



HAL
open science

La sclerotiniose des trèfles et des luzernes a *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. I - Choix d'une methode de contamination artificielle

G. Raynal

► **To cite this version:**

G. Raynal. La sclerotiniose des trèfles et des luzernes a *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. I - Choix d'une methode de contamination artificielle. *Agronomie*, 1981, 1 (7), pp.565-572. hal-02716803

HAL Id: hal-02716803

<https://hal.inrae.fr/hal-02716803v1>

Submitted on 1 Jun 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.

La sclérotiniose des trèfles et luzernes à *Sclerotinia trifoliorum* Eriks.

I. - Choix d'une méthode de contamination artificielle

Guy RAYNAL

avec la collaboration technique de Francine FERRARI, Michelle MOURET

I.N.R.A., Laboratoire de Botanique et Pathologie végétale,
Institut National Agronomique, Paris-Grignon, F 78850 Thiverval-Grignon.

RÉSUMÉ

Différentes techniques de contamination artificielle avec *Sclerotinia trifoliorum* ont été essayées, principalement sur trèfle violet, afin de choisir celle permettant de mettre en évidence des différences de résistance entre cultivars. Les plantes âgées de 2 mois sont cultivées en terrines. Elles sont placées à H.R. 100 p. 100 et à 18 °C pendant toute ou partie de la durée des essais. Les ascospores récoltées au champ en octobre-novembre sont aptes à donner des symptômes foliaires dont l'intensité différencie un cultivar sensible, « Lévezou », d'un autre plus résistant, « Tétré ». Mais cet inoculum n'est pas utilisable pour des tests de sélection, les ascospores n'ayant pu être produites *in vitro*. Les scléroties issues de cultures pures sont peu ou pas pathogènes. Un broyat mycélien en suspension dans l'eau ou dans un milieu nutritif, pulvérisé sur les plantes, permet de différencier les cultivars, mais avec un pouvoir séparateur insuffisant dans la pratique. Des implants mycéliens jeunes déposés au collet des plantes donnent les meilleurs résultats, à condition de ne laisser les plantes que peu de temps (96 h) à H.R. 100 p. 100 et de les placer ensuite en serre en les arrosant le moins possible. Les symptômes sont d'autant plus accentués que la période humide dure plus longtemps. Dans tous les cas, le cultivar de trèfle violet « Tétré » (4 n), le plus résistant au champ, a été le moins attaqué par *S. trifoliorum*. Des résultats similaires ont été obtenus avec des implants mycéliens sur 2 cultivars de luzerne, « Ancre » et « Magali », dont les niveaux de résistance assez élevés se sont montrés voisins.

Sclerotinia trifoliorum,
Contamination
artificielle,
Trèfle,
Luzerne,

SUMMARY

Read clover and alfalfa crown rot caused by Sclerotinia trifoliorum Eriks. I. - Choice of an inoculation method.

Various methods of artificial inoculation with *Sclerotinia trifoliorum* were tested, mainly on red clover, in order to choose one able to differentiate levels of cultivar resistance. Plants were 2 months old and grown in flat pots. They were kept at R.H. 100 p. 100 and 18 °C during all or part of the tests. Ascospores gathered in the field in October-November were able to produce foliar symptoms, the intensity of which was greatest on the susceptible cultivar, « Levezou », than on the more resistant « Tetri ». Unfortunately, ascospores are not suitable for selection tests because ascospores are not yet easily produced *in vitro*. Sclerotia from pure cultures were not, or were weakly, pathogenic. Mycelium from liquid culture, blended in water or in a nutrient liquid medium, then sprayed on plants, showed that resistance levels between the cultivars differed, but the results were not distinct enough for the method to be of practical use. Mycelial plugs from young agar cultures placed on the collars of plants gave best results if plants were kept for a short time (96 h) at R.H. 100 p. 100 after inoculation and then transferred to the greenhouse, where they are watered as little as possible. It was found that the longer high humidity period, the stronger the symptoms. In every instance, the field resistant red clover cultivar « Tetri », was the least attacked by *S. trifoliorum*. The same results were obtained with mycelial plugs on 2 alfalfa cultivars « Ancre » and « Magali » which showed similar fairly high resistance levels.

Sclerotinia trifoliorum,
Artificial inoculation,
Clover,
Alfalfa.

I. INTRODUCTION

La pourriture du collet des légumineuses fourragères à *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. entraîne des dégâts souvent très importants et bien visibles au printemps sur trèfle violet (*Trifolium pratense* L.). Bien que fréquente surtout dans la frange nord-maritime de la France, la maladie est généralement moins grave sur luzerne (*Medicago sativa* L.), sauf si l'implantation de la culture est réalisée en automne. Les

tentatives de sélection du trèfle violet pour la résistance à la sclérotiniose sont très anciennes et ont lieu habituellement dans les conditions naturelles, ce qui ne permet pas de tester un grand nombre de plantes ni d'avoir des contaminations homogènes et répétitives. Aucune sélection, par contre, n'a été entreprise jusqu'à présent chez la luzerne, la recherche de résistances à la sclérotiniose ne constituant pas pour cette plante un objectif prioritaire. Il serait pourtant très utile de savoir s'il existe réellement des résistances variétales afin de

conseiller les agriculteurs ayant constaté des dégâts appréciables de sclérotinose dans leurs luzernières, les quelques différences de comportement observées dans des parcelles d'essais étant rarement identiques d'un lieu à l'autre.

La mise au point de méthodes d'évaluation rapide de la résistance des trèfles et des luzernes en conditions contrôlées serait donc appréciée par les sélectionneurs.

Le champignon est très facile à isoler et à cultiver sous sa forme végétative sur de nombreux milieux nutritifs. Le mycélium et les sclérotés ont souvent été utilisés pour contaminer de jeunes plantes ou des organes détachés (DEBNAM & SMITH, 1976; RAYNAL, 1979; SCHMIDT, 1975, 1980). Cependant, si l'on offre au parasite des conditions trop favorables à son développement, les symptômes obtenus sont si sévères et d'évolution si rapide que l'on a des difficultés à séparer les cultivars très sensibles de ceux qui le sont moins dans les conditions naturelles (RAYNAL, 1979). Il est donc nécessaire de rendre le parasite moins agressif en conditions artificielles afin que les contaminations révèlent les éventuelles différences de comportement observées au champ entre les cultivars. On peut, dans ce but, utiliser des plantes « endurcies » naturellement ou artificiellement par l'action prolongée du froid (SCHMIDT, 1980), mais la technique utilisée demande beaucoup de temps et de main-d'œuvre. Nous avons donc préféré opérer sur de jeunes plantes en pleine croissance en freinant le développement des symptômes par d'autres méthodes que nous exposons ici.

Rappelons que dans la nature, aussi bien chez le trèfle que chez la luzerne, *S. trifoliorum* produit à la fin de l'automne de nombreuses apothécies pédicellées à partir des sclérotés enfouis peu profondément dans le sol ou présents dans des fragments de tiges mortes. De très nombreuses ascospores sont projetées par temps humide (nous en avons capturé jusqu'à 5 000 en 10 min par apothécie). Les attaques provenant des ascospores provoquent sur les feuilles des trèfles de petites taches qui n'évoluent pas (phase non agressive de LOVELESS, 1951). Si les conditions fortement humides persistent longtemps, la taille des macules foliaires progresse et les feuilles se nécrosent lentement. Ces phénomènes doivent se dérouler chez la luzerne, car nous avons observé que dans les parcelles où existent des apothécies, les folioles montrent de nombreuses taches punctiformes. La pourriture des feuilles s'étend aux collets pendant la période hivernale et ce n'est qu'au printemps que se forment les sclérotés à la surface et à l'intérieur des organes morts et que cesse la progression de la maladie. Le champignon peut également passer d'une plante à l'autre par le mycélium rampant à la surface du sol à partir des organes malades. Enfin, pour certains auteurs (FRANSEN, 1946), les sclérotés pourraient émettre directement du mycélium infectieux qui serait à l'origine de la plupart des attaques alors que pour d'autres (LOVELESS, 1951), les ascospores seraient les agents infectieux prépondérants. Il existerait donc 3 modes de contamination possibles : par les ascospores, par les sclérotés et par le mycélium. Nous les avons testés séparément en chambre climatisée afin de déterminer le type d'inoculum et les conditions de contamination les plus appropriés pour différencier les résistances des cultivars.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES GÉNÉRALES

Tous les essais ont été réalisés sur trèfle violet, principalement sur les cultivars « Lévezou » (diploïde, sensible au champ) et « Tétré » (tétraploïde, dont la résistance au

champ est meilleure). La luzerne n'a été utilisée que pour vérifier sur cette plante la validité de la méthode de contamination par des implants (chap. III, D).

A. Conditions de culture des plantes

Les plantes sont repiquées, après prégermination des semences, à raison de 50 plantes par terrine de 30 × 30 cm, sur un mélange terre + sable (2/3, 1/3) préalablement stérilisé. Leur croissance s'effectue en serre, sous éclairage artificiel. Un apport de solution nutritive est effectué tous les 15 j.

B. Âge des plantes

Les contaminations rapportées ici sont réalisées sur des plantes en pleine croissance, âgées de 2 mois. Des expériences préliminaires, non publiées, nous ont montré que les tests sont beaucoup trop sévères sur les plantules : des espèces sauvages de *Trifolium* et de *Medicago*, totalement résistantes à l'âge de 2 mois, sont sensibles à l'âge d'1 ou 2 semaines. De plus, nous avons vérifié que l'utilisation de plantes âgées de 5 à 7 mois, cultivées en serre, n'apporte pas d'information supplémentaire par rapport aux plantes âgées de 2 mois.

C. Température de contamination, humidité, éclairage

S. trifoliorum est capable de se développer *in vitro* entre 2 et 30 °C, mais l'optimum pour les attaques se situe entre 13 et 21 °C (FRANSEN, 1946; KREITLOW & SPRAGUE, 1951; LOVELESS, 1951; VIGNES, 1977). C'est pourquoi nous utilisons la température de 18 °C pendant toute ou partie de la durée des essais. Une humidité relative voisine de 100 p. 100 est très favorable au développement de la maladie. Sa durée d'action sera précisée pour chaque essai. L'éclairage est de 6 000 lux avec une photopériode de 12 h.

D. Isolats utilisés

Pour les contaminations avec les ascospores, les apothécies ont été récoltées en octobre-novembre 1979 et 1980 à la station INRA-SEI de La Minière, dans des parcelles de trèfle violet en fin de culture, principalement dans le cultivar « Alpilles », très attaqué.

Pour les essais conduits avec les organes végétatifs de *S. trifoliorum*, nous avons choisi, après essais préliminaires, un isolat qui possède un pouvoir pathogène d'intensité moyenne et qui attaque aussi bien les trèfles que les luzernes. Son numéro codique est ST.27.01. Il a été isolé en mars 1974 de trèfle violet en Eure-et-Loir. Son pouvoir pathogène et ses caractéristiques culturales ont été conservés grâce à des réisollements périodiques à partir des plantes malades.

E. Dispositif expérimental

Le dispositif des blocs à 3 répétitions a été utilisé pour les tests faisant l'objet d'analyses statistiques (contamination des plantes en terrines). En aucun cas nous n'avons testé moins de 100 plantes par cultivar pour chaque facteur étudié.

III. MÉTHODES PARTICULIÈRES ET RÉSULTATS

A. Contamination par les ascospores

Nous avons réussi, en conditionnant les sclérotés par la technique de KOHN (1979), à produire des apothécies de *S. trifoliorum* en conditions contrôlées. Malheureusement, leur quantité est beaucoup trop faible pour qu'on puisse les utiliser pour les contaminations artificielles. Ceci réduit donc considérablement l'intérêt pratique de l'utilisation des ascospores dans la recherche de plantes résistantes, car l'inoculum naturel n'est disponible que pendant une courte période, de fin octobre à début novembre. L'utilisation des apothécies récoltées au champ nous a cependant montré qu'il existe des différences variétales de résistance aux attaques des ascospores.

Les ascospores sont obtenues en appliquant à sec l'hyménium des apothécies contre le fond d'une boîte de Petri (TOURVIELLE DE LABROUHE *et al.*, 1978). Après dessiccation à température ordinaire, les apothécies sont enlevées et peuvent éventuellement donner une 2^e récolte si elles sont réhumectées. Les ascospores déposées en grand nombre dans les boîtes peuvent ainsi être conservées à sec et au froid pendant environ 2 mois, sans perte de pouvoir germinatif. Au-delà (4 mois), la viabilité des ascospores diminue de façon importante (10 p. 100 de germination). L'idéal est d'utiliser les ascospores dès la récolte des apothécies, après mise en suspension dans de l'eau distillée seule ou contenant des éléments nutritifs.

1. Germination des ascospores

Les ascospores sont mises à germer à différentes températures sur des lames de verre, dans de l'eau distillée ou de l'eau glucosée à 10 g/l, contenant ou non un mouillant (Tween 20). La germination n'est pas améliorée par la présence du sucre, ni gênée par le mouillant. Les pourcentages de germination ne diffèrent pas significativement entre 7 et 25 °C et sont compris entre 85 et 90 p. 100 après 24 h. A 2 °C, 40 à 60 p. 100 des ascospores germent encore. A 0 °C, il n'y a plus de germination. La longueur des tubes germinatifs après 24 h ne diffère pas de 2 à 15 °C (20 à 30 µ) et augmente linéairement avec la température de 15 à 25 °C (45-60 µ à 25 °C).

2. Contamination de folioles détachées, en survie

Des folioles prélevées sur des trèfles violets âgés de 2 mois sont mises dans des boîtes de Petri sur papier filtre humide à 18 °C. Les ascospores, à diverses doses, sont déposées à la pipette Pasteur à raison d'une goutte par foliole, à la face inférieure ou à la face supérieure. Les suspensions d'inoculum dans de l'eau distillée sont ou non additionnées de glucose à 10 g/l. Dans tous les cas, elles reçoivent du Tween 20 pour faciliter le mouillage des épidermes. Après 48 h, on éponge les gouttes de suspension d'ascospores ; la lecture des résultats est réalisée 5 j après la contamination. Les symptômes sont des taches nécrotiques localisées aux emplacements des gouttes contaminatrices. Leur intensité est notée de 0 à 5 (tabl. 1). Les notations sont établies pour 10 folioles par facteur.

Le tableau 1 montre que « Lévezou » (diploïde) est toujours plus sensible que « Tétré » (tétraploïde), quelles que soient les conditions, ce qui vérifie les observations au champ. Aux doses de 10³, 10⁵ et 5 × 10⁵ ascospores/ml, les cultivars se différencient cependant assez peu. Par contre, à la contamination de 10⁴ spores/ml, les effets des divers facteurs sont bien visibles. Pour le même cultivar, les

TABLEAU 1

Intensité des nécroses (de 0 à 5) obtenues après contamination de folioles détachées de 2 cultivars de trèfle violet avec une suspension d'ascospores dans l'eau.

(1) Présence ou absence de glucose à 10 g/l dans la suspension
(2) A : contamination à la face inférieure ; B : contamination à la face supérieure

Amount of necrosis (0 to 5) obtained on detached foliols of two red clover cultivars after inoculation with an aqueous suspension of ascospores

(1) Presence or absence of 10 g/l glucose in suspension
(2) A : inoculation on the lower surface ; B : upper surface

Cultivars		(1)	(2)	Nombres d'ascospores par ml				
				5 × 10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	Témoin
Lévezou	sans glucose	A		4,5	4,8	2,8	0,4	0
		B		4,3	3,4	1,8	0,2	0
	avec glucose	A		4,9	4,9	3,2	1,0	0
		B		4,9	4,7	1,9	0,5	0
Tétré	sans glucose	A		4,3	4,7	2,3	0,1	0
		B		2,9	2,7	1,2	0,2	0
	avec glucose	A		4,6	4,3	2,5	0,5	0
		B		4,4	2,7	0,7	0,3	0

Echelle de notation

- 0 = pas de symptôme
- 1 = taches nécrotiques peu nombreuses, sans jaunissement du limbe
- 2 = taches nécrotiques peu nombreuses, avec jaunissement du limbe
- 3 = taches nécrotiques nombreuses mais non jointives
- 4 = zone contaminée brune, sans auréole
- 5 = zone contaminée brune, avec auréole chlorotique.

Disease scale

- 0 = no symptoms
- 1 = necrotic flecks sparse, without yellowing of limb
- 2 = necrotic flecks sparse, with yellowing of limb
- 3 = necrotic flecks numerous, but discrete
- 4 = contaminated area brown, without chlorotic border
- 5 = contaminated area brown, with chlorotic border.

contaminations les plus sévères sont obtenues en déposant l'inoculum additionné de glucose à la face inférieure des limbes.

Remarquons que les symptômes n'évoluent pratiquement plus par la suite, les zones nécrotiques restant limitées et n'entraînant pas la pourriture des folioles. Il s'agit donc là de la phase non agressive de l'attaque des ascospores, citée par LOVELESS.

3. Contamination des plantes en terrines

Selon les disponibilités en ascospores, on les utilise ici à des concentrations allant de 10⁴ à 1,5 × 10⁵ spores/ml dans de l'eau glucosée ou non, mais toujours additionnée de mouillant. L'inoculum est pulvérisé finement sur les 2 faces des feuilles. Les plantes sont gardées pendant 10 j à 18 °C, sous une humidité saturante.

Des 4 essais effectués, aucun n'a donné satisfaction, bien que la germination des ascospores ait été bonne. Dans le meilleur des cas (1,5 × 10⁵ spores/ml, suspension glucosée), nous n'avons obtenu, sur 200 plantes de chaque cultivar,

que 24 feuilles nécrosées chez « Lévezou » (dont 5 ont produit des sclérotés) et 2 feuilles nécrosées, sans sclérotés, chez « Tétré ». Les différences variétales se retrouvent donc ici, mais la sévérité des attaques est trop faible après 10 j. LOVELESS (1951) avait obtenu, sur un très petit nombre de plantes, des nécroses typiques des différents organes 2 mois après l'infection des trèfles par les ascospores.

B. Contamination par les sclérotés

SCHMIDT (1980) et VIGNES (1977) ont observé que l'épandage de sclérotés broyés au pied des plantes donne des résultats très irréguliers. Nous l'avons vérifié en apportant à la surface du sol des terrines de trèfles une quantité importante de sclérotés frais (environ 50 g par terrine), grossièrement broyés pendant 30 s à petite vitesse à l'aide d'un broyeur à légumes Turmix. Les sclérotés provenaient d'une culture de 2 mois, à 20 °C, sur grains d'orge stérilisés.

Au bout du 8^e j, à 18 °C et sous une humidité saturante continue, on distingue des formations mycéliennes blanches à partir des sclérotés, mais sans attaque des plantes. Après 1 mois, les pourcentages moyens de plantes sans symptômes sont les suivants, sur les 5 cultivars testés :

« Lévezou » : 90,5 ; « Triel » : 60,8 ; « Violetta » : 81,6 ; « Alpilles » : 75,0 ; « Kuhn » : 73,9.

L'intensité des pourritures est donc insuffisante et leur apparition trop différée. De plus, l'hétérogénéité de la maladie dans une même terrine et d'une terrine à l'autre, ne permet pas d'utiliser cette méthode pour différencier les cultivars. Nous n'avons donc pas tenté de l'affiner.

C. Contamination par un broyat mycélien

VIGNES (1977) a montré que si l'on arrose le sol des terrines de trèfles avec un broyat mycélien en suspension dans de l'eau, on obtient des symptômes visibles au bout de

3 j. Cependant, la répartition de la maladie est trop hétérogène. Nous avons remplacé l'arrosage du sol par une pulvérisation foliaire du broyat mycélien. *S. trifoliorum* est cultivé sur milieu liquide (décoction de pomme de terre 250 g/l, glucose 20 g/l, eau) non agité, pendant 4 j, à 20 °C, à la lumière. Les cultures doivent être utilisées avant le début de la formation des sclérotés, sinon elles perdent leur pouvoir pathogène. L'inoculum est réalisé de 2 façons :

— broyage direct du mycélium dans le milieu nutritif, puis dilutions successives dans de l'eau distillée,

— récupération du mycélium sur un tamis, lavage à l'eau du robinet, broyage dans une quantité d'eau distillée égale à la quantité de milieu liquide, puis dilutions successives dans l'eau distillée.

Dans les 2 cas, on broie le mycélium au Turmix pendant 10 s (dimensions des hyphes entre 500 et 1 500 µ). Après addition de mouillant, 50 ml d'inoculum par terrine sont pulvérisés sur les cultivars « Tétré » et « Lévezou » (2 terrines par cultivar et par facteur), dont le feuillage a été rafraîchi par une coupe effectuée 10 j avant la contamination. Les symptômes sont notés, selon une échelle de 1 à 4 (tabl. 2), après 10 j passés dans une atmosphère saturée d'eau.

Une terrine témoin par cultivar a été traitée avec de l'eau distillée ou du milieu nutritif.

Les résultats indiquent les moyennes des notes et des pourcentages de plantes sans symptômes. Les témoins, non portés dans le tableau, n'extériorisent aucune pourriture.

L'analyse de la variance montre :

— Pour les notes des symptômes, aucune différence significative entre les blocs, pour les seuils de probabilités que nous avons utilisés, ce qui indique une bonne homogénéité des essais. Les différences entre cultivars et entre dilutions d'inoculum ne sont significatives qu'à $p = 10 p$.

TABLEAU 2

Contamination de 2 cultivars de trèfle violet avec un broyat mycélien pulvérisé sur les plantes
Infection of 2 red clover cultivars sprayed with blended mycelium

Type d'inoculum	Cultivars	Notes moyennes des symptômes (de 1 à 4) Mean notes of symptoms				Pourcentages moyens de plantes sans symptômes Mean percentages of plants without symptoms			
		Dilutions de l'inoculum				Dilutions de l'inoculum			
		1	1/2	1/4	1/8	1	1/2	1/4	1/8
Mycélium broyé dans le milieu de culture *	Lévezou	3,41	2,56	2,18	1,75	0	6,0	8,0	35,5
	Tétré	2,73	2,05	1,84	1,70	0	8,6	23,7	36,4
Mycélium broyé dans de l'eau distillée **	Lévezou	2,10	2,05	1,92	1,61	7,2	17,2	23,3	45,7
	Tétré	1,84	1,75	1,57	1,39	23,2	26,6	42,0	61,3
P.p.d.s. 10 p. 100		entre cultivars : 0,22 entre dilutions : 0,77				entre cultivars : 6,3 entre dilutions : 8,4			

* Mycelium blent in culture medium.

** Mycelium blent in distilled water.

Echelle de notation

- 1 = plante sans symptômes
- 2 = plante avec nécroses foliaires
- 3 = plantes avec nécroses foliaires et début d'attaque du collet
- 4 = plante morte.

Disease scale

- 1 = plant without symptom
- 2 = plant with foliar necrosis
- 3 = plant with foliar necrosis and the beginnings of collar rot
- 4 = dead plant.

100. L'interaction cultivar \times dilutions d'inoculum est en revanche significative à $p = 5$ p. 100.

Cette interaction est due au fait que, si « Lévezou » est toujours plus attaqué que « Tétré » quels que soient les dilutions et le type d'inoculum, les 2 cultivars se différencient mieux aux faibles qu'aux fortes dilutions lorsque l'inoculum est broyé dans le milieu nutritif. Par contre, si le mycélium est broyé dans l'eau, les différences entre « Lévezou » et « Tétré » restent constantes avec les dilutions. La p.p.d.s. montre dans ce cas que, pour un cultivar donné, les dilutions de l'inoculum n'entraînent pas de différences significatives pour les notes des symptômes.

— Pour les pourcentages de plantes sans symptômes, après transformation angulaire des pourcentages par la méthode de BLISS, on ne constate aucune différence significative entre les blocs. Par contre, les 2 cultivars diffèrent au seuil de 10 p. 100 et les dilutions de l'inoculum au seuil de 1 p. 100. Il n'existe aucune interaction cultivar \times dilution.

Dans tous les cas, il ressort nettement que le mycélium broyé dans le milieu de culture est plus pathogène que lorsqu'il est broyé dans l'eau, pour une même dilution. D'autre part, la concentration en fragments mycéliens de l'inoculum n'influe pas significativement sur les notes d'attaque, puisque la p.p.d.s. entre dilutions montre que les notes ne diffèrent pas d'une dilution à l'autre lorsque l'inoculum est constitué de mycélium broyé dans l'eau. Ceci montre que c'est plus la concentration en éléments nutritifs de l'inoculum que la concentration en champignon qui influe sur la sévérité des symptômes. Enfin, il apparaît que les notes des symptômes sont à même de départager les cultivars quel que soit le type d'inoculum, alors que les pourcentages de plantes sans symptômes ne différencient bien « Lévezou » et « Tétré » que lorsque la quantité d'éléments nutritifs de l'inoculum est faible ou nulle.

Cette méthode de contamination présente l'avantage d'être d'exécution rapide et simple. Mais elle n'est pas très sensible, ainsi qu'en témoigne le seuil élevé (10 p. 100) de signification pour les notes et les pourcentages. Ce manque de sensibilité peut avoir plusieurs causes, difficilement maîtrisables : présence dans les broyats de fragments d'hyphes d'âges différents, en proportions variables d'un essai à l'autre ; mauvaise tenue des gouttelettes d'inoculum sur le feuillage malgré la présence du mouillant ou ruissellement inégal de l'inoculum sur les collets. Ajoutons qu'en cas d'utilisation de milieu nutritif, on peut avoir des développements intempestifs de pourritures dues à des saprophytes (*Botrytis* notamment). Ces inconvénients nous ont incité à élaborer la technique suivante.

D. Contamination par des implants mycéliens

Si l'on veut réduire la variabilité des essais, donc augmenter leur sensibilité, il faut entre autres choses que l'ensemble des plantes soit contaminé de façon identique. D'où la nécessité de localiser la contamination à un endroit déterminé des plantes et d'employer un inoculum en quantité et de qualité constantes d'une plante à l'autre.

Nous avons pour ceci découpé des implants calibrés (diamètre 7 mm, épaisseur 3 mm) dans des cultures de *S. trifoliorum* réalisées sur milieu solide (PDA) en boîtes de Petri, à 20 °C et à la lumière. L'emploi d'une faible dose d'agar dans le milieu (8 g/l) facilite la tenue de l'implant sur les organes contaminés. Des essais préliminaires sur les feuilles, pétioles et collets des plantes en terrines nous ont montré que les résultats étaient les meilleurs et les plus rapides lorsque l'on déposait les implants sans blessure

entre les organes du collet. Dans ce qui suit, l'inoculum est toujours localisé au collet des plantes. Les notations des symptômes sont faites selon une échelle simplifiée de 1 à 3 (tabl. 3 et suiv.).

La note 2 recouvre plusieurs degrés de sévérité des nécroses qui évolueront cependant toutes vers la mort de la plante en conditions favorables au parasite (note 3). L'utilisation de la note 2 permet d'accentuer les faibles différences éventuelles qui existent entre les cultivars au moment de la notation. Un sélectionneur pourrait n'utiliser que les notes extrêmes 1 et 3. Il est apparu, après de nombreux essais, que cette notation simplifiée, associée au pourcentage de plantes sans symptômes, donnait une aussi bonne appréciation de la résistance variétale qu'une notation plus détaillée de l'étendue des nécroses.

TABLEAU 3

Contamination de 2 cultivars de trèfle violet par des implants mycéliens déposés au collet des plantes

Infection of 2 red clover cultivars inoculated at the collar with mycelial plugs

Type d'inoculum	Notes moyennes des symptômes (de 1 à 3) <i>Mean notes of symptoms</i>		Pourcentages moyens de plantes sans symptômes <i>Mean percentages of plants without symptoms</i>	
	Lévezou	Tétré	Lévezou	Tétré
Implants dans la marge des colonies, cultures de 3 jours <i>Plugs in the margin of colonies, 3 days old cultures</i>	2,86	2,29	9,0	26,9
Implants au centre des colonies, cultures de 3 jours <i>Plugs in the middle of colonies, 3 days old cultures</i>	2,25	2,18	30,0	32,2
Implants porteurs de primordia de sclérotites, cultures de 7 jours <i>Plugs bearing young sclerotia, 7 days old cultures</i>	1,02	1,15	97,9	89,6
Implants porteurs de sclérotites mûrs, cultures de 10 jours <i>Plugs bearing ripe sclerotia, 10 days old cultures</i>	1,00	1,00	100	100
<i>Echelle de notation</i>				
1 = plante sans symptômes				
2 = plante montrant des nécroses du collet				
3 = plante morte.				
<i>Disease scale</i>				
1 = plant without symptom				
2 = plant with collar necrosis				
3 = dead plant.				

1. Origine des implants sur les colonies, âge de l'inoculum

Les implants sont prélevés à différents niveaux des colonies et sur des cultures d'âges différents. Nous avons utilisé 100 plantes par variété et par facteur. Les plantes sont maintenues à 18 °C sous une humidité voisine de 100 p. 100 pendant les 4 premiers jours suivant la contamination. Elles sont ensuite reportées en serre (22-28 °C) et très peu arrosées. Les résultats regroupés dans le tableau 3 sont obtenus au bout de 10 j.

Il est clair que, quel que soit le cultivar, l'inoculum le plus pathogène est constitué par les implants porteurs d'hyphes jeunes, prélevés dans la frange de croissance des colonies. Plus l'âge du mycélium augmente — et *a fortiori* si les implants portent des sclérotés — moins les attaques des plantes sont importantes. Les symptômes ne sont pas aggravés lorsqu'on replace les terrines contaminées avec les implants porteurs de sclérotés, à une humidité relative de 100 p. 100 pendant 1 mois. Les sclérotés nouvellement formés ne sont donc pas contaminants et leur formation inhibe le pouvoir pathogène du mycélium dont ils sont issus. D'autre part, la différence de niveau de résistance constatée précédemment entre « Lévezou » et « Tétré » se retrouve ici.

Nous utiliserons donc par la suite des implants découpés en marge de colonies vigoureuses âgées de 3 j.

2. Richesse du milieu de culture en éléments nutritifs

La quantité d'éléments nutritifs (sucres notamment) disponibles pour le *Sclerotinia* au début de sa phase contaminatrice semble primordiale pour la rapidité de son installation dans les tissus, ainsi que nous l'avons constaté avec les ascospores et les broyats mycéliens en milieu liquide. Qu'en était-il sur un milieu solide, avec un inoculum en faible quantité localisé aux collets ?

TABLEAU 4

Influence de la concentration en éléments nutritifs du milieu solide (PDA) sur la sévérité des contaminations par des implants mycéliens
Influence of the nutrient concentration of the solid medium (PDA) on the severity of infection by mycelial plugs

Concentration du PDA en éléments nutritifs <i>Nutriments concentration of PDA</i>	Notes moyennes des symptômes (de 1 à 3) <i>Mean notes of symptoms</i>		Pourcentages moyens de plantes sans symptômes <i>Mean percentages of plants without symptoms</i>	
	Lévezou	Tétré	Lévezou	Tétré
1	2,64	2,29	12,3	26,9
1/2	1,71	1,87	47,0	39,1
1/5	1,46	1,31	76,0	72,9
1/10	1,51	1,35	68,0	77,9

Echelle de notation : cf. tabl. 3.

Le champignon est donc cultivé sur PDA pour lequel la quantité d'agar par litre est constante (8 g/l), mais dont les éléments nutritifs sont dilués au 1/2, 1/5, 1/10. L'inoculum témoin est obtenu sur PDA non dilué. Les résultats du tableau 4 sont obtenus avec le même dispositif expérimental qu'au § 1. Là encore, la richesse du milieu conditionne directement la sévérité des attaques, ce qui démontre que le mycélium, même jeune et potentiellement très pathogène, nécessite un support nutritif abondant pour pénétrer rapidement dans la plante et pour la nécroser. Notons que, dès la dilution 1/2, les résultats sont plus variables d'une terrine à l'autre que pour le PDA entier. Il s'ensuit qu'il n'est plus possible de différencier les 2 cultivars avec un inoculum obtenu sur du PDA dilué.

TABLEAU 5

Influence de la durée d'exposition à H.R. 100 p. 100 après le début de la contamination par implants mycéliens sur la sévérité des attaques
 (1) Durées d'exposition à H.R. 100 p. 100 après le début de la contamination ; conditions sèches ensuite. Résultats au 10^e jour
Influence on the severity of attack of the time passed at R.H. 100 p. 100 immediately after inoculation by mycelial plugs
 (1) Time passed at R.H. 100 p. 100 immediately after inoculation ; dry conditions. Results on 10th day

Cultivars	Résistance au champ <i>Field resistance</i>	Notes moyennes des symptômes (de 1 à 3) <i>Mean notes of symptoms</i>					Pourcentages moyens de plantes sans symptômes <i>Mean percentages of plants without symptoms</i>				
		(1)					(1)				
		24 h	48 h	72 h	96 h	168 h	24 h	48 h	72 h	96 h	168 h
<i>Trèfle violet</i>											
2n : Lévezou	TS	1,28	1,75	2,02	2,07	2,81	77,5	48,7	38,6	24,0	5,9
Kuhn	AR	1,41	1,80	2,10	2,09	2,57	70,3	48,9	34,3	31,5	10,3
Violetta	AR	1,87	1,97	2,56	2,68	2,75	44,6	30,8	4,2	5,0	0
4n : Tétré	R	1,10	1,54	1,57	1,77	2,25	90,9	56,8	62,3	48,1	21,1
Hungaropoly	AR	1,60	1,74	2,33	2,39	2,75	52,9	52,5	22,5	17,3	1,1
<i>Luzerne</i>											
Ancré	—	1,14	1,34	1,42	1,53	1,59	84,9	68,2	60,0	48,5	42,9
Magali	—	1,02	1,36	1,43	1,39	1,66	98,9	61,3	58,4	63,0	41,6

P.p.d.s. TUKEY à 5 p. 100 :

Trèfle p.p.d.s. commune entre cultivars et durées
 notes = 0,44 pourcentages = 22,5
Luzerne p.p.d.s. entre durées :
 notes = 0,20 pourcentages = 16,2

Echelle de notation : cf. tabl. 3.

L'analyse de variance donne les conclusions suivantes :

		Blocs	Cultivar	Durée	Interaction Cultivar × durée
Trèfles	Notes ajustées	n.s.	H.S.	H.S.	n.s.
	Pourcentages ajustés	n.s.	H.S.	H.S.	n.s.
Luzernes	Notes réelles	n.s.	n.s.	H.S.	n.s.
	Pourcentages réels	n.s.	n.s.	H.S.	n.s.
	Arc sin \sqrt{p}	n.s.	S	H.S.	S

3. Durée de l'exposition des plantes à l'humidité saturante après contamination

Nous avons déjà montré (RAYNAL, 1979) qu'une humidité saturante prolongée induit des symptômes si sévères qu'il est impossible de séparer les cultivars quel que soit leur comportement au champ. Nous avons de plus constaté que le fait de supprimer l'humidité saturante au-dessus des terrines avait peu d'effet sur la rapidité d'évolution des nécroses, si le sol des terrines gardait une forte humidité. Par contre, si l'humidité du sol est suffisamment basse — sans toutefois provoquer le flétrissement des plantes —, on arrive à ralentir fortement la progression de la maladie et par là à mieux différencier les cultivars. Cette constatation nous a conduit à tester, sur 5 cultivars de trèfle violet et 2 cultivars de luzerne, l'influence de la durée de l'exposition des plantes à 100 p. 100 d'humidité après le début de la contamination.

Après des durées allant de 24 à 168 h en humidité saturante, les terrines sont reportées en serre à 22-28 °C et ne sont arrosées que pour éviter le flétrissement des plantes encore saines. Le contrôle précis du degré d'humectation du sol et surtout son maintien à un niveau constant n'ont malheureusement pas été effectués.

L'inoculum est constitué d'implants prélevés en marge de colonies jeunes sur PDA. Les essais sont répartis en 2 blocs à 3 répétitions, soit 6 terrines de 50 plantes par cultivar et par durée d'exposition à l'humidité saturante. Les résultats sont relevés 10 j après la contamination (tabl. 5).

Pour le trèfle violet, un petit nombre d'essais manquent ou sont incomplets en raison de la faible quantité de semences disponibles ou de leur difficulté de germination. L'interprétation statistique des résultats a, de ce fait, demandé un traitement spécial d'ajustement des données, effectué au centre de calcul de l'INAPG sur programme d'analyse de variance ANVARI pour essais déséquilibrés. Les résultats présentés pour le trèfle dans le tableau 5 donnent les valeurs ajustées, très proches des valeurs réelles. Les essais sur luzerne, complets, ont été traités à part et ont fait l'objet d'une analyse de variance ordinaire dans laquelle les pourcentages de plantes sans symptômes ont subi la transformation angulaire de Bliss. Les valeurs présentées dans le tableau 5 sont les valeurs réelles, non transformées.

Malgré une p.p.d.s. (TUKEY) élevée pour les pourcentages de plantes résistantes, les différences de niveaux de sensibilité entre cultivars sont mises en évidence pour le trèfle violet (notamment entre « Tétré » et les autres), mais pas pour la luzerne. Bien que nous n'ayons pas fait de comparaison statistique entre trèfle et luzerne, il semble

bien que la luzerne soit nettement moins sensible que le trèfle violet, ce qui vérifie les observations courantes du champ. Les niveaux de résistance au champ, évalués en des lieux très divers pour le trèfle violet, sont bien vérifiés ici pour les cultivars à résistance ou à sensibilité marquées (R et TS). Pour les cultivars possédant une résistance moyenne (AR), les résultats ne se retrouvent que pour « Kuhn », dont la résistance dans nos essais est intermédiaire entre celles de « Tétré » et de « Lévezou ». « Violetta » et « Hungaropoly » sont très sensibles dans nos essais, ce qui pourrait indiquer que le choix de l'isolat de *Sclerotinia* n'est pas sans effet sur le niveau de résistance des plantes, ou que la résistance au champ a été surestimée (et) ou que d'autres facteurs entrent en jeu dans les conditions naturelles pour expliquer leur assez bonne résistance. Nous n'avons pas indiqué dans le tableau les évaluations des résistances au champ des luzernes, car les données sont trop fragmentaires à ce sujet. D'après quelques notations effectuées en 2 stations (La Minière-Yvelines, Lycée de Sées-Orne) à la suite de fortes attaques de *Sclerotinia* sur des luzernes semées en automne, il semblerait qu'« Ancre » soit très sensible et « Magali » un peu moins.

Dans tous les cas, le facteur « durée d'exposition à H.R. 100 p. 100 » prédomine largement, quelle que soit la variable (note ou pourcentage de plantes saines). Ceci montre bien l'influence capitale de ce facteur dans le développement de la maladie. L'absence d'interaction cultivar × durée entre 24 et 168 h pourrait indiquer que la vitesse de progression des nécroses doit être peu différente d'un cultivar à l'autre une fois que le parasite a pénétré dans la plante. Les différences de sensibilité des jeunes plantes reposeraient donc plus sur des différences de rapidité de pénétration du parasite que sur des vitesses plus ou moins grandes de développement du champignon dans les tissus parasités. Un cultivar ayant un bon comportement vis-à-vis de la sclérotiniose se caractériserait ainsi en premier lieu, au moins chez les jeunes plantes, par un pourcentage élevé d'individus chez lesquels la pénétration du *Sclerotinia* est difficile.

Remarquons que, chez la luzerne, l'effet « cultivar » et l'interaction cultivar × durée ne sont significatifs pour les pourcentages qu'après leur transformation. L'interaction s'explique ici par une réaction différentielle entre « Ancre » et « Magali » pour la durée de 24 h. Il n'y a plus d'interaction pour les durées suivantes, pour lesquelles la relation entre pourcentage de plantes saines (p) et durée à H.R. 100 p. 100 (t) est linéaire ($p = 72,9 - 0,181 t$) avec $r = 0,999$. D'après cet essai, « Ancre » et « Magali » se différencieraient donc mieux avec seulement 24 h d'exposition à l'humidité. Cette durée permettrait de mieux faire apparaître la proportion d'individus très sensibles de la population du cultivar.

Enfin, la corrélation « intra » (corrélation véritable) calculée entre pourcentages de plantes sans symptômes et notes d'attaque est de $-0,88$, significative à $p = 1$ p. 100. On peut donc évaluer la résistance en choisissant l'un ou l'autre critère. Toutefois, la p.p.d.s. est proportionnellement plus élevée pour les pourcentages que pour les notes, si bien que ces dernières seraient préférables.

Notre technique de contamination des trèfles et des luzernes par des implants mycéliens jeunes de *S. trifoliorum* permet donc de classer les cultivars qui possèdent des différences de niveaux de sensibilité suffisamment nettes, à condition de défavoriser la maladie une fois installée par l'action de la sécheresse à un moment déterminé. Etant donné que l'interaction cultivar × durée d'humidité satu-

rante n'est pas significative dans la grande majorité des cas, nous avons retenu pour des essais ultérieurs, la durée de 96 h qui permet une bonne installation du parasite, sans pour cela trop attaquer les cultivars qui ont un bon comportement au champ.

IV. CONCLUSION

La résistance des trèfles et des luzernes à *Sclerotinia trifoliorum* est difficile à évaluer, aussi bien dans les conditions naturelles que par des contaminations artificielles, à tel point que certains auteurs ont estimé qu'il était préférable de sélectionner les plantes dans les sols naturellement infectés, malgré la grande variabilité des essais selon les années (ROGERS, 1975).

Il semble cependant d'après nos résultats et ceux de SCHMIDT (1975, 1980) que l'on puisse apprécier par des contaminations artificielles les niveaux de résistance des cultivars de trèfle violet et de luzerne. L'inoculum doit être convenablement choisi. C'est ainsi que les contaminations par sclérotés ne présentent pas d'intérêt, ces organes produits *in vitro* n'étant que très peu pathogènes pendant la durée de nos essais, contrairement aux résultats obtenus dans d'autres conditions par VEAR & GUILLAUMIN (1977) avec *S. sclerotiorum* du tournesol. L'utilisation des ascospores serait sans doute intéressante et se rapprocherait le plus des contaminations naturelles, mais leur production *in vitro* n'est pas encore maîtrisée pour *S. trifoliorum*, contrairement à celle de *S. sclerotiorum*. Les broyats mycéliens pulvérisés sur les plantes, en suspension dans de l'eau ou

dans un milieu nutritif liquide, donnent des résultats trop variables pour aboutir à un test significatif à un seuil de probabilité habituel. Par contre, les essais effectués avec des implants porteurs de mycélium jeune sur milieu solide, donnent des résultats assez satisfaisants, dont la précision devrait pouvoir encore être améliorée par le contrôle de l'humidité du sol des terrines, pendant la phase sèche du test. Cette technique respecte les classements variétaux découlant des notations faites au champ, pourvu que les cultivars diffèrent suffisamment. Elle a l'avantage de fournir des résultats rapides et moins aléatoires. Elle nécessite cependant un temps de mise en œuvre assez long car les plantes doivent être contaminées individuellement au collet.

Enfin, les contaminations ont été réalisées sur des plantes jeunes (2 mois) dans le but de raccourcir le plus possible la durée des essais tout en conservant une corrélation avec la résistance au champ (elle-même plus ou moins bien évaluée). Nous n'avons toutefois pas considéré les facultés de régénération des cultivars après attaque qui, selon SCHMIDT (1975, 1980), ont une grande importance dans les possibilités réelles de résistance des plantes. Il conviendrait, pour la sélection, d'associer de telles observations aux résultats de la technique que nous proposons.

Reçu le 23 janvier 1981.

Accepté le 21 avril 1981.

REMERCIEMENTS

Nous sommes très reconnaissants envers M. P. HUET, maître-assistant à l'INAPG, d'avoir analysé certains résultats, en particulier sur le programme ANVARI.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Debnam J. R., Smith I. M., 1976. Changes in isoflavones and pterocarpanes of red clover on infection with *Sclerotinia trifoliorum* and *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathol.*, **9**, 9-23.
- Frandsen K. J., 1946. Studier over *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. In *Det Danske Forlag, København*, 220 p.
- Kohn L. M., 1979. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, **69**, 881-886.
- Kreitlow K. W., Sprague V. G., 1951. Effect of temperature on growth and pathogenicity of *Sclerotinia trifoliorum*. *Phytopathology*, **41**, 752-757.
- Loveless A. R., 1951. Observations on the biology of clover rot. *Ann. appl. Biol.*, **38**, 642-665.
- Raynal G., 1979. Premiers résultats de contaminations artificielles du trèfle violet (*Trifolium pratense* L.) avec *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. *Le Sélectionneur français*, **27**, 49-53.
- Rogers H. H., 1975. Forage Legumes. In *Plant Breeding Institute Annual Report*, Part III : 48-50.
- Schmidt D., 1975. Resistance of red clover to clover rot ; differences between diploid and tetraploid cultivars. *Eucarpia, Report of the meeting of the fodder crops section*, Zurich-Reckenholz, 178-181.
- Schmidt D., 1980. Etudes sur la résistance du trèfle violet à *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. *Rev. suisse Agric.*, **12**, 197-206.
- Tourvielle de Labrouhe D., Guillaumin J. J., Vear F., Lamarque C., 1978. Rôle des ascospores dans l'infection du tournesol par *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De By. *Ann. Phytopathol.*, **10**, 417-431.
- Vear F., Guillaumin J. J., 1977. Etude de méthodes d'inoculation du tournesol par *Sclerotinia sclerotiorum* et application à la sélection. *Ann. Amélior. Plant.*, **25**, 523-537.
- Vignes J. P., 1977. Etude de *Sclerotinia trifoliorum* sur la luzerne et le trèfle violet. Culture *in vitro*, contamination artificielle, variabilité. Mémoire DEA, Fac. Sci. Orsay, ronéoté, 28 pp.