

Comparaison de différentes techniques d'infection de folioles d'arachide par *Puccinia arachidis* Speg.

Serge SAVARY

ORSTOM, Laboratoire de Phytopathologie, Centre d'Adiopodoumé, B.P. 51, Abidjan, Côte-d'Ivoire

RÉSUMÉ

Ce travail a pour but de mettre au point la meilleure technique d'infection par *Puccinia arachidis* Speg. de folioles détachées d'arachide. Plusieurs techniques, utilisées à différentes doses d'inoculum, sont comparées. Leur effet sur l'efficacité de l'inoculum est discuté. L'inoculum est plus efficace à sec et à faible dose qu'en suspension et à forte dose.

Mots clés additionnels : Dose d'inoculum, efficacité de l'inoculum, période de latence, période d'incubation, inhibiteur de germination, agent tensioactif.

SUMMARY

A comparison of different techniques for inoculating groundnut leaflets with Puccinia arachidis.

In order to develop a method which would yield a satisfactory inoculum efficiency, several inoculation techniques with *Puccinia arachidis* Speg. were compared at various inoculum levels. The effect of technique on inoculum efficiency is discussed. The highest values of this variable were obtained at low inoculum levels, with dryspore inoculations.

Additional key words : Inoculum level, inoculum efficiency, latency period, incubation period, germination inhibitor, surfactant.

I. INTRODUCTION

Parmi les maladies de l'arachide, la rouille, due à *Puccinia arachidis* Speg., est considérée comme l'une des plus dommageables pour cette culture. C'est pourquoi plusieurs chercheurs se sont attachés à mettre au point un schéma de sélection de variétés résistantes à ce parasite. Les tests sont réalisés par infections artificielles à l'aide de suspensions de spores, sur feuilles en survie (COOK, 1980b) ou sur plantes entières (Mc VEY, 1965, SUBRAHMANYAM *et al.*, 1980).

L'emploi de suspensions de spores peut présenter des inconvénients dans ce type d'études. En effet, les spores de *P. arachidis* produisent un auto-inhibiteur de germination (FOUNDIN & MACKO, 1974) susceptible d'entraîner une diminution de l'efficacité de l'inoculum. Par ailleurs, la mise en suspension de ces spores est difficile (COOK, 1980a), rendant délicate l'évaluation des doses d'inoculum employées. Certains

auteurs ont donc utilisé des tensioactifs afin d'obtenir des suspensions homogènes (Mc VEY, 1965), excluant alors de leurs résultats une des composantes de la résistance de la plante au parasite : les différences dues à la mouillabilité des feuilles en fonction soit de leur âge, soit de la variété testée (COOK, 1980b). Il est enfin vraisemblable qu'en conditions naturelles, la dissémination soit, en partie au moins, le fait du vent. Une contamination par voie sèche serait alors plus proche des conditions d'infections naturelles les plus fréquentes. Une telle technique est couramment mise en œuvre pour l'étude de couples hôte-rouille de régions tempérées, tels que *Triticum aestivum*-*Puccinia* spp. (MEHTA & ZADOKS, 1970 ; RAPILLY *et al.*, 1970).

Avant d'aborder une étude sur les interactions entre l'arachide et *P. arachidis*, nous avons donc jugé utile de comparer les deux types de méthodes d'infection (par voie humide et par voie sèche) quant à leur intérêt et à leur efficacité respectifs.

ORSTOM Fonds Documentaire

N° 42.318 ex 1

Cote : B M P16

12 SEP. 1995

II. MÉTHODES

Trois séries d'infections sont effectuées sur des folioles détachées mises en survie : les 2 premières séries d'expériences (I et II) permettent de comparer 5 méthodes d'infection ; la 3^e (III) est réalisée afin d'estimer l'effet d'un agent tensio-actif, le Triton X-100, sur l'efficacité de l'inoculum (tabl. 1).

A. Matériel végétal

La variété d'arachide utilisée est une variété locale, de type « Spanish », à cycle court et à port érigé, très sensible à la rouille. Les 2^e et 3^e feuilles des plantes cultivées en pot au laboratoire sont prélevées lorsque celles-ci sont âgées d'environ 1 mois. Leurs folioles sont placées, sur la face supérieure, dans des boîtes de Petri dont le fond est recouvert d'un papier filtre humide qui y assure une humidité saturante. Dans ces conditions, la face inférieure des feuilles observées *in situ* à la loupe, ne présente aucune trace d'humidité sous forme de gouttelettes. De telles feuilles portent, à leur face inférieure, environ 10 000 à 15 000 stomates/cm².

B. Préparation de l'inoculum

Les spores de *P. arachidis* utilisées au cours de ces essais proviennent d'un stock d'inoculum entretenu par infections de folioles détachées. Ces infections préliminaires sont effectuées 12 à 13 j avant les essais proprement dits et, dans les conditions où ce matériel

est maintenu, la déhiscence des urédosores a lieu 2 à 3 j avant la récolte de leur contenu. Celle-ci est effectuée par grattage de la surface des folioles.

C. Techniques d'infection

Pour chaque méthode testée au cours des expériences I, II et III, l'inoculum est préparé comme indiqué (tabl. 1). Dans tous les cas, les infections sont réalisées sur la face inférieure des folioles. Les méthodes 1 et 2 mettent en œuvre un inoculum sec, sous forme d'un mélange de spores et de kaolin. La méthode 2 n'est qu'une variante de la méthode 1, avec un mouillage des folioles par pulvérisation d'eau distillée avant contamination. Les autres méthodes mettent en œuvre des suspensions de spores dans de l'eau additionnée de Triton X-100 à différentes concentrations. La méthode 5, variante de la méthode 4, correspond à la mise en suspension dans une solution de Triton X-100 à 0,01 p. 100 (v/v) du mélange spores-kaolin aux doses d'inoculum voulues.

Au cours des expériences I (méthodes 1 et 3) et II (méthodes 1, 2, 4 et 5), cinq niveaux d'inoculum, désignés par : N, N/5, N/10, N/50 et N/100, sont utilisés. Le poids de spores employé pour obtenir la dose N est calculé afin d'atteindre environ 270 spores/cm² de feuille. Chaque traitement (méthode x dose) est répété sur 8 folioles.

L'effet éventuel du Triton X-100 sur l'efficacité de l'inoculum est étudié en réalisant une 3^e série d'infections (expérience III). Des solutions de concentrations décroissantes de ce tensioactif sont utilisées pour préparer des suspensions de spores : 0,1 p. 100 (méthode 3), 0,01 p. 100 (méthode 4), 0,001 p. 100 (méthode 6), ainsi que de l'eau distillée (méthode 7). Les essais

TABLEAU 1
Caractéristiques des méthodes utilisées (expériences I, II et III).
Characteristics of the methods tested in experiments I, II and III.

| Type de méthode d'infection | A sec | | Avec une suspension de spores | | | | |
|---|--|--|---|-----------|---|---------|-----|
| Numéro de la méthode | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Numéro de l'expérience au cours de laquelle la méthode a été testée | I II III | II | I III | II III | II | III | III |
| Préparation de l'inoculum | Poids de mélange spores-kaolin utilisé : 200 mg par boîte de Petri | | Volume de suspension de spores pulvérisé par boîte de Petri : 300 µl Avec les concentrations en Triton X-100 (v/v) suivantes : | | | | |
| | | | 0,1 ‰ | 0,01 ‰ | 0,01 ‰ | 0,001 ‰ | 0 |
| Remarques | Témoin | Pulvérisation d'eau distillée sur les folioles avant contamination | | | Suspension préparée avec un mélange spores-kaolin | | |

Pour les expériences I et II, 5 doses d'inoculum sont utilisées (N, N/5, N/10, N/50, N/100, voir texte) : au cours de l'expérience III, une seule dose est utilisée : N/10. Chaque boîte de Petri contient 2 folioles.

In experiments I and II, five inoculum levels (N, N/5, N/10, N/50, N/100, see text) were tested : in experiment III, only one level was used : N/10. Each Petri dish contained two leaflets.

d'infection sont effectués au niveau d'inoculum N/10 et chacun de ces 4 traitements est répété sur 12 folioles. Par ailleurs, au cours de cet essai, la germination des spores est estimée à partir de l'observation de 200 spores au moins, après 20 h d'incubation, sur des lames de verre recouvertes de vaseline et placées dans les boîtes de Petri avant les pulvérisations.

La méthode 1, utilisée au cours de chaque expérience, peut être considérée comme témoin.

D. Quantité de spores déposées

Les doses d'inoculum effectivement apportées aux folioles sont contrôlées en plaçant des lames de verre recouvertes de vaseline dans les boîtes de Petri. Les lames sont prélevées après pulvérisation, afin d'estimer le nombre de spores déposées par unité de surface. Six comptages sur 1 cm² sont effectués pour chaque traitement.

E. Conservation des feuilles infectées et observations

Les boîtes de Petri contenant les folioles infectées sont placées dans une enceinte à température contrôlée et maintenue à 27,5 ± 1 °C, sous un éclairage réduit (400 W.m⁻²) et avec une photopériode de 12 h. La contamination est suivie d'une période d'obscurité de 12 h ; il s'agit là d'une mesure de précaution, découlant des résultats obtenus pour la rouille brune du blé (ZADOKS, 1967).

Au cours de cette étude, l'efficacité de l'inoculum (E.I.), au sens de SCHEIN (1964), est calculée comme la proportion de spores produisant une lésion. Ce paramètre est estimé grâce au dénombrement du maximum de lésions apparues sur les folioles. Ce nombre maximum de lésions est atteint, dans les traitements, au 12^e j après inoculation. Le nombre de lésions par unité de surface foliaire, est calculé en estimant la surface de chaque foliole par : $\pi LX 1,4$ où L et l représentent sa longueur et sa largeur.

III. RÉSULTATS

A. Première et seconde série d'infections (Expériences I et II)

1. Contrôle du nombre de spores déposées par unité de surface

Pour les 5 méthodes mises en œuvre dans les séries d'infections I et II, les différentes doses d'inoculum sont obtenues avec une dispersion homogène (tabl. 2) et correspondent effectivement aux dilutions indiquées (N, N/5, N/10, N/50, N/100). Il convient, toutefois, de noter que les dispersions des résultats obtenus pour les doses N/50 et N/100 sont telles que ces 2 traitements peuvent être considérés comme équivalents dans certains cas.

2. Efficacité de l'inoculum en fonction des techniques utilisées

Les valeurs obtenues pour l'efficacité de l'inoculum (tabl. 3, E.I.) sont beaucoup plus fortes pour les méthodes 1 (expériences I et II) et 2 (expérience II) ; cette variable prend une valeur particulièrement faible dans le cas de la méthode 3 (expérience I).

Il faut, par ailleurs, noter l'accroissement de E.I. entre les traitements N et N/100, pour toutes les méthodes. Cet accroissement de l'efficacité avec des doses décroissantes d'inoculum paraît plus important pour les méthodes 3, 4 et 5 que pour les méthodes 1 et 2. L'analyse de la variance de ces résultats indique un effet significatif des traitements (dose et méthode) sur l'efficacité de l'inoculum. L'effet des méthodes est très important (F (méthodes) = 43,5), alors que celui des doses d'inoculum (F (Doses) = 6,0) est moindre, tout en demeurant très significatif (F_{tables} = 3,0, au seuil de 95 p. 100).

TABLEAU 2

Nombre de spores déposées par unités de surface (expériences I et II).
Number of spores deposited per surface unit (experiments I and II).

| Expérience | Méthode | Doses | | | | |
|------------|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | N | N/5 | N/10 | N/50 | N/100 |
| I | 1 | 252 (19) _a | 60 (7) _b | 26 (1,8) _c | 3,7 (0,8) _{ef} | 2,2 (0,5) _f |
| | 2 | 275 (6) _a | 58 (4) _b | 31 (5) _c | 7,2 (1,2) _{de} | 4,0 (1,1) _{ef} |
| II | 1 | 286 (12) _a | — | 26 (0,8) _c | — | 2,5 (0,6) _f |
| | 3 | 258 (10) _a | 57 (2,7) _b | 31 (5,2) _c | 4,7 (0,4) _{de} | 3,1 (0,7) _{ef} |
| | 4 | 260 (11) _a | 77 (7,3) _b | 32 (3,5) _c | 5,7 (0,9) _{de} | 2,8 (0,5) _f |
| | 5 | 273 (13) _a | 57 (7,2) _b | 28 (3,2) _c | 7,5 (1,2) _d | 3,0 (0,7) _{ef} |

Chaque valeur (suivie par son erreur-standard entre parenthèses) correspond à la moyenne de 6 comptages sur 1 cm².

Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 99 % (test de Student pour petits échantillons).

Each value is the mean of 6 counts on 1 cm² and is followed by its standard error.

The data which are followed by different letters are significantly different at 99 percent level (Student's t test for small samples).

TABLEAU 3

Expériences I et II : nombre de lésions par cm² de feuille et efficacité de l'inoculum en fonction des traitements.

Experiments I and II : number of lesions per square centimeter of leaf and inoculum efficiency of each method at various inoculum levels.

| Expérience | Méthode | Dose | Nombre de lésions/cm ² (1) | Efficacité de l'inoculum (E.I.) (2) |
|------------|---------|-------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| I | 1 | N | 36,4 a (3) | 0,14 d |
| | | N/5 | 16,0 bc | 0,26 c |
| | | N/10 | 8,5 cd | 0,32 bc |
| | | N/50 | 1,5 d | 0,38 a |
| | | N/100 | 0,8 d | 0,36 ab |
| | 3 | N | 0,3 d | 0,001 h |
| | | N/5 | 0,3 d | 0,005 gh |
| | | N/10 | 0,1 d | 0,010 h |
| | | N/50 | 0,1 d | 0,012 gh |
| | | N/100 | 0,1 d | 0,028 fgh |
| II | 1 | N | 30,0 a | 0,10 de |
| | | N/10 | 7,2 cd | 0,28 c |
| | | N/100 | 0,8 d | 0,32 bc |
| | 2 | N | 32,4 a | 0,13 de |
| | | N/5 | 19,1 b | 0,34 abc |
| | | N/10 | 8,5 cd | 0,28 c |
| | | N/50 | 1,5 d | 0,31 bc |
| | 4 | N/100 | 0,8 d | 0,29 c |
| | | N | 7,0 cd | 0,026 fgh |
| | | N/5 | 1,4 d | 0,018 gh |
| N/10 | | 0,9 d | 0,028 fgh | |
| N/50 | | 0,5 d | 0,087 def | |
| 5 | N/100 | 0,3 d | 0,091 def | |
| | N | 5,0 d | 0,018 gh | |
| | N/5 | 3,6 d | 0,063 efg | |
| | N/10 | 2,0 d | 0,071 ef | |
| | N/50 | 0,7 d | 0,093 def | |
| | | N/100 | 0,5 d | 0,154 d |

(1) Nombre de lésions/cm² : moyenne sur 8 folioles, plus petite différence significative au seuil de 99 % : 10,3.

Number of lesions per cm² of leaf (mean of 8 results, least significant difference at 99 % level : 10.3).

(2) Efficacité de l'inoculum en nombre de lésions apparues par spore déposée : moyenne sur 8 folioles ; plus petite différence significative au seuil de 99 % : 0,067.

Inoculum efficiency, as number of lesions obtained per deposited spore (mean of 8 results, least significant difference at 99 % level : 0.067).

(3) Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 99 %.

Data followed by different letters are significantly different at 99 % level.

B. Troisième série d'infections (Expérience III)

Le tableau 4 fait apparaître un net effet de la concentration en Triton X-100 sur la germination des spores et sur l'efficacité de l'inoculum apporté. Par ailleurs, on constate que, si la germination des spores est aussi bonne dans l'eau qu'à sec (Témoin, Méthode 1), l'efficacité de l'inoculum est, par contre, nettement meilleure à sec (0,32) que dans l'eau (0,07).

IV. DISCUSSION

Efficacité de l'inoculum

Les méthodes 1 et 2 sont les plus efficaces parmi celles qui ont été testées dans les expériences I et II. Ces 2 méthodes paraissent équivalentes ; l'humectation

des feuilles préalablement à l'apport d'inoculum (méthode 3) ne semble avoir aucun effet sur le succès des infections. L'écart qui les sépare des autres méthodes utilisées peut être attribué, en partie, à l'effet d'un auto-inhibiteur de germination durant la préparation des suspensions de spores aux doses voulues (FOUN-DIN & MACKO, 1974).

Cette hypothèse est confirmée par les résultats de la 3^e série (III) d'infections (tabl. 4), qui indiquent que des concentrations croissantes de Triton X-100 diminuent le pourcentage de germination des spores et E.I. Ces résultats montrent, par ailleurs, que E.I. est plus élevé avec un inoculum à sec (0,32) qu'avec un inoculum en suspension dans l'eau (0,07). Cette dernière valeur semble équivalente à celle qui peut être calculée à partir des résultats obtenus par COOK (1980a), par une technique analogue (0,11).

Par ailleurs, pour les 2 premières séries d'inoculations (I et II), on remarque que E.I. tend à diminuer lorsque la dose d'inoculum appliquée augmente

TABLEAU 4
Troisième série d'infections (III) : pourcentages de germination des spores et efficacité des infections
en fonction des concentrations de Triton X-100 utilisées.

Third experiment (III) : spore germination percentages and inoculum efficiency depending on the concentrations of Triton X-100.

| | Concentration en Triton X-100 (1) | 0 (Méthode 7) | 0,001 (Méthode 6) | 0,01 (Méthode 4) | 0,1 (Méthode 3) | Témoin : (Méthode 1) |
|-------------------|--------------------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|
| % germination | (2) | 96 | 92 | 70 | 8 | 100 |
| Efficacité (E.I.) | (3) | 0,07 _b | 0,05 _{bc} | 0,006 _c | 0,002 _c | 0,32 _a |

(1) En % (v/v). In % (v/v).

(2) Pourcentages de germination des spores après 20 h, en % par rapport au témoin (Méthode 1).
Percentages of spore germination after 20 h, as a percent of the control (Method n° 1).

(3) Efficacité de l'inoculum en nombre de lésion par spore déposée.
Inoculum efficiency as a number of lesion per deposited spore.

Chaque valeur est la moyenne de 12 observations. Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 99 % (test de Student).

Each figure is the mean of 12 replications. Figures followed by different letters are significantly different at 99 % level (Student's test).

(tabl. 3). Cette décroissance a, vraisemblablement, plusieurs causes ; en particulier, lorsque les spores sont en suspension, la production d'un inhibiteur de germination dont la concentration croît avec la dose d'inoculum (ce facteur jouerait principalement pour les méthodes 3, 4 et 5).

Il convient de noter que des résultats variables ont été obtenus à ce sujet pour d'autres couples hôte-*Puccinia*. Ainsi, MEHTA & ZADOKS (1970), dans le cas de *P. recondita*, n'ont pas observé de relation entre dose et efficacité d'inoculum. Par contre TENG & CLOSE (1978) ont mis en évidence une nette augmentation de l'efficacité de l'inoculum lorsque la dose s'accroît dans le cas de la rouille de l'orge (*P. hordei* Oth.).

V. CONCLUSION

La comparaison de ces différentes techniques montre que l'infection de feuilles d'arachide par des spores

de *P. arachidis* s'effectue avec une fréquence de succès beaucoup plus grande lorsque l'inoculum est appliqué à sec, en atmosphère saturée, plutôt que sous forme de suspension de spores dans l'eau.

Il est vraisemblable que la dissémination des spores de *Puccinia arachidis* soit surtout éolienne. La méthode d'infection à sec décrite ici (méthode 1) permet donc de prendre en compte cet aspect de la biologie du parasite.

Reçu le 6 avril 1984.

Accepté le 21 novembre 1984.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée grâce aux conseils du Professeur J. C. ZADOKS, de l'Université Agricole de Wageningen (Pays-Bas), qui en a également revu le manuscrit.

Les avis de MM. B. HUGUENIN (Centre ORSTOM de Lomé) et M. LOURD (Mission ORSTOM de Manaus) ont été très utiles lors de la rédaction. L'auteur leur en exprime sa grande reconnaissance.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cook M., 1980 (a). Host-parasite relations in uredial infection of peanut by *Puccinia arachidis*. *Phytopathology*, **70**, 822-826.
- Cook M., 1980 (b). Peanut leaf wettability and susceptibility to rust infection by *Puccinia arachidis*. *Phytopathology*, **70**, 826-830.
- Foundin A. S., Macko V., 1974. Identification of the self-inhibitor and some germination characteristics of peanut rust uredospores. *Phytopathology*, **64**, 990-993.
- McVey D. V., 1965. Inoculation and development of rust on peanuts grown in the greenhouse. *Plant Dis. Rep.*, **49**, 191-192.
- Mehta Y. R., Zadoks J. C., 1970. Uredospore production and sporulation period of *Puccinia recondita* f.sp. *triticultura* on primary leaves of wheat. *Neth. J. Plant Pathol.*, **76**, 267-276.
- Rapilly F., Fournet J., Skajennikoff M., 1970. Etudes sur l'épidémiologie et la biologie de la rouille jaune du blé : *Puccinia striiformis* West. *Ann. Phytopathol.*, **2**, 5-31.
- Schein R. D., 1964. Design, performance and use of a quantitative inoculator. *Phytopathology*, **54**, 509-513.
- Subrahmanyam P., Gibbon R. W., Nigam S. N., Rao V. R., 1980. Screening methods and further sources of resistance to peanut rust. *Peanut Sci.*, **7**, 10-12.
- Teng P. S., Close R. C., 1978. Effect of temperature and uredinium density on urediniospore production, latent period and infections period of *Puccinia hordei* Oth. *N. Z. J. Agric. Res.*, **21**, 287-296.
- Zadoks J. C., 1967. An inhibitory effect of light on the infection by brown leaf rust of wheat. *Neth. J. Plant Pathol.*, **73**, 52-54.