

Mise au point d'une méthode de contamination artificielle en vue de l'expérimentation de fongicides sur *Plasmopara halstedii*

Marc DELOS, Service Régional de la Protection des Végétaux "Midi-Pyrénées"
- Cité Administrative - Bât. E - Bd Armand Duportal - 31074 TOULOUSE Cedex - France
Fax : 05 61 10 62 72 ; e-mail : marc.delos@agriculture.gouv.fr

Nathalie EYCHENNE, Fédération Régionale de Défense contre les Ennemis des Cultures "Midi-Pyrénées"
- Cité Administrative - Bât. E - Bd Armand Duportal - 31074 TOULOUSE Cedex - France
Fax : 05 61 10 62 72 ; e-mail : marc.delos@agriculture.gouv.fr

Isabelle BIRBA, DUPRAT C., MIALLIER D.
Service Régional de la Protection des Végétaux "Midi-Pyrénées" -
Cité Administrative - Bât. E - Bd Armand Duportal - 31074 TOULOUSE Cedex - France

Denis TOURVIELLE de LABOUHE D, GREAT - INRA - Station d'Amélioration des Plantes et de
Pathologie Végétale- 234 avenue du Brezet, 63039 Clermont-Ferrand cedex02
Fax : 33 (0)4 73 62 45 44 - e-mail : tourvie@clermont.inra.fr

RESUME

L'extension des souches de *Plasmopara halstedii* résistantes au métalaxyl a relancé des études pour l'identification de fongicides efficaces utilisables en traitement de semences. Dans cette perspective, une méthode de contamination artificielle, simulant des contaminations primaires naturelles, réalisable en plein champ, a été mise au point en 1998. Testée avec succès en 1999, cette méthode simule correctement une contamination primaire naturelle. Elle a permis d'évaluer le temps d'incubation consécutif aux contaminations primaires soit 181°j en base 8,5°c. Sa mise en œuvre permettra de multiplier les tests permettant de mesurer l'efficacité de différentes matières actives envisagées en traitement de semences pour lutter contre le mildiou du tournesol

Development of an artificial contamination method for the experimentation of fungicides on *Plasmopara halstedii*

SUMMARY

The extension of strains of *Plasmopara halstedii* resistant to the metalaxyl has increase interest for identification of fungicides efficient without cross -resistance with phénalamides, usable in seeds treatment. In this perspective, an artificial contamination method, simulating natural primary contamination, usable in full field, has been developed in 1998. It has been tested successfully in 1999; this method simulates correctly a natural primary contamination. It allowed to conduct trials in order to evaluate the incubation time consecutive to primary contamination. The mean value for this parameter was 181°j in basis 8.5°c. The artificial contamination method will allow to multiply trials in order to measure the efficiency of different fungicides envisaged in seeds treatment to limit downy mildew of sunflower.

Introduction

La détection puis le développement des souches de mildiou du tournesol résistantes aux phénylamides depuis 1996 ont relancé l'expérimentation destinée à étudier l'effet de différents fongicides utilisables en traitement de semences contre ce parasite (Délou et al, 1997). Ces travaux avaient pour objectif l'identification de matières actives de familles différentes permettant une gestion du phénomène de résistance au métalaxyl. Les premiers travaux conduits en laboratoire ont permis de cerner des pistes encourageantes dans cette perspective, de nombreuses spécialités se révélant efficaces pour maîtriser les contaminations primaires (Lafon et al, 1999). Pour être valides, ces tests devaient être complétés par des travaux de plein champ afin d'observer le comportement des fongicides testés avec succès au laboratoire dans des conditions pratiques. En raison de la difficulté pour réussir des essais dans ces conditions, une méthode de contamination artificielle au champ simulant la contamination naturelle a été mise au point. Elle a été élaborée et évaluée sur un site expérimental n'ayant jamais reçu de tournesol depuis plus de 20 ans. Les premiers travaux, conduits en 1998, visaient à identifier précisément, en conditions naturelles, le stade de sensibilité maximale de la plante aux contaminations primaires. Des données existaient pour la sensibilité en fonction du stade au laboratoire (Allard, 1978) mais la transposition en conditions de plein champ supposait des travaux spécifiques. Des travaux complémentaires, réalisés au cours du printemps et de l'été 1999, ont permis de comparer la contamination artificielle à une contamination naturelle à partir de zoospores libérées par des oospores.

Matériel et méthode

□ Méthode de contamination artificielle au champ.

1- Obtention d'une suspension de sporanges : La contamination artificielle est réalisée à l'aide d'une suspension de sporanges prélevés sur des plantes ayant subi une contamination primaire précoce. La production de cet inoculum peut être obtenue au laboratoire avec la méthode de contamination classiquement utilisée pour la caractérisation des races. L'incubation est réalisée en enceinte climatisée pour disposer d'une souche la plus pure possible, la multiplication étant réalisée à partir d'un isolat dont la race et la sensibilité au métalaxyl sont parfaitement connues. Si la quantité d'inoculum nécessaire est plus importante et dans la mesure où une tolérance existe quant à la présence marginale (<1%) d'un inoculum exogène, la production des sporanges peut être réalisée à partir de plantes contaminées à l'extérieur : Les feuilles portant des fructifications sont agitées dans des cristallisoirs contenant de l'eau permutée, afin de mettre les sporanges en suspension. Les plantes sources de l'inoculum, prélevées à l'extérieur, font l'objet d'une brumisation et d'un ensachage 24 heures avant le prélèvement afin de maintenir des conditions hygrométriques optimales pour favoriser la fructification.

2 - Concentration en sporanges de la suspension infectieuse : Le nombre de plantules ou de feuilles à utiliser est variable en fonction du volume de suspension nécessaire, de la concentration en zoospores souhaitée et de la densité de sporanges par cm² de feuille.

La concentration en sporanges dans la suspension est fonction de l'objectif retenu; elle variera, pour une pulvérisation de l'ordre de 2 litres /100 m², entre 1,8.10⁵ et 2.10⁵ sporanges par ml, soit 3,6.10⁶ à 4.10⁶ sporanges /m² pour une contamination massive entraînant la contamination primaire de plus de 50% des plantes et 2.10⁴ à 3.10⁴ sporanges par ml soit 4.10⁵ à 6.10⁵ sporanges / m² pour des contaminations primaires plus proches des situations observées dans la pratique, correspondant à environ 10% de plantes atteintes au stade 2 feuilles.

3 - Préparation des semis : Les parcelles, devant recevoir la pulvérisation de zoospores, sont semées 3 à 9 jours avant avec des semences traitées avec des fongicides inefficaces sur

mildiou ou dont l'efficacité doit être évaluée. Les plantules ne doivent pas avoir levé lors de la contamination.

4 - Apport de l'inoculum sur les parcelles : La contamination est réalisée en apportant sur les parcelles, au moyen d'un pulvérisateur à jet projeté à pression constante réservé à cet usage, la suspension contenant les sporanges qui libèrent rapidement des zoospores au contact de l'eau. Cette pulvérisation est effectuée dans l'heure qui suit la préparation de la suspension. Un délai plus important voisin de 4 heures peut être envisagé avec succès en maintenant la suspension à une température inférieure à 15°C. Le volume de suspension par m² peut varier entre 2 et 5 litres/100 m², les volumes élevés étant réservés aux pulvérisations effectuées par temps chaud.

5 - Maintien de conditions permettant la contamination : Une irrigation de 4mm est réalisée préalablement à la pulvérisation de la suspension de zoospores, elle est renouvelée une fois la contamination réalisée, puis toutes les 8 heures pendant 36 heures, les conditions qui suivent immédiatement le semis étant déterminantes pour la réussite de la contamination (Délos et al, 2000). Si des pluies sont enregistrées pendant la période d'irrigation, la quantité d'eau apportée est réduite d'autant. Le suivi des symptômes est effectué une fois la levée avérée.

□ Détermination du stade de sensibilité maximale à l'infection primaire.

La détermination du stade de sensibilité maximale à l'infection primaire a été réalisée grâce à un dispositif conduit à l'automne 1998. 5 semis successifs de 200 graines ont été réalisés respectivement 3, 6, 9, 12 et 15 jours avant contamination. Chaque condition correspond respectivement à des plantes aux stades : imbibition de la graine, élongation de l'hypocotyle, levée, cotylédons étalés, 2 feuilles, lors de la contamination.

Pour chaque condition, 100 plantes sont contaminées et 100 plantes non contaminées servent de témoin. La contamination artificielle a été réalisée selon la méthode décrite précédemment avec une suspension de sporanges de $1,8 \cdot 10^5$ par ml, avec une pulvérisation de 2 l/100 m². Des notations ont été conduites à 3 stades, 15 jours, 21 jours et 48 jours après la contamination. Les conditions climatiques qui ont suivi l'apparition des symptômes ont été peu favorables à l'observation de contaminations secondaires.

□ Comparaison entre l'efficacité de la contamination artificielle et de la contamination naturelle - détermination du temps d'incubation.

La comparaison de la réussite de la contamination artificielle par rapport à la contamination naturelle a été effectuée au cours du printemps 1999.

La partie contaminée artificiellement a été constituée par 4 semis successifs répétés 4 fois selon un dispositif « carré latin » sur une parcelle indemne de parasite. Une contamination artificielle à l'aide de $4,2 \cdot 10^5$ sporanges/m² a été effectuée, selon la méthode décrite précédemment, sur des plantes respectivement aux stades 2 feuilles, cotylédons étalés, élongation de l'hypocotyle et imbibition des graines dans la partie contaminée.

Des parcelles témoins non contaminées ont été semées à chaque date, selon un dispositif réparti de part et d'autre du carré latin. Le même dispositif a été reproduit sur une partie de la parcelle préalablement enrichie en parasite par apport de plantes contaminées à l'automne précédant la culture. Une irrigation, identique en terme de fréquence et de quantité d'eau apportée, à celle réalisée dans le dispositif contaminé artificiellement, a été effectuée sur la partie sous contamination naturelle.

Des notations ont été réalisées tous les 2 jours une fois la levée observée.

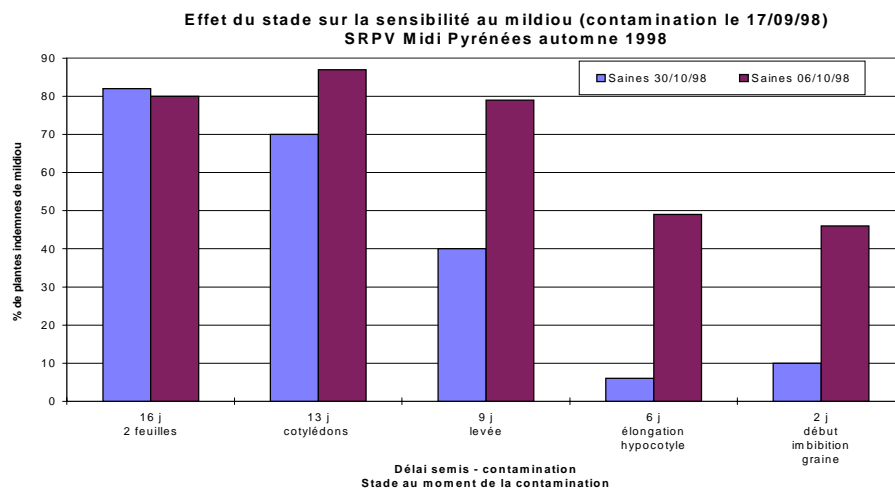
Suite à ces observations, 5 tests de semis successifs contaminés artificiellement ont été réalisés en complément au cours du printemps, afin d'évaluer par approximation le temps

d'incubation de la maladie suite à une contamination primaire simulée. Le facteur eau était non limitant et la mesure de la température était réalisée dans des conditions standards pour une généralisation de la mesure (à 2 mètres de haut) avec les limites d'une telle mesure.

Le temps d'incubation pour les champignons étant fonction de la température, il peut être exprimé en somme de degrés jours au-delà d'une température de base. La difficulté de cette évaluation tient à la détermination de la base. Afin de déterminer la base de calcul, des sommes de températures correspondant à l'intervalle contamination - apparition des symptômes sont calculées avec différentes bases de températures. La base retenue est celle qui rend les écarts minimaux entre les sommations thermiques correspondant à chaque test de semis.

Résultats

La mise en œuvre de la méthode de contamination artificielle à différents stades, a permis de vérifier qu'en conditions de plein champ, le maximum de sensibilité correspondait à des stades précédant la levée, avec un optimum lors de l'élongation de l'hypocotyle (graphique 1). C'est donc à ce stade que les contaminations doivent être réalisées pour une efficacité maximale.



graphique 1

Les travaux conduits afin de comparer l'efficacité de la contamination artificielle par pulvérisation d'une suspension de zoospores par rapport à la contamination naturelle ont permis de vérifier qu'il n'existait aucune différence majeure entre les deux modes de contamination. Les premiers symptômes sont apparus de façon quasi simultanée. La progression dans l'apparition des symptômes a été ensuite comparable. Les seules observations divergeantes entre les deux modes de contamination ont concerné le pourcentage de plantes contaminées, 10 fois plus important dans la partie contaminée artificiellement pour un apport de $4,2 \cdot 10^5$ sporanges/m² et le temps de latence pour les plantes contaminées artificiellement aux stades 2 feuilles et cotylédons, modalités pour lesquelles une contamination des organes aériens était possible. La contamination artificielle sur des plantes non encore levées semble bien reproduire le phénomène de contamination primaire naturelle au facteur d'intensité près. Ce facteur peut être ajusté en faisant varier la concentration en zoospores de la suspension ou le volume de la pulvérisation.

Les observations conduites en vue de déterminer une durée d'incubation exprimée en degré jours ont permis de déterminer une sommation thermique évaluée à 181°j (cv : 0,05) pour une base de calcul fixée à 8,5°C (tableau 1). Les sporulations apparaissent souvent simultanément

avec les premiers symptômes. Cette sommation thermique vaut aussi pour la durée de latence (intervalle contamination - sporulation).

Tableau 1 : Calcul de sommes de température caractérisant l'incubation pour différentes bases de calcul.

SEMIS	Base 0	Base6	Base 6,5	Base 6,75	Base 7	Base 8	Base 8,5	Base 9	Base 10	Base 11	Base 12
S1	539	242,7	219,7	208,45	197,3	153,7	133	113	78,7	49,6	26,7
S2	463,8	224,7	204,1	193,85	183,7	144,1	125,1	106,6	71,7	47,5	26,1
S3	603,5	303,5	278,9	266,65	254,5	206,9	183,9	161,4	121,4	87,2	59,6
S4	544,4	280,4	258,8	248,05	237,4	195,8	175,8	156,1	119	86,7	59,6
S1b	365,5	239,5	229	223,75	218,5	197,5	187	176,5	155,5	134,5	113,5
S2b	352	238	228,5	223,75	219	200	190,5	181	162	143	124
S3b	313,1	211,1	202,6	198,35	194,1	177,1	168,6	160,1	143,1	126,1	109,1
S4b	433,4	301,4	290,4	284,9	279,4	257,4	246,7	235,4	213,4	191,4	169,4
S5b	417,9	297,9	287,9	282,9	277,9	257,9	247,9	237,9	217,9	197,9	177,9
S6	355,1	259,1	251,1	247,1	243,1	227,1	219,1	211,1	195,1	179,1	163,1

Maximum	603,50	303,50	278,90	266,65	254,50	206,90	190,50	181,00	162,00	143,00	124,00
Minimum	313,10	211,10	202,60	198,35	194,10	177,10	168,60	156,10	119,00	86,70	59,60
Différence	290,40	92,40	76,30	68,30	60,40	29,80	21,90	24,90	43,00	56,30	64,40
Moyenne	435,70	254,50	239,56	232,11	224,70	195,46	181,16	167,02	140,20	115,50	93,16
écart type	129,36	36,92	29,66	26,11	22,67	11,10	8,88	11,00	19,50	26,74	31,11
CV	0,30	0,15	0,12	0,11	0,10	0,06	0,05	0,07	0,14	0,23	0,33

Discussion

Les travaux réalisés en vue de déterminer le stade de sensibilité maximale, ne traduisent qu'imparfaitement la réalité du phénomène. En effet, la mesure de l'efficacité de la contamination n'est faite que sur les symptômes visibles de la maladie. Les infections ne produisant pas de symptômes n'ont pas été prises en compte.

Si la contamination des plantes avant la levée est par définition souterraine, donc correspondant potentiellement à un inoculum ayant pour origine des oospores, à partir de la levée, les symptômes observés peuvent pour tout ou partie avoir pour origine une contamination aérienne sur les cotylédons ou les premières feuilles. Si tel est le cas dans les conditions climatiques de l'essai, les contaminations aériennes sont moins massives que les contaminations souterraines, le climat sec peut expliquer ce résultat. Dans des conditions naturelles, une fois les symptômes apparus, suite aux contaminations primaires, la masse d'inoculum produite au niveau des feuilles peut être considérable, équivalente à la quantité apportée par la contamination artificielle par unité de surface, mais la disponibilité des spores est quasi permanente sur les plantes sources de l'inoculum et la contamination s'étale sur une plage de temps bien plus longue que lors des contaminations artificielles. Si le rapport en terme de risque entre les stades 2 feuilles, cotylédons étalés et levée peut être maintenu en valeur relative, les niveaux en terme de valeur absolue sont fonction du nombre de plantes manifestant des contaminations primaires (inoculum disponible) ainsi que de la durée et de la fréquence des phases climatiques humides permettant la contamination.

La mesure de la somme de températures caractérisant la phase d'incubation avec contamination artificielle au champ est utile pour un suivi plus précis de l'épidémie. Elle permet de guider nos observations dans le cadre d'expérimentations sur le traitement de semences. Elle peut aussi constituer un indicateur pour la détermination du début de la phase de contaminations aériennes, la période de latence se confondant souvent avec la période d'incubation pour ce champignon. L'évaluation qui est faite comporte cependant deux limites

majeures qui en réduisent la précision : 1) Le phénomène biologique objet de l'étude intervient dans les premiers centimètres du sol et la mesure des conditions climatiques est effectuée dans des conditions standards à 2 mètres au-dessus du sol. Si ce choix permet de généraliser l'utilisation du paramètre, ces conditions étant celles de toutes les stations météorologiques françaises, la précision de l'évaluation est affectée par une mesure ne rendant pas parfaitement compte du phénomène biologique. L'inertie que le sol peut opposer aux fluctuations de température n'est pas prise en compte dans notre évaluation. Cette inertie est par ailleurs variable d'un sol à l'autre, en fonction des capacités de réchauffement liées entre autres à l'albédo, la teneur en eau, l'exposition, l'ombrage de la parcelle. Des observations réalisées au cours du printemps entre 2 tests de contamination artificielle réalisés simultanément dans une zone climatique homogène mais sur des sols très différents quant à leur capacité de réchauffement ont permis de constater des écarts importants de la durée d'incubation. Le paramètre de 181 j en base 8,5°C est donc indicatif et devrait être corrigé en fonction des caractéristiques de la parcelle. 2) L'autre limite à l'évaluation de ce paramètre tient au type de calcul choisi, calcul qui considèrerait que l'apport d'énergie à la croissance du champignon est un phénomène linéaire. Cette approximation assez grossière n'est généralement valide que pour une plage de températures réduite, sur la sigmoïde comprise entre la température minimale et la température optimale de croissance du champignon. Les températures des 2 premiers tests (fin mars début-avril) étaient parfois proches de la température minimum de développement du champignon et celles des 3 derniers tests (fin mai-début juin) voisines de l'optimum, ces données ont été exclues des calculs permettant la détermination de la base .

Des mesures complémentaires réalisées au cours des automnes 1998 et 1999 ont permis de vérifier que le paramètre peut s'avérer utile, malgré les limites listées précédemment.

Conclusion

L'originalité de ces travaux réside essentiellement dans la description de la méthode de contamination artificielle et de ses limites identifiées. Cet outil devrait faciliter de façon considérable les travaux conduits en vue d'évaluer de nouveaux fongicides destinés à combattre le mildiou. Il est possible de réaliser 4 essais successifs la même année en tenant compte des résultats obtenus dans l'essai précédant pour le choix des modalités. La contamination homogène permet d'augmenter la puissance de l'essai.

Il conviendra cependant d'utiliser un inoculum issu de la parcelle, préalablement multiplié, afin d'éviter tout transport d'une souche depuis une région où elle est isolée vers une autre où elle serait utilisée.

Nous rappelons à ce titre que le mildiou du tournesol, parasite de quarantaine inscrit à l'annexe II de l'arrêté du 2 septembre 1993 du Journal Officiel fixant les exigences en matière de parasites de quarantaine, fait l'objet de mesures restrictives strictes.

Bibliographie

DELOS M., EYCHENNE N., BIRBA I., FABRY C., 2000. Etude des facteurs expliquant les fluctuations des attaques de *Plasmopara halstedii* en France. Proc. 15ème Conf. Int. sur le Tournesol, Toulouse (France), 13-15 juin, (sous presse).

DELOS M., PENAUD A., LAFON S., WALSER P., de GUENIN M.C., TOURVIEILLE J., MOLINERO V., TOURVIEILLE D., 1997. Le mildiou du tournesol : une maladie toujours d'actualité. Phytoma, 495, 15-16.

ALLARD C., 1978. Invasion et colonisation systémique de la plantule de tournesol (*Helianthus annuus* L.) par le *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni. Ann. Phytopathol., 10, (2), 197-217.

LAFON S, DELOS M., GAY P, TOURVIEILLE de LABROUHE, 1999 Le mildiou du tournesol, lutte chimique les souches résistantes au métalaxyl ; Mesures de l'efficacité au laboratoire de différentes spécialités sur les contaminations primaires et secondaires. III Symposium ISA - Fargo (ND, USA)13-14 janvier, 62-73