

SCLEROTINIA SUR COLLET DE TOURNESOL : MÉTHODOLOGIE DE L'ÉVALUATION DU COMPORTEMENT VARIÉTAL EN SERRE

SCLEROTINIA ATTACK OF SUNFLOWER STEM BASE: DEVELOPMENT OF A GREENHOUSE RESISTANCE TEST

André Pérès et Denise Poinsignon - CETIOM, Centre Grignon, B.P.4, 78850 THIVERVAL-GRIGNON France Fax : +33.1.56.89.57.04 e-mail : peres@cetiom.fr
Bruno Grèzes-Besset - Biogemma, Domaine de Sandreau 31700 MONDONVILLE France Fax : 33 5 62 13 64 26 e-mail : grezes_besset@biogemma.com

RESUME

L'attaque au collet dûe à *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary est fréquemment rencontrée dans des régions de très forte production telles que l'Ouest et le Sud-Ouest de la France. Les dégâts sont d'autant plus importants que l'attaque est précoce. Associé à des mesures agronomiques, le choix de variétés tolérantes à cette forme d'attaque est la seule parade efficace. Aussi, des évaluations de comportements variétaux sont réalisés au champ mais, pour être fiables, elles nécessitent la mise en oeuvre de dispositifs expérimentaux avec témoin sensible adjacent à chaque variété. Il est donc nécessaire de rechercher d'autres techniques. La présente étude rend compte de la mise au point d'une technique d'évaluation précoce en serre par contamination artificielle mycélienne. Celle-ci consiste à infecter de jeunes plantes au stade 4 feuilles par simple contact du système racinaire avec un lit d'orge infecté par *Sclerotinia sclerotiorum*. L'évaluation et la comparaison variétales reposent sur deux critères : la cinétique d'attaque sur 25 à 45 jours et le taux de plantes détruites. Cette technique permet d'atteindre des taux élevés de plantes détruites sur des variétés très sensibles (plus de 50%) et de comparer les variétés dans une large gamme d'attaque. L'évaluation finale des variétés est généralement possible 30 jours après la date d'inoculation. Les résultats sont relativement bien corrélés avec ceux obtenus au champ. La principale contrainte de cette méthode est le contrôle rigoureux et permanent des substrats, arrosages, températures et éclairage. 30 à 40 variétés peuvent être testées par série en 50 jours environ.

SUMMARY

Basal stem attack by *Sclerotinia sclerotiorum* is frequent in the main areas of sunflower in France (West and South-West). Early attacks cause the greatest damage. The only effective control is to choose tolerant varieties, in association with agronomic measures. Varietal tests are carried out in the field, but they require complex trials with susceptible controls adjacent to each variety. Therefore, it is necessary to develop other methods. This paper presents the development of an early evaluation technique in the greenhouse by mycelial contamination. It consists of inoculating young plants at the 4 leaves stage by simple contact of the root system with barley grain infected by *S. sclerotiorum*. Varietal evaluation is based on two criteria : the development of symptoms over 25 to 45 days and the percentage of plants destroyed. This method allowed us to obtain high levels of destruction on very susceptible varieties (>50%) and to compare varieties with a wide range of attack levels. The final evaluation of varieties is generally possible 30 days after the inoculation date. Results are relatively well-correlated with those obtained in the field. The main difficulty of this method is the strict and continuous assessment of substrates, watering, temperatures and lighting. It is possible to test 30 to 40 varieties at one time in about 50 days.

INTRODUCTION

La lutte génétique est à l'heure actuelle la seule parade efficace contre les attaques de *Sclerotinia sclerotiorum* au collet, la contamination ayant généralement pour origine le contact mycélien d'un sclérote avec les racines. Depuis plusieurs années des chercheurs tentent de décrire les caractéristiques de la résistance à cette maladie, de créer des variétés résistantes et sont donc amenés à expérimenter des techniques de contamination artificielle en conditions contrôlées (Tourvieille *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1993; Grèzes-Besset *et al.*, 1994). Parallèlement, des évaluations du comportement de génotypes sont réalisées au champ, soit à des fins de validation de ces techniques, soit pour qualifier en conditions naturelles, les variétés commercialisées. Le CETIOM pratique de telles évaluations au champ par un dispositif très lourd (témoin sensible adjacent à chaque variété), aussi a-t'il été amené à mettre au point un test d'évaluation en serre (Pérès, 1993 et 1996). Rapidement, celui-ci s'est avéré insuffisant par son manque de performance face à l'augmentation permanente du nombre de variétés arrivant sur le marché et nécessitant une évaluation face à cette maladie. En s'appuyant sur les bases d'une méthode mise au point par la société Sanofi Elf Bio Recherches (Grèzes-Besset *et al.*, 1994), le CETIOM pratique depuis 2 ans une méthode d'évaluation précoce en serre en réalisant une contamination des racines par grains d'orge infectés par *S. sclerotiorum* au stade 4 feuilles. La présente étude rend compte des résultats obtenus avec cette méthode.

MATERIELS ET METHODES

(1) Culture du champignon

a- Une production abondante de mycélium est réalisée *in vitro* sur milieu PDA par le mise en culture de sclérotés de *S. sclerotiorum* sélectionnés pour leur aptitude à émettre abondamment du mycélium (durée : 10-12 jours en incubateur à 20°C)

b- On inocule avec le mycélium obtenu un substrat d'orge contenu dans des fioles de Roux par dépôt d'implants de milieu PDA colonisé par *S. sclerotiorum* (4 implants par fiole). Le substrat orge est constitué dans chaque fiole de 100g de grains d'orge additionné de 100ml d'eau, autoclavé deux fois 20 minutes.

c- Le substrat orge inoculé est placé en incubateur obscur pendant 10 jours à 21°C. Chaque fiole est secouée quotidiennement pour homogénéiser la contamination des grains d'orge.

d- Le 11ème jour, l'orge contaminée est étalée entre un lit de terreau (75%)+vermiculite (25%) et une couche de couverture de perlite (5cm), l'ensemble étant humidifié. On utilise comme contenants des bacs ALLIBERT 600 x 400 x 170. Dans chacun de ces bacs les opérations précédentes sont réalisées comme suit :

- verser 13 litres du mélange terreau+vermiculite dans chaque bac
- étaler 150 g d'orge contaminée - Bien égaliser
- recouvrir d'une couche de perlite (5 cm)

c- Recouvrir chaque bac d'un film plastique noir et laisser incuber pendant 2 jours à 20-22°C

(2) Culture des plantes

a- Les graines des variétés à analyser sont mises à pré-germer à l'obscurité sur buvard humide.

b- Elles sont ensuite repiquées en pots de 13cm x 12cm remplis d'un mélange terreau + vermiculite (75% + 25%).

c- Les plantes obtenues sont conduites jusqu'au stade 4 feuilles (20 j env) et le substrat arrosé quotidiennement avec une solution nutritive (Kristalon et/ou Optacot)

(3) Infection des plantes

a- On dépose chaque plante au stade B4 et on repique la motte dans la couche de perlite de telle sorte que les racines soient au contact du lit d'orge contaminé (8 plantes ou pots /bac)

b- On continue à arroser le substrat sans excès avec la solution nutritive (400ml/jour/bac) jusqu'au stade B6-B8. On complète ensuite l'apport de solution nutritive par de l'eau selon demande des plantes.

Après 5 à 8 jours, les premiers flétrissements de plantes témoignent des attaques de *S. sclerotiorum* sur le système racinaire ; les notations de plantes malades peuvent alors débuter.

Remarque importante

On surveille quotidiennement les paramètres environnementaux, en particulier :

- la température pour éviter les pics de chaleur, la température optimale se situant entre 18°C et 21°C

- l'arrosage qui doit être suffisant mais sans excès et très équitablement réparti entre les bacs

- l'éclairage d'appoint matin et soir pour éviter l'étiollement des plantes (16 heures de jour)

- l'état sanitaire du substrat (contaminations possibles par des hyperparasites tels que *Trichoderma viridae*)

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est de type blocs de Fisher à 4 répétitions, la parcelle élémentaire étant le bac ALLIBERT contenant 8 plantes, soit : 8 plantes (1 bac) x 4 répétitions = 32 plantes par variété. 46 variétés ont été évaluées en 1998 et 16 variétés en 1999.

Observations

L'évaluation du comportement des variétés vis-à-vis de la maladie repose sur la notation bi-hebdomadaire des plantes attaquées. Est considérée comme plante attaquée toute plante flétrie présentant au collet une pourriture molle beige-clair typique de *S. sclerotiorum*. La durée du suivi d'environ 45 jours permet pour chaque variété de noter le temps de latence, d'établir la cinétique d'attaque et de déterminer le taux final d'attaque (qui se rapporte à la date de notation au delà de laquelle l'attaque se stabilise). Les résultats sont exploités statistiquement par une analyse de variance et un test de Newman-Keuls. La fiabilité de la méthode est jugée sur la répétabilité des résultats dans le temps et la comparaison des résultats avec ceux obtenus au champ en condition de contamination naturelle.

RESULTATS

Etude conduite en 1998 Les cinétiques d'attaque discriminent bien les différentes variétés (Fig.1). Dès le début, les temps de latence qui varient selon les variétés entre 10 jours et 27 jours (Tableau 1) donnent une première indication de la réaction des variétés à l'agression fongique. L'attaque est stabilisée pour toutes les variétés le 38ème jour après la contamination (Fig.1). Il apparaît à cette date des comportements variétaux finaux très différents allant de l'état de variétés indemnes (0% d'attaque) à l'état de variétés très sensibles (75% d'attaque). La comparaison des résultats avec ceux obtenus au champ sur 13 variétés communes révèle une bonne cohérence pour les 9 variétés manifestant une attaque en serre (T2) . Pour les 4 variétés indemnes en serre, les taux d'attaque au champ sont également faibles (<15%). La corrélation statistique entre serre et champ sur l'ensemble de ces résultats est hautement significative ($r=0,819$). Rappelons que Grèzes-Besset et al (1994) observent aussi entre résultats de serre et résultats du champ une corrélation significative ($r = 0,797$).

Fig. 1 : Cinétiques d'évolution des % d'attaques de *Sclerotinia* au collet de 46 variétés (étude 1998)

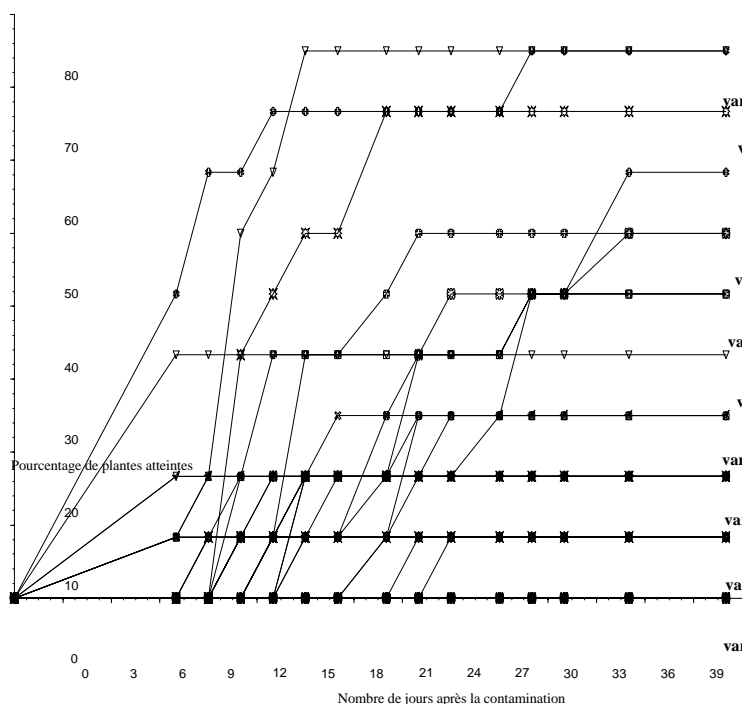


Tableau 1 : Temps de latence de la maladie sur les variétés ayant exprimé une attaque (étude 1998)

Codes des variétés	Temps de latence en jours
9 - 14 - 15 - 23	10
10 - 16 - 17	12
1 - 18 - 24	14
11	15
3 - 5 - 25	16
2 - 19	17
6 - 12 - 20 - 21 - 22 - 26 - 27	18
4 - 13	22
28 - 29	23
7	24
30	25
8 - 31	27

Etude conduite en 1999

L'attaque finale mesurée 25 jours après la contamination (Tableau 3) permet, comme en 1998, une bonne discrimination variétale dans une gamme toutefois un peu moins large (0% à 46,4% de plantes attaquées par *S. sclerotiorum* au collet). Les variétés testées ayant fait l'objet d'une première évaluation en 1998 selon la même méthodologie, il a été possible de comparer les résultats entre les deux études (Tableau 4). Sur les 14 variétés comparées, 11 d'entre-elles révèlent des comportements sensiblement équivalents entre les deux études ($r=0,940^{**}$). Pour les trois autres variétés (n° 20, 23 et 38), les résultats sont différents. Néanmoins, le calcul de corrélation intégrant la totalité des 14 variétés reste encore significatif au seuil de 4% ($r=0,546$). Enfin, une comparaison pluriannuelle sur 3 ans des résultats sur le témoin de sensibilité et une variété tolérante (intégrant la notation d'une étude préliminaire de 1997) montre un comportement stable des deux types variétaux au cours du temps (Tableau 5).

Tableau 2 : Comparaison des % d'attaques de *Sclerotinia* au collet entre essais de serre de champ en 1998

Codes variétés	% attaque en serre	% d'attaque au champ
5	41,7	35,0
7	41,7	36,2
8 (<i>témoin de sensibilité</i>)	41,7	52,0
11	25,0	13,3
18	16,7	11,9
21	16,7	15,7
22	16,7	25,4
23	8,3	11,3
29	8,3	10,7
33	0	15,6
34	0	14,9
35	0	12,7
36	0	14,4

Tableau 3 : % de plantes attaquées par *Sclerotinia* au collet sur 16 variétés (étude 1999)

Codes des variétés	% de plantes attaquées	Test Newman-Keuls
8 (<i>témoin de sensibilité</i>)	46,4	a
38	39,3	a
23	28,6	ab
10	21,4	ab
9	17,9	ab
25	17,9	ab
29	14,3	ab
16	14,3	ab
39	10,7	ab
47	7,1	ab
40	7,1	ab
42	3,6	b
41	3,6	b
48	0	b
43	0	b
20	0	b

Tableau 4 : Comparaison des % d'attaque de *Sclerotinia* entre l'étude de serre 1998 et l'étude de serre 1999

Codes des variétés	Etude de serre 1998	Etude de serre 1999
8 (<i>témoin de sensibilité</i>)	41,7	46,4
10	25,0	21,4
16	16,7	14,3
19	16,7	17,8
20	16,7	0
23	8,3	28,6
25	8,3	17,8
29	8,3	14,3
38	0	39,3
39	0	10,7
40	0	7,1
41	0	3,6
42	0	3,3
43	0	0

Tableau 5 : Comparaison pluriannuelle en serre des % de plantes attaquées au collet sur une variété sensible et une variété tolérante

Codes variétés	Etude 1997	Etude 1998	Etude 1999
	(Etude préliminaire)		
8 (<i>témoin de sensibilité</i>)	80	41.7	46.4
29 (variété tolérante)	20 (25)*	8.3 (20)*	14.3 (31)*

* : % du témoin de sensibilité

CONCLUSION-DISCUSSION

Cette méthode qui permet l'évaluation en conditions artificielles de serre du comportement de variétés de tournesol vis-à-vis de l'attaque de *S. sclerotiorum* au collet révèle un certain nombre d'avantages.

Elle s'avère fiable, les résultats obtenus étant bien corrélés avec ceux obtenus au champ et bien corrélés entre les deux années de mise en application de la méthode.

Elle donne une réponse rapide car elle est basée sur l'application d'une contamination précoce au stade 4 feuilles du tournesol (durée du test : 50 jours environ).

Elle est discriminante, les variétés exprimant des taux d'attaque sur une gamme de sensibilité très large.

Elle est performante car peu consommatrice en espace de serre (46 variétés testées en 1998).

Enfin, elle est peu coûteuse en matériel.

Par contre, elle nécessite une exigence méthodologique très forte sur trois points essentiels :

- une coordination très précise des différentes actions à conduire (culture du champignon - culture des plantes à contaminer - contamination)
- une réussite totale des trois actions pré-citées (l'échec de l'une des trois actions conduit généralement à l'échec de la méthode)
- un suivi quotidien du test (contrôle et ajustements fréquents des paramètres environnementaux - observations symptomatologiques)

BIBLIOGRAPHIE

Grèzes-Besset B., Tournade G., Arnould O., Urs R., George P., Castellanet P. and Toppan A. - 1994 - A Greenhouse Method to Assess Sunflower Resistance to *Sclerotinia* Root and Basal Stem Infections - Plant Breeding 112, 215-222

Nelson B.D. and Christianson T. - 1993 - Characteristics of resistance in sunflower to *Sclerotinia sclerotiorum* - Sunflower Research Workshop - January 14 & 15, 1993 - Proceedings - pp 1-20

Pérès A. 1993 - *Sclerotinia* au collet du tournesol : contrôler la contamination Cetiom-Proléa, Oléoscope 13 - pp 22-23

Pérès A. 1996 - *Sclerotinia sclerotiorum* : méthode d'évaluation des comportements variétaux en serre vis-à-vis de l'attaque sur bourgeon terminal et de l'attaque au collet - ISA - Symposium I - Disease Tolerance in Sunflower Beijing (PR. China) 13 June 1996 pp 64-68

Tourvielle D. et Vear F. - 1990 - Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers. III. Study of reactions to artificial infections of roots and cotyledons - agronomie 10, 323-330