

GUILLAUME ROUSSEAU

**INOCULATIONS FLORALES OU CAULINAIRES ET  
RÉSISTANCE DU SOJA AU *SCLEROTINIA*  
*SCLEROTIORUM***

Mémoire  
présenté  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

Département de phytologie  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

AVRIL 2003

© Guillaume Rousseau, 2003

## RÉSUMÉ

Cette étude vise à mettre en évidence, à l'aide de méthodes d'inoculation dirigée, des différences de résistance à l'infection par le *Sclerotinia sclerotiorum* entre des lignées de soja disponibles au Québec. Pour ce faire, les objectifs suivants ont été fixés: 1) préciser la résistance ou la sensibilité à la sclérotiniose chez 30 lignées ou cultivars de soja adaptés au Québec; 2) examiner la contribution de la fleur (pétales ou axe floral) et de la tige (intacte ou blessée) à la réaction des lignées ou cultivars; 3) examiner l'efficacité ou la complémentarité de techniques d'inoculation caulinaire ou florale, avec du mycélium ou des ascospores, au champ ou en serre, comme méthodes d'étude de la réaction de lignées de soja au *S. sclerotiorum*.

Les expériences ont été menées à l'Université Laval. En 1998, le mycélium a été utilisé dans trois techniques d'inoculation: inoculation des tiges blessées en serre et au champ, des tiges intactes au champ et des fleurs au champ. Les ascospores collectées de sclérotés produits et conditionnés au laboratoire ont été utilisées à l'hiver 1999 dans une technique d'inoculation des fleurs en serre.

L'inoculation de tiges blessées, en serre, a permis de distinguer 12 lignées significativement moins sensibles à la colonisation de la tige blessée que le cultivar Nattosan, le plus sensible. L'inoculation d'ascospores en suspension, en serre, met en évidence deux cultivars significativement moins sensibles à l'invasion des inflorescences (Maple Donovan et Frisquet).

Cette recherche montre des différences significatives de résistance à la sclérotiniose chez des lignées de soja du Québec. On précise également, grâce aux inoculations dirigées, la nature de la résistance ou de la sensibilité de quelques lignées: florale (ex: Maple Donovan et Frisquet) ou caulinaire (ex: Nattosan). Ces inoculations dirigées ont présenté une forte variabilité mais elles sont suffisamment discriminantes et complémentaires pour opérer une première sélection de parents partiellement résistants utiles à un programme d'amélioration génétique de la résistance des lignées de soja du Québec au *S. sclerotiorum*.

## TABLES DES MATIÈRES

Problématique.....	2
Hypothèse de recherche .....	2
Objectifs de recherche.....	2
Chapitre I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.1. L'agent pathogène.....	3
1.2. Symptomatologie .....	3
1.3. Épidémiologie .....	3
1.4. Survie et fructification des sclérotes .....	4
1.5. Infection par les ascospores .....	7
1.6. Moyens de lutte .....	7
1.6.1. Travail réduit.....	7
1.6.2. Rotation.....	8
1.6.3. Fertilisation .....	8
1.6.4. Autres pratiques culturales.....	8
1.7. Manifestations de la résistance.....	9
1.7.1. Phénomènes d'évitement.....	9
1.7.2. Résistance partielle ou incomplète.....	9
1.8. Les inoculum utilisés et les méthodes d'évaluation de la résistance des lignées de soja au <i>S. sclerotiorum</i> .....	11
1.8.1. Les inoculum utilisés.....	11
1.8.2. Méthodes d'évaluation des lignées de soja pour la résistance au <i>S. sclerotiorum</i> .....	11
Chapitre II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	13
2.1. Culture du matériel végétal .....	13
2.1.1. Culture en serre .....	13
2.1.2. Culture au champ .....	13
2.2. Préparation de l'inoculum .....	13
2.2.1. Collecte des ascospores.....	14
2.2.2. Préparation du mycélium .....	14
2.3. Essais d'évaluation des lignées et cultivars de soja en serre et au champ en 1998-1999: dispositifs, méthodes d'inoculation et notations de la sclérotiniose .....	16
2.3.1. Évaluation de l'infection de la tige, suite à l'inoculation de tiges blessées avec du mycélium, en serre, à l'hiver 1998.....	16
2.3.2. Évaluation de l'infection des fleurs ou des tiges au champ, à l'été 1998 .....	18
2.3.3. Évaluation de l'infection des pétales et de l'axe floral, suite à l'inoculation de fleurs avec des ascospores, en serre, à l'hiver 1999.....	18
2.4. Analyses statistiques .....	19
Chapitre III RÉSULTATS .....	22
3.1. Infection de la tige de 30 lignées et cultivars de soja, suite à l'inoculation de tiges blessées avec du mycélium en serre, à l'hiver 1998.....	22
3.2. Infection des fleurs ou des tiges des lignées et cultivars de soja inoculés avec du mycélium au champ, à l'été 1998.....	25
3.2.1. Infection des fleurs et de l'axe floral, suite à l'inoculation de fleurs.....	25
3.2.2. Infection des tiges, suite à l'inoculation de tiges blessées .....	25
3.2.3. Infection des tiges, suite à l'inoculation de tiges intactes .....	25

3.3. Infection des pétales et de l'axe floral des lignées et cultivars de soja, suite à l'inoculation de fleurs avec des ascospores en serre, à l'hiver 1999 .....	25
3.3.1. Infection des fleurs, suite à l'inoculation avec des ascospores .....	25
3.3.2. Infection de l'axe floral, suite à l'inoculation avec des ascospores .....	26
3.4. Corrélations .....	26
3.4.1 Coefficient de Spearman entre le pourcentage de fleurs infectées, la colonisation de l'axe floral et la progression des lésions sur la tige .....	26
3.4.2 Coefficient de Spearman entre les inoculations dirigées et avec des sclérotés .....	26
Chapitre IV DISCUSSION .....	27
4.1. Réaction des lignées et cultivars de soja suite à l'inoculation de tiges blessées avec du mycélium en serre, à l'hiver 1998 .....	27
4.2. Réaction des lignées et cultivars de soja inoculés avec du mycélium au champ, à l'été 1998 .....	28
4.2.1. Inoculation de fleurs .....	28
4.2.2. Inoculation de tiges blessées .....	28
4.2.3. Inoculation de tiges intactes .....	28
4.3. Infection des pétales et de l'axe floral des lignées et cultivars de soja, suite à l'inoculation de fleurs avec des ascospores en serre, à l'hiver 1999 .....	29
4.3.1. Infection des pétales .....	29
4.3.2. Infection de l'axe floral .....	30
CONCLUSIONS .....	31
C-1 Infection de la tige de 30 lignées et cultivars de soja, suite à l'inoculation de tiges blessées avec du mycélium en serre, durant l'hiver 1998 .....	41
C-2 Infection des fleurs et de l'axe floral, suite à l'inoculation de fleurs au champ, durant l'été 1998 .....	43
C-3 Infection des tiges, suite à l'inoculation de tiges blessées au champ, durant l'été 1998 .....	43
C-4 Infection des tiges, suite à l'inoculation de tiges intactes au champ, durant l'été 1998 .....	45
C-5 Infection des fleurs, suite à l'inoculation avec des ascospores en serre, durant l'hiver 1999 ..	45
C-6 Infection de l'axe floral, suite à l'inoculation avec des ascospores en serre, durant l'hiver 1999 .....	47

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1: Échelles de gravité de maladie utilisées en serre et au champ en 1998 et 1999 pour le calcul du DSI (Disease Severity Index en %). 20
- Tableau 2: Évaluation de 30 lignées de soja selon deux méthodes d'évaluation de la résistance au *Sclerotinia sclerotiorum*, testées dans deux environnements (serre et champ), en 1998 et 1999. 23
- Tableau 3: Corrélations de Spearman entre l'incidence de la sclérotiniose chez 21 cultivars ou lignées de soja testés par inoculations dirigées en serre, en 1998 et 1999, et par ensemencement de sclérotés au champ en 1997 et 1999 (S. Rioux, 1998; annexe B). 24

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Tige de soja portant moisissure blanche et sclérotés du *S. sclerotiorum* (photo: Denis Marois). 5
- Figure 2: Accumulation de pigments suite à l'inoculation de mycélium du *S. sclerotiorum* sur une blessure de tige de soja. 5
- Figure 3: Sclérotés du *Sclerotinia sclerotiorum* portant des apothécies. 6
- Figure 4: Production et collecte des ascospores du *S. sclerotiorum* sur lames de verre en contenant Magenta. 15
- Figure 5: Inoculum de mycélium du *S. sclerotiorum* en croissance sur gélose PDA sur une blessure de tige de soja. 17
- Figure 6: L'inoculum de mycélium sur gélose PDA est protégé de la dessiccation à l'aide de ouate humectée pendant 48 h. 17
- Figure 7: Dépôt de la suspension d'ascospores du *S. sclerotiorum* dans une fleur de soja à l'aide d'une micropipette. 21

## INTRODUCTION

La culture du soja [*Glycine max* (L.) Merr.] se pratique à différentes échelles dans la plupart des régions agricoles à travers le monde. En 1998, 154,8 millions de tonnes de soja étaient produites sur 70,1 millions d'hectares (FAO, 1998). La graine de soja contient près de 18 % d'huile et environ 40 % de protéines (CPVQ, 1990). Elle constitue aujourd'hui une importante source d'huile végétale et de protéines pour l'alimentation animale et humaine.

Le soja appartient à la famille des légumineuses (Papilionacées) et grâce à son association symbiotique avec le *Bradyrhizobium japonicum* (Kichner) Jordan, une bactérie fixatrice d'azote atmosphérique, le soja est autonome pour son approvisionnement en cet élément. Ainsi, il s'insère très bien en rotation avec le maïs et les autres céréales auxquelles il laisse des quantités significatives d'azote organique dans le sol de l'ordre de 20 kg N/ha (CPVQ, 1996; Paré et al., 1993). De plus, la culture de soja procure une couverture complète du sol qu'elle protège des fortes pluies notamment. La culture du soja offre donc beaucoup d'avantages au producteur.

Au cours de la dernière décennie, la culture du soja s'est fortement développée au Québec. En 1987, 8000 hectares étaient ensemencés pour une production de 17 800 tonnes (Statistiques Canada) et en 1998, la superficie ensemencée était de 128 000 hectares pour une production de 390 000 tonnes (Mousseau, 1998). Au Canada la production totale est estimée, en 1998, à 2,74 millions de tonnes, la majeure partie de la production se situant en Ontario avec 2,34 millions de tonnes.

L'intensification de la culture du soja au Québec a favorisé le développement de la sclérotiniose, une maladie du soja aussi appelée pourriture sclérotique ou moisissure blanche. Cette maladie est causée par un ascomycète (discomycète), le *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary et occasionne, en général, jusqu'à 20 % de pertes de rendement. Les pertes peuvent compromettre entièrement la récolte durant les années particulièrement favorables à la maladie (Purdy, 1979).

Le *Sclerotinia sclerotiorum* attaque une très large gamme d'hôtes (403 espèces d'angiospermes), principalement des dicotylédones herbacées (Boland et Hall, 1994). Toutes les cultures oléoprotéagineuses comme le tournesol, le haricot, le pois, le canola et la grande majorité des cultures maraîchères sont sensibles, ainsi que la luzerne et le trèfle parmi les espèces fourragères (Bailey, 1996). Mentionnons également comme plantes hôtes les adventices à feuilles larges (Adams et Ayers, 1979). Les grandes cultures non affectées sont le maïs, les céréales à paille et les graminées fourragères (Bailey, 1996).

La sclérotiniose du soja est présente surtout dans les régions à saisons fraîches et humides et en cultures irriguées (Hall, 1994). L'étendue et l'intensité de la maladie ont augmenté graduellement depuis 10 ans dans le nord des États-Unis et en Ontario pour devenir un problème grave. Cette hausse s'explique notamment par l'intensification de la production du soja généralement associée à une diminution ou à un arrêt des rotations (Anderson, 1996) ainsi que par l'irrigation dans certaines régions (Grau et Radke, 1984). En Ontario, la sclérotiniose est le troisième problème en importance après le kyste des racines causé par le nématode *Heterodera glycines* Ichinohe et les maladies des semis causées par les genres *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Phytophthora* et *Phomopsis* (Anderson et Tenuta, 2001). En 1996, année particulièrement fraîche et humide au Québec, le *S. sclerotiorum* a causé des pertes supérieures à 20 % chez le soja et constitue désormais une menace. On estime à 2500 ha les superficies ayant subi des pertes de plus de 20 % au cours de cette saison (Rioux, 1997). Les moyens de lutte

reposent actuellement sur les pratiques culturales et en particulier le travail réduit du sol associé aux rotations avec des espèces non-hôtes, pratiques qui aident à réduire le réservoir d'inoculum. Ces recommandations sont principalement basées sur des données provenant de l'Ontario et des États-Unis (Anderson, 1996). De nombreuses études font état de cas de résistance partielle ou incomplète observée au champ ou en conditions contrôlées (Boland et Hall, 1986; Buzzell et al., 1993; Cline et Jacobsen, 1983; Chun et al., 1987; Grau et al., 1982; Grau et Bissonnette, 1974; Grau et Radke, 1984; Jiao et al., 1994; Nelson et al., 1991b; Yorinori et Homechin, 1984; Zhang, 1995); cependant, aucune lignée n'a jusqu'à présent montré de résistance complète. Pour ce qui est du Québec, le comportement de cultivars recommandés par le CPVQ (Conseil des Productions Végétales du Québec Inc.) vis-à-vis la sclérotiniose est inconnu. Les producteurs sont donc actuellement assez démunis face à la maladie.

## Problématique

La virulence et la persistance du *S. sclerotiorum* en font le premier problème phytosanitaire dans la culture du soja au Québec. Seule une approche intégrée paraît susceptible de contrer efficacement cet agent pathogène. Le travail réduit associé aux rotations est aujourd'hui la seule recommandation efficace pour diminuer les infestations.

Bien qu'aucune lignée de soja n'ait montré de résistance complète au *S. sclerotiorum*, certaines s'avèrent moins sensibles que d'autres et quelques mécanismes de résistance ont été avancés. Il importe donc d'améliorer la résistance génétique par la sélection et de promouvoir ainsi ce moyen de lutte au *S. sclerotiorum*.

Cependant, les manifestations de la résistance restent mal connues et dépendent beaucoup des facteurs environnementaux. Il est donc nécessaire avant tout de mieux caractériser la résistance du soja par la mise au point de méthodes d'inoculation dirigée reproductibles et qui mettent en évidence les différences de résistance des lignées.

## Hypothèse de recherche

Il est possible de mettre en évidence, à l'aide de méthodes d'inoculation dirigée, des différences de résistance à l'infection par le *Sclerotinia sclerotiorum* entre les lignées de soja disponibles au Québec.

## Objectifs de recherche

Cette étude vise, d'une part, à préciser la résistance ou la sensibilité à la sclérotiniose chez 30 lignées ou cultivars de soja adaptés au Québec. D'autre part, on vise à examiner la contribution des tissus, composantes ou organes suivants à la réaction des lignées ou cultivars: pétales et axe floral, tige blessée ou intacte. Cette recherche examine enfin l'efficacité ou la complémentarité de techniques d'inoculation caulinaire ou florale, avec du mycélium ou des ascospores, au champ ou en serre, comme méthodes d'étude de la réaction de lignées ou cultivars de soja au *S. sclerotiorum*.



# Chapitre I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1. L'agent pathogène

Le *Sclerotinia sclerotiorum*, eumycète/ascomycète (discomycète) tellurique, fait partie de la famille des Sclerotiniacées (Achbani et al., 1995) à laquelle appartiennent, en plus du genre *Sclerotinia*, les genres *Botryosphaera* et *Monilinia*. Les *Sclerotinia* forment tous des sclérotés de couleur blanc crème à noir et dont la taille et la forme sont très variables. Les sclérotés chez le *S. sclerotiorum* sont noirs, très durs, plus ou moins ronds ou allongés et mesurent de 2 à 20 mm et plus. Les sclérotés sont des formes de conservation qui survivent dans le sol au moins 3 ans chez le *S. sclerotiorum* (Adams, 1975; Steadman, 1979). Le genre *Sclerotinia* a deux formes évolutives (Briard et al., 1997). L'une est végétative: les sclérotés germent directement sous forme de mycélium. L'autre est sexuée: les sclérotés forment des apothécies (de 5 à 15 mm de diamètre chez le *S. sclerotiorum*) qui, à maturité, libèrent des ascospores (méiospores endogènes). Plus de 250 espèces de *Sclerotinia* ont été décrites avec des noms variant selon les auteurs. Depuis quelques années, la nomenclature de Kohn (1979) est généralement admise. Le genre comporte trois espèces: les *S. sclerotiorum* (Lib) de Bary, *S. minor* Jagger, et *S. trifoliorum* Erikss.

## 1.2. Symptomatologie

Le champignon pénètre dans la plante par les pétales, envahit rapidement la fleur puis le pédoncule floral. Lorsque la lésion et le mycélium atteignent la tige, le transport de l'eau et des nutriments par les tissus vasculaires est affecté (Sinclair et Backman, 1989), voire rapidement interrompu. Les lésions brun clair à la surface des tiges se couvrent rapidement de mycélium blanc (figure 1) (Boland et Hall, 1988a). Leur marge peut être colorée de rouge ou de brun rougeâtre associés à une accumulation de pigments par la plante (figure 2) (Grau et Bissonnette, 1974; Cline et Jacobsen, 1983). Ces lésions apparaissent sur la tige généralement à l'aisselle des premières grappes de fleurs. Le mycélium peut envahir la majorité de la tige et des rameaux latéraux (Boland et Hall, 1988b), la colonisation de la tige se faisant vers le haut et vers le bas (Grau et al., 1982; Lumsden, 1979). Une à deux semaines après l'infection, la plante flétrit au stade de pleine floraison ou d'apparition des premières gousses (R2 ou R3, selon l'échelle de Fehr et al., 1971) (Boland et Hall, 1988a; Sinclair et Backman, 1989). Le développement des gousses situées au-dessus du ou des nœuds infectés et le remplissage des graines peuvent être fortement affectés (Grau et al., 1982): les gousses sont réduites, voire absentes, les graines sont blanchies, atrophiées et peuvent être remplacées par des sclérotés.

## 1.3. Épidémiologie

Le *S. sclerotiorum* est un agent pathogène monocyclique. Il survit dans le sol sous forme de sclérotés, mais aussi dans les végétaux morts ou vivants sous forme de sclérotés ou de mycélium. Après une période de dormance, les sclérotés fructifient et produisent des apothécies dans lesquelles se développent les asques contenant les ascospores (cf. section 1.4.; figure 3). Les ascospores anémophiles se déposent sur les tissus sensibles de la plante. Le mycélium peut

envahir la plante et produire de nouveaux sclérotés. Même si la fructification carpogénique est la plus commune chez le *S. sclerotiorum* (Pratt, 1992), le mycélium qui se développe à partir des sclérotés ou des débris végétaux peut également attaquer directement plusieurs plantes hôtes.

Bien que Nelson et al. (1991a) ne rapportent aucune différence dans la réponse des lignées de soja à différentes souches de *S. sclerotiorum* originaires du Dakota du Nord, une étude française montre une très grande diversité génétique chez les espèces *S. sclerotiorum* et *S. minor*. Les souches étudiées proviennent de France et des États-Unis (Briard et al., 1997). De plus, des variations du pouvoir pathogène entre différents isolats ont été rapportées en Chine (Liu et Lui, 1996). Cette forte variabilité du genre *Sclerotinia* pourrait intervenir dans le manque de constance décelé dans plusieurs évaluations de la résistance de lignées de soja (Chun et al., 1987; Nelson et al. 1991a; Wegulo et al., 1998). Briard et al. (1997) suggèrent qu'il pourrait exister des souches spécialisées pour un hôte ou un cultivar donné, ou encore des souches responsables d'un type de symptôme précis.

#### 1.4. Survie et fructification des sclérotés

La durée de la survie des sclérotés dans le sol varie en fonction de la profondeur et des conditions d'humidité et de température (Adams, 1975; Cook et al., 1975) et peut aller au-delà de 5 ans (Hall, 1994). Cependant, laissés à la surface du sol, les sclérotés sont détruits après 18 mois tandis que ceux enfouis de 5 à 50 cm dans le sol peuvent être conservés plus de 2 ans (Yorinori et Homechin, 1984; Butzen, 1997). Les cycles humidification-dessiccation, plus marqués à la surface du sol, seraient le principal facteur de destruction des sclérotés restés en surface. En effet, des travaux de Smith (1972) indiquent que des sclérotés non séchés se conservent mieux (0-6 % de dégradation) que ceux qui ont été séchés puis réhydratés (78-100 %). Smith (1972) suggère que la perte de nutriments lors de la réhydratation stimulerait les microorganismes hyperparasites en présence.

Les sclérotés ont besoin d'un conditionnement particulier pour lever leur dormance: un sol très humide (-0,25 bar ou à saturation), des températures relativement basses (4-16°C) pendant 10 à 14 jours constituent des conditions idéales (Grau, 1989). In vitro, les sclérotés exposés durant 8 semaines à ces conditions fructifient mieux qu'après une exposition de 1 à 4 semaines (Dillard et al., 1995). C'est le lessivage de composés inhibiteurs de la germination situés en surface ou à l'intérieur des sclérotés qui permettrait de lever la dormance. Cette hypothèse semble confirmée par le fait que seuls les sclérotés conditionnés en environnement sec, toutes conditions étant égales par ailleurs, n'ont pas de fructification carpogénique (Dillard et al., 1995).

Pour produire des apothécies, les sclérotés ont besoin de lumière (12 h de photopériode au laboratoire), un potentiel hydrique supérieur à -5 bars (ou la capacité au champ) pendant 16 jours et des températures entre 11 et 20°C (Hall, 1994). Au champ, les apothécies sont produites par les sclérotés situés dans les 5 premiers cm du sol et ne se développent généralement pas avant la fermeture du couvert végétal qui leur procure un microclimat frais et humide. Les apothécies formées libèrent les ascospores généralement par bouffée suite à des perturbations physiques ou des variations de l'humidité relative (Schwartz et Steadman, 1978). Au champ, les apothécies peuvent libérer continuellement des ascospores pendant plus de 10 jours (Henderson, 1962) à raison d'un total de  $2,3 \times 10^6$  d'ascospores par apothécie (Schwartz et Steadman, 1978).



Figure 1: Tige de soja portant moisissure blanche et sclérotés du *S. sclerotiorum* (photo: Denis Marois).



Figure 2: Accumulation de pigments suite à l'inoculation de mycélium du *S.sclerotiorum* sur une blessure de tige de soja.

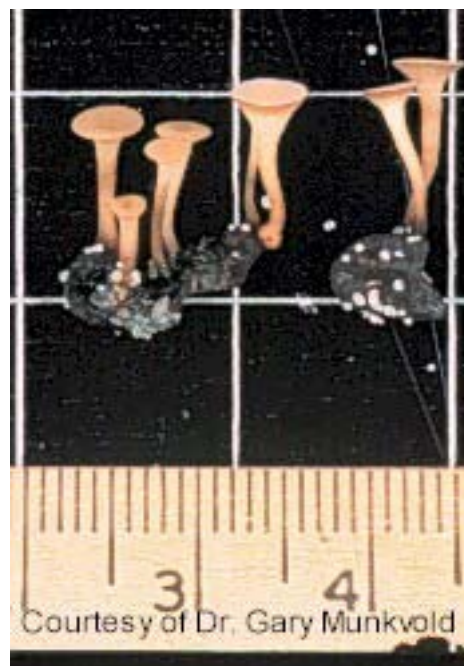


Figure 3: Sclérotes du *Sclerotinia sclerotiorum* portant des apothécies.

## 1.5. Infection par les ascospores

Les ascospores constituent la principale forme infectieuse du *S. sclerotiorum* chez le soja (Grau et al., 1982; Cline et Jacobsen, 1983) et sont véhiculées par l'air vers les tissus sensibles de la plante. Il semble que les pétales constituent la voie d'entrée privilégiée du champignon. En effet, les premières lésions apparaissent sur les inflorescences les plus basses de la tige et des rameaux latéraux. Les ascospores qui amorcent l'infection proviennent principalement du champ (90 %), mais aussi d'autres champs infestés (Boland et Hall, 1988b; X.B. Yang, Iowa State University, comm. pers.). La surface des pétales et des autres organes sensibles de la plante doit être continuellement humectée pendant 2-3 jours pour que les ascospores puissent germer (Abawi et Grogan, 1979; Boland et Hall, 1988a; Butzen, 1997) et produire du mycélium qui envahira les tissus.

La survie des ascospores sur milieu nutritif in vitro est fortement corrélée à la concentration de nutriments. Leur survie est associée notamment au stade de développement du mycélium et à la formation d'appressoria (Grogan et Abawi, 1975). Des ascospores déposées sur des feuilles de pois (*Phaseolus vulgaris*) ont survécu pendant 12 jours au champ (Grogan et Abawi, 1975). Une source exogène d'énergie, apportée par exemple par les pétales sénescents, semble faciliter la survie des ascospores et l'infection des tissus. En effet, Sutton et Deverall (1984) rapportent, suite à des inoculations in vitro sur des organes isolés, qu'en absence d'une source exogène de nutriments, les ascospores qui se développent sur des tissus sains de la plante n'émettent qu'un court tube germinatif et n'infectent que les tissus les plus jeunes. Sutton et Deverall (1984) observent fréquemment des réactions de type hypersensible de la part de la plante infectée et les lésions brunes caractéristiques d'une infection réussie n'apparaissent que lorsque de nombreux microsites d'infection convergent suite à une inoculation avec une forte concentration d'ascospores.

De même, il a été montré chez le canola (*Brassica napus* (L.) var *oleifera*) que les ascospores du *S. sclerotiorum* pouvaient germer et infecter les tissus sains des pétales alors qu'elles étaient incapables de germer sur les autres tissus de la plante (Jamaux et al., 1995).

## 1.6. Moyens de lutte

Présentement, la lutte au *S. sclerotiorum* préconisée en Ontario et applicable au Québec est exclusivement basée sur les pratiques culturales (Anderson, 1996).

### 1.6.1. Travail réduit

Le travail réduit ou le semis direct permettrait une meilleure dégradation des sclérotés laissés en surface par l'action conjuguée des cycles humidification-dessiccation et de l'action de microorganismes antagonistes (Smith, 1972; Sutton et Peng, 1993). De plus, on sait que le labour permet d'enfouir les sclérotés profondément (plus de 5 cm de profondeur) et assure ainsi leur survie pendant plusieurs années (Butzen 1997). Lors d'un labour subséquent, les sclérotés dormants sont ramenés en surface où ils fructifient et peuvent infecter une culture sensible (Merriman et al., 1979; Mitchell et Wheeler, 1990). Cependant, une étude de Merriman et al. (1979) montre, au contraire, que plus de sclérotés laissés en surface ont survécu par rapport à ceux enfouis à 4 cm pendant 35 semaines. Une étude réalisée à Saint-Hyacinthe entre le printemps 1997 et l'automne 1998 a montré que le travail réduit permet une réduction

significative ( $P=0,05$ ) du nombre de sclérotés de surface alors que le labour rapporte en surface des sclérotés produits au cours des saisons précédentes (Maheu, 1999).

### 1.6.2. Rotation

La rotation avec des plantes non-hôtes comme le maïs et les céréales à paille est un moyen préconisé pour diminuer la quantité d'inoculum (Mittchell et Wheeler, 1990; Rahe et Utkhede, 1985; Steadman, 1979). En effet, les sclérotés restés en surface peuvent fructifier même sous une espèce non-hôte (Schwartz et Steadman, 1978; Williams et Stelfox, 1980); leurs réserves de nutriments ainsi épuisées, ils se dégradent plus facilement (Mittchell et Wheeler, 1990). Il a été montré sous une culture d'orge (Williams et Stelfox, 1980) que la fructification des sclérotés sous plante non-hôte est équivalente à celle sous une culture sensible. Les ascospores ne trouvant pas de plante hôte, la quantité de sclérotés n'augmente pas et ceux qui ont fructifié s'épuisent et meurent (Mittchell et Wheeler, 1990). La quantité d'inoculum diminue donc, et d'autant plus rapidement que la rotation est associée au travail réduit du sol ou au semis direct. Au Québec, un minimum de 2 ans de cultures non-hôtes est recommandé (S. Rioux, comm. pers.).

### 1.6.3. Fertilisation

Adams (1975) a démontré que la fertilisation minérale ou organique n'avait pas d'effet sur la densité de sclérotés dans le sol. L'application d'urée au printemps favorise ponctuellement la fructification des sclérotés, mais cela a été attribué à une meilleure croissance des plantes formant un couvert végétal plus dense et plus favorable à la fructification (Williams et Stelfox, 1980). L'étude de Maheu (1999) montre que l'apport de lisier comme fertilisant organique a tendance à favoriser la survie des sclérotés par rapport à la fertilisation conventionnelle; cependant ces tendances s'estompent dès la deuxième saison. Les données sur les effets de la fertilisation sont encore trop rares et trop peu diversifiées pour pouvoir émettre des recommandations.

### 1.6.4. Autres pratiques culturales

On recommande d'utiliser des semences certifiées pour prévenir la contamination par les sclérotés. Lorsque le champ est déjà infesté, on recommande d'élargir les entre-rangs, et pour les champs irrigués, de réduire l'irrigation pendant la floraison. En effet, en cas de fortes infestations, ces mesures permettent une augmentation des rendements (Grau et Radke, 1984), en particulier parce qu'elles limitent la fructification des sclérotés qui nécessite une hygrométrie élevée et régulière. On recommande également un bon désherbage, certaines espèces d'adventices comme le chénopode blanc (*Chenopodium album* L.) et l'herbe à poux (*Ambrosia artemisiifolia* L.) étant sensibles au *S. sclerotiorum* (Butzen 1997; Yorinori et Homechin, 1984). En plus d'augmenter la quantité d'inoculum (Maheu, 1999), les adventices peuvent créer un couvert végétal plus dense favorable au développement de la maladie (Burnside et al., 1998; Butzen, 1997).

## 1.7. Manifestations de la résistance

Aucune lignée de soja n'a jusqu'à maintenant montré de résistance complète à la sclérotiniose, mais certaines s'avèrent moins sensibles que d'autres (Boland et Hall, 1986; Buzzell et al., 1993; Chun et al., 1987; Cline et Jacobsen, 1983; Grau et al., 1982; Grau et Bissonnette, 1974; Grau et Radke, 1984; Jiao et al., 1994; Kim et al., 1999; Nelson et al., 1991b; Pérès, 1995; Wegulo et al., 1998; Yorinori et Homechin, 1984; Zhang, 1995) ce qui indique qu'il est possible d'améliorer ce caractère par la sélection. Les mécanismes de résistance à la sclérotiniose sont encore mal connus. On observe une résistance partielle ou incomplète ainsi que des phénomènes d'évitement selon les lignées considérées. Le manque de constance des résultats et les trop faibles différences de sensibilité des lignées (Wegulo et al., 1998; Gondran et Leclercq, 1992) ne permettent pas, pour le moment, de cerner la vraie nature de la résistance des lignées testées.

### 1.7.1. Phénomènes d'évitement

Les différences de sensibilité observées entre les lignées de soja sont également dues à des phénomènes d'évitement liés à l'architecture des plantes, leur maturité et leur degré de verse (Grau, 1989). La hauteur de la plante à maturité et la date de maturité des gousses se sont révélées significativement corrélées à la sensibilité chez les lignées hâtives alors qu'aucune corrélation significative n'a été montrée avec la date de fermeture du couvert végétal, la date de floraison ou encore le nombre d'apothécies par m<sup>2</sup> (Gondran et Leclercq, 1992). Kim et al. (1999), au contraire, ne rapportent pas de corrélation significative entre la différence de sensibilité et la hauteur à maturité mais confirment l'absence de corrélations avec la date de floraison.

Les facteurs environnementaux et les pratiques culturales sont également très influents, notamment la densité de peuplement, la largeur des rangs, et l'irrigation lors de la floraison (Grau, 1989). Les plantes étiolées se sont montrées plus sensibles (Cline et Jacobsen, 1983), probablement à cause de la plus faible épaisseur de la cuticule facilitant l'entrée de l'agent pathogène. Tous ces facteurs compliquent la sélection et engendrent de nombreux travaux pour la mise au point de méthodes d'évaluation en milieu contrôlé.

### 1.7.2. Résistance partielle ou incomplète

La résistance génétique se manifeste notamment par des lésions brun rougeâtre chez des lignées modérément résistantes (Grau et Bissonnette, 1974; Cline et Jacobsen, 1983). Wegulo et al. (1998) ont montré que la quantité de pigment(s) rose(s) soluble(s) dans la tige de lignées infectées était significativement corrélée avec la résistance de certaines de ces lignées. Dans la même étude, les auteurs notent une variabilité dans la longueur des lésions sur les tiges des mêmes lignées mises en présence d'acide oxalique. Ceci suggère une capacité pour certaines lignées à mieux détoxifier l'acide oxalique, un déterminant du pouvoir pathogène du *S. sclerotiorum* (Godoy et al., 1990). L'oxalate, très répandu chez les champignons qui s'attaquent au bois, participe notamment à la dégradation de la lignine (Shimada et al., 1997) et son implication dans le pouvoir pathogène du *S. sclerotiorum* a été démontrée par Godoy et al. (1990) et précisée par Ferrar et Walker (1993). Une lignée de soja transformée par l'équipe de D.

Simmonds (Agriculture et Agroalimentaire Canada, Ottawa) avec le caractère “germin” du blé codant pour une oxalate oxydase est à l’essai depuis l’été 1998 (D. Simmonds comm. pers.).

On rapporte aussi des réactions de type hypersensible à la pénétration du tube germinatif des ascospores (Sutton et Deverall, 1984) ou du mycélium (Boland et Hall, 1986). Dans ce cas, on observe des lésions brunes autour de la zone de pénétration du champignon et ce dernier serait circonscrit au groupe de cellules nécrosées (Sutton et Deverall, 1984). Cependant, ces réactions ont été observées sur des tissus sains, notamment lors d’une infection par des ascospores qui étaient privées d’une source exogène d’énergie (cf. 1.5). La réaction de type hypersensible ne suffit pas à contrer l’invasion par le champignon dont les ascospores sont nombreuses et peuvent se déposer sur les pétales sénescents qui leur fournissent alors les nutriments nécessaires à la croissance du tube germinatif (Sutton et Deverall, 1984).

La présence de phytoalexines suite à l’infection par le *S. sclerotiorum* a également été rapportée. Sutton et Deverall (1984) ont mis en évidence et dosé la glycéolline, une phytoalexine du soja, dans des feuilles excisées infectées par du mycélium. La glycéolline est cependant absente lors de l’infection des feuilles par les ascospores du *S. sclerotiorum* alors qu’elle est présente dans des hypocotyles ayant subi la même inoculation. Les mêmes auteurs ont également comparé les effets inhibiteurs de la glycéolline avec ceux de deux phytoalexines du pois, la phaséolline et la kiévitone, sur des ascospores en germination et du mycélium en croissance. La glycéolline s’est révélée la moins inhibitrice de la croissance du champignon, mais aucune de ces substances n’a inhibé totalement son développement. Suite à ces observations, Sutton et Deverall (1984) suggèrent la présence d’autres substances inhibitrices ou d’autres phénomènes de résistance restant à découvrir. Plus récemment, une protéine inhibitrice de la polygalacturonase (PGIP: Polygalacturonase Inhibiting Protein) a été mise en évidence chez le soja et son gène a été cloné (Favaron et al., 1994). Il s’agit d’un gène possédant une copie unique dans le génome et dont la transcription est fortement activée par des lésions mécaniques chez la plante. Cependant, son action inhibitrice in vitro sur les endo-polygalacturonases (endo-PG) II et IV du *S. sclerotiorum* élicitrices de la synthèse de glycéolline (Favaron et al., 1992) est incomplète. Ces endo-PG sont également impliquées dans la perméabilisation des tissus du soja (Favaron et al., 1993). De plus, le niveau d’expression de ce gène dans la plante est irrégulier, ce qui alimente les doutes sur son efficacité comme facteur de résistance aux attaques fongiques.

On connaît donc mal la génétique de la résistance au *S. sclerotiorum*. Cependant la résistance s’est révélée associée au gène de la fleur mauve (Miao, 1995), ce qui confirme l’implication des pigments dans la résistance ainsi que les observations de Gondran et Leclercq (1992) qui rapportent que le pourcentage moyen de plantes malades a tendance à être plus élevé chez les cultivars à fleurs blanches que chez ceux à fleurs mauves (55 % contre 40 %). Dencescu et al. (1992) ont mis en évidence un gène de résistance (rss: Resistance at the Seedling Stage) - récessif- qui s’exprime au stade plantule chez des génotypes issus de croisements entre deux lignées sensibles et deux résistantes. La nature de ce gène reste inconnue.



## **1.8. Les inoculum utilisés et les méthodes d'évaluation de la résistance des lignées de soja au *S. sclerotiorum*.**

### **1.8.1. Les inoculum utilisés**

Les inoculations peuvent se faire par des ascospores en suspension aqueuse à différentes concentrations (Cline et Jacobsen, 1983) sur la plante entière (Cline et Jacobsen, 1983), les grappes de fleurs (Pérès, 1995) ou des explants in vitro (Sutton et Deverall, 1984; Nelson et al., 1991b). Les plantes ou explants doivent ensuite être maintenus en condition d'humidité saturante pour permettre la germination des ascospores (Cline et Jacobsen, 1983; Pérès, 1995). Les ascospores utilisées pour les inoculations dirigées sont collectées à partir de sclérotés produits au laboratoire ou collectés au champ (Sutton et Deverall, 1984; Hunter et al., 1982). Ces sclérotés sont conditionnés pour la fructification ou mis directement à fructifier (Sutton et Deverall, 1984). Une fois les apothécies formées, les ascospores sont collectées par aspiration et piégées soit dans l'eau (Hunter et al., 1982), soit directement sur filtres (Steadman et Cook, 1974). Les ascospores ainsi collectées sont conservées en dessiccateur à 4°C ou surgelées. Dans ces conditions, 90 % d'entre elles restent viables 24 mois, leur pouvoir pathogène n'étant pas affecté (Hunter et al., 1982). Le mycélium est également utilisé comme inoculum sous forme fragmentée (Boland et Hall, 1986), en croissance sur des tissus végétaux (Cline et Jacobsen, 1983), ou sur un milieu gélosé (Chun et al., 1987).

### **1.8.2. Méthodes d'évaluation des lignées de soja pour la résistance au *S. sclerotiorum***

Les apothécies matures peuvent être utilisées directement pour l'inoculation (Sutton et Deverall, 1984; Jamaux et al., 1995). Lorsque l'on inocule avec des apothécies, celles-ci sont installées à proximité de l'organe à infecter (généralement les fleurs) et laissées là un temps déterminé de façon à limiter le nombre d'ascospores libérées (Jamaux et al., 1995). Le nombre d'ascospores impliquées est alors exprimé en ascospores/cm<sup>2</sup> de surface de l'organe inoculé (Sutton et Deverall, 1984).

Une technique développée par Chun et al. (1987) reprise par la suite (Nelson et al., 1991a; Wegulo et al., 1998) consiste à inoculer des tiges de plantes jeunes (5 semaines) fraîchement coupées avec une rondelle de mycélium en culture sur milieu gélosé. En général, les résultats obtenus sur des explants s'avèrent non corrélés (Nelson et al., 1991b), ou corrélés pour certaines lignées seulement (Chun et al., 1987) avec les résultats obtenus au champ. Une technique d'inoculation dite limitée (Limited-Term-Inoculation, LTI, adaptée de Hunter et al., 1981-82; Dickson et Hunter, 1983) s'est avérée plus efficace en milieu contrôlé pour discriminer les lignées testées (Cline et Jacobsen, 1983; Boland et Hall, 1986). Cette méthode consiste à retirer l'inoculum de mycélium après une période relativement courte (24 à 48 h), de façon à limiter un développement trop rapide du champignon qui masquerait toute différence entre les lignées testées.

L'inoculation avec des ascospores procure des résultats encourageants, montrant les mêmes tendances en serre et au champ pour 5 lignées sur 7 testées par Pérès (1995) en 1993 et 1994. Cependant la méthode LTI s'est montrée la plus fiable pour discriminer les lignées, et la mieux corrélée avec les résultats obtenus au champ (Cline et Jacobsen, 1983; Grau et al., 1982).

Plus récemment, Wegulo et al. (1998) ont développé une double méthode d'évaluation de la résistance des lignées de soja basée sur le rôle de l'oxalate dans l'infection par le *S. sclerotiorum*. Des tiges de jeunes plantes fraîchement coupées sont mises en tube en présence d'oxalate et la longueur des lésions est mesurée au quatrième jour. Après un traitement identique, la quantité de pigments roses solubles est estimée par absorbance. Cette méthode présente la meilleure corrélation de rang et la meilleure corrélation avec les évaluations réalisées au champ comparativement aux inoculations de feuilles et de tiges avec des rondelles de mycélium réalisées dans la même étude. Aucune évaluation comparative des différentes méthodes n'a été réalisée.

## Chapitre II MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette recherche vise, d'une part, à caractériser la résistance ou la sensibilité à la sclérotiniose de 30 lignées ou cultivars (tableau 1) de soja adaptés au Québec. On vise, d'autre part, à examiner la contribution des tissus, composantes ou organes floraux (pétale ou axe floral) et caulinaires (tige intacte ou blessée) à la réaction des lignées et cultivars. Cette recherche examine enfin l'efficacité d'inoculations dirigées comme méthodes d'étude de la réaction de lignées et cultivars au *S. sclerotiorum*.

À cette fin, trois expériences ont été mises en œuvre, toutes sur le campus de l'Université Laval à Québec (QC), en serre et au champ en 1998 et à nouveau en serre en 1999 : 1) inoculations avec du mycélium sur tiges blessées en serre (hiver 1998); 2) inoculations avec du mycélium dans les fleurs et sur les tiges intactes ou blessées au champ (été 1998); 3) inoculations avec des ascospores dans les fleurs en serre (hiver 1999).

### 2.1. Culture du matériel végétal

#### 2.1.1. Culture en serre

Trente lignées et cultivars de soja ont été semés en pot de 20 L, à raison de quatre plantes par pot dans un terreau à pH=6,5 pasteurisé à la vapeur, contenant 60 % de terre noire, 30 % de perlite et 10 % de Promix<sup>®</sup>-v/v. Au semis, un inoculant en granules de *Bradyrhizobium japonicum* (Soil Implant<sup>®</sup>) a été ajouté pour assurer la nodulation. La croissance des plantes s'est déroulée sous les consignes de 28°C le jour, 25°C la nuit, 80 % d'humidité relative (HR) et un éclairage d'appoint en lumière blanche (photopériode de 16 h), à raison de 150  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (ampoules Optimarc<sup>®</sup>, 400 W); l'arrosage s'est fait manuellement sans aucune fertilisation complémentaire.

#### 2.1.2. Culture au champ

Les 30 lignées et cultivars de soja ont été semés sur le campus de l'Université Laval, le 18 mai 1998, en parcelles de quatre rangs de 3 m espacés de 50 cm avec un taux de semis de 12 graines par mètre linéaire. Entre les parcelles l'espacement était de 60 cm. La fertilisation a été effectuée selon les recommandations du CPVQ (CPVQ, 1996), le désherbage fut manuel. Un arrosage en fines gouttelettes a été appliqué sur l'ensemble des parcelles au champ depuis la veille de l'inoculation jusqu'à la fin des notations des données.

### 2.2. Préparation de l'inoculum

Le choix de la souche utilisée dans toutes les expériences en serre et au champ s'est fait suite à la comparaison de 20 souches issues de sclérotés collectés dans la région de Huntingdon (QC) à la fin de la saison 1996. Le but était de comparer le pouvoir pathogène de ces souches du *S. sclerotiorum* de façon à sélectionner la plus agressive. Pour ce faire, une expérience préliminaire a été conduite, en serre à l'automne 1997, avec le cultivar de soja *OAC Bayfield* connu pour sa sensibilité au champ (Rioux, 1998). Une rondelle de mycélium de chaque souche en croissance sur milieu gélosé pomme de terre-dextrose-agar (PDA, Difco<sup>®</sup>) a été

inoculée sur une blessure de la tige (section 2.3.1.). Cinq plantes ont été inoculées au stade R1 (Fehr et al., 1971) avec chacune des souches. Les souches ont été conservées à 4°C sur le milieu gélosé PDA, en tube pour la conservation à long terme et en boîtes de Petri pour l'utilisation courante. Aucune différence significative du pouvoir pathogène n'étant apparue, nous avons retenu pour l'ensemble des expériences la souche qui avait la croissance la plus rapide sur milieu gélosé PDA. Cette souche a été nommée NB-5.

### 2.2.1. Collecte des ascospores

Les sclérotés de la souche NB-5 du *S. sclerotiorum* ont été produits en 2 semaines à l'obscurité, à 28°C sur des gousses de pois mange-tout préalablement autoclavées. Les sclérotés ainsi produits ont été conditionnés pour la fructification pendant 11 semaines à 4°C à l'obscurité. Pendant toute cette période, les sclérotés, répartis dans des filets de fibre de verre, sont immergés dans l'eau 2 minutes toutes les 12 minutes (d'après Dillard et al, 1995). Par la suite, ils ont été placés à la lumière (photopériode de 12 h en lumière fluorescente:  $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) sur du sable humide (humidité équivalente =10 %) dans des contenants de type Magenta. Après l'initiation du développement de l'apothécie et si possible avant la maturité de l'hyménium (début de libération des ascospores), les sclérotés ont été transférés dans des contenants Magenta dont le fond a été préalablement recouvert d'une couche (5 mm) de milieu gélosé d'Agar-Agar à 5%. On a pris soin de fixer les sclérotés dans le milieu gélosé. On a ensuite placé deux lames de verre pour microscope dans le couvercle et les contenants fermés ont été déposés à l'envers sur une plaque de verre maintenue à environ 50 cm au-dessus de la lumière fluorescente (12 h de photopériode;  $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (figure 4). Les ascospores libérées par les apothécies en fin de maturation ont alors été collectées, tous les deux jours environ, par un simple grattage des lames de verre à l'aide d'une lame de rasoir. Les ascospores ont été stockées dans des boîtes de Petri en dessiccateur à 4°C. Le caractère infectieux de la suspension d'ascospores a été testé par inoculation de fleurs en serre dans une expérience préliminaire avec deux cultivars de sensibilité éloignée: *OAC Bayfield* et *9083* (cf section 2.3.3.).

### 2.2.2. Préparation du mycélium

Le mycélium utilisé pour les inoculations est repiqué à partir des tubes de conservation (milieu gélosé PDA) de la souche NB-5. Il est mis en culture en boîtes de Petri sur milieu gélosé PDA et incubé à l'étuve à 24°C, à l'obscurité. Après 2 jours de croissance, des rondelles de 10 mm de diamètre sont prélevées pour être inoculées dans la journée, que ce soit au champ ou en serre.



Figure 4: Production et collecte des ascospores du *S. sclerotiorum* sur lames de verre en contenant Magenta.

## **2.3. Essais d'évaluation des lignées et cultivars de soja en serre et au champ en 1998-1999: dispositifs, méthodes d'inoculation et notations de la sclérotiniose**

### **2.3.1. Évaluation de l'infection de la tige, suite à l'inoculation de tiges blessées avec du mycélium, en serre, à l'hiver 1998**

De janvier à mars 1998, les 30 lignées et cultivars de soja (tableau 2) ont été cultivés en serre (section 2.2.1), en trois blocs complets aléatoires semés à une semaine d'intervalle; quatre plantes par pot constituaient l'unité expérimentale. Les plantes ont été inoculées avec le *S. sclerotiorum* dans une section contiguë de serre, maintenue à 25°C et 100 % HR. Cette inoculation s'est faite à la floraison (stade R1-R2). On déposait une rondelle de mycélium en croissance (2 jours) sur milieu gélosé PDA (10 mm de diamètre) sur la blessure faite par l'ablation du pédoncule floral (figure 5). L'ablation de la plus basse fleur s'est faite à l'aide d'un scalpel et l'inoculum fut déposé à l'aide d'une pince. Les plantes inoculées ont été transférées dans une section de serre à 100 % HR. L'inoculation est dite limitée (LTI adaptée de Hunter et al., 1981, 1982; Dickson et Hunter 1983) car l'inoculum est protégé par un coton humide (figure 6). Le coton est enlevé après 48 h et les plantes sont transférées à nouveau dans une section de serre où l'humidité relative est plus basse (80 %), de façon à empêcher une progression trop rapide du champignon qui masquerait les différences entre les lignées (Hunter et al., 1981). La longueur de la lésion est mesurée en mm à 48 h, puis 9 jours après l'inoculation à l'aide d'un double décimètre flexible.



Figure 5: Inoculum de mycélium du *S. sclerotiorum* en croissance sur gélose PDA sur une blessure de tige de soja.



Figure 6: L'inoculum de mycélium sur gélose PDA est protégé de la dessiccation à l'aide de ouate humidifiée pendant 48 h.

### **2.3.2. Évaluation de l'infection des fleurs ou des tiges au champ, à l'été 1998**

Les parcelles des trois blocs complets aléatoires, blocs espacés de 3 m, de l'expérience au champ de l'été 1998 ont été soumises aux inoculations de fleurs, de tiges blessées ou intactes, avec du mycélium. L'inoculation des tiges blessées et intactes par du mycélium ont été réalisées sur le deuxième rang (à l'ouest) de chaque parcelle, respectivement dans la moitié sud et nord du rang. L'inoculation des fleurs par du mycélium s'est faite sur le troisième rang. Cette répartition non aléatoire des méthodes d'inoculation à l'intérieur des parcelles a été choisie pour faciliter la division du travail. Les premier et quatrième rangs de chaque parcelle formaient ainsi une bordure et des témoins non-inoculés. La lignée 22 n'a été testée que dans un bloc et les lignées 23 à 25 dans deux blocs, du fait d'un manque de semences.

#### **2.3.2.1. Infection des fleurs et de l'axe floral suite à l'inoculation de fleurs avec du mycélium**

Une fleur sur la grappe la plus basse de huit plantes/parcelle a été inoculée à la floraison (stade R1-R2 de Fehr et al., 1971) en insérant dans la fleur un fragment de rondelle de culture PDA du *S. sclerotiorum*. On a noté sur les plantes inoculées, 72 h et 10 jours après l'inoculation, le nombre de fleurs infectées, la présence de lésion sur l'axe floral et la longueur de la lésion sur la tige. Ensuite on a calculé le DSI (Disease Severity Index, d'après Grau et Radke, 1984), décrit à la section 2.3.3, sur la base de l'échelle de gravité (champ, 1998) présentée au tableau 1. Les DSI calculés ont été soumis aux analyses statistiques.

#### **2.3.2.2. Infection de la tige, suite à l'inoculation de tiges blessées avec du mycélium**

La tige de cinq plantes par parcelle a été inoculée au stade floraison (R1-R2 de Fehr et al., 1971). Comme dans l'expérience similaire en serre de l'hiver 1998, une rondelle de mycélium a été mise en place, durant 48 h (méthode LTI), sur la blessure produite par l'ablation de la grappe la plus basse sur la tige (figure 5). On a noté la longueur des lésions sur les tiges (LLT) infectées des plantes inoculées, 48 h et 9 jours après l'inoculation (AI), à l'aide d'un double décimètre flexible. Ces résultats ont été soumis aux analyses statistiques.

#### **2.3.2.3. Infection de la tige suite à l'inoculation de tiges intactes avec du mycélium**

La tige de cinq plantes par parcelle a été inoculée au stade floraison (R1-R2 Fehr et al., 1971). Une rondelle de mycélium en culture PDA âgée de 2 jours a été déposée à l'aisselle du pédoncule de la grappe la plus basse sur la tige. La rondelle est retirée au moment des notations, 7 jours après l'inoculation. On a calculé le pourcentage de plantes infectées parmi les plantes inoculées, pourcentage soumis aux analyses statistiques.

### **2.3.3. Évaluation de l'infection des pétales et de l'axe floral, suite à l'inoculation de fleurs avec des ascospores, en serre, à l'hiver 1999**

Cette méthode d'inoculation des fleurs avec des ascospores a été mise au point grâce à une expérience préliminaire avec deux cultivars, réalisée durant l'automne 1998. Pour cette expérience préliminaire, 48 plantes de chacun des deux cultivars, l'un sensible (*OAC Bayfield*) et l'autre de résistance partielle ou incomplète (*9063*) (d'après Rioux, 1998), ont été inoculées selon plusieurs modalités: suspensions d'ascospores de concentration variant de 2000 à 45 000 ascospores par ml et préparées de 2 à 72 heures avant l'inoculation. On comparait ainsi les effets



de la concentration et de l'âge des ascospores en suspension. On a choisi de n'utiliser que des suspensions préparées dans les 48 h. Les plantes inoculées étaient placées à 100 % HR ou sous une bruine continue. Le développement de la maladie était suivi au jour le jour jusqu'à la mort éventuelle des plantes.

Dans l'essai définitif, les plantes ont été maintenues en serre sous les conditions de culture décrites à la section 2.1.1. Les unités expérimentales ont été disposées en trois blocs complets aléatoires, semés à une semaine d'intervalle. La suspension d'ascospores pour l'inoculation a été préparée et ajustée à  $3-5 \times 10^4$  ascospores/ml (d'après Cline et Jacobsen, 1983) à l'aide d'un hématimètre avant chaque série d'inoculations. Pour chaque plante (quatre plantes par pot constituaient l'unité expérimentale), la suspension a été appliquée à la floraison (stade R1-R2: échelle de Fehr et al., 1971) à raison d'une goutte de 10 microlitres par fleur, soit 300 à 500 ascospores par fleur (figure 7). Trois fleurs ont été inoculées par grappe et ce sur la grappe la plus basse. Les plantes ont été placées 5 jours sous une bruine constante afin de maintenir l'hygrométrie nécessaire à la germination des ascospores (présence d'eau libre; d'après Pérès, 1995; Pratt, 1992). Le développement des symptômes a été noté à trois moments (5, 15 et 25 jours après l'inoculation) quel que soit le cultivar. Les symptômes sont répartis en classes selon leur degré de développement (tableau 1): aucun symptôme (classe 0), 1 à 3 fleurs atteintes (classe 1); à partir de 3 fleurs on a considéré l'axe floral attaqué (classe 2). Par la suite, on a noté si la tige était atteinte et lorsqu'elle l'était, on a noté la longueur de la lésion jusqu'à 20 cm (classe 3) (au-delà de 20 cm la plante était habituellement morte). Les classes de gravité ainsi définies, elles sont utilisées pour calculer les DSI utilisés dans les analyses statistiques (Disease Severity Indices;  $DSI = \frac{\sum(\text{classe} \times \text{nombre de plantes par classe})}{\text{nombre total de plantes} \times \text{nombre de classes de gravité}} \times 100$ ) (Grau et Radke, 1984). Une échelle partielle comportant seulement les trois premières classes a été utilisée pour comparer la résistance des lignées et cultivars à l'infection de l'inflorescence par les ascospores (Tableau 1). Les variables retenues pour les analyses statistiques étaient le pourcentage de fleurs infectées pour la résistance à l'invasion des pétales et les DSI partiels pour la résistance à la colonisation de l'inflorescence.

## 2.4. Analyses statistiques

Les variables ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) et un test de Bonferroni (PROC GLM option BON de SAS 6.12) (SAS institute, 1984). L'homogénéité de la variance a été vérifiée pour chacune des analyses de variance effectuées. Les relations entre la longueur des lésions, les DSI et le pourcentage de fleurs infectées ont été étudiées grâce au calcul des corrélations de Spearman (PROC CORR de SAS 6.12). Ces corrélations ont été calculées entre les trois expériences de cette étude et avec les données obtenues au champ par S. Rioux en 1997 et 1999 (annexe B).

Tableau 1: Échelles de gravité de la sclérotiniose du soja utilisées en serre et au champ en 1998 et 1999 pour le calcul du DSI (Disease Severity Index en %).

Échelles de gravité de maladie	
Champ, 1998	Serre, 1999
0 : aucun symptôme	0 : aucun symptôme
1 : 1 à 3 fleurs atteintes	1 : lésion sur l'axe floral
2 : axe floral attaqué	2 : grappe entièrement atteinte
3 : lésion ayant atteint la tige	



Figure 7: Dépôt de la suspension d'ascospores du *S. sclerotiorum* dans une fleur de soja à l'aide d'une micropipette.

## Chapitre III RÉSULTATS

Les variables et les dates associées à des différences significatives entre les lignées sont regroupées dans le tableau 2: en 1998, en serre, la longueur des lésions sur la tige (LLT) 48 h après l'inoculation (AI) d'une blessure de la tige avec du mycélium qui évalue la résistance à la progression des lésions dans la tige; en 1999, en serre, le pourcentage de fleurs infectées et le DSI (%) 25 jours après l'inoculation d'ascospores dans les fleurs qui évaluent respectivement la résistance à l'invasion des pétales et à la colonisation de l'axe floral. Les autres données recueillies au cours des expériences ne mettent pas en évidence de différences significatives entre les lignées; les données et les résultats de l'ANOVA effectuée sur ces données sont présentés respectivement dans les annexes A et C. Le tableau 3 présente les corrélations de Spearman entre l'intensité de la sclérotiniose chez 21 cultivars ou lignées de soja testés dans la présente étude et par Rioux, sous inoculation avec sclérototes, au champ en 1997 et 1999 (Rioux, 1998; S. Rioux, com. pers.) (annexe B).

### **3.1. Infection de la tige de 30 lignées et cultivars de soja, suite à l'inoculation de tiges blessées avec du mycélium en serre, à l'hiver 1998**

L'effet des lignées et cultivars sur la longueur des lésions est significatif, 48 h après l'inoculation ( $P=0,010$ ) et non significatif 9 j après l'inoculation ( $P=0,070$ ). De plus, on note un effet significatif des blocs 9 j après l'inoculation ( $P=0,020$ ) (Annexe C-1). On constate 48 h après l'application de mycélium sur la tige blessée que les lignées et cultivars présentent tous une réaction semblable excepté le cultivar *Nattosan* qui montre des lésions significativement plus étendues que 12 autres lignées et cultivars (286 mm). Dans cette expérience, la variabilité est modérée (CV=43,18 %) par rapport à la même expérience au champ (CV=76,32 %) et aux résultats de Rioux sous inoculations avec sclérototes au champ en 1997 (CV=84,44 %) et 1999 (CV=45,5 %) (Rioux, 1998; S. Rioux, com. pers.) (annexe B).

Tableau 2: Évaluation de 30 lignées de soja selon deux méthodes d'évaluation de la résistance au *Sclerotinia sclerotiorum*, testées en serre en 1998 et 1999

Cultivars et lignées	Maturité <sup>d</sup>	Inoculations		
		Mycélium	Ascospores	
		1998	1999	
		LLT <sup>a</sup> 48 HAI <sup>c</sup> (mm)	Fleurs infectées (%)	DSI <sup>b</sup> 25 JAI <sup>c</sup> (%)
Maple Donovan	0	169ab	6,5c	0,0c
Frisquet	00	125ab	30,4bc	12,5c
9063	00	127ab	65,5ab	25,0bc
Achiever	00	77b	93,9a	58,3ab
Gaillard	000	176ab	78,9ab	62,5ab
Nattosan	00	286a	77,0ab	62,5ab
SO858	00	152ab	77,8ab	62,5ab
PI 358318A	0-00	103ab	74,5ab	66,7a
Aquilon	00	80b	84,8a	75,0a
M080	0	131ab	91,7a	75,0a
X3170-11-4-3dt	00	114ab	90,0a	75,0a
X3290-32-6-4dt	00	94b	75,8ab	75,0a
Enterprise	00	99b	93,9a	70,8a
Fiesta	0	105ab	84,8a	70,8a
Maple Arrow	00	88b	100,0a	70,8a
OAC Brussels	0	166ab	75,0ab	70,8a
X3254-14-6-2dt	00	70b	85,6a	70,8a
Gentleman	00	148ab	100,0a	79,2a
SOO-66	00	93b	94,4a	79,2a
284002	00	80b	96,7a	83,3a
OAC Wingham	00	133ab	88,9a	80,6a
OAC Vision	000	115ab	91,7a	87,5a
PI 189931	00	71b	91,7a	87,5a
KG41	00	132ab	90,0a	91,7a
OAC Bayfield	0	118ab	93,9a	91,7a
OAC Mirage	00	95b	91,7a	91,7a
PS42	00	91b	97,0a	91,7a
Ugo	00	169ab	90,0a	91,7a
040	0	131ab	100,0a	95,8a
Korada	00	89b	100,0a	95,8a
	Moyenne	120,8	83,7	71,7
	R <sup>2</sup>	0,53	0,71	0,61
	F	2,07(P=0,010)	4,96(P<0,001)	3,08(P<0,001)

<sup>a</sup> Longueur des Lésions sur la Tige

<sup>b</sup> Disease Severity Indices; DSI =  $\sum(\text{classe} \times \text{nombre de plantes par classe}) \times 100 / (\text{nombre total de plantes} \times \text{nombre de classes de gravité})$  (Grau et Radke, 1984)

<sup>c</sup> Jours/Heures Après Inoculation

<sup>d</sup> 000: hatif, 0: tardif (Soybase, 2001)

**Tableau 3:** Corrélations de Spearman entre l'intensité de la sclérotiniose chez 21 cultivars ou lignées de soja testés par inoculations dirigées en serre en 1998 et 1999, et par ensemencement de sclérotés au champ en 1997 et 1999 (S. Rioux, 1998; annexe B)

Inoculations dirigées en serre	Inoculation par ensemencement de sclérotés au champ <sup>a</sup>	
	Coefficient de Spearman	
	<i>P</i> n	
	1997	1999
<b>Fleurs infectées (%)</b>	-0,099 <i>0,438</i> 63	0,215 <i>0,090</i> 63
<b>DSI<sup>b</sup> (%) 25 JAI<sup>c</sup></b>	-0,156 <i>0,222</i> 63	0,357 <i>0,004</i> 63
<b>LLT<sup>d</sup> (mm)</b>	0,29906	0,03386
<b>48 h AI</b>	<i>0,021</i> 59	<i>0,799</i> 59

<sup>a</sup> Intensité moyenne de la maladie (DSI %) suite à l'ensemencement de sclérotés au champ en 1997 et 1999 (cf. Annexes B et C)

<sup>b</sup> Disease Severity Indices;  $DSI = \frac{\sum(\text{classe} \times \text{nombre de plantes par classe}) \times 100}{(\text{nombre total de plantes} \times \text{nombre de classes de gravité})}$  (Grau et Radke, 1984)

<sup>c</sup> Jours Après Inoculation

<sup>d</sup> Longueur des Lésions sur la Tige (mm)

## **3.2. Infection des fleurs ou des tiges des lignées et cultivars de soja inoculés avec du mycélium au champ, à l'été 1998**

### **3.2.1. Infection des fleurs et de l'axe floral, suite à l'inoculation de fleurs**

On observe, 10 jours après le dépôt de mycélium dans une fleur au champ, un effet significatif des lignées et cultivars selon l'ANOVA ( $P=0,004$ ) (Annexe C-2), de même qu'un effet significatif des blocs ( $P<0,001$ ). Cependant, le test de Bonferroni ne distingue aucun groupe significativement différent (Annexe A). On note cependant une faible variabilité relative ( $CV=31,44\%$ ) par rapport aux résultats de Rioux sous inoculations avec sclérotés au champ en 1997 ( $CV=84,44\%$ ) et 1999 ( $CV=45,5\%$ ) (Rioux, 1998; Rioux, com. pers.) (annexe B) et avec du mycélium en serre ( $CV=43,18\%$ ).

### **3.2.2. Infection des tiges, suite à l'inoculation de tiges blessées**

Avec la même méthode d'inoculation avec du mycélium sur la tige blessée au champ, l'ANOVA ne montre pas d'effet significatif des lignées et cultivars 48 h ( $P=0,18$ ) et 9 j ( $P=0,14$ ) après l'inoculation (Annexe C-3). On note également une forte variabilité ( $CV=76,32\%$  pour la taille des lésions à 48 h) par rapport à l'inoculation de mycélium en serre ( $CV=43,18\%$ ; Annexe C-1) et à toutes les autres méthodes d'inoculation.

### **3.2.3 Infection des tiges, suite à l'inoculation de tiges intactes**

Les résultats de l'évaluation de la résistance à l'infection par le mycélium non issu d'ascospores sont présentés en annexe (annexe A). Cette expérience n'a pas mis en évidence de différence entre les lignées (annexes C-3, C-4 et C-5). Cependant, ce type d'infection par le *S. sclerotiorum* n'avait jamais été rapporté par le passé dans le cas de la sclérotiniose du soja. Toutes les lignées présentaient des symptômes à divers degrés suite à cette inoculation (données non présentées).

## **3.3. Infection des pétales et de l'axe floral des lignées et cultivars de soja, suite à l'inoculation de fleurs avec des ascospores en serre, à l'hiver 1999**

### **3.3.1. Infection des fleurs, suite à l'inoculation avec des ascospores**

On note un effet significatif des lignées et cultivars sur l'infection des fleurs aux trois prises de données: 5, 15 et 25 j après l'inoculation ( $P<0,001$ ) (Annexe C-5). Vingt-cinq jours après l'inoculation des fleurs par des ascospores du *S. sclerotiorum*, le cultivar *Maple Donovan* montre un pourcentage de fleurs infectées significativement moins élevé (6,5 %) que tous les autres cultivars et lignées testés à l'exception de *Frisquet* (30,4 %) (tableau 2). *Frisquet* est significativement différent des 21 cultivars et lignées les plus sensibles (84,8 à 100 %). Dans cette expérience, la variabilité est relativement faible ( $CV=18,67\%$ ) comparée à celle observée antérieurement en serre et au champ.

### 3.3.2. Infection de l'axe floral, suite à l'inoculation avec des ascospores

On note un effet significatif des lignées et cultivars sur l'infection de l'axe floral, mesurée par le DSI (tableau 1 et section 2.3.3) 25 j après l'inoculation, seule prise de données ( $P < 0,001$ ; tableau 2). *Frisquet* et *Maple Donovan* présentent un DSI (12,5 et 0 %) significativement moins élevé, donc une résistance à la colonisation de l'axe floral significativement plus élevée que les autres lignées testées, excepté le cultivar 9063 (25 %). Le cultivar 9063 est significativement différent des 23 cultivars et lignées les plus sensibles (66,7 à 95,8 %). On observe une faible variabilité (CV=31,6 %) comparée aux expériences décrites précédemment.

## 3.4. Corrélations

### 3.4.1 Coefficient de Spearman entre le pourcentage de fleurs infectées, la colonisation de l'axe floral et la progression des lésions sur la tige

On a calculé le coefficient de Spearman pour tous les couples de données des expériences d'inoculation dirigée qui montrent des différences significatives entre les lignées, soit l'évaluation de la résistance à l'invasion des pétales par les ascospores (en serre, 1999), à la colonisation de l'axe floral (en serre, 1999) et à la progression des lésions dans la tige (en serre, 1998) (tableau 2). Seules les données de la résistance à l'invasion des pétales (en serre, 1999) et la résistance à la colonisation de l'axe floral (en serre, 1999) sont significativement corrélées,  $r_s = 0,77$  ( $P < 0,001$ ).

### 3.4.2 Coefficient de Spearman entre les inoculations dirigées et avec des sclérotés

On a également calculé les corrélations entre les données des inoculations dirigées et celles sous inoculations avec des sclérotés effectuées entre 1997 et 1999 (Rioux, 1998; Rioux com. Pers.; annexe B). Ces corrélations sont calculées pour les cultivars et lignées communs aux deux études (annexe B). On note 2 corrélations significatives (tableau 3): 1) infection de l'axe floral suite à l'inoculation des fleurs avec des ascospores en serre (DSI 25 JAI, hiver 1999) et inoculation avec sclérotés au champ (été 1999) ( $r_s = 0,36$ ;  $P = 0,004$ ); 2) infection de la tige blessée suite à l'inoculation de mycélium en serre (LLT 48 HAI, hiver 1998) et inoculation avec des sclérotés au champ (été 1997) ( $r_s = 0,30$ ;  $P = 0,02$ ).



## Chapitre IV DISCUSSION

Cette recherche vise, d'une part, à caractériser la résistance à la sclérotiniose de 30 lignées ou cultivars de soja adaptés au Québec. On vise, d'autre part, à examiner la contribution des tissus ou organes suivants à la réaction des lignées et cultivars: pétales et axe floral, tige blessée ou intacte. Cette recherche examine enfin l'efficacité ou la complémentarité de techniques d'inoculation caulinaire ou florale, avec du mycélium ou des ascospores, au champ et en serre, comme méthodes d'étude de la réaction de lignées et cultivars de soja au *S. sclerotiorum*.

Les résultats obtenus valident l'hypothèse qui postulait l'existence de variabilité génétique pour la résistance à la sclérotiniose chez les lignées de soja disponibles au Québec mises en évidence à l'aide de méthodes d'inoculation dirigée. On ne conclura cependant pas sur l'existence de composantes de la résistance, les expériences n'ayant pas encore été reproduites. Tel que mentionné dans la plupart des études tentant d'évaluer la résistance du soja au *S. sclerotiorum* (Boland et Hall, 1986; Chun et al., 1987; Cline et Jacobsen, 1983; Grau et al., 1982; Nelson et al., 1991b; Wegulo et al., 1998), la variabilité de la réponse des lignées a été manifeste et généralisée au cours de cette étude (CV=18,67 à 76,32 %). Par conséquent, les lignées qui montrent une résistance marquée sont peu nombreuses (*Maple Donovan, Frisquet, 9063*). On a également relevé le manque de corrélation entre les évaluations en serre et au champ (Chun et al., 1987; Cline et Jacobson, 1983; Wegulo et al., 1998) et entre les différentes méthodes d'inoculation (Wegulo et al., 1998). De plus, l'absence de corrélation entre les inoculations avec sclérotés suivant les années (Rioux, 1998; S. Rioux com. pers.) (annexe B) et avec les inoculations dirigées, limite la confirmation des résultats en serre. Le manque de corrélation entre les inoculations avec sclérotés au champ peut-être attribué aux différences de conditions climatiques entre 1997 et 1999, mais aussi probablement à la nature différente des inoculums: un cocktail de souches en 1997 et un inoculum homogène produit en laboratoire en 1999. On peut supposer que leur taux de fructification était différent. Après amélioration des méthodes d'inoculation au champ, il sera certainement possible de réaliser des comparaisons serre/champ plus fiables. En effet, Yang et al. (1999) sont les premiers en Amérique du Nord à obtenir des résultats corrélés entre les années et pour tous les cultivars et lignées testés. Ces auteurs attribuent ces corrélations à un fort potentiel d'inoculum (80 sclérotés/m<sup>2</sup>) et à l'homogénéité de la répartition des sclérotés dans les parcelles.

On peut attribuer le manque de corrélation entre la serre et le champ, pour les inoculations dirigées, à l'absence de contrôle des conditions environnementales au champ par rapport à la serre. L'affinement des techniques d'inoculation dirigée et un meilleur contrôle des conditions environnementales devraient permettre de mieux caractériser la variabilité associée à la réponse des cultivars et lignées au *S. sclerotiorum*.

### 4.1. Réaction des lignées et cultivars de soja suite à l'inoculation de tiges blessées avec du mycélium en serre, à l'hiver 1998

On note un effet significatif des lignées et cultivars 48 h après l'inoculation. Cet effet n'est plus significatif après 9 j, ce qui confirme les observations de Hunter et al. (1981) qui signalaient qu'un développement trop marqué du champignon masque les différences entre les lignées et cultivars. L'effet significatif des blocs montre que les facteurs qui dominent alors le

développement de l'infection sont probablement liés à la date de semis ou aux variations écophysiologiques entre les blocs. Cette expérience a permis de mettre en évidence 12 cultivars et lignées qui présentent des lésions significativement moins étendues que le cultivar *Nattosan*, le plus sensible au développement des lésions dans la tige, mais pas des 17 autres lignées et cultivars évalués (tableau 2). La résistance à la colonisation de la tige blessée pourrait être attribuée à une plus grande capacité à détoxifier l'acide oxalique, déterminant principal du pouvoir pathogène du *S. sclerotiorum* (Godoy et al., 1990). Des lignées transgéniques sont présentement à l'étude (Kanters, 1999; Simmonds com. Pers.); leur résistance, qui reste à confirmer, serait basée sur l'introduction du gène de l'oxalate oxidase du blé qui conférerait au blé et aux autres céréales une résistance complète à la sclérotiniose. Wegulo et al. (1998) attribuent ce type de résistance à l'accumulation de pigments roses, probablement des anthocyanes ou à la présence de tissus ligneux réduisant la diffusion de l'oxalate dans les tissus tel qu'avéré par Tu (1989) chez le pois (*Phaseolus vulgaris* L.). Sans être très discriminante utilisée seule, l'évaluation de la progression des lésions dans la tige semble mettre en évidence une composante marquée de la résistance chez certaines lignées.

## **4.2. Réaction des lignées et cultivars de soja inoculés avec du mycélium au champ, à l'été 1998**

### **4.2.1. Inoculation de fleurs**

Pour infecter la plante, les ascospores ont besoin d'humectation (Abawi et Grogan, 1979; Phillips, 1993), de nutriments (Abawi et Grogan, 1979) ou de blessures sur les tissus floraux (Cline et Jacobsen, 1983). On a donc postulé que l'inoculation d'un fragment de mycélium dans une fleur épanouie à l'aide de pinces fines permet de reproduire toutes les conditions requises pour évaluer la résistance à la colonisation de l'axe floral. On observe un effet significatif des lignées et cultivars et des blocs, mais le test de Bonferroni ne permet pas de distinguer de groupes au sein des lignées et cultivars. Comme 9 j après l'infection de la tige en serre, la maladie semble trop avancée à ce stade pour permettre une distinction des lignées et cultivars entre eux (Hunter et al., 1981; Cline et Jacobsen, 1983). Si cette expérience devait être reproduite, une prise de données plus hâtive apporterait probablement un pouvoir discriminant acceptable compte tenu de la faible variabilité associée à l'expérience (CV=31,44 %).

### **4.2.2. Inoculation de tiges blessées**

On n'observe pas d'effet significatif des lignées et cultivars et une forte variabilité (CV=76,32 %) comparée à l'inoculation des fleurs. Cette variabilité peut être associée aux conditions climatiques ou à une plus grande variabilité de la technique qui implique une blessure et huit fois plus d'inoculum que l'inoculation de fleurs. On ne rapporte pas d'essais de cette nature au champ dans la littérature.

### **4.2.3. Inoculation de tiges intactes**

Aucune différence entre les lignées testées n'a pu être mise en évidence. Cependant, toutes les lignées ont présenté des symptômes, ce qui constitue, à notre connaissance, la première mention de ce type d'infection chez le soja au Québec. Ce type d'infection par le mycélium ne doit surtout pas être négligé dans l'avenir et doit être étudié de façon beaucoup plus précise pour

évaluer notamment son importance relative dans les infestations au champ et le degré de sensibilité relative des lignées recommandées au Québec. Négliger de sélectionner des lignées sur des critères de résistance les plus larges possibles pourrait mener à laisser à l'agent pathogène l'opportunité de se spécialiser pour un type de sensibilité particulière chez la plante comme par exemple la sensibilité à l'attaque directe de la tige par le mycélium si celle-ci se confirme. Cette problématique a déjà été soulevée dans le cas de la sclérotiniose du colza (canola) (Briard et al., 1997), chez lequel le *Sclerotinia sclerotiorum* aurait été soumis à une pression de sélection par l'introduction de cultivars partiellement résistants et offrant à l'agent pathogène la possibilité de s'adapter. Certaines souches du *S. sclerotiorum* auraient pu se spécialiser pour un type d'infection, comme par exemple, l'attaque du collet (Briard et al., 1997). Cette hypothèse est étayée par le caractère très polyphage du *S. sclerotiorum* (Boland et Hall, 1994; Briard et al., 1997) et la très grande variabilité génétique détectée au sein des populations de *S. sclerotiorum* (Briard et al., 1997).

### **4.3. Infection des pétales et de l'axe floral des lignées et cultivars de soja, suite à l'inoculation de fleurs avec des ascospores en serre, à l'hiver 1999**

#### **4.3.1. Infection des pétales**

On note un effet significatif des lignées et cultivars sur l'infection des fleurs aux trois notations, 5 j, 15 j et 25 j. Il semble que contrairement aux méthodes utilisant du mycélium (Hunter et al, 1981), le développement trop rapide de l'agent pathogène soit «contrôlable» lorsqu'on utilise des ascospores. Cependant, seulement deux cultivars *Maple Donovan* et *Frisquet* se sont montrés significativement moins sensibles face à l'invasion des pétales en serre. Cette évaluation s'est faite suite à l'inoculation de trois fleurs par plante, ce qui limite a priori la précision de l'évaluation. De plus, cette méthode requiert une humidité saturante pour permettre la germination des ascospores et, comme Cline et Jacobsen (1983) l'ont déjà souligné, si l'incubation des plantes inoculées se fait à 100 % HR, la maladie peut se développer trop vite et ne pas révéler les différences entre les lignées. Par manque d'espace, les plantes ont été incubées en condition d'humidité proche de la saturation la plupart du temps. Le faible nombre de fleurs inoculées et les conditions d'incubation expliqueraient en partie le faible pouvoir discriminant de cette méthode d'inoculation. De plus, *Frisquet* et *Maple Donovan* présentent tous deux des fleurs très peu épanouies et, de fait, moins propices à l'invasion des fleurs par les ascospores, ce qui pourrait expliquer qu'ils sont les seuls à se démarquer significativement. Si cette nouvelle hypothèse était avérée, le concept de résistance à l'invasion des pétales, tel que défini, ne serait pas applicable aux lignées dont les fleurs ne s'épanouissent pas. On pourrait alors définir un autre type de résistance à caractère morphologique, basé sur l'absence ou la réduction du développement des pétales. Cette caractéristique morphologique a été exploitée chez le colza par la création de cultivars apetalus, i.e sans pétales, conférant ainsi une résistance à la sclérotiniose commercialement intéressante chez cette espèce.

La technique inédite d'inoculation d'une goutte de suspension d'ascospores par fleur appliquée ici, s'est avérée aussi efficace à induire la maladie que les techniques de Pérès (1995) ou Cline et Jacobsen (1983), qui consistaient à vaporiser la suspension d'ascospores sur les inflorescences. Cette technique a l'avantage d'être plus précise: les ascospores ne sont en contact

qu'avec les fleurs. De plus, cette technique demande beaucoup moins d'ascospores que la technique de vaporisation (30 à 50  $\mu$ l par grappe contre 1 ml pour la vaporisation). Ceci réduit la collecte et facilite la préparation et l'ajustement de la suspension d'ascospores. Cependant, l'inoculation de chaque fleur à l'aide d'une micropipette est plus laborieuse qu'une simple vaporisation. Il conviendrait de réaliser les deux techniques en parallèle pour déterminer laquelle serait la meilleure à adopter pour des inoculations de routine. La précision obtenue devrait faciliter l'évaluation de la résistance à l'invasion des pétales. On a souvent constaté, au cours des évaluations en serre, que les fleurs infectées se détachent précocement de l'inflorescence prévenant ainsi la propagation du mycélium dans les tissus de l'axe floral. Ceci a déjà été mentionné par Cline et Jacobsen (1983). Ce fait important devrait faire l'objet d'observations plus poussées.

#### 4.3.2. Infection de l'axe floral

On note un effet significatif des lignées et cultivars sur l'infection de l'axe floral 25 j après l'inoculation (seule notation). En serre, on évalue la résistance à la colonisation de l'axe floral suite à l'inoculation d'ascospores dans les fleurs. Dans ce cas, la résistance à l'invasion des pétales peut masquer la résistance à la colonisation de l'axe floral si elle permet de circonscrire l'infection aux pétales ou aux fleurs. Les deux cultivars significativement plus résistants pour la colonisation de l'axe floral en serre (*Maple Donovan*, *Frisquet*) sont également les plus résistants à l'invasion des pétales. *Maple Donovan* montre, selon la méthode d'inoculation à l'aide d'ascospores, une absence de colonisation de l'axe floral par le simple fait que l'infection ne s'est jamais étendue au-delà des fleurs. Étant donné les incertitudes liées aux techniques et aux conditions d'inoculation et d'évaluation (serre et champ), il apparaît difficile de distinguer la résistance à la colonisation de l'axe floral de la résistance à l'invasion des pétales. En effet ces résultats sont fortement corrélés entre eux,  $r_s=0,77$  ( $P<0,001$ ). On ne rapporte pas d'autre mention de l'évaluation de la colonisation de l'axe floral.

## CONCLUSIONS

Les résultats obtenus permettent d'avérer l'hypothèse de recherche et ainsi de mettre en évidence à l'aide de méthodes d'inoculations dirigées, des différences de résistance à l'infection par le *Sclerotinia sclerotiorum* entre les lignées et cultivars de soja disponibles au Québec.

On a également atteint une partie des objectifs de recherche proposés. On a apporté des précisions sur la contribution des fleurs et de la tige blessée ou non à la résistance à l'infection par le *S. sclerotiorum*. Chez deux cultivars en particulier (*Maple Donovan* et *Frisquet*) l'infection ne s'est pas propagée dans les fleurs tandis que des différences significatives ont été notées dans la réaction des lignées et cultivars à la progression des lésions dans la tige. De plus, deux méthodes d'inoculation en serre, soit l'inoculation de mycélium sur la tige blessée (LTI) et l'inoculation d'ascospores sur les fleurs, se sont montrées discriminantes et complémentaires. Elles ont permis d'opérer une première sélection de parents sensibles ou moins sensibles, à résistance partielle ou incomplète, et de débiter un programme d'amélioration génétique de lignées et cultivars de soja plus résistants au *S. sclerotiorum*.

Les méthodes développées au cours de cette étude ont permis une approche plus précise de l'infection du soja par le *S. sclerotiorum* dans la mesure où elles permettent de mieux cerner les différentes étapes de l'infection. Elles sont complémentaires des évaluations plus générales faites au champ ou au laboratoire qui visent à évaluer la résistance des lignées selon des critères beaucoup plus larges. De plus, l'inoculation de la tige intacte réalisée au champ au cours de cette étude, bien que ne montrant pas d'effet significatif des lignées et cultivars est intéressante à plusieurs égards: c'est la première fois que l'on vérifie au Québec la possibilité d'une infection directe de la tige intacte par du mycélium du *S. sclerotiorum* et ce chez la plupart des lignées testées. Ceci confirme la très grande variabilité génétique du *S. sclerotiorum* et incite à la plus grande vigilance quant aux évaluations des lignées et cultivars. Ces évaluations doivent tenir compte des très grandes capacités adaptatives de l'agent pathogène et privilégier les lignées présentant les mécanismes de résistance les plus diversifiés possible.

Les résultats sont à confirmer et les méthodes d'inoculation à améliorer de façon à mieux contrôler la variabilité en serre comme au champ. C'est en confrontant les données issues des différentes méthodes d'inoculation utilisées en serre et au champ que l'on devrait connaître plus précisément les facteurs de variabilité associés à la sensibilité relative des lignées et cultivars de soja et ainsi établir des critères d'évaluation de plus en plus fiables et facilement utilisables.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abawi, G.S. et Grogan, R.G., 1979.** Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 899-904.
- Achbani, E. H., Tourvielle, D. et Lenormand, M., 1995.** Production d'apothécies chez *Sclerotinia* spp. *Al Awamia* 90: 31-50.
- Adams, P.B., 1975.** Factors affecting survival of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Plant Dis. Rep.* 59: 599-603.
- Adams, P.B. et Ayers, W.A., 1979.** Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 896-898.
- Anderson, T.R., 1996.** Potential diseases associated with increased soybean production. Colloque sur le soja du CPVQ, le 27 novembre 1996 à Saint Hyacinthe, Québec, Canada.
- Anderson, T.R., et Tenuta, A.U. 2001.** Diseases of soybean in Ontario and estimated yield losses, 1994, 1996-2000. *Can. Plant Dis. Surv.* **81**: 133-135.
- Bailey, K.L., 1996.** Diseases under conservation tillage systems. *Can. J. Plant Sci.* 76: 635-639.
- Boland, G.J. et Hall, R., 1986.** Growthroom evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Sci.* 66: 559-564.
- Boland, G.J. et Hall, R., 1988a.** Epidemiology of sclerotinia stem rot of soybean in Ontario. *Phytopathology* 78: 1241-1245.
- Boland, G.J. et Hall, R., 1988b.** Relationships between the spatial pattern and number of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and stem rot of soybean. *Plant Pathol.* 37: 329-336.
- Boland, G.J. et Hall, R., 1994.** Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 16: 93-108.
- Briard, M., Dutertre, M. et Brygoo Y., 1997.** Du nouveau du côté des *Sclerotinia*: Trois espèces...mais quelle variabilité ! *Phytoma-La Défense des Végétaux*, 490: 15-19.
- Burnside, O.C., Wiens, M.J., Krause, N.H., Weisberg, S., Ristau, E.A., Johnson, M.M. et Sheets, R.A., 1988.** Mechanical and chemical weed control systems for kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Weed Technol.* 12: 174-178.
- Butzen, S., 1997.** Managing white mold of soybeans. *Crop insights Pioneer* 7, 9: 1-4.
- Buzzell, R.I., Welacky, T.W. et Anderson, T.R., 1993.** Soybean cultivar reaction and row width effect on *Sclerotinia* stem rot. *Can. J. Plant Sci.* 73: 1169-1175.

**Chun, D., Kao, L.B., Lockwood, J.L. et Isleib, T.G., 1987.** Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 71: 811-815.

**Cline, M.N. et Jacobsen, B.J., 1983.** Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 67: 784-786.

**Conseil des productions végétales du Québec (CPVQ), 1996.** Grilles de références en fertilisation. 2e édition. MAPAQ, Québec. 128 p.

**Conseil des productions végétales du Québec (CPVQ), 1990.** Soya, culture. Gouvernement du Québec. MAPAQ, Québec. 47p.

**Cook, G.E., Steadman J.R. et Boosalis M.G., 1975.** Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in western Nebraska. Phytopathology 65: 250-255.

**Dencescu, S., Soare, T. et Cristea, G., 1992.** Studies on the inheritance to attack by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in soybean at the seedling stage. Probleme de Genetica Teoretica si Aplicata 24: 61-69.

**Dickson, M. et Hunter, J.E., 1983.** Modifications of methods for screening for white mold resistance in the greenhouse. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 26: 85-86.

**Dillard, H.R., Ludwig, J.W. et Hunter, J.E., 1995.** Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. Plant Dis. 79: 411-415.

**Favaron, F., Alghisi, P. et Marciano P., 1992.** Characterization of two *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonases with different abilities to elicit glyceollin in soybean. Plant Sci. 83: 7-13.

**Favaron, F., Peretto, R., Bonfante, P. et Alghisi, P., 1993.** Differential absorption and localization of two *Sclerotinia sclerotiorum* endo-polygalacturonases in soybean hypocotyls. Physiol. Mol. Plant Pathol. 43: 353-364.

**Favaron, F., D'Ovidio, R., Porceddu, E. et Alghisi, P., 1994.** Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein. Planta 195: 80-87.

**Fehr, W.R., Caviness, C.E., Burmood, D.T. et Pennington, J.S., 1971.** Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. Crop Sci. 11: 929-931.

**Ferrar, P. H. et Walker, J.R.L., 1993.** O-Diphenol oxidase inhibition-an additionnal role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 43: 415-422.

**Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998.** «FAO STAT Agriculture Data; Agriculture Production; Crops Primary». <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-wrap.pl?Production.Crops.Primary&Domain=SUA&servlet=1>. 9 décembre 1998.

- Godoy, G., Steadman, J.R., Dickman, M.B. et Dam, R., 1990.** Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37: 179-191.
- Gondran, J. et Leclercq P., 1992.** Variabilité génétique du soja pour la résistance à la sclérotiniose (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib de Bary). Liaisons statistiques avec certains caractères de la culture. INRA, France. Publication interne.
- Grau, C.R., 1989.** Sclerotinia stem rot. In J.B. Sinclair et P.A. Backman (réds) *Compendium of Soybean Diseases*. Troisième édition. APS Press. St. Paul. pp. 47-48.
- Grau, C.R. et Bissonnette, H.L., 1974.** Whetzelinia stem rot of soybean in Minnesota. *Plant Dis. Rep.* 58: 693-695.
- Grau, C.R. et Radke, V.L., 1984.** Effects of cultivars and cultural practices on Sclerotinia stem rot of soybean. *Plant Dis.* 68: 56-58.
- Grau, C.R., Radke, V.L. et Gillespie, F.L., 1982.** Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 66: 506-508.
- Grogan, R.G. et Abawi, G.S., 1975.** Influence of water potential on growth and survival of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 65: 122-138.
- Hall, R., 1994.** Pea and Bean. In R.J. Howard, J.A. Garland et W.L. Seaman (réds). *Diseases and pests in vegetable crops in Canada*. Ottawa. CPS et ESC. p. 211-223.
- Henderson, R.M., 1962.** An inhibitory growth correlation in the apothecial stipe of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Nature (London)* 195: 826.
- Hunter, J.E., Dikson, M.H. et Cigna, J.A., 1981.** Limited-term inoculation: a method to screen bean plants for partial resistance to white mold. *Plant Dis.* 65: 414-417.
- Hunter, J.E., Steadman, J.R., et Cigna, J.A., 1982.** Preservation of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* on membrane filters. *Phytopathology* 72: 650-652.
- Jamaux, I., Gelie, B. et Lamarque, C., 1995.** Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. *Plant Pathol.* 44: 22-30.
- Jiao, H.S., Cheng, Z.M., Xu, X.H., Zou, L.B., Lu, X.D., Liu, J.P. et Ding, T.F., 1994.** Studies on evaluation for resistance of soybean germplasm resource to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Soybean Sci.* 13: 349-356.
- Kanters, J., 1999.** White mould resistant soybean cultivars being tested. *Agri-Book Magazine/Beans in Canada* 1999.



**Kim, H. S., Sneller, C.H. et Diers, B.W., 1999.** Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia* stem rot in field environments. *Crop Sci.* 39: 64-68.

**Kohn, L.M., 1979.** A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon* 9: 365-444.

**Lumsden, R.D., 1979.** Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 890-896.

**Liu, Y. et Lui, Y., 1996.** A study of the variation in pathogenicity among ascospores isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Southwest Agricultural University*. 18: 536-538 (Résumé CAB)

**Maheu, L., 1999.** Effet des pratiques culturales sur la survie des sclérotés du *Sclerotinia sclerotiorum*, l'agent responsable de la sclérotiniose du soya. Mémoire de Maîtrise, Université Laval, Québec.

**Merriman, P.R., Pywell, M., Harrison, G. et Nancarrow, J., 1979.** Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and effect of cultivation practices on disease. *Soil Biol. Biochem.* 11: 567-570.

**Miao, B.H., 1995.** Study for the evaluation of soybean germplasm resistant to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop Genetic Resources* 2: 35-36.

**Mitchell, S.J. et Wheeler, B.E.J., 1990.** Factors affecting the production of apothecia and longevity of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol.* 39: 70-76.

**Mousseau, A., 1998.** Estimations de la production des grandes cultures. *Terre de Chez-Nous* 69: 43 p. 37.

**Nelson, B.N., Helms, T.C. et Kural, I., 1991a.** Effect of temperature and pathogen isolate on laboratory screening of soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Sci.* 71: 347-352.

**Nelson, B.N., Helms, T.C. et Olson, M.A., 1991b.** Comparison of laboratory and field evaluations of resistance in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 75: 662-665.

**Paré, T., Chalifour, F.P., Bourassa, J. et Antoun, H., 1993.** Forage corn production and N-fertilizer replacement values following 1 or 2 years of legumes. *Can. J. Plant Sci.* 73: 477-493.

**Pères, A., 1995.** *Sclerotinia* du soja: premières évaluations du comportement variétal. *CETIOM-Oléoscope* 26: 28-29.

**Phillips, A. J. L., 1993.** Influence of fluctuating temperatures and interrupted periods of plant surface wetness on infection on bean leaves by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Ann. Appl. Biol.* 124: 413-427.

**Pratt, R.G., 1992.** Sclerotinia. Dans Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. Singleton, H.H., Mihail, J.D. et Rush, C.M. (réds). APS Press. St. Paul. pp. 74-78.

**Purdy, L. H., 1979.** *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology* 69: 875-880.

**Rahe, J.E. et Utkhede, R.S., 1985.** Integrated biological and chemical control of sclerotial pathogens. Dans: *Ecology and management of soilborne plant pathogens*, G.A. Parker, A.D. Rovira, K.J. Moore, P.T.W. Wong et J.F. Kollmorgen (réds), The American Phytopathological Society, St. Paul, pp. 124-126.

**Rioux, S., 1997.** La sclérotiniose chez le soya, son importance et les moyens de lutte. Agri-Vision. Journée d'information de la Direction Régionale de Montérégie, secteur est, Saint-Hyacinthe. 10 p.

**Rioux, S., 1998.** Lutte à *Sclerotinia sclerotiorum*, l'agent responsable de la pourriture sclérotique chez le soya. Rapport d'étape, projet CORPAQ 4575, Québec.

**SAS Institute, 1984.** The SAS System 6.12. Statistics SAS Inst. Cary.

**Schwartz, H.F. et Steadman, J.R., 1978.** Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 68: 383-388.

**Shimada, M., Akamtsu, Y., Tokimatsu, T., Mii, K, et Hattori, T., 1997.** Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. *Journal of Biotechnology* 53: 103-113.

**Sinclair, J.B. et Backman, P.A., 1989.** Compendium of soybean diseases. Troisième édition. APS Press. St Paul. 69 p.

**Smith, A.M., 1972.** Biological control of fungal sclerotia in soil. *Soil Biol. Biochem.* 4: 131-134.

**Soybase, 2001.** <http://129.186.26.94/>.

**Statistiques Canada.** StatCan: Disque CANSIM.

**Steadman, J.R., 1979.** Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 904-907.

**Steadman, J.R. et Cook, G.E., 1974.** A simple method for collecting ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Plant Dis. Rep.* 58: 190.

**Sutton, J.C. et Peng, G., 1993.** Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 473-493.

**Sutton, J.C. et Deverall, B.J., 1984.** Phytoalexin accumulation during infection of bean and soybean by ascospores and mycelium of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathol. 33: 377-383.

**Tu, J.C., 1989.** Modes of primary infection caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. In navy bean. Microbios 57: 85-91.

**Wegulo, S.N., Yang, X.B. et Martinson, C.A., 1998.** Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. Plant Dis. 82: 1264-1270.

**Williams, J.R. et Stelfox, D., 1980.** Influence of farming practices in Alberta on germination and apothecium production of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Plant Pathol. 2: 169-172.

**Yang, X. B., Lundeen, P. et Uphoff, M. D., 1999.** Soybean varietal response and yield loss caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 83: 456-461.

**Yorinori, J.T. et Homechin, M., 1984.** Sclerotinia stem rot of soybeans, its importance and research in Brazil. World soybean research conference III. Proceedings, pp. 582-588.

**Zhang, G.D., 1995.** Screening of soybean germplasm for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Soybean Genetics Newsletter 22: 59-60.

## ANNEXE A: Inoculations de mycélium dans les fleurs, de mycélium sur la tige saine ou blessée, au champ en 1998

DSI (Disease Severity Index, %) 10 jours après l'inoculation (JAI) de mycélium dans les fleurs, pourcentage moyen de plantes atteintes 7 jours après l'inoculation de mycélium sur la tige saine et longueur des lésions sur la tige (LLT en mm) 48 h après l'inoculation (HAI) de tiges blessées avec du mycélium, chez 30 cultivars et lignées de soja au champ en 1998.

Cultivars et lignées	Inoculations					
	Mycélium dans les fleurs		Mycélium sur tige intacte		Mycélium sur tiges blessées	
	DSI 10 JAI (%)	Écart type	Plantes malades 7 JAI (%)	Écart type	LLT 48 HAI (mm)	Écart type
040	16,7	4,8	26,7	30,6	92,6	6,4
284 002	59,4	19,5	73,3	11,5	70,8	39,3
9063	28,1	35,2	53,3	23,1	70	61,2
Achiever	64,6	39,6	65,0	8,7	63,6	20,5
Aquilon	58,3	18,3	71,7	10,4	40,6	28,4
Enterprise	65,6	6,2	60,0	20,0	122	88,6
Fiesta	17,7	3,6	66,7	23,1	62,7	36,8
Frisquet	51	17,8	60,0	34,6	70,6	60
Gaillard	52,1	4,8	53,3	41,6	142	93,5
Gentleman	54,2	11	40,0	20,0	79,3	44,7
KG 41	52	14,8	36,7	15,3	144,7	10
Korada	51	12,6	53,3	30,6	87,3	31,9
M080	16,7	1,8	93,3	11,5	84	73,7
Maple Arrow	54,2	9,5	53,3	11,5	98,6	14,7
Maple Donovan	35,4	11	53,3	41,6	28,6	25
Nattosan	43	25	53,3	46,2	141,3	25,8
OAC Bayfield	57,4	16	80,0	20,0	52	35,4
OAC Brussels	17,7	23	33,3	11,5	95,8	3,43
OAC Mirage	54,2	22,6	73,3	23,1	125,3	113,2
OAC Vision	49	12,6	60,0	20,0	17,3	15,5
OAC Wingham	25	35,2	66,7	30,6	70	40,6
PI 189931	36,5	4,8	40,0	28,3	21	12,7
PI 358318A	55,2	31,6	73,3	23,1	33,3	57,7
PS 42	50	17,4	86,7	11,5	68,7	39,7
SO858	41,7	11	36,7	32,1	14	12,2
SOO-66	54,2	11	60,0	20,0	49,3	78,6
Ugo	42,7	7,9	33,3	41,6	47,7	4,37
X3170-11-4-3dt	45,8	18,8	50,0	42,4	14	5,6
X3254-14-6-2dt	39,1	37,6	40,0	28,3	52	48
X3290-32-6-4dt	44,8	24,3	30,0	14,1	72	0,85
<b>Moyenne</b>	<b>47,05</b>		<b>56,63</b>		<b>72,5</b>	
R <sup>2</sup>	0,61		0,46		0,42	
CV	31,44		44,36		76,33	

## ANNEXE B: Évaluations de la résistance à la sclérotiniose chez le soja au champ par inoculation de sclérotés en 1997 et 1999 (Rioux, 1998)

**B-1:** Intensité et incidence de la sclérotiniose (DSI, % de plantes atteintes), rendement et maturité évalués au champ en 1997 chez 21 lignées de soja suite à l'inoculation de sclérotés issus de résidus de soja collectés dans la région de Huntingdon (QC) et conditionnés pour la fructification au laboratoire (Rioux, 1998)

N°	Nom	DSI <sup>a</sup>		PA <sup>b</sup>	Rendement	Maturité
		Moyenne		%	kg/ha	1:hâtif; 4:tardif
15	OAC Mirage	<b>0,00</b>	<b>a</b>	0,00	4668,17	3,33
16	OAC Vision	<b>0,00</b>	<b>a</b>	0,00	3663,29	1,00
21	Ugo	<b>0,00</b>	<b>a</b>	1,33	5539,93	2,67
20	SO858	<b>0,33</b>	<b>a</b>	0,67	5393,70	4,00
2	284002	<b>0,67</b>	<b>a</b>	1,00	4896,89	3,00
5	Aquilon	<b>0,67</b>	<b>a</b>	0,00	4595,05	2,00
10	Maple Arrow	<b>0,67</b>	<b>a</b>	0,33	3899,51	2,33
18	PS42	<b>0,67</b>	<b>a</b>	0,67	3269,59	2,67
19	SO0-66	<b>1,00</b>	<b>ab</b>	0,33	5093,74	2,67
4	Achiever	<b>10,33</b>	<b>abc</b>	2,33	4536,93	2,67
17	OAC Wingham	<b>10,67</b>	<b>abc</b>	3,33	4750,66	4,00
9	MO80	<b>12,00</b>	<b>bc</b>	4,00	5568,05	4,00
13	OAC Bayfield	<b>12,33</b>	<b>c</b>	6,00	4351,33	4,00
3	9063	<b>3,33</b>	<b>abc</b>	4,00	3993,25	3,00
7	KG41	<b>3,33</b>	<b>abc</b>	1,00	4694,41	3,33
6	Fiesta	<b>3,67</b>	<b>abc</b>	0,33	4851,89	4,00
1	O40	<b>33,00</b>	<b>d</b>	12,33	4261,34	3,67
11	Maple Donovan	<b>4,33</b>	<b>abc</b>	1,00	3903,26	2,67
8	Korada	<b>5,67</b>	<b>abc</b>	3,67	4533,18	3,33
14	OAC Brussels	<b>7,67</b>	<b>abc</b>	5,33	3393,33	3,00
12	Nattosan	<b>74,33</b>	<b>e</b>	73,33	1936,63	2,33
Moyenne:		<b>8,79</b>		5,76	4371,15	3,03
R <sup>2</sup>		0,89		0,97	0,74	0,84
C.V.		84,44		57,50	14,29	14,00

<sup>a</sup> DSI (Disease Severity Index) exprimé en pourcentage

<sup>b</sup> Pourcentage de plantes atteintes

**B-2:** Intensité de la sclérotiniose (DSI) et maturité évalués au champ en 1999 chez 21 lignées de soja suite à l'inoculation de sclérotés produits et conditionnés pour la fructification au laboratoire (Rioux, com. pers.)

<b>lignées</b>		<b>DSI<sup>a</sup></b>		<b>Maturité</b>
No.	Nom	<b>Moyenne<sup>b</sup></b>		(1=hâtif; 5=tardif)
1	O40	<b>22,4</b>	<b>cdefg</b>	4,3
2	284002	<b>44,0</b>	<b>fgh</b>	4,0
3	9063	<b>0,3</b>	<b>a</b>	4,0
4	Achiever	<b>5,5</b>	<b>abc</b>	4,0
5	Aquilon	<b>19,8</b>	<b>bcdefg</b>	2,0
6	Fiesta	<b>13,9</b>	<b>abcdefg</b>	4,7
7	KG41	<b>8,3</b>	<b>abcd</b>	4,7
8	Korada	<b>14,1</b>	<b>abcdefg</b>	4,0
9	M080	<b>23,2</b>	<b>cdefg</b>	4,7
10	Maple Arrow	<b>9,3</b>	<b>abcde</b>	2,0
11	Maple Donovan	<b>5,5</b>	<b>abc</b>	4,0
12	Nattosan	<b>84,6</b>	<b>h</b>	2,0
13	OAC Bayfield	<b>21,9</b>	<b>cdefg</b>	5,0
14	OAC Brussels	<b>40,6</b>	<b>efgh</b>	3,7
15	OAC Mirage	<b>43,9</b>	<b>fgh</b>	4,3
16	OAC Vision	<b>3,0</b>	<b>abc</b>	1,0
17	OAC Wingham	<b>50,7</b>	<b>gh</b>	5,0
18	PS42	<b>42,5</b>	<b>efgh</b>	3,0
19	S00-66	<b>10,5</b>	<b>abcdef</b>	4,0
20	SO858	<b>1,4</b>	<b>ab</b>	4,7
21	Ugo	<b>37,1</b>	<b>defgh</b>	2,7
Moyenne		<b>23,9</b>		3,7
R <sup>2</sup>		0,66		
C.V.		45,5		

<sup>a</sup> DSI (Disease Severity Index) exprimé en pourcentage

<sup>b</sup> Moyennes détransformées de arcsinus de la racine carrée

## ANNEXE C: Analyses de variance des résultats des inoculations artificielles générées par le progiciel SAS

(PROC GLM)

### C-1 Infection de la tige de 30 lignées et cultivars de soja, suite à l'inoculation de tiges blessées avec du mycélium en serre, durant l'hiver 1998

ANOVA de la taille des lésions (cm) à T1= longueur des lésions sur la tige 48 h après inoculation, T2= longueur des lésions sur la tige 9 j après inoculation.

Variable dépendante: T1

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés	Moyennes des carrés	F	P>F
Modèle	31	1659,376	53,528	1,970	0,014
Erreur	54	1470,559	27,233		
Total	85	3129,935			

R <sup>2</sup>	Coefficient de variation	Racine de la moyenne des carrés des écarts	Moyenne de T1
0,530	43,181	5,218	12,085

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés de type III	Moyennes des carrés	F	P>F
Blocs	2	20,663	10,332	0,380	0,686
Cultivars	29	1634,864	56,375	2,070	0,010

## Variable dépendante: T2

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés	Moyennes des carrés	F	P>F
Modèle	31	158933,055	5126,873	1,710	0,042
Erreur	53	159058,711	3001.108		
Total	84	317991,766			

R <sup>2</sup>	Coefficient de variation	Racine de la moyenne des carrés des écarts	Moyenne de T2
0,499	36,150	54,782	151,543

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés de type III	Moyennes des carrés	F	P>F
Blocs	2	25285,416	12642,708	4,210	0,020
Cultivars	29	137436,994	4739,207	1,580	0,074



## C-2 Infection des fleurs et de l'axe floral, suite à l'inoculation de fleurs au champ, durant l'été 1998

ANOVA du DSI (%) à T2=10 j.

Variable dépendante: T2

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés	Moyennes des carrés	F	P>F
Modèle	27	17403,615	644,578	2,940	<0,001
Erreur	50	10947,282	218,946		
Total	77	28350,897			

R <sup>2</sup>	Coefficient de variation	Racine de la moyenne des carrés des écarts	Moyenne de T2
0,614	31,444	14,797	47,057

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés de type III	Moyennes des carrés	F	P>F
Blocs	2	4117,881	2058,940	9,400	<0,001
Cultivars	25	13285,735	531,429	2,430	0,004

## C-3 Infection des tiges, suite à l'inoculation de tiges blessées au champ, durant l'été 1998

ANOVA de la taille des lésions (cm) à T1=48 h, T2=9 j, CIN=cinétique de progression des lésions calculée sur 7 j.

Variable dépendante: T1

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés	Moyennes des carrés	F	P>F
Modèle	31	1192,211	38,458	1,260	0,228
Erreur	54	1654,229	30,634		
Total	85	2846,440			

R <sup>2</sup>	Coefficient de variation	Racine de la moyenne des carrés des écarts	Moyenne de T1
0,419	76,330	5,535	7,251

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés de type III	Moyennes des carrés	F	P>F
Blocs	2	19,248	9,624	0,310	0,732
Cultivars	29	1186,995	40,931	1,340	0,176

## Variable dépendante: T2

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés	Moyennes des carrés	F	P>F
Modèle	31	109572,341	3534,592	1,420	0,127
Erreur	54	134364,841	2488,238		
Total	85	243937,183			

R <sup>2</sup>	Coefficient de variation	Racine de la moyenne des carrés des écarts	Moyenne de T2
0,449	94,104	49,882	53,008

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés de type III	Moyennes des carrés	F	P>F
Blocs	2	6470,964	3235,482	1,300	0,281
Cultivars	29	100439,879	3463,444	1,390	0,145

## C-4 Infection des tiges, suite à l'inoculation de tiges intactes au champ, durant l'été 1998

ANOVA du pourcentage de plantes atteintes = POURC, 7 j après l'inoculation

Variable dépendante: pourcentage de plantes atteintes

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés	Moyennes des carrés	F	P>F
Modèle	31	29199,336	941,914	1,490	0,097
Erreur	54	34072,756	630,977		
Total	85	63272,093			

R <sup>2</sup>	Coefficient de variation	Racine de la moyenne des carrés des écarts	Moyenne de Pourc
0,461	44,358	25,119	56,628

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés de type III	Moyennes des carrés	F	P>F
Blocs	2	4693,910	2346,955	3,720	0,031
Cultivars	29	24605,192	848,455	1,340	0,171

## C-5 Infection des fleurs, suite à l'inoculation avec des ascospores en serre, durant l'hiver 1999

ANOVA du pourcentage de fleur atteintes à T1=5 j, T2=15 j, T3=25 j

Variable dépendante: T1

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés	Moyennes des carrés	F	P>F
Modèle	31	48306,079	1558,261	3,890	<0,001
Erreur	58	23246,344	400,799		
Total	89	71552,423			

R <sup>2</sup>	Coefficient de variation	Racine de la moyenne des carrés des écarts	Moyenne de T1
0,675	30,682	20,020	65,250

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés de type III	Moyennes des carrés	F	P>F
Blocs	2	2139,917	1069,958	2,670	0,078
Cultivars	29	46166,162	1591,937	3,970	<0,001

Variable dépendante: T2

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés	Moyennes des carrés	F	P>F
Modèle	31	36350,655	1172,602	3,610	<0,001
Erreur	58	18845,714	324,926		
Total	89	55196,369			

R <sup>2</sup>	Coefficient de variation	Racine de la moyenne des carrés des écarts	Moyenne de T2
0,658	22,465	18,026	80,240

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés de type III	Moyennes des carrés	F	P>F
Blocs	2	1239,946	619,973	1,910	0,158
Cultivars	29	35110,708	1210,714	3,730	<0,001

### Variable dépendante: T3

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés	Moyennes des carrés	F	P>F
Modèle	31	35267,032	1137,646	4,660	<0,001
Erreur	58	14173,641	244,373		
Total	89	49440,673			

R <sup>2</sup>	Coefficient de variation	Racine de la moyenne des carrés des écarts	Moyenne de T3
0,713	18,668	15,632	83,737

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés de type III	Moyennes des carrés	F	P>F
Blocs	2	149,950	74,975	0,310	0,737
Cultivars	29	35117,082	1210,934	4,960	<0,001

## C-6 Infection de l'axe floral, suite à l'inoculation avec des ascospores en serre, durant l'hiver 1999

ANOVA du DSI (%) à T3=25 j,

Variable dépendante: T3

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés	Moyennes des carrés	F	P>F
Modèle	31	46026,881	1484,738	2,890	<0,001
Erreur	58	29788,864	513,601		
Total	89	75815,745			

R <sup>2</sup>	Coefficient de variation	Racine de la moyenne des carrés des écarts	Moyenne de T3
0,607	31,602	22,663	71,7130

Sources de variation	Degrés de liberté	Sommes des carrés de type III	Moyennes des carrés	F	P>F
Blocs	2	83,728	41,864	0,080	0,922
Cultivars	29	45943,153	1584,247	3,080	<0,001