

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

**SCLEROTINIA SCLEROTIORUM : IMPORTANCE DU MILIEU DES IMPLANTS MYCELIENS POUR
L'INOCULATION D'ORGANES DETACHES DE COLZA**

A. PENAUD ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Terres Inovia, 1 avenue Lucien Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon FRANCE,
a.penaud@terresinovia.fr

RÉSUMÉ

Sclerotinia sclerotiorum est un agent phytopathogène qu'il est possible d'inoculer à l'aide de suspensions d'ascospores ou d'implants mycéliens. Un des avantages de l'implant mycélien est de pouvoir être calibré mais le développement du champignon est trop souvent favorisé en conditions contrôlées. Un moyen de freiner ce développement consiste à appauvrir le milieu de culture des colonies utilisées pour préparer les implants. Cette technique est appliquée avec succès à des tests d'évaluation variétale ou bien encore à des tests d'efficacité et de persistance d'action des fongicides.

Mots-clés : *Sclerotinia sclerotiorum*, colza, inoculation, milieu nutritif.

ABSTRACT

SCLEROTINIA SCLEROTIORUM : IMPORTANCE OF THE MEDIUM OF MYCELIAL PLUGS FOR THE INOCULATION OF RAPESEED FREE ORGANS

Sclerotinia sclerotiorum is a pathogen that can be inoculated with ascospores suspensions or mycelial plugs. An advantage of the mycelial plug is to be calibrated but the growth of the fungus is too often favored in controlled conditions. One way to slow down its development is to impoverish the culture medium of colonies used to prepare plugs. This technique is successfully applied for tests of varietal evaluation or even to tests of fungicidal efficacy.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, oilseed rape, inoculation, nutritive medium.

INTRODUCTION

Le colza est le premier oléagineux cultivé en France, avec près de 1.5 millions d'hectares implantés chaque année. Parmi les maladies fongiques qui l'affectent, la sclérotiniose causée par *Sclerotinia sclerotiorum* constitue une des maladies majeures, même si elle n'est véritablement dommageable que deux à trois années par décennie (Penaud *et al*, 2009). Ce sont les attaques sur tiges principales qui occasionnent les plus sévères pertes de rendements qui, à partir d'un seuil de nuisibilité établi à 10% d'attaque, sont estimées au moins à 1 q/ha par tranche de 10% d'attaque, pouvant atteindre jusqu'à 20 q/ha (Simonin *et al*, comm. pers).

La protection contre cette maladie repose essentiellement sur l'application d'un traitement fongicide préventif en début de floraison, stade où le colza est le plus sensible aux contaminations aériennes par les ascospores de *S. sclerotiorum*. Des recommandations agronomiques pour minimiser le risque de développement de la maladie peuvent être réalisées, mais elles sont encore peu suivies. La lutte biologique se développe et offre des solutions dirigées contre les scléroties telle que l'utilisation du champignon parasite des scléroties, *Coniothyrium minitans* (Penaud & Michi, 2009) ou s'associe à la protection fongicide permettant d'en réduire les doses (Canot *et al*, 2012). Du côté du levier génétique, aucune variété de colza n'est actuellement tolérante au sclérotinia, mais des travaux sont engagés pour proposer une méthode d'évaluation des variétés nouvellement inscrites (Jestin *et al*, 2012).

Quels que soient les leviers de lutte en jeu, il convient de les évaluer. Pour assurer une régularité des infections, des techniques de contamination artificielle tant au champ qu'en conditions contrôlée ont par le passé été mises au point (Pierre *et al*, 1990 ; Pérès *et al*, 2001). Dans la mesure du possible, ces méthodes doivent reproduire le processus d'infection. Dans le cas du colza, la contamination s'effectue par l'intermédiaire des pétales où les ascospores sont capables de germer et de développer un mycélium (Jamaux *et al*, 1994). En tombant sur une feuille, le pétale adhère d'autant mieux qu'il est infecté (Penaud, 1993). Ce contact étroit permet alors le passage du mycélium dans la feuille puis vers la tige. Le pétale joue à la fois un rôle de piège naturel des ascospores où elles germent et de relais trophique qui assure le développement du champignon.

Cependant la manipulation de pétales contaminés se heurte à des contraintes pratiques comme d'une part de disposer en toute saison de pétales sains qui, s'ils ont été conservés au congélateur, deviennent mous et difficiles à manipuler et d'autre part d'inoculum produit sous forme d'ascospores. Cette étude rapporte un moyen de s'affranchir des pétales contaminés en simulant un pétale artificiel qui puisse offrir le relais trophique juste nécessaire à *S. sclerotiorum* pour établir une infection qui ne soit pas trop violente et permette une discrimination des modalités étudiées.

MATERIEL ET MÉTHODE

MATERIEL FONGIQUE

A partir d'un sclérote conservé en mycothèque, la souche de *S. sclerotiorum* Ssc8 est reprise sur milieu PDA (Potato Dextrose agar pour microbiologie VWR dosant 39 g/l).

Une gamme de concentrations du milieu PDA est testée, correspondant à 1, 0.5, 0.25, 0.1 et 0 de la dose d'emploi de 39 g/l. Pour chaque concentration, la quantité d'agar est ajustée pour obtenir au final 15 g/l d'agar.

La souche Ssc8 est ensuite repiquée à l'aide d'un implant de 5 mm de diamètre prélevé sur le front de croissance de la colonie sur les différents milieux, à raison de 6 boîtes de 90 mm de diamètre par concentration, et incubée à l'obscurité, à 20°C. Le diamètre des colonies est mesuré à 24h, 48h et 72h.

TESTS D'INOCULATION

Pour des essais d'efficacité et de persistance d'action de fongicides, les différents produits ou doses sont appliqués au champ à l'aide d'un pulvérisateur d'expérimentation. A intervalle de 1, 3, 5 et 7 jours après application des produits, 30 feuilles par traitement sont prélevées sur le même étage foliaire de plantes différentes (feuilles de rang 6 à 8 en partant du haut de la tige principale) puis placées en survie

par lot de 10 feuilles dans un plateau 45x30 cm dont le fond est tapissé d'un papier absorbant épais humidifié, avec un rebord de 3-5 cm rabattu sur le pétiole des feuilles. A chaque date de prélèvement au champ, les feuilles sont inoculées à l'aide d'un implant mycélien de 4 mm de diamètre prélevé sur le front de croissance d'une colonie de *S. sclerotiorum* Ssc8 âgée de 3 jours et cultivée sur milieu PDA 39 g/l ou appauvri 3.9 g/l. L'incubation est effectuée à l'obscurité, à une température moyenne de l'ordre de 18°C, favorable mais non optimale pour le développement du sclérotinia. Les observations effectuées 3 jours après inoculation portent sur le nombre de lésions et la mesure de leur diamètre. Une efficacité est calculée à partir de la mesure des diamètres.

RESULTATS

EFFET DU MILIEU SUR LA CROISSANCE DE *S. SCLEROTIURUM*

La richesse du milieu PDA a un effet marqué sur le développement des colonies de *S. sclerotiorum* (Tableau I). Sur milieu PDA 39 g/l, les colonies atteignent les bords de la boîte de Petri en 48 heures et commencent à former leurs sclérotés en 72 heures. Réduire de moitié la concentration en PDA ralentit la croissance mycélienne pendant les premières 48 heures mais le mycélium couvre totalement le milieu après 3 jours d'incubation. Au quart de la concentration initiale de PDA, la croissance mycélienne est freinée mais le milieu demeure suffisamment riche pour que le champignon parvienne à se développer sur la quasi-totalité du milieu après 72 heures d'incubation. Sur le milieu PDA 10%, la croissance des colonies de *S. sclerotiorum* est davantage freinée, couvrant respectivement 51% et 80% de la surface du milieu après 48 heures et 72 heures d'incubation. Sur milieu agar sans aucun autre élément nutritif, les colonies de *S. sclerotiorum* parviennent à couvrir 63% de la surface de la boîte après 3 jours d'incubation. La réduction de la croissance mycélienne s'accompagne d'une modification de l'aspect du mycélium qui, très hyalin, est à peine visible sur le milieu. De plus, quand il parvient au bord de la boîte après 10 jours d'incubation, il ne forme alors qu'un minuscule et unique sclérote. Comme la visualisation du mycélium est difficile sur simple milieu gélosé, c'est la solution milieu PDA appauvri à 10% qui est retenue pour les inoculations sur organes détachés.

Tableau I : Diamètre moyen des colonies de *S. sclerotiorum* Ssc8 et réduction de croissance en fonction de la concentration du milieu en PDA.

(Mean diameter of *S. sclerotiorum* Ssc8 colonies and growth reduction according to the concentration of the PDA medium)

Concentration en PDA	Croissance mycélienne (mm)			Réduction de croissance/PDA 39 g/l (%)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
39 g/l (1)	36.4 ± 0.6	84.2 ± 0.6	85	-	-	-
19.5 g/l (0.5)	31.6 ± 1	70 ± 0.9	85	15.4	17.9	0
9.75 g/l (0.25)	25.7 ± 2.7	54.5 ± 0.7	82.1 ± 0.9	34.2	37.5	3.6
3.9 g/l (0.1)	22.3 ± 1.3	45.7 ± 1.5	68.1 ± 1.2	44.8	48.6	20.8
0	13.2 ± 0.6	31.4 ± 1.9	50.1 ± 0.7	58.1	60.3	37

TESTS D'EFFICACITE ET DE PERSISTANCE D'ACTION D'UN TRAITEMENT FONGICIDE A DIFFERENTES DOSES

Tests réalisés avec des implants sur milieu PDA à pleine concentration 39g/l

Dès 24 heures après l'application, quelle que soit la modalité, 100% des feuilles inoculées présentent une lésion. Le nombre de lésions n'étant pas discriminant, on s'intéresse à la dimension des lésions. A T+1j, le fongicide à dose N présente un diamètre significativement plus réduit que celui du témoin non

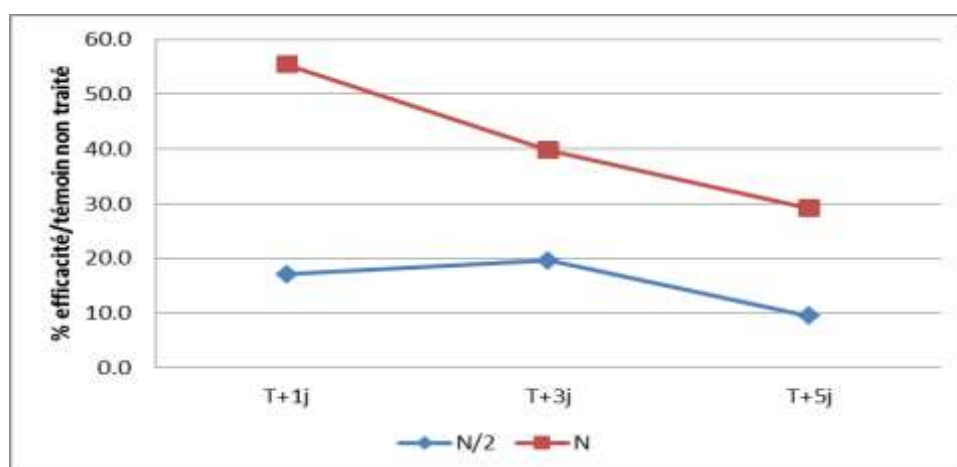
traité. A demi-dose N/2, le diamètre se montre significativement plus petit comparé au témoin non traité mais significativement plus large que celui de la dose N. A T+3j, le diamètre de la dose N demeure significativement plus faible que celui du témoin non traité et de la dose N/2. A T+5j, seul le diamètre de la dose N ressort comme significativement plus faible que ceux du témoin non traité et de la dose N/2 (Tableau II).

Tableau II : Diamètre moyen des lésions, après dépôt d'un implant mycélien sur milieu PDA 39 g/l.
(Mean diameter of the lesions provided by a plug of PDA medium 39 g/l)

Jours après traitement	T+1j	T+3j	T+5j
Témoin	47.7 a	32 a	31.4 a
N/2	39.6 b	25.7 b	28.4 a
N	21.3 c	19.3 c	22.2 b
<i>CV</i>	5.9	8.4	5.5
<i>Pr > F</i>	<0.0001	0.0010	0.0004

Traduit en efficacité, la dose N, présente une efficacité de 55% à T+1jour qui décroît jusqu'à 30% à T+5j alors que la dose N/2 voit son efficacité comprise entre 20 et 10% (Figure 2). Or l'efficacité de la dose N, 24 heures après application, est anormalement faible, alors qu'il n'y a eu au champ ni lessivage du traitement par la pluie, ni température trop basse ou trop élevée.

Figure 2 : Evaluation de la persistance d'action d'un fongicide avec un implant mycélien PDA 39 g/l.
Assessment of persistence of action of a fungicide with a mycelium implant PDA 39 g / l.



Tests réalisés avec des implants sur milieu PDA appauvri 3.9g/l

Sur le témoin non traité, 100% des feuilles inoculées montrent une lésion, de même que la modalité N/2. En revanche, la modalité à dose N ne montre que 30% de lésions à T+1j puis 66% et 50% de lésions respectivement à T+3j et T+5j ; à T+7j, 100% des feuilles traitées à dose N et inoculées présentent une lésion.

En termes de dimensions des lésions, un jour après traitement T+1j, le diamètre des taches sur les feuilles traitées à la dose N est significativement différent du témoin non traité et de la dose N/2. Trois et cinq jours après traitement, le diamètre des taches sur feuilles du traitement N/2 demeure

significativement inférieur à celui du témoin non traité et significativement supérieur à celui de la dose N. A T+7 jours, il n'y a plus de différence significative entre les diamètres du témoin non traité et de la dose N/2. Seule la dose N présente des taches dont le diamètre est encore significativement inférieur.

Tableau III : Diamètre moyen des lésions obtenu après dépôt d'un implant mycélien sur milieu PDA appauvri (3.9 g/l)

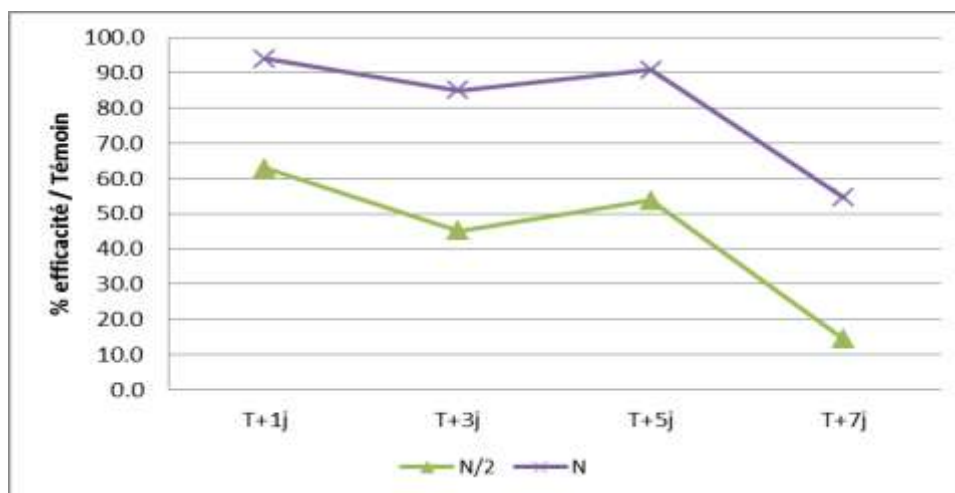
(Mean diameter of the lesions provided by a reduced PDA medium 3.9 g/l)

Jours après traitement	T+1j	T+3j	T+5j	T+7j
Témoin	25.1 a	16.1 a	13.7 a	13.1 a
Ref-A (N/2)	8.7 b	9.0 b	6.6 b	11.2 a
Ref-A (N)	1.4 c	2.5 c	1.3 c	6.0 b
<i>CV</i>	11.8	15.8	23.0	14.7
<i>Pr > F</i>	<0.0001	<0.0001	0.0004	0.0032

En présence d'un inoculum appauvri, la dose N montre une efficacité $\geq 85\%$ jusqu'à 5 jours après son application. Cette efficacité chute à 55% au bout d'une semaine. L'efficacité de la dose N/2 suit la même cinétique que celle de la dose N mais avec un niveau d'efficacité plus faible, allant de 60 % à T+1j à 15% à T+7j (Figure 3).

Figure 3 : Persistance d'action d'un fongicide à partir de tests effectués avec un implant mycélien PDA 3.9 g/l.

(Assessment of persistence of action of a fungicide with a mycelium implant PDA 3.9 g / l.)



DISCUSSION - CONCLUSION

Substituer un pétale contaminé de colza par un implant mycélien de *S. sclerotiorum* nécessite un calibrage de cet implant. S'il est possible de réduire le diamètre et l'épaisseur de l'implant, il y a tout de même des limites, en particulier celle de pouvoir le manipuler facilement pour réaliser des tests biologiques. Une solution consiste à réduire la source nutritive apportée par le milieu de l'implant. Avec

seulement 10% des éléments nutritifs, un implant mycélien d'une souche moyennement agressive de *S. sclerotiorum* est suffisant pour provoquer des contaminations, sans que celles-ci soient rapidement trop importantes et exercent une pression maladie trop forte pour permettre une bonne évaluation des modalités testées.

L'étude de la persistance d'action d'un fongicide appliqué à 2 doses au champ et testé sur feuilles détachées en conditions contrôlées en est l'illustration. En effet, dans les tests avec un implant « riche », le fongicide à dose N ne présente pas l'efficacité attendue au champ (55% au lieu de > 80%, Terres_Inovia, 2015) 24 heures après son application. En revanche, la culture de la souche sur milieu appauvri a permis d'obtenir le résultat escompté et d'évaluer l'efficacité et la persistance d'action des doses du fongicide. Ainsi, un implant mycélien sur milieu PDA 10% se montre plus représentatif de la pression sclerotinia qui s'exerce au champ.

En conséquence, l'utilisation du milieu PDA appauvri pour produire des implants mycéliens de *S. sclerotiorum* constitue une méthode d'inoculation particulièrement adaptée à des tests d'évaluation de sensibilité de matériel génétique (Jestin *et al*, en préparation) ou bien encore de réactions de défense de plantes où une pression maladie trop forte ne permet pas de discrimination.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient tout particulièrement Aurélie Dinar et F. Nourry qui ont assuré le lien entre champ et laboratoire le samedi.

BIBLIOGRAPHIE

Canot A., Hinh E., Coquin C., A. Penaud A., Calaora V., Barchietto T., Buchet S., Straebler B., 2012 – Etude du mode d'action et de l'efficacité d'un agent biologique de lutte DPX-RNP31 contre le sclerotinia du colza. *AFPP – 10ème Conférence internationale sur les maladies des plantes*, 726-735.

Jestin C., Bichot S., Leflon M., Penaud A., Pinochet X., 2012, SCLEROVAR : mise au point de tests d'évaluation variétale des variétés de colza vis-à-vis du sclerotinia. *10ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes*, 140-145.

Penaud A., Michi H., 2009 – *Coniothyrium minitans*, un agent de lutte biologique au service de la protection intégrée. *OCL* vol 16 (3), 158-163.

Penaud A., Wagner D., Makowski D. and Ruck L., 2009 – Evaluation d'un indicateur de risque en tant qu'outil d'aide à la décision d'une protection contre la sclérotiniose du colza. *AFPP – 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes*, 400-407.2001 –

Pérès A.,Penaud A., Bammé B., 2001 - Techniques de contamination artificielle des cultures oléagineuses. Ed Cetiom 55 pp

Pierre J-G et al., 1990 – Techniques de contamination artificielle du colza en stations d'essais. Ed CETIOM 36 pp

Terres_Inovia, 2015 - Résultats des fongicides évalués au champ contre sclérotinia
<http://www.terresinovia.fr/colza/cultiver-du-colza/maladies/sclerotinia/lutte/>