



LIMITER LE DEVELOPPEMENT DE FUMAGINE SUR MIELLAT DE *Metcalfa pruinosa* VALIDATION D'UN PROTOCOLE DE CULTURE IN VITRO DE FUMAGINE ET TEST DE FONGICIDES SUR FUMAGINE IN VITRO

Sophie-Joy Ondet (GRAB), Anne Maître (stagiaire)

Partenaires : CEPEM, INRA d'Avignon

1 - PROBLEMATIQUE

Metcalfa pruinosa est un ravageur très polyphage, localisé dans tout le sud de la France et causant d'importants dégâts principalement en Corse et sur la Côte d'Azur.

On retrouve ce ravageur piqueur suceur dans les haies, bosquets, jardins, espaces verts, cultures maraîchères, vergers et vignoble.

Cet insecte piqueur suceur, rejette sur les feuilles et les fruits, un miellat sur lequel se développe la fumagine, dépréciant alors la qualité des fruits (taches noirâtres sur l'épiderme et déformation dû à une mauvaise photosynthèse).

Tenter de limiter le développement de fumagine et de dessécher ou lessiver le miellat sont de nouveaux axes d'expérimentations débutés cette année au GRAB.

2 - OBJECTIFS

Limiter le développement de fumagine : tests en laboratoire.

- 1/ déterminer le milieu de culture le plus approprié à la fumagine en culture in vitro
- 2/ valider l'intérêt de l'ajout d'un antibiotique dans les milieux de cultures comparés
- 3/ tester certains fongicides et/ou fongistatiques sur fumagine in vitro

3 - MATERIEL ET METHODE

3.1 Lieu :

L'essai est mis en place dans le laboratoire du GRAB et réalisé en parti au laboratoire du CEPEM, à Avignon.

3.2 Matériel végétal

Tests en boîte de pétri.

Les milieux de culture et les inoculations ont été réalisés sous hôte aspirante à flux laminaire au Cepem.

Les inoculations de fumagine ont été faites à partir :

- de peau de kiwis recouverts de fumagine, récoltés en décembre 2003, en Corse
- de peau de jeunes kiwis recouverts partiellement de fumagine, récoltés en août 2004 à Nîmes
- de feuilles (ronce, cornouiller ...) recouvertes partiellement de fumagine, prélevées en août 2004 dans un bosquet.

3.3 Dispositif expérimental

- a) test de milieux de culture : 5 répétitions par milieu comparé
- b) essai de détermination de champignons contenus dans la fumagine : 5 répétitions par type de champignon différencié ou identifié
- c) essai des produits fongicides et/ou fongistatiques : essai en randomisation à 5 répétitions.

3.4 Modalités :

a) Elaboration et validation d'un protocole de mise en culture de fumagine en boîte de pétri sur milieu gélosé.
- Test de différents milieux de culture en boîte de pétri et validation de l'intérêt d'ajouter un antibiotique dans ces milieux (éviter le développement de bactéries non désirées).

PDA (Potatoes Dextrose Agar),
OGYE (Oxytétracycline-Glucose-Extrait de levure)
V8
Malt Agar,

Chacun de ces 4 milieux est avec ou sans ajout d'antibiotique (Rifamicine 30mg/l).
Ceci représente un total de 8 milieux à comparer.

- Deux méthodes d'inoculation sont réalisées :

dépôt de la peau de kiwi ou de la feuille : face inférieure sur gélose

dépôt de la peau de kiwi ou de la feuille : face supérieure sur gélose.

Au total nous comparons donc 16 modalités si l'on considère ces deux critères : le milieu et la méthode d'inoculation.

Pour chacune de ces modalités, 5 répétitions sont réalisées.

Toutes ces boîtes de pétri sont fermées hermétiquement (film plastique autour) et sont entreposées à température ambiante et sans luminosité ou obscurité particulière (durées naturelles de jour et de nuit).

b) Isolement et détermination si possible de champignons contenus dans la fumagine :

En recoupant les différents champignons mentionnés dans les articles de notre recherche bibliographique, on peut lister 16 champignons principaux, constituant la fumagine.

Les observations au microscope et les essais de détermination avec l'aide de pathologistes de l'INRA, nous permettent de valider ou non la présence de ces champignons principaux listés en bibliographie et éventuellement de dire si l'on en trouve de nouveaux.

c) Pour le test de fongicides/fongistatiques :

L'essai en boîte de pétri se fait à partir du milieu de culture le plus adapté au développement de la fumagine, donné par le résultat de l'essai a.

Les modalités comparées sont :

T : témoin sec

BN : Bouillie Nantaise

BSC : Bouillie Sulfo Calciqie italienne

BB : Bouillie Bordelaise

KMnO4 : Permanganate de potassium

HE Sa : Huile essentielle de sarriette vivace

HE La : Huile essentielle de lavandin grosso

Tableau récapitulatif des dosages

| Modalité | Dosage conseillé | Dosage utilisé | Mode d'application |
|-----------------------|---|---------------------------------------|------------------------|
| BN (liquide) | 3 à 5 l/hl selon le végétal | 0.05 l/l | Pulvérisation manuelle |
| BSC (liquide) | 1 à 2 kg/ hl | 0.01 l/l | Pulvérisation manuelle |
| BB (poudre) | 1.25 kg/hl tavelure / pomme 2.5 kg/hl cloque / pêcher | 25 g/l | Pulvérisation manuelle |
| KMnO4 (poudre) | 200 à 300 g/hl | 2,5 g/l | Pulvérisation manuelle |
| HE Sa | 10% : 1 volume d'HE pour 3 d'éthanol à 70% mis dans 6 volumes d'eau minérale pH 6 | Pulvérisation de cette préparation | Pulvérisation manuelle |
| HE La | idem | idem | idem |

3.5 Observations et calendrier d'intervention

Observation du développement de fumagine in vitro autour de l'inoculum (fragment de peau de kiwi ou de feuille de cornouiller et de ronce).

Observations visuelles, sans et avec microscope (observation de l'organisation des filaments et la présence ou non de spores) et détermination éventuelle par les pathologistes de l'INRA d'Avignon.

Utilisation d'un système de quadrillage (au mm²) transparent pour quantifier le développement progressif de ces champignons observés sur boîte de pétri.

Calendrier d'intervention :

a) Comparaison de milieux de culture :

Préparation des milieux : 28/07/04

Inoculation sur ces milieux : 29/07/04 (Jo)

Observations visuelles : 02/08 (J+3), 03/08 (J+4), 11/08 (J+12), 13/08 (J+14) et le 16/08 (J+17)

b) Détermination éventuelle de certains champignons constituant la fumagine

- Inoculation sur milieu sélectionné (milieu PDA : voir résultats ci-dessus) : le 10/08/04 (Jo) à partir de peau de kiwis (récoltés en 2003 en Corse et en 2004 à Avignon) et de feuilles de cornouiller et ronce.
- Observations : 12/08 (J+2) ; 16/08 (J+6)
- Détermination à l'INRA : le 18/08 (J+8) (clef de détermination des genres de champignons imparfaits) des champignons les plus fréquemment rencontrés dans les observations
- Repiquage sur milieu PDA

c) Tests de fongicides et fongistatiques

- inoculation sur PDA de peau de kiwi recouverte de fumagine (kiwis récoltés en 2003 en Corse et peaux déposées face interne sur gélose, cf essai a) et réalisation des pulvérisations (pulvérisation manuelle) : le 20/08/04 (Jo)
- observations : 24/08 (J+4) ; 26/08 (J+6) ; 30/08 (J+10)

4 - RESULTATS

4.1 Comparaison des milieux de culture

Lors des observations du développement de fumagine sur les différents milieux, il a été nécessaire de regrouper les différents types de champignons selon des critères visuels :

Filamenteux Blanc, Gris, Noir et Marron : FB, FG, FN, FM

Rose Cloqué : RC (correspond au développement de bactéries)

Coussin Blanc, Noir, Rose, Gris : CB, CN, CR, CG

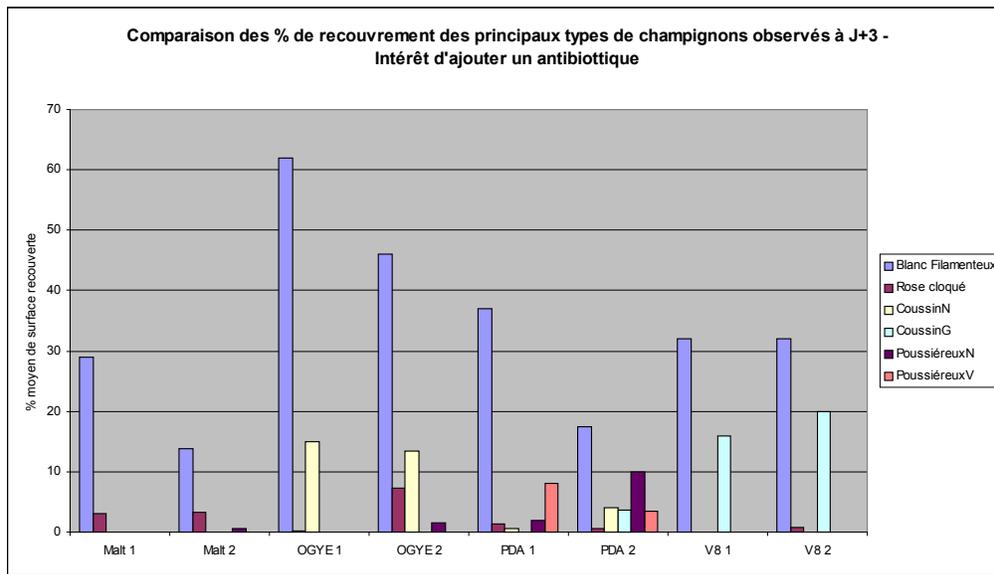
Poussiéreux Noir, Blanc, Vert, Gris, Noir Gros Grain : PN, PB, PV, PG, PNGG

Opaque Blanc, Noir, Vert, Marron orangé, Ocre, Rose : OB, ON, OV, OM, OO, OR.

A chaque observation visuelle, afin de quantifier la surface de développement des champignons caractérisés, une notation du pourcentage de surface recouverte a été estimé.

Sur les milieux moyennement riches (OGYE et PDA) à très riches (V8), dès le quatrième jour après inoculation, les différents types de champignons commencent à se superposer et à prendre des formes et des couleurs de plus en plus complexes. Les développements de champignons relevés à J+3 sur les milieux OGYE, PDA et V8 sont déjà importants et permettent de les regrouper par types. Sur Malt Agar, milieu assez pauvre, les observations ont été prolongées jusqu'à J+17 pour permettre aux différents types champignons de se développer (développement très lent).

- Tableau comparant les % moyens de surface occupée par type de champignon : intérêt d'ajout de l'antibiotique :

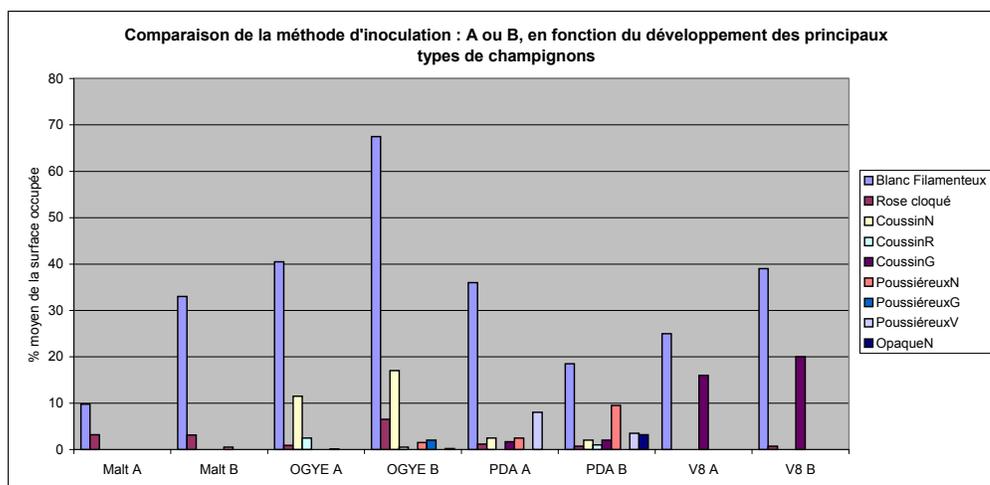


Légende : milieu 1 : milieu avec antibiotique
milieu 2 : milieu sans antibiotique

Le type classé Rose Cloqué semble après observation au microscope et avec l'expérience de pathologistes de l'INRA, être un développement de bactérie(s). Il serait donc logique de focaliser nos comparaisons de milieu avec ou sans antibiotique, sur ce type Rose Cloqué. Sur les milieux Malt Agar, PDA et V8 l'antibiotique ne permet pas de diminuer le développement de la catégorie « Rose Cloqué ». Son intérêt sur milieu OGYE par contre est positif mais reste timide.

En ce qui concerne les autres types comme le « Blanc Filamenteux » et le « Coussin Noir », l'ajout de l'antibiotique stimule leur développement.

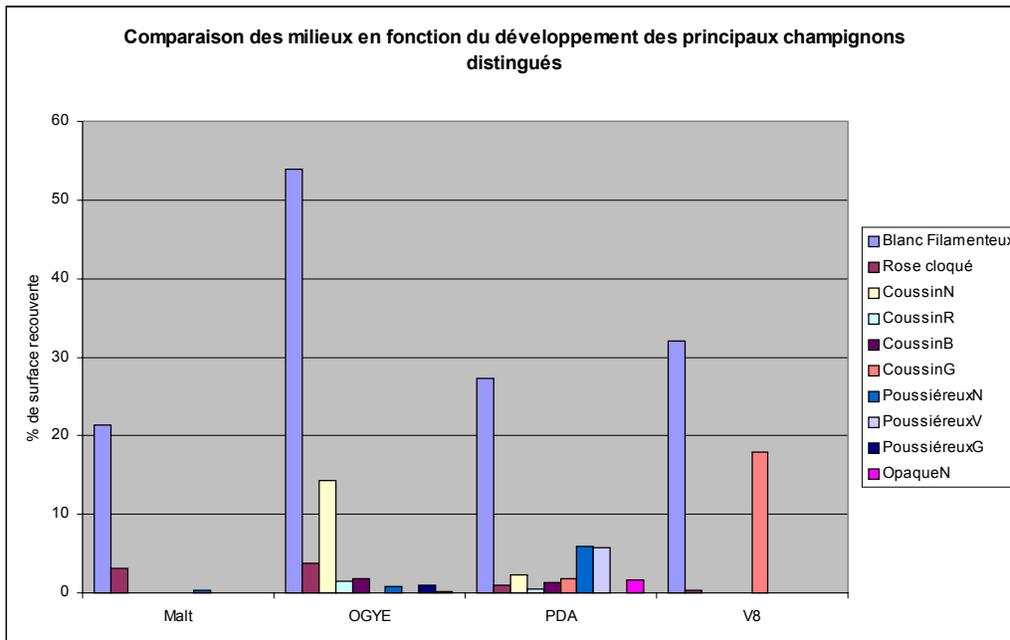
- Tableau comparant les % moyens de surface occupée par type de champignon : comparaison entre deux méthodes d'inoculation.



Légende : méthode A : la face supérieure de la peau ou de la feuille est placée sur la gélose
méthode B : la face inférieure de la peau ou de la feuille est placée sur la gélose

Pour avoir le maximum de types de champignons se développant sur milieu, il semble que la méthode B avec la face inférieure de la peau ou de la feuille sur la gélose soit plus intéressante.

- Tableau comparant les différents milieux (méthodes d'inoculation et ajout ou non d'antibiotiques confondus) :
 Les milieux de culture conditionnent le développement des champignons.



Le milieu permettant au plus grand nombre de types de champignons distingués, de se développer, est le milieu PDA.

4.2 Détermination éventuelle de certains champignons constituant la fumagine

En réalisant le recoupement des nombreux types de champignons répertoriés en bibliographie sous le terme générique de fumagine, on peut lister 16 champignons principaux :

| | |
|--------------------|--------------------|
| Alternaria (2) | Limacinia (1) |
| Asterina (1) | Limacinula (1,3) |
| Aureobasidium (2) | Metiola (1) |
| Camarosporium (1) | Mucor (1) |
| Capnodium (1,2,3) | Peyronellaea (2) |
| Ceratocarpia (1,2) | Pleosphaeria (1,2) |
| Cladosporium (2) | Torula (2) |
| Cucurbitaria (1) | Ulocladium (2) |

Avec :

(1) ARNAUD, Gabriel. *Contribution à l'étude des Fumagines*.

ARNAUD, Gabriel. *Contribution à l'étude des Fumagines*. 3^e édition

(2) <http://www.biopuglia.iamb.it/arboree/web1491.htm>

(3) VAVASSORI, Emiliano Giovanni. *Descrizione Delle Malattie Mostrate Dai Campioni Allegati. CAMPIONE N. 1 - FUMAGGINE*. Erbario Fitopatologico. www.guit.sssup.it/downloads/erbario.pdf

Parmi les types de champignons développés sur nos boîtes de pétri et distingués selon des critères visuels, le service de pathologie de l'INRA, a pu déterminer certains d'entre eux :

- le type nommé Opaque Noir (ON) regroupe deux champignons : *Curvularia* et *Torula*
- le type nommé Filament Gris (FG) regroupe deux champignons : *Cladosporium* et un autre non déterminé
- le type nommé Coussin Noir (CN) regroupe : l'*Alternaria*, du *Fusarium* et au moins deux autres genres non déterminés

- le type nommé Opaque Vert (OV) est du pénicillium
- le type nommé Poussiéreux Noir (PN) est du Aureobasidium

Certains autres, n'ont pu être déterminés par défaut de sporulation.

Comme les inoculations ont été réalisées à partir de kiwis couverts de fumagine récoltés en Corse en février 2004 et conservés en frigo pendant 6 mois, il est possible que d'autres champignons s'y soient développés ou s'y soient déposés. Après la première série d'inoculation à partir de peau de ces kiwis, ayant permis de déterminer visuellement différents types de champignons, une seconde série d'inoculations sur milieu PDA a été mise en place. Cette fumagine développée pendant l'été 2004, a été prélevée sur feuilles de ronce, de cornouiller, de peau de kiwi (de Nîmes), comparés à la peau de kiwi de Corse de la saison 2003 et à la peau de kiwis 2004 apparemment « sain » (sans trace de miellat ni de fumagine).

Six boîtes de pétri par origine d'inoculum sont préparées.

Tableau donnant le nombre de boîtes dans lesquelles chaque type de champignon est observé sur PDA (maximum 6) à J+6 :

| Origine de l'inoculum | Filament Blanc | Filament Gris | Coussin Noir | Poussiéreux Noir | Poussiéreux Vert | Opaque Noir | Opaque Marron |
|-----------------------------|----------------|---------------|--------------|------------------|------------------|-------------|---------------|
| Kiwis sains | 1 | 0 | 5 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Cornouiller | 1 | 1 | 6 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| Ronce | 0 | 3 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 |
| Kiwi (de Nîmes) 2004 | 0 | 1 | 4 | 0 | 2 | 2 | 3 |
| Kiwi de Corse 2003 | 4 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 |

Ces résultats semblent indiquer que certains champignons responsables de la fumagine sont présents en verger sur les fruits (cf kiwis sains) sous forme de spores et que le miellat ne constituerait alors qu'un support adéquat à leur développement.

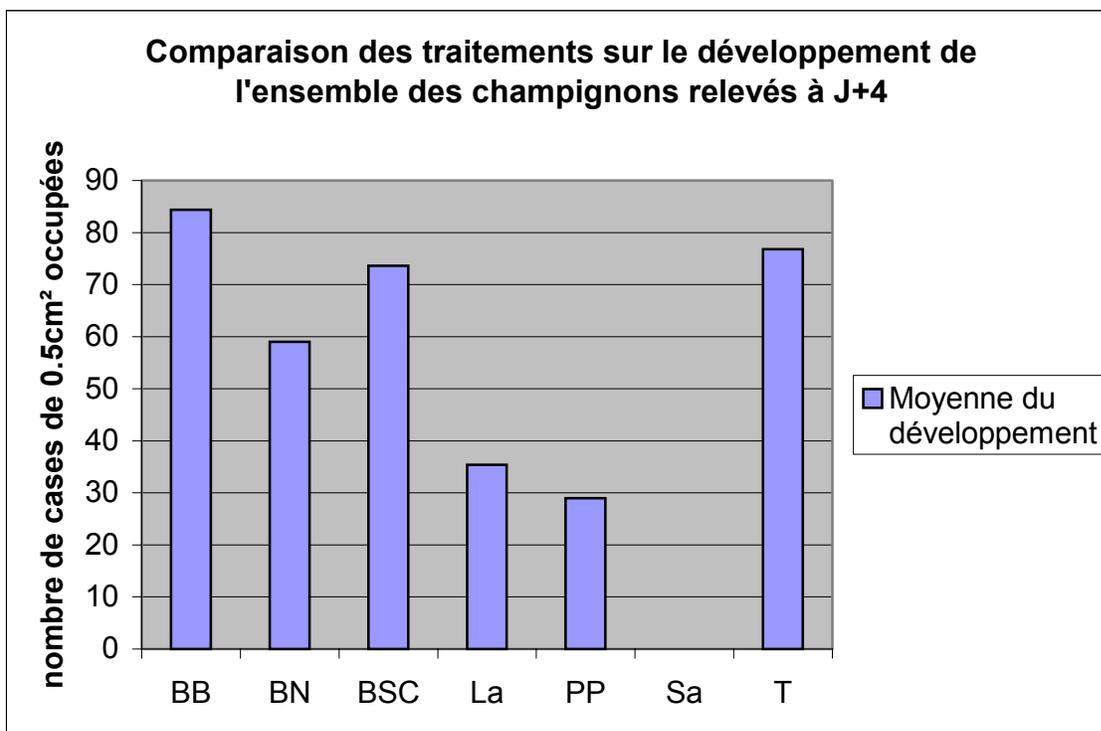
On retrouve les Filaments Gris, Coussins Noirs, Opaques Noirs et Marrons, pour toutes les origines d'inoculum prélevés en 2004. Par contre les Poussiéreux Noir et Vert n'apparaissent pas systématiquement.

N.B : L'essai n'avait pas pour objectif principal de déterminer les genres regroupés sous le nom de fumagine ni de les isoler. Les quelques reconnaissances de genres cependant nous ont permis de saisir la complexité et la lourdeur de ce type d'étude.

4.3 Tests de fongicides et fongistatiques

Le développement des champignons 6 jours après inoculation sur PDA, est tel qu'il est difficile de réaliser les observations. La comparaison peut être faite sur les résultats de l'observation à J+4.

Tableau donnant la surface recouverte par les différents types de champignons répertoriés en fonction des traitements effectués en boîte de pétri :



Aucun champignon ne s'est développé avec le traitement à base de Sarriette Vivace à J+4 (ni à J+6). Son action fongicide ou fongistatique, à la concentration utilisée ici, semble très forte. Les traitements à base de permanganate de potassium et d'huile essentielle de lavandin grosso permettent de diminuer fortement (diminution de 55 à 63%) le développement des champignons par rapport au témoin. Avec des traitements à base de bouillie nantaise et la bouillie sulfo-calcique, la diminution de développement des champignons reste faible. La bouillie bordelaise semble n'avoir aucun effet fongicide ou fongistatique.

CONCLUSIONS :

- L'antibiotique « Rifamicine » utilisé dans cet essai ne permet pas de limiter de façon nette le développement de bactéries. L'intérêt de l'ajout d'un tel antibiotique dans nos milieux de culture n'est donc pas validé.
- Le milieu PDA pour la mise en culture de fumagine semble le plus adéquat en comparaison au milieu V8, OGYE et Malt Agar.
- L'inoculum d'épiderme de fruit ou de portion de feuille est à placer face interne (ou inférieure pour les feuilles) sur la gélose pour une meilleure mise en culture de la fumagine.
- L'huile essentielle de sarriette vivace, le permanganate de potassium puis l'huile essentielle de lavandin grosso permettent de diminuer fortement le développement de champignons (résultats obtenus in vitro). Leurs propriétés fongicide et/ou fongistatique se révèlent plus puissantes que celles de la bouillie nantaise, de la bouillie sulfo-calcique et de la bouillie bordelaise.

ANNEE DE MISE EN PLACE : 2003 - ANNEE DE FIN D 'ACTION : 2006

ACTION : nouvelle ○

en cours ●

en projet ○

Renseignements complémentaires auprès de : C. Gomez, G. Libourel, S-J Ondet, L. Romet et F. Warlop

GRAB Agroparc BP 1222 84911 Avignon cedex 9 tel 04 90 84 01 70 fax 04 90 84 00 37 mail : arboriculture.grab@freesbee.fr

Mots clés du thésaurus Ctifl : Agriculture biologique - multi espèces - *Metcalfa pruinosa*

Date de création de cette fiche : décembre 2004