

Annexes

Annexes.....	97
Annexe 1 - Échantillonnage de <i>Phytophthora infestans</i> au moyen de cartes FTA (Euroblight).....	98
Annexe 2 - Formulaire d'échantillonnage (Euroblight).....	100
Annexe 3 - Protocole d'isolement des souches de <i>Phytophthora infestans</i> à partir d'échantillons frais (CRA-W).....	102
Annexe 4 - Caractérisation des souches mildiou pour la saison 2019	107
4.1. Échantillonnage sur l'essai MILVAR, Libramont.....	107
4.2. Échantillonnage sur le territoire wallon	108
Annexe 5 - Culture de <i>P. infestans</i>	110
5.1. Préparation de milieu seigle agar (350ml).....	110
5.2. Protocole de repiquage d'une culture de <i>P. infestans</i> en chambre stérile	110
Annexe 6 – Abaque d'utilisation de la cellule de Fuchs Rosenthal.....	111
Annexe 7 - Restauration de pathogénicité et préparation d'une solution de sporanges.....	112
Annexe 8 - Étude de la variation des symptômes provoqués par <i>P. infestans</i> selon la méthode d'inoculation et la concentration en inoculum (Lore-Anne Bastin et Marie Goormans)	114
Annexe 9 - Étude de l'évolution de la quantité de sporanges de <i>P. infestans</i> sur milieu seigle selon la concentration en sucrose (Marie Goormans)	116
Annexe 10 - Étude sur feuilles détachées du potentiel infectieux de <i>P. infestans</i> selon le type d'inoculum et le milieu de croissance.....	117
10.1. Protocole.....	117
10.2. Macro ImageJ (Simon Caulier)	119
10.3. Résultats complets et écarts-types	120

Annexe 1 - Échantillonnage de *Phytophthora infestans* au moyen de cartes FTA (Euroblight)



Protocol for sampling *Phytophthora infestans* DNA using FTA cards

Despite this long text, it's really simple! Watch the YouTube videos for demo!

1. Use 1 card with 2 sampling areas (circles) per field.
2. Sample 2 lesions per infected field, 1 lesion for each sample area (circle), preferably from the same plant.
3. Label the FTA card with a reference number (if not already done)
Provide the rest of the information on the sample form or XL sheet.
4. Take the sample (instructions below)
Do not touch the sampling area except with the *Phytophthora* sample!
5. Fill out the sampling form or the XL sheet with the sample details
Please use decimal lat/long codes
6. Air-dry the card, store and return cards + XL sheet to your local coordinator.



Collect sample on FTA card:

- Cut a 1-2 cm² piece of sporulating lesion (Figure 2)
- Place the lesion sample inside a clean circular sampling area on the FTA matrix. Sporulating side facing down.
- Replace the cover sheet.
- Apply moderate pounding/pressure to the leaf sample through the cover sheet with a blunt object such as a small hammer, spoon, screw driver handle, car key or pestle. Take care not to damage the matrix.
- When the green leaf extract is visible on the back of the FTA matrix the collection process is complete.
- Remove plant residue from card, ensure that no large pieces of plant tissue remain adhered to the FTA card (Figure 3).
- Fill out the sampling form/XL sample sheet
- Allow the FTA card to air dry for a minimum of one hour at room temperature.
- Store dry FTA cards separately in a paper envelope or plastic zip-lock bag.
- Collect cards + Sampling Forms and return to local coordinator.
- Figure 3 shows a card after processing in the laboratory so you can see what the next stage will be



Figure 3. FTA card containing samples for SSR analysis. DNA has been extracted from the 2mm disks punched from each sample.

Materials needed:

- Knife/Scissors for sampling the lesion (clean after use!)
- Whatman FTA plant-card
- Pen/Pencil
- Blunt object such as a small pestle, small hammer etc
- Zip lock bag to store used and air-dried FTA cards

Related You Tube videos:

1. <https://www.youtube.com/watch?v=BQLe0G7vdHY>

Contacts for questions:

	Name	Email
General / Technical James Hutton Institute	David Cooke	David.Cooke@hutton.ac.uk



Euroblight 2016 *Phytophthora infestans* SAMPLING FORM

Please write clearly!

COMPULSORY:

Reference number FTA card	<input type="text"/>
Sampler name	<input type="text"/>
e-mail address	<input type="text"/>
Country +	<input type="text"/>
Town +	<input type="text"/>
Postal Code	<input type="text"/>
OR gps coordinates (decimal)	<input type="text"/>
OR gps coordinates (Deg, min, sec)	<input type="text" value="° '"/>
Source: <u>P</u> roduction field or <u>T</u> rial*	<input type="text"/>
Sampling date	<input type="text"/>
Host (Potato or Tomato)	<input type="text"/>
Cultivar	<input type="text"/>
Remarks	<input type="text"/>
Disease level at sampling	<input type="text" value="High Medium Low"/>

OPTIONAL

Annexe 3 - Protocole d'isolement des souches de *Phytophthora infestans* à partir d'échantillons frais (CRA-W)



Section *Systèmes Agricoles*

Isolement des souches de *Phytophthora infestans* à partir d'échantillons frais. Procédure n° : PA-MIL-ISOL

I. Objet

Cette procédure a pour objet de décrire la méthode d'isolement de nouvelles souches de *Phytophthora infestans* à partir d'échantillons frais.

II. Définition et abréviations

ED : Eau Distillée
EDS : Eau Distillée Stérile

III. Références

IV. Principe

Les tubercules de Bintje sont très sensibles au mildiou.

Si on dépose un morceau d'organe infecté par *Phytophthora infestans* sur une rondelle de tubercule, le mycélium va se développer et traverser la rondelle. Il pourra être prélevé de l'autre côté de la rondelle pour être isolé sur un milieu. Cette technique permet l'isolement d'une souche, les bactéries présentes sur l'échantillon de départ étant plus lentes à traverser le tubercule.

V. Appareillage

Nom de l'appareil	Emplacement
Enceinte réfrigérée de marque Liebherr – Température moyenne de 16°C	Couloir

VI. Consommables et petit matériel de laboratoire

VI.1. Consommables

- Serviettes
- Boîtes de Pétri de 90 mm ϕ
- Essuie propre et sec
- Boîtes de Pétri de 90 mm ϕ contenant du milieu Pois (Procédure PA-MIL-Pois)
- Boîtes de Pétri de 90 mm ϕ contenant du milieu V8 (Procédure PA-MIL-V8)
- Boîtes de Pétri de 90 mm ϕ contenant du milieu Se (Procédure PA-MIL-Se)

VI.2. Petit matériel de laboratoire

- Boîtes d'incubation en plastique
- Bécher de 2L ou 5L
- Opinel
- scalpel

VII. Réactifs**VII.1. Produits**

Nom du réactif	n° inventaire
Solution d'Eau de Javel -1% Cl	
Eau Distillée Stérile	

VII.2. Préparations des solutions

- Eau de Javel 1% Cl : 333 ml d'Eau de Javel à 15° dans 4667 ml d'ED ou 416ml d'Eau de Javel 12° dans 4584 ml d'ED
- EDS : autoclaver l'ED à 121°C pendant 15 minutes

VIII. Matériel frais

- Tubercules de variété Bintje ou Première achetés en grande surface

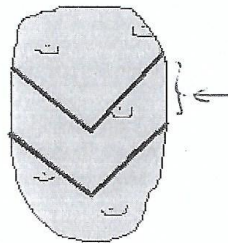
IX. Mode opératoire**IX.1. Préparation de l'échantillon**

- Les échantillons doivent rester dans la salle « ancienne vache-folle » et ne peuvent en aucun cas être remontés dans le laboratoire avant traitement
- Si la fiche d'échantillonnage n'est pas présente, demander à la personne ayant apporté l'échantillon de remplir une fiche. Si cette personne n'est pas joignable, prendre une fiche vierge⁽¹⁾ pour indiquer le numéro de LABO. La fiche devra être complétée par la suite
- Attribuer à l'échantillon un numéro LABO. Regarder quel était le numéro attribué à l'échantillon précédent⁽²⁾ et incrémenter ce numéro d'une unité
- Noter le numéro LABO sur la feuille d'échantillonnage. Ce numéro devra être noté sur l'échantillon pour toutes les étapes suivantes
- Mettre la feuille d'échantillonnage dans la farde adéquate⁽²⁾
- Indiquer sur la feuille d'inventaire⁽³⁾ le numéro LABO et la date d'arrivée du nouvel échantillon
- Si les lésions ne sporulent pas encore, placer l'échantillon en incubation afin de favoriser la sporulation :
 - Préparer une boîte en plastique transparent par échantillon
 - Placer une serviette humidifiée dans le fond de la boîte (+ / - 20 ml d'ED)

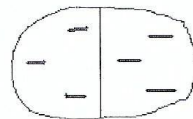
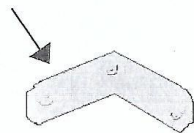
- Placer sur la serviette une boîte de Pétri ouverte et retournée ainsi que son couvercle
- Sélectionner la partie de l'échantillon qui sera mise à sporuler. Il n'est pas toujours nécessaire de conserver la totalité de l'échantillon à ce stade. L'important est d'avoir des lésions individualisées, non macérées, non contaminées et propres. Si des lésions apparaissent au niveau de plusieurs types d'organes, il est important de conserver chacun de ceux-ci
- Placer l'échantillon sur la boîte de Pétri de façon à ce qu'il ne touche pas la serviette afin d'éviter une macération, la face inférieure des feuilles tournée vers le dessus
- Indiquer sur la boîte le numéro LABO de l'échantillon et la date
- Les échantillons sont conservés ainsi dans « l'ancienne vache folle » pendant minimum 16 heures

IX.2. Isolement sur tubercule et milieu Pois

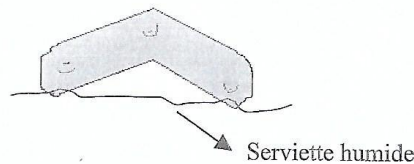
- Les boîtes avec les échantillons peuvent être remontées dans le laboratoire
- Faire tremper les tubercules sains de variété Bintje ou Première pendant 30 minutes dans de l'eau de Javel 1% dans un bécher
- Couper, à l'aide de l'Opinel, des rondelles incurvées dans les tubercules (épaisseur $\pm 1,5$ cm)



- Tremper les rondelles incurvées pendant 5 minutes dans de l'Eau de Javel 1% dans un bécher
- Rincer les rondelles à l'EDS
- Faire sécher les rondelles incurvées sur un essuie propre
- Prélever à l'aide d'un scalpel stérilisé à la flamme un peu de mycélium et de fructifications ou un morceau de la lésion et les déposer sur la face supérieure des rondelles
- Flamber le scalpel entre chaque prélèvement



- Déposer les rondelles inoculées dans une boîte d'incubation dont le fond est recouvert d'un papier absorbant humide et sur laquelle le numéro LABO a été indiqué



- Si plusieurs prélèvements sont effectués sur un même échantillon mais au niveau de différents organes, une rondelle de tubercule différente doit être utilisée pour chacun d'eux
- Le numéro LABO doit être repris sur la boîte d'incubation et un numéro correspondant au prélèvement doit lui être ajouté ainsi que l'endroit de prélèvement. Ce numéro complet doit également être indiqué sur les boîtes de milieu après isolement
Ex : 03 012/2 tige = 12^{ème} échantillon de l'année 2003, 2^{ème} endroit de prélèvement, effectué au niveau de la tige
- Les différents prélèvements effectués au niveau d'un même échantillon doivent être indiqués sur la fiche d'échantillonnage⁽²⁾
- Incuber les boîtes à l'obscurité à 16°C
- Indiquer sur la feuille d'inventaire⁽³⁾ la date à laquelle le repiquage sur tubercule a été effectué. A ce moment, une feuille d'entretien⁽⁴⁾ pour la souche doit également être créé.
- Observer la face inférieure du tubercule à partir du 2^{ème} jour d'incubation. Dès que le tubercule est transpercé, prélever un peu de mycélium à l'aide d'un scalpel en prenant garde de ne pas toucher le tubercule
- Déposer le mycélium sur milieu pois dans une boîte de Pétri de 90mm φ *3-4 prélèvements / boîte*
- Flamber le scalpel entre chaque prélèvement
- Incuber à 16°C pendant 3 à 4 jours
- La date à laquelle l'opération est réalisée doit être indiquée sur les fiches d'inventaire⁽³⁾ et d'entretien⁽⁴⁾

IX.3. Passage sur milieux V8, Se et Pois

- Lorsque le champignon s'est bien développé sur milieu Pois, prélever un peu de mycélium et le transférer sur milieux V8, Seigle et Pois
- Incuber à 16°C pendant 3 à 4 jours
- Repiquer le champignon sur milieux V8 et / ou Seigle
- Les dates auxquelles ces opérations sont réalisées doivent être indiquées sur les fiches d'inventaire⁽³⁾ et d'entretien⁽⁴⁾

X. Remarques

- (¹) Des fiches d'échantillonnage vierges se trouvent dans la farde « Echantillon 2003 – fiches de collecte » ou dans le rack sur l'étagère, dans la farde « fiches d'échantillonnages »
- (²) Voir farde « Echantillon 2003 – fiches de collecte »
- (³) Voir tableau magnétique
- (⁴) Voir farde « Echantillon 2003 – inventaire »

XI. Annexes

NA

Annexe 4 - Caractérisation des souches mildiou pour la saison 2019

4.1. Échantillonnage sur l'essai MILVAR, Libramont

Date	Variété	Mating Type	Genotyping
23-juil	Bintje	A1	misc
23-juil	Bintje	-	misc
06-août	Bintje	-	misc
06-août	Bintje	A1	misc
14-août	Agria	A1	misc
14-août	Triplo	A2	36_A2
14-août	Jelly	A2	36_A2
19-août	Nicola	A1	misc
19-août	Yona	A1	misc
19-août	Allians	A1	misc
19-août	Bintje	A1	misc
19-août	Challenger	A2	36_A2
19-août	Bintje	A1	misc
19-août	Agria	A1	misc
19-août	CMK2010	A1	misc
20-août	Allians	A1	misc
20-août	Sarpo Mira	A2	36_A2
20-août	Tentation	A2	36_A2
27-août	Kelly	A2	36_A2
27-août	Louisa	A2	13_A2
27-août	FOB2010	A2	36_A2
27-août	Delila	A1	-
27-août	Alanis	A2	-
27-août	Edony	A2	FAILED
27-août	Pamela	A2	36_A2
27-août	Challenger	A2	36_A2
27-août	Fontane	A2	36_A2
27-août	CMK2010	A1	misc
27-août	CMK2008	A1	misc
27-août	Nicola	A1	misc
27-août	Jelly	A1	misc
27-août	Levante	A2	36_A2
27-août	Yona	A2	36_A2
27-août	Innovator	A2	37_A2
13-sept	Levante	A2	36_A2
23-sept	Agria	-	misc

4.2. Échantillonnage sur le territoire wallon

Commune	Province	Date	Origine	Variété	Mating Type	Genotyping
LLN	BW	28-août	essai	Agria	A1	1_A1
Gembloux	Namur	22-août	essai	Nicola	A2	13_A2
Antheit	Liège	21-août	bio	connect	A2	13_A2
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Louisa	A2	13_A2
Fernelmont	Liège	28-août	-	-	A2	13_A2
Gembloux	Namur	28-août	essai	Louisa	A2	13_A2
Gembloux	Namur	16-sept	essai	Gasoré	A2	13_A2
Gembloux	Namur	16-sept	essai	Gasoré	A2	13_A2
Bierwart	Namur	4-juin	tas de déchets	-	A2	36_A2
Bierwart	Namur	4-juin	tas de déchets	-	A2	36_A2
Chièvres	Hainaut	3-juin	tas de déchets	-	A2	36_A2
Amay	Liège	13-juin	tas de déchets	-	A2	36_A2
Bierwart	Namur	20-juin	bio	Agria	A2	36_A2
Baisy-Thy	BW	20-juin	culture	Bintje	A2	36_A2
Nivelles	BW	20-juin	culture	Bintje	A2	36_A2
Ernage	Namur	23-juin	culture	-	A2	36_A2
Gbx	Namur	10-juil	essai	Nicola	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	14-août	essai	Triplo	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	14-août	essai	Jelly	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	19-août	essai	Challenger	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	20-août	essai	Sarpo Mira	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	20-août	essai	Tentation	A2	36_A2
Gembloux	Namur	22-août	essai	clone 07-10-96	A2	36_A2
Wantoul	Liège	22-août	bio	Agria	A2	36_A2
Wantoul	Liège	22-août	bio	Annabelle	A2	36_A2
Wantoul	Liège	22-août	bio	Agria	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Kelly	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	FOB2010	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Pamela	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Challenger	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Fontane	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Levante	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Yona	A2	36_A2
Gochenée	Namur	28-août	bio	Allians	A2	36_A2
Bierwart	Namur	26-août	culture	Fontane	A2	36_A2
Libramont	Luxembourg	13-sept	essai	Levante	A2	36_A2
Mont-st-André	BW	16-sept	repousses	-	A2	36_A2
Mont-saint-André	BW	16-sept	repousses	tomate	A2	36_A2
Binche	Hainaut	23-sept	serres	Amora	A2	36_A2
Malmédy	Liège	25-sept	serres	Agila	A2	36_A2
Malmédy	Liège	25-sept	serres	Agila	A2	36_A2
Morhet	Luxembourg	1-oct	jardin	Corne de gatte	A2	36_A2
Tournai	Hainaut	9-oct	repousses	Fontane	A2	36_A2
Malmédy	Liège	15-oct	serres	Divaa	A2	36_A2

Perwez	BW	15-oct	jardin	tomate	A2	36_A2
Wagnelée	Namur	31-mai	tas de déchets	-	A2	37_A2
Wagnelée	Namur	13-juin	tas de déchets	-	A2	37_A2
Grand-Manil	Namur	8-juil	-	-	A2	37_A2
Gembloux	Namur	10-juil	essai	Nicola	A2	37_A2
Ernage	Namur	10-juil	culture	-	A2	37_A2
Chastre	BW	5-août	jardin	-	A2	37_A2
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Innovator	A2	37_A2
Terwagne	Liège	2-oct	serres	Annabelle	A2	37_A2
Gembloux	Namur	7-oct	jardin	Vitelotte	A2	37_A2
Gembloux	Namur	7-oct	jardin	Vitelotte	A2	37_A2
Houtain-Le-Val	BW	8-oct	essai	Bintje	A2	37_A2
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Edony	A2	FAILED
Gembloux	Namur	28-août	essai	Gasoré	A2	37_A2
Louvain-la-Neuve	BW	28-août	essai	Agria	A1	FAILED
Libramont	Luxembourg	23-juil	essai	Bintje	A1	misc
Libramont	Luxembourg	23-juil	essai	Bintje	-	misc
Flevoland	Pays-Bas	24-juil	essai	-	A1	misc
Libramont	Luxembourg	6-août	essai	Bintje	-	misc
Libramont	Luxembourg	6-août	essai	Bintje	A1	misc
Libramont	Luxembourg	14-août	essai	Agria	A1	misc
Libramont	Luxembourg	19-août	essai	Nicola	A1	misc
Libramont	Luxembourg	19-août	essai	Yona	A1	misc
Libramont	Luxembourg	19-août	essai	Allians	A1	misc
Libramont	Luxembourg	19-août	essai	Bintje	A1	misc
Libramont	Luxembourg	19-août	essai	Bintje	A1	misc
Libramont	Luxembourg	19-août	essai	Agria	A1	misc
Libramont	Luxembourg	19-août	essai	CMK2010	A1	misc
Libramont	Luxembourg	20-août	essai	Allians	A1	misc
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	CMK2010	A1	misc
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	CMK2008	A1	misc
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Nicola	A1	misc
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Jelly	A1	misc
Libramont	Luxembourg	23-sept	essai	Agria	-	misc
Wagnelée	Namur	31-mai	tas de déchets	-	A2	-
Attre	Hainaut	3-juin	tas de déchets	-	A2	-
Arquennes	Hainaut	20-juin	culture	Fontane	A2	-
Chastre	BW	24-juin	jardin	Primura	A1	-
Ernage	Namur	6-juil	bio	Bintje	A2	-
Marche-Lez-Ecaussinnes	Hainaut	11-juil	culture	Fontane	A2	-
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Delila	A1	-
Libramont	Luxembourg	27-août	essai	Alanis	A2	-
Fernelmont	Liège	23-août	-	-	A2	-
LLN	BW	28-août	essai	Agria	A1	-
LLN	BW	28-août	essai	Agria	A1	-
Ath	Hainaut	28-août	essai	Louisa	A2	-

Annexe 5 - Culture de *P. infestans*

5.1. Préparation de milieu seigle agar (350ml)

Appareillage

- Autoclave
- Agitateur magnétique

Matériel

- Farine de seigle
- Eau déminéralisée
- Sucrose
- Agar-agar
- Erlenmeyer 350mL
- Tamis à 3 largeurs de mailles
- Spatule de peintre
- Coton de bourre
- Aluminium

Manipulation

Peser 21g de farine et la placer dans l'erien. Ajouter 180mL d'eau déminéralisée et agiter à l'aide de l'agitateur magnétique. Fermer hermétiquement l'erien avec du coton de bourre et de l'aluminium, autoclaver le mélange. Filtrer sur tamis en commençant par la taille de maille la plus large, racler à l'aide de la spatule. Ajouter 0,35g de sucrose, 5,25g d'agar-agar et de l'eau déminéralisée pour ajuster le volume à 350mL. Autoclaver à nouveau.

5.2. Protocole de repiquage d'une culture de *P. infestans* en chambre stérile

Appareillage

- Incubateur 18°C

Matériel de laboratoire

- Boîte de pétri (90mm Ø) stérile contenant du milieu seigle-agar
- Scalpel
- Emporte-pièce (6mm Ø)
- Parafilm
- Éthanol

Matériel frais

- Culture de *P. infestans* sur milieu seigle-agar

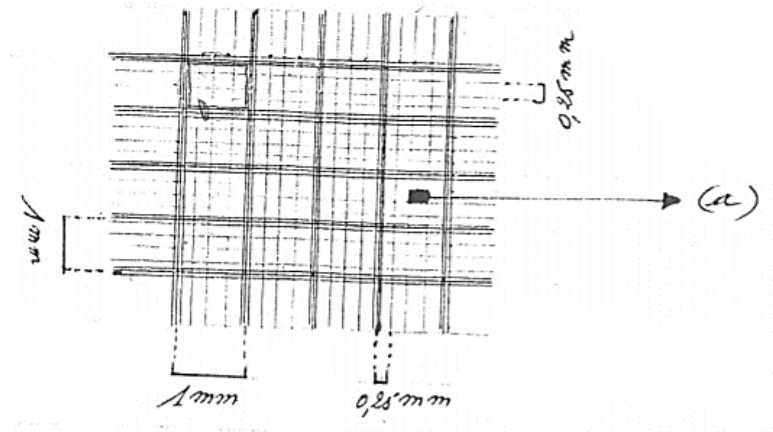
Manipulation

Désinfecter la paillasse à l'aide d'éthanol. À la flamme, réaliser un plug dans le milieu de culture de la boîte contenant *P. infestans*, à l'aide de l'emporte-pièce stérilisé à la flamme. Utiliser le scalpel stérilisé à la flamme pour soulever le plug et le placer au centre de la boîte de pétri contenant du milieu seigle, mycélium vers le bas. Sceller la boîte et l'incuber à 18°C.

Réaliser un repiquage environ tous les mois permet de conserver suffisamment de matériel frais et directement utilisable (âgé de ± 21 jours).

Annexe 6 – Abaque d'utilisation de la cellule de Fuchs Rosenthal

Représentation de la cellule



Paramètres de la cellule

Surface élémentaire (a) = 0,0625 mm²

Profondeur de la cellule = 0,2 mm

→ 1 volume élémentaire = 0,0125 mm³ = 125.10⁻⁷ mL

Abaque

Le volume total observé est fonction du nombre x de volumes élémentaires parcourus :

$$V_{\text{TOTAL}} = 125 \cdot 10^{-7} \cdot x \quad [\text{mL}] \quad \text{avec } 1 < x < 256$$

Tableau 1 - Abaque d'utilisation d'une cellule de Fuchs Rosenthal.

Le facteur multiplicatif permet d'exprimer le nombre d'objets contenus dans 1mL de la suspension considérée.

X	Volume parcouru (mL)	Facteur multiplicatif
16 (1 carré)	2.10 ⁻⁴	5000
32 (2 carrés)	4.10 ⁻⁴	2500
64 (4 carrés)	8.10 ⁻⁴	1250
80 (5 carrés)	1.10 ⁻³	1000
160 (10 carrés)	2.10 ⁻³	500
256 (16 carrés)	3,2.10 ⁻³	312,5

Annexe 7 - Restauration de pathogénicité et préparation d'une solution de sporanges

Objectif : Préparation d'une solution de sporanges ayant retrouvé leur pathogénicité.

Appareillage

- Microscope à contraste de phase
- Chambre d'incubation lumineuse à 17°C

Matériel de laboratoire

- 150mL d'une solution stérile d'eau + Tween 20 (0,1%)
- 200mL d'eau stérile
- Eau déminéralisée
- Tige de verre courbée à la flamme (racloir)
- 1 Falcon de 15mL
- 4 Falcon de 45mL
- Cellule de Fuchs Rosenthal
- 20 feuilles de pomme de terre (variété sensible)
- Javel 1%
- Papier absorbant
- 20 papiers filtres stériles (90 mm Ø)
- 20 boîtes de Petri stériles (90 mm Ø)
- Ouate stérile
- Pipette + tips
- Pipette + poire
- Parafilm

Matériel frais

- 5 boîtes de Petri contenant *P. infestans* incubé 21 jours à 18°C en obscurité complète sur milieu seigle-agar

Procédure

Récupération des sporanges :

- 1) À la flamme, placer 7mL de la solution d'eau + Tween 20 dans une première boîte de culture et racler son contenu.
- 2) Transvaser le contenu dans une seconde boîte.
- 3) Racler son contenu et traiter les boîtes restantes de la même manière.
- 4) Récupérer la solution dans un Falcon 15mL.

Comptage des sporanges :

- 5) Compter les sporanges à l'aide de la cellule de Fuchs-Rosenthal (voir annexe 6).
- 6) Ajuster la solution à 50 000 sporanges/mL et compter à nouveau afin de vérifier cette concentration.
- 7) Placer la solution 2h à 4°C afin de libérer les zoospores.

Inoculation des feuilles détachées (sous flux) :

- 8) Désinfecter 20 feuilles de pomme de terre à l'eau de Javel 1% durant 30 secondes et les rincer 3 fois dans de l'eau stérile. Les sécher à l'aide d'un papier absorbant.
- 9) Insérer le pédoncule des feuilles dans une boule d'ouate stérile. Placer l'ensemble dans une boîte de Petri stérile contenant un papier filtre stérile, face inférieure de la feuille vers le haut.
- 10) Imbiber l'ouate d'eau stérile à l'aide d'une pipette (7mL). Le papier filtre est imbibé par le surplus d'eau.
- 11) Inoculer les feuilles par 5 gouttes de 50 μ l de la solution de sporanges.
- 12) Sceller et stocker les boîtes à 17°C en présence de lumière pour une durée de 10 jours.

Récolte des sporanges restaurés en pathogénicité :

- 13) À la flamme, récupérer 5 feuilles infectées et les placer dans un Falcon de 45ml contenant 25 mL d'eau + Tween 20, répéter cette opération pour les feuilles restantes.
- 14) Vortexer le Falcon (30 secondes).
- 15) Retirer les feuilles de la solution pour ne conserver que la solution de sporanges.

Mesure de la concentration en sporanges de la solution :

- 16) Compter les sporanges au moyen de la cellule de Fuchs Rosenthal selon la méthodologie habituelle.
- 17) La solution est ajustée à la concentration en sporanges désirée et cette concentration est vérifiée par deux nouveaux comptages.

Annexe 8 - Étude de la variation des symptômes provoqués par *P. infestans* selon la méthode d'inoculation et la concentration en inoculum (Lore-Anne Bastin et Marie Goormans)

Objectifs : Déterminer une méthode d'inoculation permettant de quantifier le nombre de sporanges inoculés sur un plant de pomme de terre. Tester différentes concentrations en inoculum et comparer l'évolution des symptômes.

Appareillage

- Microscope à contraste de phases
- Humidificateurs (2)

Matériel de laboratoire

- 150mL d'une solution stérile d'eau + Tween 20 (0,1%)
- Gélatine en poudre
- Disques de cellophane 5mm Ø (réalisés à l'aide d'une perforatrice)
- Pipette + tips
- 3 récipients spray
- 4 Falcon de 45mL
- 6 Falcon de 15mL

Matériel en serre

- Tuteurs de 50cm de hauteur
- 6 pots remplis de sable humide
- Bâche translucide
- Ruban adhésif

Matériel frais

- 12 plants de Bintje
- 20 feuilles de Bintje issues d'une restauration de pathogénicité d'une culture de *P. infestans* (13_A2)

Procédure

Récolte des sporanges restaurés en pathogénicité :

- 1) À la flamme, récupérer 5 feuilles infectées et les placer dans un Falcon de 45ml contenant 25 mL d'eau + Tween 20, répéter cette opération pour les feuilles restantes.
- 2) Vortexer le Falcon (30 secondes).
- 3) Retirer les feuilles et conserver la solution de sporanges (elles sont au nombre de 4).

Mesure de la concentration en sporanges de la solution :

- 4) Compter les sporanges au moyen de la cellule de Fuchs Rosenthal selon la méthodologie habituelle.
- 5) Répartir les solutions dans les Falcon de 15 mL et les récipients spray selon le schéma suivant :

Volume	Contenant	Composants	Concentrations (sporanges/mL)
±600µl	Falcon 15mL	Eau et Tween 20, sporanges	2000
			10 000
			50 000
±600µl	Falcon 15mL	Eau et Tween 20, sporanges + 5% gélatine en poudre	2000
			10 000
			50 000
±3mL	Pulvérisateur (spray 1mL)	Eau et Tween 20, sporanges	2000
			10 000
			50 000

6) Chaque solution subit deux comptages successifs afin de vérifier leur concentration.

7) Incuber les solutions 2h à 4°C.

Construction de la mini serre (phase 1) :

8) Désinfecter tout le matériel nécessaire à la construction de la mini serre, ainsi que la table, à l'aide de Javel 1%.

9) Planter les tuteurs dans 6 pots contenant du sable humide.

10) Placer un humidificateur à chaque extrémité de la table.

Inoculation des plants de pomme de terre :

11) Placer les plants sur la table de la serre G2Q.

12) Les plants sont inoculés selon le dispositif expérimental suivant :

Une pastille = 3 feuilles sélectionnées sur un plant.

	Goutte + cellophane	Goutte + gélatine 5%	Spray
2 000 sporanges/mL	●	●	●
10 000 sporanges/mL	●	●	●
50 000 sporanges/mL	●	●	●
Témoins	●	●	●

a. Goutte + cellophane : Vortexer la solution et à l'aide d'une pipette + tips, déposer une goutte de 50µl sur chaque feuille. Déposer un disque de cellophane sur chaque goutte.

b. Goutte + gélatine : Vortexer la solution et à l'aide d'une pipette + tips, déposer une goutte de 50µl sur chaque feuille.

c. Spray : Après avoir secoué le récipient, pulvériser 1ml de solution sur la face supérieure de la feuille.

Les témoins sont traités avec la solution d'eau + Tween 20 selon les mêmes techniques.

Construction de la mini serre (phase 2) :

13) Déposer la bâche sur les tuteurs et sceller la serre à l'aide de scotch.

14) Allumer les humidificateurs et incuber les plants pour une durée de 12 heures.

15) Démonter la serre.

Annexe 9 - Étude de l'évolution de la quantité de sporanges de *P. infestans* sur milieu seigle selon la concentration en sucrose (Marie Goormans)

Objectif : Comparer le taux et la vitesse de sporulation de la souche 13_A2 en fonction de la concentration en sucrose du milieu seigle de croissance pour vérifier s'il est possible d'obtenir une sporulation suffisante (> 50 000 sporanges/mL) plus rapidement que 21 jours.

Appareillage

- Microscope à contraste de phases
- Incubateur 18°C

Matériel de laboratoire

- 25 boîtes de pétri (90mm Ø) contenant du milieu seigle sucrose 0.1%
- 25 boîtes de pétri (90mm Ø) contenant du milieu seigle sucrose 2%
- Pipette + tips
- Tige de verre courbée à la flamme (racloir)
- 8 Falcon de 15mL stériles
- Cellule de Fuchs Rosenthal
- Solution d'eau + Tween 20 (100mL)

Matériel frais

- 2 cultures sur seigle de la souche 13_A2 âgées de 21 jours.

Procédure

1) Repiquage :

À la flamme, à l'aide d'un emporte-pièce stérilisé, découper 50 plugs dans les boîtes-mères de la souche 13_A2. Déposer un plug au centre des 25 boîtes seigle 0.1% sucrose et des 25 seigle 2%. Sucrose. Sceller les boîtes et les incuber à 18°C. 10 boîtes serviront de réserve.

2) Mise en solution :

Après 7 jours, prélever 5 boîtes par type de milieu seigle. À la flamme, déposer 7mL d'eau + Tween 20 dans une première boîte et racler son contenu. Transvaser ce contenu dans une seconde boîte à l'aide d'une pipette et racler son contenu de la même manière. Faire de même pour les 3 autres boîtes et pour les boîtes contenant l'autre type de milieu seigle. Récupérer les solutions dans deux Falcon de 15mL.

3) Le comptage :

Les sporanges contenus dans les solutions sont comptés à l'aide d'une cellule de Fuchs Rosenthal au microscope à contraste de phase (annexe 6).

4) Les deuxième et troisième étapes sont répétées aux jours 14, 21 et 28.

Annexe 10 - Étude sur feuilles détachées du potentiel infectieux de *P. infestans* selon le type d'inoculum et le milieu de croissance.

10.1. Protocole

Objectif : Comparer le potentiel infectieux de zoosporanges et de zoospores, ainsi que vérifier si la concentration en sucrose du milieu de croissance influence ce potentiel infectieux.

Appareillage

- Microscope à contraste de phase
- Chambre d'incubation lumineuse 17°C
- Chambre d'incubation lumineuse 22°C

Matériel de laboratoire

- 15 boîtes de pétri (90mm Ø) stériles
- 15 papiers filtres stériles
- Ouate stérile
- 2 Falcon 45mL
- 4 Falcon 15mL
- Cellule de Fuchs Rosenthal
- 250mL eau stérile
- 150mL d'une solution stérile d'eau + Tween 20 (0,1%)
- Pipette + tips

Matériel frais

- 5 feuilles issues d'une restauration de pathogénicité d'une culture de *P.infestans* (13_A2) ayant poussé sur milieu seigle 0,1% sucrose.
- 5 feuilles issues d'une restauration de pathogénicité d'une culture de *P.infestans* (13_A2) ayant poussé sur milieu seigle 2% sucrose.
- 15 feuilles de pomme de terre (Bintje)

Procédure

Récupération des sporanges restaurés en pathogénicité :

- 1) À la flamme, récupérer 5 feuilles infectées et les placer dans un Falcon de 45ml contenant 25 ml d'eau + Tween 20, répéter cette opération pour les feuilles restantes.
- 2) Vortexer le Falcon (30 secondes).
- 3) Retirer les feuilles, 2 solutions de 25ml sont donc obtenues.

Préparation des solutions d'inoculum :

- 4) Ajuster la concentration des solutions à 50 000 sporanges/mL.
- 5) Répartir les solutions dans 4 Falcon de 15mL selon le schéma suivant :

Concentration en sucrose du milieu de culture « mère »	Incubation	Type d'inoculum	N° de traitement
0,1%	Non	Sporanges	1
	2 heures à 4°C	Zoospores	2
2%	Non	Sporanges	3
	2 heures à 4°C	Zoospores	4

Inoculation des feuilles de pomme de terre (sous flux) :

- 6) Désinfecter 15 feuilles de pomme de terre à l'eau de Javel 1% durant 30 secondes et les rincer 3 fois dans de l'eau stérile. Les sécher à l'aide d'un papier absorbant.
- 7) Insérer le pédoncule des feuilles dans une boule d'ouate stérile. Placer l'ensemble dans une boîte de Petri stérile contenant un papier filtre stérile, face inférieure de la feuille vers le haut.
- 8) Imbiber l'ouate d'eau stérile à l'aide d'une pipette (7mL). Le papier filtre est imbibé par le surplus d'eau.
- 9) Inoculer chacun des traitements sur 3 feuilles (1 goutte de 50µl par feuille).
- 10) Traiter les 3 feuilles restantes avec 1 goutte (50µl) d'eau + Tween 20 (témoins).
- 11) Sceller et stocker les boîtes à 22°C en présence de lumière.

Cotations:

- 12) Prendre des images de chacune des boîtes journalièrement.
- 13) Analyser les images avec ImageJ et le code situé en annexe 10.2.

10.2. Macro ImageJ (Simon Caulier)

```
name = getTitle();
selectWindow(name);
    run("Duplicate...", "title=step1");
run("Duplicate...", "title=step2");
selectWindow("step1");
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");
min[0]=30;
max[0]=255;
filter[0]="pass";
min[1]=102;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=83;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0", "1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0", "2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");

close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename("step1 (green)");
    run("Make Binary");

run("Remove Outliers...", "radius=3 threshold=50
which=Dark");
selectWindow("step1 (green)");

selectWindow("step2");
run("Split Channels");
selectWindow("step2 (red)");
    run("Close");
selectWindow("step2 (green)");
    run("Close");
selectWindow("step2 (blue)");
    run("8-bit");

setAutoThreshold("Default");
setThreshold(0, 92);
run("Remove Outliers...", "radius=10 threshold=50
which=Dark");
    run("Make Binary");

makeOval(0, -4, 1274, 1292);
run("Set Measurements...", " mean min
redirect=None decimal=3");
run("Measure");

run("ROI Manager...");
imageCalculator("Subtract create", "step2
(blue)", "step1 (green)");

selectWindow("Result of step2 (blue)");
makeOval(0, -4, 1274, 1292);
run("Set Measurements...", " mean min
redirect=None decimal=3");
run("Measure")
```

10.3. Résultats complets et écarts-types

Sucrose 0,1% - Zoospores				Sucrose 2% - Zoospores			
Jours	% mildiou	Moyennes	Écarts-type	Jours	% mildiou	Moyennes	Écarts-type
0	2,622	2,436	1,760	0	1,095	3,516	4,987
	4,096				9,251		
	0,590				0,202		
1	8,474	4,719	3,631	1	0,644	0,846	0,268
	1,227				0,743		
	4,457				1,150		
2	4,813	7,329	7,573	2	37,482	14,006	20,339
	15,840				1,694		
	1,335				2,841		
3	41,003	19,102	19,384	3	2,930	18,978	14,014
	12,158				25,201		
	4,147				28,802		
4	27,441	31,720	19,946	4	14,090	30,922	18,709
	53,458				51,065		
	14,261				27,610		
5	27,274	38,236	10,531	5	4,501	47,104	41,254
	48,276				49,950		
	39,157				86,862		
6	14,521	56,984	37,913	6	7,473	62,951	48,454
	68,994				84,413		
	87,436				96,967		
Sucrose 0,1% - sporanges				Sucrose 2% - sporanges			
Jours	% mildiou	Moyennes	Écarts-type	Jours	% mildiou	Moyennes	Écarts-type
0	3,556	6,259	6,273	0	1,098	0,772	0,292
	13,430				0,538		
	1,790				0,679		
1	0,697	6,088	7,952	1	1,211	1,289	0,584
	15,221				0,749		
	2,346				1,908		
2	0,235	16,494	26,950	2	0,206	2,218	3,321
	47,602				0,396		
	1,644				6,051		
3	5,873	13,173	15,670	3	1,546	6,759	6,478
	31,162				4,720		
	2,485				14,011		
4	93,416	61,402	31,779	4	37,967	28,061	14,676
	60,928				11,201		
	29,863				35,016		
5	49,141	40,818	7,560	5	45,175	42,001	35,414
	38,936				5,107		
	34,377				75,722		
6	94,851	83,103	24,576	6	87,092	75,049	29,217
	99,600				41,735		
	54,858				96,318		