

Projet Sclerotinia sclerotiorum : meilleure connaissance du champignon pathogène, évaluation du risque et évaluation de méthodes de protection

François Villeneuve, Christel Leyronas, Philippe C. Nicot, Marc Bardin,
Vincent Faloya

► **To cite this version:**

François Villeneuve, Christel Leyronas, Philippe C. Nicot, Marc Bardin, Vincent Faloya. Projet Sclerotinia sclerotiorum : meilleure connaissance du champignon pathogène, évaluation du risque et évaluation de méthodes de protection. Innovations Agronomiques, INRAE, 2019, 71, pp.401-413. 10.15454/vkn5jf. hal-02627650

HAL Id: hal-02627650

<https://hal.inrae.fr/hal-02627650>

Submitted on 26 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Projet *Sclerotinia sclerotiorum* : meilleure connaissance du champignon pathogène, évaluation du risque et évaluation de méthodes de protection

Villeneuve F.¹, Leyronas C.², Nicot P.C.², Bardin M.², Faloya V.³

¹ CTIFL – Centre opérationnel de Lanxade, 28, route des Nébouts, F-24130 Prignonrieux

² INRA – Pathologie Végétale, CS 60 094 - Domaine Saint Maurice, F-84143, Montfavet Cedex

³ INRA – UMR IGEPP, Domaine de la motte, BP 35327, F-35653 Le Rheu Cedex

Avec la collaboration de l'ensemble des participants au projet Sclérolég :

Jean Michel Lhote, Samuel Menard (ACPEL), Marc Benigni (APEF), Françoise Henry-Leix (Cefel), Marie Torres, François Latour, Peter Prince, Christine Fournier (CTIFL), Maxime Davy (CTIFL/Sileban), Magali Duffaud, Claire Troulet (INRA, Unité de Pathologie végétale Montfavet), Loïc Daniel (INRA UMR IGEPP Rennes), Stéphan Plas, Sarah Bellalou, Renaud Galland (Invenio), Emilie Robillard (Sileban), Annette Penaud (Terres Inovia), Anne-Sophie Kouassi, Olivier Favaron, Laurent Nivet (Unilet).

Correspondance: Villeneuve@ctifl.fr

Résumé

Le champignon phytopathogène *Sclerotinia* représente ces dernières années un problème croissant pour les producteurs du fait d'une recrudescence des dégâts et de moyens de protection ne donnant pas satisfaction. Les objectifs du projet Sclérolég visent à proposer aux producteurs des stratégies de protection combinant différentes techniques pour une meilleure maîtrise de *Sclerotinia*. Le premier axe a cherché à combler le manque de connaissances sur la variabilité du pathogène et à mieux comprendre le développement des épidémies et les processus épidémiologiques clefs mis en jeu. Par ailleurs le deuxième axe a été d'évaluer des outils de prévisions des risques ainsi que de développer de nouveaux outils. Enfin la combinaison de différentes techniques de protection Sclérolég a été expérimentée et évaluée pour proposer aux producteurs des systèmes de production innovants et durables.

Les souches de *S. sclerotiorum* caractérisées dans le cadre du projet se sont montrées très diverses au niveau génétique et en capacité de faire des symptômes sur l'ensemble des cultures testées, ce qui confirme l'absence de spécialisation d'hôte. Différents tests ont été mis au point en particulier pour caractériser l'agressivité du pathogène. Concernant le processus infectieux, le projet a montré toute l'importance que revêtent les ascospores en particulier pour les cultures de melon. La présence de *Sclerotinia subartica* a été détectée pour la première fois en France mais reste très minoritaire par rapport à *S. sclerotiorum*. Concernant la quantification de l'inoculum du sol, deux techniques originales de quantification ont été mises au point : l'élutriation et l'utilisation de carottes pièges. En termes de gestion du potentiel infectieux des parcelles, certains points sur le comportement de *C. minitans* (CONTANS®) sont approfondis. Enfin, les agents de biocontrôle expérimentés dans le cadre de Sclérolég n'ont pas permis d'obtenir un contrôle satisfaisant du bioagresseur.

Mots-clés : diversité génétique, test d'agressivité, ascospores, prévision, biocontrôle

Abstract: Project *Sclerotinia sclerotiorum*: Better knowledge of the pathogenic fungus, risk assessment and assessment of protection methods

The fungus *Sclerotinia* has been an increasing problem for producers in recent years due to increasing damages and unsatisfactory means of protection. The objectives of the Sclérolég project were to offer to

growers some protection strategies combining different techniques for a better control of sclerotinia. The first axis sought to fill the knowledge gap on the variability of the pathogens and also to better understand the development of epidemics and the key epidemiological processes involved. In addition, one of the objectives was to evaluate risk prediction tools and develop new tools. Finally, the combination of different protection techniques was tested and evaluated to offer producers innovative and sustainable production systems in Scleroleg. The strains of *S. sclerotiorum* characterized in the project were very diverse at the genetic level and in their ability to cause symptoms in all the crops tested, which confirms the absence of specialization. Various tests were developed in particular to characterize the aggressiveness of the pathogen. Concerning the infectious process, the project showed how important ascospores are, especially for melon cultures. *Sclerotinia subartica* was reported for the first time in France. Concerning the quantification of soil inoculum, two original quantification techniques were developed: elutriation and the use of trap cores. In terms of managing the infectious potential of the plots, some points on the behavior of *C. minitans* (CONTANS®) were examined in details. Finally, the biocontrol agents experimented in Scleroleg did not provide satisfactory control of the pest infestation.

Keywords: genetic diversity, aggressiveness test, ascospores, prediction, biocontrol

Introduction

Depuis de très nombreuses années, les maladies dues au champignon *Sclerotinia sclerotiorum* posent des problèmes aux producteurs qui sont plus ou moins bien maîtrisés par des interventions chimiques essentiellement préventives. Néanmoins, au cours de ces dernières années, les dégâts sont plus prégnants tant pour les cultures légumières que pour les protéagineux et cela malgré l'emploi de quatre leviers d'action contre ce bioagresseur (i) les techniques culturales pour réduire le potentiel d'inoculum du sol et/ou maîtriser l'architecture du couvert, (ii) des moyens biologiques, (iii) des outils de prévision des risques et (iv) l'utilisation de variétés moins sensibles. Les stratégies de protection mises en œuvre contre *S. sclerotiorum* restent fondées sur l'application de produits phytopharmaceutiques, rendant difficile l'obtention des objectifs d'ECOPHYTO 2018.

L'évolution des pratiques agricoles a favorisé le développement des cultures d'oléagineux, l'utilisation des Cultures Intermédiaires Pièges à Nitrates (CIPAN) ou encore la mise en œuvre de techniques comme la biofumigation à base de brassicacées, toutes des plantes sensibles à *Sclerotinia*. Ces nouvelles évolutions de pratiques agricoles ont complexifié la maîtrise de ce champignon d'une part en créant un véritable "corridor végétal" permettant au pathogène de se maintenir sur les cultures tout au long de l'année et d'autre part en générant un risque d'augmentation du potentiel d'inoculum du sol.

Face à cette situation, beaucoup d'interrogations émergent. Nonobstant l'abondante littérature sur *Sclerotinia*, il subsiste des lacunes dans la connaissance du pathogène pour les cultures légumières (variabilité, processus épidémiologiques, phase tellurique). La protection existante est aléatoire et non durable. Il est impératif de développer des leviers innovants et efficaces permettant une protection durable et économe en intrants phytosanitaires et une gestion agro-écologique des cultures.

Le projet Sclérolég, soutenu financièrement par le CASDAR et labellisé par le GIS PIClég, a eu pour objectif de proposer aux producteurs de légumes des techniques de protection alternatives pour une meilleure gestion de *Sclerotinia* tout en ayant une production de qualité et en respectant l'environnement.

Le projet Sclérolég, débuté en 2014 et terminé en juin 2017, a réuni de nombreux partenaires, à savoir le CTIFL (centres opérationnels de Lanxade et de Balandran), l'INRA (centres de Rennes et d'Avignon), Terres Inovia, l'UNILET ainsi que les stations d'expérimentation régionales : ACEPEL, APEF, CEFEL, INVENIO et SILEBAN. Sur une durée de trois ans et demie, plusieurs cultures ont été étudiées -comme la carotte, le colza, le haricot, l'endive et le melon- de façon à comprendre les processus

épidémiologiques de la maladie et acquérir des connaissances solides sur l'agent pathogène. Il s'agissait plus précisément de :

- (i) mieux connaître la variabilité de l'agent pathogène, comprendre le développement des épidémies au champ afin de mieux intégrer et combiner les pratiques ;
- (ii) évaluer et/ou valider les outils existants de prévisions des risques et développer de nouveaux outils d'aide à l'expérimentation (dynamique de l'inoculum du sol...) pour mieux cibler et rechercher de nouveaux leviers d'action ;
- (iii) mettre au point, expérimenter et évaluer la combinaison de différentes techniques de protection complémentaires pour proposer aux producteurs des systèmes de production innovants et durables.

1. Diversité génétique de *Sclerotinia sclerotiorum* en France

Le travail entrepris a permis de constituer une large collection de souches (plus de 2 000) provenant à la fois de symptômes sur diverses cultures (carotte, colza, endive, haricot, melon, laitue), de sclérotés présents dans le sol et de captures d'ascospores présentes dans l'air. Les objectifs de la constitution de la collection de souches étaient de pouvoir répondre à deux questions initiales du projet : (i) : existe-t-il une différence entre les populations de *Sclerotinia* du nord et celles du sud de la France ? ; (ii) la structuration génétique des populations est-elle liée aux plantes hôtes ?

L'évaluation de la diversité a été effectuée à l'aide de 16 marqueurs microsatellites, ce qui a permis d'obtenir un profil génétique (haplotype) pour plusieurs centaines de souches de la collection. À la fin du projet, un haplotype complet a été obtenu pour 200 souches de *S. sclerotiorum* prélevées sur plantes (Figure 1). Dans ces 200 souches, 128 profils haplotypiques différents ont été identifiés, ce qui équivaut à une diversité haplotypique de 0,63 (0 étant la valeur de diversité la plus faible et 1 la plus élevée). Trente-cinq haplotypes étaient portés par au moins deux souches (les souches ayant le même haplotype sont potentiellement identiques). Dix d'entre eux étaient portés par des souches collectées sur des espèces végétales différentes. Les souches possédant le même haplotype pouvaient avoir été collectées sur des sites distants de 700 km comme par exemple les souches collectées dans le sud-ouest sur carotte et les souches collectées dans le nord sur endive (Leyronas *et al.*, 2018a) (Figure 2).

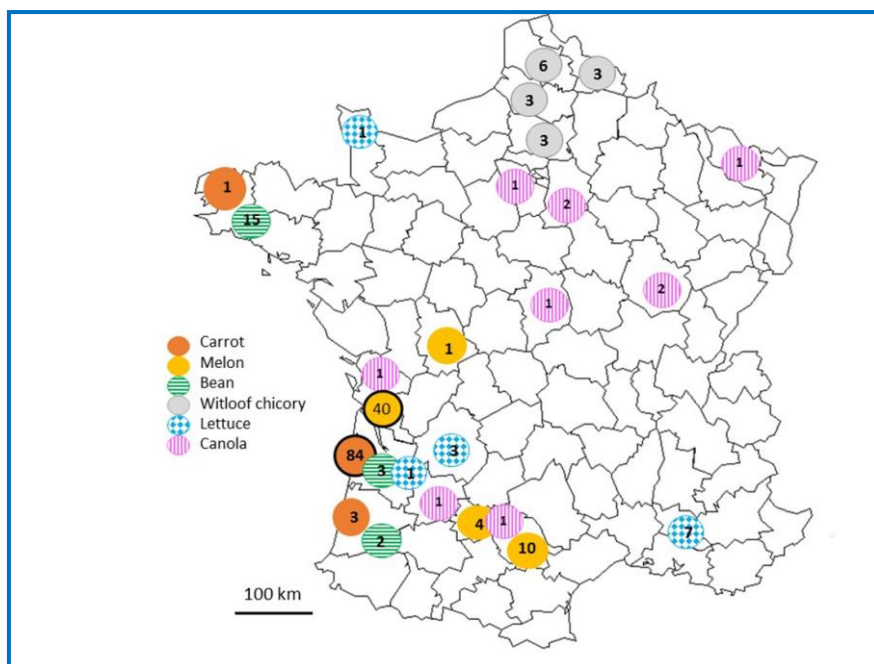


Figure 1 : Répartition des 200 souches collectées sur plantes pour lesquelles un profil haplotypique complet a été obtenu (Projet Sclérolég).

L'étude de la structure génétique des 200 souches collectées sur plantes a montré que la plante hôte n'est pas le facteur qui structure les groupes génétiques. En revanche, il semble que les souches de *S. sclerotiorum* soient légèrement géographiquement structurées, avec un groupe génétique un peu plus fréquent au nord-ouest et un autre un peu plus fréquent au sud-est. Cependant, pour confirmer cette tendance, de nouvelles souches collectées sur plantes et des analyses plus poussées sont nécessaires.

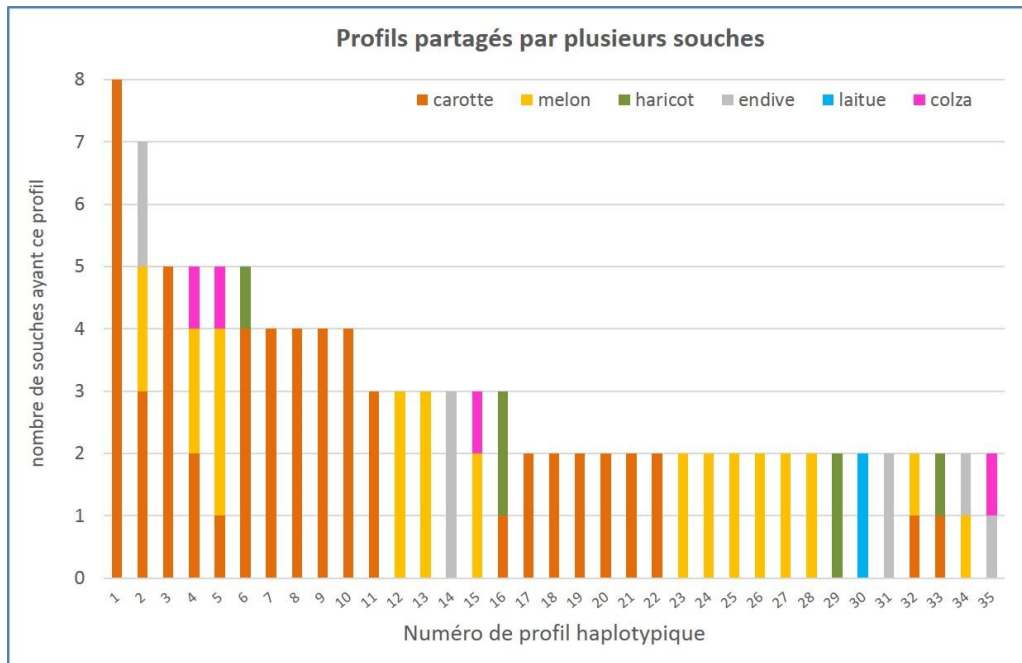


Figure 2 : Origine des souches partageant le même profil haplotypique (et donc potentiellement identiques) (Projet Sclérolég).

Concernant les souches collectées dans l'air, leur diversité haplotypique varie de 0,55 à 0,94 selon les régions (Leyronas *et al.*, 2018b, c). Comme pour les souches collectées sur plantes, des souches aériennes collectées dans des régions éloignées peuvent présenter le même profil génétique (et donc être potentiellement identiques), ce qui soulève la question des échanges d'inoculum à longue distance via l'atmosphère (Leyronas *et al.*, 2018b).

2. Premier signalement de la présence de *S. subarctica* en France

Sclerotinia subarctica est une espèce identifiée relativement récemment (Holst-Jensen *et al.*, 1998) qui provoque les mêmes symptômes que *S. sclerotiorum*. Les deux espèces ne sont pas distinguables par des critères morphologiques. *S. subarctica* a, initialement, été décrite sous des latitudes septentrionales. Dans les années 2010, l'espèce a été répertoriée en Norvège, Suède, Ecosse et dans le centre de l'Angleterre. La présence de cette espèce a été recherchée dans la collection de souches françaises générée par le projet Sclérolég. Sur les 969 souches testées, une seule s'est révélée être *S. subarctica*. Elle a été collectée sur endive au forçage en 2011. Ceci constitue la première identification de la présence de cette espèce en France, sur endive, et à une latitude plus au sud que toutes les autres précédemment répertoriées (Leyronas *et al.*, 2018d).

3. Spécialisation parasitaire de *Sclerotinia sclerotiorum* en fonction de la plante hôte

L'objectif spécifique de travaux réalisés à l'INRA d'Avignon, au Ctifl de Balandran et Lanxade, à Terres Inovia, à l'Unilet et à l'APEF était de tester l'agressivité de souches de *S. sclerotiorum* collectées en France et prélevées sur différentes plantes hôtes (carotte, colza, endive, haricot, laitue, melon, moutarde brune et tomate).

Ce travail a nécessité la mise au point de tests quantitatifs pour évaluer la diversité d'agressivité de souches de *S. sclerotiorum*. Ces tests ont montré l'importance de la technique à mettre en œuvre pour avoir une bonne 'répétabilité' des résultats: plante entière/organe détaché ; localisation de l'inoculum (par exemple, la base des carottes s'est avérée plus sensible que la proximité du collet), âge de l'inoculum et milieu nutritif pour la production de l'inoculum.

Après cette mise au point des tests quantitatifs (Tableau 1), les questions suivantes ont été abordées : (i) les souches de *S. sclerotiorum* sont-elles capables d'attaquer l'ensemble des espèces végétales testées ? ; (ii) existe-il une diversité d'agressivité entre différentes souches de *S. sclerotiorum* sur une espèce végétale donnée ? ; (iii) l'agressivité des souches de *S. sclerotiorum* est-elle similaire d'une espèce végétale à une autre ? ; (iv) y a-t-il un lien entre l'hôte d'origine des souches et leur niveau d'agressivité ?

Tableau 1 : Quelques caractéristiques des tests d'agressivité effectués dans le cadre du projet Sclérolég. « CTIFL Lx » = Centre opérationnel de Lanxade ; « CTIFL BI » = Centre opérationnel de Balandran.

	Carotte	Colza	Endive	Haricot	Melon	Moutarde brune
Réalisés par	CTIFL Lx Sileban	Terres Inovia	APEF	CTIFL Lx Unilet	CTIFL BI INRA Avignon	Ctifl BI
Type de test	Sur racines	Feuilles détachées	Sur racines	Straw test	Feuilles détachées	Feuilles détachées
Nombre d'organes	10 racines	(5 plantes – 2 feuilles) X 2	10 racines	5 plantes X 4	5 plantes – 2 feuilles	10 plantes – 1 feuille
Lecture après inoculation	96 heures	48 heures	96 heures	96 heures	48 heures	48 heures

Les 116 souches de *S. sclerotiorum* utilisées dans cette étude ont été choisies dans la collection de souches sur la base de leur appartenance à des génotypes différents (caractérisés à l'aide de neuf microsatellites) et de leur plante hôte d'origine (cinq espèces végétales : haricot (21), melon (28), carotte (25), endive (11), et colza (11)). Ces souches ont originellement été prélevées sur des plantes (96 souches) ou dans l'air (20 souches) dans des parcelles contaminées par le champignon en France.

L'analyse des résultats obtenus par l'ensemble des partenaires a révélé que toutes les souches testées lors de cette étude sont capables d'attaquer l'ensemble des huit espèces végétales évaluées (Figure 3) confirmant le caractère très polyphage du champignon *S. sclerotiorum*.

En revanche, il a été observé des différences d'agressivité entre les souches. Cependant, une grande partie des souches testées n'ont pas une agressivité significativement différente les unes des autres. En dehors de la majorité des souches dont le niveau d'agressivité est proche, quelques souches présentent des différences d'agressivité significatives entre elles.



Figure 3 : Exemple de lésions sur organe végétal détaché obtenues avec une souche de *S. sclerotiorum*.

Dans notre étude, les souches ont été prélevées sur des plantes hôtes différentes. Cette méthode d'échantillonnage nous a permis de vérifier s'il existe un lien entre l'hôte d'origine de la souche et son agressivité sur une plante hôte donnée. Ainsi sur melon, quel que soit l'hôte de prélèvement des souches, il n'y a pas de différence d'agressivité (Figure 4). Les résultats mettent en évidence qu'il n'existe pas de lien pour la plupart des espèces végétales (melon, laitue, tomate, carotte, colza, moutarde brune) (Tableau 2). Ce n'est pas le cas par exemple sur endive où les souches provenant de carotte sont significativement moins agressives sur cette plante que des souches provenant d'endive ou haricot (Figure 4). L'ensemble des résultats obtenus va dans le sens d'une absence de spécialisation parasitaire claire chez *S. sclerotiorum*.

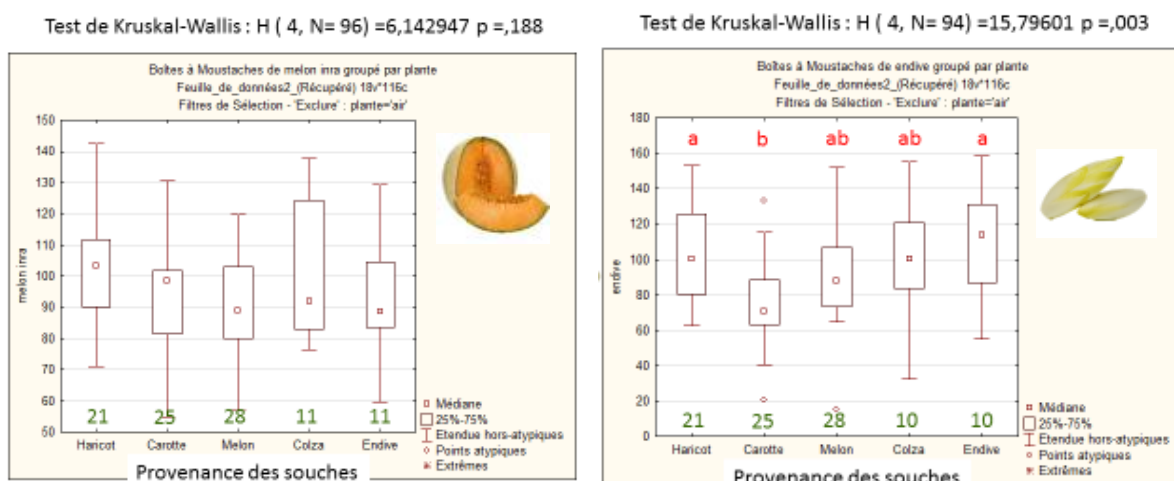


Figure 4 : Répartition des indices d'agressivité des souches de *S. sclerotiorum* sur melon et sur endive selon leur hôte d'origine de prélèvement (Projet Scérolég).

Tableau 2 : Pourcentage moyen d'agressivité (IA) des souches provenant des 5 plantes hôtes de prélèvement (haricot, carotte, melon, colza et endive) sur les différentes plantes testées (melon, laitue, tomate, moutarde brune, endive, carotte, colza). Le lien statistique entre provenance des souches et agressivité sur plante est testé par une analyse de variance non paramétrique (test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$) (Projet Sclérolég).

	Provenance des souches					Kruskal Wallis P =
	Carotte	Colza	Endive	Haricot	Melon	
Carotte (Ctifl)	143	93	133	162	147	0,06
Carotte (Sileban)	100	160	146	102	119	0,08
Colza	89	58	97	100	89	0,14
Endive	70	135	132	81	101	0,00
Haricot	103	80	85	104	98	0,03
Laitue	83	106	88	82	93	0,25
Melon (Inra)	102	92	108	93	84	0,19
Melon (Ctifl)	123	82	105	104	94	0,34
Moutarde brune	99	83	140	79	114	0,12
Tomate	96	104	136	99	94	1,00

4. Évaluation du potentiel infectieux des parcelles

Le volet tellurique de *S. sclerotiorum* fait partie des traits de vie à bien comprendre dans le cadre de la gestion de ce parasite. Environ 90% du cycle se fait sous forme de sclérotés -donc dans le sol- avec une durée de survie estimée à au moins sept ans et jusqu'à onze ans (Adams et Ayers, 1979). Pour certaines cultures, une relation a pu être mise en évidence entre la distribution spatiale, la densité de sclérotés et le niveau de dégâts, par exemple chez la laitue avec *S. minor* (Dillard et Grogan, 1985).

L'évaluation du potentiel infectieux d'une parcelle, par l'énumération du nombre de sclérotés présents dans des échantillons de sol, est un travail long et fastidieux. De manière traditionnelle, l'énumération se fait par tamisage puis tri dans les débris organiques parfois avec des aides comme la flottaison dans une solution de sucre, ou la mise sur milieu de culture après dilutions successives (Hoes et Huang, 1975 ; Adams, 1979). À partir de protocoles utilisés en routine dans le laboratoire pour la quantification de nématodes dans le sol, l'INRA-Rennes a, durant le projet, élaboré une méthode de quantification de sclérotés de *S. sclerotiorum* par élutriation. Le calibrage de la méthode à travers des échantillons de sols contenant un nombre connu de sclérotés a montré que l'on arrivait à retrouver 87,3% des sclérotés avec 8 à 25 % des sclérotés non repérés selon les échantillons. Le temps nécessaire au traitement d'un échantillon de sol est de quelques minutes de lavage et de 30 min à une heure de tri selon les sols. Cette méthode présente donc l'intérêt de déterminer une part importante des sclérotés du sol, avec, toutefois, deux limites : le risque de non détection d'une certaine quantité de sclérotés ; un temps de travail par échantillon de sol non négligeable.

Un total de 76 échantillons (dont 60 de 2015) a été traité. Ils provenaient de Charente Maritime (17), de la Manche (50), du Pas-de-Calais (62), de la Vienne (86) et du Tarn (81). Parmi ces échantillons, des sclérotés ont pu être détectés sur quatre sites (deux en Charente Maritime sur culture de melon, un dans la Manche et un en Aquitaine sur culture de carotte). *S. sclerotiorum* était présent dans 10 des 11 échantillons prélevés sur les sites de Charente Maritime, avec une densité moyenne de $2,4 \pm 0,6$ sclérotés par kg de sol. Dans la Manche et en Aquitaine, le nombre de sclérotés était proche de 1 par kg de sol.

Le seul comptage des sclérotés ne définit toutefois que partiellement le potentiel infectieux d'une parcelle : il faut également savoir si, d'une part, les sclérotés retrouvés sont viables et d'autre part, s'il y

a présence de mycélium dans le sol. Afin d'approcher cette connaissance, précieuse pour certaines cultures comme la carotte conservée l'hiver au champ, nous avons employé un test utilisant les carottes pour piéger le mycélium de *S. sclerotiorum* éventuellement présent dans les sols. Les carottes choisies dans une parcelle exempte de *Sclerotinia* sont préparées à travers plusieurs opérations : nettoyage à l'eau claire, désinfection par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5% pendant 3 minutes, rinçage dans de l'eau stérile dans trois bains successifs. Une fois « prêtes » au test, les carottes sont disposées horizontalement dans le sol à 10 cm de profondeur, puis, après un laps de temps donné (4 à 26 jours), elles sont placées dans des boîtes fermées mises à incuber à 12°C. Le nombre de carottes atteintes par *Sclerotinia* est ensuite comptabilisé quotidiennement.

La technique expérimentée permet de rendre compte et de quantifier la présence de mycélium de *S. sclerotiorum* dans le sol, à travers la fréquence des nécroses. Par contre, on ne sait pas si l'inoculum provient de mycélium déjà présent dans le sol ou d'une germination mycélienne des sclérotés (Tableau 3).

Tableau 3 : Résultats des tests d'élutriation et adéquatation avec le test carotte dans deux parcelles de carotte du Sud-Ouest (Projet Sclérolég).

Parcelle	Nombre de sclérotés retrouvés	Résultat du test carotte piège
INVENIO Ychoux Fleury	1 à 9 selon le prélèvement et l'année	Positif
INVENIO Ychoux Blagon	0	Négatif

Pour améliorer les connaissances sur certains traits de vie du mycélium éventuellement présent dans le sol, il s'est agi de déterminer la capacité du champignon à se maintenir et se développer en l'absence de plante hôte (capacité saprophytique). Afin d'étudier l'importance de la germination mycélienne de *S. sclerotiorum* et des facteurs qui la conditionnent, plusieurs essais ont été mis en place, concernant : (i) l'importance de la teneur en matière organique du sol sur le développement du mycélium dans le sol ; (ii) l'importance de la ressource nutritive (quantité) sur le développement du mycélium dans le sol, et sa capacité d'infection ; (iii) l'influence du type d'inoculum et de sa localisation sur l'importance des symptômes.

Nos suivis de la progression du mycélium dans le sol ont permis de mettre en évidence certains traits de la biologie du champignon : (i) la capacité de développement dans le sol (croissance du mycélium) avant infestation fortement liée à la quantité de nutriments disponibles ; (ii) une croissance faible en l'absence d'hôte, de l'ordre de 4 cm (Figure 5) ; (iii) une forte sensibilité à la compétition avec les autres micro-organismes du sol (lorsque la teneur en matière organique du sol augmente, ce qui le plus souvent induit une flore et une faune plus abondante, la croissance du mycélium ainsi que sa capacité à réussir une infection sont réduites) ; (iv) la sensibilité du mycélium à la teneur en CO₂ du sol (les infections réussies sur carotte sont significativement plus importantes lorsque le mycélium est proche de la surface du sol) (Tableau 4).

Tableau 4 : Pourcentage de carottes attaquées pour une inoculation à 90 jours après semis, notation à 110 jours, variété Dordogne, inoculum sous forme de grains d'orge placés à 1 cm des pivots (Projet Sclérolég).

Année	Profondeur		
	Collet	- 4 cm	- 8 cm
2015	3,7	3,1	3,5
2016	15,9	4,0	3,8

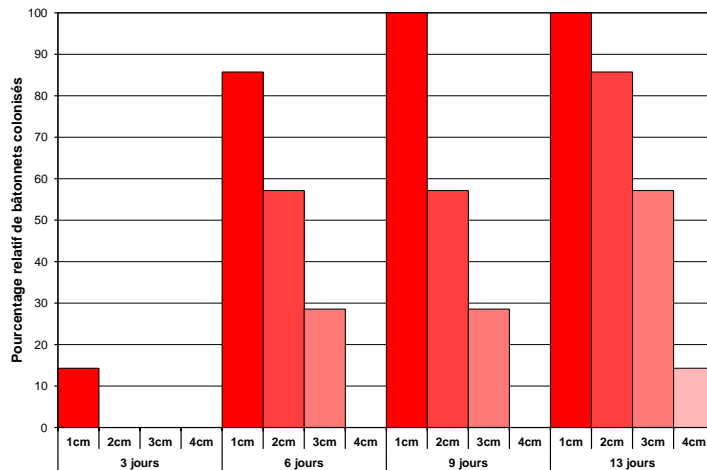


Figure 5 : Capacité de croissance du mycélium dans le sol estimée à partir du pourcentage relatif de bâtonnets placés à différentes distances colonisés par le sclérotinia, le point de départ étant un grain d'orge servant de base nutritive initiale (Prriet Sclérolén)

5. Importance de l'inoculum aérien

Pour suivre et quantifier les déplacements des ascospores, deux techniques ont été combinées : (i) des "blue plates" : boîtes de Petri contenant un milieu PDA additionné de Bleu de bromophénol, de triton, de pénicilline et de streptomycine (Steadman *et al.*, 1994) ; (ii) un piège volumétrique Burkard, qui permet d'échantillonner une quantité déterminée d'air, et de provoquer le dépôt des particules sur une "blue plate". L'air est échantillonné deux fois sept minutes. Les boîtes de Petri sont ensuite incubées au laboratoire pour permettre le développement des micro-organismes présents dans l'air. Le nombre de halos jaunes, dénotant une acidification du milieu par certains micro-organismes (dont *Sclerotinia*), est alors estimé (Figure 6).

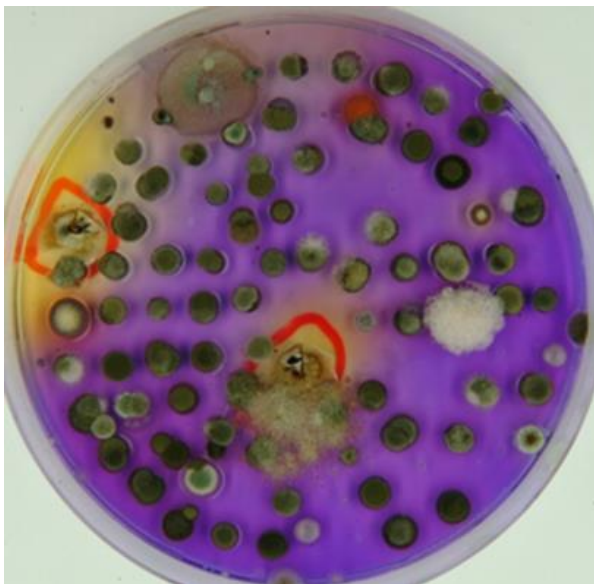


Figure 6 : Halo jaune occasionné par la germination des spores de *Sclerotinia* (photo F. Villeneuve, CTIFL).

La comparaison entre les sites suivis par le Sileban en Normandie, l'AcpeL dans le Centre-Ouest et Invenio en Nouvelle Aquitaine semble indiquer une certaine concordance des pics de captures (Figure 7). Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces pics, soit il y a une contribution non négligeable liée au déplacement des ascospores dans les masses d'air, soit dans certaines occasions, il peut y avoir concordance des conditions favorables à la germination carpogénique des sclérotés et l'émission des ascospores.

L'inoculum aérien de *S. sclerotiorum* a été collecté de 2014 à 2016 sur différentes parcelles dans quatre zones de production : région d'Arras pour l'endive, le Cotentin et la zone Landaise pour la carotte et le centre-ouest pour le melon. Dans la région d'Arras, les résultats montrent que des ascospores viables étaient présentes pendant 80% des dates d'échantillonnage (100 jours de collecte). Une corrélation significative entre l'abondance des ascospores dans l'air et l'humidité relative locale suggère une origine locale de l'inoculum. Cependant, l'existence d'une légère différenciation génétique entre les isolats véhiculés par des masses d'air provenant de l'ouest et du nord-ouest est compatible avec l'hypothèse d'une origine lointaine de l'inoculum de *S. sclerotiorum* (Leyronas *et al.*, 2018c). La présence de souches ayant des profils haplotypiques identiques et collectées dans l'air des quatre régions distantes (jusqu'à 700 km) semble indiquer des échanges d'inoculum aérien à longue distance (Leyronas *et al.*, 2018b).

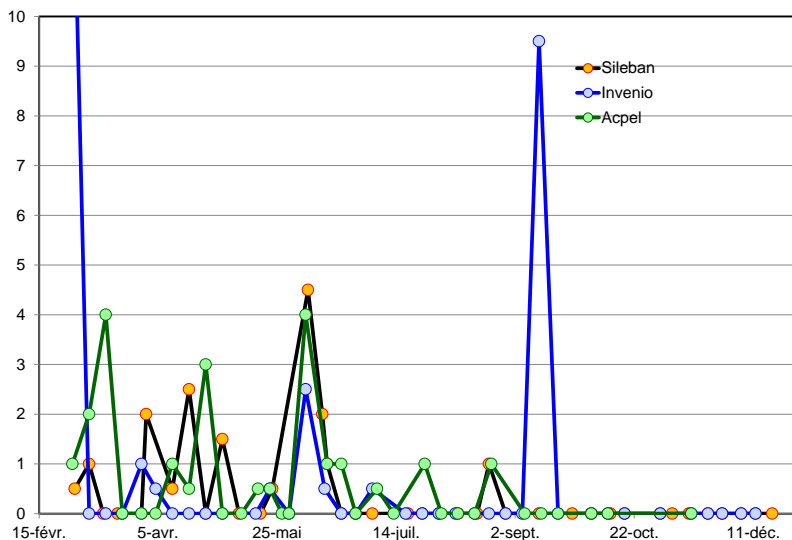


Figure 7 : Capture d'ascospores de *S. sclerotiorum* sur le site Bas-Normand suivi par le Sileban, le site du Centre Ouest suivi par l'AcpeI et dans le Sud-Ouest par Invenio (Projet Sclérolég).

6. Éléments pour une protection contre le *Sclerotinia* sans pesticide

Les travaux touchant la protection des cultures dans le cadre de Sclérolég ont essentiellement porté sur la réduction du potentiel infectieux que représentent les sclérotés contenus dans le sol.

Un point important étudié concerne les limites observées avec l'agent de biocontrôle, *Coniothyrium minitans* - CONTANS®. En effet, en plein champ, les producteurs obtiennent de bons résultats dans le nord de la France, alors que les résultats sont très décevants dans le sud, en particulier dans les cultures de carotte du Sud-Ouest. Deux hypothèses ont été explorées dans ce projet : (i) les souches de *S. sclerotiorum* présentes dans les parcelles agricoles ont des niveaux de sensibilité à *C. minitans* différents ; (ii) les souches de *S. sclerotiorum* présentes dans le Sud de la France sont moins sensibles à *C. minitans* que celles du Nord de la France.

Afin de tester ces hypothèses, il a été nécessaire de mettre au point des techniques standardisées pour obtenir des données quantitatives fiables et répétables. La première technique a consisté à produire des sclérotés de différentes souches de *S. sclerotiorum* et la seconde correspond à une méthode de confrontation entre les sclérotés de *S. sclerotiorum* et *C. minitans* en absence de microflore contaminante. L'effet du mycoparasite sur les sclérotés a été évalué de plusieurs manières pour comparer la sensibilité des souches de *S. sclerotiorum* : (i) présence du mycoparasite dans les

sclérotés ; (ii) capacité de germination mycéliogénique des sclérotés de *S. sclerotiorum* (Nicot *et al.*, 2016).

En fonction de son intensité, la colonisation des sclérotés de *S. sclerotiorum* par le mycoparasite aboutit à leur destruction totale ou bien à des destructions internes partielles. En réduisant la biomasse vivante de *S. sclerotiorum* dans les sclérotés, ces destructions partielles peuvent résulter en une croissance plus lente du champignon à partir des sclérotés, une fois ceux-ci déposés sur un milieu nutritif gélosé.

De grandes différences entre souches ont été observées (Figure 8). Pour certaines souches, l'infection des sclérotés par le mycoparasite se traduit effectivement par une réduction de la croissance mycélienne de *S. sclerotiorum* sur milieu gélosé. Par contre, pour une partie significative des souches, cette infection se traduit par une stimulation apparente (inhibition négative) de la croissance mycélienne.

Pour l'ensemble des critères étudiés, l'analyse des 75 souches a montré : (i) une grande diversité du niveau de sensibilité de *S. sclerotiorum* à *C. minitans*; (ii) l'absence de différences significatives entre les groupes de souches Nord et Sud pour la sensibilité à *C. minitans*. Cette situation est illustrée sur la Figure 7 pour l'effet de l'infection des sclérotés par *C. minitans* sur la croissance mycélienne de *S. sclerotiorum* sur milieu PDA. En moyenne, l'indice de réduction de croissance est de 9,95% pour le groupe des souches du Nord et de 2,91% pour le groupe du Sud de la France, mais cette différence n'est pas significative ($P=0,19$; test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

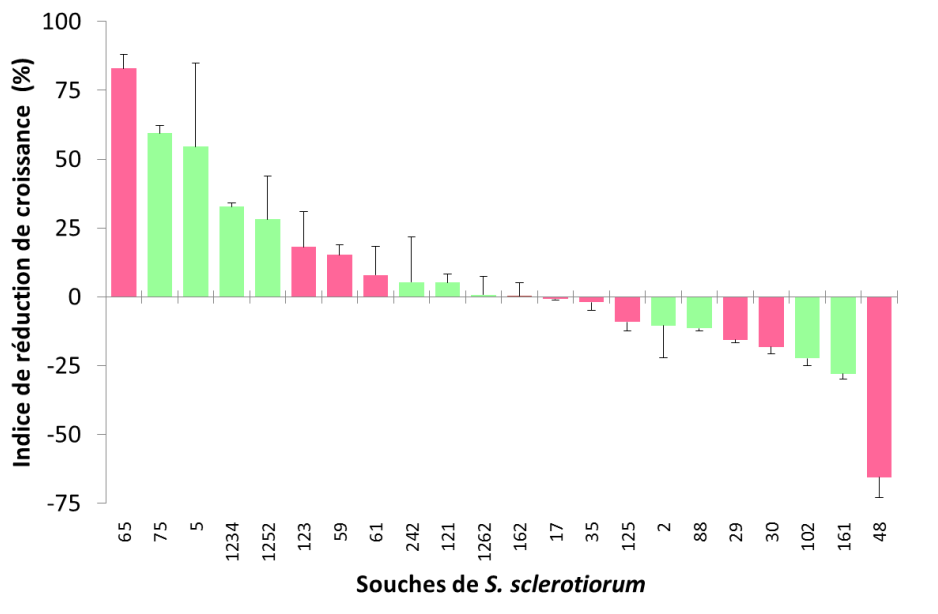


Figure 7 : Comparaison de la sensibilité à *C. minitans* de souches de *S. sclerotiorum* issues du Nord (en vert) et du Sud (en rose) de la France (données pour un échantillon de 22 souches, d'après Nicot *et al.*, 2016).

Les différences entre le Nord et le Sud de la France dans l'efficacité de la gestion biologique de l'inoculum tellurique de *S. sclerotiorum* à l'aide du CONTANS® ne peuvent donc pas être expliquées par des différences dues aux souches présentes dans ces régions (Nicot *et al.*, 2016).

Par contre, la grande diversité de sensibilités observée entre souches de *S. sclerotiorum* suggère que des variations locales d'efficacité de l'effet nettoyant du sol par *C. minitans* pourraient exister en fonction de la proportion de souches sensibles ou moins sensibles dans une parcelle donnée. Il pourrait donc être utile pour les agriculteurs de connaître le profil de sensibilité à *C. minitans* des souches présentes sur leur exploitation. De même, il serait utile de savoir si l'utilisation répétée de la même souche de *C.*

minitans dans une parcelle peut aboutir à la sélection de souches moins sensibles et amener à une non-efficacité de la technique de protection.

En conditions de plein champ, différentes techniques de protection ont été expérimentées, à savoir : la solarisation, l'utilisation de différents agents de biocontrôle (*C. minitans*, différentes souches de *Trichoderma* sp.), l'apport de bouchons de moutarde riche en glucosinolates et l'emploi d'engrais organiques. L'évaluation de l'efficacité de ces différentes techniques a été effectuée au niveau de la viabilité et du niveau de contaminations par différents micro-organismes des sclérotés mais aussi du nombre de sclérotés retrouvé après le laps de temps de présence dans le sol.

Il s'avère que les impacts des pratiques améliorantes portent sur des compartiments de traits de vie différents du pathogène comme la viabilité des sclérotés exprimée au travers du pourcentage de sclérotés pouvant faire un développement mycélien et induire la formation de sclérotés fils, ou la colonisation par différents micro-organismes (champignons et/ou bactéries) très divers. Ce sont les techniques jouant sur les équilibres biologiques du sol qui ont le plus d'impact sur la viabilité des sclérotés.

Les essais conduits dans la zone de production landaise ont permis de confirmer les difficultés rencontrées pour contrôler les attaques de *S. sclerotiorum* au cours de la conservation au champ des carottes. Les agents de biocontrôle expérimentés n'ont pas permis d'obtenir un contrôle satisfaisant du bioagresseur (peu ou pas de réduction des dégâts).

Lorsque l'on compare le pourcentage de survie des sclérotés des témoins sans techniques améliorantes dans les trois essais (15% dans la parcelle de l'ACPEL, 60% pour celle du Sileban et 80% dans celle d'Invenio), il ressort qu'il y a une différence importante entre les parcelles, ce qui peut s'expliquer par une flore fongique et/ou bactérienne ou des macro-organismes qui peuvent jouer un rôle important et qu'il serait intéressant d'analyser de plus près.

Conclusion

Nos travaux ont confirmé le caractère très polyphage de *S. sclerotiorum* et la diversité d'agressivité des souches sur différentes espèces végétales. Ces travaux de comparaison de souches ont mis en évidence la très forte sensibilité des résultats aux conditions d'expérimentation rendant parfois difficiles les comparaisons. Un travail complémentaire apparaît donc nécessaire pour mieux standardiser les conditions de réalisation des tests, point important par exemple pour des programmes de sélection de matériel végétal résistant à ce bioagresseur.

Ces travaux ont également confirmé l'importance de l'inoculum aérien dans l'épidémiologie de la maladie, des ascospores viables ayant été régulièrement collectées dans l'air des parcelles étudiées. Prévoir l'abondance d'ascospores dans l'air d'une région donnée pourrait permettre d'affiner les interventions dans les cultures sensibles à la sclérotiniose. De plus, les ascospores collectées sur un site donné peuvent provenir de sources éloignées. Ainsi il serait intéressant d'étudier les populations de *S. sclerotiorum* non plus seulement à l'échelle de la parcelle ou de la France mais également à l'échelle européenne afin de déterminer si des souches exogènes peuvent venir alimenter la population autochtone par le biais des mouvements de masses d'air.

Concernant l'utilisation de *C. minitans* pour réduire l'inoculum primaire que constituent les sclérotés présents dans le sol, différentes questions méritent d'être approfondies : (i) quels sont les mécanismes impliqués dans les différences de sensibilité des souches de *S. sclerotiorum* ? (ii) les variations locales d'efficacité dans les parcelles sont-elles liées à la présence de souches de *Sclerotinia* avec des niveaux différents de sensibilité à *C. minitans* ? (iii) l'utilisation massive de *C. minitans* pourrait-elle conduire à une sélection progressive de souches de *S. sclerotiorum* moins sensibles et affecter l'efficacité des traitements ?

Enfin la méthode de mesure de l'efficacité des techniques de contrôle par l'utilisation de sachets de sclérotés enterrés montre des différences très importantes (i) du nombre de sclérotés restant au bout d'un mois dans une parcelle et (ii) de colonisation de ces sclérotés par divers agents biologiques en fonction de la parcelle. L'approfondissement de ce point relatif à l'abondance et la diversité en micro-organismes/macro-organismes d'une parcelle peut devenir un levier d'action pour limiter l'inoculum primaire que représentent les sclérotés.

Remerciements : Merci à l'ensemble des stagiaires qui ont œuvré à la réalisation des différentes tâches ayant permis d'obtenir les résultats présentés dans cet article.

Références bibliographiques

- Adams P.B., 1979. A rapid method for quantitative isolation of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *Sclerotium cepivorum* from soil. *Plant Disease Reporter* 63: 349-351
- Adams P.B., Ayers W.A., 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69:896-898
- Dillard H.R., Grogan R.G., 1985. Relationship between sclerotial spatial pattern and density of *Sclerotinia minor* and the incidence of lettuce drop. *Phytopathology* 75:90-94. DOI: 10.1094/Phyto-75-90
- Hoes J.A., Huang H.C., 1975. *Sclerotinia sclerotiorum*: Viability and separation of sclerotia from soil. *Phytopathology* 65: 1431–1432.
- Holst-Jensen A., Vaage M., Schumacher T., 1998. An approximation to the phylogeny of *Sclerotinia* and related genera. *Nordic Journal of Botany*18: 705–719.
- Leyronas C., Bardin M., Berthier K., Duffaud M., Troulet C., Torres M., Villeneuve F., Nicot P. C., 2018a. Assessing the phenotypic and genotypic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* in France. *European Journal of Plant Pathology* doi.org/10.1007/s10658-018-1493-9
- Leyronas C., Morris C.E., Choufany M., Soubeyrand S., 2018b. Assessing the aerial interconnectivity of distant reservoirs of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology* doi.org/10.3389/fmicb.2018.02257
- Leyronas C., Benigni M., Leignez S., Duffaud M., Villeneuve F., Nicot P.C., 2018c. Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* airborne inoculum, the widespread agent of white mould disease. *Aerobiologia* doi.org/10.1007/s10453-018-09555-x
- Leyronas C., Troulet C., Duffaud M., Villeneuve F., Benigni M., Leignez S., Nicot P.C., 2018d. Assessing the occurrence of *Sclerotinia subarctica* in France with a PCR-based test. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40:2, 248-253, DOI: 10.1080/07060661.2018.1438515
- Nicot P.C., Avril F., Duffaud M., Leyronas C., Troulet C., Villeneuve F., Bardin M., 2016. Are there regional differences in the susceptibility of *Sclerotinia sclerotiorum* strains to *Coniothyrium minitans*? *IOBC-WPRS Bulletin* 117:83-87
- Steadman J.R., Marcinkowska J., Rutledge S., 1994. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 68-70

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)