

ESSAI DE STANDARDISATION DES TECHNIQUES D'INOCULATION DU TOURNE-SOL AVEC L'ALTERNARIA HELIANTHI

C. LAMARQUE* et J. K. KOCHMAN, DPI, Plant Pathology Branch, TOOWOOMBA, 4350 Qld, AUSTRALIA

* adresse actuelle : INRA, Pathologie Végétale, 78000 VERSAILLES, FRANCE.

RESUME

Actuellement aucune variété commerciale ne présente de réelle résistance à l'Alternaria helianthi (Hansf.) Tubaki et Nishihara. Cependant des travaux préliminaires (Kochman, 1983) ont montré qu'à l'intérieur du genre Helianthus, plusieurs espèces présentent un certain niveau de résistance par rapport au matériel sensible. Ce type de résistance quantitative requiert des techniques standardisées et quantitatives afin de rechercher des sources de résistance dans le matériel disponible et de tester la descendance obtenue dans un programme de sélection.

Les effets de différents isolats du champignon cultivés sur différents milieux de culture utilisés pour la production de l'inoculum, l'âge des spores utilisées et la comparaison de deux méthodes d'inoculation sont étudiés ici sur le taux de contamination de jeunes plantes de trois variétés différentes.

L'âge des spores apparaît comme le facteur le plus important, pour assurer une bonne contamination des plantes.

Les deux méthodes d'inoculation permettent des taux équivalents de maladie, la méthode des pastilles préinoculées autorise en outre une étude ultérieure de la vitesse de pénétration propre à chaque cultivar.

Il apparaît d'autre part, absolument nécessaire d'utiliser une chambre humide pour obtenir rapidement des lésions.

INTRODUCTION

L'inoculation de jeunes plantes, constitue le meilleur moyen de tester les variétés de Tournesol vis à vis de l'Alternaria helianthi (Hansf.) Tubaki et Nishihara à condition de disposer de tests donnant des résultats réguliers et fidèles d'infection.

Al'issue d'une expérimentation importante (20 essais) tendant à réduire les différentes sources de variabilité de l'infection, les auteurs proposent ici les meilleures méthodes d'inoculation du matériel végétal par l'A. helianthi adaptées aux différents besoins du test.

MATERIEL ET METHODES

1. Le matériel végétal

3 cultivars couramment commercialisés en Australie ont été utilisés dans l'ensemble de l'expérimentation : Hysun 33 ; Sunking et Sunfola.

Les plantes sont inoculées au stade V2 -V6 (comme décrits par Sneider et Miller en 1981).

2. Le champignon

Différents isolats sont récoltés en mai 1986, le long de la côte du

Capricorne (Queensland, Australie), dans différentes localités sur des espèces sauvages d'Helianthus annuus et H. argophyllus. Tous les isolats sont identifiés comme étant de l'A. helianthi (Hansf.) Tub. et Nish. (Simmons, 1986).

3. Préparation de l'inoculum

85 isolats ou cultures monospores sont élevés sur différents milieux artificiels : PDA ; PDA + extrait de semences de Tournesol ; papier-filtre imbibé d'extrait de semences.

Chacun de ces milieux est ensemencé avec une suspension aqueuse de conidies (environ 1000 spores/ml) afin d'obtenir une sporulation importante sur toute la surface des boîtes de Pétri ensemencées. Les conidies sont récoltées pour la préparation de l'inoculum en raclant la surface des boîtes de Pétri avec un scalpel. Les fragments de mycélium sont éliminés de la dilution par tamisage approprié.

Différentes concentrations de conidies ont été comparées pour l'infection. (de 8000 spores/ml à 100 spores/ml). L'effet de l'âge de l'inoculum a également été testé sur la réussite des contaminations. (5 à 45 jours)

4. Les méthodes d'inoculation

Deux méthodes d'application de l'inoculum furent testées :

- a) dépôt de microgouttes sur les feuilles et étalement au pinceau pour répartir l'inoculum sur l'intégralité du limbe.
 - b) dépôt des microgouttes sur des pastilles de papier filtre en boîte de Pétri moins d'une heure avant leur dépôt sur les feuilles.
- Dans tous les cas le dépôt est de 50 μ l et les plantes sont inoculées sur la première paire de vraies feuilles après dépôt d'un film d'eau par pulvérisation.

5. Les facteurs de l'environnement

Les plantes inoculées sont laissées en incubation pendant 24, 48 ou 72 heures après inoculation dans une chambre climatique à 26°C pendant 12 heures de "jour" (avec lumière) et à 15°C pendant 12 heures de "nuit" (obscurité).

Afin de prévenir le séchage de l'inoculum et de conserver un film d'eau sur la surface de l'hôte une chambre humide en polystyrène est retournée sur l'ensemble des plantes inoculées à l'intérieur de la chambre climatique.

La comparaison entre une hygrométrie permanente à saturation et des séquences de séchage de 24 ou 48 heures entre des séquences de réhumectation est également étudiée.

6. Lecture des résultats

Afin de vérifier la viabilité de l'inoculum et son efficacité, les taux de germination sont relevés dans les 24 heures qui suivent l'inoculation.

Le nombre de lésions obtenu est lu 24, 48 et 72 heures après l'inoculation.

Dans quelques cas, leur taille (diamètre) est mesurée plusieurs jours après l'inoculation.

La surface théorique nécrosée est calculée en considérant que les lésions sont régulièrement circulaires. Les taux d'infection sont calculés pour chaque condition.

RESULTATS

1. Production d'inoculum

Les inoculations réalisées avec de l'inoculum élevé sur PDA donnent significativement (**) de meilleurs résultats que celles réalisées avec un inoculum obtenu sur PDA enrichi en extrait de semences.

Le taux de germination est plus bas pour les spores issues de cultures enrichies en extrait de semences et il décroît très rapidement avec l'âge de la culture. Cependant lorsque les pénétrations surviennent, la taille des lésions n'est pas affectée par l'origine des conidies.

2. Concentration de l'inoculum

L'inoculation directe de microgouttes sur feuille d'un inoculum âgé de 12 jours montre quelque soit la variété, une faible concentration (200 spores/ml ou 10 spores par feuille) donne le meilleur résultat.

Tableau I : Pourcentages d'infection obtenus avec différentes concentrations de spores sur différentes variétés.

	100 spores/ml	200 spores/ml	1000 spores/ml	2000 sp
SUNKING	50	93	32,2	42,2
HYSUN 33	44	81	22,6	36,9
SUNFOLA	52	100	25,4	39,9

Avec l'inoculation par pastilles pré-inoculées, on a pu obtenir une bonne infection avec la plus basse concentration sur Hysun 33.

3. Age de l'inoculum

Les spores récoltées sur une culture de 5 jours sont suffisamment âgées pour initier une infection.

Tant que les conidies restent blanches à jaune clair, elles conservent un bon taux d'infection.

Quand elles commencent à devenir brunes à noires et que les granulations apparaissent dans le cytoplasme de leurs cellules, leur taux d'infection diminue.

Tableau II : Effet de l'âge de l'inoculum sur le nombre de lésions obtenues après 66 heures d'humectation à 26°C.

Age (en jours)	nbre total lésions	taux de réussite
7	194	48,5
9	196	49
11	96	24
14	45	11,25
16	40	10
18	16	4
21	15	3,75
23	18	4,5
25	13	3,25

10 plantes inoculées sur 2 feuilles avec 20 spores/feuille.

4. Méthodes d'inoculation

Tableau III : Comparaison des deux méthodes sur deux variétés pour 50 plantes

	<u>pastilles pré-inoculées</u>		<u>Inoculation directe</u>	
	nbre moyen lésions / F	taux de contamination	nbre moyen lésions/F	taux de contamination
HYSUN 33	11,52	57,60	7,14	35,70
SNKING	11,76	58,80	7,70	38,50

Les deux méthodes donnent des résultats quantitatifs équivalents. Le nombre de lésions est également équivalent quelque soit le niveau d'inoculation (1ère paire de feuilles ; 3ème et 4ème feuilles ou 5ème et 6ème feuilles) quelque soit la variété dans le cas de jeunes feuilles récemment apparues. Des feuilles plus âgées deviennent plus sensibles à la fois à la pénétration et à la colonisation (post-pénétration) et quelques différences peuvent apparaître dans les variétés à ce niveau.

5. Les conditions climatiques

Il est apparu que 96 heures d'humectation des plantes réparties en 2 ou 4 périodes séparées par des périodes de ressuyage ont permis l'apparition d'un même nombre de lésions et une même extension de ces symptômes.

Une température de nuit de 15°C n'a pas affecté le processus infectieux.

6. Comparaison des isolats

Des résultats réguliers et fidèles ont été obtenus à partir de différents isolats de cultures monospores. Parmi ces cultures, plusieurs sont apparues plus efficaces bien qu'aucun caractère morphologique ou physiologique ne les distingue des autres isolats.

DISCUSSION

1. Préparation de l'inoculum

Il semble que les cultures monospores obtenues par étalement d'une dilution de spores sur PDA non enrichi produise l'inoculum le plus efficace.

L'âge des spores apparaît comme le facteur le plus important pour assurer une bonne infection. Théoriquement, des spores de 5 jours sont suffisamment âgées pour être infectieuses cependant beaucoup de spores encore immatures à cet âge tandis qu'une culture de 7 à 9 jours, plus foncée donne un meilleur taux d'infection. Cependant, ce taux excède rarement 50 p.cent. Lorsque l'on considère que les conidies germent en donnant plusieurs t.g., seulement une petite partie d'entre eux arrive à pénétrer. Ce taux de réussite est encore abaissé par de fortes concentrations de spores. Par la méthode de l'étalement au pipette, 200 spores/ml ou 10 spores / feuille ont donné les meilleurs résultats. Cette concentration, la solution doit être très homogène pour être très régulière dans chaque gouttelette d'inoculum. A des concentrations plus élevées, il y a moins de risque de perte d'inoculum lorsqu'il est déposé sur les pastilles.

2. Méthode d'inoculation

Les jeunes plantes de 3 à 5 semaines peuvent être inoculées avec la solution de conidies ou avec des pastilles sur leurs dernières feuilles formées.

Avec la méthode du dépôt-étalement, un certain nombre de spores peut être perdu ou retenu dans les poils du pinceau mais si le nombre de plantes inoculées est convenable, il n'y a pas de problème.

La méthode des pastilles pré-inoculées utilisée avec un nombre limité de spores (par exemple 10 par pastille) permet de suivre ultérieurement le développement et le détail de l'infection au microscope. Cette technique permet d'étudier la vitesse de pénétration et les facteurs qui pourraient varier d'un cultivar à un autre.

3. Conditions d'incubation

Le temps d'humectation des plantes semble le facteur le plus important pour obtenir des lésions très rapidement. Les premières lésions peuvent apparaître dans les premières 48 heures si la période de rosée commence avec l'inoculation et que la température se situe vers 26°C. Cependant une température plus basse pendant la nuit peut produire des symptômes au 5^e jour si la période de rosée a duré jusqu'à 72 heures.

CONCLUSIONS

Afin de comparer des variétés de tournesol vis-à-vis de l'Alternaria helianthi, un éventail d'isolats monospores peut être préparé. Les cultivars ou les lignées peuvent être comparées à un stade très jeune même sans épidémie. Deux méthodes sont disponibles: par dépôt direct et étalement d'une suspension ou par dépôt de pastilles pré-inoculées. Par cette dernière voie, quantitativement plus sûre, une comparaison des taux de germination et de pénétration ainsi que l'apparence des symptômes (avec ou sans halo) peut être menée entre les différents matériels végétaux.

Il est absolument nécessaire d'utiliser une chambre humide ou tout autre technique apte à maintenir un film d'eau pendant au moins 48 heures sur les plantes.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier J.L. Alcorn qui nous a permis d'identifier tous les isolats du champignon comme appartenant à l'espèce A. helianthi.

REFERENCES

- Allen J. A., 1981, Alternaria blight of Sunflower in Australia. PhD University of New England
 Islam, U. and Maric, A., 1978, Alternaria helianthi (Hansf.) Tub. and Nish. on sunflower and in Yugoslavia and some characteristics of the fungus. Zastita Bilja, 29 (3), N° 145 : 219-236.