

TECHNIQUES D'INOCULATION DU COLZA PAR

Sclerotinia sclerotiorum

H. BRUN * - J.G. PIERRE ** - M. RENARD ***

* Station de Pathologie Végétale - INRA - LE RHEU

** St Pathus - CETIOM - PARIS - 75016

*** Station d'Amélioration des Plantes INRA - LE RHEU

I - INTRODUCTION

Plusieurs années d'expérimentation menées en plein champ ont montré que la sélection du colza pour la résistance à *Sclerotinia sclerotiorum* est difficile voire impossible dans les conditions de contamination naturelle. Cette méthode met en évidence des résistances "apparentes" qui ne se répètent pas d'une année à l'autre (BRUN, RENARD, travaux non publiés). La contamination massive du colza par les ascospores se réalise à la floraison, par l'intermédiaire des pétales sénescents. Chez le colza la précocité de floraison présente une variabilité importante, qui permet à certains génotypes d'échapper à la maladie. D'autre part, les attaques de *Sclerotinia sclerotiorum* ne se produisent pas chaque année, notamment à cause de la nécessité de conditions climatiques particulières pour la contamination par les ascospores.

Pour éviter ces inconvénients, la mise au point d'une technique d'inoculation fiable et répétable est indispensable.

Après avoir maîtrisé la production de l'inoculum, d'autres facteurs restent à préciser tels que le support de l'infection (état des pétales), le stade de l'infection et la dose de spores afin de réussir les inoculations.

II - PRODUCTION DE L'INOCULUM

1 : Production et induction des sclérotés

Ceux-ci sont prélevés sur des tournesols cultivés à St Pathus (77), ayant fait l'objet d'une inoculation artificielle préalable, ou de culture sur milieu pomme de terre (LAMARQUE, 1975). Leur induction à la carpogénèse s'effectue dans de petits récipients au fond grillagé appelés "tamis", de 3 cm environ de profondeur, remplis de sol de Saint-Pathus (limono (75 %), argilo-sableux). Les tamis rassemblés dans des bacs plastiques assurant une bonne percolation sont placés au champ de fin octobre à fin février, de telle sorte qu'ils affleurent la surface du sol.

.../...

Cette technique des tamis comporte plusieurs avantages :

- les sclérotés restent constamment en contact direct avec leur milieu naturel. Les conditions dans lesquelles ils sont placés peuvent être facilement contrôlées. Ils sont aisément manipulables.

- après induction de la carpogénèse, on peut soit les mettre en conditions contrôlées pour obtenir rapidement des ascospores destinés aux contaminations artificielles, soit les déposer dans les cultures, sous le couvert végétal, pour s'efforcer d'obtenir des contaminations semi-naturelles.

2 : Les apothécies

Après cette phase d'induction, les bacs sont entreposés en plusieurs séries échelonnées dans le temps, à des températures de l'ordre de 18°C le jour et 12°C la nuit. Le sol des bacs est maintenu constamment humide.

Les apothécies sont recouvertes d'un couvercle plastique dès leur apparition et subissent entre 8 et 18 heures une luminosité de 2000 - 2500 lux grâce à l'éclairage d'une lampe (MAZDA 500).

3 : Les spores

Le nuage de spores libéré par les apothécies lors de la levée du couvercle est récupéré sur un filtre millipore (1,2 μ) par aspiration. Les ascospores sont immédiatement placées dans un tube plastique fermé à l'aide d'un bouchon déséchant et conservées au réfrigérateur à 4°C (STEADMAN, 1974 ; HUNTER *and al*, 1982).

4 : Suspension de spores

Le lavage des filtres à l'eau stérile permet la préparation des suspensions d'ascospores dont on peut titrer la concentration à l'hématimètre. A chaque inoculation on s'assure de la viabilité des spores par un test de germination sur milieu PDA à 20°C.

III - CONDITIONS D'INOCULATION

Pour les conditions de milieu, en l'absence d'indications suffisantes dans le cas de *S. sclerotiorum* sur colza, les résultats obtenus avec ce parasite sur d'autres plantes notamment en ce qui concerne l'eau libre (ABAWI, 1975, LAMARQUE 1978) nous ont servi de base.

1 : Nécessité d'un support nutritif et état physiologique du pétale pour la réalisation de l'infection.

Pour un certain nombre d'espèces végétales, la contamination par les ascospores nécessite la présence d'une source nutritive facilement utilisable (Mc LEAN, 1958 ; PURDY, 1953). L'observation de la maladie sur colza montre que ce sont souvent les pétales morts adhérents sur les feuilles qui permettent l'installation de la maladie.

Nous avons donc comparé le taux de réussite des infections en fonction de l'état des pétales, sur des feuilles de colza maintenues en survie en chambre humide.

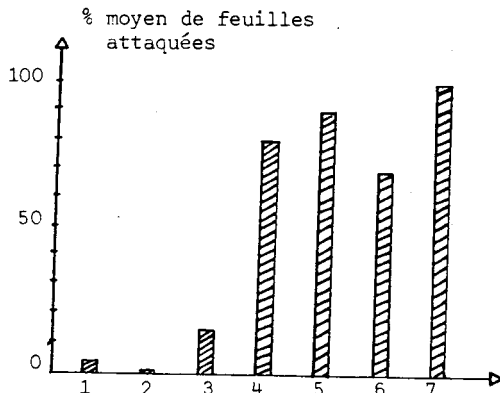
.../...

11. Technique

25 feuilles de la variété BRUTOR (stade végétatif G3 - G4) sont réparties en 5 répétitions, disposées sur 2 feuilles de papier filtre imbibées de 15 ml d'eau, dans des boîtes de Petri de 14 cm de diamètre. Les feuilles sont inoculées sur différents supports (Fig. 1) à l'aide d'une goutte (0,02 ml) d'une suspension ajustée à 1.10^7 ascospores par ml, et incubées à 20°C.

- 1 = eau
- 2 = Czapeck non saccharosé
- 3 = pétale frais
- 4 = pétale frais au four
- 5 = pétale sec (au labo)
- 6 = pétale sec au four
- 7 = explantat mycélien

Fig. 1 : Importance du support nutritif et de l'état des pétales dans la réussite des contaminations du Colza par les ascospores de *S. sclerotiorum* à 20°C.



(notation 5 jours après inoculations).

12. Résultats

Les ascospores dans l'eau (1) ou dans une solution minérale (2) (Czapeck non saccharosé) occasionnent très peu de symptômes. De même, des pétales prélevés sur la plante juste avant l'inoculation (3) sont difficilement colonisés par les ascospores. Par contre des pétales morts (4-5-6) (séchés naturellement ou prélevés frais et passés 1 h à 100°C) permettent d'obtenir un fort taux de maladie, très voisin de celui obtenu avec les explantats mycéliens.

2 : Importance du stade de l'inoculation

Dans la nature, les attaques massives de *S. sclerotiorum* ne surviennent qu'au cours du stade floraison. Afin de préciser si les infections sont dues principalement à la présence des pétales sur les feuilles et/ou à une réceptivité plus grande de ce stade, nous avons effectué des inoculations à différents stades.

21. Technique

En réalisant des semis échelonnés et en modulant les durées de vernalisation, des plants de colza cultivés en pots ont pu être inoculés simultanément à des stades très différents : jeunes plants (B_2), rosette (B_8), montaison (D_2) et floraison (G_1-G_2). 20 plants par stade disposés en 4 répétitions sont inoculés à l'aide d'un explantat mycélien de 5 mm de diamètre, déposé à l'aisselle d'une feuille, recouvert d'un coton humide et entouré d'une feuille d'aluminium.

22. Résultats

Les notations ont porté sur le pourcentage de plantes malades et, au stade 3 et 4 sur la taille de la nécrose (fig. 2).
.../...

- 1 = jeune plant
2 = Rosette
3 = Montaison
4 = Floraison

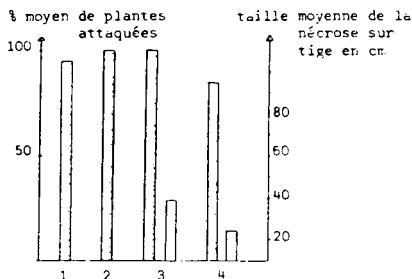


Fig. 2 : Importance du stade physiologique sur la sensibilité du Colza à la contamination par les ascospores de *S. sclerotiorum*.

Quel que soit le stade végétatif au moment de l'inoculation, les colza présentent toujours une grande sensibilité aux contaminations par *S. sclerotiorum*, à condition que le taux d'humidité soit suffisant et qu'une source nutritive soit disponible pour le parasite.

3 : Doses de spores et expression des symptômes

Deux années d'expérimentation conduites en plein champ ont permis de préciser les doses de spores à utiliser pour l'obtention d'un niveau de maladie suffisamment élevé.

La variété BRUTOR est inoculée au stade G₃ par la technique d'inoculation ponctuelle. L'essai est réalisé selon le dispositif bloc de Fischer en 4 répétitions de 30 plantes.

TABLEAU 1 INFLUENCE DE LA DOSE DE SPORES SUR L'IMPORTANCE DES ATTAQUES DE *S. SCLEROTIORUM*.

Concentration en spores/ml	0	1.10 ²	5.10 ²	1.10 ³	1.10 ⁴	5.10 ⁴	1.10 ⁵	1.10 ⁶	ppds 0,05
% plantes attaquées	7,1	17,2	24,2	25,4	43	45	52,6	55	12,11
taille moyenne de la nécrose sur tige, en cm	0,17	11	15,1	14,6	26,7	31,3	41,1	40,4	4,18

4 : Techniques d'inoculation

4.1. Description de la technique d'inoculation ponctuelle

Au stade floraison, les plants de colza sont inoculés à mi-hauteur de la plante, à l'aisselle d'une feuille sessile à l'aide d'une pastille de papier filtre imbibée d'une suspension d'ascospores titrant 1.10⁵ spores par ml, insérée entre 2 pétales de colza préalablement desséchés au laboratoire. Un coton légèrement humidifié recouvre le tout. La feuille de colza inoculée et la portion de tige concernée sont enveloppées (sans occasionner de blessure) le plus hermétiquement possible dans une feuille d'aluminium ménager.

En défaisant l'emballage aluminium, on peut suivre l'évolution des

symptômes de la feuille vers la tige. Les notations portent sur le pourcentage de plantes attaquées et la mesure du symptôme sur tige.

Cette technique est très simple et donne de bons résultats, cependant, elle présente l'inconvénient d'être assez longue à réaliser.

42. Inoculation par pulvérisation d'ascospores sur la plante entière

Afin de tenter de réduire au maximum le temps imputable aux manipulations et de se rapprocher le plus possible des contaminations naturelles, des inoculations par pulvérisation d'ascospores ont été comparées.

411. Technique

Des pieds de colza de la variété "Jet neuf", cultivés au champ, sont repiqués en février à raison de 2 plantes par pot.

Au stade G1 (début de la chute des pétales), ils sont inoculés de différentes façons à raison de 10 plantes par type d'inoculation, disposés en 5 répétitions selon le système blocs de Fisher.

Les types d'inoculation sont les suivants :

- 1/ Suspension d'ascospores après dépôt de pétales sur la plante.
- 2/ Adjonction de 5 % de saccharose à la suspension.
- 3/ Adjonction d'un broyat de pétales desséchés à la suspension d'ascospores.
- 4/ Explantat recouvert d'un coton humide disposé à l'aisselle d'une feuille.
- 5/ Pétales desséchés préinoculés (2 jours) disposés à l'aisselle d'une feuille.
- 6/ Pulvérisation d'eau stérile et encapuchonnage
- 7/ Encapuchonnage
- 8/ Non encapuchonné. Témoins

La suspension d'ascospores titre 3.10^5 spores par ml. L'encapuchonnage dure 90 heures.

412. Résultats

Dans les conditions climatiques de l'essai (fig.3), 90 heures après la contamination par pulvérisation d'ascospores, on observe la présence d'une tache de 1 à 2 cm de diamètre sous tous les pétales tombés sur les feuilles.

L'évolution du taux d'attaque (fig. 3) est exprimée par le nombre de plantes présentant des symptômes sur hampe primaire :

a) L'évolution des taux d'attaque est plus lente que prévue. Deux facteurs y concourent :

- le critère retenu est l'attaque nette de la tige : le symptôme est plus long à obtenir que l'attaque sur feuille dont elle découle.

- le climat de la serre, relativement sec, notamment immédiatement après le retrait des capuchons de plastique, ne correspond pas à celui du couvert végétal de la culture. L'évolution de l'attaque, depuis la feuille jusqu'à la tige n'en est pas favorisée.

b) Les techniques utilisant les pétales préinoculés ou non, et celle comprenant une adjonction de saccharose donnent des résultats à peu près similaires.

Quoique la technique de l'explantat mycélien aboutisse à un taux d'attaque élevé, nous retiendrons celle de la pulvérisation de la suspension après dé-

.../...

pôt des pétales sur la plante. En effet, cette technique semble mieux "simuler" le processus tel qu'il se déroule probablement au champ.

- 1/ Ascospores + pétales desséchés
- 2/ " + 5 % saccharose
- 3/ " + broyat pétales
- 4/ Explantat + coton humide
- 5/ Pétales pré-inoculés
- 6/ Eau stérile + encapuchonnage
- 7/ Encapuchonnage seul
- 8/ Non encapuchonné, non inoculé

- a - 8 jours après inoculation
- b - 18 jours après inoculation
- c - 40 jours après inoculation
- d - 46 jours après inoculation

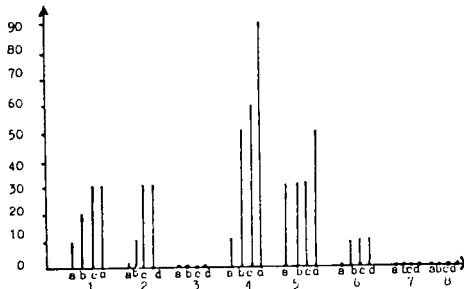


Fig. 3 : Evolution du taux d'attaque sur tige en fonction du temps et du type d'inoculation

IV - CONCLUSIONS

Ces 2 techniques d'inoculation artificielle permettent d'obtenir des niveaux de maladie relativement élevés au champ et en serre. L'inoculation ponctuelle sous manchon aluminium favorise des attaques importantes indépendamment des conditions d'humidité relative ambiante et la notation des symptômes est facile. Les pulvérisations d'ascospores ont donné des pourcentages de plantes attaquées moins importants mais elles se rapprochent beaucoup des conditions de contamination naturelle, et le maintien des capuchons pendant des durées plus longues devrait résoudre ce problème.

Dès à présent, différents aspects de la biologie du champignon ont pu être abordés et précisés par l'inoculation ponctuelle.

Ces techniques ont également servi à l'étude de l'efficacité de différentes spécialités fongicides. Cependant, elles doivent être adaptées à la recherche de "résistances partielles" chez le colza et les espèces voisines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABAWI G.S. and R.G. GROGAN, 1975. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 65, 300-309.
- HUNTER J.E., STEADMAN and J.A. CIGNA, 1982. Preservation of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* on membrane filters. *Phytopathology* 72, 6, 650-652.
- LAMARQUE C., 1975. Obtention d'apothécies de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary en grand nombre et à tout moment. *Annales de Phytopathologie*.
- LAMARQUE C., 1978. Conditions nécessaires à la contamination des capitules de Tournesol par le *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Proceeding of the 8th international sunflower conference*. Minneapolis, Minnesota (U.S.A.).
- Mc LEAN, 1958. Role of dead flower parts in infection of certain crucifers by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de By. *Plant. Dis. Repr.* 42 (5) 663-666.
- PURDY L.H. and J.R. and R. BARDIN, 1953. Mode of infection of Tomato plants by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant. Dis. Repr.* 37 (6) 361-362.
- STEADMAN J.R. and G.E. COOK 1974. A simple method for collecting ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Plant. Dis. Repr.* 58(2), 190.