	Reliquat possible dans des tissus désorganisés et nécrosés	Présence possible de spores isolées

### *Règles d'affectation en classes :*

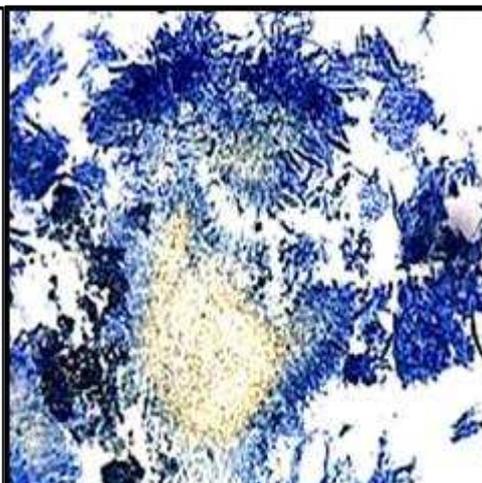
- ↳ Affectation en classe C et D quand au moins un asque et une ascospore ont atteint le stade considéré
- ↳ Un périthèce est considéré comme mûr quand il présente au moins un asque différencié contenant des ascospores à plus de 4 cellules.

N.B. Illustrations classes de différenciation des périthèces

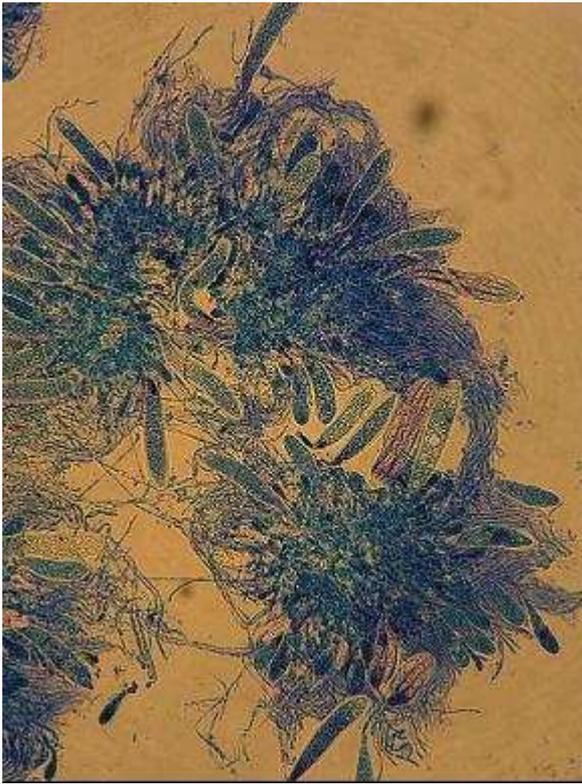
### **Classe A :**



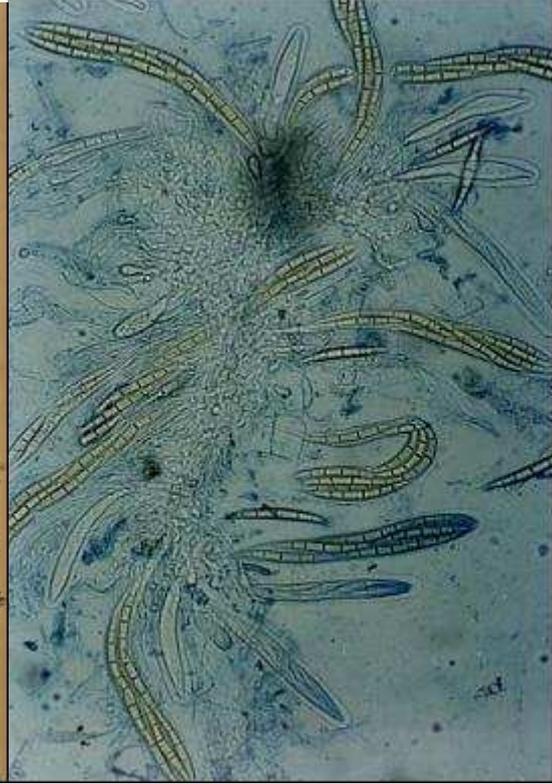
### **Classe B :**



**Classe C :**



**Classe D :**



**Classe E :**

