



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Agrosystèmes, Écosystèmes et Environnement

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme NEILA AIT KACI AHMED

le jeudi 6 octobre 2022

**Titre :**

Evaluation des services et dis-services écosystémiques rendus par les cultures intermédiaires multi-services et par la biofumigation pour améliorer la productivité du tournesol

---

**Ecole doctorale :**

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

**Unité de recherche :**

AGroécologie, Innovations, TeRritoires ( AGIR)

**Directeur(s) de Thèse :**

M. GREGORY DECHAMP-GUILLAUME

MME CELIA SEASSAU

**Rapporteurs :**

MME AURELIE METAY, MONTPELLIER SUPAGRO

MME DELPHINE MOREAU, INRA DIJON

**Membre(s) du jury :**

M. PHILIPPE DEBAEKE, INRA TOULOUSE, Président

M. GREGORY DECHAMP-GUILLAUME, TOULOUSE INP, Membre

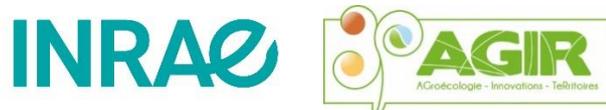
MME CELIA SEASSAU, EI PURPAN, Membre

MME MURIEL VALANTIN-MORISON, CENTRE REGIONAL INRA, Membre

*Financement*



*Accueil*





*A mes parents et à mon petit frère*



## **Remerciements**

*Trois années de thèse s'achèvent marquées par d'innombrables heures passées confinée chez moi, mais heureusement, également passées en plein champ au milieu des tournesols ou des moutardes ou ... confinée au laboratoire avec des graines d'Orobanche ! Ces trois années de thèse n'auraient pas été les mêmes si je n'avais pas été accompagnée par un grand nombre de personnes que je souhaite remercier vivement.*

*Tout d'abord, merci à Célia Seassau et Grégory Dechamp-Guillaume, mes deux directeurs de thèse, pour m'avoir confiée cette thèse dont le sujet m'a passionnée tout du long, et pour l'autonomie dont vous m'avez laissée faire preuve. Merci également pour votre avis dans la préparation de mes protocoles expérimentaux et pour la relecture de mes écrits (articles, appels à projet, ainsi que ce présent manuscrit) et oraux malgré vos emplois du temps très chargés ! Merci également à Célia de m'avoir permis de t'épauler sur les TD de phytopathologie à l'EI Purpan pour m'initier à l'enseignement et de m'avoir proposée de participer et accompagnée à la formation EDEN qui avait été un moment enrichissant.*

*Merci également à Mireille Chabaud et Stéphane Muñoz du LIPME qui m'ont prise sous leur aile pour toute la partie Orobanche et m'ont aidée à me familiariser avec ce bioagresseur ! Merci beaucoup à Mireille d'avoir pris le temps de me former à tous les protocoles relatifs à son étude, avec patience et persévérance car tout n'était pas gagné au début ! Merci également pour tes relectures de mon article et tes suggestions de lectures bibliographiques. Je remercie aussi Marie-Claude Bonniface pour l'aide qu'elle a pu m'apporter pour la préparation et la mise en œuvre de mes expérimentations au laboratoire, sous serre, et en plein champ relatives à l'Orobanche.*

*Merci à mes superviseurs du côté de MAS Seeds d'avoir contribué au financement de la thèse avec l'Association nationale de la recherche et de la technologie et merci d'avoir également contribué au financement de projets annexes. Plus précisément, merci à Antoine Gaillard, Camille Henry, Aurélie Baussart, Gabriel Magaddino, Thibault Leclerc, Olivier Maes et Aline Dumont pour les réunions que nous avons pu faire au cours de la thèse, qui étaient intéressants et riches en perspectives.*

*Merci donc aux financeurs du LabEx Tulip d'avoir co-financé le projet OMOCO et à la FRAIB d'avoir financé le projet CROCO. Merci également à Plant2Pro Institut Carnot pour le financement du projet CIMS-ON grâce auquel quelques essais ont pu être menés à bien.*

*Merci aux membres de mon jury de thèse Delphine Moreau, Aurélie Métay, Muriel Valantin Morison et Philippe Debaeke d'avoir accepté d'en faire partie et pour le temps passé à examiner le présent travail.*

*Merci aux membres de mes deux comités de pilotage pour les échanges méthodologiques enrichissants et pour votre avis sur mes travaux : Jean-Noël Aubertot, Lionel Alletto, Christophe Jestin et Christophe Roux.*

*Merci également aux chercheurs de l'UMR AGIR qui se sont toujours montrés disponibles pour répondre à mes questions et m'apporter leur aide sur différents*

*sujets : Philippe et Lionel encore une fois, concernant mes questions sur le tournesol ou les CIMS, respectivement ou plus globalement sur d'autres questionnements ! Merci à Jay-Ram Lamichhane pour ta disponibilité et ta gentillesse à répondre à toutes mes questions sur la rédaction d'article ou sur de nombreux autres sujets scientifiques, Pascal Etienne Journet et Laurent Bedoussac pour la discussion sur les légumineuses et la fixation azotée, Claire Jouany au sujet des champignons mycorhiziens à arbuscules ou encore Jean-Noël pour les dispositifs expérimentaux et Sandrine Longis pour les analyses statistiques. Merci à ces deux derniers pour les bons moments lors de la Summer School System Experiment à Volterra, riche tant scientifiquement qu'humainement ! Je regrette en tout cas que le confinement ait amputé les échanges et qu'il n'y en ait pas eu plus ...*

*Merci également à Christophe Roux pour ton aide hors comité de pilotage pour l'interprétation de mes résultats de méta-barcoding, et également à Samuel Mondy pour les réunions réalisées à distance pour analyser les données et pour les interpréter et pour ta relecture du chapitre sur les dis-services, c'était passionnant d'en discuter avec deux spécialistes du sujet comme vous !*

*Merci à Pierre Maury de m'avoir permis de réaliser des heures d'enseignement à l'ENSAT, sur des U.E. variées, qui m'ont donnée le goût de continuer sur cette voie ! Merci également à Juliette Grimaldi de m'avoir accompagnée dans la réalisation des TP, c'était très agréable de les préparer et de les réaliser avec toi. Et merci à Elana Dayoub pour son aide et la transmission de conseils puisqu'elle en était en charge avant nous !*

*Merci à Antoine Couëdel pour les nombreux échanges par email ou de vive voix sur les CIMS toujours très stimulantes, ainsi que pour les nombreux articles toujours pertinents que tu m'as envoyé le long de la thèse !*

*Cette thèse n'aurait jamais pu être possible sans l'aide colossale et l'investissement de l'équipe technique qui m'a aidée à porter les parties expérimentales en plein champ : Merci tout d'abord à Didier Raffailac pour m'avoir formée à tous les protocoles relatifs à l'étude de la succession CIMS – Tournesol, ainsi que pour ta rigueur et ton sérieux lors des journées de prélèvements. Merci à Eric Lecloux d'être venu nous prêter main forte très régulièrement en plein champ, d'avoir réalisé les analyses laboratoire d'azote et merci d'avoir été le « facilitateur en expérimentation » tout au long de ma thèse, à trouver des solutions à mes blocages techniques ou à m'indiquer où étaient les objets ou les produits que je cherchais. Grâce à toi, l'UMR AGIR était un peu comme une immense chambre sur demande ! Merci à Jean-François Garrigues, Damien Marchand, Béatrice Quinquiry, Sophie Ducos, Frank Pagès, Nicolai, ainsi que Guillaume Hustet-Caou pour leur aide au champ et à la halle technique ! On en aura découpé et pesé des échantillons ! Et Merci à Benoît Gleize et Pierre Perrin pour leur aide lorsque j'avais besoin de matériel en lien avec les essais sous serre ou la manipulation d'isothiocyanates ...*

*Merci également à l'Unité Expérimentale d'avoir assuré les interventions culturelles de mes essais en plein champ, qui relevaient parfois du défi... « Il faut qu'on broie le couvert à 10°C et avant une période de pluie donc il faut qu'il soit broyé Lundi 24 Février entre 13h21 et 16h39 tapantes ». Merci en particulier d'avoir contribué à la réussite de la mise en place de mon essai au déconfinement, grâce à votre grande*

*mobilisation pour que le tournesol puisse être semé dans les meilleurs délais après la réouverture du centre.*

*Merci également aux stagiaires que j'ai pu encadrer, qui m'ont permis de développer des compétences de transmission, de pédagogie et d'accompagnement, et qui m'ont également été d'une aide inestimable au champ, notamment lors des notations d'incidence et de sévérité de la Verticilliose et pour les comptages des taux de mycorhization : Jonathan, Ambrine, Domitille, Coraline, Juliette, Marine et Léa merci pour toute votre aide précieuse ! Merci plus largement aux stagiaires d'autres chercheurs et doctorants pour la bonne humeur ou pour leur aide ponctuelle : Lucas, Angélique, Mathis ou encore Clémentine, et désolée pour ceux que j'oublie ...*

*Merci, justement, aux collègues doctorants et aux ingénieurs que ce soit pour leur aide dans la réalisation de ce travail ou pour les moments de détente à la salle café à discuter de sujets divers et variés : Tout d'abord ceux déjà docteurs, qui étaient là avant moi et sont partis vers d'autres horizons : Céline, Nicolas et Marie-Anne, Camillo, mais également les collègues toujours présents à l'heure où j'écris ces lignes : Lin, Mathilde, Appoline, Claire, Julien, Marine, Maxime, Manon pour tous les déjeuners et les discussions échangées. Merci en particulier à Rémi, Camille, Solène, Lucie, Lin et Alexandre pour les nombreux moments de convivialité passés autant entre les murs de INRAE qu'à l'extérieur ! (et une pensée spéciale à la délicieuse tarte au citron de Camille...). Et remerciement supplémentaire à Lucie et Alexandre pour toutes nos conversations stimulantes autour des CIMS et du tournesol ! Dommage que nous n'ayons pas fait nos thèses en même temps... Bon, ça aurait été un enfer pour l'équipe technique, certes mais notre cohésion et notre entre-aide aurait abouti à plein de belles choses 😊*

*Merci également aux gestionnaires d'avoir facilité les aspects administratifs de la thèse : Christel Moder, Marina Lefebvre, Clémence Rigal, Maryse Perreux, Thierry Courbet et surtout Mathieu Solle que j'ai énormément enquiné avec mes innombrables demandes de commande de semence de CIMS introuvables ou de matériel labo ... Merci également à Dominique Pantalacci d'avoir répondu à toutes mes questions concernant l'école doctorale.*

*Enfin, je remercie ma famille, qui malgré la distance m'a beaucoup soutenue, mes amis, notamment ceux qui étaient ou sont toujours à Toulouse : Nirina, Nina, Félix, Hugo, Tasnim, Fiona et Dido ou ceux dans d'autres villes : Mehdi et Katia. Enfin, merci à Paul pour tout le reste !*



## Table des matières

Liste des abréviations .....	14
Introduction générale.....	16
<b>Chapitre I – Synthèse bibliographique et problématique.....</b>	<b>21</b>
I.1. Le tournesol.....	22
I.1.1. Production du tournesol .....	22
I.1.2. Caractéristiques morphologiques et botaniques du tournesol .....	24
I.1.3. Conduite de la culture et atouts agronomiques et écologiques du tournesol .....	27
I.1.4. Stagnation des rendements du tournesol et facteurs explicatifs .....	30
I.1.4.1. Facteurs abiotiques limitants les rendements du tournesol.....	32
I.1.4.2. Facteurs biotiques réduisant les rendements du tournesol .....	34
I.2. Les bioagresseurs telluriques ciblés dans le travail de thèse .....	40
I.2.1. <i>Verticillium dahliae</i> , agent pathogène responsable de la Verticilliose .....	41
I.2.1.1. Répartition géographique du champignon .....	41
I.2.1.2. Morphologie du <i>Verticillium dahliae</i> et cycle de développement .....	42
I.2.1.3. Dégâts et dommages de la Verticilliose du tournesol.....	44
I.2.2. <i>Orobanche cumana</i> holoparasite du tournesol .....	45
I.2.2.1. Répartition géographique de l’Orobanche du tournesol .....	45
I.2.2.2. Description de l’Orobanche du tournesol et cycle de développement .....	46
I.2.2.3. Dégâts et dommages de l’Orobanche du tournesol .....	49
I.2.3. Méthodes de lutte contre <i>Verticillium dahliae</i> et <i>Orobanche cumana</i> .....	49
I.2.3.1. Les méthodes de lutte génétiques .....	50
I.2.3.2. Les pratiques culturales.....	52
I.2.3.3. Les méthodes de lutte chimiques .....	54
I.2.3.4. Les méthodes de lutte physiques.....	55
I.2.3.5. Les méthodes de lutte biologiques .....	56
I.3. Les cultures intermédiaires multi-services et la biofumigation comme méthodes de lutte contre la Verticilliose du tournesol et l’Orobanche .....	57
I.3.1. Services écosystémiques fournis par les CIMS.....	58
I.3.1.1. Services écosystémiques fournis par les cultures intermédiaires multi-services non ciblés par la thèse .....	59
I.3.1.2. Services écosystémiques en lien avec la fourniture d’azote minéral au tournesol .....	60

I.3.1.3. Exemples de mécanismes en lien avec les CIMS et menant à la régulation de la Verticilliose et de l’Orobanche du tournesol .....	62
I. 3.2. Dis-services écosystémiques produits par les CIMS.....	73
I.3.2.1. Dis-services écosystémiques potentiels vis-à-vis des bactéries impliquées dans le cycle de l’azote .....	73
I.3.2.2. Dis-services écosystémiques potentiels vis-à-vis des champignons mycorhiziens à arbuscules.....	74
I.4. Objectifs et hypothèses traitées dans la thèse et approches globales employées.....	77
<b>Chapitre II – Evaluation des effets de broyats de Brassicacées ou de Fabacées sur le <i>Verticillium dahliae</i> et l’<i>Orobanche cumana</i> .....</b>	<b>94</b>
II. 1. Introduction générale du chapitre .....	95
II. 2. Biofumigant potential of grinded tissues of Brassicaceae or Fabaceae species on <i>Verticillium dahliae</i> and <i>Orobanche cumana</i> .....	97
II. 2.1. Abstract .....	97
II. 2.2. Introduction.....	97
II. 2.3. Material and Methods.....	101
II. 2.3.1 – Pests and plants materials.....	101
II. 2.3.2 – Plant material preparation and glucosinolates analyses.....	102
II. 2.3.3 – Effect of grinded tissues on <i>Verticillium dahliae</i> development.....	103
II. 2.3.4 – Effect of grinded tissues on <i>Orobanche cumana</i> germination.....	104
II. 2.3.5 – Statistical analysis.....	107
II. 2.4. - Results .....	108
II. 2.4.1. – Tissues glucosinolates characterization .....	108
II.2.4.2. Brassicaceae grinded tissues inhibited <i>Verticillium dahliae</i> development .....	109
II. 2.4.3. Brassicaceae grinded tissues inhibited <i>Orobanche cumana</i> germination .....	111
II. 2.5. Discussion .....	115
II.3. Essais complémentaires portant sur les effets des broyats sur l’Orobanche (fixation et émergences).....	119
II.3.1. Introduction.....	120
II.3.2. Matériel et méthodes.....	120
II.3.2.1. Essais en chambre de culture.....	120
II.3.2.2. Essais sous serres .....	125
II.3.2.3. Analyses des résultats des essais en plaques de culture et en serre .....	129
II.3.3. Résultats .....	130
II.3.3.1. Effets des broyats sur <i>Orobanche cumana</i> observé lors des essais en chambres de culture .....	130
II.3.3.2. – Effets des broyats de Brassicacées ou de Fabacées sur les émergences de <i>Orobanche cumana</i> observés lors des essais sous serre .....	132

II. 3. 4. Discussion .....	136
II.4. Discussion et conclusions du chapitre.....	137
<b>Chapitre III – Evaluation des effets des cultures intermédiaires multi-services et de la biofumigation sur la protection du tournesol contre la Verticilliose du tournesol et sur la productivité de la culture</b> .....	140
III.1. Introduction générale du chapitre .....	141
III.2.1. Introduction.....	143
III.2.2 Materials and Methods .....	145
III.2.2.1. Experimental Design and Crop-Management Systems.....	145
III.2.2.2. Cover-Crop and Soil Sampling .....	148
III.2.2.3. Sunflower Sampling and Disease Assessment .....	149
III.2.2.4. Statistical Analysis .....	151
III.2.3. Results .....	151
III.2.3.1. Cover-Crop Production and Characterisation .....	151
III.2.3.2. Soil Mineral Nitrogen Available for Sunflower before Sowing.....	154
III.2.3.3. Effects of Cover Crops and Biofumigation on Sunflower Verticillium Wilt .....	155
III.2.3.4. Effects of Individual Factors on Sunflower Yield .....	157
III.2.4. Discussion .....	159
III.2.4.1. Cover-Crop Effects on Soil Mineral Nitrogen Available for Sunflower.....	159
III.2.4.2. Cover Crops and Biofumigation Effects on Sunflower Verticillium wilt .....	160
III.2.5. Conclusions.....	162
III.3. Essai complémentaire pour évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur une variété très peu sensible à la Verticilliose du tournesol.....	167
III.3.1. – Introduction.....	167
III.3.2. Matériel et méthodes.....	167
III.3.3. Résultats .....	168
III.4. Essai complémentaire au sein d’une parcelle d’agriculteur.....	170
III.4.1. Matériel et méthodes de l’essai supplémentaire .....	170
III.4.1.1. Design expérimental et itinéraire cultural .....	170
III.4.1.2. Mesures réalisées.....	171
III.4.2. Résultats obtenus dans le cadre de l’essai complémentaires et éléments de discussion ...	172
III.4.2.1. Caractérisation des biomasses produites par les cultures intermédiaires multi-services .....	172
III.4.2.2. Quantités d’azote minéral mesurées dans le sol avant destruction des CIMS et après semis du tournesol .....	173
III.4.2.3. Effets des CIMS sur la sévérité de la Verticilliose du tournesol .....	174
III.4.2.4. Rendements manuels mesurés à maturité du tournesol.....	175

III.5. Discussion générale et conclusion du chapitre .....	176
<b>Chapitre IV – Evaluation des potentiels dis-services des cultures intermédiaires multi-services sur les communautés microbiennes du sol .....</b>	<b>181</b>
IV.1. Introduction générale du chapitre .....	182
IV.2. Introduction .....	182
IV.3. Matériel et méthodes .....	186
IV.3.1. Mesures de la fixation azotée .....	186
IV.3.2. Mesures des taux de mycorhization des racines de tournesol.....	188
IV.3.2.1. Choix des traitements .....	188
IV.3.2.2. Prélèvements des racines de tournesols et conditionnement .....	189
IV.3.2.3. Préparation des racines de tournesols pour l’observation des taux de mycorhization	190
IV.3.2.4. Découpe des racines tertiaires de tournesols.....	190
IV.3.2.5. Décoloration des racines et coloration des champignons mycorhiziens à arbuscules .	190
IV.3.2.6. Comptage des taux de mycorhization.....	191
IV.3.3. Analyse des communautés microbiennes du sol par approche metabarcoding d’ADNr 16S et 18S.....	193
IV.3.4. Analyses des données recueillies.....	195
IV.3.4.1. Taux de fixation symbiotique de l’azote atmosphérique.....	195
IV.3.4.2. Taux de mycorhization des racines de tournesol.....	196
IV.3.4.3. Communautés microbiennes du sol.....	196
IV.4. Résultats.....	197
IV.4.1. Taux de fixation symbiotique de l’azote atmosphérique par les Fabacées .....	197
IV.4.1.1. Azote acquis par les Fabacées en culture monospécifique ou en mélanges bispécifiques .....	197
IV.4.1.2. Azote fixé symbiotiquement par les Fabacées en culture monospécifique ou en mélanges bispécifiques .....	199
IV.4.2. Taux de mycorhization des racines de tournesol en fonction du précédent cultural .....	201
IV.4.3. Effets des CIMS et de la biofumigation sur les communautés microbiennes des sols .....	204
IV.4.3.1. Effets des CIMS sur les biomasses moléculaires microbiennes mesurées dans le sol..	204
IV.4.3.2. Effets des CIMS sur les ratios 16S/18S mesurés dans le sol.....	204
IV.4.3.3. Effets des CIMS sur la richesse spécifique du sol en copies 16S et 18S.....	205
IV.4.3.4. Indice d’équitabilité (Evenness) des communautés bactériennes et fongiques en fonction des CIMS et des dates de prélèvement .....	206
IV.4.4. Effets des CIMS sur des communautés d’intérêt pour la succession culturale CIMS – Tournesol.....	207
IV.4.4.1. Bactéries symbiotiques des Fabacées.....	207
IV.4.4.2. Champignons mycorhiziens à arbuscules .....	209

IV.5. Discussion et conclusions sur les potentiels dis-services fournis par les cultures intermédiaires multi-services .....	214
<b>Chapitre V – Discussion générale et perspectives .....</b>	<b>221</b>
.....	221
V.1. Potentiel de régulation du <i>Verticillium dahliae</i> par l'utilisation de Brassicacées et/ou de Fabacées, et de la biofumigation .....	224
V.2. Potentiel de régulation de l' <i>Orobanche cumana</i> par l'utilisation de Brassicacées ou de Fabacées et de la biofumigation .....	232
V.3. Elargir la diversité des variétés et espèces testées pour lutter contre <i>V. dahliae</i> et <i>O. cumana</i> .....	235
V.4. Caractérisation en mésocosme du potentiel de biofumigation pour réguler <i>V. dahliae</i> et <i>O. cumana</i> .....	236
V.5. Caractérisation de l'effet des CIMS et de la biofumigation à l'échelle de la rotation .....	238
V.6. Considérer la biofumigation au sein d'un bouquet de services écosystémiques .....	240
V.7. Pas de dis-service majeur des CIMS et de la biofumigation contre les communautés microbiennes bénéfiques des sols .....	242
Annexes .....	247
Références bibliographiques.....	265
Publications scientifiques et communications associées à ce travail de thèse.....	290
Activités d'enseignement réalisées durant la thèse.....	291
Résumé.....	293

## Liste des abréviations

ANOVA : Analysis of variance

AUC : Area under the curve

AUDPC : Area under the disease progress curve

BR : Brassicaceae

CIMS : Cultures intermédiaires multi-services

CIPAN : Cultures intermédiaires pièges à nitrates

CMA : Champignons mycorhiziens à arbuscules

cv. : Cultivar

DAS : Day after sowing

DCL : déhydrocostus lactones

DM / MS : Dry matter / Matière sèche

DSI : Disease severity index

EPAA : Ethanol Potassium Amoxicilin Agar

FB : Fabaceae

FDR : False discovery rate

GSL : Glucosinolates

IFT : Indice de fréquence de traitement

INN / NNI : Indice de nutrition azotée / nitrogen nutrient index

ITC : Isothiocyanates

MB(R) : Moutarde brune

MBL : Moutarde blanche

Mix : Mixture

NF : Navette fourragère

PAEC : Protection agroécologique des cultures

PDA : Potatoe dextrose agar

PIC : Protection intégrée des cultures

RF : Radis fourrager

SMN : Soil mineral nitrogen

SN : Sol nu

SVW : Sunflower verticillium wilt

TPS : Très peu sensible (variété)

VB : Vesce du Bengale



## Introduction générale

L'agriculture a connu une intensification importante à l'issue de la 2<sup>ème</sup> guerre mondiale (Donald et al., 2001). Le système de production agricole repose alors sur l'utilisation d'équipements techniques modernes et d'intrants tels que les engrais minéraux et les pesticides (Griffon, 2007). Cette période est également marquée par une simplification des paysages, avec la disparition des espaces semi-naturels (Tschardt et al., 2005), afin d'augmenter et de standardiser la taille des parcelles cultivées. Ce système de production intensive a permis d'assurer la sécurité alimentaire, mais les pratiques de l'agriculture intensive ont toutefois de nombreuses limites sanitaires et environnementales qui ont notamment mené à la pollution des eaux (Evans et al., 2019) et à une érosion de la biodiversité (Donald et al., 2001), tout en favorisant la multiplication de bioagresseurs et le développement de résistances (de Carvalho et al., 2015). En outre, la surexploitation des sols a conduit à des pertes de fertilité largement constatées aujourd'hui (Scotti et al., 2015).

La durabilité de l'agriculture intensive est largement remise en cause à partir des années 90 et la prise de conscience face aux limites de ces pratiques agricoles a mené à la mise en place de mesures telles que la Directive Nitrates (91/676/CEE) adoptée en 1991 et visant à réduire la pollution des eaux par les nitrates et l'eutrophisation issus des activités agricoles, et à prévenir l'extension de ces pollutions. Plus récemment, les rencontres politiques du Grenelle de l'environnement (2007) ont mené à la mise en place du Plan Ecophyto, aujourd'hui remplacé par le Plan Ecophyto II+, dont les objectifs sont de réduire les usages de produits phytopharmaceutiques de 50% d'ici 2025 et ne plus recourir au glyphosate à la fin 2020 pour les principaux usages, et au plus tard d'ici 2022 pour leur ensemble. Ce plan a également pour objectif d'accompagner les agriculteurs dans leur changement de modèle agricole, afin de tendre vers la mise en œuvre des principes de l'agroécologie. Dans ce cadre, la protection des cultures est repensée depuis de nombreuses années, de manière à réduire l'utilisation de pesticides pour minimiser leur impact sur l'environnement. La protection des cultures contre les bioagresseurs a évolué en ce sens, avec l'intensification de stratégies de protection intégrée des cultures (PIC) ou de protection agroécologique des cultures (PAEC). La PIC et la PAEC favorisent le fonctionnement écologique des agroécosystèmes et les

mécanismes naturels de lutte contre les bioagresseurs. Les bioagresseurs telluriques sont particulièrement difficiles à contrôler du fait, entre autres, de la difficulté de les observer et d'évaluer leur distribution (Matthiessen et Kirkegaard, 2006). Les méthodes de lutte actuelles contre ces bioagresseurs sont donc surtout basées sur des pratiques de désinfection des sols lorsque les matières actives sont disponibles et lorsque cela est rentable (en culture maraîchères par exemple), sur des traitements de semence et sur des résistances variétales. Les deux premiers leviers étant contraires à la démarche de transition agroécologique, et le 3<sup>ème</sup> levier étant partiellement efficace à l'encontre de certains bioagresseurs à cause de l'apparition de contournements de résistance, il est nécessaire d'identifier de nouvelles méthodes de lutte agroécologiques. La diversification des rotations en fait partie, d'une part afin de briser les cycles des bioagresseurs mais aussi grâce à l'utilisation de familles botaniques ayant des propriétés allélopathiques. Ainsi, les Brassicacées sont connues pour la présence dans leurs tissus de glucosinolates (GSLs) qui s'hydrolysent pour produire des molécules biocides telles que les isothiocyanates (ITCs), et sont libérées lorsque les tissus végétaux sont broyés (Angus et al., 1994 ; Brown and Morra, 1997). Cette propriété est la base du processus de biofumigation, qui consiste en le fait de cultiver, broyer et enfouir une culture riche en molécules biocides, afin de permettre leur libération dans le sol pour que ces molécules puissent réguler des bioagresseurs telluriques (Kirkegaard et al., 1993).

Le tournesol fait partie des cultures pouvant potentiellement bénéficier d'un semis de CIMS pendant la période d'interculture précédant son semis, et des techniques de biofumigation pour lutter contre ses bioagresseurs telluriques. Cette culture oléagineuse majeure dans le monde est cultivée sur une surface globale de 27 millions d'hectares répartis sur les cinq continents et représente une production d'environ 50 millions de tonnes de graines (FAO, 2021). La France fait partie des 10 premiers pays producteurs de tournesol, avec actuellement 697 000 ha pour 1,3 million de tonnes produites par an. Cette culture présente de nombreux atouts agroécologiques (indicateur de fréquence de traitement faible, besoins en azote et en eau modérés, répartition de la charge du travail, bonne tête de rotation, etc...) (Debaeke et al., 2017a ; Debaeke et al., 2017b). Néanmoins, ses rendements peuvent être réduits par les dommages de bioagresseurs en expansion en France ces dernières années. En particulier, le *Verticillium dahliae* et l'*Orobanche cumana*

sont deux parasites pouvant engendrer 30% à 50% (Mestries and Lecomte, 2012) et 90% (Jestin et Martin-Monjaret, 2016) de pertes de récolte sur des variétés sensibles, lorsque aucune méthode de lutte n'est entreprise. Les seuls leviers opérationnels pour contrôler ces deux bioagresseurs sont l'utilisation de variétés tolérantes ou résistantes (Mestries and Lecomte, 2012), parfois accompagnés par l'utilisation d'herbicides dans le cas de l'Orobanche (Jestin et Martin-Monjaret, 2016). Dans le Sud-Ouest de la France, le tournesol est généralement cultivé en rotation courte avec du blé dur. La période d'interculture entre la récolte du blé dur et le semis du tournesol pourrait être valorisée en implantant des cultures intermédiaires multi-services (CIMS), avec l'exemple des Brassicacées, qui seraient broyées et enfouies pour mettre en œuvre la biofumigation, et qui représenterait un levier agroécologique supplémentaire pour contrôler ces deux bioagresseurs telluriques. En outre, en plus de ce service de régulation de bioagresseurs, les CIMS pourraient également fournir des services en lien avec le recyclage de nutriments, tels que les nitrates, afin d'éviter leur lixiviation. En mélange avec des Fabacées, les Brassicacées pourraient également permettre une mutualisation de services écosystémiques en combinant des effets sur le piégeage de l'azote, leur minéralisation, et la régulation de bioagresseurs telluriques, en plus de services en lien avec l'amélioration de la fertilité physique et biologique des sols, grâce à sa couverture et à l'apport de matière organique.

Actuellement, la pratique de la biofumigation est largement étudiée et utilisée en culture maraîchères, notamment pour réguler le *V. dahliae*, champignon polyphage que l'on retrouve sur de nombreuses espèces de Solanacées ou de Cucurbitacées par exemple. Si l'action biocide des ITCs ou des broyats de Brassicacées est avérée en conditions contrôlées (Olivier, 1999 ; Neubauer et al., 2014 ; Seassau et al., 2016) elle est beaucoup plus variable en plein champ. Cette variabilité pourrait être due à de nombreux facteurs conditionnant l'efficacité de la biofumigation, qui dépendent (i) de la Brassicacée elle-même (variété, concentrations en glucosinolates, biomasses produites, etc...) ; (ii) des conditions météorologiques encadrant le jour de la destruction des couverts (température et précipitation). L'efficacité de cette méthode et les facteurs de sa réussite sont mal caractérisés en grandes cultures et notamment dans le cadre de la protection de la culture du tournesol. Il y a donc un intérêt à transposer l'utilisation de cette technique pour une protection agroécologique de la culture du tournesol, en évaluant son potentiel

à réguler des bioagresseurs telluriques du tournesol. Bien que la biofumigation soit réputée comme étant une alternative biologique à la fumigation, il y a également un intérêt à évaluer les éventuels effets biocides des molécules impliquées dans la biofumigation à l'encontre de communautés microbiennes bénéfiques dans les sols, telles que les bactéries impliquées dans la fixation de l'azote atmosphérique par les Fabacées et les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) du tournesol.

Ainsi, l'objectif général de la thèse est d'évaluer les services écosystémiques fournis par les CIMS, en vue d'améliorer la productivité du tournesol. Ce travail se focalise en particulier sur la famille des Brassicacées et leur capacité à potentiellement réguler le *Verticillium dahliae* et *Orobanche cumana* grâce à la production de molécules biocides lors de leur broyage et enfouissement (biofumigation). En outre, ce travail s'intéresse à la famille des Fabacées pour sa capacité à fixer l'azote atmosphérique et enrichir le sol en azote. Un mélange des deux familles botanique est également étudié afin d'évaluer une possible interaction entre services écosystémiques. Enfin, ce travail tente également d'évaluer les potentiels dis-services fournis par les CIMS et la biofumigation sur des communautés microbiennes d'intérêt pour la succession CIMS – Tournesol.

Dans ce cadre, le premier chapitre de ce manuscrit de thèse propose une mise en contexte et une synthèse bibliographique sur les connaissances existantes sur la production de la culture du tournesol, ainsi que sur les facteurs abiotiques et biotiques limitants sa production. Un intérêt particulier sera porté aux deux bioagresseurs ciblés par cette thèse : La Verticilliose du tournesol et l'Orobanche du tournesol, avec une synthèse des méthodes de lutte actuellement employées et leurs limites. Cette synthèse explicitera également les connaissances existantes sur le processus de la biofumigation, les facteurs favorables à sa réussite, et les connaissances actuelles sur son efficacité à lutter contre la Verticilliose et l'Orobanche. Les trois chapitres suivants rapporteront les résultats obtenus lors d'expérimentations menées dans le cadre de la thèse. Le chapitre 2 a pour but d'identifier le potentiel de régulation de broyats de Brassicacées ou de Fabacées sur les deux bioagresseurs ciblés par la thèse, par des approches en conditions contrôlées qui seront détaillées au sein du chapitre. Le chapitre 3 a pour objectif d'évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur la régulation de la Verticilliose et sur la productivité du tournesol, par la mise en place d'un dispositif expérimental en plein champ. Enfin, le chapitre 4 a pour objectif d'identifier

d'éventuels dis-services produits par les Brassicacées ou la biofumigation sur les communautés microbiennes d'intérêt pour la succession CIMS – Tournesol (bactéries fixatrices d'azote et CMA). Ce chapitre est suivi par une discussion faisant le lien entre les différents résultats obtenus et les nouvelles perspectives et questions de recherche qu'ils soulèvent.

## Chapitre I – Synthèse bibliographique et problématique

## I.1. Le tournesol

### I.1.1. Production du tournesol

Le tournesol (*Helianthus annuus* L., 1753) a été domestiqué en Amérique du Nord depuis environ 3000 ans avant J.-C., où il était consommé pour son huile et ses graines. C'est à partir des années 1830s que le tournesol est vraiment valorisé en tant que culture oléagineuse, en Russie, où il est sélectionné pour améliorer sa teneur en huile (Velasco et al., 2015a). Au XXème siècle, l'expansion des surfaces de production de la culture s'est accélérée en Europe à partir de la fin des années 60, notamment en Espagne et en France (Velasco et al., 2015a). Actuellement, le tournesol est cultivé sur des surfaces atteignant 27 millions d'hectare et réparties sur les cinq continents (Figure 1). La production annuelle de tournesol est d'environ 50 millions de tonnes de graines (FAO, 2021) et de 20 millions de tonnes d'huile (FAOSTAT, 2022), faisant du tournesol l'une des cultures oléagineuses les plus importantes au monde (FAO, 2021). Les principaux pays producteurs de tournesol sont l'Ukraine, la Russie, l'Argentine, la Chine et la Roumanie (Figure 1).

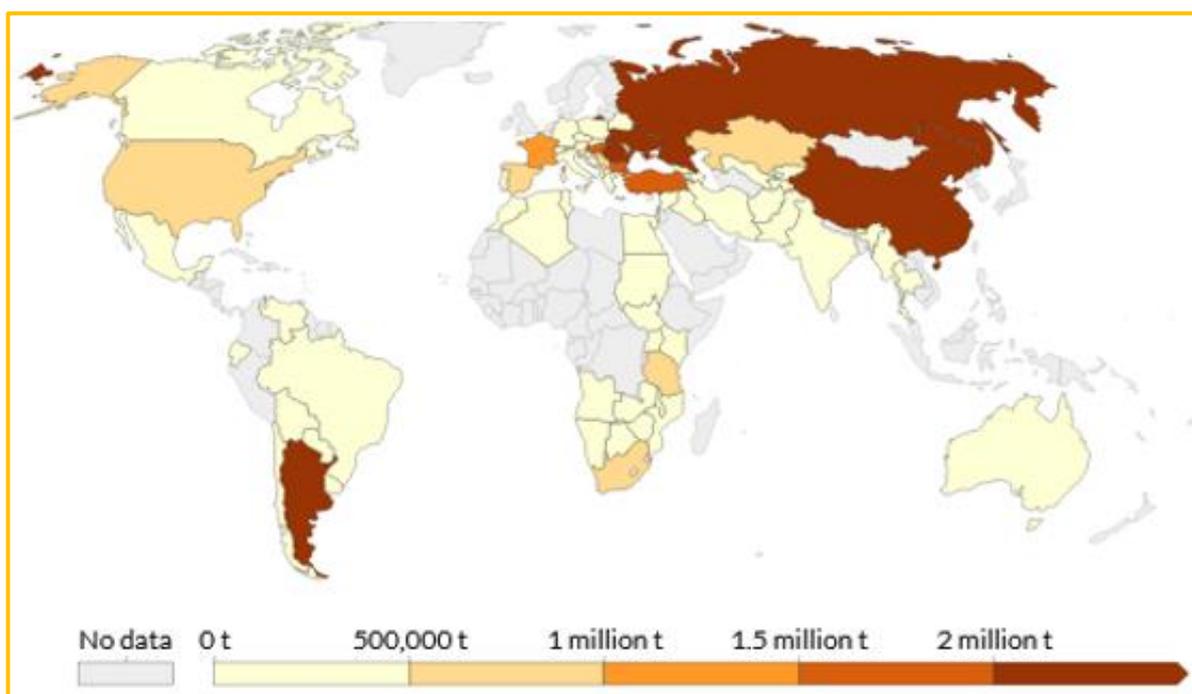


Figure 1. Répartition de la production mondiale de graines de tournesol (tonnes) en 2018 (D'après ourworldindata.org, données FAO)

La France fait partie des 10 pays à produire le plus de tournesol par an (FAOSTAT, 2022; Terres Univia, 2022). Les déclarations PAC de 2021 rapportent pour la France

une surface cultivée de plus de 697 000 ha (Mestries, 2022). Les bassins de production dits traditionnels sont le Sud-Ouest et le Poitou-Charentes (Jouffert et al., 2011). Le tournesol est également cultivé dans le Centre et les Pays de la Loire (Figure 2). Il s'agit de la 2<sup>ème</sup> culture oléagineuse la plus importante en terme de production de graines, avec environ 1,3 millions de tonnes produites par an (moyenne quinquennale), précédée par le colza qui a une production de 4,8 millions de tonnes/an et suivie par le soja avec une production de 0,4 millions de tonnes par an (FranceAgriMer, 2021).

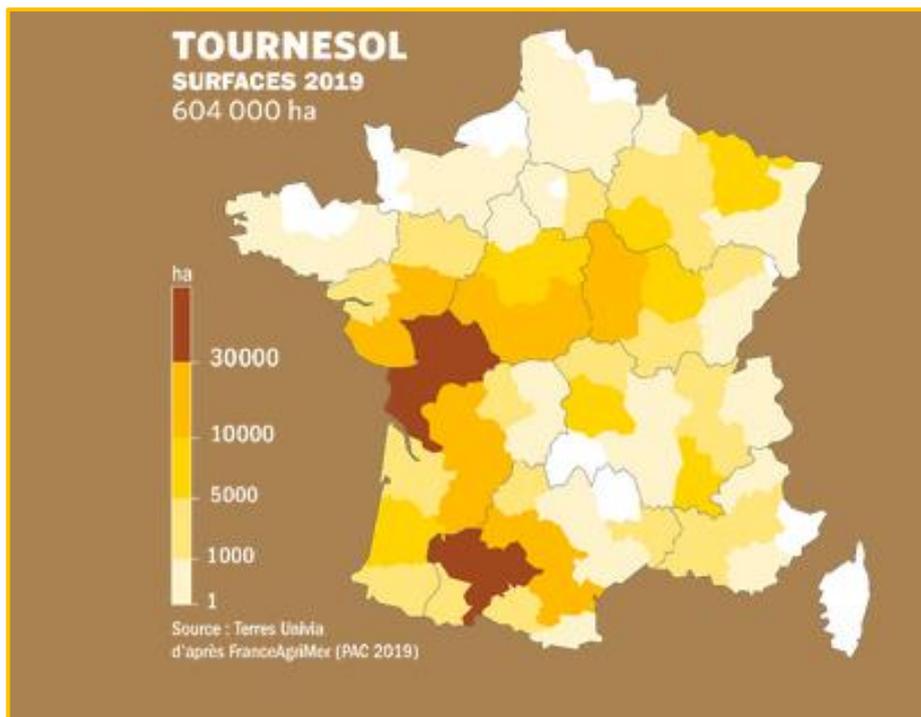


Figure 2. Répartition des surfaces production de tournesol en France, en 2019  
(D'après Terres Univia, données FranceAgriMer)

La graine de tournesol est principalement valorisée en alimentation humaine, à travers la consommation d'huile alimentaire ou de graines de variétés non-oléagineuses (Jouffert et al., 2011; Park et al., 2015). Le tourteau de tournesol obtenu après trituration des graines est considéré comme une source alternative de protéines dans l'alimentation du bétail (Park et al., 2015; Peyronnet et al., 2012). Enfin, le tournesol peut être utilisé à des fins non alimentaires telles que la production de biocarburant à partir de son huile (Park et al., 2015).

### I.1.2. Caractéristiques morphologiques et botaniques du tournesol

Le tournesol est une angiosperme annuelle de la famille des Astéracées (anciennement appelée Composées). Le tournesol cultivé se caractérise par une tige non ramifiée surmontée par une large inflorescence, appelée capitule (Knowles, 1978; Seiler, 1997). La hauteur moyenne de tournesols cultivés en conduite pluviale est de 150 à 210 cm à la floraison (Schneiter, 1992) et le capitule mesure entre 15 à 40 cm de large. Cependant, ces caractéristiques morphologiques varient beaucoup en fonction des facteurs environnementaux du milieu, du génotype et de la densité du peuplement (Seiler, 1997).

Le cycle de développement du tournesol peut durer entre 120 à 150 jours, selon la précocité du cultivar. Il se divise en une phase végétative et une phase de reproduction, comme chez toutes les spermatophytes (Schneiter et Miller, 1981), et ces phases sont séparées en une succession de stades qui ont été décrits par différents auteurs (exemples ; Merrien et Milan, 1992; Schneiter et Miller, 1981). La description reprise par Terres inovia, basée sur des critères morphologiques, tels que la couleur du dos du capitule, est disponible en Annexe I.

Le système racinaire pivotant du tournesol peut atteindre une profondeur de 150 à 270 cm, les racines secondaires se répandent entre 60 à 150 cm de profondeur et sont très denses dans les premiers 30 cm de sol (Knowles, 1978; Seiler, 1997)(Figure 3).



*Figure 3. Système racinaire pivotant du tournesol, caractérisé par des ramifications importantes dans les 30 premiers centimètres du sol  
(D'après (Terres inovia, 2019a))*

Les feuilles du tournesol sont pétiolées, alternées, cordiformes, légèrement dentées et rugueuses. L'inflorescence du tournesol est composée d'un seul rang de fleurs ligulées stériles, formées de cinq pétales soudés de couleur jaune-doré (Seiler, 1997; Todesco et al., 2022), et de fleurs tubulées fertiles, appelés fleurons, également formés de cinq pétales soudés (Seiler, 1997). Chaque rang de fleurons est mâle puis femelle (Figure 4). Le diamètre du capitule présente un intérêt en agronomie et en sélection variétale, car il influence la taille des graines et le

pourcentage de fleurs stériles, qui influenceront à leur tour le rendement en grains (Seiler, 1997).

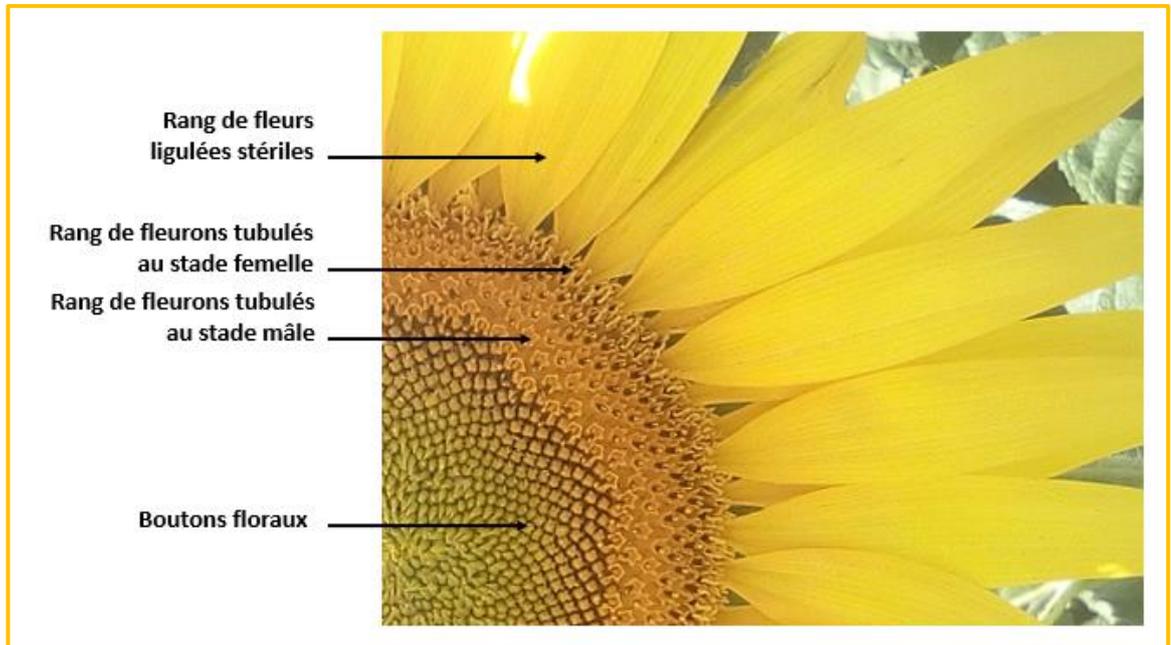


Figure 4. Inflorescence d'un tournesol cultivé au stade floraison  
(Photo personnelle)

Le fruit obtenu après fécondation des fleurs tubulées est un akène, dont l'amande est composée essentiellement de matières grasses (44%), de protéines (16%), de cellulose (16%), d'eau (7 %) et d'autres éléments tels que des minéraux et de l'amidon (Le Clef et Kemper, 2015; Terres Univia, 2022) (Figure 5). La composition en acides gras des graines peut être très riche en acides linoléiques (67%) chez les tournesols dits classiques, ou en acides oléiques (80%) chez les tournesols oléiques (Terres Univia, 2022).

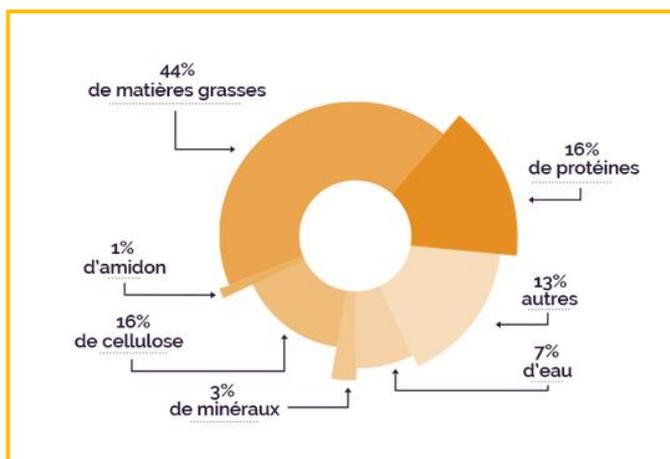


Figure 5. Composition d'une graine de tournesol  
(D'après Terres Univia, source des données Feedbase)

### I.1.3. Conduite de la culture et atouts agronomiques et écologiques du tournesol

Dans la région Sud-Ouest de la France, le tournesol s'insère fréquemment au sein d'une rotation tournesol / blé dur ou blé tendre (Nolot et Lecomte, 2011). Cependant, les rotations ont tendance à s'allonger ces dernières années, avec l'introduction de cultures de soja ou de maïs, en particulier dans les sols profonds (Figure 6) (Terres Inovia, 2020a). Le tournesol est considéré comme une bonne tête de rotation pour les céréales, car il libère relativement tôt le sol et sa récolte réalisée en conditions sèches permet d'éviter des tassements du sol (Nolot and Lecomte, 2011; Terres Inovia, 2019b). Il permet également de briser les cycles de développement de maladies des céréales, et de lutter contre certaines adventices appartenant à la famille des graminées telles que le ray-grass et le vulpin (Terres Inovia, 2019b).

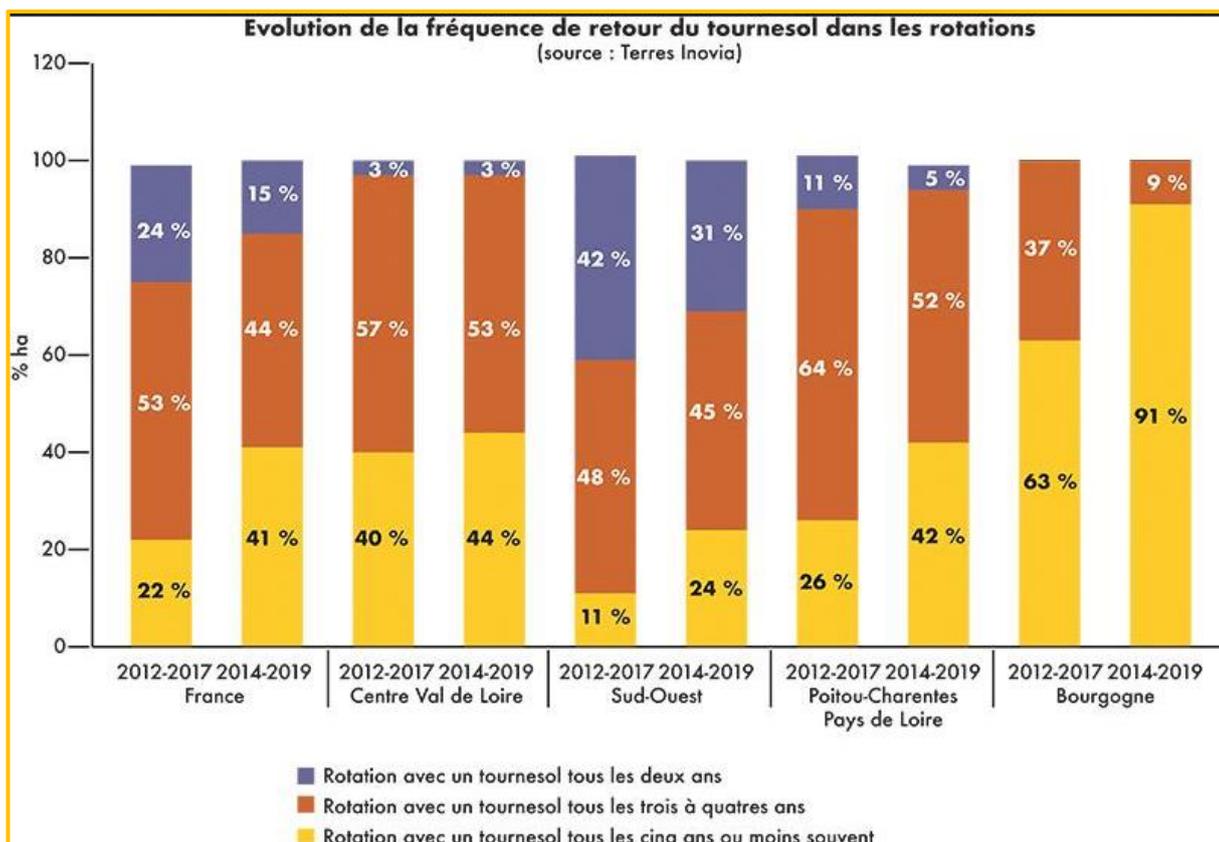


Figure 6 Evolution de la fréquence de retour de la culture du tournesol dans les rotations en France, entre 2012 et 2019 (D'après Terres inovia, 2019a)

Le tournesol est une culture semée au printemps, aux alentours de la 2<sup>ème</sup> quinzaine d'Avril ou début Mai, et son cycle de développement est généralement plus court que celui des autres grandes cultures cultivées à la même période, telles que le maïs, le sorgho et le soja (Nolot and Lecomte, 2011). Avec des besoins thermiques situés entre 1570°C pour les variétés précoces et 1700 degrés jour (base 6°C) pour les variétés tardives (Agridea, 2007), le tournesol est moins exigeant en chaleur que d'autres cultures d'été telles que le maïs, qui nécessite un cumul de température entre son semis et sa récolte, qui peut varier entre 2455 et 2781 degrés jours (base 10) selon les variétés (Neild and Seeley, 1977). Cette caractéristique permet d'étaler les périodes de semis de la culture dans le Sud de la France, sans avoir à changer de variété (Nolot and Lecomte, 2011). Cela permet aussi de répartir la charge en travail sur l'exploitation, et la période d'interculture relativement longue avant son semis offre la possibilité de travailler le sol dans de bonnes conditions (Terres Inovia, 2019b). Une fois implanté, le tournesol développe un système racinaire pivotant et profond qui peut améliorer la structure du sol (Terres inovia, 2019a). Ce système racinaire contribue à sa bonne tolérance à la sécheresse

(Cabelguenne and Debaeke, 1998), aux côtés de différentes autres stratégies d'adaptation à la sécheresse mises en place par la plante telles que la réduction de la transpiration ou des ajustements osmotique (Maury et al., 2011). De ce fait, le tournesol a la réputation de pouvoir être cultivé sur des sols de réserve en eau réduite (Nolot and Lecomte, 2011) et en conduite pluviale, dans des situations sèches, en climat sub-humide à semi-aride (Champolivier et al., 2011). Ainsi, en 2019, près de 20% des parcelles cultivées avec du tournesol étaient irrigables, mais seules 6% l'ont été (Terres Inovia, 2020b). Le tournesol semble donc être une culture avantageuse dans le contexte actuel et futur du changement climatique, où les épisodes de sécheresse seront plus fréquents et plus intenses (Debaeke et al., 2017b). Cependant, il reste sensible à la sécheresse entre le début de sa floraison et la fin du remplissage de ses graines, car c'est durant cette période que le taux de nouaison et le PMG (poids de mille grains) sont déterminés (Terres Inovia, 2020b). Un apport en eau modéré peut être très bien valorisé lorsque des volumes adaptés sont apportés en fonction du type de sol, de la quantité d'eau disponible, de la croissance du tournesol et de son état de stress hydrique (Terres Inovia, 2020b).

Concernant sa nutrition minérale, le tournesol a la réputation de pouvoir être cultivé sur des sols aux potentiels de minéralisation réduits. Cela est dû à sa forte capacité d'extraction, grâce à son système racinaire profond, et à ses besoins modérés en azote, se situant autour de 120 à 150 kg d'azote par ha (Nolot and Lecomte, 2011), ainsi, pour un objectif de 35 q.ha<sup>-1</sup> des apports de 40 à 80 u suffisent, dans le cas de reliquats azotés s'élevant à 60 u, par exemple. Ses exigences en phosphore sont faibles, et celles en potasse sont moyennes (40 à 60 u en sols à faibles teneurs pour les deux), mais les impasses sur les engrais PK sont déconseillées (Terres Inovia, 2019c). En revanche, le tournesol est exigeant en bore, qui est un oligo-élément essentiel pour le développement du tournesol (da Silva et al., 2016). Le tournesol pourrait par ailleurs fournir des services écosystémiques en lien avec le recyclage des nutriments (Franco et al., 2016).

Peu de pesticides sont utilisés dans la protection du tournesol, à l'exception des herbicides (Debaeke et al., 2017a). De ce fait, son indice de fréquence de traitement (IFT) total (y compris le traitement des semences) est estimé en moyenne à 2,7 en 2017, à l'échelle de la France ; en comparaison celui du blé dur qui s'élève à 4,2 (Agreste, 2019). Une étude récente a évalué les performances de différents systèmes de culture innovants dont la culture principale était le tournesol ou le blé

dur (Bonnet et al., 2021). La référence de l'étude était un système conventionnel tournesol – blé dur sans réduction des apports en intrants (pesticides et fertilisation azotée). Les auteurs rapportent que, en comparaison à cette référence, les rendements du tournesol restent inchangés s'il est cultivé dans un système à bas niveau d'intrants (-75% d'usages de fertilisants azotés et -50% d'usage de pesticides) et précédé par des cultures intermédiaires multi-services (CIMS), ou dans un système très bas niveau d'intrants (-50% d'usage de fertilisants azotés et de pesticides) à base de mélanges de cultivars et précédé par des CIMS.

Au-delà des différents atouts agroécologiques abordés ci-dessus, le tournesol peut potentiellement contribuer à différents services écosystémiques tels que celui de la pollinisation (Franco et al., 2016), le tournesol pouvant fournir certaines ressources pour les pollinisateurs, comme le nectar (Kevan, 1989). De plus, il contribue à l'esthétique des paysages agricoles (Figure 7) (Bonciu et al., 2020).



*Figure 7 Champ de tournesol au stade floraison, contribuant à l'esthétique du paysage  
(Photo personnelle)*

#### 1.1.4. Stagnation des rendements du tournesol et facteurs explicatifs

Malgré les intérêts agro-écologiques que présente le tournesol, des résultats d'enquêtes de Terres inovia rapportent, à l'échelle de ces 20 dernières années, et bien que celles-ci soient à nouveau en hausse depuis environ 3 ans, une baisse importante des surfaces cultivées (Figure 8). Les surfaces cultivées en tournesol ont régressé d'environ 400 000 ha entre 1990 et 2020 (Figure 8). Cela serait une conséquence de la stagnation des rendements du tournesol, autour de 20 à 25

qt.ha<sup>-1</sup> (Figure 9), malgré un progrès variétal important (Terres Inovia, 2019b; Vear and Muller, 2011). Les facteurs explicatifs de cette stagnation sont d'une part une limitation des rendements par des facteurs abiotiques (facteurs environnementaux) et d'autre part une réduction due aux facteurs biotiques (bioagresseurs). Ces deux types de contraintes peuvent également interagir.

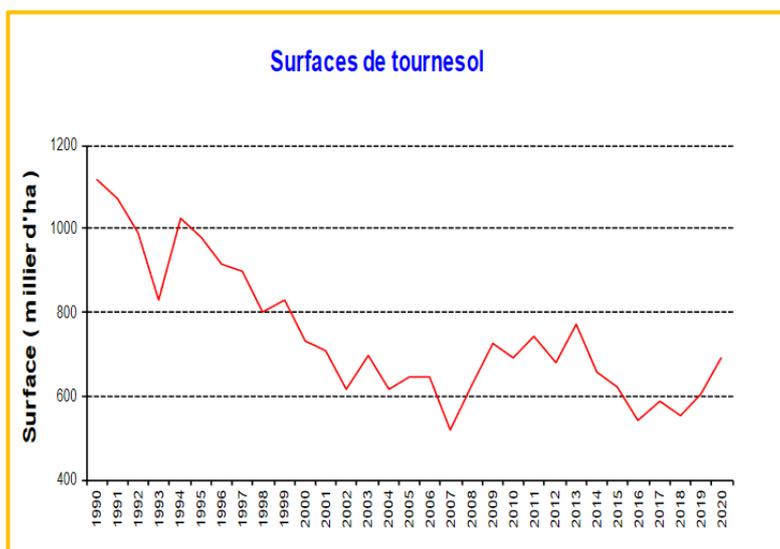


Figure 8. Evolution des surfaces cultivées (millier de ha) avec du tournesol en France, entre 1990 et 2020 (Agreste, 2020)

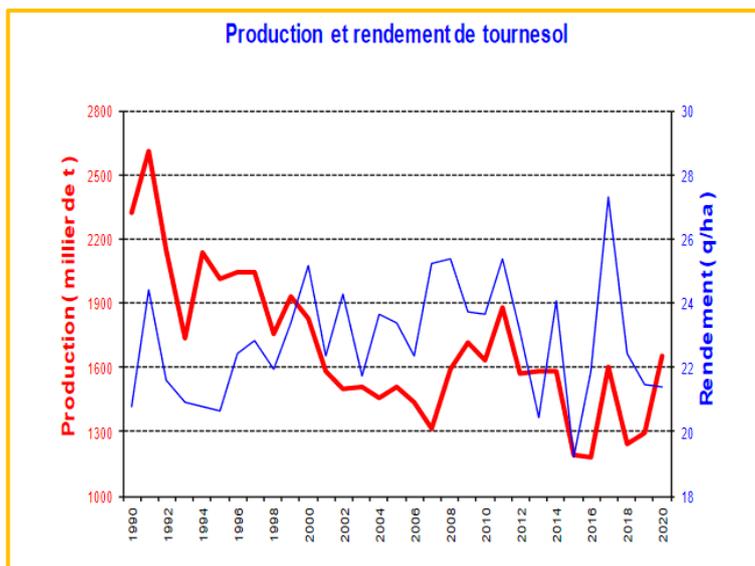


Figure 9. Evolution de la production (milliers de t) et des rendements (q.ha<sup>-1</sup>) du tournesol en France, entre 1990 et 2020 (Agreste, 2021)

#### I.1.4.1. Facteurs abiotiques limitants les rendements du tournesol

Malgré sa tolérance à la sécheresse grâce à différentes stratégies, avec les exemples de la réduction de la transpiration par la fermeture des stomates ou la réduction de la croissance foliaire ou l'accélération de la senescence foliaire pour réduire les pertes d'eau (Maury et al., 2011), le stress hydrique reste une limitation majeure des rendements du tournesol dans le monde (Alberio et al., 2015; Debaeke and Izquierdo, 2021), en particulier lors d'épisodes sévères (Hussain et al., 2018). Selon la revue de littérature réalisée par ces mêmes auteurs, le tournesol peut être sensible à ce stress tout au long de son cycle de développement.

Les températures élevées sont également considérées comme un stress abiotique majeur et peuvent aussi conduire à des réductions importantes des rendements, en particulier lorsqu'elles interviennent pendant l'anthèse, qui correspond à la phase de formation des fleurs mâles (Moriondo et al., 2011). En effet, Rondanini et al., (2006) rapportent qu'une température moyenne supérieure à 30°C durant 4 jours consécutifs ou plus (avec une amplitude thermique équivalente à celles rencontrées en plein champ), conduit à des pertes de rendements et des modifications de la qualité de l'huile ; les réductions qu'ils ont observé étaient plus importantes si l'exposition au stress intervenait 10 à 12 jours après l'anthèse, en comparaison avec une exposition entre 18 à 24 jours après l'anthèse. Les auteurs attribuent les réductions de rendements à des réductions du poids unitaire des grains et à une augmentation de la proportion de grains pesant entre 10 et 30 mg en comparaison au contrôles dont les poids des grains avoisinaient 55 à 65 mg.

Les températures et les déficits en eau étant amenés à s'intensifier avec le changement climatique, le tournesol risque d'être plus exposé à ces deux problématiques (Debaeke et al., 2021). Selon ces mêmes auteurs, des leviers agronomiques et génétiques sont déjà mis en place ou en cours d'évaluation afin de répondre à cet enjeu, avec par exemple la possibilité de réaliser des semis précoces de tournesol, afin d'éviter que les stades sensibles ne coïncident avec les périodes de déficit hydrique ou de fortes chaleurs. La génétique permet aussi d'apporter des solutions face à ces contraintes, par exemple grâce à la sélection de variétés plus résistantes à la sécheresse, en s'intéressant à des traits tels que la profondeur et la densité du système racinaire, ainsi que le potentiel hydrique ou la pression osmotique des feuilles (Rauf, 2008). Une diversité génétique élevée d'espèces sauvages du genre *Helianthus* a été recensée, dont certaines très

tolérantes à la sécheresse, et les gènes d'intérêt de ces espèces pourraient donc être introgressés au tournesol cultivé, bien que ce soit des caractères génétiques complexes (Duriez, 2019).

Inversement à la problématique de sécheresse, un excès en eau peut aussi limiter le rendement en grain du tournesol, lorsqu'il intervient pendant la phase de remplissage des grains (Grassini et al., 2007).

Enfin, des carences en nutriments peuvent impacter négativement le développement du tournesol, malgré des besoins relativement modérés. A titre d'exemple, une carence en azote pendant les phases végétatives peut limiter le développement de la culture et engendrer un impact direct sur l'interception des rayonnements solaires et la photosynthèse (Debaeke et al., 2021). Visuellement, cette carence se traduit par une modification de la couleur des feuilles qui devient vert pâle (Figure 10) (Pellet and Grosjean, 2007). De plus, de faibles quantités en azote limitent la biomasse du tournesol et son rendement en grains, tandis qu'une augmentation des apports mènent à une augmentation de ces derniers (Massignam et al., 2009). Pour autant, il faut éviter les excès d'azote, qui favorisent l'exubérance de la végétation et sa verse, pénalisant ainsi le rendement (Terres inovia, 2019e), et le développement de certaines maladies fongiques telles que le dessèchement précoce causé par *Phoma macdonaldii* (Seassau et al., 2010).



Figure 10 Parcelle de tournesol n'ayant reçue aucun apport azotée (N=0, à gauche) face à une parcelle de tournesol fertilisée avec 150 kg/ha d'azote (à droite), à Auzeville, en 2005 (Photo prise par Philippe Debaeke)

#### I.1.4.2. Facteurs biotiques réduisant les rendements du tournesol

Les bioagresseurs majeurs du tournesol dans le monde sont les oiseaux, les insectes et les champignons pathogènes. Ils peuvent causer des dégâts à l'échelle de la plante entière, ou de façon plus localisée (impact sur la surface photosynthétique ou le nombre de graines par capitules, par exemple), les deux types pouvant mener à des dommages (Alberio et al., 2015).

Le nombre de plants par unité de surface est la composante de rendement la plus importante pour le tournesol (Sausse et al., 2021b) et c'est pour cette raison que des dégâts pendant l'implantation sont préjudiciables au rendement. Des dégâts d'oiseaux intervenant pendant la phase d'implantation de la culture sont de plus en plus observés dans certains pays européens, dont la France (Sausse and Lévy, 2021). Selon les espèces, les oiseaux peuvent endommager les cotylédons, et la plantule peut rester viable, mais ils peuvent également totalement sectionner le plant et ainsi le détruire (Figure 11) (Sausse et al., 2021b). Enfin, la problématique des dégâts d'oiseaux à maturité est reconnue depuis longtemps (Sausse et al., 2021a).

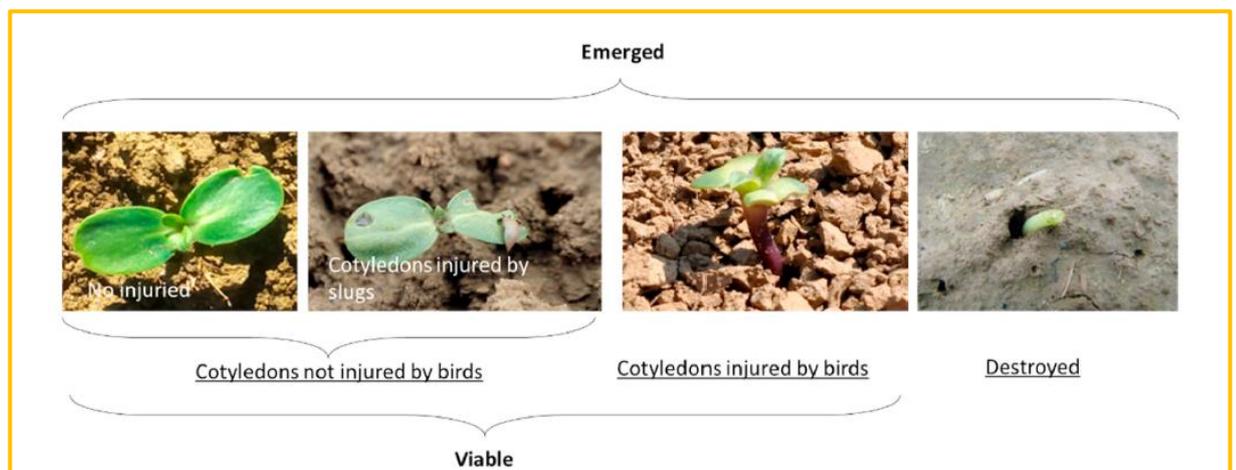


Figure 11 Dégâts observés sur des plantules de tournesol après leur émergence, dues à des limaces ou des oiseaux et dont l'effet est létal ou non (Sausse et al., 2021a)

Dans les régions historiques de culture du tournesol en Amérique du Nord, une quinzaine d'espèces d'insectes ravageurs a été recensée, avec comme exemples le coléoptère du tournesol (*Zygogramma exclamationis*) et le charançon du tournesol (*Cylindrocopturus adspersus*) (Knodel et al., 2010). En France le tournesol n'a en revanche pas de sensibilité particulière aux insectes, sauf en phase de levée (Nolot

and Lecomte, 2011). En effet, des attaques de pucerons noirs de la fève (*Aphis fabae*) ou de pucerons verts du prunier (*Brachycaudus helichrysi*) qui peuvent causer des crispations de feuilles entre la levée et la formation du bouton floral (Vear, 2016; Terres inovia, 2021). Cependant, leur nuisibilité est souvent modérée et aucun virus dommageable au tournesol n'est transmis (Vear, 2016).

Le tournesol est la culture hôte d'une trentaine de pathogènes dans le monde, dont l'importance des dégâts et des dommages varie d'une région à une autre (Markell et al., 2015). En France, le tournesol est soumis à une douzaine de champignons pathogènes (Mestries et al., 2011) et leur importance en terme de dommages occasionnés a évolué dans le temps en fonction de la mise en place de méthodes de lutte. Actuellement, les espèces considérées comme étant les plus nuisibles pour le tournesol sont le mildiou (*Plasmopara halstedii*), le phomopsis (*Phomopsis helianthi*), le phoma (*Phoma macdonaldii*), le sclérotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Mestries et al., 2011; Seassau, 2010) et plus récemment la Verticilliose (*V. dahliae*) (Debaeke et al., 2017a). Qu'ils soient aériens ou telluriques, leur cycle de développement peut être décrit par la Figure 12.

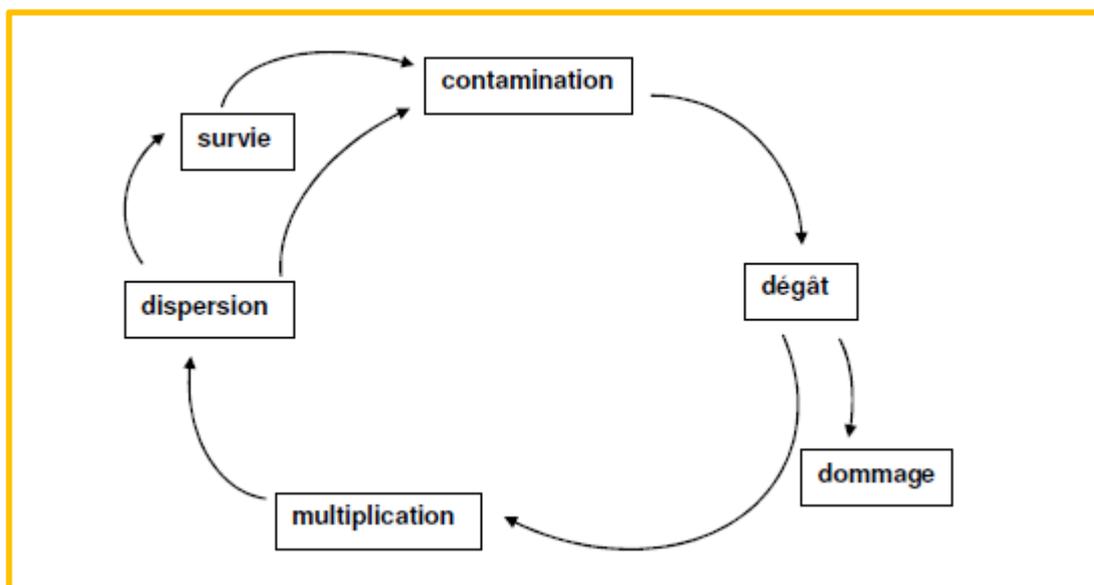


Figure 12 Schéma simplifié du cycle de développement d'un bioagresseur sur une plante hôte, ou à l'échelle d'une culture ou du paysage (Lucas, (2007))

Sur la base de la Figure 12, différentes méthodes de lutttes sont entreprises et permettent une protection de la culture du tournesol relativement efficace et

durable en fonction des champignons telluriques. Elles sont brièvement détaillées ci-dessous et synthétisé dans le Tableau 1 présenté à la fin de cette section.

Le mildiou, causé par le pathogène *P. halstedii*, peut causer un retard de croissance important voire même un nanisme lors d'attaques primaires systémiques (Mestries et al., 2011) (Figure 13). Les dommages peuvent potentiellement atteindre 50% de pertes de rendements (Mestries et al., 2011). De nombreuses races du pathogène et de gènes de résistances du tournesol sont aujourd'hui connues, et l'utilisation de variétés résistantes s'est généralisée (Penaud et al., 2003; Vear, 2016). Néanmoins, les données de surveillance du pathogène ont mis en évidence son caractère très évolutif et des contournements de résistance sont observés (Penaud et al., 2003). Actuellement, la protection du tournesol contre les attaques de mildiou se base sur l'allongement des rotations, l'alternance dans le choix variétal afin de ralentir la progression des contournements, en favorisant des variétés cumulant plusieurs gènes efficaces, et enfin, l'utilisation d'un traitement de semence associé (Tableau 1) (Terres Inovia, 2021b). Selon les enquêtes de Terres inovia dans un réseau d'environ 300 parcelles, l'incidence du mildiou est globalement stable et autour de 30 à 40% (Figure 14).



*Figure 13 Tournesol présentant les symptômes d'une attaque systémique primaire de mildiou (visibles ici : nanisme et tâches chlorotiques)  
(Photo personnelle)*

Le phomopsis, le phoma et le sclérotinia sont tous les trois causés par des champignons nécrotrophes (Mestries et al., 2011). Les dommages associés à ces champignons dépendent de la localisation des attaques. Dans le cas du phomopsis, les pertes sont de l'ordre de 1 à 3 qt.ha<sup>-1</sup> lorsque 10% des plantes présentent une tâche encerclante (Mestries et al., 2011). La lutte contre ce champignon en France repose essentiellement sur de la résistance quantitative (Viguie et al., 2000) et il est considéré comme étant bien contrôlé actuellement (Vear, 2016). Les enquêtes de Terres inovia révèlent que moins de 20% des parcelles sont concernées par la présence de phomopsis ces dernières années (Figure 14)

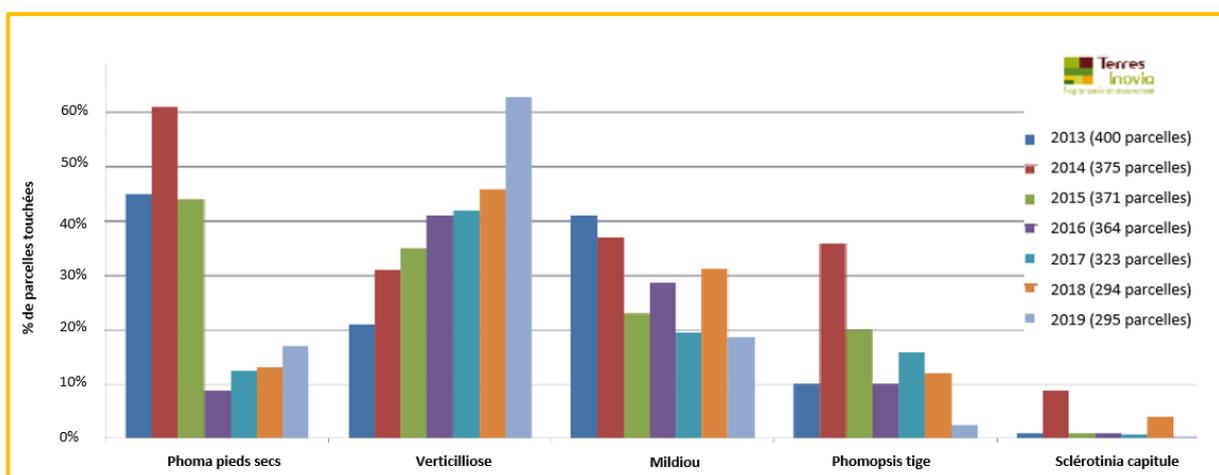


Figure 14 Proportion de parcelles de tournesol avec présence de maladies entre 2013 et 2019 en Aquitaine et Ouest Occitanie (Draaf Occitanie, 2019)

Le phoma est également le plus pénalisant lorsque les attaques au collet deviennent encerclante (Figure 15a), pouvant mener à un dessèchement précoce de la plante (syndrome des pieds secs, Figure 15b) (Mestries et al., 2010). Les dommages dus au champignon se situent entre 30 à 50% (Mestries et al., 2011). Les travaux menés par Seassau et al. (2010) ont mis en avant l'impact fort de la conduite de culture, en mettant en évidence une augmentation de la sévérité des symptômes en conditions non-limitantes en azote, ainsi qu'une augmentation de l'incidence et de la sévérité du dessèchement précoce lors de conditions hydriques limitantes. Les moyens de lutte recommandés à ce jour reposent donc entre autres sur l'ajustement de la fertilisation, ainsi que sur l'enfouissement des résidus de culture contaminés (Mestries et al., 2010). Néanmoins, l'incidence de la maladie

dans le Sud-Ouest a beaucoup diminué ces dernières années et se situent entre 10 et 20% des parcelles enquêtées (Figure 14).



Figure 15 Symptômes du phoma sur tournesol (A) au collet (B) Pied sec due à un dessèchement précoce suite à une attaque de phoma

((A) Mestries et al., 2010 ; (B) Photo personnelle)

Les dommages du sclérotinia peuvent potentiellement dépasser 50% (Mestries et al., 2011), et la gestion de la maladie est considérée comme difficile (Markell et al., 2015). En effet, les luttés variétales et chimiques ne semblent offrir qu'une efficacité partielle, et la capacité du champignon à se conserver de nombreuses années et à infecter de nombreuses plantes hôtes rend la rotation inefficace. Néanmoins, le champignon n'a pas causé de dommages importants ces dernières années en France. Cela serait associé aux conditions sèches dans les régions où le tournesol est cultivé (Vear, 2016). Le pourcentage de parcelles au sein desquelles des attaques de sclérotinia du capitule ont été observées est négligeable ces dernières années (Figure 14).

Tout comme le Sclerotinia, le champignon tellurique *V. dahliae*, responsable de la Verticilliose du tournesol, est capable de se conserver environ 14 ans dans le sol en l'absence de cultures hôtes (Wilhelm, 1955). Or, le champignon est capable d'infecter de nombreuses espèces végétales cultivées et diverses adventices (Pegg and Brady, 2002). Contrairement aux champignons évoqués ci-dessus, la Verticilliose du tournesol est en pleine expansion en France (Figure 14), et hormis l'utilisation de variétés résistantes, aucune méthode de lutte durable n'est disponible. C'est entre autres pour ces raisons que le *V. dahliae* est l'un des deux

bioagresseurs ciblés par ce travail de thèse. Une description plus détaillée du champignon et de la maladie est disponible dans la section suivante du manuscrit (§1.2).

Au-delà des ravageurs et des champignons pathogènes, les adventices sont également des bioagresseurs nuisibles à la culture du tournesol. Elles peuvent entrer en compétition avec le tournesol pour les ressources en eau et en nutriments, et impacter le développement et le rendement de la culture (Johnson, 1971). Les écarts de rendements entre des parcelles avec une faible pression et des parcelles infestées peuvent atteindre 10 qt.ha<sup>-1</sup> (Terres inovia, 2020c). Les méthodes de lutte recommandées sont notamment la diversification des rotations et le travail du sol pendant la période d'interculture (Terres inovia, 2019f). La gestion mécanique des adventices en post-levée (binage) est possible à mettre en place car l'écartement entre les rangs est généralement supérieur à 50 cm (Debaeke et al., 2017a). Cependant, dans les cas de fortes pressions, le recours aux herbicides est souvent nécessaire en pré-levée ou en post-levée (Terres inovia, 2020d). Les espèces favorisées par les rotations courtes telles que les rotations tournesol-blé sont le ray-grass, l'ammi élevé, le datura, ou encore le chardon et les liserons (Terres inovia, 2019f).

L'Orobanche du tournesol (*Orobanche cumana*) est une adventice bien particulière, car il s'agit d'un holoparasite exclusif à la culture (Parker, 2012; Terres inovia, 2019g). C'est-à-dire que cette plante non photosynthétique dépend totalement du tournesol, dont elle détourne nutriments et eau afin de pouvoir se développer et se multiplier (Louarn, 2013a). L'Orobanche est une problématique récente en France, et en expansion rapide. La stratégie de lutte la plus efficace contre ce bioagresseur est actuellement l'utilisation de variétés très peu sensibles (Jestin and Martin-Monjaret, 2016; Louarn et al., 2016), parfois accompagnée de l'utilisation d'un herbicide chimique, dans les secteurs à forte pression. Mais ces deux méthodes présentent différentes limites et la mise en place de nouveaux leviers est nécessaire. Pour ces raisons, *O. cumana* est aussi un bioagresseur ciblé par ce travail de thèse. Une description plus détaillée de ce bioagresseur est disponible dans la section suivante du manuscrit (§1.2)

Pour résumer, le rendement du tournesol peut être impacté par divers pathosystèmes, pour lesquels les méthodes de luttés sont relativement développées selon les bioagresseurs, mais le *V. dahliae* et l'*O. cumana* sont deux

bioagresseurs nuisibles pour le tournesol, principalement du fait de leur expansion rapide depuis leur arrivée en France, et du manque de stratégies de lutte efficaces et durables (Tableau 1).

Tableau 1. Incidence et efficacité des méthodes de lutte employées contre les principaux bioagresseurs du tournesol, recensés dans le sud-ouest de la France en 2019. L'efficacité des méthodes concerne leur utilisation en grandes cultures. L'incidence des champignon est issue des chiffres de la DRAAF Occitanie 2019 tandis que celle de l'Orobanche est issue d'une enquête Terres Inovia. D'après Seassau et al. (2016)

Bioagresseur		Mildiou	Phomopsis	Phoma	Sclérotinia	Verticilliose	Orobanche
Incidence dans le sud-ouest de la France (295 parcelles visitées en 2019*)		< 20%	< 20%	< 20%	< 10%	> 60%	~ 204 parcelles *nb parcelles visitées inconnu
Efficacité des méthodes de lutte mises en œuvre en grandes cultures en France	Contrôle génétique	++(+)	+++	+	++	++(+)	++(+)
	Lutte chimique	++	++	++	⊘	⊘	+
	Lutte physique <sup>1</sup>	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘	⊘
	Lutte biologique	⊘	⊘	⊘	+	⊘	⊘
	Contrôle cultural <sup>2</sup>	++	++	++	++	+	+

<sup>1</sup>: Les méthodes de lutte physique n'incluent pas le travail du sol.

<sup>2</sup>: Les méthodes de contrôle cultural incluent le travail du sol.

## I.2. Les bioagresseurs telluriques ciblés dans le travail de thèse

Le champignon *V. dahliae* et le parasite *O. cumana* sont deux bioagresseurs telluriques du tournesol, en pleine expansion ces dernières années, en particulier dans le Sud-Ouest de la France (BSV, 2021). Après une présentation des caractéristiques générales de chacun des bioagresseurs, seront détaillées les méthodes de contrôles mobilisées pour la protection du tournesol et les raisons de leur efficacité ou durabilité partielles, menant à la nécessité de trouver des méthodes de contrôle alternatives pour leur régulation.

## 1.2.1. *Verticillium dahliae*, agent pathogène responsable de la Verticilliose

### 1.2.1.1. Répartition géographique du champignon

Initialement décrit sur une espèce de *Dahlia* sp. par Klebahn en 1913 (Inderbitzin et al., 2011), *V. dahliae* a environ 350 plantes hôtes (Markell et al., 2015), dont des cultures maraîchères telles que la tomate et l'aubergine (Bhat and Subbarao, 1999; Pegg and Brady, 2002), des arbres fruitiers tels que l'olivier (Jiménez-Ruiz et al., 2017; Pegg and Brady, 2002) et l'abricotier (Inderbitzin et al., 2011), ou encore des adventices telles que la morelle noire et le datura (Pegg and Brady, 2002), qui sont justement des espèces retrouvées en parcelles cultivées de tournesol (Terres inovia, 2019f). Actuellement, le champignon est présent sur tous les continents (Figure 16) et la Verticilliose du tournesol, d'abord décrite en Amérique du Nord à la fin des années quarante (Markell et al., 2015), est considérée comme la maladie la plus dommageable au tournesol dans certains pays comme l'Argentine (Erreguerena et al., 2019). Elle est observée depuis longtemps en France, mais ses dégâts et dommages sont en progression depuis les années 2010 (Mestries and Lecomte, 2012; Mestries, 2017).

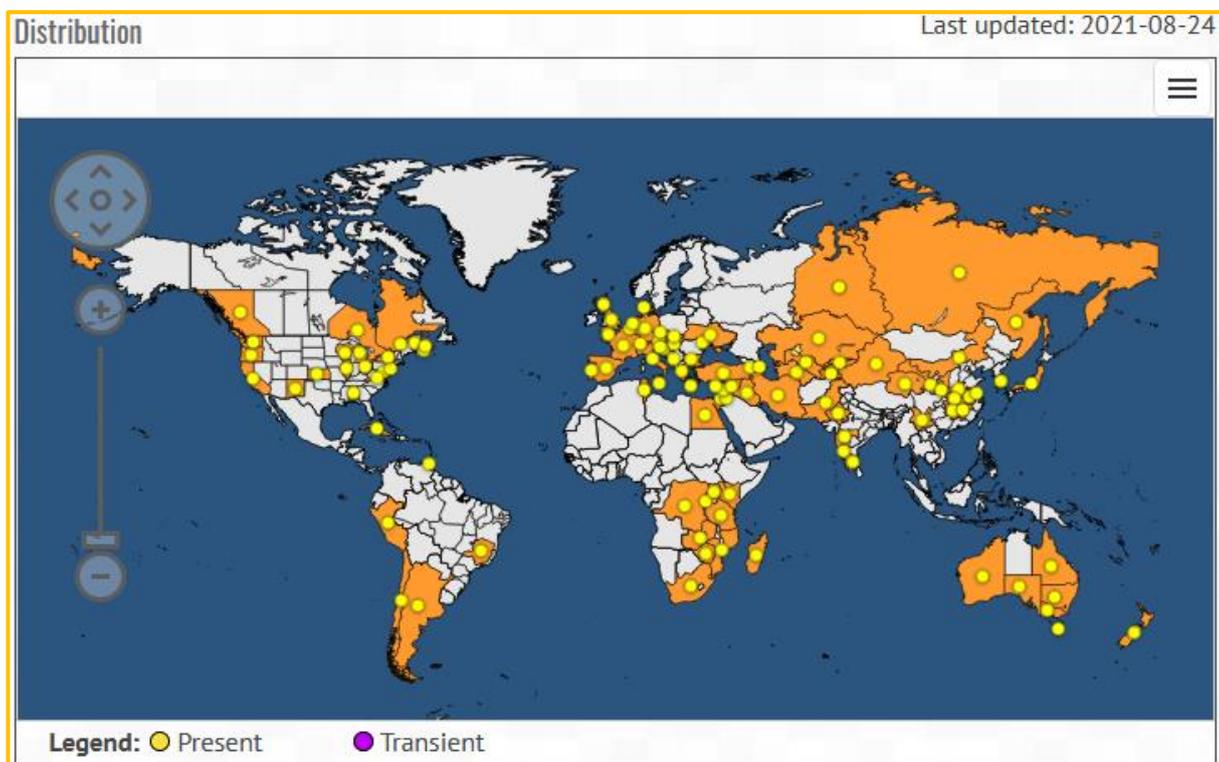


Figure 16 Distribution mondiale de l'espèce *Verticillium dahliae* (toutes cultures hôtes confondues)  
(EPPO Global Database, 2022)

#### 1.2.1.2. Morphologie du *Verticillium dahliae* et cycle de développement

*Verticillium dahliae* est un champignon ascomycète. Son mycélium végétatif est hyalin, septé, plurinucléé et haploïde. Son mycélium aérien est généralement abondant et a un aspect duveteux (EFSA, 2014). Les conidies (spores issues de la reproduction asexuée) sont hyalines, non septées, cylindriques et se forment à l'intérieur des phialides. Ces dernières sont disposées en spirales sur des conidiophores hyalins et érigés, ramifiés ou non (Pegg and Brady, 2002) (Figure 17A et Figure 17B). Le champignon peut former des microsclérotes d'une couleur brune-noire à noire par des bourgeonnements répétés à partir d'hyphes uniques. Ces microsclérotes peuvent être arrondis ou allongés et mesurent environ 25 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 18). Ces structures constituent la forme de conservation principale du champignon et sont donc très importantes d'un point de vue épidémiologique (EFSA, 2014).

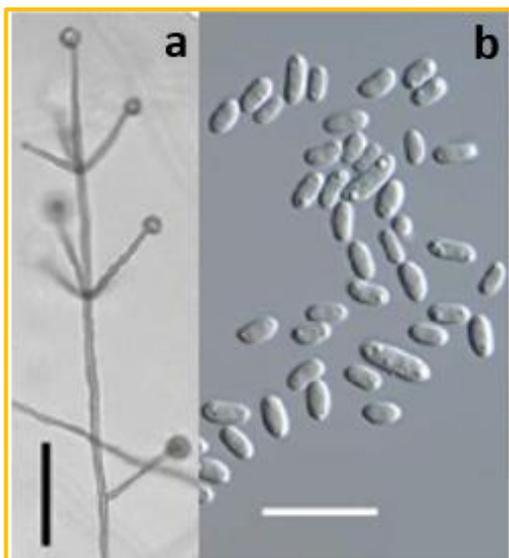


Figure 17 Quelques caractéristiques morphologiques de *V. dahliae*. (A) – Conidiophores après 15 jours sur gélose. (B) – Conidies après 9 jours sur PDA. Barres d'échelle : a :50  $\mu\text{m}$ , b : 20  $\mu\text{m}$ . (Inderbitzin et al., 2011)

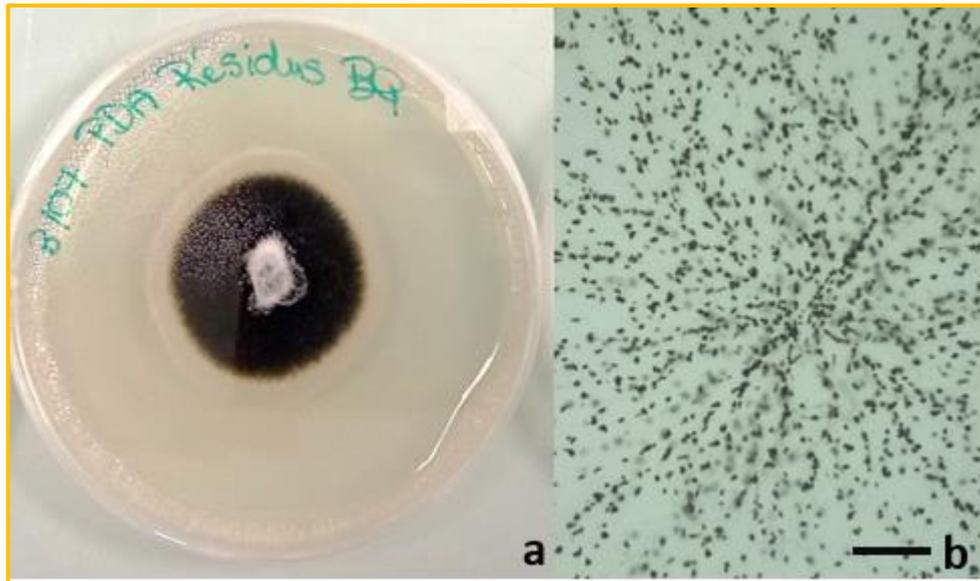


Figure 18 Microclérotos de *V. dahliae*. (A) – Mycélium et microclérotos sur PDA après 12 jours. (B) – Microclérotos sur milieu Ethanol Potassium Amoxicilin Agar (EPAA) après 15 jours barre d'échelle = 0.05 cm (Photos personnelles).

Grâce à ses microclérotos, *V. dahliae* se conserve dans les sols. La Verticilliose est donc une maladie d'origine tellurique. C'est également une maladie monocyclique, c'est à dire qu'elle n'a qu'un seul cycle d'infection par cycle de développement de la plante hôte (EFSA, 2014). Selon les mêmes auteurs, le cycle de développement du champignon se déroule comme suit (Figure 19) : le cycle démarre avec la présence de microclérotos dormants dans le sol ou dans des résidus de culture. La germination des microclérotos est induite par les exsudats racinaires libérés dans la rhizosphère par la plante hôte. Le champignon développe, à partir des microclérotos, des hyphes qui atteignent les racines de la plante hôte, qu'ils vont ensuite pouvoir coloniser en se développant entre les cellules épidermiques (Klosterman et al., 2009). Le champignon atteint le cortex puis envahit le xylème, où il forme ses conidies, qui sont entraînées vers la tige (EFSA, 2014). Les vaisseaux du xylème sont alors envahis par le champignon, mais également par différents agrégats et des composés polysaccharidiques issus de réactions de défenses de la plante, ce qui restreint la circulation de l'eau (Jiménez-Díaz et al., 2012). Les vaisseaux peuvent se déformer puis se rompre avec l'augmentation de la sévérité des symptômes (EFSA, 2014). Enfin, les microclérotos se forment sur les tissus des plants en cours de dépérissement ou déjà morts et sont ensuite libérés dans le sol lors de la décomposition de ces tissus. Lors de l'implantation d'une plante hôte durant cette période, le cycle recommence.

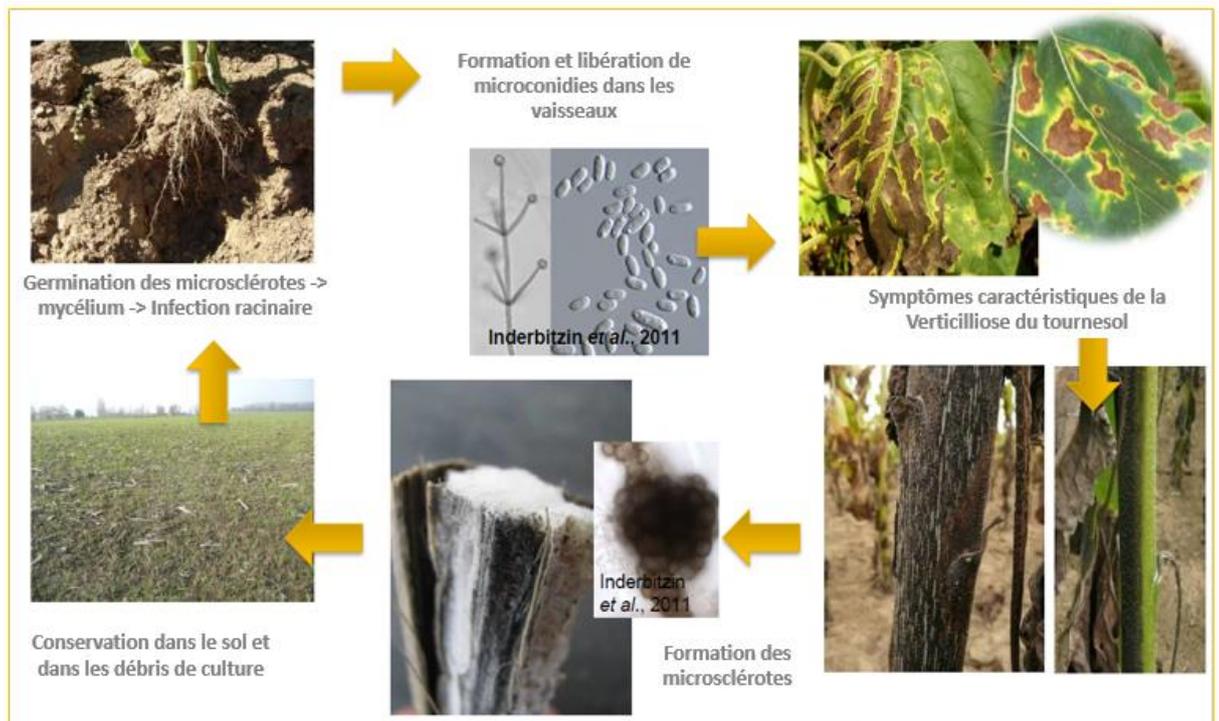


Figure 19 Cycle de développement de *Verticillium dahliae* sur culture de tournesol (Mestries and Lecomte (2012))

### 1.2.1.3. Dégâts et dommages de la Verticilliose du tournesol

Les dégâts de la Verticilliose, qui sont définis comme étant les symptômes observés et causés par la présence du bioagresseur (Aubertot et al., 2011), sont liés au cycle de développement du *V. dahliae* (Figure 19). L'origine tellurique et les infections du champignon par les racines ainsi que sa progression par les vaisseaux font que les premiers symptômes apparaissent sur les étages inférieurs de la plante hôte (Daayf et al., 1997; Terres inovia, 2019e), aux alentours de la floraison, bien qu'ils puissent apparaître avant ce stade (Markell et al., 2015; Terres inovia, 2019h). Les symptômes observés sur feuilles sont des chloroses d'un jaune vif, toujours situées entre les nervures des feuilles (Figure 20), puis ces taches chlorotiques atteignent les étages supérieurs des plantes. Les feuilles peuvent alors se nécroser, voire se dessécher complètement et mourir (Markell et al., 2015; Uppal et al., 2008). Ces symptômes sont causés par l'obstruction des vaisseaux conducteurs, qui empêchent la circulation de l'eau (EFSA, 2014). En fin de cycle, il est également possible d'observer des taches noires sur la partie inférieure des cannes des tournesols sévèrement atteints. Ces taches sont en fait constituées par des milliers de microsclérotés (Markell et al., 2015). La Verticilliose mène à l'accélération de la

sénescence et à la réduction du poids de mille grains (Mestries and Lecomte, 2012). L'inoculum primaire présent dans le sol a un impact important sur l'expression de l'incidence et de la sévérité des symptômes (Erreguerena et al., 2019), et la sévérité des symptômes est liée à des pertes de rendement, notamment sur variétés sensibles (Mestries and Lecomte, 2012; Ait Kaci Ahmed et al., 2022). Ces pertes ont été évaluées à 2,4 q.ha<sup>-1</sup> en moyenne dans le Sud-Ouest de la France, et peuvent atteindre 30 à 50% en cas de fortes attaques sur variétés sensibles (Mestries and Lecomte, 2012).



Figure 20 Photos de symptômes de la Verticilliose du tournesol, commençant aux alentours de la floraison, démarrant par les étapes foliaires du bas. Caractérisé par des taches chlorotiques situées entre les nervures, qui se nécrosent au centre (Photos personnelles).

## 1.2.2. *Orobanche cumana* holoparasite du tournesol

### 1.2.2.1. Répartition géographique de l'Orobanche du tournesol

Les premières observations de *O. cumana*, parasitant le tournesol, ont été signalées en Russie, dans les années 1890 (Škorić et al., 2021). L'espèce est actuellement distribuée dans des pays Européens comme l'Espagne et la Roumanie, au Moyen Orient, en Asie du Sud-Ouest et en Chine. En France, elle commence à être observée en 2007. Une enquête menée par Terres Inovia en 2011 permet de mettre en

évidence que les deux secteurs les plus touchés sont dans le Sud-Ouest et le Poitou Charentes, mais d'année en année, les zones contaminées s'étendent rapidement (Jestin and Martin-Monjaret, 2016) (Figure 21). Une difficulté concernant la distribution de *O. cumana* est l'apparition de populations de plus en plus agressives à cause de l'utilisation récurrente de variétés résistantes (Terres inovia, 2019g). De plus, il n'y a actuellement pas de nomenclature homogène des races entre différentes régions (Fernández-Martínez et al., 2015),

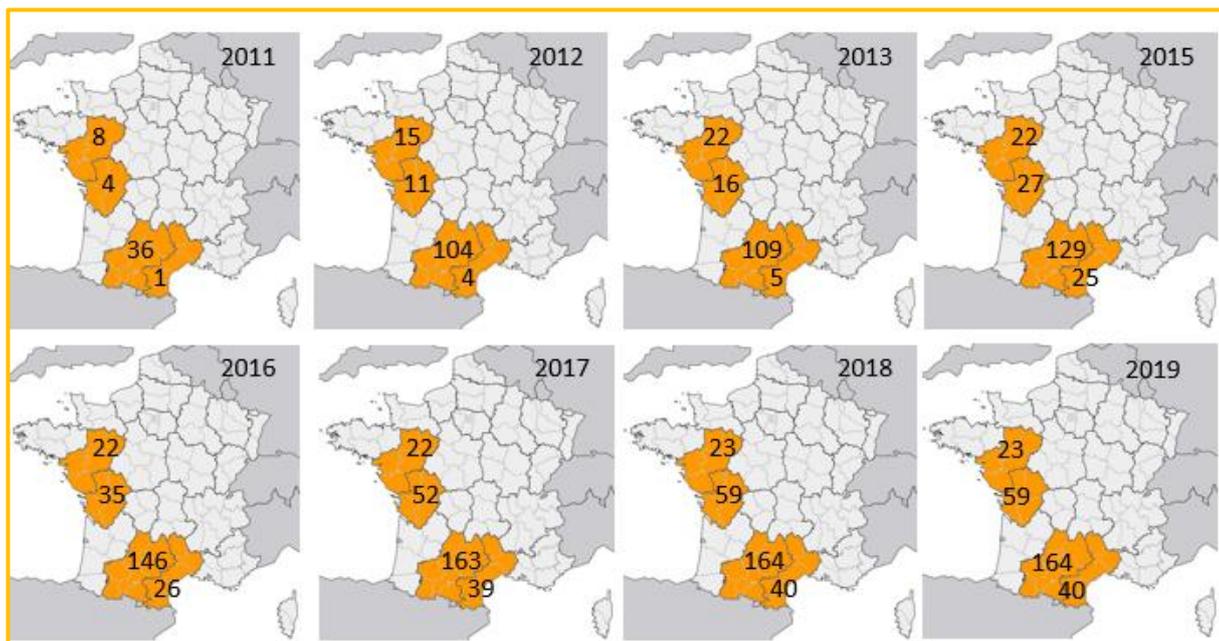


Figure 21 Augmentation du nombre de parcelles infestées par *O. cumana* entre 2011 et 2019 (Terres inovia, 2019)

#### 1.2.2.2. Description de l'Orobanche du tournesol et cycle de développement

*O. cumana* Wallr. est une angiosperme de la famille des Orobanchaceae et de l'ordre des Lamiales. Les Orobanchaceae sont la famille de plantes comptant le plus d'espèces holoparasites (Uhlich et al., 1995). Le terme holoparasite désigne des plantes ayant perdu leur capacité photosynthétique, et nécessitant de parasiter une plante hôte afin de pouvoir y prélever l'eau et les nutriments nécessaires à l'accomplissement de leur cycle (Fernández-Aparicio et al., 2016b; Mohamed et al., 2006). Le tournesol est la seule espèce cultivée parasitée par *O. cumana* (Parker, 2013), qui lui vaut sa dénomination d'Orobanche du tournesol, bien que l'espèce ait déjà été observée fixée à une espèce sauvage d'armoise du genre *Artemisia* spp. (Fernández-Martínez et al., 2015).

Avant d'être en mesure de se fixer sur le tournesol, l'Orobanche passe par plusieurs étapes préalables. Au regard du manque de références précises sur *O. cumana*, la description du cycle de développement ci-dessous concerne les Orobanchaceae. La phase souterraine commence par la présence de graines dormantes, capables de se conserver dans le sol sans plante hôte pendant une dizaine d'année (Jestin and Martin-Monjaret, 2016). Les graines d'*O. cumana* sont relativement allongées et mesurent environ 0,3 mm de long (Figure 22A). Pour lever cette dormance, la graine doit passer par une étape **d'imbibition**, qui peut être très rapide, et qui est réversible en l'absence de conditions favorables à sa germination (Kebreab and Murdoch, 1999). Les graines sont en effet incapables de germer sans stimulations chimiques exsudés dans la rhizosphère par les racines de leur plante hôte (Delavault, 2015). Ces inducteurs chimiques sont, par exemple, les déhydrocostus lactones (DCL), suggérés comme étant un inducteur majeur de la germination de *O. cumana* (Joel et al., 2011), l'heliolactone (qui fait partie de la famille des strigolactones non-cannoniques), le costunolide (Ueno et al., 2014), ainsi qu'une strigolactone de synthèse, le GR24 (Raupp and Spring, 2013). Il est à noter que l'induction de la germination par les strigolactones est spécifique, car chaque espèce d'Orobanche a une sensibilité différente aux diverses strigolactones, et c'est particulièrement le cas pour *O. cumana* (Fernández-Aparicio et al., 2011). Après cette étape de **perception des exsudats racinaires**, la graine germe, la radicule se développe vers les racines de la plante hôte et forme un **haustorium** (Figure 22B) (Fernández-Aparicio et al., 2016a) qui est un organe spécialisé dans la fixation, la pénétration et la connexion avec les tissus vasculaires de la plante hôte (Figure 22C) (Press and Graves, 1995). Une fois fixé, ce dernier permet à l'Orobanche d'absorber, via le xylème l'eau et les nutriments nécessaires à la vie du parasite (Parker and Riches, 1993). Ainsi, l'Orobanche commence sa croissance hétérotrophe et forme un **tubercule** (Figure 22D) (Duriez, 2019; Labrousse et al., 2001), qui devient un nouveau puit de ressources et qui redirigent une grande partie du flux de nutriments et d'eau. Chacun de ces tubercules peut se différencier en une tige souterraine, qui peut émerger hors du sol pour donner une tige non ramifiée d'environ 40 à 65 cm. L'Orobanche fleurit et présente des fleurs formant un épi sur la partie supérieure de la tige, chaque fleur n'étant composée que d'une seule bractée d'environ 10 à 12 mm de long. Le calice et la corolle sont tubulaires et cette dernière est incurvée vers le bas. Sa couleur varie du blanc au bleu pâle (Parker, 2013) (Figure 22E et Figure 23). Chaque fleur peut produire plusieurs

centaines de milliers de graines, dont la petite taille va leur permettre de se disséminer par le vent, les animaux, les semences, le matériel et l'homme avant de retourner au sol afin que le cycle puisse recommencer (Jestin and Martin-Monjaret, 2016). Selon ces mêmes auteurs, le stock grainier en Orobanche dans les sols peut augmenter de façon exponentielle si aucune méthode de lutte n'est entreprise.

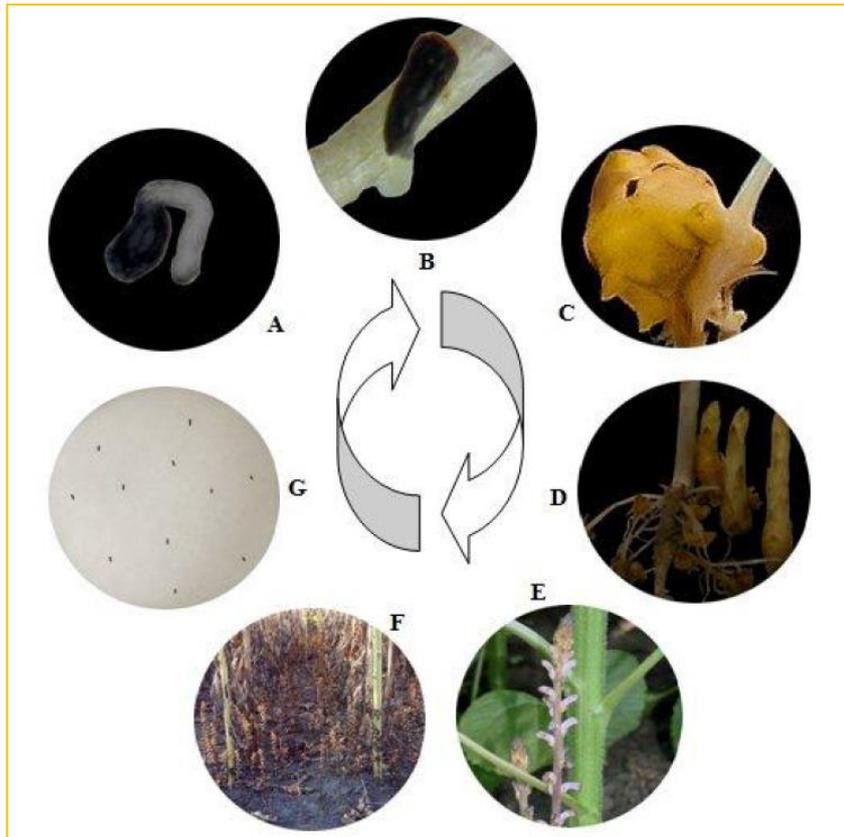


Figure 22 Cycle de développement de *O. cumana*

**A** : Germination de la graine et apparition de la radicule ; **B** : Développement de l'haustorium ; **C** : Développement d'un nodule après fixation de l'Orobanche à la racine du tournesol ; **D** : Différentiation du nodule en tubercule ; **E** : Emergence et floraison de la tige ; **F** : Orobanche à maturité ; **G** : Dispersion des graines d'Orobanche  
(Duca et al. (2013))



Figure 23 Pieds d'*Orobanche cumana* à floraison, à proximité de pieds de tournesols  
(Photo prise par Grégory Dechamp-Guillaume)

#### 1.2.2.3. Dégâts et dommages de l'*Orobanche* du tournesol

Après fixation de l'*Orobanche* sur les racines du tournesol, les tournesols présentent une réduction du développement du système racinaire et du capitule (Labrousse et al., 2001). Les réductions de biomasses des capitules (incluant les graines) peuvent atteindre 35% (Grenz et al., 2008). Ces réductions de croissance et de biomasses sont le résultat d'une compétition entre le parasite et l'hôte pour l'eau et les nutriments (Grenz et al., 2008; Labrousse et al., 2001). En France, les pertes de rendement dues à l'*Orobanche* ont été estimées à 90%, en parcelles fortement infestées, lorsqu'aucune mesure de lutte n'est prise (Jestin and Martin-Monjaret, 2016).

#### 1.2.3. Méthodes de lutte contre *Verticillium dahliae* et *Orobanche cumana*

La Verticilliose est une maladie difficile à contrôler, les méthodes de lutte opérationnelles et durables contre la Verticilliose du tournesol sont limitées, en

particulier si elles sont utilisées isolément (EFSA, 2014; Markell et al., 2015). La stratégie de lutte contre *O. cumana* est à adapter selon le niveau de risque (historique du secteur, présence ou non de l’Orobanche) (Figure 24) (Jestin and Martin-Monjaret, 2016). Elle se décline en différentes méthodes, dont l’action isolée de chacune a une efficacité partielle. Les leviers potentiels contre ces deux bioagresseurs sont les suivants :

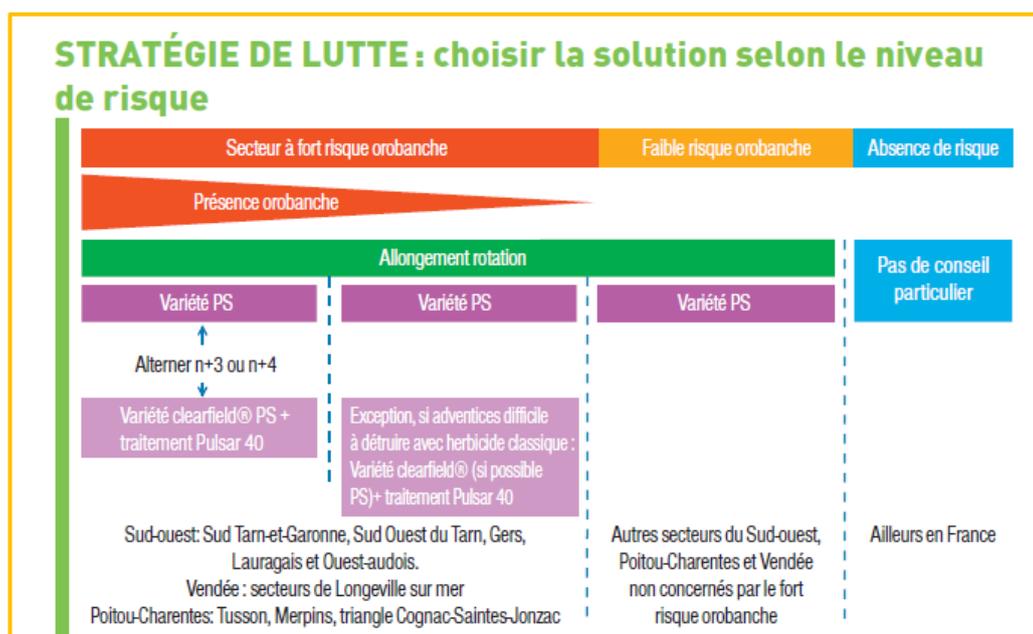


Figure 24 Stratégie de lutte contre *O. cumana* actuellement recommandée par Terres inovia, en fonction de la pression d’infestation en parcelles de tournesol (Jestin and Martin-Monjaret (2016))

### 1.2.3.1. Les méthodes de lutte génétiques

La lutte génétique est à ce jour la seule méthode disponible et opérationnelle pour protéger le tournesol contre la Verticilliose (Markell et al., 2015; Mestries and Lecomte, 2012). La première race de *V. dahliae* sur tournesol (NA-1) a été identifiée aux Etats-Unis et est contrôlée par une résistance monogénique (single major gene) (Fick and Zimmer, 1974). Depuis, de nouvelles races contournant cette résistance ont été reportées dans des pays producteurs du tournesol comme les Etats-Unis (Gulya, 1997) et l’Espagne (García-Ruiz et al., 2014).

La situation est assez comparable concernant *O. cumana* contre laquelle la lutte génétique est actuellement aussi le moyen de lutte le plus efficace (Jestin and Martin-Monjaret, 2016; Louarn et al., 2016; Vear, 2016). Il existe de nombreux exemples de mécanismes de résistance à l’Orobanche, pouvant intervenir à différentes étapes de son cycle de développement, dont quelques exemples ont

été observés par Labrousse et al. (2001). Au stade de la germination, une résistance observée est la réduction de la production d'inducteurs de germination. Lors de la fixation, les auteurs ont observé des formations de dépôts sur les parois cellulaires, à l'interface des zones de fixation de l'Orobanche au tournesol, ou encore une obstruction complète des vaisseaux du xylème à la suite de dépôts de substances gélatineuses. Un mécanisme de résistance lors de la fixation correspond à un attachement incompatible (Louarn et al., 2016) (Figure 25). Ces différents mécanismes mènent à des nécroses et à la mort du parasite (Labrousse et al., 2001).

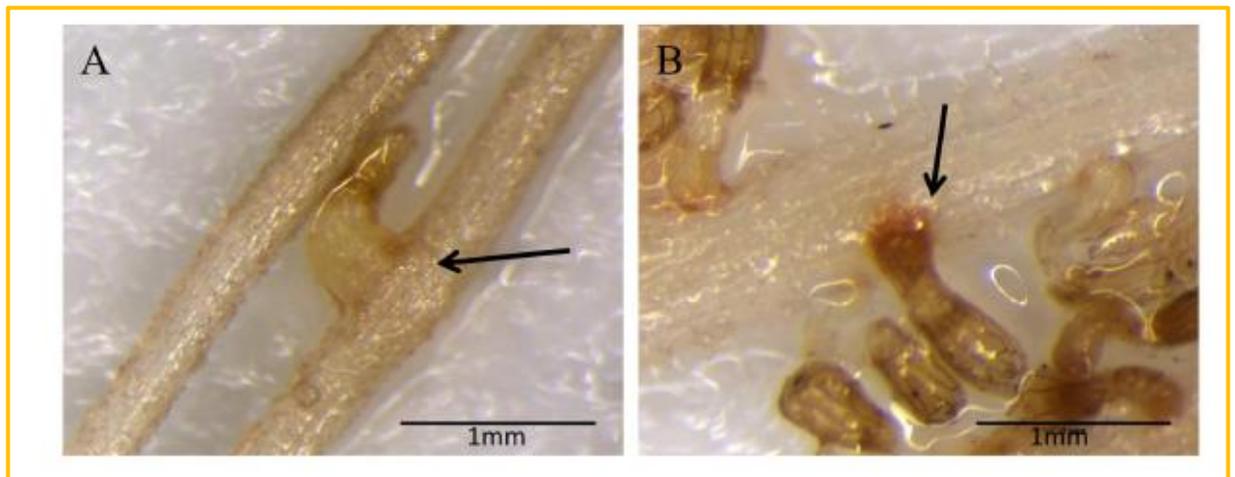


Figure 25 Photos de graines d'*Orobancha cumana* à proximité de racines de tournesols montrant (A) un attachement compatible entre le parasite et l'hôte ; (B) : Un attachement incompatible (Louarn et al. (2016)

Ces résistances sont pour la plupart monogéniques et totales, c'est-à-dire qu'elles sont « races-spécifiques », et les gènes *Or1* à *Or5* permettent respectivement de résister aux races A à E (Fernández-Martínez et al., 2015; Molinero-Ruiz et al., 2006). Ceci a favorisé des contournements de résistance par une évolution rapide et la virulence de *O. cumana*. De plus, la distribution mondiale des races d'Orobancha est mal connue et les correspondances entre les noms de races entre différents pays est loin d'être homogène. Ces deux limites prouvent la nécessité de développer des résistances plus durables, basées sur l'utilisation de plusieurs gènes (Fernández-Martínez et al., 2015), et nécessitant donc une meilleure caractérisation de loci de résistance. Ainsi, des travaux récents ont permis d'identifier des loci de caractères quantitatifs conférant des résistances « stades-spécifiques » contre l'Orobancha du tournesol (Louarn et al., 2016). Une analyse du

gène Or7 a montré qu'il s'agissait d'un récepteur membranaire qui permettait de prévenir la connexion de l'Orobanche au système vasculaire des racines du tournesol (Duriez et al., 2019). Ces stratégies de lutte génétique doivent nécessairement être accompagnées par des pratiques culturales adaptées pour prévenir les infestations et l'apparition de nouvelles races plus virulentes (Fernández-Martínez et al., 2015).

#### 1.2.3.2. Les pratiques culturales

**Raisonner l'assolement** selon l'historique de la parcelle permet de favoriser l'efficacité d'autres méthodes de contrôle de la maladie (EFSA, 2014). **Diversifier la rotation**, avec un retour du tournesol chaque 3 à 4 années après des cultures non-hôtes, peut réduire l'inoculum du champignon (Markell et al., 2015), ou le nombre de graines d'Orobanche dans le sol (Rubiales et al., 2009). Ceci constitue une méthode préventive contre la Verticilliose du tournesol (Mestries and Lecomte, 2012). Cependant, ces deux premiers leviers utilisés seuls sont loin d'être efficaces à cause de (i) la capacité de *V. dahliae* à se conserver environ 14 ans sans plante hôte (Wilhelm, 1955), (ii) la diversité des plantes hôtes du champignon, telles que des adventices retrouvées en grandes cultures citées précédemment. De plus, Malcolm et al. (2013) soulignent l'importance des cultures considérées comme non-hôtes, car elles ne présentent aucun symptôme de la Verticilliose, mais peuvent en réalité abriter *V. dahliae* en tant qu'endophyte. Selon la revue de littérature réalisée par ces auteurs, le blé et l'orge font partie de ces cultures hôtes mais asymptomatiques. La diversification des rotations est également considérée comme inefficace pour lutter contre l'Orobanche (Rubiales et al., 2009). En revanche, il serait possible pour lutter contre certaines espèces d'Orobanche d'utiliser des cultures pièges (trap crop), qui sont des cultures résistantes à l'Orobanche capables de stimuler sa germination sans que celle-ci ne puisse s'y fixer, menant donc à la mort des graines ayant germé (Fernández-Martínez et al., 2015). De nombreuses espèces pouvant remplir cette fonction sont référencées pour d'autres espèces que *O. cumana*, avec l'exemple de l'utilisation de petit pois pour induire la germination de l'Orobanche crénelée (Fernández-Aparicio et al., 2016b), mais *O. cumana* est considérée comme assez spécialisée, et peu d'exsudats racinaires semblent capables de stimuler sa germination en comparaison avec ceux du tournesol et au GR24 (Fernández-Aparicio et al., 2009). Ces mêmes auteurs ont observé de légères augmentations de la germination de graines d'*O. cumana* suite à des expositions à des exsudats racinaires de Fabacées (vesce, petit pois, trèfle) et

surtout de graminées (Blé, sorgho et avoine par exemple), ou de coton. D'autre part, Ma et al. (2013) ont observé que des exsudats racinaires de maïs permettaient également d'induire la germination de *O. cumana*, avec une variabilité du pourcentage de germination en fonction des lignées utilisées et des stades de développement du maïs (25,7% à 36,5%). Ces résultats sont cependant issus d'expérimentations au laboratoire, et aucune application n'existe actuellement pour contrôler l'Orobanche du tournesol en parcelles agricoles, bien que ces voies soient prometteuses.

Concernant les effets du **travail du sol**, une étude a démontré que le nombre d'unité formatrice de colonies par gramme de sol de *V. dahliae* étaient significativement plus faibles dans les sols non travaillés, comparés aux sols ayant subi un travail du sol conventionnel, mais les réductions étaient moins marquées concernant les observations de sévérités de la Verticilliose du tournesol (Quiroz et al., 2008). Ces auteurs soulignent également qu'une combinaison entre une absence de travail du sol et l'utilisation d'une variété résistante réduisaient la sévérité de la maladie et la production de microsclérotés, suggérant ainsi qu'il s'agissait d'une bonne méthode préventive contre la Verticilliose du tournesol. **Le travail du sol** pourrait aussi réduire les germinations de l'Orobanche, soit en réduisant le nombre de graines incorporées dans le sol, dans le cas d'un travail du sol superficiel, ou au contraire en entraînant les graines à des horizons où elles manqueraient d'oxygène, dans le cas d'un travail du sol profond (Rubiales et al., 2009).

Contrairement à d'autres maladies du tournesol telles que le phoma (*P. macdonaldii*), aucune étude n'établit clairement le lien entre **la fertilisation**, et l'incidence ou la sévérité de la Verticilliose du tournesol (Mestries and Lecomte, 2012). Cependant, des études rapportent des effets toxiques de l'ammoniac et des acides nitreux contenus dans les amendements azotés menant à la mort des microsclérotés (Tenuta and Lazarovits, 2002). Les effets de **l'irrigation** sur l'incidence ou la sévérité de la Verticilliose sont également peu étudiés, bien que l'incidence de la Verticilliose du tournesol tende à augmenter en conduite irriguée (Alabouvette and Marty, 1977). Cette observation est en accord avec des résultats obtenus en culture de coton : le régime hydrique avec les apports en eau les plus élevés mène à une incidence de la Verticilliose du coton supérieure à celle observée dans les traitements avec un régime hydrique de base (Wheeler et al., 2020). Selon

ces mêmes auteurs, cela pourrait s'expliquer par des conditions humides plus favorables au champignon. Enfin, Grenz et al. (2008) ont observé que des **semis tardifs** (mi-Mai) accompagnés d'une **irrigation** (190 mm) et d'apports en **azote** importants (150 kg.ha<sup>-1</sup>) étaient accompagnés par une augmentation du nombre d'*O. cumana* et de leur biomasse. Les auteurs ont également observé que le nombre d'Orobanches fixées était positivement corrélé à la densité et à la longueur du système racinaire, qui était mieux développé grâce aux apports en eau et en azote. Les auteurs suggèrent donc que l'Orobanche a bénéficié de l'augmentation de la productivité de l'hôte et recommandent de ne pas irriguer les champs de tournesols infestés par le parasite.

#### 1.2.3.3. Les méthodes de lutte chimiques

Le méthyl-bromide et la chloropicrine utilisés dans le cadre d'une fumigation (injection du gaz biocide directement dans le sol, sous film plastique) permettent de réduire presque totalement la densité de l'inoculum de *V. dahliae* (Xiao and Subbarao, 1998). Le métham sodium et le dazomet qui génèrent des ITCs de méthyles sont également deux fumigants induisant 65 à 100% de mortalité chez *V. dahliae* (Di Primo et al., 2003). De ce fait, ces matières actives ont longtemps été utilisées pour le contrôle de *V. dahliae* en cultures à haute valeur ajoutée et cultivées sur des surfaces réduites telles que les fraisières et la tomate (Pegg and Brady, 2002). En effet, des concentrations élevées sont nécessaires pour atteindre une régulation efficace, rendant cette pratique onéreuse (Mestries and Lecomte, 2012 ; Pegg and Brady, 2002). En outre, des réductions de l'efficacité de ces matières actives ont été observées sur des sols où elles avaient déjà été utilisées, à cause du phénomène de dégradation accélérée des matières actives (en anglais 'accelerated / enhanced degradation') (Di Primo et al., 2003; Matthiessen and Kirkegaard, 2006). Enfin, les conséquences négatives de ces matières actives sur la santé des manipulateurs et sur l'environnement, avec notamment des effets négatifs sur la couche d'ozone, ont mené à l'interdiction d'un grand nombre de ces matières actives, notamment dans le cadre de la signature du protocole de Montréal (Porter et al., 2009). Toutes ces raisons font que cette méthode est loin d'être adaptée ou appliquée dans le cadre de la protection du tournesol.

Quelques travaux ont été menés sur des traitements de semences et des fongicides de végétation mais les résultats sont insuffisants et ces traitements ne sont pas préconisés en France (Mestries and Lecomte, 2012).

Pour ce qui est de l'Orobanche, des méthodes chimiques peuvent être utilisées **avant le semis** de la culture hôte, afin d'agir avant même que l'Orobanche ne se développe. Les méthodes suggérées sont la **fumigation**, notamment à base de metam-sodium (methyl-isothiocyanates) (Goldwasser et al., 1995), mais encore une fois, les limites écologiques et économiques de cette pratique ont déjà été soulignées ci-dessus. L'utilisation **d'inducteurs de germination chimiques** (analogues aux strigolactones) permet d'induire une **germination suicide** en l'absence de l'hôte et un grand nombre d'études existe sur le sujet (review de Rubiales et al., 2009). Cette approche présente l'avantage d'être spécifique à la plante parasite visée, mais son application en plein champ est très couteuse, et nécessite une irrigation préalable, qui n'est pas disponible partout (Rubiales et al., 2009), d'autant plus dans un contexte de changement climatique. **Après le semis** de la culture hôte, la lutte chimique est plus difficile car la plante parasite est difficilement accessible. Parmi les matières actives utilisées en post-émergence contre *O. cumana*, la famille des imidazolinones est souvent retenue (Aly et al., 2001; Jestin and Martin-Monjaret, 2016). Ce traitement doit être accompagné de l'utilisation de variétés de tournesols résistantes à cet herbicide (Dominguez et al., 2004), connus sous l'appellation Clearfield® (Fernández-Martínez et al., 2015). Cette méthode de lutte, discutable d'un point de vue environnementale, en particulier dans le contexte du plan Ecophyto II+ visant à réduire de 50% l'utilisation de produits phytopharmaceutiques, n'est recommandée en France qu'en cas de forte pression Orobanche, dans les foyers sensibles (Jestin and Martin-Monjaret, 2016) et ne représente pas un moyen de lutte durable.

#### 1.2.3.4. Les méthodes de lutte physiques

Ces méthodes impliquent l'utilisation de températures élevées pour lutter contre les bioagresseurs. Le pourcentage de survie de *V. dahliae* est proche de 0% à 50°C au bout d'une dizaine de minutes dans le sol, ou à 45°C après environ 2h (Pullman et al., 1981). De ce fait, brûler les résidus pour éliminer l'inoculum de *V. dahliae* a été utilisés pour plusieurs cultures (Pegg and Brady, 2002). **La solarisation**, qui consiste en l'utilisation de matériaux en polyéthylène ou PVC pour couvrir le sol et le chauffer, permet d'atteindre des températures létales au champignon (Pegg and Brady, 2002). Elle est aussi évoquée comme méthode permettant de réduire voire d'éradiquer le stock de graines d'Orobanche dans le sol (Rubiales et al., 2009). Cette technique est utilisée sur les petites surfaces de production de cultures maraîchères

mais est inadaptée aux grandes cultures. De plus, la solarisation est une méthode non sélective avec des effets négatifs sur la biomasse microbienne.

#### 1.2.3.5. Les méthodes de lutte biologiques

Quelques travaux ont évalué le potentiel de quelques microorganismes pour contrôler *V. dahliae* et son référencés par Pegg and Brady (2002) et EFSA (2014). Il en ressort que la présence de certaines bactéries ou champignons pouvaient être efficaces, tels que les genres *Pythium* et *Trichoderma*, mais ces études sont menées au laboratoire et ne permettent pas aujourd’hui d’aboutir à des méthodes opérationnelles en plein champ (EFSA, 2014; Mestries and Lecomte, 2012). Plus concrètement, Davis et al. (2010) ont rapporté une réduction de la Verticilliose de la pomme de terre associée à une augmentation de l’activité microbienne et de populations du genre *Fusarium* spp., après l’incorporation de couverts végétaux. Les auteurs suggèrent que cette incorporation a induit des modifications de l’activité des communautés microbiennes, pouvant mener à une compétition avec *V. dahliae*.

Concernant *O. cumana*, une étude en conditions contrôlées a rapporté une réduction de sa germination dans les sols inoculés avec des CMA (Louarn et al., 2012). Selon les auteurs, cette inhibition repose sur (i) une réduction de la production d’inducteurs de la germination par les tournesols aux racines mycorhizées, et (ii) une production d’exsudats par ces derniers, ayant un impact négatif sur la germination de *O. cumana*. Une autre étude, menée sous serre, a mis en avant des réductions du nombre de fixations, de biomasses et d’émergences d’Orobanche capables de produire des graines grâce à des formulations à base de *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras*, utilisées alors en tant que bioherbicide (Shabana et al., 2003). Ces résultats soulèvent des perspectives intéressantes sur la réflexion d’une stratégie de lutte intégrée mais ne sont pas encore appliqués en plein champ.

Pour conclure, *V. dahliae* et *O. cumana* sont deux bioagresseurs en expansion en France dont les pertes de récolte sont avérées et dont il faut endiguer la progression, en particulier avec des méthodes agissant directement sur le stock initial (microsclérotés ou graines) afin de réduire leurs dégâts, leurs dommages et leur multiplication. La succession culturale blé dur – tournesol est caractérisé par une période d’interculture d’environ 8 à 9 mois, qui offre la possibilité de mettre en place des leviers de protection de la culture pendant cette période, jusqu’ici

assez peu valorisée. Une méthode alternative d'intérêt serait de diversifier la rotation grâce à la mise en place de plantes de couverture. De plus, l'implantation de ces CIMS ont de nombreux bénéfices, en particulier en termes de régulation des bioagresseurs du tournesol, qui sont détaillés dans la partie suivante.

### I.3. Les cultures intermédiaires multi-services et la biofumigation comme méthodes de lutte contre la Verticilliose du tournesol et l'Orobanche

La terminologie des CIMS découle de différentes définitions, qui ont évolué dans le temps en fonction des problématiques agronomiques et écologiques encadrant leur utilisation. La mise en place de cultures pendant la période d'interculture, entre deux **cultures de rente**, est initialement développée dans un objectif d'enrichissement du sol en azote (effet « **engrais vert** », *green manure*) et de structuration du sol (Meisinger et al., 1991). Cette terminologie d'engrais vert utilisée dans les années 70 à 90 a évolué vers celle des **cultures intermédiaires pièges à nitrates (CIPAN, catch crop)** dans les années 90 à 2000, soulignant l'intérêt de sa fonction d'immobilisation des nitrates pour réduire leur lixiviation et améliorer la qualité des eaux drainées (Justes and Richard, 2017). Cette terminologie est en lien avec la Directives Nitrates (91/676/CEE), adoptée en 1991, dont les objectifs de l'une des mesures est l'obligation de couvrir les sols pour limiter les fuites d'azote au cours de périodes pluvieuses, en zones vulnérables.

Les « **cultures intermédiaires** » sont définies par Justes and Richard (2017) comme étant des cultures implantées entre deux cultures principales pour produire des services, et ne sont pas récoltées. Elles sont en effet enfouies après une destruction mécanique ou laissées sur le sol (après un broyage ou une destruction chimique), plusieurs semaines ou juste avant l'implantation de la culture de rente suivante. Elles ne sont donc utilisées ni comme culture à vocation énergétique, ni pour le pâturage. C'est cette définition qui sera utilisée dans le cadre de ce manuscrit, bien qu'il en existe d'autres, avec l'exemple de celle du Décret n° 2016-929, les définissant comme « culture qui est semée et récoltée entre deux cultures principales », permettant donc d'inclure les cultures intermédiaires à vocation énergétique (CIVE).

Ce n'est qu'à partir des années 2010 que la terminologie de **Cultures intermédiaires multi-services (CIMS)** se répand, faisant référence aux différents bénéfices fournis par ces dernières sur les compartiments sol/eau/air (Justes et Richard, 2017), en plus des effets engrais vert et CIPAN déjà évoqués. Plus précisément, cette terminologie implique le concept de « **services écosystémiques** », dont la définition communément admise est celle de l'évaluation des écosystèmes pour le millénaire (Millennium Ecosystem Assessment, 2005) et indique qu'il s'agit des bénéfices ou avantages que les humains retirent des écosystèmes. Ces services découlent de processus naturels écologiques de fonctionnement et de maintien des écosystèmes. Selon la même source, ces services écosystémiques sont répartis en 4 types qui sont : les services d'approvisionnement, les services de régulation, les services socioculturels et les services de soutien ou de support. Enfin, les « **dis-services écosystémiques** », qui sont à opposer aux services écosystémiques, car pouvant entraîner par exemple des dysfonctionnements ou des effets indésirables, doivent être minimisés (Dunn, 2010).

Désormais, les CIMS sont considérés comme un pilier des systèmes de production agroécologiques (Ingels et al., 1994; Justes et al., 2017).

### 1.3.1. Services écosystémiques fournis par les CIMS

La Figure 26, adaptée des travaux de Therond and Duru (2019), représente des services écosystémiques potentiellement fournis par les couverts végétaux gérés, qui incluent les CIMS. Aucune espèce ou mélange d'espèce ne permet de fournir tous ces services en même temps, et maximiser leur fourniture tout en minimisant les éventuels dis-services nécessite des compromis, qui dépendent du choix de l'espèce ou du mélange d'espèce, de la conduite de la CIMS, des conditions pédo-climatiques et de la culture principale suivante (Ingels et al., 1994; Justes and Richard, 2017; Tribouillois et al., 2017; Couëdel et al., 2019).

Le présent travail de thèse se concentre sur les services écosystémiques de régulation de la Verticilliose du tournesol et de l'Orobanche fournis par les CIMS et la biofumigation, qui sont actuellement mal caractérisés. Il s'intéresse également aux effets de l'implantation des CIMS sur les quantités de azote disponibles dans le sol au semis du tournesol. En effet, bien que les effets de différentes familles botaniques de CIMS sur la dynamique de l'azote dans le sol soit largement documenté, et que l'enrichissement du sol en azote suite à une Fabacée ait déjà été observé, les répercussions sur les quantités disponibles pour la culture de

tournesol suivant les CIMS (de Brassicacées, de Fabacées ou du mélange des deux) n'a été que rarement caractérisé expérimentalement. Cette section traite donc en particulier de ces aspects, après avoir détaillé plus largement d'autres services, qui ne seront pas visés par la thèse.

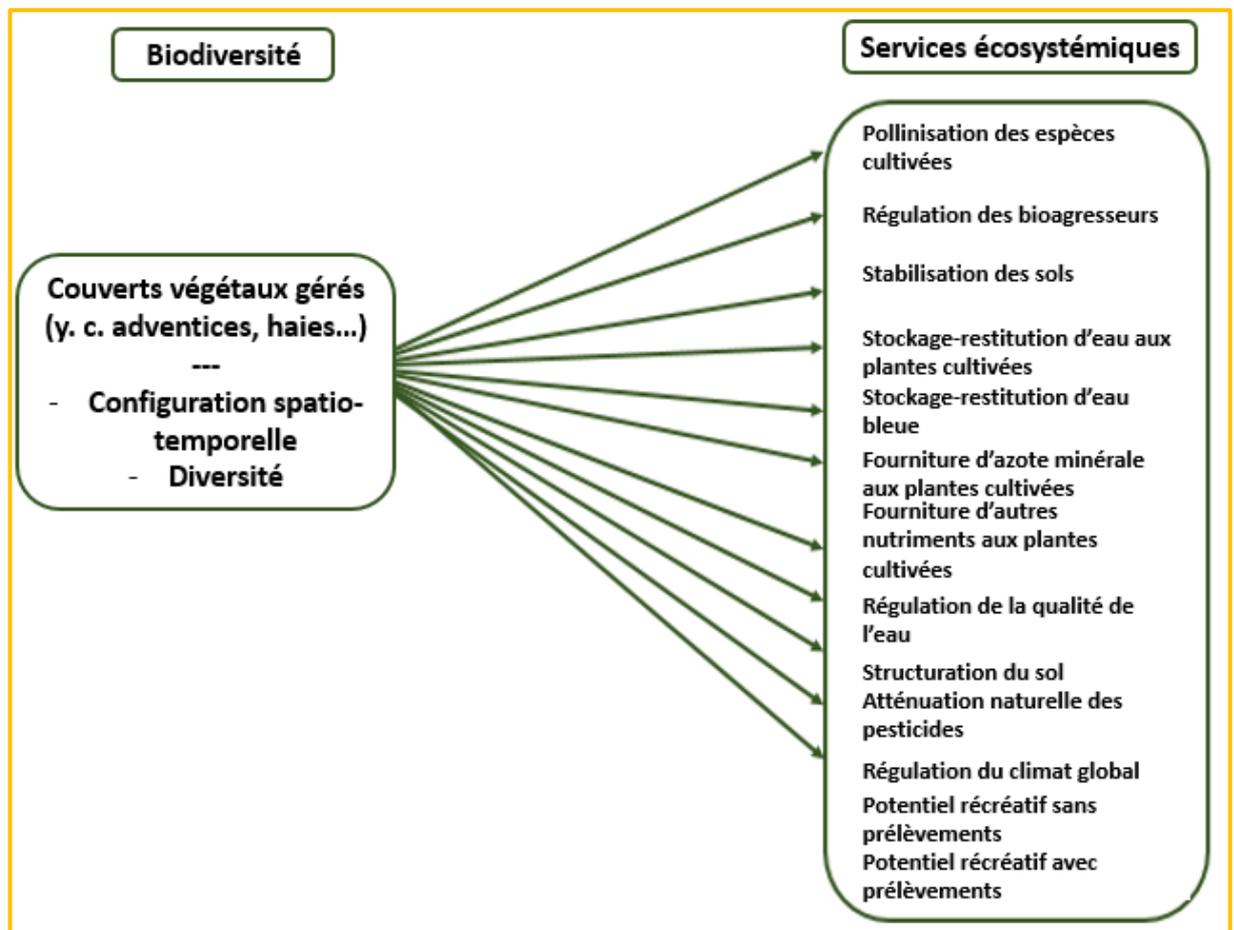


Figure 26 Principales relations entre les composantes de la biodiversité des couverts végétaux gérés (incluant les CIMS) et les services écosystémiques fournis à l'agriculteur, c'est-à-dire sous tendant la production agricole (Adaptée de Therond and Duru (2019))

### I.3.1.1. Services écosystémiques fournis par les cultures intermédiaires multi-services non ciblés par la thèse

Les CIMS peuvent fournir de nombreux services écosystémiques, dont certains ne sont pas ciblés par la thèse : On y retrouve des services de soutien concernant l'amélioration des sols, par une meilleure structuration et stabilisation des sols grâce à des effets bénéfiques sur la réduction de l'érosion, du ruissèlement et de la battance du sol, ainsi que de meilleures propriétés hydriques (amélioration de l'infiltration de l'eau et limitation de pertes d'eau par évaporation) (Justes et al., 2012; Justes and Richard, 2017). Ces mêmes auteurs référencent également des

services en lien avec un entretien de la matière organique du sol, qui n'est pas analysé dans ce travail mais qui ne doit pas être exclue comme mécanismes de régulation de bioagresseurs (Kirkegaard and Matthiessen, 2004).

Il ressort également de la revue de littérature de Couëdel et al. (2019) que les CIMS, en particulier en mélange, ont globalement des effets positifs sur la macrofaune utile (arthropodes tels que les carabes et abeilles), ainsi que sur les communautés microbiennes du sol bénéfiques telles que les bactéries impliquées dans le cycle de l'azote et celles du genre *Rhizobium* (Figure 27).

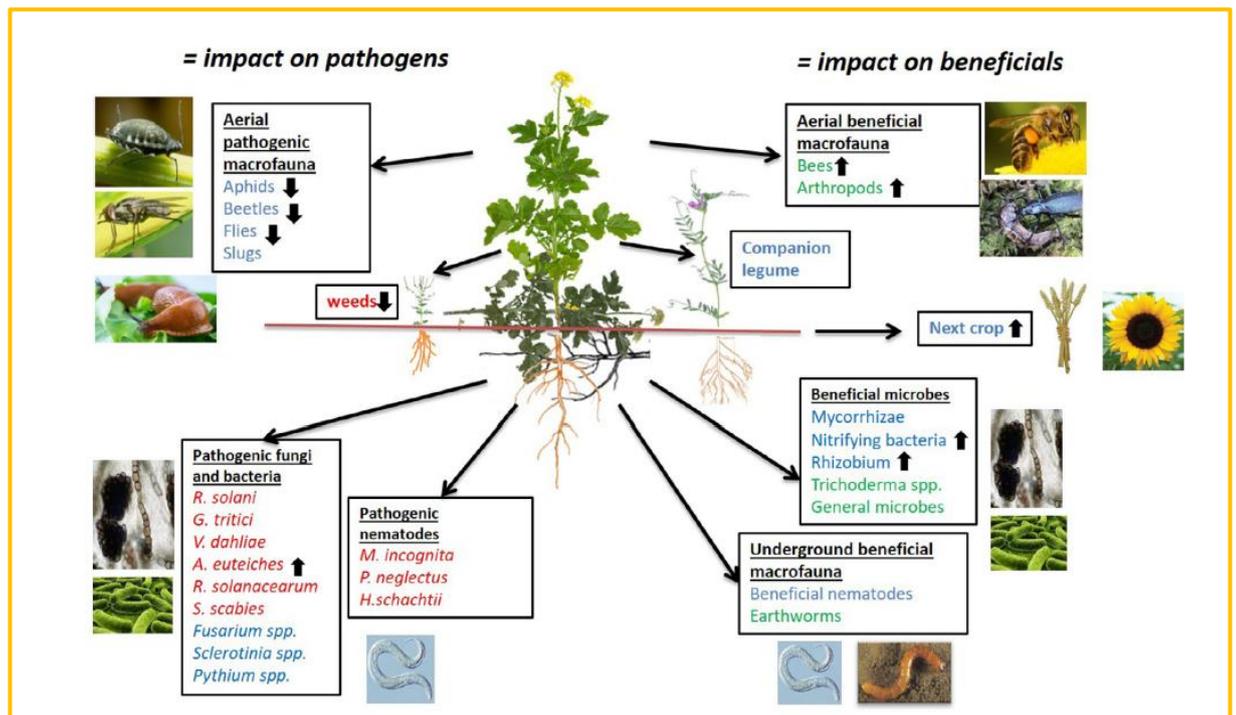


Figure 27 Schéma synthétique des effets des CIMS sur les pathogènes et les auxiliaires des cultures issues de la revue de littérature de Couëdel et al. (2019)

### 1.3.1.2. Services écosystémiques en lien avec la fourniture d'azote minéral au tournesol

Les CIMS peuvent piéger l'azote minéral du sol menant, à la destruction des CIMS, à des quantités significativement inférieures dans le sol, en comparaison avec des sols laissés nus pendant la période d'interculture (Tribouillois et al., 2016). Selon ces mêmes auteurs, ce service peut être fourni par des Fabacées et des non-Fabacées telles que les Brassicacées (avec l'exemple la navette fourragère). De plus, cette même étude démontre que les quantités d'azote piégées sont généralement supérieures dans le cas des non-Fabacées, en comparaison aux Fabacées. Ces résultats ont été confirmés par Couëdel et al., (2018), qui ont démontré que les

quantités d'azote minéral dans le sol étaient significativement inférieures après la destruction de Brassicacées ou de Fabacées en comparaison avec des sols nus. Les Fabacées avaient également permis un effet engrais vert significatif. La simulation des quantités d'azote disponibles dans le sol pour la culture de rente suivante, après destruction et minéralisation d'une CIMS, a montré qu'elles étaient généralement inférieures après des non-Fabacées en comparaisons à des sols nus et ces quantités étaient en revanche plus élevées suite à des Fabacées (Tribouillois et al., 2016), bien que ces tendances soient variables en fonction des sites de l'étude. Les auteurs rapportent par exemple pour Auzeville une quantité moyenne de 46 kg d'azote par ha simulées dans le cas des sols cultivés avec des non-Fabacées, 73 kg.ha<sup>-1</sup> pour les sols cultivés avec des Fabacées et 69 kg.ha<sup>-1</sup> pour les sols sans couverture pendant la période d'interculture. Cet effet est en lien avec la capacité des Fabacées à valoriser la voie symbiotique pour enrichir le système agricole en azote (Schneider and Huyghe, 2015)

En outre, il a aussi été démontré qu'un mélange entre Fabacées et non Fabacées pouvait permettre (i) une minéralisation des nitrates supérieure à celle des non Fabacées en culture monospécifiques, (ii) une lixiviation significativement inférieure que celle des sols laissés nus pendant la période d'interculture, et équivalente à celle observée dans le cas de non Fabacées monospécifiques (Tribouillois et al., 2016). En particulier, les mélanges composés de Brassicacées et de Fabacées permettent de fournir un effet CIPAN similaire à celui des Brassicacées monospécifiques en réduisant les quantités de nitrates dans les sols à la destruction du couvert (Couëdel et al., 2018c). Les auteurs ont également observé que ces mélanges mènent à des quantités de nitrates minéralisées supérieures à celles minéralisées après des Brassicacées en cultures monospécifiques, 6 mois après la destruction. Ces résultats peuvent s'expliquer par une meilleure acquisition d'azote et des ratios C/N plus faibles au sein des mélanges, grâce à des complémentarités, permettant une multifonctionnalité du couvert (Couëdel et al., 2018c). Il y a donc un intérêt à compléter ces résultats issus de simulations par des données recueillies au sein d'expérimentations en plein champ. Il est également nécessaire de combler les lacunes de connaissances sur les répercussions de ces enrichissements du sol en azote minéral sur le rendement en grain du tournesol, en fonction de la composition des espèces (Brassicacées monospécifiques, Fabacées monospécifiques ou mélanges des deux), la fertilisation azotée étant un ressource pouvant affecter les rendements du tournesol (Massignam et al., 2009).

### 1.3.1.3. Exemples de mécanismes en lien avec les CIMS et menant à la régulation de la Verticilliose et de l'Orobanche du tournesol

#### 1.3.1.3.1. Enrichissement du sol en azote

Tel que précisé ci-dessous, les CIMS permettent d'augmenter les quantités d'azote disponibles dans le sol (Couëdel et al., 2018c; Tribouillois et al., 2016) et donc potentiellement utilisables par le tournesol. Une régulation des bioagresseurs pourrait alors être observée grâce à une nutrition azotée optimale qui mènerait à un bon développement qui, généralement, conduit à une moindre réceptivité de la culture aux maladies (Huber et al., 2012). Concernant le cas de la Verticilliose, les effets de l'azote sur le champignon ne font pas consensus (Wheeler et al., 2012). Par exemple, une augmentation de la disponibilité de l'azote a permis de réduire les symptômes de la Verticilliose de la pomme de terre observé sur le cultivar Russet Burbank, mais n'a pas eu d'effet sur le cultivar Norgold Russet (Davis and Everson, 1986). Néanmoins, des corrélations négatives de l'ordre de -99% ont déjà été observées entre les densités d'inoculum de *V. dahliae* et les concentrations en nitrates dans le sol (Cocozza et al., 2021). Ces auteurs suggèrent un effet toxique de l'ammoniaque ou de l'acide nitrique sur les membranes des microscolérotes, cette toxicité ayant déjà été observée par Tenuta and Lazarovits (2002). Enfin, l'incorporation de CIMS telles qu'une espèce de Fabacée, de Brassicacée ou de graminée pourrait affecter différentes propriétés du sol et également induire des modifications de l'activité et de la biomasse microbienne, qui y sont associées (Ochiai et al., 2008). Les effets directs et indirects des quantités de nitrates qui peuvent être apportées suite à une incorporation de CIMS, et en particulier de Fabacée, sont donc encore à mieux caractériser et comprendre.

#### 1.3.1.3.2. Diversification des rotations

En outre, lorsque le choix des espèces de CIMS à semer est réalisé en fonction de la culture précédente et de la culture suivante (voire même de l'ensemble des cultures de la rotation), les CIMS permettent une **diversification des rotations** (Justes and Richard, 2017), et peuvent briser les cycles de bioagresseurs, dont la survie est limitée dans le temps sans plante hôte (Couëdel et al., 2019). Ainsi, dans le cadre d'une rotation tournesol – blé, l'inclusion d'une Brassicacée et/ou d'une Fabacée pendant la période d'interculture permet de diversifier les familles botaniques cultivées, et contribue à briser les cycles de bioagresseurs des graminées et des Astéracées. Néanmoins, la durée de conservation de *V. dahliae* et

*O. cumana* étant de l'ordre d'une dizaine d'années (Wilhelm, 1955 ; Jestin et Martin-Monjaret, 2016), une diversification de la rotation à elle seule n'est pas suffisante pour lutter contre ces deux bioagresseurs telluriques et nécessite la mise en place d'une stratégie de lutte intégrée.

#### *1.3.1.3.2.1. Allélopathie et biofumigation*

Les Brassicacées sont également particulièrement intéressantes pour la régulation de bioagresseurs, du fait de leur capacité à produire des **composés allélopathiques** tels que les molécules issues de la dégradation des glucosinolates (GSLs) (Angus et al., 1994a; Brown and Morra, 1997). L'allélopathie est définie par Rice (1984) comme étant tout effet direct ou indirect, positif ou négatif d'une plante ou d'un microorganisme sur un autre organisme à travers la production de composés chimiques libérés dans l'environnement. Le processus de l'allélopathie est à distinguer de celui de la biofumigation, qui a été utilisé pour la première fois par Kirkegaard et al. (1993), pour désigner l'effet toxique de Brassicacées sur les bioagresseurs du sol à la suite de la libération de molécules issus de la dégradation des GSLs. La mise en œuvre technique de la biofumigation repose sur l'implantation d'une culture ayant des propriétés assainissantes (capable de libérer des molécules toxiques vis-à-vis des bioagresseurs ciblés), son développement, son broyage et son enfouissement, afin que ces molécules puissent entrer en contact avec les bioagresseurs telluriques (Matthiessen and Kirkegaard, 2006).

**L'intérêt d'utiliser des Brassicacées et la biofumigation pour lutter contre les champignons telluriques du tournesol ayant fait l'objet d'une revue de littérature publiée dans la revue OCL (Ait-Kaci Ahmed, N., Dechamp-Guillaume, G., & Seassau, C. (2020). Biofumigation to protect oilseed crops: focus on management of soilborne fungi of sunflower. *OCL*, 27, 59., Annexe II), une grande partie de la section suivante est extraite de cette revue de littérature et traduite en français pour simplifier la lecture. Cet article a été rédigé suite à une demande de la revue, dans le cadre d'une revue spéciale sur les Systèmes innovants de culture.**

#### *1.3.1.3.2.2. Développement du concept de la biofumigation*

Le contrôle de bioagresseurs telluriques est particulièrement complexe à cause de leur petite taille et leur distribution hétérogène rendant le suivi de leur populations difficile et coûteuse (Matthiessen and Kirkegaard, 2006). Afin de réduire la pression des bioagresseurs telluriques, les agriculteurs ont eu recours à des fumigants tels

que le bromure de méthyle (Martin, 2003), en particulier pour la protection des cultures maraîchères ou des cultures ornementales. Néanmoins, ce produit phytosanitaire a été supprimé en 2005, dans le cadre du protocole de Montréal, à cause de ses effets néfastes sur la couche d'ozone (Gimsing and Kirkegaard, 2009). D'autres produits phytosanitaires ont aussi été utilisés comme substituts, avec notamment le métham sodium, qui génère des isothiocyanates de méthyle (Di Primo et al., 2003). Les fumigants présentent néanmoins de nombreuses limites économiques et écologiques déjà évoquées ci-dessus (§ 1.2.3.3), avec notamment des effets négatifs sur les fonctions écologiques du sol, un transfert vers l'atmosphère, et une perte en efficacité à cause du développement de résistances de la part des bioagresseurs visés.

Sachant que les ITCs (produits générés par le métham sodium) sont présents naturellement dans certains végétaux, l'utilisation d'ITCs issus d'une source naturelle a suscité un fort intérêt et a contribué à la réflexion autour d'une alternative biologique à la fumigation, nommé « biofumigation » (Kirkegaard et al., 1993). Les ITCs sont issus de la dégradation de GSLs, qui sont des molécules soufrées naturellement présentes chez les familles botaniques des Tovariaceae, Resedaceae, Cappareaeae, Moringaceae et en particulier chez les Brassicaceae (Fenwick et al., 1983; Brown and Morra, 1997).

#### *1.3.1.3.2.3. Le complexe glucosinolates – myrosinase*

Les GSLs sont une classe de métabolites secondaires caractérisés par une structure commune composée d'un sulfate et d'une chaîne latérale R (Brown and Morra, 1997; Fahey, 2006) qui détermine le profil du GSL, qui peuvent être aliphatique, aromatique ou indole (Fenwick et al., 1983; Brown and Morra, 1997). A ce jour, environ 132 GSLs ont été identifiés (Couëdel et al., 2019). Telles qu'elles, ces molécules ont peu ou pas d'activité biocide (Manici et al., 1997), mais toutes les espèces contenant des GSLs dans leurs cellules, contiennent également une enzyme, la myrosinase, qui catalyse la réaction d'hydrolyse des GSLs en isothiocyanates ou autres composés toxiques tels que les nitriles ou les thiocyanates (Brown and Morra, 1997). Lorsque les tissus de la plante sont intacts, la myrosinase et les GSLs sont séparés, la myrosinase étant dans des « myrosin-cells » (Figure 28), et c'est pendant la destruction des tissus que les deux composés entrent en contact et que les GSLs sont hydrolysés en composés toxiques (Winde and Wittstock, 2011) (Figure 29).

L'action biocide des produits de dégradation des GSLs dépend de la chaîne latérale de ces derniers, de leur concentration, des conditions environnementales lors de la destruction et du temps d'exposition au bioagresseur visé (Fenwick et al., 1983; Lazzeri et al., 1993; Laegdsmand et al., 2007; Gimsing and Kirkegaard, 2009). Les ITCs sont très volatiles, en particulier les ITCs aliphatiques car leur chaîne latérale est plus courte et a un faible poids moléculaire (Sarwar et al., 1998). Ainsi, il semblerait que leur concentration en GSLs et ITCs soient maximales durant les 30 minutes après l'incorporation de Brassicacées broyées, et ces derniers pouvaient être détectés jusqu'à 12 jours après incorporation (Gimsing and Kirkegaard, 2006).

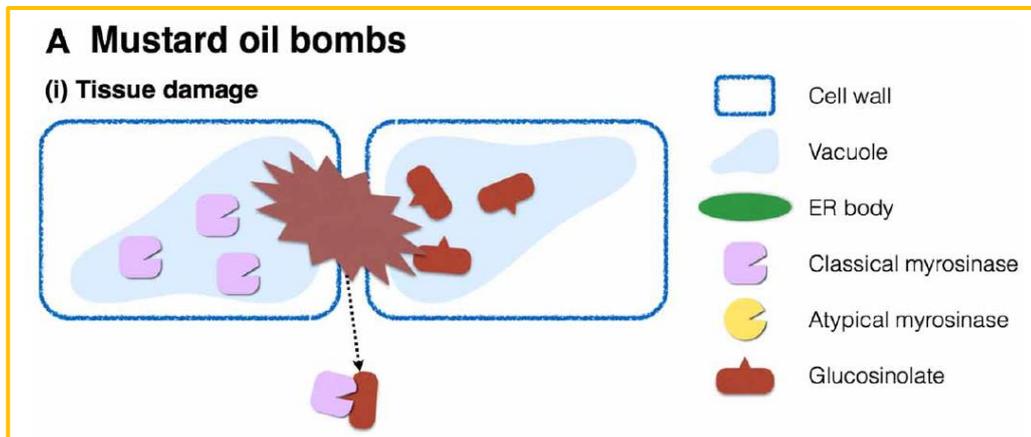


Figure 28 Schéma synthétique représentant le système myrosinase – glucosinolates  
(D'après (Nakano et al., 2014))

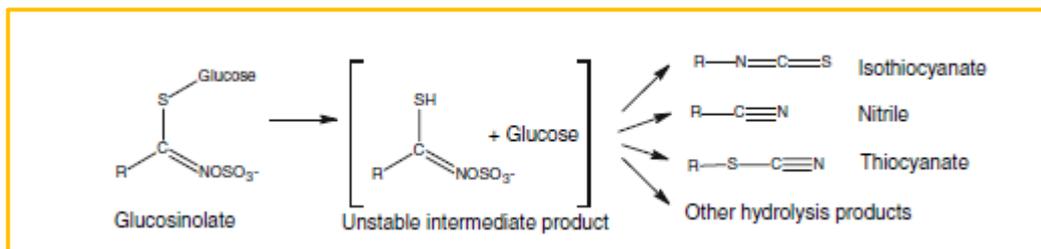


Figure 29 Exemples de molécules issues de la dégradation des glucosinolates  
(Gimsing and Kirkegaard, 2009)

Ainsi, la mise en œuvre du processus de biofumigation entant que méthode de lutte repose sur la mise en place d'une Brassicacée, son développement, son broyage pour lyser les cellules et permettre l'entrée en contact des GSLs avec la myrosinase,

et l'enfouissement rapide des résidus dans le sol afin d'augmenter la persistance des ITCs.

#### *1.3.1.3.2.4. Optimiser l'efficacité de la biofumigation pour la protection du tournesol*

Avec plus de 350 genres (Beilstein et al., 2006; Abideen et al., 2013) et 3200 espèces (Abideen et al., 2013), la famille botanique des Brassicacées offre aux agriculteurs une diversité élevée pour choisir les espèces ou variétés les plus prometteuses pour une biofumigation efficace, en fonction des biomasses produites et des concentrations et profils des GSLs présents dans les tissus (Sarwar et al., 1998). En plus du choix de l'espèce, il est important d'agir sur le taux de conversion des GSLs en ITCs et du temps de persistance des composés biocides dans le sol.

##### *1.3.1.3.2.4.1. Choix de l'espèce biofumigante pour optimiser l'efficacité de la biofumigation*

Selon la méta-analyse de Morris et al. (2020), les espèces des genres *Raphanus* et *Eruca* présentent un intérêt comme culture biofumigante. Néanmoins, de nombreuses études s'intéressent plutôt à des variétés de moutarde et de colza (Sarwar et al., 1998; Kirkegaard et al., 2004; Reau et al., 2005; Clarkson et al., 2015). La moutarde brune (*Brassica juncea* L.) a des concentrations élevées en sinigrine, un glucosinolate aliphatique (2-propenyl-glucosinolate), qui s'hydrolyse en 2-propenyl-ITCs très volatile et très toxique à l'encontre de nombreux bioagresseurs (Motisi, 2009). Un autre GSL d'intérêt est le 2-phenyl-ethyl, très présent chez la variété de colza *Brassica napus* ssp. *olifera* var. *annua* dont les propriétés inhibitrices ont été démontrées au laboratoire contre plusieurs micro-organismes du sol par Smith and Kirkegaard (2002).

##### *1.3.1.3.2.4.2. Améliorer les concentrations des GSLs pour optimiser l'efficacité de la biofumigation*

Les concentrations en GSLs (tous profils confondus) ont un effet positif sur l'efficacité de la biofumigation (Morris et al., 2020). Il a été démontré que leurs natures variaient considérablement d'une espèce à une autre tandis qu'elles étaient équivalentes au sein d'une même espèce (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Concernant les concentrations, les mêmes auteurs rapportent qu'elles sont variables entre espèces et au sein de la même espèce. En outre, les GSLs sont variables entre parties aériennes et parties racinaires d'un même individu (Kirkegaard and Sarwar, 1998; van Dam et al., 2009). En effet, les racines ont

généralement des concentrations totales en GSLs supérieures à celles des parties aériennes (van Dam et al., 2009; Bhandari et al., 2015) et ceci pourrait s'expliquer par une diversité et une abondance plus élevée des bioagresseurs telluriques auxquels sont confrontées les racines des Brassicacées (van Dam et al., 2009). Ceci est en accord avec le fait qu'initialement, les GSLs sont des répulsifs naturels s'insérant dans un mécanisme naturel de défense de la plante contre des attaques de bioagresseurs (Chhajed et al., 2020). En effet, les GSLs augmentent à la suite de dégâts d'herbivores ou d'infections par des pathogènes (van Dam et al., 2009). Néanmoins, il est important que les dégâts de ces derniers ne réduisent pas trop fortement les biomasses, car le potentiel biofumigant d'une culture dépend de la biomasse produite multipliée par les concentrations en GSLs, tout en prenant en compte la toxicité des molécules biocides produites à l'égard des bioagresseurs ciblés (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Des quantités élevées de biomasses sont donc nécessaires pour la biofumigation (Clarkson et al., 2015). Morris et al. (2020) ont par ailleurs estimé qu'une biomasse inférieure à 0,53 tonne de matière sèche par hectare mènerait probablement à une biofumigation inefficace. L'agriculteur doit donc raisonner les densités et dates de semis afin d'assurer une bonne implantation du couvert et une production de biomasse élevée (Clarkson et al., 2015). Il a également été rapporté que des apports en azote ou en soufre pouvaient modifier ces concentrations, avec notamment une augmentation des GSLs en fonction de l'augmentation des apports en soufre (Booth et al., 1991; Li et al., 2007), mais dans un contexte de transition agroécologique, ces apports en fertilisants chimiques se doivent d'être raisonnés.

Le stade phénologique de la Brassicacée lors de la destruction du couvert est également à prendre en considération afin d'optimiser l'efficacité de la biofumigation. En effet, bien que les profils et leurs proportions relatives restent stables selon les différents stades de développement, les concentrations totales de GSLs diminuent généralement entre le stade bourgeon (« buds-raised ») et la floraison, et les concentrations les plus faibles sont atteintes à la maturité des Brassicacées (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Selon Booth et al. (1991), ce déclin des concentrations, qu'ils ont observés en particulier à partir de la production des fleurs et des graines, est due à une redistribution des GSLs vers les graines à l'approche de la maturité. Bien que les graines tendent à avoir des concentrations plus élevées en GSLs, des tourteaux de graines représentent un volume beaucoup plus faible à

incorporer au sol, en comparaison aux tissus végétatifs (Morris et al., 2020). Ainsi, il est recommandé de broyer et d'incorporer les Brassicacées au plus tard en pleine floraison (Michel, 2008) .

#### [1.3.1.3.2.4.3. Maximiser la conversion des glucosinolates en isothiocyanates pour optimiser l'efficacité de la biofumigation](#)

Sachant que les GSLs ont une activité biocide faible et que la toxicité est plutôt attribuée aux produits de leur dégradation (Brown and Morra, 1997; Manici et al., 1997), il est nécessaire de maximiser la réaction d'hydrolyse permettant leur conversion en ITCs et autres molécules biocides afin d'augmenter leurs concentrations dans le sol (Brown and Morra, 1997; Gimsing and Kirkegaard, 2009). En effet, l'efficacité de cette conversion est très variable et a été estimée en plein champ entre 26% à 56%, trente minutes après l'incorporation des tissus broyés de moutarde et de colza, respectivement (Gimsing and Kirkegaard, 2006). Au laboratoire, elle peut varier entre 62,5% et 100% (Neubauer et al., 2015). Cette conversion dépend essentiellement de la méthode de broyage et d'enfouissement des Brassicacées et des conditions météorologiques. En effet, les pratiques recommandées pour augmenter la libération d'ITCs sont : un broyage fin des tissus afin de maximiser le contact entre myrosinase et GSLs, et une incorporation rapide dans un sol humide voire même l'application de quantités d'eau additionnelles pour favoriser la macération et l'hydrolyse (Morra and Kirkegaard, 2002; Kirkegaard and Matthiessen, 2004; Matthiessen et al., 2004; Matthiessen and Kirkegaard, 2006). En effet, Matthiessen et al. (2004) ont mesuré en plein champ des concentrations 7 à 10 fois supérieures après l'ajout de 42 mm d'eau immédiatement après l'incorporation de Brassicacées. Cette pratique d'irrigation abondante est recommandée (Michel, 2008). Néanmoins, une irrigation avec 18 mm d'eau durant les 3h suivant l'incorporation de Brassicacées n'a pas eu d'effets sur les concentrations de GSLs ou d'ITCs selon Gimsing and Kirkegaard (2006), qui rapportent que cette irrigation n'a pas permis d'atteindre une saturation du sol en eau. Des travaux supplémentaires sont donc nécessaires pour évaluer les quantités d'eau à appliquer et les méthodes à utiliser pour optimiser les effets de cette pratique (Matthiessen and Kirkegaard, 2006). L'acceptabilité d'une irrigation après broyage et enfouissement est également à étudier auprès des agriculteurs. La production d'ITCs est favorisée par des températures douces (Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Michel, 2008). Matthiessen and Shackleton (2005) ont ainsi

observé que l'activité de ces molécules était particulièrement réduite à 5°C, en particulier pour le 2-phenyl-ethyl-ITC. Ainsi, il est généralement recommandé de détruire et d'incorporer le couvert dans un sol bien réchauffés (températures > à 10°C) (Michel, 2008). Enfin, le pH du sol semble également influencer la conversion de GSLs en ITCs, dont la production est favorisée en pH neutre, tandis que des pH acides sont favorables à la production de nitriles (Brown and Morra, 1997; Matthiessen and Kirkegaard, 2006).

#### [I.3.1.3.2.4.4. Maximiser la persistance des molécules biocides dans le sol](#)

Les ITCs peuvent persister dans le sol de quelques jours à quelques semaines (Brown and Morra, 1997). En effet, les concentrations en GSL et ITC sont maximales 30 minutes après l'incorporation de Brassicacées broyées et ces composés peuvent être détectés jusqu'à 8 à 12 jours respectivement selon Gimsing and Kirkegaard (2006). Maximiser la persistance des ITCs dans le sol est crucial pour augmenter la durée de contact entre ces molécules et les bioagresseurs visés (Brown and Morra, 1997). Gimsing and Kirkegaard (2009) ont synthétisé les différents processus par lesquels ces molécules sont perdues. Comme le montre la Figure 30, les ITCs peuvent être lixiviés, dégradés par des microorganismes, adsorbés à la matière organique, réagir avec des groupes nucléophiles, et être volatilisés. Ces différents processus sont influencés par le type de sol, l'eau contenue dans le sol et les températures de ce dernier.

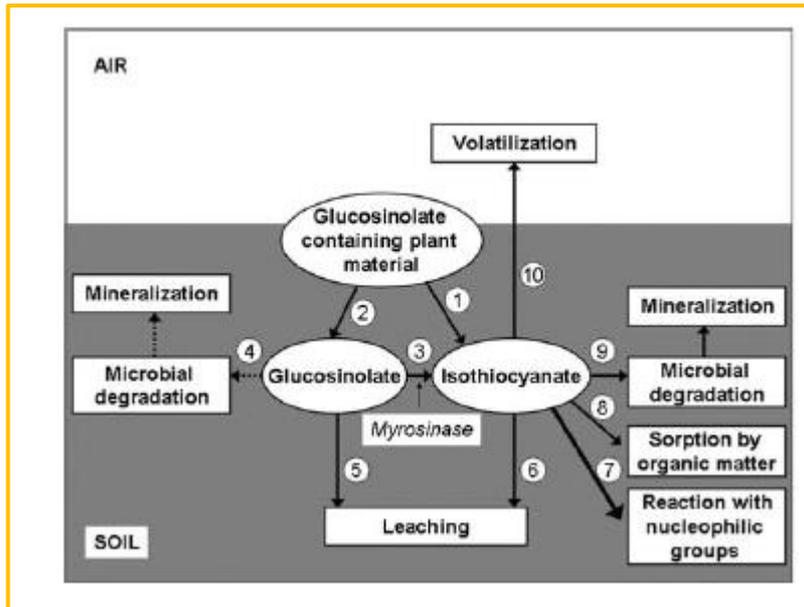


Figure 30 Schéma représentant les différentes voies de pertes de glucosinolates et d'isothiocyanates dans le sol et l'atmosphère (Gimsing and Kirkegaard, 2006)

Selon Brown and Morra (1997), la volatilisation est un processus majeur de perte d'ITCs, et cette volatilité dépend de leur chaîne latérale (plus celle-ci est longue, moins l'ITC sera volatil). Afin de réduire ces pertes, une solarisation peut être mise en place (Morris et al., 2020), mais contrairement aux suppositions des auteurs, seules les études sans solarisation ont permis d'aboutir à une biofumigation efficace. Cette méthode n'est de toute façon pas applicable en grande culture et présente de nombreuses limites écologiques évoquées préalablement. Ainsi, il est fortement recommandé d'enfouir les Brassicacées immédiatement après leur broyage (Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Michel, 2008). Une augmentation de la teneur en matière organique a déjà été associée à une réduction de la toxicité des ITCs, en particulier lorsque la teneur en carbone organique est supérieure à 1% (Neubauer et al., 2014). Ces observations seraient dues à une sorption des ITCs à la matière organique (Gimsing and Kirkegaard, 2009; Neubauer et al., 2014). Une lixiviation des ITCs a été démontrée par Laegdsmand et al. (2007) à la suite de simulations de précipitations de 70 à 90 mm et les ITCs pouvaient descendre jusqu'à 1 m de profondeur. Enfin, des études comparant la dégradation des ITCs dans des sols stérilisés et non stérilisés ont permis d'observer que les concentrations en ITCs diminuaient plus rapidement dans les sols non stériles en comparaison aux sols stérilisés, suggérant que la dégradation microbienne est également un mécanisme de perte des ITCs (Rumberger and Marschner, 2003a). En outre, il semblerait que des sols ayant précédemment été exposés à des ITCs, par exemple parce qu'ils ont

régulièrement été traités avec du métham sodium, pourraient développer une biodégradation accrue des molécules issues de la biofumigation (Enhanced biodegradation) (Warton et al., 2003).

#### [I.3.1.3.2.4.5. Espèces de bioagresseurs ciblées par la biofumigation](#)

Un dernier facteur de variabilité de l'efficacité de la biofumigation est l'espèce visée. En effet, la sensibilité des bioagresseurs à un même profil d'ITC, utilisé à des gammes de concentration similaires, dépend du bioagresseur (Smith and Kirkegaard, 2002).

##### [I.3.1.3.2.4.5.1. Sensibilité du \*Verticillium dahliae\* aux Brassicacées et à la biofumigation](#)

La littérature existant sur les deux bioagresseurs visés par la thèse permet de supposer que la biofumigation peut être une méthode de lutte efficace contre la Verticilliose du tournesol en plein champ, étant donné qu'un certain nombre de références rapportent des réductions significatives du développement de *V. dahliae* exposés à des broyats de Brassicacées, en conditions contrôlées, telle qu'il a été démontré dans la revue de littérature de Ait-Kaci Ahmed et al. (2020) (Tableau 1 de l'annexe II). Par exemple, Olivier et al. (1999) ont démontré que les broyats de différents génotypes de moutarde noire et de moutarde brune permettaient d'inhiber le développement du mycélium de *V. dahliae*, lors de l'exposition du champignon à 25 g de broyats de ces Brassicacées. Des effets inhibiteurs de *B. juncea* ont été confirmés plus récemment par Neubauer et al. (2014) qui ont démontré qu'une exposition des microscélérotés viables de *V. dahliae* permettait une réduction de 69,3 à 81,3% en comparaison au témoin (phacélie). Néanmoins, ces résultats deviennent plus variables en plein champ, en partie à cause des facteurs cités précédemment. Par exemple, Hartz et al. (2005) n'ont observés aucun effet de CIMS composées de moutarde brune sur les populations de *V. dahliae*, ni sur les symptômes de Verticilliose de tomate, tandis que des rotations incluant du brocoli ont mené à des réductions de la densité des microscélérotés atteignant 83%, en comparaison à la densité initiale de l'inoculum (Subbarao et al., 2007). Les sévérités observées sur les fraises étaient identiques à celles mesurées sur les fraises cultivées après un traitement par fumigation à la dernière notation de sévérité, selon les mêmes auteurs. Enfin, des études rapportent que le nombre de microscélérotés de *V. dahliae* dans le sol n'a pas diminué après l'incorporation de « foin de moutarde » (mustard hay) à court terme, mais qu'une réduction de 80%

a été observée sur le long terme (Michel, 2014). Selon les mêmes auteurs, l'action et la persistance des ITCs étant très courte dans le temps, ces résultats suggèrent qu'ils ne seraient pas impliqués dans ce contrôle, et qu'il s'agirait peut-être de la stimulation de communautés microbiennes spécifiques. Ces hypothèses sont confirmées par des travaux tels que ceux de Davis et al. (2010), qui rapportent des corrélations négatives entre l'incidence de *V. dahliae* sur pomme de terre, et des indices d'activité microbiennes, ou avec les populations de *Fusarium equiseti* sur les racines de pomme de terre. **Ces résultats sur le rôle potentiel de micro-organismes antagonistes soulèvent l'importance de l'évaluation d'éventuels dis-services des CIMS et de la biofumigation sur des communautés microbiennes bénéfiques du sol, qui seront abordés dans la section suivante ( § 3.2.).**

#### I.3.1.3.2.4.5.2. Sensibilité de *Orobanche cumana* aux Brassicacées et à la biofumigation

Concernant l'Orobanche du tournesol, très peu d'études traitent du sujet, et à l'heure de la rédaction de ce manuscrit. Les résultats connus (qui ne sont pas dans la revue de littérature de Ait Kaci Ahmed et al. (2020)) sont les suivants : l'exposition de graines d'Orobanche à de la moutarde blanche permettait des réductions moyennes de 45% à 49% de la germination (Pedraza et al., 2015). Ces inhibitions prometteuses induites par la moutarde blanche ont été confirmées, plus récemment, dans le cadre d'un essai, également réalisé en conditions contrôlées, lors duquel des broyats de différentes espèces de Brassicacées ont été incorporés dans du substrat inoculé avec des graines de *O. cumana* (Strelnikov et al., 2020). Quinze jours après exposition, les substrats inoculés ont été semés avec des graines de tournesol. Les résultats de l'étude démontrent des réductions d'infestation par l'orobanche (quantité de tubercules et d'émergences par tournesol) allant de -24,2% à -44,7%, grâce à l'incorporation de colza (var. Tavrion) et de moutarde blanche (var. Ruslana), respectivement. Des réductions intermédiaires sont obtenues à la suite de l'incorporation de moutarde noire (var. Niagara, -27%) et de moutarde brune (var. Yunona, -25,9%). Pedraza (2015) a également mené des essais en plein champ pour évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur le nombre d'orobanches fixées par plants de tournesol et concluent à de légères réductions (de l'ordre de 1 ou 2 attachements en moins) grâce à la moutarde blanche et à la vesce de Narbonne, significatives aux premières dates de notation (63 jours après semis), en comparaison aux témoins sans CIMS.

Des lacunes de connaissances sont donc encore à combler concernant les effets des CIMS et de la biofumigation sur *O. cumana*. En effet, il y a tout d'abord un intérêt à valider ces premiers résultats avec des espèces et variétés communément utilisées en France et à tenter de déterminer quelles molécules seraient responsables des régulations observées (en comparant des espèces et variétés aux profils en GSLs contrastées). Une fois ces effets validés, il y aurait un intérêt à implémenter ces essais sous serre et en plein champ afin de les valider avant un transfert vers la profession agricole.

### I. 3.2. Dis-services écosystémiques produits par les CIMS

D'un point de vue général, les CIMS peuvent mener à des dis-services en lien avec des facteurs abiotiques tels qu'une préemption d'azote, en fonction de l'intensité de la lixiviation, des quantités d'azote absorbées, ou encore lors d'une destruction tardive du couvert, empêchant une minéralisation satisfaisante du couvert lors de la mise en place de la culture suivante. De plus, les effets allélopathiques des CIMS ayant un impact sur les adventices, il serait possible qu'elles impactent négativement la germination de la culture du tournesol. Néanmoins, ces deux dis-services potentiels devraient être minimales à cause de la durée entre destruction des CIMS et semis du tournesol qui est d'environ 3 mois dans le cadre de la thèse. Ils ne seront donc pas abordés en détails et ne sont pas ciblés par cette thèse.

Ce travail se concentre plutôt sur l'impact des CIMS sur des organismes bénéfiques, qui est moins documenté que celui sur les pathogènes (Couëdel et al., 2019). sont donc pas visés par la thèse.

Ce travail se concentre plutôt sur l'impact des CIMS sur des organismes bénéfiques, qui est moins documenté que celui sur les pathogènes (Couëdel et al., 2019). Néanmoins, il a été observé que le phenyl-ethyl-ITC influençait les structures de communautés bactériennes et eucaryotes (Rumberger and Marschner, 2003; Omirou et al., 2011). Dans le cadre de la succession culturale CIMS – Tournesol, des communautés d'intérêt seraient les bactéries symbiotiques des Fabacées et les CMA.

#### I.3.2.1. Dis-services écosystémiques potentiels vis-à-vis des bactéries impliquées dans le cycle de l'azote

Les Fabacées sont considérées comme étant une porte d'entrée d'azote dans le système de production, car elles sont connues pour leur capacité à exploiter l'azote

atmosphérique (N<sub>2</sub>), en plus de l'utilisation de l'azote présent dans le sol (Schneider and Huyghe, 2015). Cette fixation est réalisée grâce à une symbiose avec des bactéries des genres *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* (Hirsch et al., 2001). Les CIMS pouvant être cultivées en mélanges Brassicacées x Fabacées, il est nécessaire d'évaluer si ces communautés sont impactées par les ITCs produits par les Brassicacées au cours de leur développement. En outre, l'azote présent dans le sol suit un cycle durant lequel des bactéries nitrifiantes peuvent intervenir. Selon une étude menée en laboratoire, l'application d'ITCs aliphatiques ou aromatiques réduiraient les populations de bactéries oxydatives d'ammonium et de nitrates, menant à une réduction de la nitrification, en fonction des types de sols (Bending and Lincoln, 2000). Au contraire, des analyses moléculaires n'ont pas révélé d'effets de la moutarde blanche et de la moutarde brune sur les bactéries fixatrices d'azote et les bactéries oxydatives d'ammoniaque (Hossain et al., 2015). Les auteurs rapportent une réduction de la formation de nodules chez les Fabacées cultivées après ces Brassicacées, en particulier les moutardes blanches, indiquant un impact sur l'activité des rhizobiums, que les auteurs lient à la production d'ITCs. Selon Couëdel et al. (2019) des mélanges de Brassicacées avec des Fabacées devraient théoriquement réduire les potentiels dis-services des Brassicacées (via la production d'ITCs) sur les communautés microbiennes du sol impliquées dans le cycle de l'azote, mais des expérimentations, notamment en plein champ, sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

#### 1.3.2.2. Dis-services écosystémiques potentiels vis-à-vis des champignons mycorhiziens à arbuscules

Les CMA colonisent les racines d'environ 80% de plantes, et leur fournissent de nombreux bénéfices tels qu'une augmentation de la capacité de la plante hôte à puiser de l'eau et des nutriments (Berruti et al., 2016), en particulier le phosphore (Hart and Forsythe, 2012). De plus, ces organismes auraient un rôle dans la protection des cultures contre certains pathogènes (Berruti et al., 2016). Concernant la culture du tournesol, Louarn et al. (2012) ont observé que les plants de tournesols mycorhizés par les espèces *Rhizophagus irregularis* et *Gigaspora rosea* étaient significativement moins réceptifs à l'Orobanche, bien que la réduction d'Orobanches fixées ne soit que de 20% environ. Ces auteurs soulignent que ces réductions du nombre de tubercules fixés aux racines de tournesol pouvaient être dues à une diminution de la production de stimulants de

germination mais également à des effets négatifs des exsudats racinaires sur la germination de *O. cumana*. Bien que ces résultats n'aient pas encore été confirmés en plein champ, il y a un intérêt à évaluer si les CIMS et la biofumigation pourraient causer d'éventuels dis-services aux CMA. Il est connu que la majorité des Brassicacées ne sont pas hôtes de CMA (Cosme et al., 2018), et l'une des hypothèses émises pour expliquer cette observation serait justement la présence de GSLs et de leurs produits de dégradation (Vierheilig et al., 2000). Ces mêmes auteurs rapportent en effet d'une part que le 2-PE-GSL est retrouvé dans la majorité des espèces non-hôtes de CMA, tandis qu'il est absent dans les espèces hôtes, ce qui pourrait suggérer que ce GSL indole inhiberait les CMA. Néanmoins, les observations réalisées sous serre ou en plein champ sont plus variables avec des études rapportant des effets négatifs des Brassicacées sur les CMA dans le sol (Njeru et al., 2015), ou sur les racines de soja (Valetti et al., 2016), ou alors l'absence d'effets négatifs de Brassicacées sur la colonisation de racines de maïs (Pellerin et al., 2007). Enfin, lors de la mise en place de couverts en mélanges, ces derniers n'ont globalement pas non plus d'effets sur les CMA, malgré la présence de Brassicacées (Wortman et al., 2012; Finney et al., 2017).

Face à l'absence de consensus concernant les effets des CIMS sur des communautés microbiennes, qui peut provenir de la diversité des approches et dispositifs mis en œuvre, ainsi que de la diversité des communautés étudiées, il y a un intérêt à évaluer précisément les effets des CIMS (seules ou en association, pour valider ou réfuter d'éventuelles hypothèses de compensation des effets négatifs des ITCs par les Fabacées) et de la biofumigation, en plein champ, sur des communautés ciblées.

**Au terme de cette revue de littérature existante sur les effets des CIMS et de la biofumigation dans le cadre de la protection du tournesol, il ressort que, bien que le potentiel des Brassicacées à réguler le champignon *Verticillium dahliae* soit bien caractérisé au laboratoire, l'efficacité de la biofumigation est plus variable en plein champ, et les régulations de la Verticilliose observées (sur d'autres cultures que le tournesol) ne sont pas toujours dues à l'effet direct des produits de la dégradation des GSLs, mais à un ensemble d'autres mécanismes. Il reste donc à l'évaluer en plein champ pour la protection de la culture du tournesol. Le potentiel des CIMS à réguler *O. cumana* est en revanche encore très peu exploré,,**

à l'exception des résultats cités ci-dessus, qui ne concernent qu'une gamme d'espèces limitée et ne permettent pas de savoir si les GSLs sont impliqués dans les régulations observées ou s'il s'agit d'autres mécanismes. De plus, les effets de cette pratique sont à ce jour bien documentés en cultures maraîchères mais elle n'est pas encore répandue en grande culture et son intérêt pour la protection du tournesol contre deux bioagresseurs en expansion (*V. dahliae* et *O. cumana*) est encore mal connue. En outre, les facteurs clefs d'une réussite de la biofumigation pour protéger le tournesol sont également peu documentés en plein champ sur ces bioagresseurs, et encore moins sur les communautés bénéfiques telles que le (brady)rhizobium et les CMA. Il est donc nécessaire de mettre en place des dispositifs expérimentaux permettant de répondre à ces lacunes. Les molécules potentiellement biocides tels que les ITCs étant connus pour être volatiles et pour s'adsorber rapidement au sol, il semble nécessaire de mettre en place en premier lieu des dispositifs minimisant les pertes d'ITCs pour tester leur efficacité, avant de pouvoir la confirmer en pots, sous serre, voire en plein champ où les facteurs de pertes des ITCs sont beaucoup plus nombreux et où leur efficacité peut donc être beaucoup plus variable, avec comme différents exemples de sources de pertes d'ITCs : La volatilisation, l'adsorption aux molécules présentes dans le sol, le lessivage, la dégradation par des communautés microbiennes, etc ...

## I.4. Objectifs et hypothèses traitées dans la thèse et approches globales employées

Sur la base des enjeux décrits précédemment, et des connaissances scientifiques actuelles, ce travail de thèse, a pour objectif principal d'évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur la protection du tournesol contre le *V. dahliae* et l'*O. cumana*, ainsi que leurs effets sur l'enrichissement du sol azote minéral avant le semis du tournesol, en vue d'améliorer la productivité de la culture. Ce travail vise également à évaluer si les CIMS ne produisent pas d'éventuels dis-services vis-à-vis des communautés microbiennes du sol, d'intérêt pour cette succession. Pour cela, les objectifs et hypothèses de cette thèse s'articulent toutes autour de la succession culturale « CIMS – Tournesol ». Le cadrage de la temporalité et des processus étudiés dans ce travail de thèse sont schématisés dans la figure 31. Sur la base de cette figure seront ensuite formalisés les objectifs, sous-objectifs et hypothèses de la thèse, s'appuyant sur des schémas plus simplifiés (figure 31a et figure 31b). Enfin, l'articulation des objectifs, des approches globalement employées et les principales informations sur les mesures réalisées, ainsi que les facteurs testés et leurs principales modalités seront décrites pour chacun des objectifs.

Le système étudié (Succession culturale « CIMS – Tournesol ») consiste donc en l'étude de CIMS (Brassicacées et/ou Fabacées) semées pendant une période d'interculture d'environ 5 à 6 mois détruites mécaniquement et enfouies afin de mettre en œuvre une biofumigation, et suivie par une culture de tournesol. Ce système, lorsqu'il a été étudié par des approches en plein champ, est soumis à des aléas pédo-climatiques et techniques, dont il est possible de s'affranchir grâce à des approches *in vitro* également mobilisées dans le cadre de la thèse. Cela permettant de comprendre avec plus de précision les mécanismes sous-jacents aux effets des Brassicacées ou Fabacées observés. En plus de ces composantes végétales, le système prend en compte des processus se déroulant dans le sol, tels que la minéralisation de l'azote. Les composantes du système et les processus ciblés par la thèse sont décrits ci-dessous (Figure 31) :

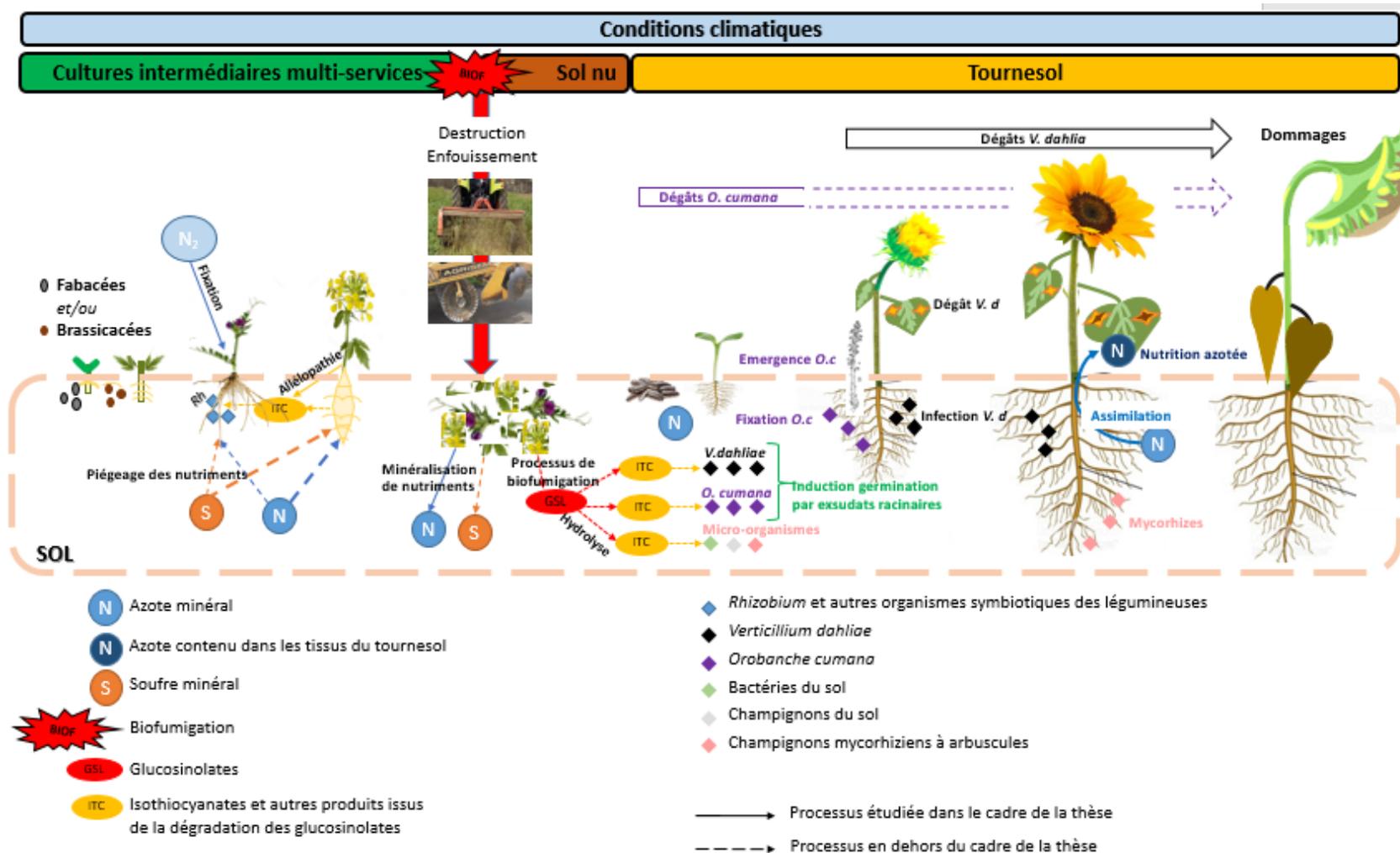


Figure 31 – Schéma conceptuel général cadrant le système étudié dans le cadre de la thèse (Succession culturale CIMS – Tournesol), les différents facteurs biotiques d'intérêt (CIMS, tournesol, Verticilliose du tournesol, *Orobanche cumana*, communautés microbiennes du sol) et les composantes du système pouvant être impactés par l'inclusion d'une CIMS dans le système en comparaison à un sol nu (quantités d'azote minéral dans le sol, sévérité des dégâts des bioagresseurs, nutrition azotée et rendements du tournesol). Les effets des CIMS sur ces composantes se font via des processus représentés par des flèches dans le schéma. Les CIMS implantées varient dans le système étudiée (Brassicacées : Moutarde brune, navette fourragère, radis fourrager et/ou Fabacée : Vesce du Bengale). Ce système, lorsqu'il est étudié en

Les CIMS sont semées à la fin de l'été ou en début d'automne sur une parcelle expérimentale naturellement infestée par le champignon tellurique *V. dahliae*. Les CIMS étudiées au sein du système sont d'une part des Brassicacées (pour la production de GSLs et la mise en œuvre d'une biofumigation), qui ont été choisies de manière à avoir des profils et des concentrations contrastées en GSLs. Il s'agit de la moutarde brune (var. Etamine), la navette fourragère (var. Chicon) et le radis fourrager (var. Anaconda). D'autre part, une Fabacée a également été choisie pour sa fonction engrais vert grâce à la capacité des Fabacées à fixer de l'azote atmosphérique et pour leur C/N faibles. La Vesce du Bengale présente l'avantage de bien se comporter en association avec les Brassicacées (complémentarité des systèmes racinaires). De plus, elle ne produit pas de GSLs et permet de distinguer entre effets en lien avec ces molécules. Ces espèces de CIMS ont tout d'abord été étudiées en composition monospécifique puis en mélanges. Les détails des modalités utilisées pour chacun des essais sont disponibles dans les Tableaux 2, 3 et 4, et l'itinéraire cultural complet est présenté dans de la section matériel et méthodes de l'article « **Ecosystem Services Provided by Cover Crops and Biofumigation in Sunflower Cultivation** » (Chapitre III, section 2.2.1).

Les cultures intermédiaires se développent sur une durée d'environ 5 mois durant laquelle les Fabacées peuvent fixer de l'azote grâce à leur symbiose avec des communautés microbiennes telles que les (*Brady*)*Rhizobium*. Elles peuvent également être hôtes et favoriser la multiplication de champignons mycorhiziens à arbuscules, contrairement aux Brassicacées. Ces dernières peuvent libérer tout le long de leur cycle de développement des quantités de GSLs, qui peuvent s'hydrolyser en molécules biocides telles que les ITCs, qui sont à la base du processus d'allélopathie. Ce processus d'allélopathie peut d'une part avoir un effet assainissant contre certains bioagresseurs telluriques, mais peut également affecter les communautés symbiotiques des Fabacées qui leur permettent de fixer l'azote atmosphériques.

Les cultures intermédiaires sont détruites aux alentours de la floraison des Brassicacées car les concentrations de GSLs sont les plus élevées à ce stade. La destruction des couverts se fait par un broyage mécanique avec un broyeur à fléaux et un enfouissement, à l'aide d'un cover crop, afin de mettre en œuvre le processus

de biofumigation. L'enfouissement se fait le plus rapidement possible après le broyage, pour réduire les pertes d'ITCs et autres molécules de dégradation des GSLs par volatilisation. Enfin, un passage au rouleau est réalisé après l'enfouissement, pour que le tassement de sol réduise aussi la volatilisation des ITCs, qu'il favorise le contact entre sol et résidus de cultures et favorise ainsi la dégradation des tissus. Le broyage et l'enfouissement permettent, en conditions favorables, de mettre en œuvre le processus de biofumigation pendant lequel sont libérées en plein champ, dans le sol, les molécules de dégradation des GSLs (telles que les ITCs) en quantités plus importantes que lors du processus d'allélopathie. C'est donc, à priori, à ce moment que les molécules biocides ont une action contre les bioagresseurs telluriques du tournesol, avec le cas ici des microsclérotés de *V. dahliae*. Ces microsclérotés ayant une dispersion limitée et ne pouvant se multiplier qu'en présence de plantes hôtes, il est peu probable que le champignon recolonise la parcelle entre la biofumigation et le semis du tournesol. Lors de la biofumigation, les communautés microbiennes bénéfiques à la succession CIMS – Tournesol, telles que les CMA, pourraient également être impactées.

Le deuxième processus qui entre en jeu après le broyage et l'enfouissement des CIMS est la minéralisation des tissus, qui, en fonction du C/N des espèces (entre autres), vont restituer l'azote qui a été prélevé et piégé par le couvert pendant son développement.

Une période d'interculture d'environ 3 mois entre la biofumigation et le semis du tournesol passe ensuite. Un travail du sol superficiel est réalisé avant le semis du tournesol et la culture est semée en Avril ou au plus tard en Mai. Un itinéraire technique proche de celui mis en place par les agriculteurs de la région est suivi. Le détail de toutes les interventions et du matériel utilisé est disponible au **Chapitre III, section 2.2.1.**

Durant son cycle de développement, le tournesol va mobiliser les quantités d'azotes restituées par les CIMS, suite à leur minéralisation. Il va aussi exprimer des dégâts de Verticilliose, en fonction de l'inoculum de microsclérotés présent dans le sol, et de la variété de tournesol cultivée. La nutrition azotée du tournesol et la sévérité des dégâts de la Verticilliose peuvent impacter le rendement en grains du tournesol, aux côtés d'autres facteurs non ciblés par la thèse (texture du sol, quantités de nutriments autres que l'azote, enherbement et dégâts d'autres

maladies que la Verticilliose du tournesol, etc ...). L'essai expérimental se termine par la récolte à la moissonneuse batteuse de l'essai.

Sur la base de ce système, les différents objectifs étudiés (déclinés en sous-objectifs), ainsi que les hypothèses de départ de la thèse sont formalisés et schématisés (Figure 31a et Figure 31b) de la manière suivante :

**Objectif 1 :** Par des approches au laboratoire simulant une biofumigation artificielle, le premier objectif est d'évaluer les effets de broyats de cultures de Brassicacées ou Fabacées, communément utilisées comme CIMS en plein champ, sur le développement du *V. dahliae* et de *O. cumana*. Ces essais préliminaires visent à identifier le potentiel de régulation des deux bioagresseurs grâce à des broyats de CIMS et de la biofumigation, avant une mise en application au champ.

Il est à noter que les hypothèses de régulation concernent les Brassicacées car le mécanisme sous-jacent serait une régulation de l'Orobanche ou du *V. dahliae* grâce aux molécules de dégradation des GSLs (ITCs par exemple). La Fabacée est considérée ici comme un témoin négatif ne produisant pas de GSLs lors des expérimentations menées au laboratoire.

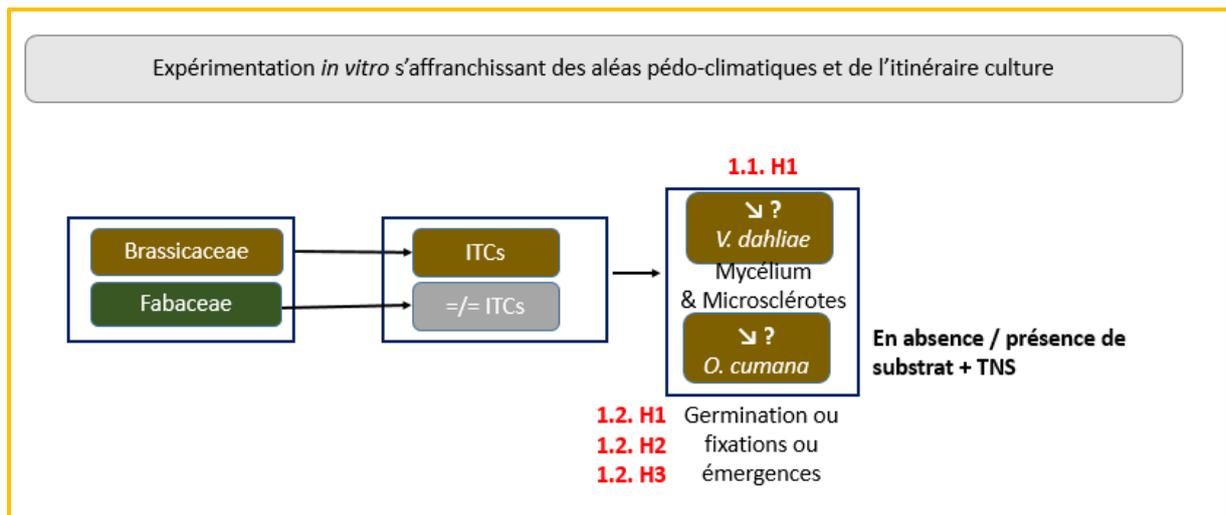


Figure 31a - Schéma conceptuel résumant les hypothèses de l'objectif 1 qui consiste en l'évaluation des effets de broyats de cultures de Brassicacées ou Fabacées, sur le développement du *V. dahliae* et de l'*O. cumana*. Toutes les expérimentations de ce premier objectif sont réalisées au laboratoire et ne dépendent donc pas d'aléas en lien avec le climat ou l'itinéraire technique. Les différents composants étudiés sont représentés dans des rectangles et les flèches entre les rectangles représentent les liens existants entre ces composants. Les différentes hypothèses en lien avec les effets de régulation des Brassicacées sur les deux bioagresseurs, via la production d'ITCs, sont représentées en rouge directement sur le schéma. Concernant *O. cumana*, différents dispositifs ont été mis en œuvre, d'abord sans inclure de tournesol et de substrat puis en incluant ces deux composants. Les abréviations ITCs, =/= ITCs et TNS correspondent respectivement à « Production d'isothiocyanates », « Absence de production d'isothiocyanates » et « Tournesol »

Cet objectif se subdivise en deux sous-objectifs :

1.1. Evaluer les effets des broyats de CIMS sur le développement du *V. dahliae*, avec comme hypothèse émise :

H1 : Les broyats de Brassicacées réduisent le développement du mycélium de *V. dahliae* et la formation de ses organes de conservation, les microsclérotés.

1.2. Evaluer les effets des broyats de Brassicacées ou de Fabacées sur différents stades du développement d'*O. cumana*, avec comme hypothèses émises :

H1 : Les broyats de Brassicacées réduisent la germination de *O. cumana* induites par stimulation chimique ou naturelle grâce aux exsudats racinaires du tournesol

H2 : Les broyats de Brassicacées réduisent la fixation de *O. cumana* aux racines de tournesol

H3 : Les broyats des Brassicacées réduisent les émergences de *O. cumana* une fois fixés aux racines de tournesol

**Objectif 2 :** Evaluer en plein champ les effets des CIMS et de la biofumigation sur les dégâts et dommages de la Verticilliose du tournesol. Les essais sont menés en parcelles expérimentales à Auzeville (31) ainsi qu'une parcelle chez un agriculteur à l'Isle Jourdain (32) étant naturellement infestées par la Verticilliose du tournesol.

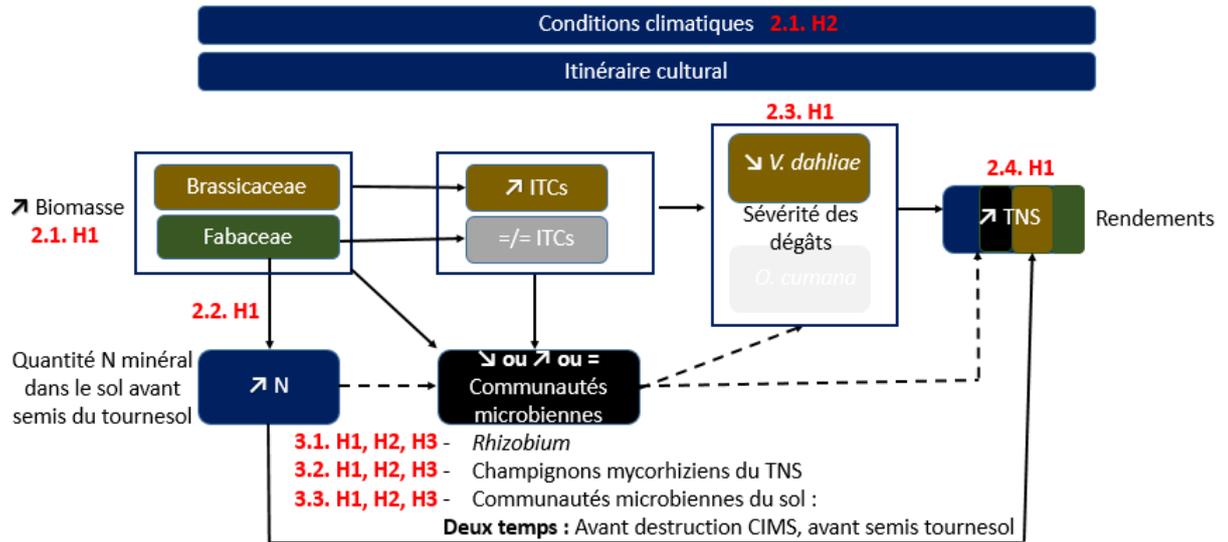


Figure 31b - Schéma conceptuel résumant les hypothèses sous-jacentes à l'évaluation des effets des CIMS et de la biofumigation sur les dégâts et dommages de cette maladie sur tournesol (objectif 2), et sur les communautés microbiennes du sol (objectif 3). Toutes les expérimentations de ces deux chapitres sont réalisées au champ et dépendent d'aléas pédo-climatiques et techniques. Les différentes composantes du système étudié sont représentées dans des rectangles et les flèches entre les rectangles représentent les liens existants entre ces composantes. Les différentes hypothèses en lien avec les effets de régulation des Brassicacées et de la Fabacées (monospécifiques ou en mélange) sur la Verticilliose du tournesol, via la production de molécules biocides, ainsi que sur l'azote minéral du sol, sur les communautés microbiennes et finalement sur les rendements en grains du tournesol sont représentées en rouge directement sur le schéma. Il peut exister des interactions entre azote minéral dans les sols, communautés microbiennes et sévérité de la Verticilliose, mais elles ne sont pas étudiées dans le cadre de la thèse (flèches en pointsillés). Les abréviations N, ITCs, =/- ITCs, CIMS et TNS correspondent, respectivement, à azote dans le sol avant semis du tournesol, production ou absence de production d'isothiocyanates, cultures intermédiaires multi-services et tournesol.

Cet objectif se subdivise en quatre sous-objectifs :

2.1. Caractériser les conditions optimales pour la réussite de la biofumigation qui dépendent de la biomasse produite par les CIMS, des concentrations en GSLs des tissus des CIMS et des conditions météorologiques lors de la destruction des couverts. Les hypothèses émises sont :

H1 : La régulation de la Verticilliose est fonction de la biomasse produite par les Brassicacées

H2 : Des température douce et une quantité en eau non limitante lors de la biofumigation permettent une régulation efficace de la Verticilliose du tournesol par les Brassicacées

2.2. Evaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur la disponibilité en azote minéral pour le tournesol :

H1 : Les Fabacées augmentent les quantités d'azote minéral disponibles dans le sol pour le tournesol en comparaison avec le sol nu

2.3. Evaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur les dégâts de la Verticilliose du tournesol en plein champ, avec comme hypothèse émise :

H1 : Les Brassicacées, grâce à la mise en œuvre de la biofumigation, réduisent les dégâts de la Verticilliose du tournesol en comparaison au sol nu

2.4. Les CIMS améliorent les rendements en grains du tournesol en comparaison à un sol nu grâce à la régulation biotique de la Verticilliose ou à l'enrichissement du sol en azote minéral, avec comme hypothèses émises :

H1 : Les Brassicacées ou les Fabacées permettent une amélioration des rendements en grains en comparaison des sols nus, et les mélanges des deux permettent une mutualisation des effets régulation et engrais verts, qui permettent également une amélioration des rendements en grains.

**Objectif 3 :** Si l'implantation de CIMS et la mise en œuvre de la biofumigation présentent des potentiels de régulation intéressants vis-à-vis des bioagresseurs, alors il est indispensable d'évaluer si cette pratique n'engendre pas d'éventuels dis-services sur les communautés bénéfiques du sol. Les questions de recherche et hypothèses émises sont les suivantes :

1. Une association entre Brassicacées et Fabacées a-t-elle un effet sur la capacité de la Fabacée à fixer symbiotiquement l'azote atmosphérique, en comparaison avec une Fabacée en culture monospécifique ?

L'association de la Fabacée avec la Brassicacée pourrait :

H1 : Réduire le taux de fixation symbiotique de la Fabacée à cause d'effets allélopathiques impactant le *Rhizobium* symbiotique de la Fabacée

H2 : Augmenter le taux de fixation symbiotique par la Fabacée à cause d'une compétition sur l'acquisition de l'azote disponibles dans le sol

H3 : Ne pas avoir d'effets sur le taux de fixation symbiotique par la Fabacée à cause d'une compensation entre les deux effets cités ci-dessus

**2. Quels effets des CIMS et de la biofumigation sur le taux de mycorhization des racines de tournesol?**

H1 : Les Brassicacées réduisent les taux de mycorhization des racines de tournesol en comparaison au sol nu car ce ne sont pas des cultures hôtes de CMA et parcequ'elles produisent des ITCs.

H2 : Les Fabacées favorisent les taux de mycorhization des racines de tournesol en comparaison au sol nu car ce sont des cultures hôtes de CMA et qu'elles ne semblent pas produire de molécules biocides vis-à-vis de ces communautés.

H3 : L'inclusion de Fabacées dans des mélanges avec des Brassicacées permet de réduire les effets négatifs des Brassicacées

**3.1 : Quels effets des CIMS sur les communautés à proximité des racines (environnement rhizosphérique) de CIMS (où les effets allélopathiques sont les plus importants) pendant le développement des couverts ?**

H1 : Les Brassicacées peuvent impacter la structure des communautés microbiennes par des effets allélopathiques en comparaison au sol nu ou à des non-Brassicacées.

H2 : Il peut y avoir une compensation des effets potentiellement négatifs des ITCs produits par les Brassicacées en cultures monospécifiques grâce à une diversification des molécules apportés par les mélanges de Brassicacées et de Fabacées.

**3.2 : Quels effets des résidus des CIMS sur les communautés microbiennes après leur enfouissement et leur décomposition ?**

H1 : Les Brassicacées peuvent impacter la structure des communautés microbiennes suite à la biofumigation en comparaison au sol nu.

H2 : Fabacées peuvent impacter la structure par un effet engrais vert en comparaison au sol nu.

H3 : Il peut y avoir une compensation des effets grâce aux mélanges.

Afin de répondre à ces questions, plusieurs approches ont été combinées, avec

a). Une évaluation indirecte de l'effet de l'association entre Brassicacées et Fabacées sur les communautés symbiotiques du sol par des mesures du pourcentage d'azote isotopique  $^{15}\text{N}$  issu de l'air et contenu dans l'échantillon végétal

b). Une évaluation indirecte de l'effet des CIMS et de la biofumigation sur les CMA du sol par des mesures de taux de mycorhization des racines du tournesol

Les résultats de ces approches expérimentales seront confrontés à ceux obtenus dans le cadre de la 3<sup>ème</sup> partie de ce chapitre :

c). Une évaluation plus globale des effets des CIMS et de la biofumigation sur la composition et la structure des communautés microbiennes du sol par des outils moléculaires reposant sur l'extraction, l'amplification par PCR et le séquençage de l'ARN ribosomal des bactéries (copies 16S) et de l'ARN ribosomal des champignons (copies 18S), à partir de l'ADN présent dans le sol, avec, dans un second temps, une étude plus précise de genres présentant un intérêt pour la succession CIMS – Tournesol (Communautés symbiotiques des Fabacées et CMA).

Le système décrit au sein de la figure 31 (et schématisé au sein de la figure 31b) représente le principe général des dispositifs mis en place en plein champ, à Auzeville, autour desquels s'articule tous les essais menés dans le cadre de la thèse. Ces dispositifs en plein champ ont été réalisés sur des parcelles différentes en 2016, 2017 et 2019 et sur la même parcelle (mais pas au même endroit, pour s'affranchir d'effets cumulatifs des CIMS) en 2019 et 2020. Ces essais sont dénommés AUZ16, AUZ17, AUZ19 et AUZ20 dans le manuscrit.

Ces dispositifs contribuent à répondre aux 3 objectifs de la thèse de la manière suivante :

**Objectif 1 : Evaluer les effets de broyats de cultures de Brassicacées ou Fabacées sur le développement de *V. dahliae* et de *O. cumana*, par des approches *in vitro* :**

La majorité des broyats utilisés lors des expérimentations d'exposition des bioagresseurs aux Brassicacées ou aux Fabacées sont issus des dispositifs en plein champ, et les concentrations en GSLs dans les tissus ont été analysées, avec deux exceptions (première répétition de l'essai portant sur les effets des Brassicacées sur le développement de *V. dahliae* et l'essai portant sur les effets des Brassicacées ou de la Fabacées sur les émergences d'Orobanche en pots. Les détails relatifs aux conditions de culture des CIMS utilisées pour ces essais sont disponibles directement dans le chapitre II, aux sections 2.3.2 et 3.2.2, respectivement.

Afin de tester les hypothèses de l'objectif 1 les principales mesures réalisées sont :

- Des mesures de GSLs dans les tissus des Brassicacées testées afin de caractériser les quantités et les profils de ces derniers, en fonction des espèces de couverts testées
- Suivi de l'évolution du diamètre du mycélium du *Verticillium dahliae* en boîtes de Pétri, sur milieu de culture.
- Le comptage des taux germination de graines d'Orobanche en fonction des espèces de couverts testés, au sein de dispositifs en plaques 96 puits et en mini-rhizotrons
- Le comptage du nombre de fixation d'Orobanche aux racines de tournesol, en fonction des espèces de couverts testés et des variétés de tournesols testées, au sein de dispositifs en plaques de cultures.
- Les comptages du nombre d'émergences d'Orobanche à proximité de tournesols cultivés en pots, en fonction des espèces de couverts testés et des variétés de tournesols testées, au sein de dispositifs sous serre.

Les modalités et le nombre de répétitions de ces différentes mesures est résumé dans le Tableau 2. Le détail du matériel et des méthodes employées dans le cadre de ces dispositifs est détaillé directement au sein du **chapitre II**.

**Tableau 2** – Récapitulatif général des mesures réalisées dans le cadre de l'Objectif 1, et des facteurs, modalités et nombre de répétitions relatifs à chaque essai expérimental. Les abréviations EOB, FOB, GOB, MB, M. Blanche, MR, NF, PDA, RF, REP, var. et VB correspondent, respectivement à « Emergence d'Orobanche après broyats », « Fixations d'Orobanche après broyats », « Germination d'Orobanche après broyats », moutarde brune, moutarde blanche, mini-rhizotron, navette fourragère, Potato Dextrose Agar, radis fourrager, répétition, variété et vesce du Bengale.

	Mesure réalisée	Facteur testé	Essai	Modalités	Nombre de répétitions
<b>Objectif 1 : Evaluer les effets de broyats de cultures de Brassicacées ou Fabacées, communément utilisées comme CIMS en plein champ, sur le développement du <i>V. dahliae</i> et de <i>O. cumana</i></b>					
<b>Sous-objectif 1</b>	Aire sous la courbe de développement du mycélium de <i>Verticillium dahliae</i> en boîtes de Pétri sur milieu de culture PDA	Broyats de Brassicacées	VD Rep 1 (2015)	Témoin sans broyat, MB (var. Etamine), NF (var. Chicon), RF (var. Anaconda)	n = 5
			VD Rep 2 (2021)		n = 10
<b>Sous-objectif 2</b>	Taux de germination des graines d'Orobanche (%) en plaques 96 puits, avec une induction de synthèse de la germination	Broyats de Brassicacées ou de Fabacées	GOB Rep 1* (2020)	Témoin sans broyat, MB (var. Etamine), NF (var. Chicon), RF (var. Anaconda), VB (var. Titane)	n = 10
			GOB Rep 2* (2020)		
			GOB Rep 3* (2021)		
			GOB Rep 4* (2021)		
	Taux de germination des graines d'Orobanche (%) en plaques 96 puits, en mini-rhizotrons avec induction naturelle de la germination (présence de tournesol)	Broyats de Brassicacées ou de Fabacées	MR Rep 1 (2020)	Témoin sans broyat MB (var. Etamine), NF (var. Chicon), RF (var. Anaconda), VB (var. Titane)	n = 5
			MR Rep 2 (2020)		
			MR Rep 3 (2021)		
			MR Rep 4 (2021)		
	Nombre de fixations d'Orobanche aux tournesols (en plaques de cultures)	Broyats et date de semis	FOB Essai 1	<b>Pour les broyats</b> : Témoin sans broyat MB (var. Etamine), <b>Pour les dates</b> de semis, elles sont soit J0 incorporation des broyats ou J-7 incorporation des broyats	n = 11
		Broyats et génotype de tournesol	FOB Essai 2	<b>Pour les broyats</b> : Témoin sans broyat, MB (var. Etamine), VB (var. Titane). <b>Pour les génotypes de tournesol</b> : XRQ lignée sensible et MAS 82.OL hybride commercialisé sensible	n = 11 pour XRQ et n = 25 pour MAS 82.OL
Nombre d'émergences d'Orobanche en pots (sous serre)	Broyats et génotype de tournesol	EOB	<b>Pour les broyats</b> : Témoin sans broyat, MB (var. Etamine), VB (var. Titane), RF (var. Anaconda), M. Blanche (var. Abraham). <b>Pour les génotypes de tournesol</b> : XRQ lignée sensible et DKF3333 hybride sensible	n = 10 pour chacun des deux génotypes	

\* les 4 répétitions de l'essai « GOB » en plaques 96 puits visant à évaluer les effets des broyats sur la germination de l'orobanche : Pour chacune des répétitions deux temps de conditionnements dans l'eau ont été testés : un temps court (7 jours, graines dans l'eau et exposées aux broyats), un temps long (graines 7 jours dans l'eau puis 7 jours dans l'eau et exposées aux broyats)

**Objectif 2 Evaluer en plein champ les effets des CIMS et de la biofumigation sur les dégâts et dommages de cette maladie sur tournesol.**

Afin de tester les hypothèse de l'objectif 2, toutes les données ont été recueillies à partir d'échantillons issus des dispositifs mis en place à Auzeville, et décrits ci-dessus, pendant 4 années (2016, 2017, 2019 et 2020). Les différentes mesures sont les suivantes :

- Caractérisation des CIMS : Quantification des biomasses aériennes et racinaires produites par chacune des compositions de CIMS et mesures des concentrations et profils des GSLs des tissus des Brassicacées, avant la destruction des CIMS.
- Mesure des quantités d'azote minéral dans le sol, avant le semis du tournesol, en fonction des différents précédents (CIMS ou sol nus)
- Mesure des concentrations en azote dans les tissus des tournesols, à la floraison (Indice de nutrition azotée), en fonction des différents précédents.
- Suivi hebdomadaire de la sévérité de la Verticilliose du tournesol, en fonction des différents précédents (et pendant une année, des différentes variétés)
- Rendements manuels du tournesol, à maturité, en fonction des différents précédents.

Les modalités et le nombre de répétition de ces différentes mesures est résumé dans le Tableau 3. Le détail du matériel et des méthodes employées dans le cadre de ces dispositifs est décrit directement au sein du **chapitre III**.

**Tableau 3** – Récapitulatif général des mesures réalisées dans le cadre de l'Objectif 2, et des modalités et nombre de répétitions relatifs à chaque année d'expérimentation. Le facteur testé n'est pas précisé dans le tableau car il ne varie pas, il s'agit toujours de l'espèce (pour les biomasses et les concentrations de GSLs) ou du précédent cultural. Les abréviations AUZ, MB, MS, NF, RF var. et VB correspondent, respectivement à Auzeville, moutarde brune, matière sèche, navette fourragère, radis fourrager, variété et vesce du Bengale.

Mesure réalisée	Essai	Modalités	Nombre de répétitions	Remarques	
<b>Objectif 2 : Evaluer en plein champ les effets des CIMS et de la biofumigation sur les dégâts et dommages de cette maladie sur tournesol.</b>					
<b>Sous-objectif 2.1</b>	Quantités de biomasses aériennes et racinaires (t de MS.ha <sup>-1</sup> ) produites par les CIMS avant destruction et concentrations et profils en GSLs des tissus (uniquement des Brassicacées (μmol.g <sup>-1</sup> de MS))	AUZ16	MB (var. Etamine), NF (var. Chicon), RF (var. Anaconda)	4 zones de prélèvement	/
		AUZ17	MB (var. Etamine), NF (var. Chicon), RF (var. Anaconda), VB (var. Titane)	3 blocs et 2 zones de prélèvements intra-bloc	Pas de prélèvements des parties racinaires de la VB
		AUZ19	MB (var. Etamine), NF (var. Chicon), RF (var. Anaconda), VB (var. Titane),	3 blocs et 1 zone de prélèvement intra-bloc	NF en mélange tri-spécifique n'a pas germé
		AUZ20	MB + VB, NF + VB, RF + VB, MB + RF + VB, NF + RF + VB	3 blocs et 3 zones de prélèvements intra-blocs	/
<b>Sous-objectif 2.2</b>	Quantité d'azote minéral dans le sol avant le semis du tournesol (kg de N.ha <sup>-1</sup> ) aux 3 horizons 0-30, 30-60 et 60-90 cm	AUZ16	Témoins sol nu et modalités sous-objectif 2.1 pour chaque année respectives	n = 1 zone de prélèvement (composée de 6 échantillons de sols mis en commun)	
		AUZ17		n = 3 blocs (composés de 6 échantillons de sols mis en commun)	
		AUZ19			
		AUZ20			
	Indice de nutrition azotée du tournesol à la floraison	AUZ16	Témoins sol nu et modalités sous-objectif 2.1 pour chaque année respectives	n = 1 zone de prélèvement (composés de 5 parties aériennes de tournesols mises en commun)	
		AUZ17		n = 3 blocs (composés de 5 parties aériennes de tournesols mises en commun)	
		AUZ19			
		AUZ20			
<b>Sous-objectif 2.3</b>	Indice de sévérité de la Verticilliose du tournesol (%)	AUZ16	Témoins sol nu et modalités sous-objectif 2.1 pour chaque année respectives	n = 3 zones de suivi (composée de 25 tournesols)	Variété sensible 1 (R.A.G.T)
		AUZ17		n = 3 blocs et 3 zones de suivi (composées de 15 tournesols)	
		AUZ19		n = 3 blocs et 3 zones de suivi (composées de 10 tournesols)	Variété sensible 2 (MAS Seeds)
		AUZ20			Variété sensible 2 (MAS Seeds) et variété TPS* (MAS Seeds)
<b>Sous-objectif 2.4</b>	Rendements en grains du tournesol (t.ha <sup>-1</sup> ) (prélèvements manuels)	AUZ16	Témoins sol nu et modalités sous-objectif 2.1 pour chaque année respectives	n = 3 zones de suivi (composée de 25 tournesols)	
		AUZ17		n = 3 blocs et 3 zones de suivi (composées de 15 tournesols)	
		AUZ19		n = 3 blocs et 3 zones de suivi (composées de 10 tournesols)	
		AUZ20			

\* La variété TPS MAS Seeds a été récoltée à la moissonneuse batteuse expérimentale, contrairement aux variétés sensibles qui a été récoltée manuellement.

**Objectif 3 : Evaluer de potentiels dis-services des CIMS sur les communautés microbiennes des sols d'intérêt pour la succession culturale CIMS – Tournesol.** La synthèse des différentes hypothèses de départ est disponible dans la figure 31b et peut se résumer par de possibles effets majoritairement négatifs des Brassicacées (via l'allélopathie et/ou la biofumigation) sur différentes communautés microbiennes (Communautés symbiotiques des Fabacées pour la fixation de l'azote atmosphérique, champignons mycorhiziens à arbuscules des racines de tournesol, communautés microbiennes et fongiques globales). Les Fabacées, ne produisant pas d'ITCs et étant des cultures hôtes à CMA (contrairement aux Brassicacées), auraient moins, voire pas d'effets négatifs sur ces communautés. Un mélange d'espèces issues des deux familles botaniques pourrait donc permettre une compensation des effets négatifs des Brassicacées grâce à l'inclusion de Fabacées. Pour répondre à ces hypothèses, les mesures réalisées sont les suivantes :

- Mesures de concentrations d'azote dans les tissus de Fabacées monospécifiques ou en association bispécifique avec des Brassicacées et mesures de  $\delta^{15}\text{N}$  afin de quantifier la part d'azote contenu dans les tissus des Fabacées issus du sol et celle issus de la fixation atmosphérique
- Mesures de taux de mycorhization des racines de tournesol, en fonction du précédent cultural (CIMS ou sol nu)
- Séquençage de l'ADN du sol présent avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol (soit après biofumigation et démarrage de la minéralisation), pour calculer différents indices écologiques rendant compte de la structure des communautés microbiennes en fonction de ces deux temps de prélèvement et du précédent cultural (Sol nu ou CIMS).

Les modalités et le nombre de répétitions de chacune de ces mesures est disponible au sein du Tableau 4 et le détail du matériel et des méthodes déployées est directement décrit au sein du **chapitre IV**.

**Tableau 4** – Récapitulatif général des mesures réalisées dans le cadre de l’Objectif 3, et des facteurs, modalités et nombre de répétitions relatifs à chaque mesure. L’ensemble de ces mesures a été réalisé sur le dispositif d’Auzeville en 2020, l’essai est donc réalisé une seule fois. Les abréviations MB, NF, RF et VB correspondent, respectivement à moutarde brune, navette fourragère, radis fourrager, vesce du Bengale.

	Mesure réalisée	Facteur testé	Modalités	Nombre de répétitions
<b>Objectif 3 : Evaluer de potentiels dis-services des CIMS sur les communautés microbiennes des sols d’intérêt pour la succession culturale CIMS – Tournesol</b>				
Sous-objectif 3.1	Quantification des ratios $\delta^{15}N$ et des quantités d'azote absorbées par la Vesce du Bengale ( $kg \cdot ha^{-1}$ )	Composition du couvert de Fabacée	VB monospécifique avec MB ou NF ou RF      VB bispécifique	3 blocs composés de 3 zones de prélèvements
Sous-objectif 3.2	Taux de mycorhization des racines de tournesol (%)	Précédent cultural	Témoin sol nu      MB (var. Etamine) RF (var. Anaconda)      VB (var. Titane) MB+RF+VB	3 blocs composés de 3 zones de prélèvements (chaque zone contient 4 à 5 tournesols qui ont été regroupés)
Sous-objectif 3.3	Séquençage de l'ADN du sol et calcul d'indices écologiques : Richesse spécifique, Equitabilité et ratio 18S/16S	Précédent cultural et temps de prélèvement	<b>Pour le précédent cultural</b> , les échantillons ont été regroupés à l'échelle de la composition : Brassicacée, Fabacée, Mélanges et témoin sol nu / <b>Pour le temps de prélèvement</b> , les échantillons de sol ont été prélevés avant destruction des couvert (effet allélopathie) et avant semis du tournesol (effet biofumigation et minéralisation des résidus)	3 blocs

## Chapitre II – Evaluation des effets de broyats de Brassicacées ou de Fabacées sur le *Verticillium dahliae* et l'*Orobanche cumana*

## II. 1. Introduction générale du chapitre

Selon la littérature, les Brassicacées semblent avoir des effets prometteurs sur la régulation de certains bioagresseurs, dont le *V. dahliae*, qui ont été observé au laboratoire par des méthodologies d'exposition du bioagresseur soit à des ITCs de synthèse, soit directement à des broyats de Brassicacées libérant des molécules de dégradation des GSLs et les espèces les plus adaptées semblent être la moutarde brune et la moutarde noire (Olivier et al., 1999; Neubauer et al., 2014). Les broyats de Brassicacées semblent aussi avoir un potentiel biocide à l'encontre de *O. cumana* notamment grâce à la moutarde blanche comme cela a été observé par Pedraza et al. (2015) dans des dispositifs en boîtes de Pétri ou par Strelnikov et al. (2020) en pots, sous serre. Ainsi, nous avons souhaité évaluer en conditions contrôlées les effets de broyats de cultures communément cultivées en tant que CIMS dans le Sud Ouest de la France, qui sont les Brassicacées (moutarde brune var. Etamine, radis fourrager var. Anaconda et navette fourragère var. Chicon) ainsi qu'une Fabacée, la Vesce du Bengale var. Titane, sur la germination et le développement des deux bioagresseurs ciblés par la thèse, qui sont le *V. dahliae* et l'*O. cumana*, afin d'évaluer la potentielle efficacité des produits de la dégradation des glucosinolates produits par ces variétés de Brassicacées, dont le potentiel est encore inconnu, à notre connaissance, à l'encontre de ces deux bioagresseurs.

Ceci, afin d'identifier les variétés qui seraient les plus efficace pour une mise en œuvre de la biofumigation en plein champ, dans le cadre de la protection de la culture du tournesol. La Fabacée utilisée ne produisant pas de glucosinolates, elle permettrait de déterminer si les régulations observées sont effectivement dues uniquement aux produits de dégradation des GSLs ou si d'autres molécules entrent en œuvre. Ce chapitre est décomposé en deux parties :

Une première partie présentant des résultats de l'effets de broyats moutarde brune, navette fourragère ou radis fourrager sur

(i) les organes de conservation de *V. dahliae* (microsclérotés) en l'absence de tournesol, sur milieu de culture nutritif PDA, qui permet malgré l'absence d'exsudats racinaires du tournesol, la germination des microsclérotés de *V. dahliae* et le développement de son mycélium,

(ii) Sur les graines d'Orobanche en absence de tournesol et avec l'utilisation d'inducteurs de germination de synthèse et en présence de tournesol afin que les exsudats racinaires du tournesol permettent la germination des graines de l'Orobanche.

Les expositions sont faites d'abord *in vitro* par des approches maximisant l'efficacité d'une biofumigation artificielle. Cette partie est présentée en anglais car elle est en cours de rédaction et vise à être valorisée dans la revue *Plant Cell and Environment*, en collaboration avec Mireille Chabaud, Grégory Dechamp-Guillaume Stéphane Muños et Célia Seassau. Mireille Chabaud et Stéphane Muños font partie de l'équipe SPI du LIPME, qui est spécialisée en interaction entre tournesol et bioagresseurs.

Une deuxième partie présentant des résultats d'expérimentations complémentaires qui sont menées en chambre de culture et sous serre, et permettent d'intégrer du substrat et du tournesol cultivé en pots. Les effets des broyats sont observés grâce à la mise en place de dispositifs en plaques de culture, contenant un substrat inoculé avec des graines d'Orobanche, qui seront ensuite semées avec des graines de tournesols et incubées en chambre de culture, afin de permettre la germination de *O. cumana*, qui nécessite les exsudats racinaires du tournesol. Le deuxième dispositif utilisé est la culture en pots, sous serre, pour permettre un déroulement plus prolongé de l'expérimentation (Jusqu'à 90 jours après semis), contrairement aux plaques de cultures qui, de par leur taille limitée, contraignent un arrêt de l'expérimentation environ 45 jours après le semis. Cette expérimentation complémentaire en pots a un intérêt dans l'étude de la capacité des broyats à réduire les émergences et donc le nombre d'Orobanche qui pourraient atteindre floraison et maturité et multiplier le stock de graines du parasite (tout en ayant un impact négatif sur le développement du tournesol à cause du détournement de nutriments et d'eau).

Il est à noter que les ajustements du dispositif expérimental visant à se rapprocher des conditions 'plein champ' (avec notamment l'ajout de substrat et le passage à des essais sous serre) n'ont concerné que *O. cumana*, à cause de la difficulté à trouver des parcelles expérimentales naturellement infestée par ce bioagresseur, tandis que le domaine expérimentale d'Auzeville comprend déjà des parcelles expérimentales où des symptômes de Verticilliose avaient régulièrement été

observées depuis de nombreuses années. Il permet également de valider des observations obtenues *in vitro* avant des applications en plein champ, qui sont beaucoup plus coûteuses que celles en pots.

## II. 2. Biofumigant potential of grinded tissues of Brassicaceae or Fabaceae species on *Verticillium dahliae* and *Orobanche cumana*

### II. 2.1. Abstract

Sunflower Verticillium Wilt (*Verticillium dahliae*) and sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) are two major soilborne pest of sunflower, that can persist in soils more than ten years, even without a host, making crop diversification ineffective if used alone, because of their long-term conservation. Currently, resistant cultivars are used to control their damages. Brassicaceae cover crops and biofumigation could be implemented as an alternative and agroecological protection strategy. Before implementation at the field scale, there is a need to identify the most efficient species and cultivars of cover crops to use. Thus, through an *in vitro* approach, we have exposed *V. dahliae* microsclerotia on potato dextrose agar to grinded tissues of Brassicaceae (brown mustard, turnip rape or fodder radish), and monitored the mycelial growth during 21 days. The exposition to grinded Brassicaceae always led to significant inhibition of the development of the fungus. On the other hand, we have exposed *O. cumana* seeds to the same species or to purple vetch (Fabaceae), and we have used GR24+DCL or exposed the seeds directly to sunflower seeds to stimulate the germination of the seeds. Germination inhibition was inconsistent regarding the approaches and the repetitions of the assays, but brown mustard always led to the highest inhibitions. We hypothesized that glucosinolates breakdown products are involved in these inhibitions, but further studies are needed to decipher precisely the mechanism involved. Applications at greenhouse or experimental field scale are also needed to confirm the inhibitions observed.

### II. 2.2. Introduction

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is a major oilseed crop worldwide regarding its production and harvested areas which exceeded 50 M tonnes of seeds (FAO, 2021)

and 27 M ha in 2018, respectively (Pilorgé, 2020). However, global yield production can vary sharply from year to year (FAO, 2021). Abiotic factors such as drought (Alberio et al., 2015) and high temperatures (Harris et al., 1978) mainly limit yields. In south-western of France, a major basin of sunflower production (Jouffert et al., 2011; Velasco et al., 2015b), the crop is frequently cultivated each 2 years, in rotations including wheat (Lecomte and Nolot, 2011). This leads to a multiplication of pests which reduces sunflower yields. The most detrimental ones are aerial fungi, with the examples of phomopsis stem canker (*Phomopsis helianthi*), phoma black stem (*Phoma macdonaldii*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) and soilborne pest such as Verticillium wilt (*V. dahliae*) and broomrape (*O. cumana*). The latter two have spread these last years in France (Carretier, 2021).

Sunflower Verticillium Wilt (SVW) is distributed in most sunflower-producing areas of the world (Gulya, 1997; Markell et al., 2015), as in Argentina, where SVW is the most important disease (Erreguerena et al., 2019) and many temperate European countries such as France (Martín-Sanz et al., 2018; Carretier, 2021). The diversity of *V. dahliae* in Europe is poorly characterized but three pathogenic races were differentiated : V1, V2-EE and V2-WE (Martín-Sanz et al., 2018). The fungus infects its host through the roots (Daayf et al., 1997), and causes chlorosis and necrosis on the leaves, leading to an acceleration of leaf senescence and a reduction of photosynthetic area (Mestries and Lecomte, 2012). Experiments in south-western of France showed that yield losses can reach 0.25 t.ha<sup>-1</sup>, or up to 50% in case of severe attacks (Mestries and Lecomte, 2012).

Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) is an obligatory and non-photosynthetic root parasitic weed of the sunflower (Pérez-Vich et al., 2004; Louarn et al., 2016), it is widespread in many sunflower producing countries in Central and Eastern Europe, Spain (Parker, 2012b) and France (Jestin and Martin-Monjaret, 2016). To date, there are eight known races of *O. cumana* which are identified from race A to race H (Velasco et al., 2016). The current situation of broomrapes virulences remains unclear because there is no homogenous races nomenclature between countries and, overall, there are several reports of races F, G and H (Fernández-Martínez et al., 2015). After germination, broomrape attach to sunflower and starts to deplete it from nutrients and water (Pérez-Vich et al., 2004; Louarn et al., 2016). Broomrape can cause 80 to 90% yield losses in high infections (Jestin and Martin-Monjaret, 2016; Louarn et al., 2016). After its maturity, broomrape can produce

from 50.000 to 500.000 seeds of 0.2 mm to 0.3 mm and can spread easily (Gevezova et al., 2012; Jestin and Martin-Monjaret, 2016).

In absence of a sensitive host, both of these soilborne pests are able to persist in the soils more than ten years as microsclerotia (MS), the conservation form of *V. dahliae* (Wilhelm, 1955) or as tiny seeds for broomrape (Antonova et al., 2013). Both needs their host root exudates to stimulate their germination (Mol and Van Riessen, 1995; Joel et al., 2011). This long-time persistence in the soil makes rotation diversification ineffective if used alone. Currently, varietal resistance is the main effective protection method available against *V. dahliae* (Markell et al., 2015) and *O. cumana* (Louarn et al., 2016). Regarding *V. dahliae*, the resistance developed toward the first race on sunflower (NA-1) was associated to a single major gene (Fick and Zimmer, 1974) and new races overcoming this resistance had been reported later in some sunflower production countries as USA (Gulya, 2007) and Spain (García-Ruiz et al., 2014).

Considering *O. cumana*, mapping studies have identified quantitative resistance in sunflower, and quantitative trait loci have been found to be specific to one or more developmental stage of *O. cumana* (Louarn et al., 2016), or qualitative, race-specific resistance affecting the incidence of broomrape, and quantitative non-race specific resistance affecting their number (Pérez-Vich et al., 2004). Moreover, vertical gene resistances have been used, such as *HaOr5*, providing resistances to races D, E and F, which were predominant till the middle 1990s (Fernández-Martínez et al., 2015). Currently, several commercialized sunflower hybrids are resistant to race F, and this is permitted by the introgression of the *HaOr7* gene, which confer resistance by preventing the connexion of *O. cumana* to the vascular system of sunflower roots (Duriez et al., 2019). However, *O. cumana* population evolves, leading to the apparition of new more virulent populations (Fernández-Martínez et al., 2015) that can overcome the resistance conferred by *Or* genes, as already reported in Spain (Martín-Sanz et al., 2016). Finally, chemical protection against *O. cumana* is possible using herbicides such as imidazolinone (Dominguez et al., 2004; Jestin and Martin-Monjaret, 2016) but it requires to use tolerant sunflower hybrid and it is opposed to the actual agroecological transition. Therefore, alternative methods beside resistant cultivars are needed, in order to implement an integrated pest management strategy against both of these soilborne disease.

Brassicaceae cover crops can be used to implement biofumigation (Kirkegaard et al., 1993; Morris et al., 2020), which consist of the liberation of biocidal compounds in the soils, during the destruction and the incorporation of the biofumigant cover crop (Kirkegaard et al., 1993). These biocidal compounds are the degradation products of the glucosinolates contained in Brassicaceae cells, such as isothiocyanates (Brown and Morra, 1997). Glucosinolates are classified into three profiles: Aliphatic, aromatic and indolyl, which differs in the length and weight of their side chain, and thus, in properties such as volatility and persistence in the soil (Brown and Morra, 1997; Fahey, 2006). The glucosinolates profiles varies widely from a species to another (Kirkegaard and Sarwar, 1998). For example, brown mustard (*Brassica juncea* L.) is known for its high concentration of sinigrin (Merah, 2015; Couëdel et al., 2018), whereas fodder radish (*Raphanus sativus* L.) has appreciable quantities of glucoraphasatin (Castro-Torres et al., 2014; Couëdel et al., 2018b). The inhibition effects of glucosinolates product of degradation are referenced on bacteria and fungi (Brown and Morra, 1997; Smith and Kirkegaard, 2002), nematodes (Lazzeri et al., 2004), insects (Borek et al., 1995) and weeds (Haramoto and Gallandt, 2004).

The sensitivity of *V. dahliae* exposed to synthetic isothiocyanates or to crushed materials of Brassicaceae species had already been reported during *in vitro* studies, with significant reductions of the fungus development following its exposition to mustards (*Brassica juncea* or *Brassica nigra*) (Olivier et al., 1999; Neubauer et al., 2014; Seassau et al., 2016) or radish (*Raphanus sativus*) (Seassau et al., 2016). Few field studies implementing biofumigation also show significant regulation of sunflower Verticillium wilt, especially following fodder radish (Couëdel et al., 2021; Ait Kaci Ahmed et al., 2022). Studies about the effects of Brassicaceae and biofumigation on *O. cumana* regulation are scarcer. Recent studies reported effective regulations of *O. cumana* germination when exposed to white mustard (*Sinapis alba* L.) residues or water-soluble extract in petri dish experiment (Pedraza et al., 2015). Also, the incorporation of white mustard fresh and grinded tissues into inoculated soils reduced *O. cumana* infestations during a greenhouse experiment (Strelnikov et al., 2020). Moreover, Pedraza (2018) reported significant reduction of *O. cumana* germination when exposed to common vetch (*Vicia narbonensis* L.) *in vitro*. Brassicaceae seems to control other Orobanchae species, as shown by El-Dabaa et al. (2019) who observed effective reduction of the number of *O. crenata*

tubercles/pots when exposed to *Eruca sativa* seed powder and the yields of the *Vicia faba* host plant were significantly higher with the seed powder addition.

The assessment of cover crops and biofumigation effects on *O. cumana* and *V. dahliae* regulation is needed, and this practice could be suitable in south-western of France (Ait-Kaci Ahmed et al., 2020), as sunflower is usually grown using wheat-sunflower rotations (Lecomte and Nolot, 2011), with a fallow period of 9 months between the two crops. Beside the regulation of *O. cumana* and *V. dahliae*, cover crops could provide a bundle of ecosystem services such as nitrates or sulphates catch crop effect (Couëdel et al., 2018b, 2018c; Thorup-Kristensen, 2006), and green manure effects (Couëdel et al., 2018b, 2018c).

Before field applications, there is a need to assess precisely the effects of fresh grinded materials of Brassicaceae toward *O. cumana* and *V. dahliae* using cultivars that could be suitable as cover crops in South-Western France, and that had never been assessed previously. Thus, the aim of this study was to implement an artificial biofumigation, in laboratory conditions, using three species of Brassicaceae (chosen for their contrasted glucosinolates profiles) and one species of Fabaceae (chosen as a non-glucosinolates treatment, to decipher if the observed regulations are due to glucosinolates or to other compounds), to assess the effects of their exposition on the germination of *O. cumana*

## II. 2.3. Material and Methods

### II. 2.3.1 – Pests and plants materials

#### II. 2.3.1.1 - *Verticillium dahliae* strain and *Orobanche cumana* seeds

A strain of *V. dahliae* was obtained from infected stem of sunflower cultivated in the field of Verfeil in 2015, (43.657°N, 1.662°E), in south-western of France. This strain was selected regarding its aggressiveness toward sunflower and its quick development on growing media. Stock culture of microsclerotia were maintained on potato dextrose agar (PDA- Fluka® at 39 g/liter, 150 mg of streptomycin, pH 6), in the dark at 5 °C.

Seeds of *O. cumana* were collected in an infested sunflower field in Bourret (43.939°N, 1.164°E), in south-western of France, in 2018. Seeds were stored in the dark at ambient temperature.

### II. 2.3.1.2 - Plant materials

The following material from three Brassicaceae and one Fabaceae plants were used: brown mustard (*Brassica juncea* L., cv. Etamine), turnip rape (*Brassica rapa* L., cv. Chicon), fodder radish (*Raphanus sativus* L., cv. Anaconda), and purple vetch (*Vicia benghalensis* L., cv. Titane). The seeds were provided by the seed's companies Jouffray Drillaud, for turnip rape and purple vetch, and R.A.G.T., for brown mustard and fodder radish.

The XRQ line of sunflower (*Helianthus annuus* L.), susceptible to *O. cumana*, was used for experimentation. Seeds were provided by LIPME.

### II. 2.3.2 – Plant material preparation and glucosinolates analyses

The different repetitions of the assays (two for *V. dahliae* and four for *O. cumana*) were made over five years, using grinded tissues of cover crops also grown during different years. The seeds of Brassicaceae or Fabaceae were sown, according to the assays, either in greenhouse in 2015 (15 liters pots filled with potting compost), or in fields plots the subsequent years (loamy clay soil), at INRAE Auzeville, in south-western of France (43.528°N, 1.501°E). The green whole plants (roots and shoots) were harvested at the beginning of flowering, the 19/05/2015, 24/02/2020, 22/02/2021 and 04/01/2022. For the purple vetch harvested in 2021, the sampling was done 17 days before that of Brassicaceae, the 05/01/2021, as the vetch started to freeze in January 2021.

Freshly harvested material was washed and grinded with a plant shredder (Eliet Maestro City®) into pieces of about 1 cm. The plant shredder was rinsed thoroughly between each species. The roots and the shoots of the plants of the same species were pooled, except for the glucosinolates analyses, where they were separated. Grinded tissues were kept in plastic bags and quickly frozen at -80 °C for further use.

The glucosinolates analyses was performed from a sub-sample of 4-5 plants of each Brassicaceae species, on the cover crops grown in 2021. The shoots and the roots, grinded and stored at -80°C, were lyophilized prior to be sent to the Centre for Integrative Biodiversity Research (Germany). The quantitative and qualitative analysis of glucosinolates in the tissues was performed according to the methods of (de Graaf et al., 2015).

Plant material required for the experimentation was taken out from the freezer at the beginning of the assays. The tissues were weighted, stored in labelled plastic bags and quickly grinded by hand to ground more finely the frozen tissues.

### II. 2.3.3 – Effect of grinded tissues on *Verticillium dahliae* development

Two repetitions were performed to evaluate, *in vitro*, the effects of the grinded Brassicaceae (brown mustard, turnip rape, fodder radish) tissues on the development of *V. dahliae*. For both repetitions, the microsclerotia of *V. dahliae* were grown for 10-15 days in the dark at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  on PDA (39g/liter of deionised water) amended with 150 mg/liter of streptomycin (pH 6). Thus, a plug of 6 mm diameter of PDA with microsclerotia was placed in the center of Petri dishes containing PDA (PDA- Fluka® at 39 g/liter, 150 mg of streptomycin, pH 6).

Disinfected plastic glasses (Plexiglas®) were filled with the frozen grinded Brassicaceae tissues, sampled from the greenhouse crops, and from field crops, for the first and the second repetition, respectively. The quantity of Brassicaceae tissues per plastic glasses was 6.5 g. This quantity was calculated to be equivalent to 1.5 to 2 tons of dried matter per hectare, which correspond to the yield of cover crops obtained in field conditions (low range). After adding the tissues, the plastic glasses were immediately closed with Petri dishes containing the plug of microsclerotia and sealed with paraffin (Parafilm®) (Figure 32A). For the controls, the plastic glasses were empty. Each treatment (control, brown mustard, turnip rape, and fodder radish) was repeated 5 times and 10 times, for the first and the second repetition, respectively. All the plastic glasses were incubated in the dark at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  for 21 days.

The diameter of *V. dahliae* development, including mycelium and microsclerotia, was measured at 7, 14 and 21 days. Three measures of the diameter were used to calculate the area under the growth curve (AUC) of *V. dahliae* according to the equation of Campbell and Madden (1990):

$$AUC = \sum_i^{n-1} \left[ \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right] \times (t_{i+1} - t_i)$$

where  $n$  is the number of evaluations,  $y$  the diameter of *V. dahliae*, and  $t$  the number of days after the start of the measures at 7, 14 and 21 days.

#### II. 2.3.4 – Effect of grinded tissues on *Orobancha cumana* germination

Prior to the assay, seeds of *O. cumana* were decontaminated by treatment with commercial bleach (2% NaClO), diluted at 33% in deionised water, for 5 minutes. Seeds were rinsed 3 times with sterile deionised water using a 40 µm sterile cell strainer. Seeds were resuspended in sterile deionised water at the concentration of 10 mg/ml, around 1000 seeds/ ml. Ten wells of 96-well plates were filled with 100 µl of the resuspended *O. cumana* seeds (around 100 seeds/well). Each 96-well plate was placed in a hermetic plastic boxes of 120 cm<sup>2</sup>. Boxes were either empty (control) or filled with frozen grinded tissues of one Brassicaceae, or Fabaceae sampled from the field (Figure 32B). The grinded tissues were not in contact with the seeds as they were placed under the 96-well plate. The quantity of tissues per plastic boxes was 20 g and calculated to be equivalent to 2 tons of dried matter per hectare

Three experimentations were carried to evaluate the effect of organic material of Brassicaceae or Fabaceae on *O. cumana* germination, with two conditioning time or two approaches to induce germination, which are described below. Each experimentation was repeated four times, and the repetitions staggered over time over time.

For the first experimentation, the conditioning of the seeds was the longest (Type L): the 96-well plate with seeds of *O. cumana* resuspended in sterile deionised water was placed in an empty hermetic plastic box for 7 days at 22°C in the dark. Then, boxes were filled with the grinded tissues for 7 days in the same conditions. After 7 days, the grinded tissues were removed from the boxes. For the second experimentation, the conditioning of the seeds was the shortest (Type S), the 96-well plate with seeds of *O. cumana* resuspended in sterile deionised water was placed directly with the grinded tissues in the hermetic plastic boxes for 7 days at 22°C in the dark. After 7 days, grinded tissues were removed from the boxes.

The germination of seed of *O. cumana* was induced using two approaches. In the first and the second experimentations, seeds of the Type Long, and Type Short were treated with chemical stimulants using 100 µl of 2.10<sup>-7</sup> M DCL and 2.10<sup>-7</sup> M GR24 added in each well for a final concentration of 10<sup>-7</sup> M DCL + 10<sup>-7</sup> M GR24. The 96-well plates in the boxes were incubated for 7 days at 22°C in the dark. In the third experimentation, seeds of the Type S were transferred from the 96-well plates and exposed to sunflower (line XRQ). To that aim, sunflower seeds were

decontaminated in 4.8% sodium hypochlorite for 10 min, rinsed three times with sterile water, sown in a mixture 1/1 (v/v) of sand/vermiculite and grown for 7 days. The content of a well (around 1 mg.100 $\mu$ l<sup>-1</sup>) was inoculated all around the roots of a 7-day-old seedling sunflower transferred in a Rhizotron (Figure 33). Rhizotrons are Plexiglas boxes 12 x 12 cm containing a sterile glass fiber paper on a layer of autoclaved rockwool (Le Ru et al., 2021). The rhizotrons are watered 3 times a week with a half-strength Long Ashton nutrient solution, supplemented with 370  $\mu$ M phosphate. The culture was done in a growth chamber at 22°C, 60% humidity, 16 h light 110  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/s. For each condition, 5 rhizotrons were prepared.

Finally, seven days after the germination stimulation, done either by GR24 and DCL or through the Rhizotron, the germination was observed under binocular magnifier. The total number of seeds (germinated or not) of each replicate corresponded to 100%. The number of observed germinated seeds was counted, and the rate of germination was calculated using the following equation :

$$\text{Germination rate} = \frac{\text{Germinated seeds for one replicate} \times 100}{\text{Total number of observed seed for one replicate}}$$

The duration of the three experimentations about the effects of grinded tissues on *O. cumana* are summarized in the Appendix III.

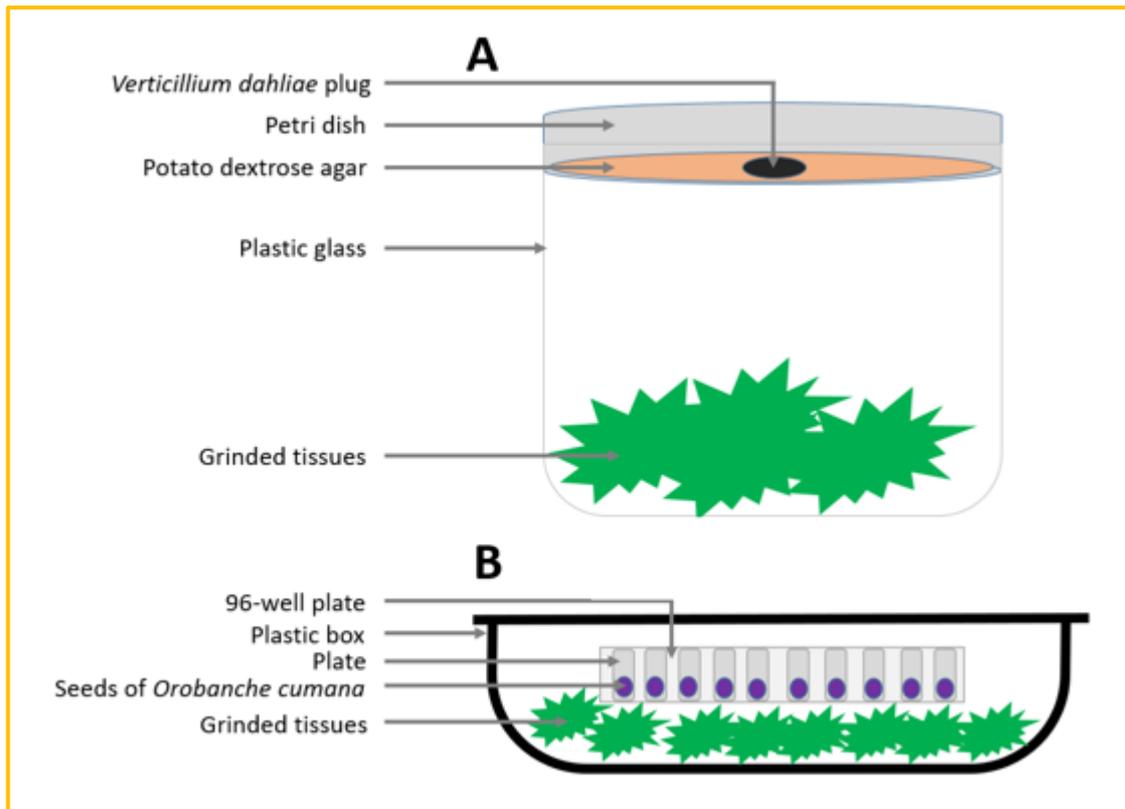


Figure 32 – Descriptive diagram of (A) the *Verticillium dahliae* exposition set-up and (B) the *Orobanchae cumana* exposition set-up. For (A), a plug of *Verticillium dahliae* was added in the middle of potato dextrose agar medium, filled in a Petri dish. The Petri dish was put above a plastic glass with the PDA and *V. dahliae* microsclerotia shifted toward 6.5 g of the grinded tissues. The Petri dish and the plastic glass were hermetically closed during the duration of the experimentation. For (B), a mean of 50 to 100 seeds of *O. cumana* per well, in 100  $\mu$ l of sterilized water, were filled in 10 well per plate, for each treatment, and 20g of grinded tissues were added. The plastic boxes were hermetically closed during the duration of the experimentation.



Figure 33 – Rhizotrons composed by Plexiglas boxes 12 x 12 cm containing a sterile glass fiber paper on a layer of autoclaved rockwool, and containing a seedling of sunflower (XRQ line) to stimulate *O. cumana* germination

#### II. 2.3.5 – Statistical analysis

The rates of germination of the broomrape were transformed using arcsine and square root transformations (Ahrens et al., 1990). As the hypothesis of homoscedasticity or normality were not always met, the non-parametric test Kruskal-Wallis were used to assess the effect of the treatments on the rate of germinations of *O. cumana* or on the AUC of *V. dahliae*. For the graphical representations of the effects of grinded Brassicaceae or Fabaceae on *O. cumana* germinations, the rates of germination of the seeds were transformed in order to normalize the rates of the controls to one, as in Pouvreau et al. (2021). The other treatments were normalized consequently: for each repetition, the rate was divided by the mean of the 10 replicates of the control. These raw germination rates are also represented for each experimentation and repetition. All statistical

analyses were performed with R Version 1.2.5033 © 2009-2019 RStudio, Inc., using the packages agricolae, Rmisc and ggplot2.

## II. 2.4. - Results

### II. 2.4.1. – Tissues glucosinolates characterization

The GSL concentrations contained in the dry matter (DM) of the three Brassicaceae species used in this study were quantified. The mean GSL concentrations of all the occurring ITC-liberating GSLs of the species of Brassicaceae tested in the experiment are shown in Table A. The three profiles of GSLs (aliphatic, aromatic and indole) were measured in the shoots and roots DM of the Brown mustard, turnip rape and fodder radish.

The concentrations of GSL found in the Brassicaceae tissues ranged from undetectable concentrations to  $79.54 \mu\text{mol gDM}^{-1}$  (Table A). Brown mustard tissues contents were dominated in sinigrin (aliphatic GSL) in the shoots and, to a lesser extent, in its roots. This GSL was not detected in the other species. Fodder radish roots contained high concentrations of the aliphatic GSL glucoraphasatin ( $79.54 \mu\text{mol gDM}^{-1}$ ), while the shoots contained tenfold less. In turnip rape, progoitrin (aliphatic GSL) was predominant in shoots and roots, with  $16.25$  and  $17.66 \mu\text{mol gDM}^{-1}$ , respectively. Turnip rape GSL profiles were more diversified in aliphatic (Glucobrassicinapin and gluconapin), aromatic (gluconasturtiin) and indole glucosinolates (neoglucobrassicin), conversely to brown mustard and fodder radish. These results showed that there was a high variation of the GSL profiles among Brassicaceae species and between shoots and roots.

**Table A**

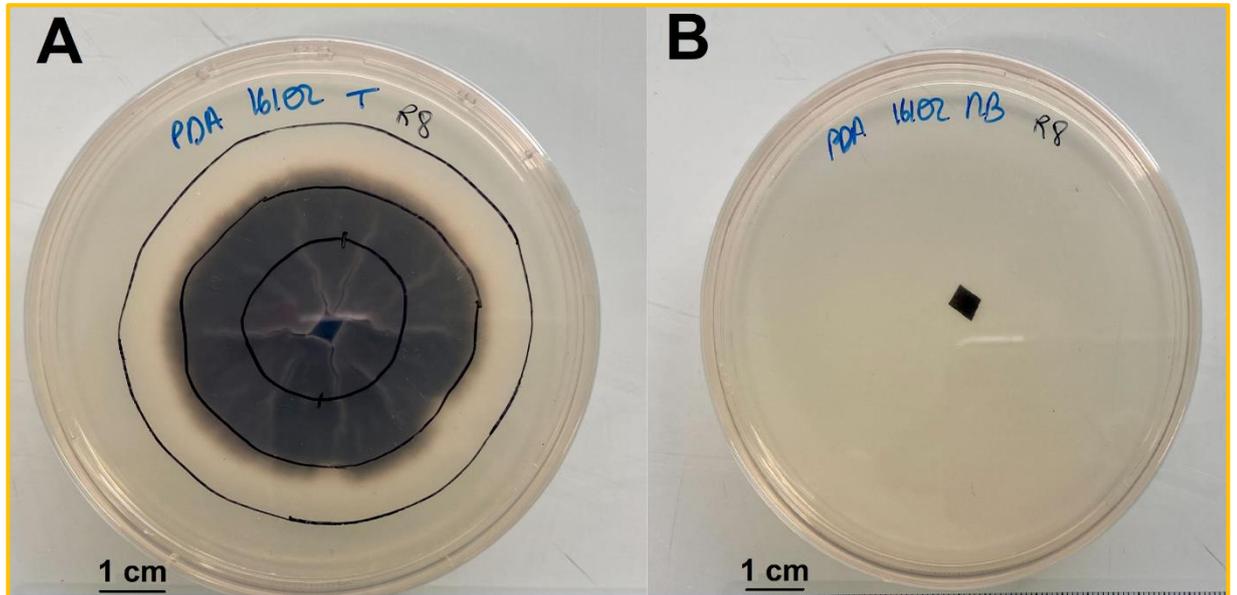
Individual glucosinolates concentrations ( $\mu\text{mol gDM}^{-1}$ ) found in the shoots and roots of Brassicaceae cover crops. Values correspond to the Brassicaceae grown in Auzerville field in 2020. Each value is the mean of three replicates and the numbers in brackets represent standard errors.

	Brown Mustard		Turnip rape		Fodder radish	
	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots
<b>Aliphatic</b>						
Glucobrassicinapin	0.09 (0.09)	0	8.39 (3.77)	2.41 (1.96)	0	0
Gluconapin	0.14	0.03	4.66 (4.66)	3.67 (2.13)	0	0
Progoitrin	0	0	16.25 (4.31)	17.66 (1.11)	0	0
Glucoraphasatin	0.06	0	0.1 (0.1)	0	6.94 (1.42)	79.54
Sinigrin	32.62 (2.2)	7.1 (1.26)	0	0	0	0
<b>Aromatic</b>						
Gluconasturtiin	1.24 (0.1)	6.5 (0.62)	1.28 (0.22)	11.49 (4.78)	0.03 (0.03)	0.04 (0.04)
<b>Indole</b>						
Neoglucobrassicin	0.18 (0.01)	0.11 (0.02)	8.14 (0.42)	4.06 (0.49)	0	0
Neoglucobrassicin	0.18 (0.01)	0.11 (0.02)	8.14 (0.42)	4.06 (0.49)	0	0

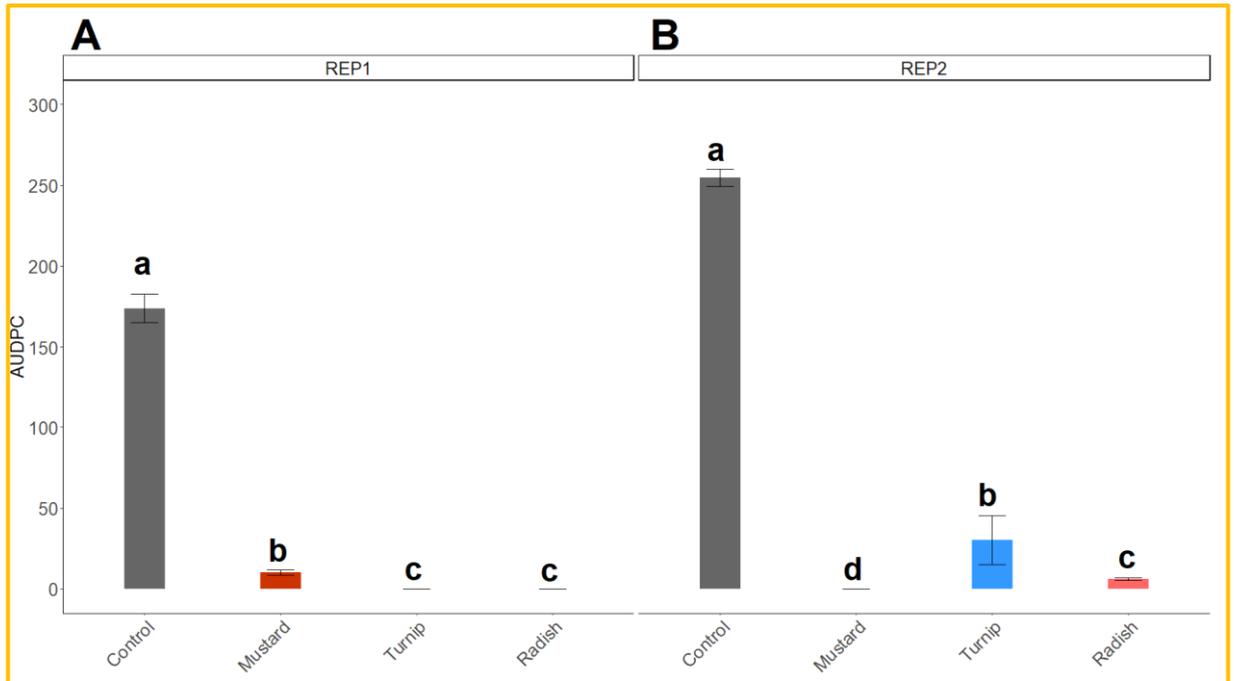
#### II.2.4.2. Brassicaceae grinded tissues inhibited *Verticillium dahliae* development

The effect of three species of Brassicaceae was assessed on *V. dahliae* development by exposing microsclerotia of *V. dahliae* to grinded Brassicaceae tissues. In absence of grinded Brassicaceae tissues, the fungus developed a mycelium and produced microsclerotia, on the potato dextrose agar (PDA) growing media (Figure 34A). The exposition of *V. dahliae* to grinded Brassicaceae tissues led to a strong inhibition of the development of the mycelial growth and the production of microsclerotia (Figure 34B). In the control without amendments, the disease progress measured by the Area Under the growth Curve of the fungus (AUC) reached a mean of 173.9 and 254.9 in the first and the second repetitions, respectively (Figure 35A and Figure 35B). When *V. dahliae* was exposed to grinded Brassicaceae tissues, the AUC was always significantly ( $p < 0.01$ ) lower, compared to the control without amendment, and had inhibited up to 100% the development of *V. dahliae*. The turnip rape and fodder radish led to a total inhibition of *V. dahliae* development in the first repetition, whereas with brown mustard, the AUC reached 10.2 (Figure 35A). In the second repetition, brown mustard was the most effective Brassicaceae, and inhibited completely the fungus, followed by fodder radish (Figure 2B). Turnip

rape led to more contrasted but significant ( $p < 0.01$ ) reductions of AUC, compared to the control without amendments (Figure 35B). These results highlight that grinded tissue of Brassicaceae reduced efficiently *V. dahliae* development and microsclerotia production.



**Figure 34** –*V. dahliae* development 21 days after the inoculation on potato dextrose agar of the plugs of *V. dahliae* microsclerotia. **(A)** The development in absence of Brassicaceae grinded tissues (Control without amendment), **(B)** The inhibition in presence of brown mustard grinded tissues. Bar= 1 cm.



**Figure 35** – Assessment of the Area Under the growth Curve of the fungus (AUC) of *V. dahliae* germination and development, grown from plugs of microsclerotia on potato dextrose agar. The fungus was exposed to Brassicaceae grinded tissues for 21 days, compared to controls without treatments. The assay was repeated twice and the values are the mean of 5 or 10 replicates in REP1 (A) and REP2 (B), respectively. Different letters indicate significant differences between AUC ( $p < 0.05$ ). Error bars represent standard errors.

#### II. 2.4.3. Brassicaceae grinded tissues inhibited *Orobanche cumana* germination

##### II. 2.4.3.1. Germination induced by chemical stimulants (DCL and GR24)

The effects of three species of Brassicaceae and one species of Fabaceae was assessed on *O. cumana* germination by exposing the seeds to grinded tissues of each species. The control had no amendments. Two types of exposition were tested: The first one is the Type L which consisted of conditioning the seeds 7 days, then the grinded tissues were added 7 days, then the seeds were treated with GR24 and DCL. The second one is the Type S was shorter and consisted in conditioning the seeds directly with the grinded tissues for 7 days, then the seeds were treated with GR24 and DCL. All the observations were made 7 days after the addition of the chemical inductors.

The exposition of seeds of *O. cumana* to grinded Brassicaceae tissues had overall strong inhibition effects on the germination rates, compared to the control without

amendment (Figure 36). Application of GR24 and DCL had enabled mean germination rates of the controls without amendment, that ranged from 25.3% to 56.2% for the Type L (Figure 37A) and from 11.1% to 58.5% for the Type S (Figure 37B), according to the repetitions. These differences in germination rates between the controls could be related to the staggering of the four repetitions over time, as *O. cumana* could be very sensitive to the disinfection step, and the batches of bleach used changed over the replicates. The reduction of *O. cumana* germination was always significant considering the Brassicaceae brown mustard ( $p < 0.01$ ), fodder radish ( $p < 0.05$ ), turnip rape ( $p < 0.05$ ) and the non-Brassicaceae treatment purple vetch ( $p < 0.01$ ), compared to the control, for both type L and S, and for the four repetitions. Moreover, the exposition to brown mustard or purple vetch permitted up to 99% reductions of the germination rate.

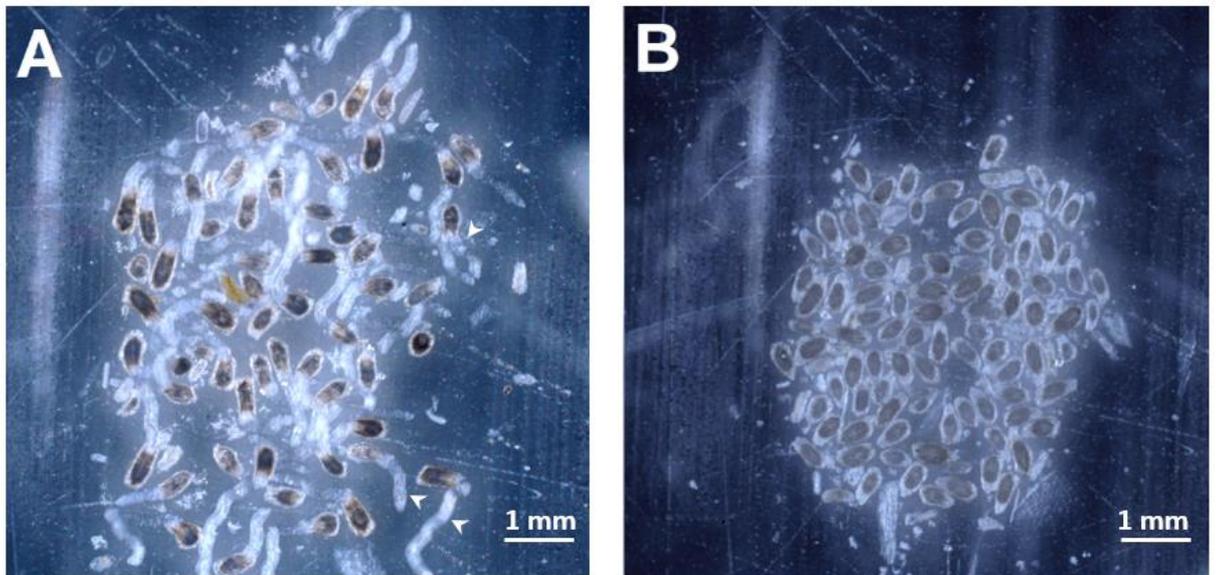
Thus, it can be assumed that *O. cumana* seeds do not need a conditioning period prior to the exposition to Brassicaceae, to be able to perceive the inhibitory molecules produced by the grinded tissues. This is highlighted by results obtained with the Type S that led to appreciable germination rates of the control, except during the third repetition (Figure 37B). Therefore, we've selected seeds of the Type S (shortest conditioning type) to assess the effect of the grinded tissues on *O. cumana* which germination was induced directly by sunflower exudates, through the rhizotron approach.

#### *II. 2.4.3.2. Germination induced by sunflower root exudates*

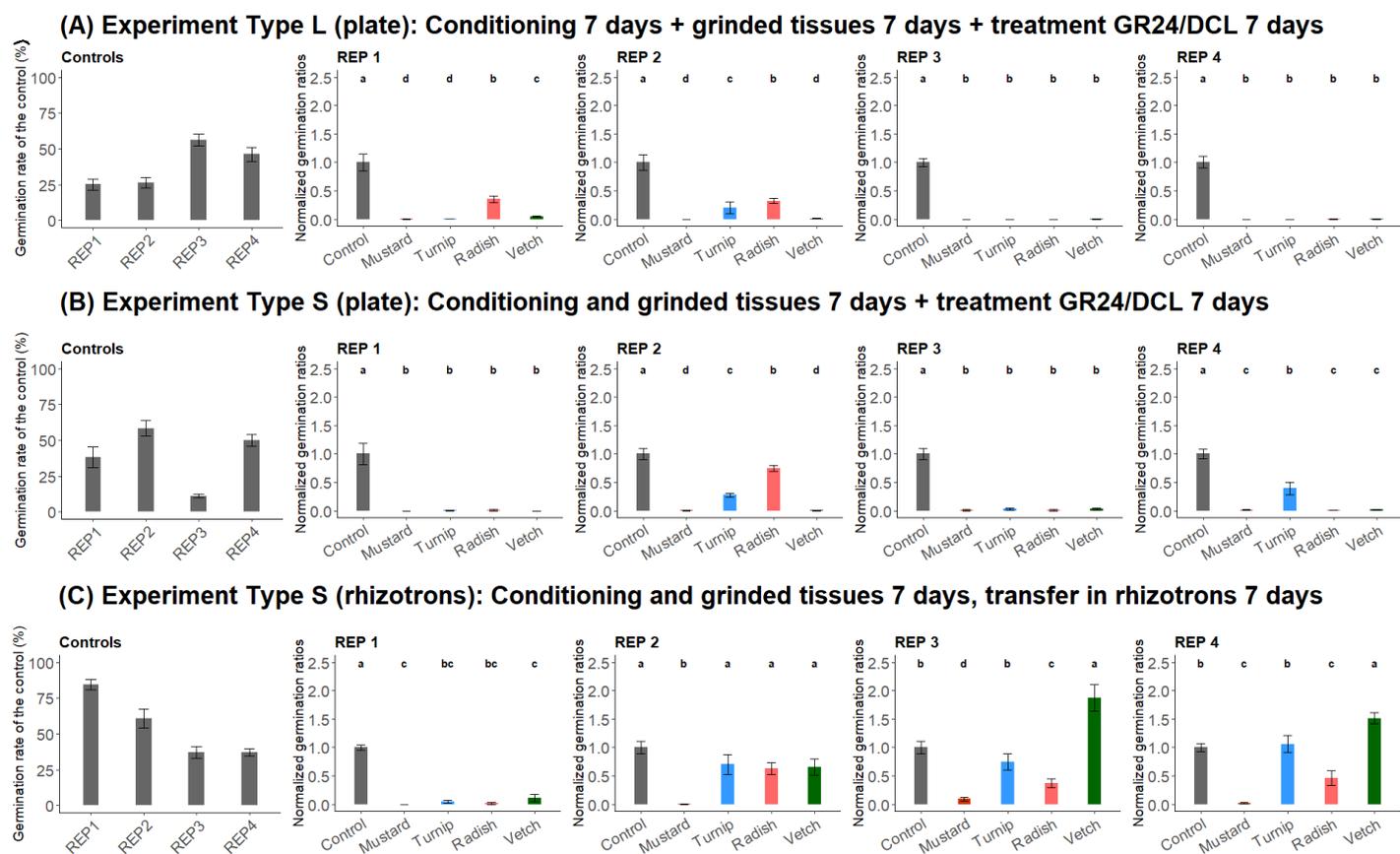
Rather than inducing germination with chemical stimulant (GR24 and DCL), we have exposed *O. cumana* seeds of the type S to sunflower roots exudates through rhizotrons approaches. Sunflower root exudates had enabled mean germination rates of the control that ranged from 37.1% to 84.5%, according to the repetition (Figure 37C), which is overall higher than those observed following the induction using GR24 and DCL (Figure 37A and B).

The inhibitory effect of brown mustard on *O. cumana* seeds was confirmed through the rhizotron approach, as it always led to a significant reduction ( $p < 0.01$ ), reaching 96% to 100% inhibition of the germination, regardless the four repetitions. The inhibition observed following the exposition to the two other Brassicaceae was inconsistent among the repetitions (Figure 37C). Fodder radish led to significant reduction of the germination rates ( $p < 0.05$ ), compared to the control, except

during the second repetition (Figure 37C). Turnip rape grinded tissues were able to reduce significantly ( $p < 0.01$ ) *O. cumana* germination only during the first repetition. Considering purple vetch, the non-Brassicaceae treatment, the observations were inconsistent among the four repetitions. A significant reduction of the germination rate, compared to the control, was observed only during the first repetition ( $p < 0.05$ ). Conversely, the germination rate was significantly higher ( $p < 0.01$ ) following the exposition to purple vetch grinded tissues in the two last repetitions (Figure 37C), compared to the control, suggesting a stimulation of the germination.



**Figure 36** – *Orobanchaceae* germination 7 days after the addition of GR24 and DCL to induce the germination. The pictures were taken for the trial Type S. **(A)** *O. cumana* conditioned in sterile water only, during 7 days before the addition of germination inductors (Control without amendment) white arrowheads show examples of germinating tubes, **(B)** *O. cumana* conditioned in sterile water while exposed to brown mustard grinded tissues for 7 days, before the addition of the germination inductors (GR24+DCL).



**Figure 37** – Effects of grinded tissues (shoots and roots) of Brassicaceae (Brown mustard, turnip rape and fodder radish) and Fabaceae (purple vetch) tissues on *Orobancha cumana* germination rates, following the Type L (A) or Type S (B) of expositions time to Brassicaceae grinded tissues, and an induction of germination using sunflower exudates (C). The raw germination rates of the controls are presented in the left and the germination rate were transformed to germination ratios, with a means of the controls normalized to one. The Brassicaceae and Fabaceae treatments had been normalized subsequently exposition. Each assay was repeated four times (REP1 to REP4) and values represents a mean of 10 replicates for the GR24 and DCL induction of germination approach, and a mean of 5 replicates for the rhizotron induction approach, respectively. Different letters indicate significant differences between the rates according to Kruskal-Wallis multiple pairwise comparison ( $p < 0.05$ ). Error bars represent standard errors.

## II. 2.5. Discussion

The aim of our study was to assess the potential effects of Brassicaceae commonly cultivated in south-western of France on the two soil-borne parasites of sunflower in expansion these last years: *V. dahliae* and *O. cumana*. Through *in vitro* approaches, we have used grinded tissues of three Brassicaceae species (brown mustard, turnip rape and fodder radish) to simulate an artificial biofumigation, allowing the liberation of biocidal compounds such as isothiocyanates. Our results highlight significant inhibitions of both pathogens following their exposition to Brassicaceae species.

The exposition of *V. dahliae* to grinded Brassicaceae led to significant reductions of the development of the fungus, measured by AUC, compared to the control without amendment. The development of the fungus was drastically inhibited, and this inhibition reached 100% in some cases with the fodder radish and turnip rape during the first repetition, and with brown mustard during the second repetition. These inhibitions are in accordance with previous studies that assessed the effects of Brassicaceae *in vitro* on the development of *V. dahliae*, but using other cultivars. For example, Olivier et al. (1999) reported the inhibitory activity of the macerated tissues of various cultivars of black mustard (*Brassica nigra*) and brown mustard had led to up to 100% inhibition of *V. dahliae* mycelial growth, compared to control without amendment, through a similar approach proceed by. The authors used Petri plates with plugs of *V. dahliae* exposed on glass jars containing 25 g of stem and leaves macerated in a food processor, which represents 3.8 times the quantity of fresh material used in our study. It had also been shown that freeze dried brown mustard amended in sterile quartz sand infested with microsclerotia led to significant reductions of the viable microsclerotia, compared to the control without amendment (Neubauer et al., 2014). Moreover, these authors showed that amendments with fodder radish or white mustard were less effective than brown mustard, whereas Seassau et al. (2016) observed that brown mustard and fodder radish both reduced significantly the viable microsclerotia of this fungus using a similar approach to our study. To go further, Olivier et al. (1999) and Neubauer et al. (2014) showed that the suppression of *V. dahliae* was related to an Allyl-ITC compound. This ITC (also

named 2-propenyl-ITC) is a breakdown product of the aliphatic GSL sinigrin. Based on the results of the GSLs analysis of our study (Table A), showing high concentrations of sinigrin in brown mustard tissues ( $39.72 \mu\text{mol gDM}^{-1}$ ), we can also hypothesize that the breakdown products of this aliphatic GSL may have contributed to the *V. dahliae* inhibition. However, *V. dahliae* may not be only sensitive to the breakdown products of this GSL, as we have also observed inhibitions following the exposition to fodder radish and turnip rape, where sinigrin was not detected (Table A). Fodder radish tissues contains high concentrations of the aliphatic glucoraphasatin, whereas turnip rape contains the three profiles of GSL (Table A). Thus, it is to date difficult to precisely address which GSL and breakdown products are involved in the inhibition of *V. dahliae*. However, these observations may suggest that these three Brassicaceae cultivars, which are suitable cover crops for South-Western France, could lead to a protection of sunflower against Verticillium wilt.

Our study also showed that *O. cumana* germination is highly sensitive to the molecules released by grinded tissues of brown mustard, as the exposition of the seeds of the holoparasite to this Brassicaceae led to inhibitions of the germination that reached 100%, compared to the control without amendments. These inhibitions were consistent for the seed's germination induced chemically with GR24 and DCL (Type L and type S), and the seeds induced in rhizotrons, with the exudates of sunflower. The exposition to turnip rape and fodder radish led to inconsistent results. Inhibitory effects of Brassicaceae species had already been observed recently, with only two studies addressing this question, to our knowledge. White mustard (*Sinapis alba*), as grinded tissues or aqueous extractions, reduced significantly *O. cumana* germination, up to 49 % (Pedraza et al., 2015). These results were consistent with those of Strelnikov et al. (2020), obtained through a pot study under greenhouse conditions, using quantities of grinded tissues equivalent to around 3.6 to 4.5 t DM.ha<sup>-1</sup>. The authors reported a decrease of 44.7 % of the infestations of *O. cumana* on sunflower (assessed by the quantity of tubercles and shoots per sunflower plant), when the seeds were exposed to grinded tissues of white mustard (mixed with a sandy substrate). The authors also reported reductions of the infestations after the exposition to black mustard, brown mustard, and rapeseed (*Brassica napus* L.) that reached 27%, 25.9% and 24%, respectively. As hypothesized for *V. dahliae*, the breakdown products of sinigrin may also be involved in the observed suppressions.

Conversely, high concentrations of roots exudates of rapeseed, during hydroponic culture of 100 plants, triggered *O. cumana* seeds germination (Auger et al., 2012), which shows that ITCs may not only suppress *O. cumana*, depending on the species of Brassicaceae used and the concentrations of ITCs produced.

Thus, there is a need to identify the ITCs involved in both inhibitions of *O. cumana* and *V. dahliae* observed in our study. To that aim, it would be interesting to assess directly the effects of GSL combined with myrosinase (to ensure their hydrolysis into biocidal compounds), or the effects of pure ITCs alone available commercially, such as in Auger et al. (2012) for Orobanchaceae and Neubauer et al. (2014) for *V. dahliae*. Moreover, there is an interest to assess a wider diversity of Brassicaceae, and thus various profiles of GSL, to determine the most effective(s) one(s). For example, there are evidences about the efficiency of white mustard to control *O. cumana* as observed by Strelnikov et al. (2020), which may involve different ITCs, as this species is characterized by high concentrations in sinalbin (Couëdel et al., 2018b). Finally, the hydrolysis of GSL also lead to the production of other breakdown products such as nitriles and thiocyanates (Gimsing and Kirkegaard, 2009), which may also have a biocidal activity toward soil-borne pathogens (Brown and Morra, 1997), suggesting that ITCs should not be considered alone as the driver of the inhibitory effects observed.

Beyond the comparison between the efficiency of the three species of Brassicaceae among the same germination induction approach (GR24+DCL), compared to the control without amendment, it is possible to compare this efficiency between the two germination induction approaches. This is possible because the grinded tissues used for the Type S – 96 well plate, where the germination seeds of *O. cumana* was induced with GR24 and DCL, and the Type S where the germination seeds were induced with sunflower exudates through rhizotrons are the same (Figure 2). The results showed that brown mustard had strong inhibition effects for both stimulations approaches, whereas fodder radish and turnip rape were less efficient to reduce *O. cumana* germinations when the seeds germination was stimulated by sunflower roots exudates. This may highlight that the affinity between the induction molecules produced by sunflower, potentially a non-canonical family of strigolactones (Yoneyama et al., 2018), and the receptors presents on *O. cumana*, is

stronger than the one between the synthetic compounds DCL or GR24 and the receptors. Thus, this may prevent the ITCs produced by fodder radish or turnip rape to interact with the receptors of *O. cumana* and inhibit the germination. Further researches are needed to address these hypotheses, using transcriptomic approaches with and without ITCs, and induction molecules.

Interestingly, the only non-Brassicaceae cover crop used in this study (purple vetch) led to contrasting results as it strongly inhibited *O. cumana* germination when seeds were exposed to an induction with GR24 and DCL, whereas significant increases of *O. cumana* germination were observed during the repetition three and the repetition four (Figure 4.C) using the rhizotron approach. The inhibitory effects observed in our study on *O. cumana* has not been reported before to our knowledge. During our study, it seems important to emphasize that the vetch, used for the repetitions that led to stimulations of germination, were sampled when the crop started to freeze. However, it is unclear if it is directly or indirectly related to our observations. Studies conducted in growth chamber showed that inter-cropping host Fabaceae with berseem (*Trifolium alexandrinum*) reduced significantly the germination rates and the number of tubercles of *O. crenata* per plants (Fernández-Aparicio et al., 2010). The authors suggested interactions among berseem root exudates and those of the host plant. More precisely, the authors also suggested allelopathy as the mechanism for *O. crenata* inhibition. Overall, Fabaceae exudates are source of various molecules such as triterpene, sterols and polyphenols (Cimmino et al., 2018), but the molecules involved in the inhibitions observed in our study needs to be assessed. On the other hand, stimulations of *O. cumana* germination were observed through the rhizotron approach. Such stimulation effects of *O. cumana* seeds germination following their exposition to Fabaceae were also reported, compared to an untreated control (Fernández-Aparicio et al., 2009). The species that induced germination were chickpea (19.4%), faba bean (8.2%) and berseem (5%). All the germination rates observed by Fernández-Aparicio et al., 2009 were, however, well below the germination rates induced by GR24 (around 80%) and sunflower exudates (92%) that they observed. The authors concluded that *O. cumana* had an intermediate specialization in root exudates recognition, compared with other Orobanche species such as *O. densiflora*, *O. gracilis* and *O. hederæ* that were highly specialized toward their host crop.

Altogether, these results highlight some potential control effects of *O. cumana* germination (as an inhibitor with brown mustard and eventually an inductor with purple vetch). However, it needs to be assessed in greenhouse and field conditions, as the *in vitro* approach used in this study maximize the liberation and the persistence of biocidal compounds unlike in field conditions, where the ITCs and the other molecules may be loosed rapidly by various ways as volatilization or adsorption to soil organic matter (Gimsing and Kirkegaard, 2009). If the potential control is confirmed, the use of these crops and biofumigation as a control method could be implemented in an integrated pest management strategy. The benefits for sunflower protection against *O. cumana* could increase the bundle ecosystem services provided by Brassicaceae and Fabaceae that are already widely documented on soil physical properties (Blanco-Canqui and Ruis, 2020) and nitrate or nitrogen recycling (Tribouillois et al., 2016; Couëdel et al., 2018b). Regarding *V. dahliae* control, field experiments are also needed but some previous studies showed that the efficiency of the technique to control Verticillium wilt is variable. It had been shown that broccoli residues incorporation reduced significantly Verticillium wilt severity on cauliflower (Subbarao et al., 1999), and fodder radish reduced significantly Verticillium wilt incidence (Couëdel et al., 2021) and severity (Ait Kaci Ahmed et al., 2022) on sunflower, when biomass and weather conditions are favorable, whereas Hartz et al. (2005) observed no reduction of Verticillium wilt on tomato, after an exposition to brown mustard. The efficiency of biofumigation depends on several factors related to the crop and the climate conditions during and after the pulverization and incorporation of the Brassicaceae (Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Ait-Kaci Ahmed et al., 2020). Thus, further field studies are needed to assess and maximize the potential of cover crops and biofumigation for sunflower soil-borne control.

### II.3. Essais complémentaires portant sur les effets des broyats sur l'Orobanche (fixation et émergences)

### II.3.1. Introduction

Afin de permettre de se rapprocher de conditions plus réalistes concernant la durée de l'essai ainsi que la présence de sol, des essais complémentaires en plaques de culture et en pots ont été réfléchis. Ils permettent également de prendre en compte différents facteurs de perte des ITCs (Figure 30) tels que la volatilité, le lessivage et l'adsorption aux particules de matière organique. En effet, l'exposition aux broyats a été réalisée en milieux hermétiques (boîtes en plastiques closes et enveloppées d'aluminium, et verres fermés par des boîtes de Petri scellées avec du Parafilm). Cette limite a été levée dans le cas de l'étude, en plein champ, des effets de la biofumigation, après des cultures intermédiaires de Brassicacées et de Fabacées seules ou associées, sur la Verticilliose du tournesol (Chapitre 3 de la thèse). Concernant l'*O. cumana*, les parcelles expérimentales d'Auzeville étant préservées des infestations de cette plante holoparasite, il n'a pas été possible de mener un essai expérimental en plein champ. Il est à noter qu'un essai préliminaire au champ est en cours chez un agriculteur dans le cadre du projet CIMS-ON (Plant2Pro). Dans le cadre de cette thèse, l'alternative à un essai en plein champ a été la mise en place d'expérimentations en chambres de culture et sous serre. La question scientifique traitée s'intéresse cette fois-ci aux effets que peuvent avoir les broyats de Brassicacées ou de Fabacées sur des phases ultérieures à la germination : celle de la fixation de l'Orobanche aux racines de tournesol, et celle de leur émergence (contrairement aux essais précédents qui s'arrêtaient à la phase de germination). Cela permettrait donc d'évaluer plus précisément les effets des CIMS et de la biofumigation sur la capacité de l'Orobanche à engendrer des dégâts au tournesol (après sa fixation) et à se multiplier (après sa phase d'émergence). Les deux dispositifs mis en place et résultats de ces essais supplémentaires sont détaillés ci-dessous.

### II.3.2. Matériel et méthodes

#### II.3.2.1. Essais en chambre de culture

L'évaluation des effets de broyats de moutarde brune (deux essais) et de vesce du Bengale (un essai) a été réalisée dans un dispositif en plaques de cultures (Figure 38). Le choix de ces espèces s'est fait en fonction des résultats obtenus en plaques 96 puits lors desquels les inhibitions de germination les plus importantes des graines d'*O. cumana* avaient été observées après leur

exposition à ces deux espèces, en comparaison au témoin sans traitement et aux autres Brassicacées utilisées (radis fourrager et navette fourragère).

Le matériel biologique utilisé est détaillé dans le Tableau 5 pour chacun des deux essais.

Tableau 5 – Matériel biologique (pathogène et végétal) utilisé pour chacun des deux essais visant à évaluer les effets de broyats de couverts sur la fixation et l'émergence de l'Orobanche, en chambre de culture

	Essai 1	Essai 2
<i>Orobanche cumana</i>	Population Bourret 2020	Population RCO
Variétés de broyats de couverts	Moutarde brune var. Etamine  (Semé à Auzeville le 08.09.20 puis prélevée en fin de floraison le 29/03/21)	Moutarde brune var. Etamine  Vesce du Bengale var. Titane  (Semé à Auzeville le 08.09.20 puis prélevée en début floraison de la moutarde brune, en Février 2021)
génotype de tournesol	Lignée sensible XRQ (n = 11 répétitions), fournie par le LIPME	Lignée sensible XRQ (n = 11)  Variété sensible MAS82.OL (n = 25), fournies par MAS Seeds

Les graines d'Orobanche ont été directement inoculées dans le substrat épandu dans les alvéoles de la manière suivante : 1,5g de graines d'Orobanche non tamisées, mélangées à 9 L de terreau pour 3 L de sable, pendant 15 min à la bétonnière. Les plaques de culture ont les dimensions suivantes : 5,5 cm \* 5,5 cm \* 16,5 cm. Elles sont remplies avec 200 mL de ce substrat inoculé de graines d'*O. cumana* (Figure 38). Les critères de choix de ce substrat sont (i) son utilisation en

routine par MAS Seeds dans leurs essais sur l’Orobanche car sa texture globalement aérée permet un déracinement facile des plants de tournesol pour le comptage des fixations. En outre, l’utilisation de terreau stérile réduit les risques de contamination du tournesol par d’autres pathogènes, et il permet une bonne imbibition en eau et une bonne rétention de cette dernière. Le sable permet au contraire d’assurer un bon drainage. Il est à noter que le terreau est riche en matière organique (bien que celle-ci n’ait pas été exactement quantifiée), ce qui suggère une adsorption importante des ITCs, réduisant ainsi leur persistance.



Figure 38 – Plaque de culture contenant le substrat inoculé de graines d’Orobanche du tournesol et semée avec les graines de la variété sensible MAS82.OL et l’hybride sensible XRQ. Le traitement présenté sur la photo est le témoin sans broyat (Photo personnelle)

Lors de l’Essai 1, nous avons uniquement testé les effets de broyats de moutarde brune, et nous avons réalisé l’incorporation des broyats dans le substrat selon deux modalités. Ainsi, au lancement de l’essai (J0 sur la Figure 39) nous avons :

- Semer les traitements témoins avec les graines de tournesol
- Semer le tournesol et incorporé les broyats de moutarde brune le jour même pour la modalité Broyat J0 semis du tournesol

- Incorporé les broyats de moutarde brune et le tournesol a été semé 7 jours plus tard, pour la modalité Broyat J-7 semis. Cette modalité permet de se rapprocher des conditions réelles où les couverts broyés sont enfouis dans le sol puis le tournesol est semé (quelques jours à quelques mois plus tard, selon la durée du cycle de développement et la date de destruction du couvert).

Les broyats sont incorporés à raison de 7,7 g de matière fraîche par alvéole, ce qui correspond à environ 4 t de MS.ha<sup>-1</sup>. Les alvéoles étant profondes, elles ont d'abord été remplies à moitié, puis les broyats ont été mélangés à la deuxième moitié du substrat, afin d'éviter un effet de dilution, bien qu'il soit connu que la volatilité des ITCs puisse permettre une action plus loin que le point de contact entre Brassicacée et substrat (Angus et al., 1994b). Un témoin sans broyat, commun à ces deux modalités, a été démarré le même jour que le semis de la modalité pour laquelle les broyats sont enfouis le jour du semis du tournesol (modalité broyat J0 semis du tournesol) (Figure 39).

Juste après l'enfouissement des broyats et du semis du tournesol, le substrat contenu dans les alvéoles est arrosé à l'arrosoir avec une quantité approximative de moins de 25 mL afin de favoriser les germinations des graines de tournesol. Cela a également l'avantage de maximiser l'hydrolyse des glucosinolates en ITCs. Les plaques de culture sont ensuite placées dans des bacs eux-mêmes placés en chambre de culture à 23°C et 25°C, à une photopériode de 16h/8h. L'arrosage des bacs contenant les plaques est équivalent pour toutes les modalités (environ 200mL toutes les 48 à 72h), afin de permettre une humidification du substrat par capillarité, sans lessiver les graines d'Orobanche vers le fond des alvéoles.

Lors de l'Essai 2, nous n'avons conservé que la modalité Broyat J-7 avec un enfouissement de broyats de moutarde une semaine avant le semis du tournesol et l'avons décliné à l'utilisation de broyats de vesce du Bengale. Le déroulement de l'enfouissement des broyats, du semis et de l'arrosage des plaques de culture est le même que pour l'Essai 1, bien que la population d'Orobanche utilisée (RCO) soit différente, et considérée comme plus agressive que Bourret 2020 par les experts (Tableau 5). Il est à noter que lors de ce 2<sup>ème</sup> essai, le témoin sans broyats a été semé une semaine avant les traitements avec broyats, à cause de contraintes en main d'œuvre, les expérimentations étant réalisées en dehors de INRAE. Selon les experts de l'Orobanche à MAS Seeds ayant participé à cette expérimentation, ce délai d'une semaine n'impacte pas les

comptages de fixation et d'émergences. Ces dires d'experts ont été confirmés par les résultats de l'Essai 1 : Deux traitements ayant reçu des broyats de moutarde brune et ayant été semés avec une semaine d'écart a mené à des nombres de fixations ne présentant aucune différence significative. Les différentes étapes des deux répétitions sont résumées dans la Figure 39.

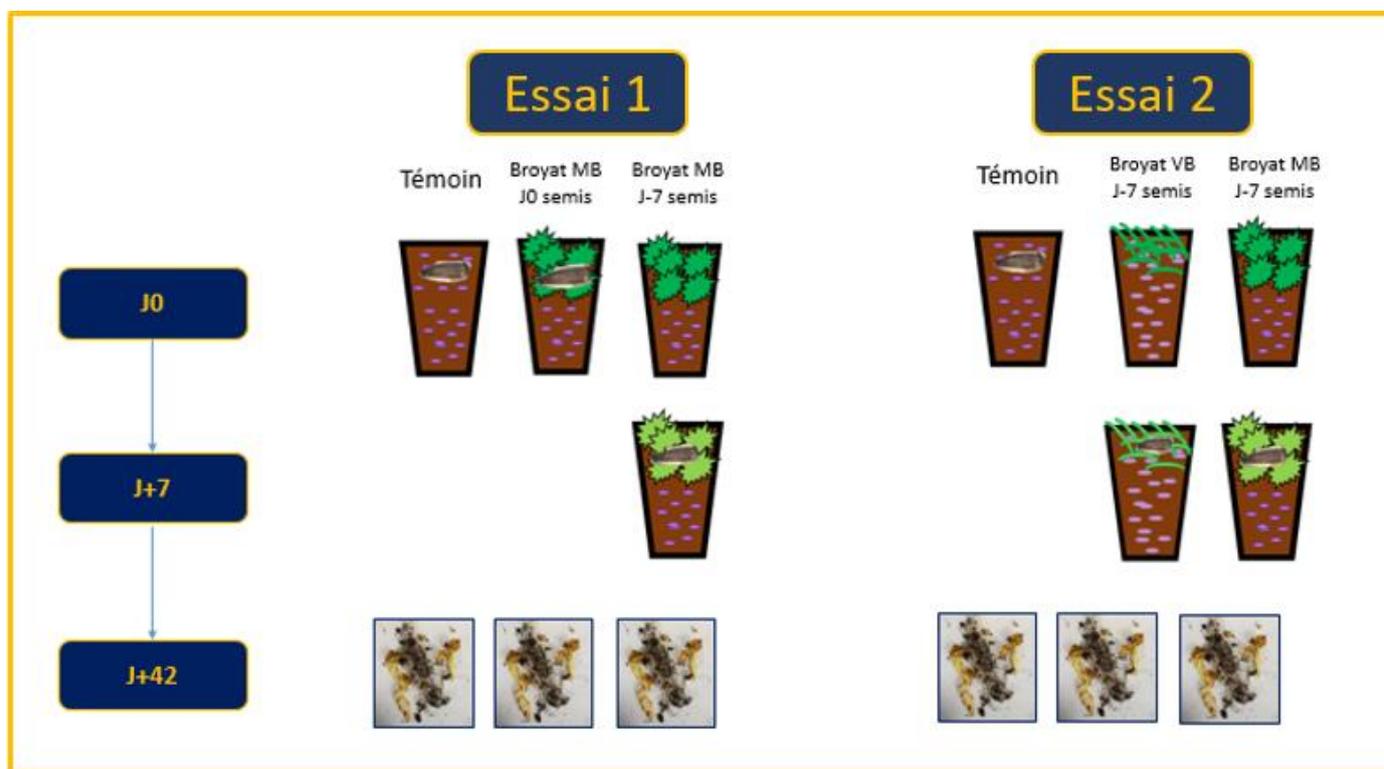


Figure 39 – Schéma des étapes des deux essais de l'essai visant à évaluer les effets de broyats de Brassicacées ou de Fabacées sur la fixation et l'émergence de l'Orobanche du tournesol, en plaques de culture. Lors de l'Essai 1, des broyats de moutarde brune ont été incorporés 7 jours avant le semis du tournesol, ou le jour du semis du tournesol. Lors de l'Essai 2, les broyats de moutarde brune (MB) et de vesce du Bengale (VB) ont été incorporé 7 jours avant le semis du tournesol (J-7). Quarante-deux jours après le semis des graines de tournesol du traitement témoin (correspondant à 36 jours après semis du tournesol des modalités J-7 semis), les orobanches fixées et émergées ont été dénombrées à l'œil nu, selon leur stade de développement.

Lors des deux essais, les comptages du nombre d'Orobanches fixées ont été réalisés, à J+42 des semis du témoin, ce qui correspond à J+36 pour la modalité « Broyat J-7 », puisque le tournesol a été semé 7 jours plus tard (Figure 39). Nous avons comptabilisé à l'œil nu le nombre d'Orobanches émergées ainsi que le nombre d'orobanches fixées, en distinguant les différents stades : nodules, bourgeons et tubercules (Figure 40), après avoir soigneusement déraciné les tournesols et les avoir

délicatement nettoyés sur des tamis afin que le substrat soit éliminé sans que le système racinaire ne soit perdu.



Figure 40 – Stades de développement (nodule, bourgeon et tubercule) de l'*Orobanche cumana* fixée à une racine de tournesol, avant émergence hors du sol. (Photo personnelle)

### II.3.2.2. Essais sous serres

L'essai en plaques de culture décrit ci-dessus est limité dans le temps à cause de la taille restreinte des alvéoles contenues dans les laques de culture, pouvant contraindre le développement du système racinaire. La durée de l'essai a dû prendre fin au bout d'environ 1 mois et demi. Une expérimentation complémentaire visant à évaluer les effets des broyats de Brassicacées et de Fabacées sur une plus longue période sur le nombre d'émergences d'Orobanche a donc été mise en place en pots de 3 L, sous serre. Cet essai a également permis de diversifier les espèces testées en incluant le radis fourrager et la moutarde blanche, qui seraient possibles à utiliser dans le cadre d'une biofumigation en plein champ. Le matériel biologique utilisé est résumé dans le Tableau 6. Les génotypes de tournesols choisis sont la lignée sensible XRQ afin de répéter l'essai et l'hybride commercialisé DKF3333. Les deux sont considérées comme sensibles à *O. cumana*.

Tableau 6 – Tableau récapitulatif du matériel biologique utilisé dans le cadre de l’essai sous serre visant à évaluer les effets de broyats d’espèces de Brassicacées ou de Fabacées sur les émergences de l’Orobanche du tournesol

	Essai sous serre
<i>Orobanche cumana</i>	Population Bourret 2021
Variétés de broyats de couverts	Moutarde brune var. Etamine (prélevée à floraison le 04/01/2022) Moutarde blanche var. Abraham (prélevée à floraison le 16/12/2021) Radis fourrager var. Anaconda (prélevé le 04/01/2022 avant floraison) Vesce du Bengale var. Titane (prélevée le 16/12/2021)
Génotypes de tournesol	Lignée sensible XRQ (n = 10 répétitions), fournie par le LIPME Hybride sensible DKF3333 (n = 10 répétitions), fourni par Syngenta

**a) Conditions de culture des CIMS :** Les échantillons de CIMS utilisée dans le cadre de cet essai sont issus de prélèvements réalisés en plein champ sur des CIMS semées le 31/08/2021 sur une parcelle expérimentale du lycée agricole à Auzeville Tolosane, dans le Sud-Est de Toulouse (43.539 N, 1.489 E). Les semences ont été fournies par Cérence et R.A.G.T et les densités de semis étaient les suivantes : 100 gr.m<sup>-2</sup> pour la moutarde brune et la moutarde blanche, et 80 gr.m<sup>-2</sup> pour la navette fourragère, le radis fourrager et la vesce du Bengale. Les CIMS n’ont reçues aucun traitement phytosanitaire. Les dates de prélèvements été choisies de manière à prélever les Brassicacées lorsqu’elles étaient à floraison, quand c’était possible, et la vesce du Bengale a été prélevée en mi-décembre à cause d’antécédents de gel observés les années précédentes (Tableau 6). Environ 5 kg

de matière fraîche a été prélevée pour chaque CIMS. La méthodologie de rinçage, broyage et stockage des échantillons est similaire à celle décrite dans le matériel et méthodes de la section 2.1. De manière analogue à l'essai en plaques de culture de la 2<sup>ème</sup> répétition, seul le temps d'exposition « Broyat J-7 semis du tournesol » a été testé, et décliné pour les 4 espèces broyées. Les quantités exactes de broyats utilisés sont disponibles dans le tableau 7 et ont été calculés de manière à atteindre l'équivalent de 4 t de MS.ha<sup>-1</sup>. Lors des essais précédents, la même quantité de broyat a été utilisée sans distinction entre espèces. Pour cet essai sous serre, nous avons ajusté les biomasses fraîches utilisées en fonction des pourcentages d'humidité mesurés espèce par espèce (Tableau 7).

Tableau 7 – Quantité de matière fraîche de broyats incorporés dans les godets, en fonction des espèces de CIMS utilisées, calculées à partir des pourcentages d'humidité, afin d'atteindre des quantités équivalentes à 4 t MS.ha<sup>-1</sup>.

CIMS	Humidité de l'échantillon (%)	Quantité de broyats équivalente à 4 t de MS.ha <sup>-1</sup> (g)
Moutarde brune	83,7	12
Moutarde blanche	78,4	9
Radis fourrager	87,8	16
Vesce du Bengale	88,7	17

**b) Substrat inoculé avec les graines d'Orobanche :** Les broyats de CIMS sont enfouis dans un substrat inoculé de graines de Bourret 2021 dans les mêmes proportions que celles décrites dans l'essai en plaques de culture : 1,5g de graines d'Orobanches de la population Bourret 2021 pour 3 L de sable et 9 L de terreau, qui ont cette fois-ci été mélangés manuellement dans des bacs pour homogénéiser la répartition des graines dans le substrat. Des godets (petits pot individuels) de 6,5

x 6,5 cm sont rempli de ce substrat dans lequel les CIMS sont incorporées avec les quantités précisées dans le tableau 7. Chaque godet est arrosé avec un apport d'eau de 15 ml, afin de favoriser l'hydrolyse des GSLs en ITCs et autres produits de dégradation. Les 10 godets de chaque traitement sont placés dans des boîtes hermétiques séparées en fonction des traitements, refermées avec des couvercles et stockés en chambre de culture à 22°C pendant 7 jours, avant le semis du tournesol.

**c) Graines de tournesol :** Les akènes des tournesols utilisés dans le cadre de cet essai sont la variété DKF3333 et la lignée XRQ. Avant le lancement de germination les graines ont été mises à tremper 4h dans une solution de Fluodioxonil ; 0,2L.qt<sup>-1</sup>. Ensuite, elles ont été mises à germer en boîtes de Petri dans du papier filtre imbibé d'eau. Les graines ont été stockées trois jours dans l'obscurité à 22°C pour initier la germination. Une graine présentant un hypocotyle a été semée par godet contenant le substrat inoculé et les broyats incorporés 7 jours plus tôt. Un apport d'eau de 15 ml a été réalisé sur les traitements avec broyats, et de 25 ml pour les témoins pour compenser l'humidité apportée par les couverts. L'arrosage doit être modéré et délicat pour éviter un lessivage des graines vers le fond ou perturber la germination des graines d'Orobanches sensibles aux variations d'humidité. Les godets ont ensuite été conservés en chambre de culture à 22°C et 60% d'humidité pendant 20 jours pour favoriser les émergences de tournesols avant le transfert en serre expérimentale et permettent une action des ITCs prolongée. Les godets contenant des tournesols ont ensuite été transférés à la station expérimentale SETE pour acclimatation pendant 10 jours. Au stade 2 paires de feuilles (Figure 41A), chaque godet a été transféré dans des pots de 3 L rempli de terreau. Un nombre potentiel total de 100 pots aurait dû être repoté en tenant compte des 2 génotypes x 4 espèces de CIMS et du témoin, qui ont tous été répétés 10 fois. Néanmoins, quelques pertes lors des émergences ont réduit ce nombre. Une fois repotés, les pots ont été arrosés par un système de goutte à goutte à raison de 33 mL pendant 10 minutes, 2 fois par jours, 3 fois par semaine (Figure 41A). Des symptômes d'oïdium ont nécessité un traitement au soufre (Soufre trituré ventilé à 97,5% ; dosage 20g.10m<sup>-2</sup>). Une fertilisation azotée a également été réalisée (NPK 17-07-27 (0,6 gr. l<sup>-1</sup>) et correcteur de carence en fer et autres nutriments (Hortilion © 0,46gr. l<sup>-1</sup>), par ferti-irrigation.

Les premières émergences d'Orobanche ont été observées un mois après le repotage (Figure 41B). Un comptage hebdomadaire des émergences a dès lors été effectué chaque semaine jusqu'à atteinte d'un plateau des émergences. Ces comptages ont été réalisés à 7 dates, de 57 jours après semis à 98 jours après semis. Des mesures de hauteurs des plants de tournesol ont également été réalisés à chaque date de notation du nombre d'émergences.



Figure 41 – Aperçu de pots de l'essai sous serre contenant les tournesols et le substrat inoculé avec de l'Orobanche, (A) irrigué automatiquement par un système de goutte à goutte (B) présentant des émergences d'Orobanche (photos prises par Léa MOUYSSSET)

### II.3.2.3. Analyses des résultats des essais en plaques de culture et en serre

1. Les données de comptage de fixation et d'émergences d'Orobanche observées lors de l'essai en chambre de cultures en plaques de culture :

Les deux répétitions et les deux génotypes ont été analysés séparément. Lors de la deuxième répétition, des taux d'infestations ont été calculés à partir des données de comptages de fixation (tous stades cumulés), car certaines répétitions contenaient deux tournesols au lieu d'un seul. Ces taux consistent à diviser le nombre d'Orobanche par le nombre de tournesols par alvéoles.

2. Les données d'émergences d'Orobanche lors de l'essai sous serre ont été analysées afin d'évaluer l'effet du traitement (espèces de CIMS ou témoin) sur le nombre d'Orobanches.

L'hétérogénéité des variances des données n'ont pas permis d'utiliser des ANOVAs à un facteur pour évaluer les effets des traitements (CIMS ou témoin) sur le nombre d'Orobanches ou le taux d'infestation. Des tests de Kruskal-Wallis et les comparaisons multiples qui lui y sont associés ont donc été utilisés. Le seuil de significativité a été fixé à  $p = 0,05$ . Les analyses ont été réalisées avec le logiciel Rstudio version 4.0.5, à l'aide de la fonction `kruskal` du package `Agricolae`.

### II.3.3. Résultats

#### II.3.3.1. Effets des broyats sur *Orobanche cumana* observé lors des essais en chambres de culture

Lors de la première répétition, le nombre moyen de fixations observées (tous stades de développement de l'Orobanche cumulés) est de 14,9 fixations par tournesol sur le témoins sans traitement (Figure 42a). L'incorporation de broyats de moutarde brune a mené à des réductions significatives du nombre de fixations, pouvant atteindre en moyenne 9,9 fixations en moins, sans qu'il n'y ait de différences entre le broyats incorporés à J0 et les broyats incorporés à J-7 du semis du tournesol (Figure 42a). Il est également à noter que les tournesols traités avec ce broyats de moutarde brune incorporé le jour du semis du tournesol (Broyats MB J0), ne présentaient aucune émergence d'Orobanche.

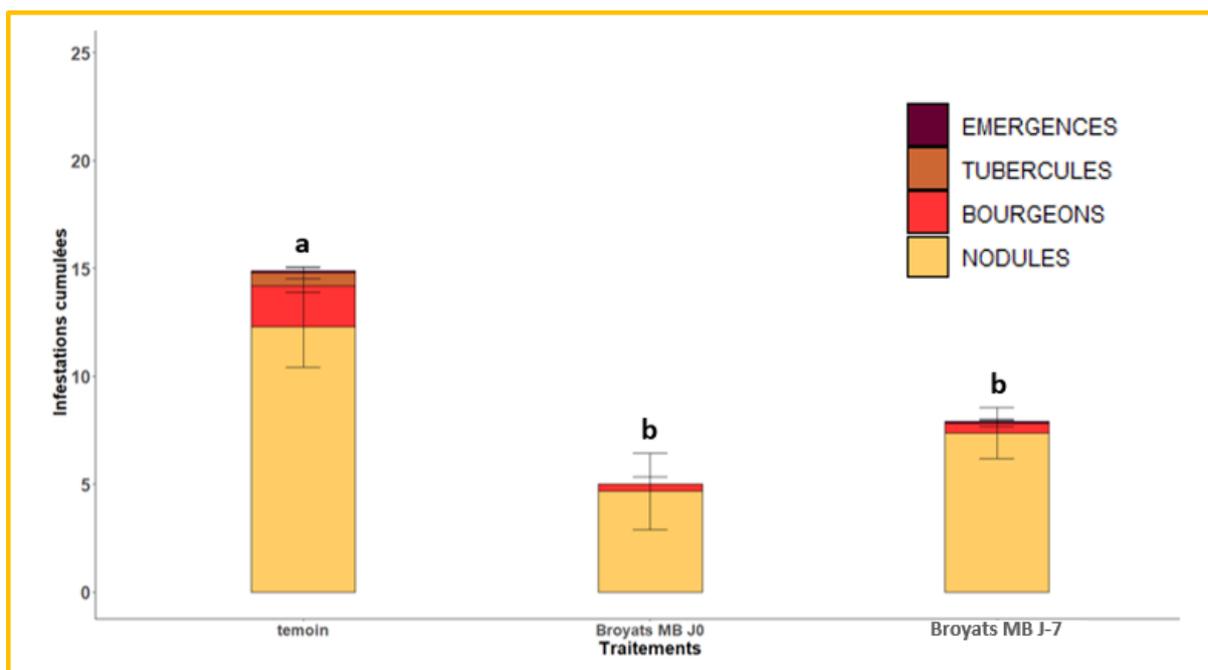


Figure 42a – Nombre d’Orobanches fixées au système racinaire de tournesols (Lignée sensible XRQ) selon différents traitements qui sont le témoin et les broyats de moutarde brune incorporés le jour du semis du tournesol (J0) ou J-7 avant le semis du tournesol, tous stades de développement de l’Orobanche cumulées. Les barres d’erreurs représentent les erreurs standards. Des lettres différentes représentent des différences significatives entre traitements ( $p < 0.05$ ).

Lors de la deuxième répétition, les broyats testés étaient obtenus à partir de moutarde brune et de vesce du Bengale, enfouis à une seule date qui était à J-7 semis du tournesol. Les résultats observés lors de la première répétition ont été confirmés sur l’hybride sensible MAS 82.OL. Le taux moyen d’infestation tous stades cumulés était de 23,36 orobanches par tournesols pour le traitement témoin, contre 13,66 et 8,12 orobanches fixées par tournesols des modalités broyats VB J-8 et broyats MB J-7, respectivement. Ces taux sont significativement ( $p < 0,01$ ) inférieurs à ceux observés sur le témoin sans traitement. L’utilisation de broyats de moutarde brune a par ailleurs significativement ( $p < 0,01$ ) réduit ce taux en comparaison avec l’utilisation de vesce du Bengale. Aucune tendance n’a été observée concernant d’éventuelles différences entre stades de développement de l’Orobanche (Figure 42b), ce qui suggère que l’action des ITCs se fait précocément (inhibition de la germination ou réduction des fixations). En revanche, les résultats de cette deuxième répétition n’ont pas permis de confirmer les résultats obtenus lors de la première répétition sur la lignée sensible XRQ. Les taux d’infestations d’Orobanches étaient en moyenne de 11,8 orobanches par tournesol, contre 6,11 et 7,22 fixées sur les tournesols des modalités « Broyat

MB J-7 » et « Broyat VB J-7 », respectivement, sans que les différences entre le témoin et les traitements ne soient significatives (Figure 42).

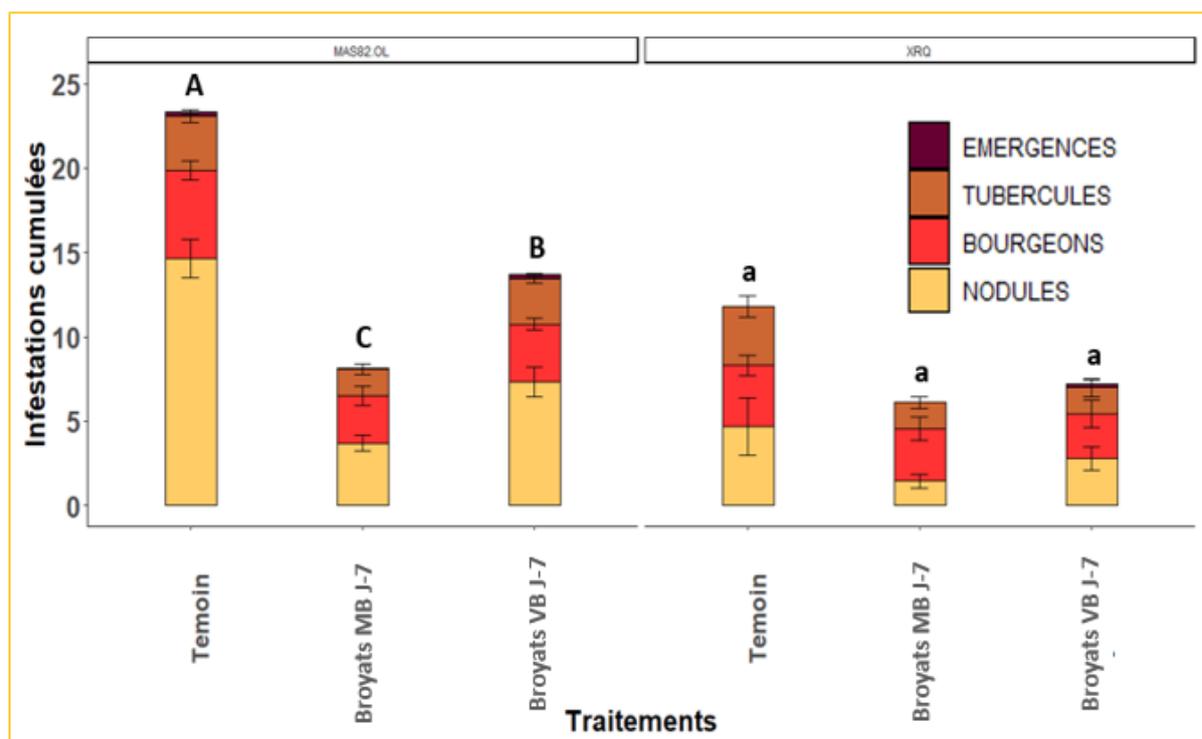


Figure 42b – Nombre d’Orobanches fixées au système racinaire de tournesols (Lignée sensible XRQ ou hybride sensible MAS82.OL) selon différents traitements, qui sont le témoin, les broyats de moutarde brune et les broyats de vesce du Bengale (tous deux incorporés à J-7 semis du tournesol), tous stades de développement de l’Orobanche cumulées. Les barres d’erreurs représentent les erreurs standards. Des lettres différentes représentent des différences significatives entre traitements ( $p < 0,05$ ).

### II.3.3.2. – Effets des broyats de Brassicacées ou de Fabacées sur les émergences de *Orobanche cumana* observés lors des essais sous serre

La Figure 43 représente le nombre total d’Orobanches ayant émergé à la dernière date de notation pour les génotypes XRQ (Figure 43A) et DKF3333 (Figure 43B), soit 98 jours après le semis du tournesol. Le nombre moyen d’Orobanches émergées a globalement varié entre 5 et 20 Orobanches, tous traitements et tous génotypes confondus. A la dernière date de notation, aucune différence n’a été observée entre le nombre d’Orobanche émergées des traitements témoins en comparaison aux traitements ayant reçu des broyats de Brassicacées ou de Fabacées, malgré quelques tendances de réduction du nombre d’émergences, durant le suivi global qui n’ont pas été

observées avec la lignée XRQ (Figure 44) mais qui ont été observées avec les traitements radis fourrager et moutarde blanche avec l'hybride sensible DKF3333 (Figure 45).

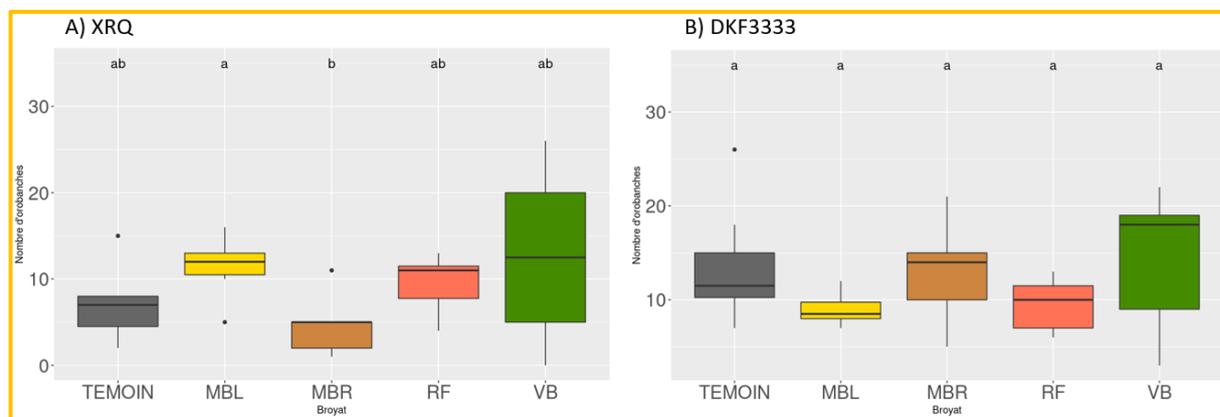


Figure 43 – Nombre d'émergences d'Orobanche dans des pots de 3 L semés avec un tournesol de la lignée sensible XRQ (A) ou de la variété sensible DKF3333, des pots (hors les témoins) ayant reçu des broyats de différentes espèces de CIMS : MBL = Moutarde blanche ; MBR = Moutarde brune ; RF = Radis fourrager ; VB = Vesce du Bengale. Des lettres différentes représentent des différences significatives entre traitements ( $p < 0,05$ ).

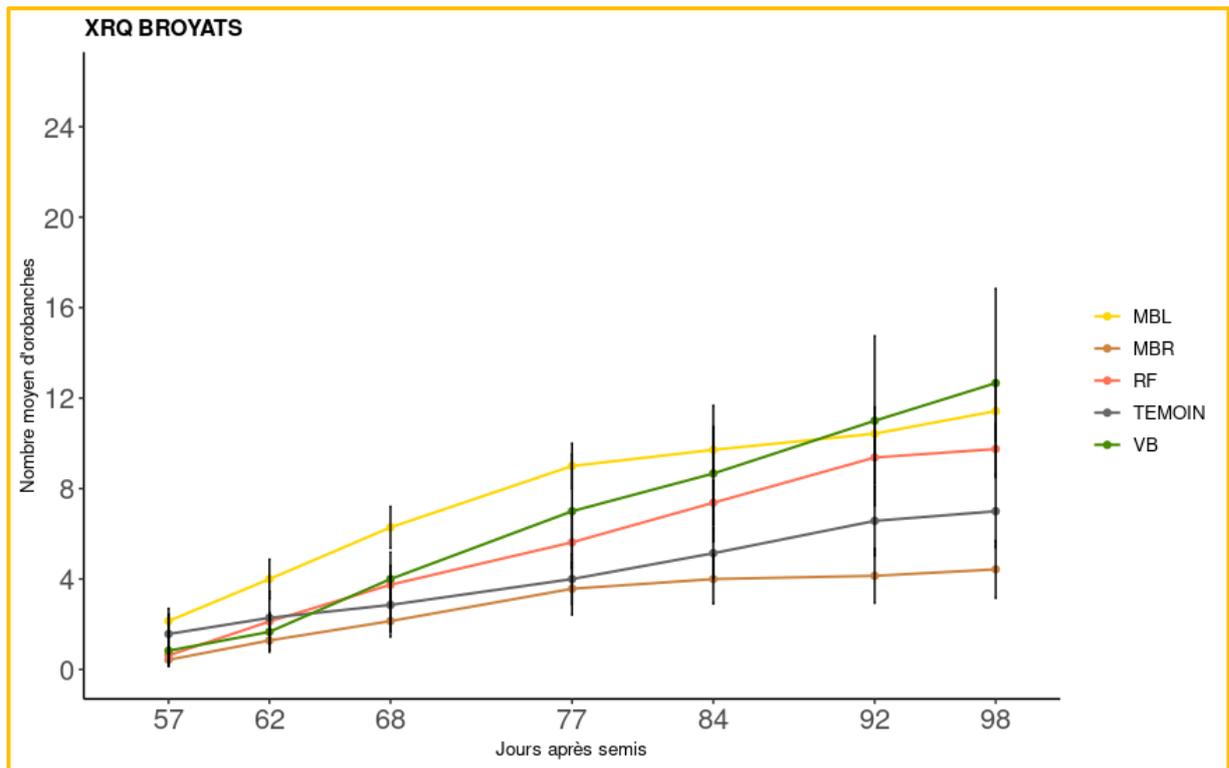


Figure 44 – Nombre d’émergences d’Orobanche dans des pots de 3 L semés avec un tournesol de la lignée sensible XRQ, en fonction du nombre de jours après semis et des pots (hors les témoins) ayant reçu des broyats de différentes espèces de CIMS : MBL = Moutarde blanche ; MBR = Moutarde brune ; RF = Radis fourrager ; VB = Vesce du Bengale. Les barres d’erreurs représentent les erreurs standards. Aucune différence significative n’a été observée entre le témoin et les traitements ayant reçu des broyats, lors de la dernière date de comptage (98 JAS).

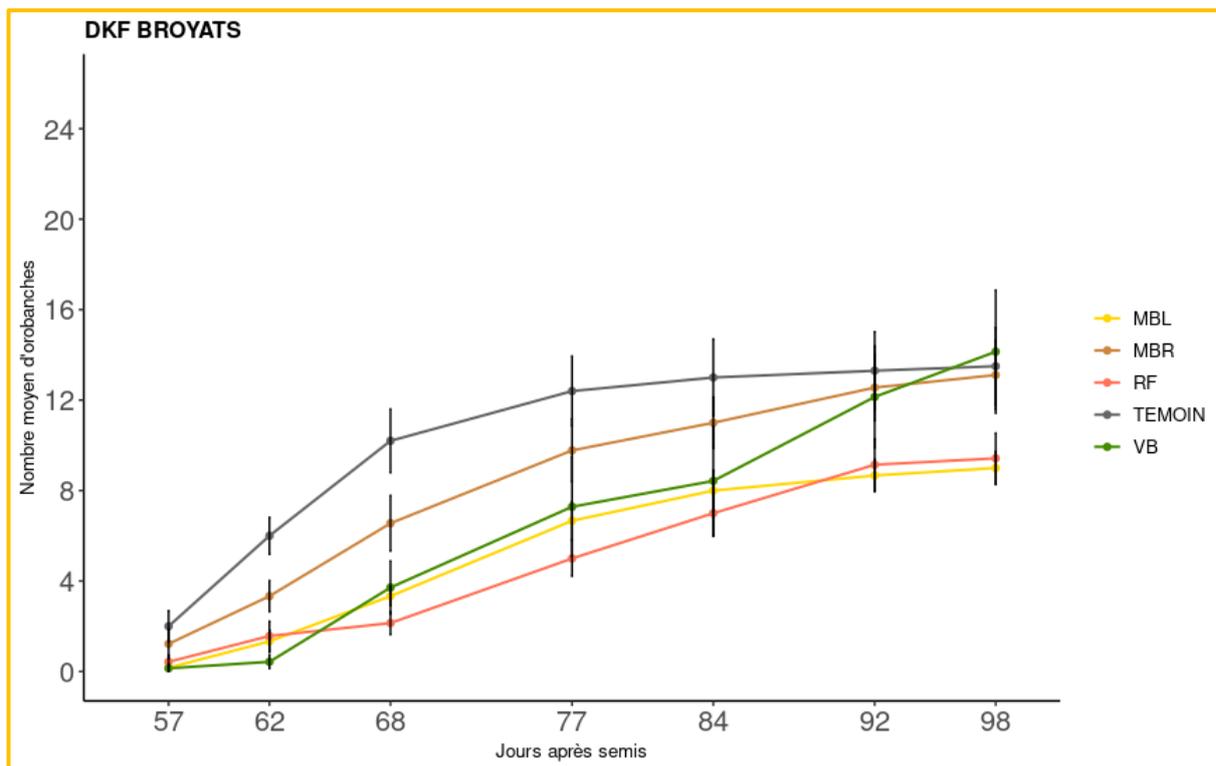


Figure 45 – Nombre d’émergences d’Orobanche dans des pots de 3 L semés avec un tournesol de la lignée sensible DKF3333, en fonction du nombre de jours après semis et des pots (hors les témoins) ayant reçu des broyats de différentes espèces de CIMS : MBL = Moutarde blanche ; MBR = Moutarde brune ; RF = Radis fourrager ; VB = Vesce du Bengale. Les barres d’erreurs représentent les erreurs standards. Aucune différence significative n’a été observée entre le témoin et les traitements ayant reçu des broyats, lors de la dernière date de comptage (98 JAS).

Concernant les notations de hauteurs de tournesols, réalisées conjointement aux comptages du nombre d’Orobanches émergées, elles ont permis d’observer des différences entre les deux génotypes (Figure 46). Les plantes XRQ ont présenté des hauteurs moyennes entre 0,2 et 0,6 m tous traitements confondus lors des dernières dates de notation, tandis que les DKF3333 ont des hauteurs moyennes supérieures à 0,5 m. Quel que soit le génotype, il a également été possible d’observer que les tournesols ayant reçu un traitement avec des broyats de vesce du Bengale avaient tendance à présenter des hauteurs plus élevées que les autres traitements, avec des tournesols atteignant 1 m pour les génotypes DKF3333 cultivés après incorporation de la vesce du Bengale, à la fin de l’expérimentation. Enfin, les tournesols du traitement témoin ont toujours eu tendance à présenter les hauteurs les plus faibles (Figure 46). A la dernière notation, ces différences de hauteur entre les tournesols cultivés après un témoin sans broyats ou de la Vesce du Bengale

étaient non significatives ( $p > 0,05$ ) pour le génotype XRQ (Figure 46a) et significatives ( $p < 0,01$ ) pour le génotype DFK (Figure 46b).

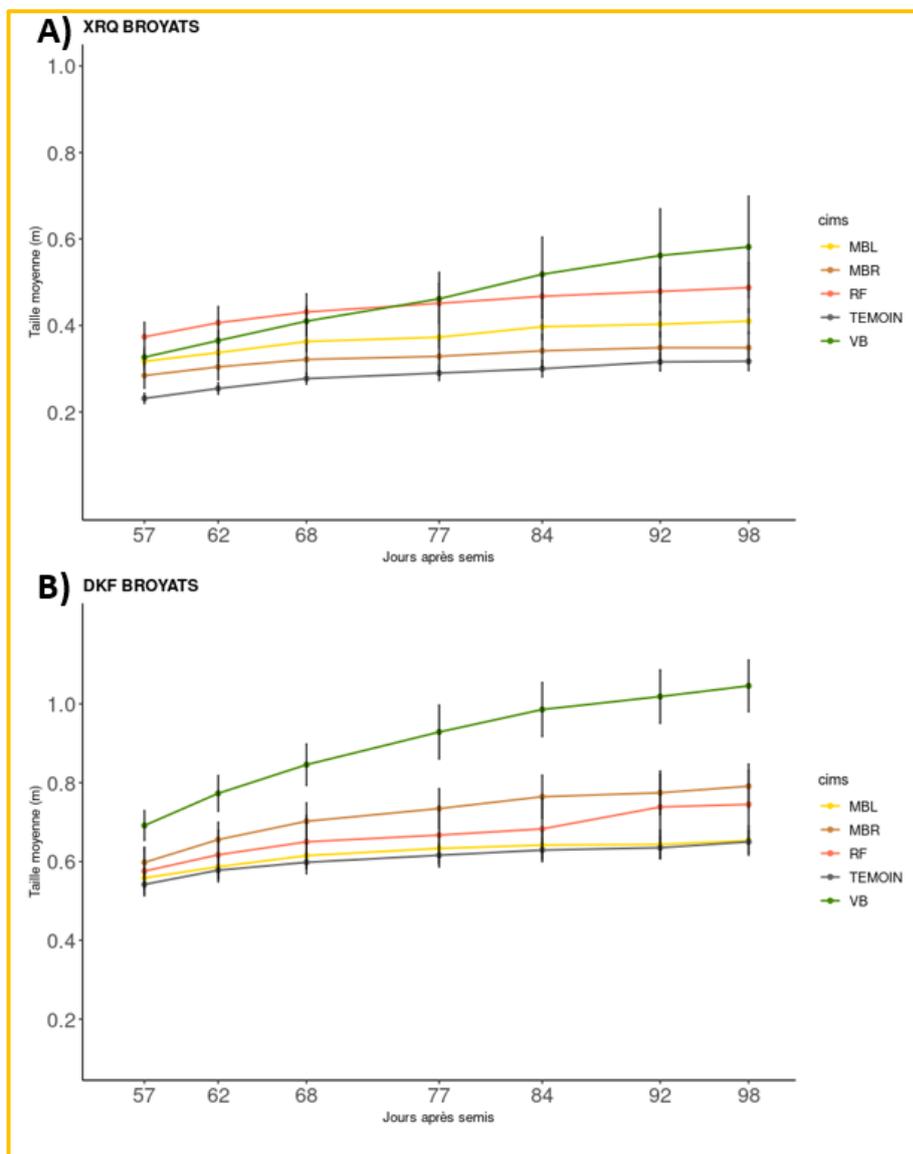


Figure 46 – Hauteurs moyennes des tournesols (A) Du génotype XRQ et (B) du génotype DFK3333, cultivés après différents traitements de CIMS : Moutarde blanche (MBL), Moutarde brune (MBR), Radis fourrager (RF), Vesce du Bengale (VB) et témoin sans apports de broyats. Les hauteurs ont été mesurées en fonction du nombre de jours après semis (entre 57 et 98 jours après semis). Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

### II. 3. 4. Discussion

Des expérimentations en pots, permettant d'intégrer du substrat inoculé d'Orobanche (terreau avec sable) et d'y cultiver du tournesol. Elles permettent aussi de prolonger la durée de l'expérimentation jusqu'à la floraison des tournesols (dernière observation réalisée 96 jours après le semis), en comparaison aux expérimentations en plaques 96 puits ou mini-rhizotrons

(observations 7 jours après le traitement avec les inducteurs de germination ou la mise en contact avec des plantules de tournesols), ou en plaques de cultures (environs 1 mois après le semis). Ces expérimentations ont abouti à des résultats variables lors du comptage du nombre de fixations et / ou d'émergences. En effet, les résultats des essais en plaques de culture ont permis d'observer des réductions significatives des nombres de fixations cumulées lors des deux essais mis en place (Essai 1 et Essai 2), mais aucun effet des broyats de Brassicacées ou de Fabacées n'a été observé lors de ces essais en pots. L'absence de régulation significative en pots peut s'expliquer par la richesse du terreau en matière organique, connue pour adsorber fortement les ITCs (Neubauer et al., 2014). Il n'est pas aussi à exclure que les molécules testées dont les effets biocides ont été observées en dispositifs réduisant leur volatilité n'aient pas été produites en quantités suffisantes pour réguler efficacement *O. cumana*, ou que leur faible persistance n'ait pas permis une durée de contact suffisante.

## II.4. Discussion et conclusions du chapitre

Les expérimentations menées dans le cadre de ce chapitre avaient comme hypothèses de départ des réductions du développement du mycélium de *V. dahliae* ainsi que la formation de ses microsclérotés grâce aux broyats de Brassicacées. Les mêmes effets des Brassicacées étaient supposées concernant l'Orobanche, à ses différents stades de développement (germination, fixation, émergences). Les observations réalisées ont permis d'identifier un potentiel biofumigant prometteur des Brassicacées testées afin de réduire voire de complètement inhiber le développement du *V. dahliae* ou la germination de l'*O. cumana* et de valider ces hypothèses, en fonction des approches utilisées. Les approches *in vitro* employées dans la première partie du chapitre permettent de maximiser la libération et la persistance des molécules biocides, telles que les ITCs, puisqu'elles sont conduites en milieux confinés (boîtes hermétiques dans le cas de *O. cumana* et verres scellés avec boîte de Petri et parafilm dans le cas de *V. dahliae*). Ces approches ont conduit aux régulations les plus efficaces, et permettent de suggérer que les molécules volatiles libérées par les broyats sont impliquées dans ces régulations. En effet, cette approche permet d'isoler cet effet d'autres processus possibles en plein champ (enrichissement du sol en azote, en

matière organique, stimulation de communautés microbiennes, etc...). De plus, les mesures de GSLs permettent de mettre en évidence des concentrations élevées en sinigrine dans les tissus de moutarde brune. Cette concentration élevée concernant cette espèce est en accord avec la littérature (Merah, 2015; Couëdel et al., 2018) et les quantités d'ITCs issus de la sinigrine ont déjà été corrélées avec des observations de régulation de *V. dahliae* (Olivier et al., 1999 ; Neubauer et al., 2014). De telles analyses n'ont pas pu être réalisées dans le cadre de ce travail de thèse car les concentrations de GSLs ont été analysés selon 3 répétitions issus du même échantillon, qui a été prélevé en même temps que ceux utilisés lors de l'expérimentation, mais sans qu'il n'y ait de lien entre ces 3 répétitions et les répétitions de l'expérimentation. De plus, les GSLs eux même ont une activité biocide très faible voire inexistante (Brown and Morra, 1997). Une perspective afin de mettre en lien régulation et molécule biocide serait donc de mesurer les ITCs, en réalisant une voire plusieurs mesures pour chaque espèce de Brassicacée testée mais également pour chaque répétition de l'essai.

Ces approches ont été complétées par des expérimentations en pots, qui permettent de prolonger la durée de l'expérimentation et de pouvoir faire des observations sur les nombres d'émergences d'Orobanche. Ces dispositifs augmentent également les sources de pertes d'ITCs, avec des volatilités plus importantes, et leur adsorption au substrat, particulièrement riche en matière organique, matière connue pour interagir avec les ITCs (Neubauer et al., 2014). Aucune espèce de broyat n'a permis de réduire significativement les nombres d'émergences d'Orobanche, contrairement à ce qui avait été observé lors des phases de germination et de fixation. Des pistes afin d'optimiser les processus de régulation en pots seraient d'utiliser des sols prélevés en plein champ, dont les teneurs en matière organique seraient plus réalistes (et plus faibles) que celles d'un terreau. Il y aurait aussi un intérêt à utiliser des variétés de Brassicacées aux concentrations plus élevées en GSLs, permettant d'augmenter les quantités d'ITCs produites. Ce choix de nouvelles variétés passerait par un screening des profils de Brassicacées et pourrait s'accompagner par de la sélection pour répondre à cet objectif. Ces premiers résultats doivent en tout cas encourager la mise en place d'essais supplémentaires, dans l'objectif de réaliser de nouvelles répétitions

expérimentales voire également d'évaluer les effets d'autres variétés ou espèces de Brassicacées ou de Fabacées.

Il y a un intérêt à évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation en plein champ, car même si les effets des ITCs s'avèrent trop faibles car les molécules pourraient être trop rapidement perdues, l'ensemble des processus entrant en jeu après une biofumigation peuvent potentiellement engendrer des réductions des infestations d'Orobanche. En effet, l'enrichissement du sol en azote pourrait potentiellement avoir un impact sur le développement de l'Orobanche et le nombre d'émergences, bien que les processus soient encore mal caractérisés. Au laboratoire, Westwood and Foy (1999) avaient démontré que l'ammonium avait une action inhibitrice sur l'élongation de la racine de différentes espèces d'Orobanches (sans que *O. cumana* n'ait été testée). Lors d'un essai en culture hydroponique, Labrousse et al. (2010) ont mis en évidence que l'augmentation des concentrations du milieu en macro et micro-éléments conduisait à des réductions d'infestation de *O. cumana* en augmentant le nombre de parasites nécrosés observés sur un génotype sensible de tournesol, ou en diminuant le nombre d'orobanches fixées ou leur développement ultérieur, sur des génotypes résistants de tournesol. Les auteurs suggèrent que ces observations peuvent être dues à des modifications des forces puits, ou à des effets toxiques de l'azote qui perturberait le métabolisme de la plante parasite. Enfin, en plein champ, il semblerait au contraire que le nombre d'Orobanches émergées aux pieds de tournesols soit favorisé par des semis tardifs et des augmentations en eau et en azote, ce qui pourrait s'expliquer par le meilleur développement du tournesol se traduisant par une meilleure capacité à servir d'hôte à l'Orobanche (Grenz et al., 2008). La variabilité élevée du nombre d'émergences observé dans le cadre de notre étude en pots ne permet pas pour l'instant d'avoir d'informations sur la question et ce bien qu'il soit probable que la minéralisation de l'azote soit bien avancée, puisque le relargage de l'azote peut débuter moins d'une trentaine de jours après enfouissement de partie aériennes ou racinaires de Fabacées (De Notaris et al., 2020), et comme peut le suggérer l'augmentation des tailles moyennes des tournesols qui a pu être observée. Ainsi, des essais supplémentaires sur cette question semblent nécessaires à mener.

**Chapitre III** – Evaluation des effets des cultures intermédiaires multi-services et de la biofumigation sur la protection du tournesol contre la Verticilliose du tournesol et sur la productivité de la culture

### III.1. Introduction générale du chapitre

Le chapitre précédent a permis d'identifier des cultures au potentiel biofumigant prometteur, ayant mené en conditions contrôlées à une réduction significative du développement du champignon tellurique *Verticillium dahliae*. L'objectif de ce 3<sup>ème</sup> chapitre est d'évaluer en plein champ les effets des CIMS et de la biofumigation sur les dégâts et les dommages de la Verticilliose du tournesol. Pour ce faire, quatre années d'expérimentation en plein champ ont été menées dans des parcelles expérimentales naturellement infestées par *V. dahliae* ainsi qu'une année dans une parcelle chez un agriculteur. Ce chapitre est décomposé en trois parties principales :

Une partie présentant les résultats des essais menés pendant quatre ans à Auzeville en parcelles expérimentales, qui ont été valorisées dans la revue *Agronomy* : Ait Kaci Ahmed, N., Galaup, B., Desplanques, J., Dechamp-Guillaume, G., & Seassau, C. (2022). Ecosystem Services Provided by Cover Crops and Biofumigation in Sunflower Cultivation. *Agronomy*, 12(1), 120. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010120>. La thèse ayant démarré en Avril 2019, il est à noter que les données relatives aux deux premières années de cette essai ont été obtenus avant le démarrage de ce présent travail de thèse, grâce à la contribution de Jérémy Desplanques et Benoit Galaup, des stagiaires du projet CASDAR Crucial, financé par le ministère de l'Agriculture et par la région Occitanie. Les données des deux années suivantes ont été obtenues durant ce travail de thèse et j'ai été appuyé par des stagiaires et l'équipe technique de l'UMR AGIR. Plus précisément, les données relatives aux cultures intermédiaires semées en 2018 (considérée comme l'année AUZ19) avaient été recueillies uniquement grâce à la mobilisation de l'équipe technique, la thèse ayant démarré juste avant le semis du tournesol de l'année AUZ19. Enfin, il est à noter que ces 4 années d'essais à Auzeville n'ont pas été réalisées sur les mêmes parcelles, à l'exception des années notées AUZ19 et AUZ20 où la même parcelle a été utilisée deux années de suite (du fait de l'absence d'autres parcelles infestées par la Verticilliose disponible, à notre connaissance).

Une partie présentant des résultats complémentaires obtenus à Auzeville en 2020 afin d'évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur une variété très peu sensible à la Verticilliose (variété TPS), suivant le même dispositif que celui présenté dans l'article. Cette variété, sélectionnée et conseillée par MAS Seeds est donc considérée comme moins sensible à la Verticilliose que la variété sensible utilisée lors des quatre années d'essais. Il est attendu de cette variété qu'elle présente des dégâts et dommages dus à la Verticilliose moins sévères que ceux présentés par la variété sensible. Elle permettrait d'évaluer la possibilité de mettre en œuvre une lutte intégrée contre la Verticilliose, combinant biofumigation et résistance variétale, et aboutissant à des régulations importantes de la Verticilliose. Les rendements en grains du tournesol pourraient donc être significativement plus élevés suite aux Brassicacées, en comparaison au témoin sans cultures intermédiaires, grâce à cette lutte intégrée. Enfin, ce chapitre contient une partie présentant d'autres résultats complémentaires obtenus lors d'un essai chez un agriculteur (32). L'objectif scientifique assigné à cette partie est d'évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation pour la

protection du tournesol selon un itinéraire technique mis en place par un agriculteur, se rapprochant donc d'avantage des contraintes agronomiques et techniques pouvant être rencontrées dans le Sud Ouest de la France lors de la mise en œuvre de ce potentiel levier agroécologique dans la lutte de la Verticilliose. En effet, elles peuvent être nombreuses et parfois insoupçonnées en comparaison à des essais menés en parcelles expérimentales à Auzeville, où elles peuvent également être levées afin d'assurer l'essai (en intervenant avec une irrigation lorsqu'elle est nécessaire, ou en désherbant manuellement).



# Ecosystem Services Provided by Cover Crops and Biofumigation in Sunflower Cultivation

Neila Ait Kaci Ahmed <sup>1</sup>, Benoit Galaup <sup>1</sup>, Jérémy Desplanques <sup>1</sup>, Grégory Dechamp-Guillaume <sup>2</sup> and Célia Seassau <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> INRAE, UMR AGIR, Université Fédérale de Toulouse, 31326 Castanet-Tolosan, France; neila.ait-kaci-ahmed@inrae.fr (N.A.K.A.); benoit.galaup@inrae.com (B.G.); jeremy.desplanques@inrae.fr (J.D.)

<sup>2</sup> INRAE, INP-ENSAT, UMR AGIR, Université Fédérale de Toulouse, 31326 Castanet-Tolosan, France; gregory.dechamp@toulouse-inp.fr

<sup>3</sup> INRAE, INP-EIP, UMR AGIR, Université Fédérale de Toulouse, 31326 Castanet-Tolosan, France

\* Correspondence: celia.seassau@purpan.fr

**Abstract:** In south-western France, sunflower are usually grown in short rotations and after a long fallow period during which soils are left bare. This practice can favour diseases, caused by soilborne fungi, such as sunflower verticillium wilt (SVW), as well as nitrate leaching, both of which can decrease yields. Growing cover crops during a fallow period is an agroecological practice that can provide ecosystem services and mitigate SVW. A Brassicaceae cover crop that causes biofumigation produces glucosinolates and liberate biocidal compounds that might regulate SVW biologically. Moreover, the green manure effect of the Fabaceae might increase soil mineral nitrogen (SMN). To go further, mixtures of Brassicaceae and Fabaceae might mutualise the benefits that each cover crop has in sole crops. A four-year field study in south-western France tested Brassicaceae (brown mustard, turnip rape and fodder radish) and Fabaceae (purple vetch) in sole crops or a mixture with two or three species during the fallow period, followed by biofumigation, and sunflower crop. The cover crops were characterised, SMN was measured, the SVW and yield were assessed and compared to those of the crop grown on soils left bare during the fallow period. Purple vetch as a sole crop cover crop significantly increased SMN before sunflower sowing but only in 2019. Fodder radish as a sole crop reduced SVW severity significantly, overall, 80 days after sowing, except in 2019, when weather conditions were unfavourable to biofumigation. Purple vetch as a sole crop also reduced significantly SVW severity in 2017 and 2020. Finally, sunflower yields after cover crops were higher than those after bare soils, only after purple vetch as a sole crop in 2020, with a mean increase of 0.77 t ha<sup>-1</sup>. Mixtures of Brassicaceae and Fabaceae sowed at these densities resulted in an intermediate SMN level between those in sole crops and the bare soil and they did not significantly decrease SVW or increase yields. Our results suggest that, cover crops, especially fodder radish or purple vetch, and biofumigation can provide ecosystem services and increase sunflower yield instead of leaving soils bare during the fallow period. However, the extent of ecosystem services is markedly affected by soil and climatic conditions as well as other management practices.

**Keywords:** agroecological protection; *Helianthus annuus*; *Verticillium dahliae*; Brassicaceae; Fabaceae; glucosinolates; verticillium wilt

---

## III.2.1. Introduction

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the main oilseed crops grown worldwide, reaching 57.1 million t of seed produced in 2019–2020 [1]. Mainly cultivated for its oil [2], sunflower has many agroecological benefits [3]. Sunflower is considered a drought-tolerant crop that uses limited water resources efficiently [4]. It readily captures soil nitrogen (N) not taken up by the previous crop [5] and requires few chemical inputs, except for weed control [3]. Although a sunflower crop is a favourable preceding crop for cereals [6], its productivity is reduced due to a variety of factors (e.g., birds, fungal diseases, low and uneven plant populations) [7], drought [8,9] and high temperatures [10]. Global sunflower production varies greatly from year to year [1], and mean yields in France have barely exceeded 2 t ha<sup>-1</sup> for the last 10 years [11].

Fungal diseases are often considered a severe constraint for the stability of sunflower yield. The most widespread and detrimental diseases in sunflower production are downy mildew (*Plasmopara*

*halstedii*), verticillium wilt (*Verticillium dahliae*), phomopsis stem canker (*Phomopsis helianthi*), phoma black stem (*Phoma macdonaldii*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) [3,12]. Growing sunflower frequently during a rotation favours the proliferation of these pathogens. In south-western France, one of France's two main basins of sunflower production [5,7], the crop is frequently grown in short rotations (mainly wheat-sunflower) [6]. The limits of this system are that (i) bare soils during the fallow period (9 months) lead to nutrient leaching and groundwater pollution [13], and (ii) reduce soil tillage after sunflower harvest increases fungal inoculums, as infected stubbles remain on the soil surface [14].

In the past few years, sunflower verticillium wilt (SVW) has been observed widely in France [3,15]. Verticillium wilt is caused by the soilborne ascomycete fungus *Verticillium dahliae*. Typical symptoms are characterised by chlorosis and necrosis of leaves, starting from the bottom of the sunflower [16], and can occur on only one side or the entire plant [17]. These symptoms accelerate leaf senescence and decrease photosynthetic area [18,19]. *V. dahliae* persists in the soil through microsclerotia for up to 14 years [20], even without a susceptible host [21]. *V. dahliae* has a wide host range besides sunflower and can survive on vegetable crops [22–24] and weeds including *Chenopodium* sp., dandelions and white clover [25]. Experiments in south-western France estimated yield losses up to 0.25 t ha<sup>-1</sup>, or 50% in case of severe attacks [19].

In the past, the control of diseases caused by soilborne pathogens, including that of verticillium wilt, was based on the use of chemical fumigants such as methyl bromide, especially on high-value vegetable crops [26]. However, such chemical fumigants have been banned from being used in the European Union since 2005 [27]. To limit SVW, the only disease control method available to date relies on varietal resistance [19]. However, the circumvention of genetic resistance commonly occurs in sunflowers [28], and alternative crop protection methods are needed. To this aim, cover cropping and biofumigation, which can provide ecosystem services such as a biological regulation of soilborne diseases, have great potential [29]. Biofumigation is an alternative disinfection method to chemical fumigation, with in situ production of biocidal molecules by plants [30]. This consists of a form of bio-disinfection that derives from the suppressive effect of glucosinolates on soilborne pathogens through the liberation of volatile compounds, mainly isothiocyanates. The latter are released after hydrolysis of glucosinolates by the enzyme myrosinase during tissue disruption and incorporation into the soil [30,31]. Brassicaceae species have different glucosinolates concentrations and profiles, whether aromatic, aliphatic or indolyl [32–35]. *In vitro* experiments using synthetic isothiocyanates and pot experiments using chopped Brassicaceae tissues showed significant inhibition of *V. dahliae* germination or development [36–38]. In the field, biofumigation to control *V. dahliae* has more contrasting effects. It is expected to have a biocidal action on *V. dahliae* microsclerotia through the liberation of isothiocyanates and other volatile compounds [39]. The direct biocidal activity is limited in time as the molecules can be lost by volatilisation, sorption onto soil components, leaching and microbial degradation [40]. For instance, the viability of microsclerotia and cauliflower verticillium wilt decreased after incorporation of broccoli residues [41], whereas incorporation of brown mustard did not affect on microsclerotia in the short-term [39], or on tomato verticillium wilt [23]. In the field, Brassicaceae residues need to be chopped and quickly incorporated into the soil to liberate these biocidal compounds [40,42–44]. The effectiveness of biofumigation depends greatly on many factors, such as the quantity of biomass produced [45], destruction at flowering to obtain peak glucosinolates [44,46,47], along with mild temperatures and water availability [29,40,44]. The complexity of these factors that influence successful biofumigation leads to high variability in the provision of a biological regulation service against soilborne pathogens [48].

The utility of growing cover crops of Brassicaceae for their potential ecosystem service of regulating soilborne diseases could be supported by other ecosystem services, such as supporting services related to nutrient cycling. They provide catch-crop effects that decrease nitrate leaching and groundwater pollution [13]. After the destruction, their moderate C:N ratio releases nitrate into the soil slowly [49]. Thus, the duration between the destruction of Brassicaceae cover crops and sunflower sowing determine the cover crop's green manure effect, or pre-emptive effect, due to immobilizing nitrate [50]. This pre-emptive effect could be decreased by mixing Brassicaceae and Fabaceae. Fabaceae increase soil mineral nitrogen (SMN) through N-fixing symbioses [51,52], and their low C:N ratio allows for rapid mineralisation, which releases nitrate, and an effective-green

manure service [53]. An increase in SMN is favourable to sunflower development and yields [54]. Brassicaceae and Fabaceae mixtures can provide more benefits than sole cover crops [55]. Mixtures had higher effective N green-manure effects than Brassicaceae sole crops [13] and maintained the production of glucosinolates in Brassicaceae [56]. On sunflower, the only study available to date showed that crop yield increased more after Fabaceae mixtures than after fallow in a reduced-tillage system and after Brassicaceae in a no-tillage system [57].

Despite a long fallow period between wheat harvest and sunflower sowing that would be particularly suitable for cover cropping in south-western France, no field study has assessed the potential of Brassicaceae and Fabaceae cover crops, as a sole crop or in mixtures, in SVW control and sunflower productivity. Beyond characterising the performances of Brassicaceae and/or Fabaceae cover crops are grown in sole crops or a mixture of two or three species, the main objectives of this four-year field study under conditions in south-western France were to (i) estimate the ecosystem services of cover crops for SMN, (ii) evaluate effects of cover crops and biofumigation on SVW, and (iii) assess benefits of cover crops for sunflower productivity. We hypothesized that cover crops and biofumigation would increase SMN after Fabaceae cover crops, reduce SVW severity, especially after Brassicaceae cover crops, and therefore increase sunflower yields, compared to bare soils. We also expected the Brassicaceae and Fabaceae mixtures to mutualise the benefits of each species.

### III.2.2 Materials and Methods

#### III.2.2.1. Experimental Design and Crop-Management Systems

Field experiments were conducted at INRAE, Auzeville, near Toulouse, in south-western France (43.528° N, 1.501° E) over four years with cover crops sown in 2015, 2016, 2018 and 2019 prior to sowing a sunflower in 2016, 2017, 2019 and 2020. The year of the experiment are summarised in 2016, 2017, 2019 and 2020. Auzeville has a temperate oceanic climate (cfb) according to the Köppen climate classification. The fields selected were naturally infested with *V. dahliae*. The previous crop was wheat to follow the most common rotation system in south-western France, except in 2020, when the previous crop was sunflower. The previous crop, soil texture and soil organic matter content of each field are resumed in Table B.

**Table B.** Field characteristics and crop management for the cover crops and the sunflower of the four-year experiment carried out at Auzeville, France. Cover crops were sown after a previous crop in 2015, 2016, 2018 and 2019, and the destruction was performed close to the flowering of the Brassicaceae. Sunflower cultivar (cv. 1 or cv. 2) were sown after cover crops destruction in 2016, 2017, 2019 and 2020. Irrigation and N fertilisation are for the growing season measurements from the sowing date to the date of cover crop destruction or sunflower harvest. DAS is for days after sowing.

Previous Crop	Field Characteristics		Cover-Crop Management					Sunflower Management							
	Soil Organic Matter (g kg <sup>-1</sup> )	Soil Texture	Species	Cultivars	Sowing Date	Densities (Seeds m <sup>-2</sup> )	Irrigation (mm)	Destruction Date	Cultivar	Sowing Date	N Fertilisation (kg ha <sup>-1</sup> )	Irrigation (mm)	Harvest Date		
Durum wheat	12.3	Loamy-sandy clay	Brown mustard	Etamine	08/09/2015	132									
			Turnip rape	Chicon		111	0	07/12/2015	cv.1	28/04/2016	0	0	19/09/2016		
			Fodder radish	Anaconda		102									
Durum wheat	9.76	Loamy-sandy clay	Brown mustard	Etamine	05/09/2016	161									
			Turnip rape	Chicon		212									
			Fodder radish	Anaconda		100			33 mm (3 DAS)	07/12/2016	cv. 1	20/04/2017	110	0	07/09/2017
			Vetch	Titane		86									
Durum wheat	8.57	Loamy clay	Brown mustard	Etamine	28/08/2018	100									
			Turnip rape	Chicon		80									
			Fodder radish	Anaconda		80			30 mm (8 DAS)	07/01/2019	cv.2	13/05/2019	60	30 mm (73 DAS)	18/09/2019
			Vetch	Titane		80			30 mm (24 DAS)						
			Brown mustard	Etamine	09/10/2019	100									
Sunflower	8.57	Loamy clay	Turnip rape	Chicon		80						20 mm			
			Fodder radish	Anaconda		80			54 mm (1 DAS)	25/02/2020	cv.2	25/05/2020	40	(3 DAS) 19/10/2020	
			Vetch	Titane		80							50 mm (58 DAS)		

The experimental design progressed over the four years, with one block in 2016, three blocks of non-randomised design in 2017 and three blocks of completely randomised design in 2019 and 2020. The factor tested in these experiments was the cover-crops species before sunflower. The control treatment involved leaving the soil bare during the fallow period. Weeds and spontaneous emergence of the previous crop were negligible and left unmanaged. Plots were 6 m wide to allow the sowing of 12 rows of sunflower. Plot length varied from 12 m (2019 and 2020) to 50 m (2017), to 120 m (2016).

Cover crops treatments were Brassicaceae or Fabaceae commonly cultivated in south-western France. Seeds were kindly provided by Cérience (Beaufort-en-Vallée, France). The Brassicaceae species were brown mustard (*Brassica juncea* cv. Etamine), turnip rape (*Brassica rapa* subsp. *oleifera* cv. Chicon) and fodder radish (*Raphanus sativus* cv. Anaconda) and the Fabaceae species was purple vetch (*Vicia benghalensis* cv. Titane). The Brassicaceae were selected from preliminary screening experiments *in vitro* that assessed their ability to control *V. dahliae*, and the diversity of their glucosinolates profiles and concentrations [38,56]. Purple vetch was selected for its good green-manure effect in sole crops or mixtures Brassicaceae [13] and minimises competition with Brassicaceae [58]. These cover crops were grown in sole crops all four years, except the Fabaceae in 2016. In 2019 and 2020, mixtures of two or three species were tested. A mixture of two species contained one Brassicaceae and one Fabaceae, while a mixture of three species contained two Brassicaceae and one Fabaceae, in a substitutive design. All cover crops were compared to bare soil. Four treatments were tested in 2016, five in 2017, and ten each in 2019 and 2020.

The crops management was carried out by INRAE APC [59]. The cover crops were sown using a cereal seed drill (Kuhn, Saverne, France) in late August to mid-October depending upon the weather conditions each year. Species grown in sole crops were sown at densities recommended by the cover-crop seed distributor and breeder. In a mixture of two or three species, the sowing density for each species was  $\frac{1}{2}$  or  $\frac{1}{3}$  of its corresponding sole-crop density (Table B). To ensure homogeneous development, cover crops were irrigated at sowing by sprinkler except in 2016 (Table B). Cover crops were not fertilised, and pesticide was applied when needed with an application of ferric phosphate (Certis Europe, Guyancourt, France) against slugs in 2016 and lambda-cyhalothrin (Syngenta France SAS, Saint Sauveur, France) against sawfly in 2019. The biofumigation was performed close to the flowering of the Brassicaceae. The cover crops were chopped using a flail mower (Kverneland, Klepp, Norway) and quickly incorporated into the soil using a cultivator (Agrisem International, Ancenis-Saint-Géréon, France). A roller-crimper (SEMAS & FERJU GOURDIN, Selles, France) ensured good contact between the soil and the chopped cover crops. In April or May, depending upon the weather conditions each year, a sunflower cultivar susceptible to *V. dahliae* was sown. In 2016 and 2017, the cultivar was the same (cv. 1). As it was no longer commercialised after 2018, another susceptible cultivar (cv. 2) was sown in 2019 and 2020. Plant density was 7.5 plants.m<sup>-2</sup> after thinning. Sunflower were cultivated following low-input management. N fertilisation was adjusted based on soil analyses before sunflower sowing and was the same for all treatments (Table B). The quantity and timing of sprinkler irrigation were determined according to precipitation and the soil water deficit (Table B). Weather conditions (temperatures and precipitation) during cover crop and sunflower development, as well as the day of biofumigation, varied (Table C).

**Table C.** Climate conditions of the four-year experiment carried out at Auzeville, France. Cumulative growing degree days and precipitation values are sums of growing season measurements from the sowing date to the date of cover crop destruction, and sunflower harvest. Climate data at biofumigation are the mean day temperature at cover crops destruction and the sum of precipitation 7 days from cover crops destruction. GDD is for growing degree days, Br is for Brassicaceae, and Fb is for Fabaceae.

Year	Cover Crops		Biofumigation		Sunflower	
	GDD Br <sup>1</sup> /Fb <sup>2</sup>	(°C)Precipitation (mm)	Temperature (°C)	Cumulative Days (mm)	Precipitation 7 GDD (°C) <sup>3</sup>	Precipitation (mm)
2015–2016	615 1033	100	13	2.5	2228	296
2016–2017	686 1119	119	7	1.5	2212	267
2018–2019	905 1489	191	2	3.5	2147	248
2019–2020	487 1112	400	10	50.0	2319	257

<sup>1</sup> Brassicaceae base temperature of 6.9 °C. <sup>2</sup> *Vicia benghalensis* base temperature of 2.1 °C. <sup>3</sup> Sunflower base temperature of 4.4 °C according to [61]

### III.2.2.2. Cover-Crop and Soil Sampling

#### III.2.2.2.1. Cover-Crop Sampling and Partial Land Equivalent Ratio Calculation

Before cover-crop destruction and incorporation (biofumigation), samples of the shoot and root biomass of Brassicaceae and Fabaceae (sole crops and mixtures) were collected from 0.5 m<sup>2</sup> replicates in each plot, except for the roots of vetch in 2017 (wet soils at the date of sampling did not permit to properly sample the roots of vetch), and the turnip rape in mixtures of three species in 2019 (no germination and seedling of the turnip rape). Samples came from the middle of the plots to avoid edge effects between different treatments. The number of plants of each species in sole crops and mixtures was counted to calculate densities. Shoots and roots were separated, and the root systems were washed with cold water to remove the remaining soil. Fresh samples were weighed, then dried at 80 °C for 48 h and weighed to estimate the total dry matter biomass produced per species. A sub-sample of each species per plot was ground to estimate C and N content in the tissues via elemental analyses based on the Dumas method (Elementar MicroVario Cube, Germany).

In each plot, a sub-sample of Brassicaceae (4–5 plants) was cut into 2–3 cm pieces and immediately frozen at –80 °C before lyophilisation for glucosinolates analysis. Glucosinolate profiles and concentration analysis were performed in specialised laboratories (Institute for Water and Wetland Research, Radboud University, Netherlands, for 2016 and 2017 samples, and German Centre for Integrative Biodiversity Research for 2019 and 2020 samples). Both laboratories used the method detailed in [61]. The quantities of glucosinolates produced by each Brassicaceae in sole crops and mixtures were calculated by multiplying dry biomass by the concentration of each glucosinolate of each profile.

Land equivalent ratio (LER) is defined as the area of a sole crop required to reach the same biomass as a mixture [62]. It has been used to compare the performance of sole crops and mixtures for cash crops [63] and cover crops [13]. However, this index is based on the theoretical density of each species in mixtures. As densities of the mixtures in 2019 and 2020 frequently differed from the desired densities at sowing (50:50 or 33:33:33), the partial LER (LER<sub>p</sub>) for Brassicaceae or Fabaceae was calculated (1) and compared to the density ratio (DR) between sole crops and mixtures (2):

$$\text{LERp} = \frac{\text{Mixture biomass}}{\text{Sole crop biomass}}$$

$$\text{DR} = \frac{\text{Mixture density}}{\text{Sole crop density}}$$

The performance of each of Brassicaceae and Fabaceae was compared (3):

$$\text{Comparison of performance} = \frac{\text{LERp}}{\text{DR}}$$

If the comparison exceeded 1 (i.e.,  $\text{LERp} > \text{DR}$ ), then the mixtures performed better than the sole crops, and vice-versa.

#### *III.2.2.2.2. Soil Sampling*

Before sunflower sowing, six soil cores were randomly taken at depths of 0–30, 30–60 and 60–90 cm with a hydraulic core drill within each treatment and each block. The six cores for each depth were pooled, and SMN content of 12, 45 and 90 soil samples were analysed in 2016, 2017 and both 2019 and 2020, respectively. The analysis was done using a continuous flow auto-analyser (Skylar 51,000, Skalar Analytic, Erkelenz, Germany).

#### *III.2.2.3. Sunflower Sampling and Disease Assessment*

##### *III.2.2.3.1. Assessment of Sunflower Nutrition Status*

At flowering, five sunflowers per treatment were sampled and pooled to estimate the N nutrition status for each treatment. It was quantified using the Nitrogen Nutrition Index (NNI), calculated according to [64]:

$$\text{NNI} = \frac{\text{Nm}}{\text{Nc}}$$

where Nm is the total N concentration measured in aboveground tissues and Nc is the critical total N concentration calculated for the mass of aerial dry matter (ADM) of sunflower measured in situ (i.e., the minimum N concentration needed to obtain maximum dry matter production by the crop).

Nc was calculated according to [65] using the critical N-dilution curve for sunflower:

$$\text{Nc} = 4.53 \times \text{ADM}^{-0.42}$$

##### *III.2.2.3.2. Assessment of Sunflower Verticillium Wilt Severity*

Before SVW appeared, 10 sunflowers (2019 and 2020), 15 (2017) and 25 (2016) were tagged within each treatment (with three plots per treatment) for the three blocks in 2017, 2019 and 2020 and one block in 2016. Overall, 300 and 675 sunflowers were recorded in 2016 and 2017, respectively, and 900 sunflowers each in 2019 and 2020. At the first signs of SVW, 40–50 days after sowing (DAS), symptoms were assessed weekly. To describe the severity of symptoms on leaves, a rating scale from 0–4 was used: 0 = healthy plant, 1 = [0–20%], 2 = [20–50%], 3 = [50–80%] and 4 = >80% of the plant displaying wilt symptoms. Disease severity was assessed up to 96 DAS in 2016 and 2017, 91 DAS in 2019 and 92 DAS in 2020, 1 week before the onset of normal senescence. At least eight observations were made in 2016, 2019 and 2020, and nine in 2017.

Disease severity index (DSI) was calculated from the rating scale up to maturity, for each plot, according to [66]:

$$\text{DSI} = \frac{100 \times \text{number of diseased plants in each score} \times \text{value of the corresponding score}}{\text{total number of plants scored} \times \text{value of the maximum score}}$$

Disease development was also assessed by the area under disease progress curves (AUDPC) of the severity. The AUDPC was calculated according to the equation of [67]:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \left[ \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right] \times (t_{i+1} - t_i)$$

where n is the number of observations, y the rating scale of SVW and t is the DAS of each observation. AUDPC was calculated for each tagged sunflower and averaged per plot.

### III.2.2.3.3. Sunflower Yield Estimation

At maturity, sunflowers tagged for SVW monitoring were harvested by hand in each plot and block for the four years of the experiment. The inflorescences were threshed, cleaned with a densiometric column, dried at 80 °C for 48 h and then weighed to estimate sunflower yield for each treatment.

### III.2.2.4. Statistical Analysis

Within each year, mixed analyses of variance (ANOVA) were used to test the effects of treatment (cover crops and bare soil) on SMN before sunflower sowing, DSI or AUDPC of SVW at each DAS, and manual yields. Blocks were always used as random factors. This model was also applied to characterise the cover crops (biomass produced and C:N ratio). Arcsine and square root transformations were carried out on all percent data prior to applying statistical analysis to improve the homogeneity of variance [68]. The assumptions of validity of the models were checked, and if not respected, square root or log transformations were performed on the quantitative variables of the analysis. Post-hoc multiple comparisons were performed to compare among all the different treatments. Correlations of Spearman and regression models that combined data for all four years were used to assess relationships between sunflower yield and DSI or sunflower NNI at flowering. Cover crops were used pooled by botanical family or composition (i.e., bare soil, Brassicaceae sole crop, Fabaceae sole crop, mixture of two or three species). For all data analyses, differences among treatments were considered significant at  $\alpha = 0.05$ . Statistical analyses were performed using Rstudio software (R Core Team, 2020).

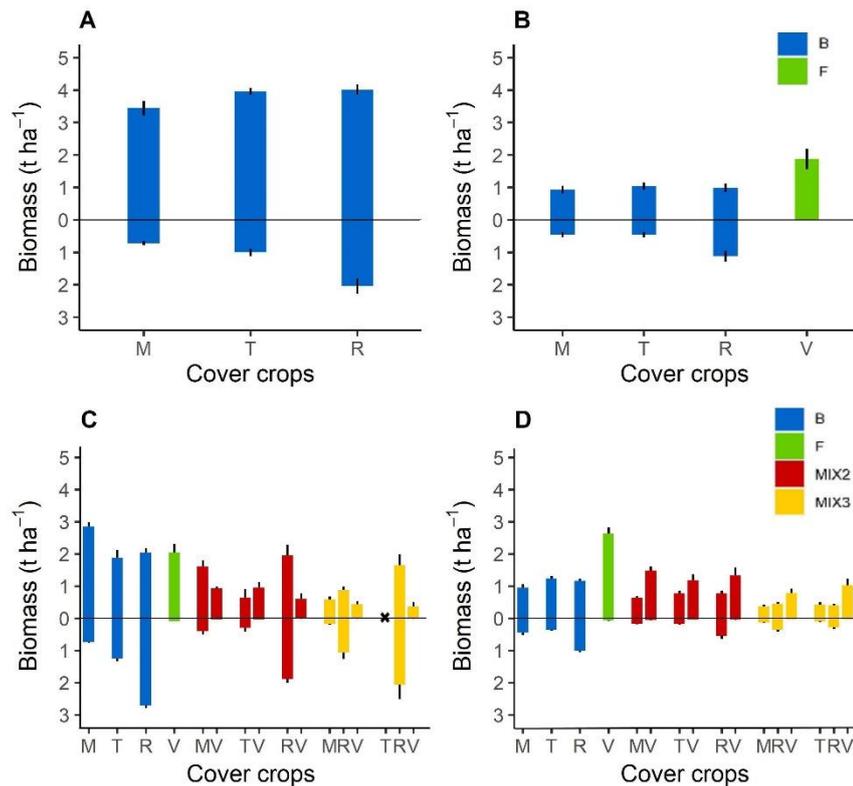
## III.2.3. Results

### III.2.3.1. Cover-Crop Production and Characterisation

#### III.2.3.1.1. Cover-Crop Biomass Production

Overall, Brassicaceae sole crops produced more total dry matter biomass (roots and shoots) in 2016 than in the following years (Figure 47). Fodder radish was the most productive Brassicaceae during the four years, whereas brown mustard was the least. Fodder radish biomass reached 6.1 and 4.7 t ha<sup>-1</sup> in 2016 and 2019, respectively when sown in September (early sowing; Table B). It produced less biomass the other years: 2.1 t ha<sup>-1</sup> in 2017 (early sowing) and 2.2 t ha<sup>-1</sup> in 2020 (late sowing, in October). Fodder radish produced more biomass than the Fabaceae sole crops, except in 2020, when purple vetch produced the most shoot biomass.

Overall, Brassicaceae or Fabaceae sole crops produced significantly ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ) more biomass than mixtures per unit area (Figure 47 C,D, Table Appendix 1), as mixtures were sown at  $\frac{1}{2}$  or  $\frac{1}{3}$  of their sole-crop densities. Fodder radish always produced significantly ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ) more biomass in sole crops than in mixtures, but differences were inconsistent for the other cover crops. With early sowing (2019), the total biomass of Brassicaceae sole crops and mixtures was higher than those of Fabaceae (Figure 47). Conversely, with late sowing (2020), the shoot biomass of Fabaceae sole crops and mixtures was higher than those of Brassicaceae. For example, in 2019, fodder radish had highest biomass (3.83 t ha<sup>-1</sup>) when associated with purple vetch (0.61 t ha<sup>-1</sup>) in mixtures of two species. Conversely, in 2020, purple vetch had the highest biomass when associated with Brassicaceae in a mixture of two or three species (Table Appendix 1). Based on the LER<sub>p</sub>, mixtures performed better overall than sole crops in 2019, as the LER<sub>p</sub>:DR ratio exceeded 1, except for purple vetch cultivated with fodder radish and brown mustard in a mixture of three species (ratio = 0.88). Conversely, in 2020, all Brassicaceae performed better in sole crops than in mixtures (ratio < 1), whereas purple vetch always performed better in mixtures (ratio > 1).



**Figure 47.** Shoot (above zero) and root (below zero) dry matter biomass ( $\text{t ha}^{-1}$ ) for each Brassicaceae or Fabaceae species cover crops in sole crops or mixtures measured at the cover crop destruction in 2016 (A), 2017 (B), 2019 (C) and 2020 (D). In 2019, the turnip rape did not grow in a mixture of fodder radish and purple vetch. Abbreviation letter refers to cover-crop species with M for brown mustard, T for turnip rape, R for fodder radish, and V for purple vetch. Error bars represent standard errors.

### III.2.3.1.2. Cover-Crop C:N Ratio

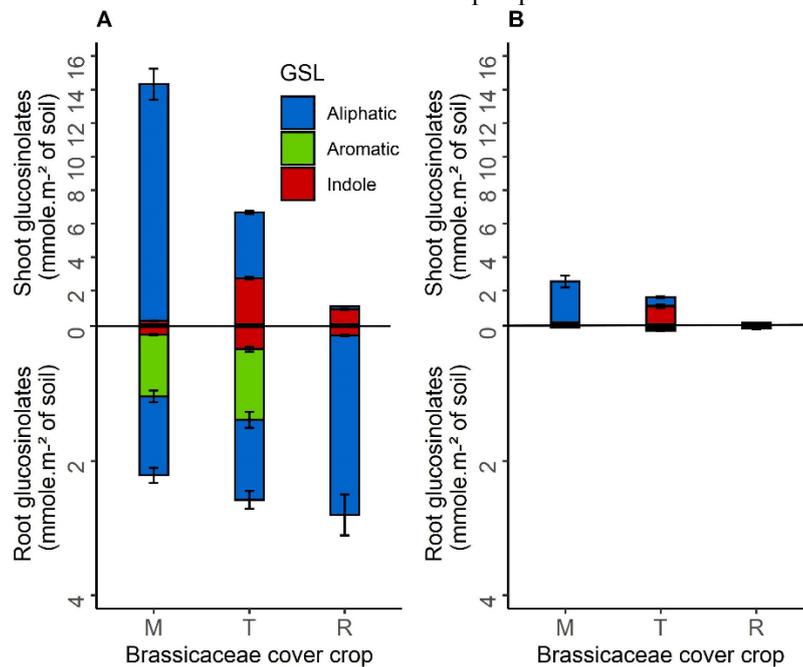
The C:N ratio of each cover crop species in sole crops and in mixtures varied among years (Table Appendix 2). For the four sole crops, the three Brassicaceae had C:N ratios significantly ( $p < 0.01$ ) higher than that of purple vetch, regardless of the year. C:N ratios of the Brassicaceae species in sole crops did not differ significantly. In mixtures, C:N ratios of the Brassicaceae were always lower than those in sole crops, and this difference was always significant ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ) in a mixture of two species (Table Appendix 2). Conversely, purple vetch had an equivalent C:N ratio in sole crops or mixtures. In 2019, C:N ratios of Brassicaceae in a mixture of two species were 57–67% of those in sole crops, and that of purple vetch in mixtures was 94% of that in sole crops. Finally, in 2019 and 2020, the C:N ratio of each species in a mixture of two or three species did not differ significantly, except for brown mustard in a mixture of three species in 2020 (Table Appendix 2).

### III.2.3.1.3. Glucosinolates Production of Brassicaceae Cover Crops

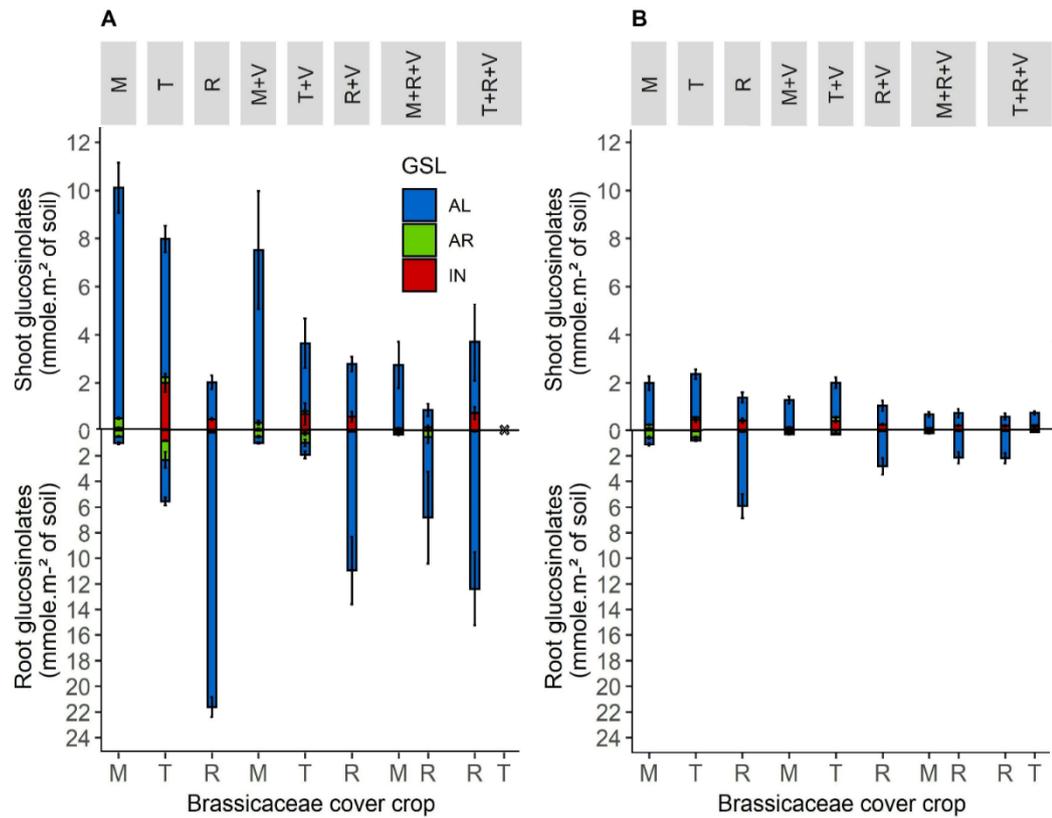
The quantities of glucosinolates produced by each species of Brassicaceae per  $\text{m}^2$  of soil were calculated as the product of biomass and glucosinolates concentration in the tissues in sole crops or mixtures in 2016 and 2017 (Figure 48) and 2019 and 2020 (Figure 49). Total quantities of glucosinolates varied highly over the four years of the experimentation, in accordance with dry matter biomass production (Figure 47) and the environment. In 2017, the lyophilisation of the fodder radish samples, not totally achieved, may have induced a volatilisation of the glucosinolates. The three species of Brassicaceae had contrasting profiles and quantities of aliphatic, aromatic and indole glucosinolates. In sole crops, brown mustard and fodder radish produced the most aliphatic glucosinolates, mainly sinigrin and glucoraphasatin, respectively.

Turnip rape produced less aliphatic glucosinolates but more indole glucosinolates than the other species. Glucosinolates production also differed between shoots and roots of the crops. Unlike fodder radish, which produced more glucosinolates in the roots, the other Brassicaceae produced more glucosinolates in the shoots. Brown mustard produced five times as many aliphatic glucosinolates in shoots than in roots each year, unlike fodder radish.

Regarding sole crops and mixtures, the Brassicaceae produced more glucosinolates in sole crops than in mixtures (Figure 49), as they produced more biomass in sole crops than in mixtures (Figure 47). However, the quantities of glucosinolates produced in mixtures were not  $\frac{1}{2}$  or  $\frac{1}{3}$  of those produced in sole crops, even though the mixtures were sown at  $\frac{1}{2}$  or  $\frac{1}{3}$  of the densities of the sole crops. In a mixture of two species, fodder radish produced up to 137% of the quantities produced in sole crops (glucosinolates in the shoots, Figure 49). In a mixture of three species, it always produced at least 43% of that produced in sole crops. These trends were less consistent for brown mustard and turnip rape.



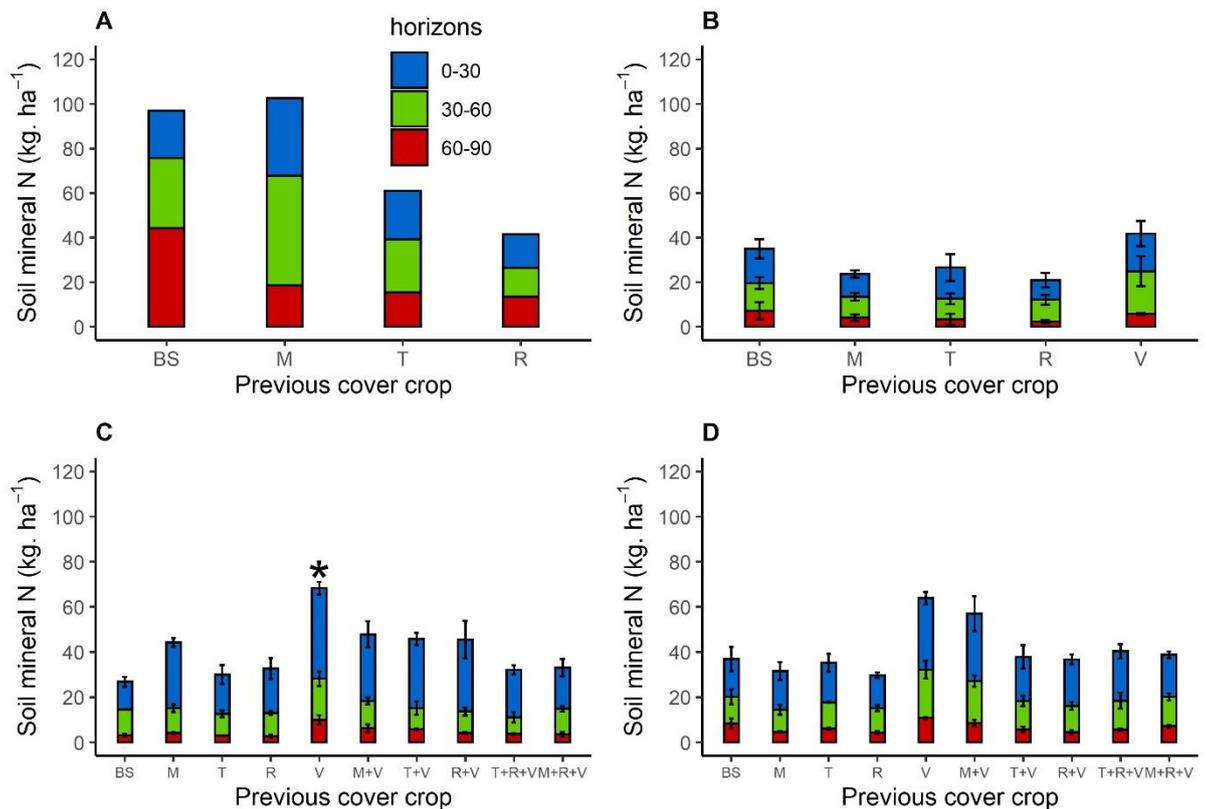
**Figure 48.** Mean shoot and root glucosinolates production function of the total dry matter biomass of each species of Brassicaceae cover crop per square meter of soil (mmol.m<sup>-2</sup> soil) in sole crops in 2016 (A) and 2017 (B). Abbreviation letter refers to Brassicaceae cover-crop with M for brown mustard, T for turnip rape, R for fodder radish. Error bars represent standard errors.



**Figure 49.** Mean shoot and root glucosinolates production function of the total dry matter biomass of each species of Brassicaceae cover crop per square meter of soil (mmol.m<sup>-2</sup> soil) in sole crops and mixture with vetch in 2019 (A) and 2020 (B). In 2019, the turnip rape did not grow in a mixture of fodder radish and purple vetch. Abbreviation letter refers to cover-crop species with M for brown mustard, T for turnip rape, R for fodder radish and V for purple vetch. Error bars represent standard errors.

### III.2.3.2. Soil Mineral Nitrogen Available for Sunflower before Sowing

Cumulative SMN in 0–90 cm soil horizons varied among years (Figure 50), and SMN in 2016 was the highest, especially after bare soil and brown mustard (100 kg N ha<sup>-1</sup>). In the following years, SMN was less than 70 kg N ha<sup>-1</sup>, regardless of the year and treatment, with the lowest SMN in 2017 (<50 kg N ha<sup>-1</sup>). Within a year, soil after Brassicaceae sole crops had less N overall than after bare soil, but the differences were not significant. Conversely, soil after purple vetch in sole crops had more SMN than that after bare soil, and the difference was significant ( $p < 0.01$ ) in 2019 (Figure 50C), with a cumulative mean increase of more than 50 kg N ha<sup>-1</sup>. After a mixture of two or three species (Figure 50C,D), SMN was equal to or greater than to those after bare soil or Brassicaceae, but the differences were not significant. Soils after purple vetch in mixtures had less SMN than in sole crops. Thus, SMN after mixtures always lay between those of Brassicaceae and Fabaceae sole crops (Figure 50).

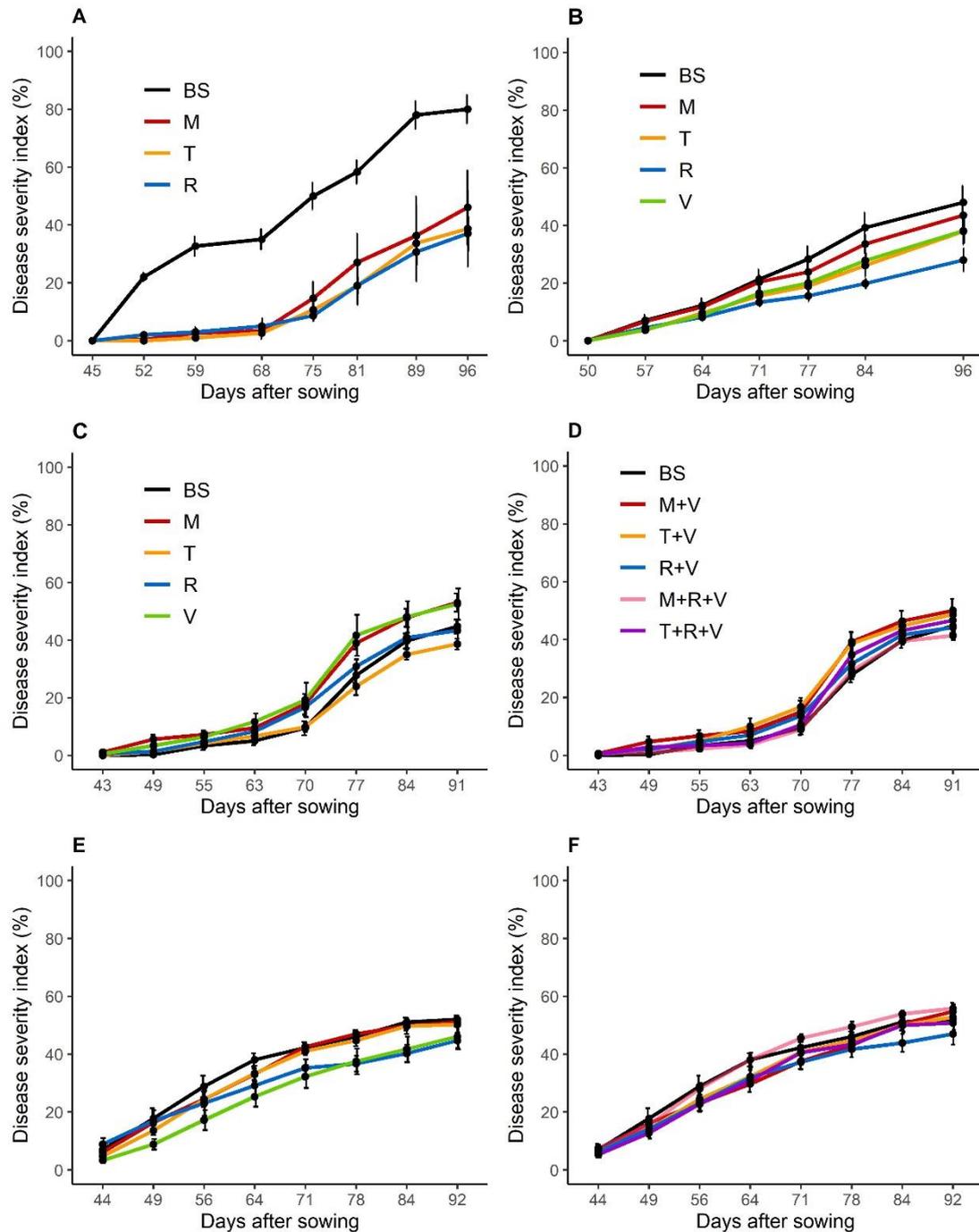


**Figure 50.** Soil mineral nitrogen ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) in the three depth soil horizons (0–30, 30–60, and 60–90 cm) measured at sunflower sowing in 2016 (A), 2017 (B), 2019 (C) and 2020 (D) after bare soil, Brassicaceae, and Fabaceae cover crops sown in sole crops (A–D) or a mixture (C,D) with one Brassicaceae and one Fabaceae, or two Brassicaceae and one Fabaceae. Abbreviation letter refers to BS for bare soil, M for brown mustard, T for turnip rape, R for fodder radish and V for purple vetch. Error bars represent standard errors. There were no blocks in 2016. Soil mineral nitrogen that differed significantly from that of bare soil are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

### III.2.3.3. Effects of Cover Crops and Biofumigation on Sunflower Verticillium Wilt

The disease severity index (DSI) measured on the sunflower cultivated after bare soils reached a mean of 80% in 2016 (Figure 51A) but were only around 45% to 50% the following years (Figure 51B–F, Supplemental S1 in Supplemental Data). This highest severity may be due to a high initial density of inoculum and the susceptibility of the cultivar (cv.1, in 2016 and 2017), which is presumably more sensitive than cv.2 in 2019 and 2020. The most effective regulations were observed in 2016, the year when the cover crops produced the highest biomass (Figure 47). Sunflower cultivated after fodder radish in sole crop tended to have lower DSI in 2016, 2017 and 2020 than that grown after bare soil, and differences were significant ( $p < 0.01$  or  $p < 0.05$ ) at 52, 75 and 81 DAS in 2016, at 84 and 96 DAS in 2017 and 78 and 84 DAS in 2020 (Figure 51A,B,D). Sunflower cultivated after brown mustard and turnip rape had lower DSI, but it was less consistent than that grown after fodder radish. DSI was significantly lower ( $p < 0.01$  or  $p < 0.05$ ) on sunflowers following turnip rape or brown mustard in 2016 (from 52 to 81 DAS). In 2017, DSI was significantly lower following turnip rape (at 84 DAS), compared with that after bare soil. Finally, sunflowers cultivated after purple vetch also showed significantly lower DSI in 2020 at 64, 71 and 84 DAS, compared to sunflower cultivated after bare soils. Overall, sunflowers cultivated after a mixture of two or three species did not have significantly lower DSI.

The AUDPC values calculated from sowing to 80 to 85 DAS (following the year) ranged from 30.3 (2019) to 91.7 (2016) on sunflowers cultivated after bare soil and that were overall consistent with the DSI (Table Appendix 3). The AUDPC value was significantly ( $p < 0.01$ ) lower following Brassicaceae compared to bare soil in 2016, and in 2017 after turnip rape ( $p < 0.05$ ) and fodder radish ( $p < 0.01$ ). After purple vetch, the AUDPC was significantly ( $p < 0.01$ ) lower compared to the bare soil in 2020, whereas the AUDPC was higher in 2019. Overall, sunflowers cultivated after a mixture of two or three species did not have significantly lower AUDPC.



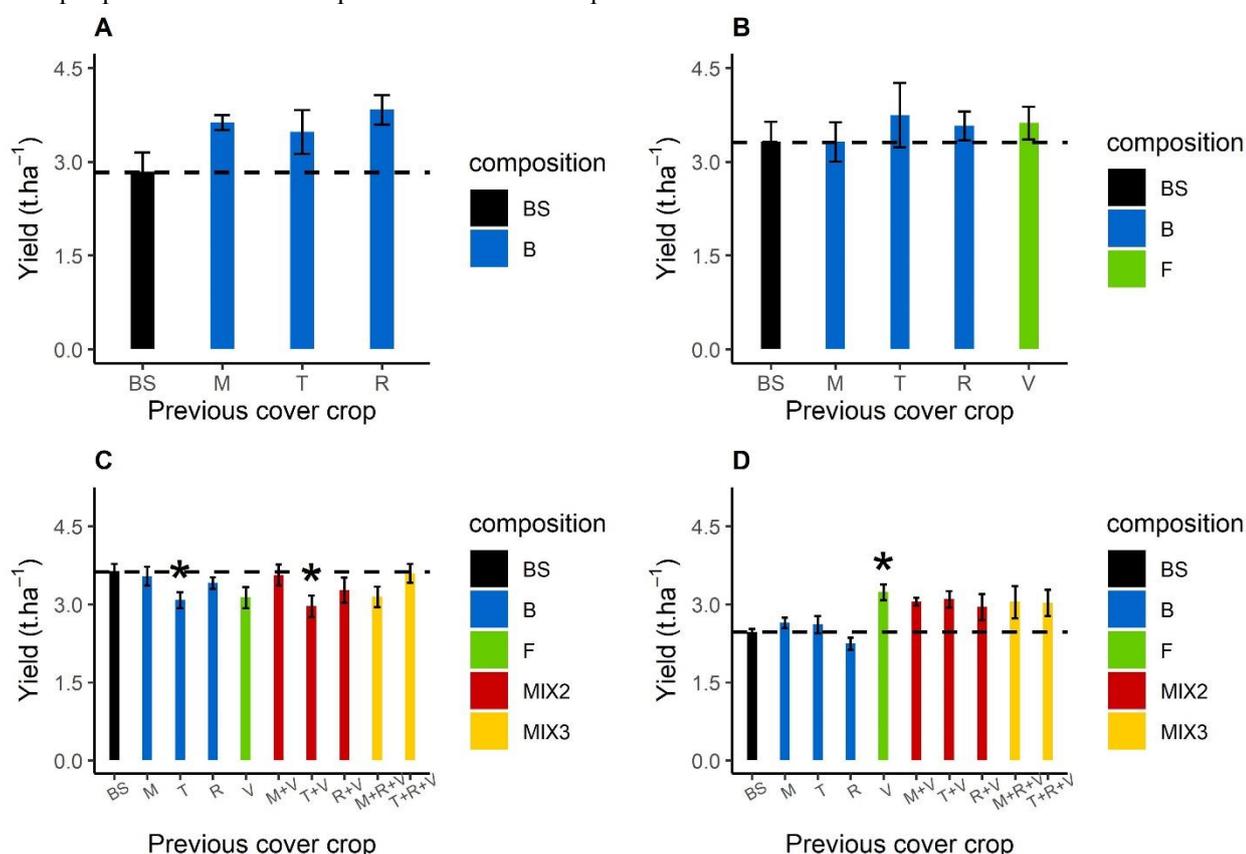
**Figure 51.** Annual disease severity index (%) progress curves of sunflower verticillium wilt in 2016 (A), 2017 (B), 2019 (C,D) and 2020 (E,F). Sunflower cultivar cv. 1 (A,B) and cv. 2 (C-F) were cultivated after a bare soil, a Brassicaceae or a Fabaceae cover crop in sole crops (A,B,C,E), or in a mixture with one Brassicaceae and one Fabaceae, or two Brassicaceae and one Fabaceae (D,F). In 2019, the turnip rape did not grow in a mixture of fodder radish and purple vetch. The number of sunflowers recorded was 300 in 2016 (A), 675 in 2017 (B), and

900 in 2019 (C,D) and 2020 (C,D). Abbreviation letter refers to the treatments with BS for bare soil, M for brown mustard, T for turnip rape, R for fodder radish and V for purple vetch. Error bars represent standard errors.

### III.2.3.4. Effects of Individual Factors on Sunflower Yield

#### III.2.3.4.1. Previous Cover Crop

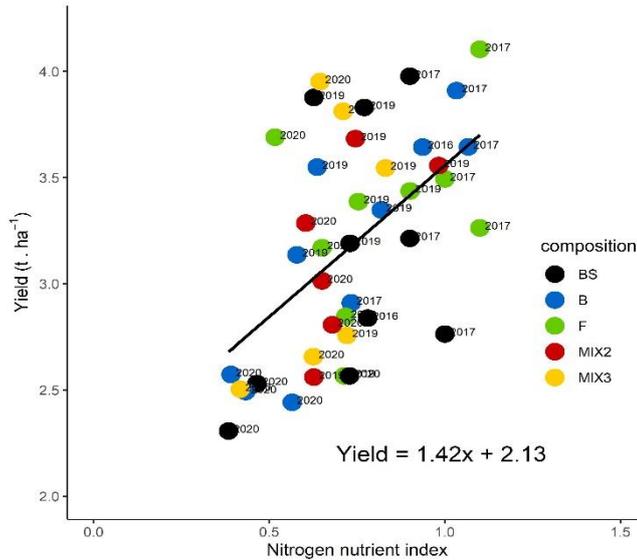
Regardless of the treatment (bare soil or cover crop), mean sunflower yields ranged from 2.24 t ha<sup>-1</sup> and 3.8 t ha<sup>-1</sup> (Figure 52). Overall, no significant increase in yields due to cover cropping before sunflower occurred, compared to those after bare soil. In 2016, the mean increase in sunflower yield was 0.9 t ha<sup>-1</sup> following fodder radish cover cropping, but this increase was not observed in the following years. In 2019, sunflower yield following turnip rape in sole crops or a mixture with purple vetch was significantly lower ( $p < 0.05$ ) compared with that after bare soil or after other cover crops. In 2020, a significant ( $p = 0.01$ ) increase in sunflower yield (+ 0.77 t ha<sup>-1</sup>) after purple vetch in sole crops was observed compared to that after bare soil.



**Figure 52.** Manual sunflower yields (t ha<sup>-1</sup>) from the sunflowers monitored for sunflower verticillium wilt severity after bare soil, Brassicaceae or Fabaceae cover crop in 2016 (A), 2017 (B), 2019 (C) and 2020 (D). The yield after a bare soil is in black, blue after Brassicaceae (B) sole crops, green after Fabaceae (F) sole crops, red for a mixture with one Brassicaceae and one Fabaceae (MIX2), and orange for a mixture with two Brassicaceae and one Fabaceae (MIX3). In 2019, the turnip rape did not grow in a mixture of fodder radish and purple vetch. Abbreviation letters refer to the treatment with BS for bare soil, B for Brassicaceae, F for Fabaceae, M for brown mustard, T for turnip rape, R for fodder radish and V for purple vetch. Dashed lines indicate the mean bare soil yield for the year. Error bars represent standard errors. Treatments with yields that differ significantly from that of bare soil are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

#### III.2.3.4.2. Nitrogen Nutrient index at Flowering and Yields

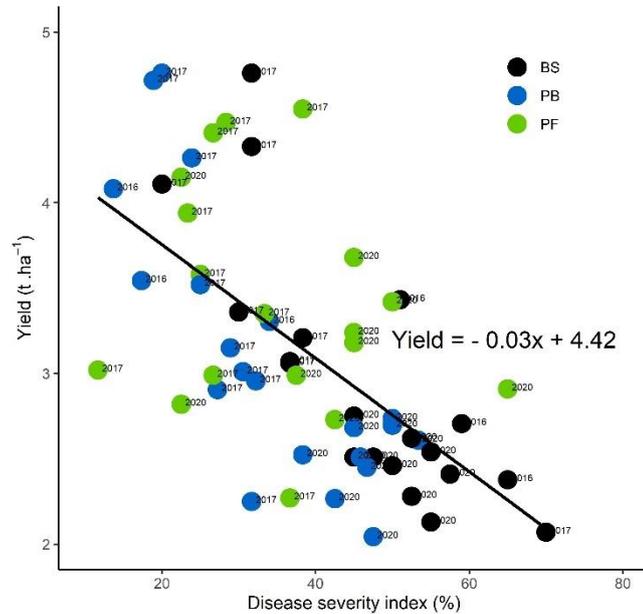
The relationship between the yield and the NNI is presented in Figure 53A, with mean values per block after bare soil, Brassicaceae sole crops, Fabaceae sole crops, and mixtures of two or three species, for the four years of experiment. Mean values of the yield ranged from 2.3 t ha<sup>-1</sup> to 4.1 t ha<sup>-1</sup> and the NNI from 0.38 to 1.1. When all the 4-year data are considered, independent of cover crop treatments and bare soil, a significant positive Spearman's correlation ( $\rho = 0.54, p < 0.01$ ) was found between sunflower yield and NNI. The linear regression between yield and NNI was also significant ( $p < 0.01$ ). The yields increased with NNI increasing. However, no clear trend or consistent response was found between the treatment used and NNI values.



**Figure 53A.** The causal relationship between manual sunflower yield (t ha<sup>-1</sup>) and nitrogen nutrition index at sunflower flowering cultivated after bare soil (BS), Brassicaceae (B) sole crops, Fabaceae (F) sole crops, a mixture with one Brassicaceae and one Fabaceae (MIX2), and a mixture with two Brassicaceae and one Fabaceae (MIX3) in 2016, 2017, 2019 and 2020. Each point represents the mean values of the yield and the NNI of the composition of each year and each block. In 2019, the turnip rape did not grow in a mixture of fodder radish and purple vetch.

#### III.2.3.4.3. Disease Severity Index at Maturity and Yields

The relationship between the yield and the DSI is presented in Figure 53B, after bare soil, Brassicaceae sole crops pooled, and Fabaceae sole crops, in 2016, 2017 and 2020. Values in 2019 and in mixtures were removed due to a lack of significance of SVW regulation. Regardless of the year or the treatment, yields mean values ranged from 1.89 t ha<sup>-1</sup> to 4.76 t ha<sup>-1</sup> and DSI severity from 11.66% to 70%. A significant negative Spearman's correlation ( $\rho = -0.67, p < 0.01$ ) was found between sunflower yields and DSI. Linear regression between yield and DSI severity was also significant ( $p < 0.01$ ). The yields decreased with DSI increasing, and the DSI tended to be higher on sunflower after bare soils, whereas sunflower following cover crops tended to have lower DSI and higher yields.



**Figure 53B.** Causal relationship between manual sunflower yield ( $\text{t ha}^{-1}$ ) and disease severity index (%) at sunflower maturity, for sunflowers cultivated after bare soil (BS), Brassicaceae (B) sole crops pooled per year, and Fabaceae (F) sole crops in 2016, 2017 and 2020. Each point represents the mean values (per blocks and plots) of the yield and the NNI of the composition per year. Data in 2019 and a mixture of two or three species in 2020 were removed from this regression because no significant regulation of SVW was observed.

### III.2.4. Discussion

This study aimed to assess ecosystem services provided by Brassicaceae and Fabaceae cover crops in sole crops or a mixture of two or three species, and biofumigation, on sunflower verticillium wilt and yield, during four field experiments. Overall, no significant effect of cover crops was observed on SMN compared to that after bare soils except for purple vetch in 2019. Mixtures with Brassicaceae and a Fabaceae, tested in 2019 and 2020, did not increase significantly SMN compared to bare soil. Brassicaceae in sole crops reduced significantly the AUDPC on cv.1, in 2016 and 2017, except after brown mustard in 2017. This result was not confirmed on cv. 2, in 2019 and 2020. Sunflower cultivated after fodder radish in sole crop tended to have lower DSI in 2016, 2017 and 2020 than that grown after bare soil, and differences were significant at some monitoring dates. The inconsistent effects of cover crops either in sole crops or mixtures could be due to soil and climate conditions as well as management practices including the previous crops in the rotation and sunflower genotypes that differed among the four experimental years.

#### III.2.4.1. Cover-Crop Effects on Soil Mineral Nitrogen Available for Sunflower

Cumulative SMN at 0–90 cm slightly varied among years due to contrasting residual N left after the previous crop in the rotation, and the cover crops that differed in biomass and C:N ratio. Soils cultivated with Fabaceae sole crops tended to have higher SMN than those grown with Brassicaceae sole crops, mixtures, and bare soil. This result agrees with a previous study [69], which highlighted higher SMN in spring in soils cropped with vetch than in bare soils. Vetch's ability to take up nitrate from the soil and fix atmospheric N, and its low C:N ratio, favours rapid mineralisation of its residues after destruction [13,70]. Soils cultivated with mixtures

always had an intermediate level of SMN between those grown with sole cover crops and bare soil as previously reported for Fabaceae and Brassicaceae mixtures [13] as well as legume and non-legume mixtures [58]. Brassicaceae in mixtures with Fabaceae may have taken up as much or more N as in sole crops, through niche complementarity with Fabaceae [13] or reduction in intraspecific competition. The level of N uptake reached by Fabaceae may have increased the N concentration of residues of the entire mixture, as already hypothesised [13], resulting in more rapid decomposition and availability of SMN for sunflower. Results of our study suggest that cover cropping with Brassicaceae, and Fabaceae mixtures may be a promising practice because SMN are at least equivalent to those after sole crop.

#### III.2.4.2. Cover Crops and Biofumigation Effects on Sunflower Verticillium wilt

SVW occurred in all the experimental fields but the severity of SVW varied among years. Besides the effects of the cover crops and biofumigation, other factors may have affected the severity of the disease including previous crops in the rotation, the density of inoculum of *V. dahliae* in the soil and the susceptibility of the sunflower cultivar. Indeed, the incidence and severity of SVW are often related to the initial density inoculum of *V. dahliae* in the soil [71,72], which in turn may have shaped the disease development, in interaction with the crop genotype. Although seed companies classify both cultivars (cv. 1 in 2016 and 2017, and cv. 2 in 2019 and 2020) as “susceptible” to SVW, differences may occur. Moreover, other soil and climatic factor may have influenced the severity of SVW.

Cover crops biomass production could be involved in regulating SVW. Sole crop total dry matter biomass production greater than 0.53 t ha<sup>-1</sup> was identified as an effective biofumigation threshold [45]. Below this threshold, biofumigation was predicted to be ineffective against various soil-borne pathogens. In our study, fodder radish produced more biomass each year in sole crops and mixtures than the other Brassicaceae, which could be due to its rapid growth and deep taproot system [73,74], This result is important for farmers looking for cover crops that produce large quantities of biomass with low variability from year to year [75]. Besides biomass production, the quantity and type of glucosinolates produced by the cover crop determine the regulation service targeted. The high biomass production of fodder radish produced relatively large quantities of glucosinolates, especially aliphatic profiles (mainly glucoraphasatin) in roots, which agrees with analyses of other studies [56,76]. Brown mustard produced the most aliphatic glucosinolates each year due to its high and well-known sinigrin concentrations [56,77]. Lower quantities of sinigrin produced by fodder radish than by brown mustard despite producing more biomass suggest potential biocidal effects of glucoraphasatin-hydrolysis products on *V. dahliae*. Nevertheless, glucoraphasatin-hydrolysis products may not be the only glucosinolates involved in regulating *V. dahliae*, as glucoraphasatin is not present in turnip rape tissues, which also reduced SVW. Regarding the ineffective effect of brown mustard, the sinigrin produced and its hydrolysis products may be insufficient to achieve effective control of *V. dahliae* and SVW in the field. This agrees with predictions suggesting that supplying at least 4 t ha<sup>-1</sup> of brown-mustard-seed meals (containing sinigrin) to reduce *V. dahliae* effectively in soils with high organic carbon content. In commercial fumigation, controlling *V. dahliae* requires a large quantity of methyl-isothiocyanates, due mainly to the aggregated cell mass of its microsclerotia, which protects the fungus from biocidal compounds [78].

In 2016 and 2017, Brassicaceae cover cropping in sole crops before sunflower cv. 1 reduced significantly the DSI (for some cover crops and overall after 80 days after sowing) and the AUDPC (except after brown mustard in 2017). In 2019 and 2020, Brassicaceae cover cropping in sole crops or mixtures before sunflower cv.2 did not significantly reduce the DSI or AUDPC compared to bare soil, except after fodder radish in 2020. Turnip rape reduced significantly DSI and AUDPC in 2016 and 2017

as previously reviewed [29]. The reduction in SVW achieved by fodder radish in our study agrees with previous results [37], which showed a significant reduction in microsclerotia germination or development following exposure to chopped fodder radish under laboratory conditions. Unlike previous reports [36–39], we did not observe a consistent effect of brown mustard on *V. dahliae* control, but this result corroborates the results of a previous study [23]. We showed that cover-crop mixtures did not seem to regulate SVW, conversely to occasional DSI reduction following sole crops. This may be related to the reduction of Brassicaceae biomass sown at  $\frac{1}{2}$  or  $\frac{1}{3}$  of their densities. The quantities of glucosinolates produced in mixtures were therefore reduced, even though glucosinolates concentrations did not decrease by the  $\frac{1}{2}$  or  $\frac{1}{3}$  of those measured in sole crops, as also observed in a previous study [56]. Our study also showed that despite applying the same Brassicaceae cultivars, the regulation of SVW differed over years. The lack of a significant decrease in SVW after Brassicaceae in 2019 could be attributed to unfavourable weather conditions (2 °C at the destruction and incorporation of cover crops) for optimal hydrolysis of glucosinolates into isothiocyanates and other biocidal compounds. This enzymatic reaction depends on many factors, such as temperature and moisture [29,39,40]. Thus, the quantities of glucosinolates per m<sup>2</sup> of soil calculated in our study may not be related to the presence or persistence of its products of hydrolysis (e.g., isothiocyanates) in the soil. This hypothesis is supported by studies that highlight the importance of mid to high temperatures (at least above 10 °C) for isothiocyanates production [79,80].

Interestingly, purple vetch in sole crops led to contrasting effects following the year. The AUDPC significantly increased on sunflower in 2019 but was significantly lower in 2020 compared to the bare soil. In 2019, symptoms of *Phoma macdonaldii* and premature ripening were observed on sunflowers. A previous study showed a strong positive correlation between high nitrogen supply and premature ripening caused by *P. macdonaldii* [81]. The SMN measured after purple vetch in 2019 was significantly higher compared to bare soil and may have led to an increase of *P. macdonaldii* development which caused overexpression of *V. dahliae* symptoms. Conversely, a significant reduction of SVW after purple vetch was measured in 2017 and 2020 and symptoms of *P. macdonaldii* were scarce. This is, to our knowledge, the first study that reports a reduction of SVW after a Fabaceae cover crop. Similar results were reported on potatoes cultivated after Austrian winter pea [82,83], highlighting a significant reduction of *V. dahliae* inoculum density and verticillium wilt incidence, compared to fallow controls. This result raises many hypotheses between the SMN after Fabaceae, the N status of the plant and *V. dahliae* relationship, poorly understood to date [84]. A previous study showed a strong negative correlation between soil nitrates concentrations and *V. dahliae* inoculum density, after organic and inorganic soil fertilisation [85]. The reduction of *V. dahliae* was enhanced with livestock manure-based compost, which had the highest N composition. The authors hypothesised a direct toxic effect of ammonia and nitric acid on the membranes of microsclerotia, as also showed before [86]. In addition, the incorporation of green manure could stimulate antagonist microbial communities [82,83]. This is supported by a study that highlighted a negative correlation between the densities of *Fusarium equiseti* and *V. dahliae*, after cover crops (including Austrian winter pea) incorporation in the soil [87]. Finally, the reduction of SVW after purple vetch could also be explained by a better nutrition status of the sunflower, leading to a better defence of the plant against some pathogens, as known for several crops pathosystems [88].

#### III.2.4.3. Sunflower Production

Overall, no clear trend of sunflower yield increase was observed after cover crops (sole crops or mixtures), over the four-year field experiment (Figure 52). However, in 2020, a significant increase in sunflower yields was observed following purple

vetch in sole crops. An increase in cash crop yields following Fabaceae cover crops had already been observed like for maize after hairy vetch [89]. Moreover, considering the four years of the field experiment, a significant positive relationship was highlighted between yields and NNI (Figure 51). The N supply after Fabaceae could support the positive causal relationship between NNI at sunflower flowering and the yield, as an increase in SMN is favourable to sunflower development and yields [54]. Yields after Brassicaceae sole crops did not differ significantly from those after bare soils, except in 2019, when turnip rape (in sole crops and bispecific mixtures) had significantly lower sunflower yield. Results that show an increase in cash-crop yield after a Brassicaceae sole crop are inconsistent in other studies; no effects of Brassicaceae on potato tuber yields, despite a significant reduction in verticillium wilt, were reported [82,83]. Conversely, an increase in potato tuber yield after Brassicaceae, compared to that after bare soils had also been observed [90]. Negative effects of brown mustard on sunflower yield were reported [91], the authors hypothesised N immobilisation due to a large quantity of residues with a high C:N ratio. Overall, our study identified no significant increase in sunflower yields after cover crops in mixtures within a year. Finally, a negative causal relationship was found between yields and DSI with mean values in sole crops in 2016, 2017 and 2020 (Figure 53B), This result, to some extent, is similar to previous studies on sunflower, potatoes and strawberry [19,92,93] suggesting that regulation of SVW is an important factor for maintaining sunflower yields.

### III.2.5. Conclusions

This four-year field study provides some evidence that cover cropping and biofumigation could represent promising agroecological methods to reduce SVW and increase sunflower yield, instead of leaving the soils bare during the fallow period. Fodder radish or purple vetch seems to be the most suitable species to provide ecosystem services (increase in SMN or decrease in SVW). However, the susceptibility of the sunflower cultivar, soil and climate conditions seem to shape largely the potential of cover crops in providing the desired ecosystems services, as shown by the inconsistency of the results obtained over the years. Further studies are needed to fill the current knowledge gap concerning the mechanisms that drive the control of SVW by these cover crops. While, in general, the benefits of cover crops mixtures did not confirm the hypothesis of mutualisation, each sole crop species provided ecosystem services that support the utility of mixing species during the fallow period. To maximise these services in mixtures, future experiments are needed to determine optimal densities to be sown in mixtures. The contrasting weather conditions throughout the four-year experiment, especially at cover crop destruction, highlight the importance of maximising the biomass of the cover crop and performing biofumigation at mild temperatures to foster the expected regulation service and obtain a significant reduction in SVW.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Table S1: Annual disease severity index (%) progress curves of sunflower verticillium wilt recorded in 2016, 2017, 2019 and 2020. Sunflower cultivar cv. 1 (2016 and 2017) and cv. 2 (2019 and 2020) were cultivated after bare soil, a cover crop of Brassicaceae in the sole crop, Fabaceae in sole crops, or mixtures. The number of sunflowers recorded was 300 in 2016, 675 in 2017 and 900 in 2019 and 2020. In 2019, the turnip rape did not grow in a mixture of fodder radish and purple vetch. Numbers in brackets represent standard errors. DAS is for the day after sowing.

**Author Contributions:** Conceptualisation, C.S. and G.D.-G.; methodology, C.S., J.D., B.G. and N.A.K.A.; software, N.A.K.A.; validation, C.S. and G.D.-G.; formal analysis, N.A.K.A.; investigation, C.S., J.D., B.G. and N.A.K.A.; resources, C.S.; data curation, J.D., B.G. and N.A.K.A.; writing—original draft preparation, B.G. and N.A.K.A.; writing—review and editing, C.S., G.D.-G.; visualisation, N.A.K.A.; supervision, C.S., G.D.-G.; project

administration, C.S.; funding acquisition, C.S.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** the French Ministry of Agriculture (CASDAR project no. C-2013-05) and the Occitanie Region (CLE project no. 13053068). This study was also financially supported by the seed company MAS Seeds and the National Association for Research in Technology (ANRT).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable

**Informed Consent Statement:** Not applicable

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors thank the seed companies Cérieence and RAGT for providing cover crop seeds. We thank Didier Raffailac, Eric Lecloux, Beatrice Quinquy and the internship students (Domitille Tissier and Coraline Reynaud) for their effective technical help with the sampling and laboratory analysis at the Auzeville site. We thank Michelle and Michael Corson for reviewing the English language. Finally, we thank the three reviewers for their comments that helped us to improve this work.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Appendix A

**Table Appendix 1.** Dry matter biomass ( $t\ ha^{-1}$ ) of each cover crops species in sole crops and in a mixture of two or three species measured at the destruction of the cover crop, in 2016, 2017, 2019 and 2020. SE represents the standard error. Abbreviations ns, \*, \*\*, \*\*\* indicate non-significant, or significant differences at  $p < 0.05$ , 0.01 or 0.001, respectively. NA indicate non applicable (no data available to test this interaction).

Year	Cover Crops	Biomass ( $t\ ha^{-1}$ )	SE	Significance of the Comparison between the Biomass of the Cover Crop in Sole Crop and in a Mixture
AUZ16	Brown mustard	4.17	0.29	/
	Turnip rape	4.96	0.19	/
	Fodder radish	6.06	0.30	/
AUZ17	Brown mustard	1.38	0.19	/
	Turnip rape	1.50	0.19	/
	Fodder radish	2.11	0.29	/
	Vetch	1.88	0.31	
AUZ19	Brown mustard	3.58	0.13	/
	Turnip rape	3.12	0.32	/
	Fodder radish	4.74	0.22	/
	Vetch	2.14	0.27	/
	Brown mustard * Vetch	2.02/0.96	0.12/0.05	**/**
	Turnip rape * Vetch	0.94/0.98	0.38/0.17	***/**

	Fodder radish * Vetch	3.83/0.61	0.21/0.17	ns/***
	Brown mustard * Fodder radish * Vetch	0.76/1.93/0.45	0.12/0.28/0.09	***/***/***
	Turnip rape * Fodder radish * Vetch	NA/3.72/0.38	NA/0.77 /0.13	NA/ns/***
AUZ20	Brown mustard	1.39	0.17	/
	Turnip rape	1.60	0.10	/
	Fodder radish	2.17	0.09	/
	Vetch	2.71	0.20	/
	Brown mustard * Vetch	0.80/1.54	0.08/0.12	**/***
	Turnip rape * Vetch	0.95/1.22	0.10/0.18	**/***
	Fodder radish * Vetch	1.31/1.37	0.19/0.25	**/***
	Brown mustard * Fodder radish * Vetch	0.49/0.81/0.82	0.06/0.10/0.14	***/***/***
	Turnip rape * Fodder radish * Vetch	0.69/0.53/1.06	0.10/0.08/0.21	***/***/***

**Table Appendix 2.** C:N ratios of each cover crops species in sole crops and in a mixture of two or three species calculated from C and N contents at the destruction of the cover crop, in 2016, 2017, 2019 and 2020. SE represents the standard error. Abbreviations ns, \*, \*\*, \*\*\* indicate non-significant, or significant differences at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ , respectively. NA indicate non applicable (no data available to test this interaction).

Year	Cover Crops	C:N Ratio	SE	Significance of the Comparison of the C:N Ratios between Sole Crop and a Mixture
2016	Brown mustard	14.64	0.88	/
	Turnip rape	14.43	1.11	/
	Fodder radish	13.47	0.97	/
2017	Brown mustard	19.61	1.52	/
	Turnip rape	19.83	0.51	/
	Fodder radish	20.89	1.35	/
	Vetch	10.79	0.26	/
2019	Brown mustard	28.31	1.4	/
	Turnip rape	24.43	1.26	/
	Fodder radish	26.8	0.43	/
	Vetch	12.9	0.69	/
	Brown mustard * Vetch	16.25/12.13	2.26/0.19	*/ns
	Turnip rape * Vetch	16.34/12.09	0.48/0.06	*/ns

	Fodder radish * Vetch	17.83/11.98	1.97/0.11	*/ns
	Brown mustard * Fodder radish * Vetch	18.54/19.75/12.58	3.30/2.96/0.25	**/ns/ns
	Turnip rape * Fodder radish * Vetch	NA/21.14/11.8	NA/1.98/0.26	NA/ns/ns
2020	Brown mustard	22.62	0.7	/
	Turnip rape	24.35	0.83	/
	Fodder radish	24.14	0.42	/
	Vetch	13.58	0.25	/
	Brown mustard * Vetch	19.78/13.89	0.47/0.19	**/ns
	Turnip rape * Vetch	21.78/14.15	0.55/0.24	*/ns
	Fodder radish * Vetch	20.35/14.47	0.76/0.17	**/ns
	Brown mustard * Fodder radish * Vetch	22.81/22.3/14.24	0.54/0.51/0.27	ns/ns/ns
	Turnip rape * Fodder radish * Vetch	21.70/20.81/14.09	0.45/0.63/0.17	**/**/ns

**Table Appendix 3.** Area under disease progression curve (AUDPC) of sunflower verticillium wilt severity, calculated from the appearance of symptoms until sunflower maturity, after bare soil, cover crops in sole crop and in a mixture of two or three species in 2016, 2017, 2019 and 2020. SE represents the standard error. Abbreviations ns, \*, \*\*, indicate non-significant, or significant differences at  $p < 0.05$ , 0.01, respectively between the bare soil and the cover crop.

Year	Treatment	AUDPC	SE	Significance of the Comparison of the AUDPC of the Cover Crop to That of the Bare Soil
2016	Bare soil	91.74	40.62	/
	Brown mustard	30.72	32.27	**
	Turnip rape	24.78	29.66	**
	Fodder radish	25.07	33.84	**
2017	Bare soil	44.72	32.11	/
	Brown mustard	39.82	30.21	ns
	Turnip rape	31.72	29.24	*
	Fodder radish	25.62	26.39	**
	Vetch	32.77	26.24	*
2019	Bare soil	30.31	21.24	/
	Brown mustard	43.12	26.60	**

	Turnip rape	28.00	20.41	ns
	Fodder radish	35.08	22.19	ns
	Vetch	44.06	29.26	**
	Brown mustard * Vetch	40.78	27.42	ns
	Turnip rape * Vetch	39.73	22.96	ns
	Fodder radish * Vetch	34.46	22.96	ns
	Brown mustard * Fodder radish * Vetch	29.53	17.28	ns
	Turnip rape * Fodder radish * Vetch	34.18	23.13	ns
2020	Bare soil	73.38	30.89	/
	Brown mustard	69.18	26.13	ns
	Turnip rape	67.11	29.77	ns
	Fodder radish	60.05	33.75	ns
	Vetch	53.67	38.64	**
	Brown mustard * Vetch	66.02	30.91	ns
	Turnip rape * Vetch	67.65	25.49	ns
	Fodder radish * Vetch	62.77	33.18	ns
	Brown mustard * Fodder radish * Vetch	75.31	26.40	ns
	Turnip rape * Fodder radish * Vetch	65.43	27.62	ns

---

*Les références bibliographiques citées au sein de cet article se trouvent à la fin du manuscrit*

### III.3. Essai complémentaire pour évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur une variété très peu sensible à la Verticilliose du tournesol

#### III.3.1. – Introduction

Afin de palier la problématique de la Verticilliose du tournesol, la méthode de lutte opérationnelle actuellement conseillée aux agriculteurs est l'utilisation de variétés à bon comportement contre la maladie. Il y a donc un intérêt à évaluer une possible combinaison entre ce levier variétal et le levier agroécologique de la biofumigation, afin d'évaluer s'il permet une réduction significative des dégâts et des dommages de la maladie.

Ainsi, le dispositif mis en place à Auzeville en 2020, décrit ci-dessus dans l'article de la première partie de ce chapitre a également été mobilisé pour évaluer les effets des mêmes traitements de CIMS et de la biofumigation sur les dégâts et les dommages de la Verticilliose du tournesol sur une variété très peu sensible à la maladie. En effet, des micro-parcelles adjacentes à celles semées avec la variété sensible MAS 82.OL (nommée CV.2 dans la publication ci-dessus) ont été semées avec la variété très peu sensible MAS 86.OL, afin qu'elles aient le même précédent que la variété sensible.

#### III.3.2. Matériel et méthodes

L'itinéraire technique mis en place est le même que celui décrit pour CV.2 à AUZ20 dans la publication ci-dessus (Table B, AUZ20). Les traitements testés sont donc similaires, avec comme référence un témoin sans couverture pendant la période d'interculture, comparé à une couverture du sol avec trois Brassicacées monospécifiques (Moutarde brune, navette fourragère, radis fourrager), une Fabacée (Vesce du Bengale) et des mélanges bispécifiques des Brassicacées ou Fabacées ou tri-spécifiques (moutarde brune avec radis fourrager et vesce du Bengale ; ou navette fourragère avec radis fourrager et vesce du Bengale). Concernant les mesures de sévérité de la maladie réalisées, elles ont été moins nombreuses (Cinq notations en tout, réalisées à 44, 49, 64 et 78 JAS). L'indice de sévérité de la Verticilliose a été calculé de la même manière que dans le cadre des

travaux de la première partie, en prenant en compte les scores de sévérité allant de 0 à 4 en fonction du pourcentage de la plante présentant des symptômes. A l'issue de l'essai, des rendements machine à la moissonneuse batteuse expérimentale ont été réalisés en récoltant les 4 rangs centraux de chaque micro-parcelle (sur 12 rangs en tout, afin de laisser des rangs de bordure). Il est à noter qu'une limite de cette méthode de récolte est que les rendements mesurés ne tiennent pas compte des dégâts d'oiseaux. Les analyses statistiques réalisées sont des Anova permettant de tester l'effet du facteur « CIMS » sur les variables « indice de sévérité de la Verticilliose » et « rendement »

### III.3.3. Résultats

La Figure 54 représente les indices de sévérité de la Verticilliose du tournesol en fonction du temps et du précédent cultural, ainsi que de la variété de tournesol cultivée (sensible MAS82.OL ou très peu sensible MAS 86.OL). La variété très peu sensible a présenté des pourcentages de sévérité plus faibles que ceux de la variété sensible, ces derniers se limitant à environ 20 % à la dernière date de notation, quel que soit le précédent cultural, sans qu'il n'y ait de tendance particulière dans son évolution. Le témoin sol nu a présenté une sévérité moyenne de 15% à la dernière date de notation. Aucun effet des traitements monospécifiques ou en mélange sur la sévérité n'a pu être mis en évidence dans le cadre de cet essai et aucune différence significative n'a été observée.

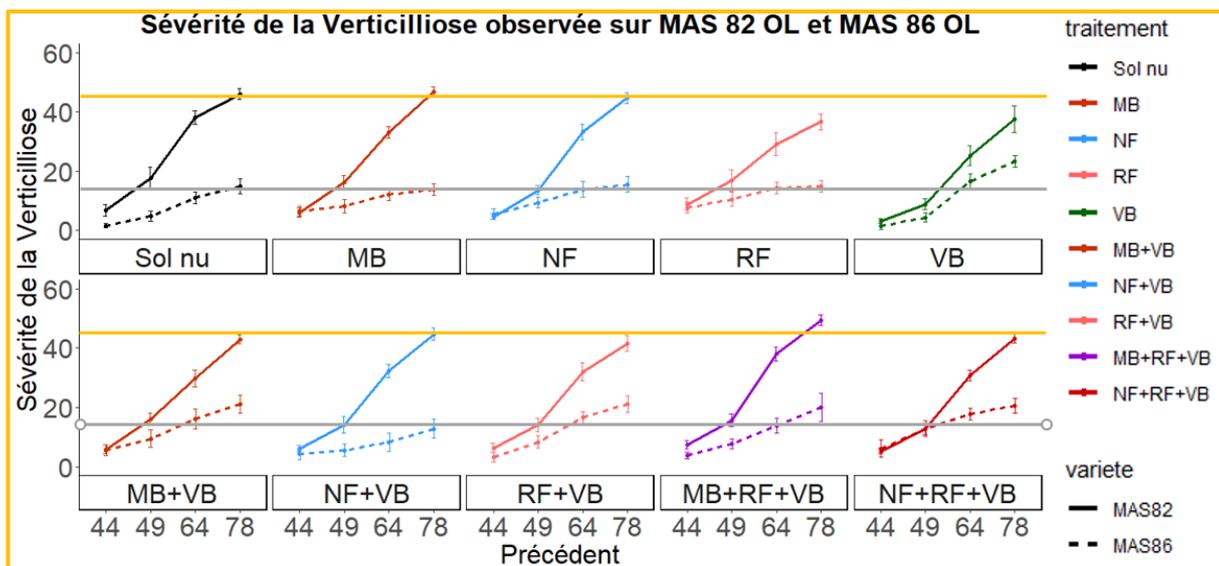


Figure 54 – Dynamique de l'indice de la sévérité de la Verticilliose du tournesol (%) en fonction du nombre de jour après semis, ainsi que du précédent cultural et des deux variétés utilisées où Sol nu est le témoin sans couverture pendant la période d'interculture ; MB la moutarde brune ; NF la navette fourragère ; RF le radis fourrager ; VB la vesce du Bengale ; et MB+VB, NF+VB, RF+VB les mélanges bispécifiques des deux cultures précédemment nommées ; MB+RF+VB et NF+RF+VB les mélanges trispécifiques des trois cultures précédemment nommées. MAS82 est la variété sensible à la Verticilliose MAS82OL et MAS86 est la variété très peu sensible à la Verticilliose MAS86OL. Les traits verticaux jaunes et gris correspondent à l'indice de sévérité du témoin sol nu à 78 JAS de MAS 82OL et MAS 86OL, respectivement. Ils permettent la comparaison de l'indice de ce traitement avec les autres traitements, pour chacune des deux variétés.

Les rendements du tournesol de la variété MAS 86.OL sont présentés sur la Figure 55. Les tournesols cultivés après le traitement sol nu ont en moyenne les rendements les plus faibles ( $1,91 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) et les tournesols cultivés après un précédent moutarde brune en mélange avec de la vesce du Bengale ont mené aux rendements moyens les plus élevés ( $2,38 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Aucune différence significative n'a néanmoins été observée entre aucun des traitements (CIMS monospécifiques ou CIMS en mélanges, en comparaison avec les témoins laissés en sols nus pendant la période d'interculture).

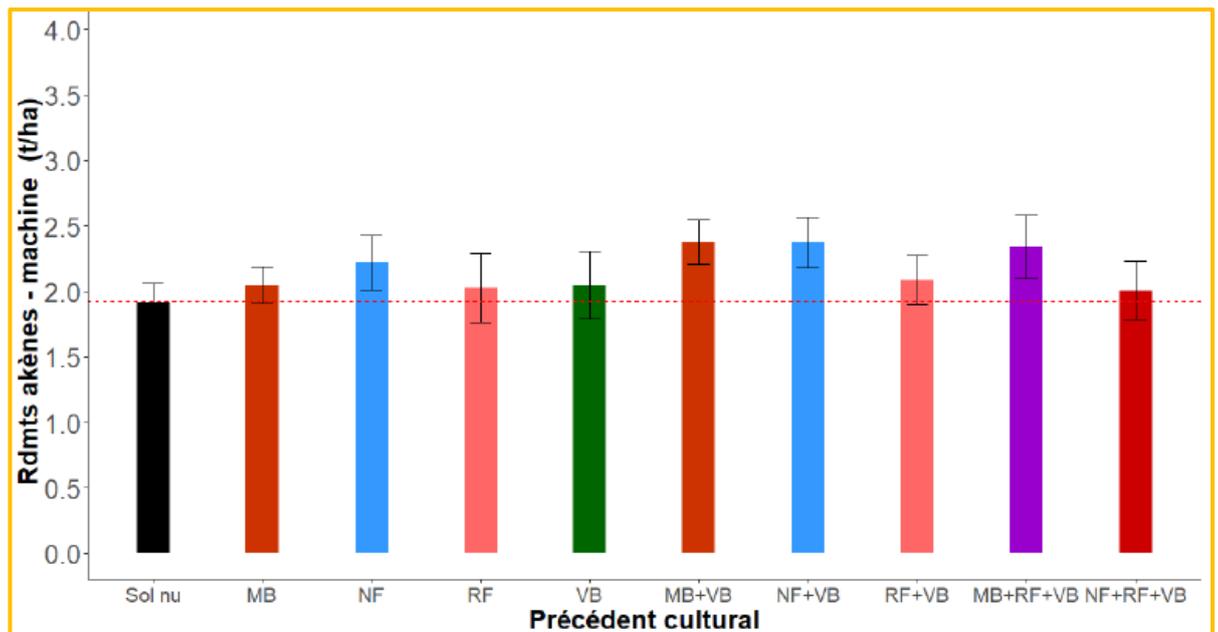


Figure 55 – Rendements en akènes ( $t \cdot ha^{-1}$ ) de la variété très peu sensible à la Verticilliose (MAS86.OL) mesurés sur 4 rangs par récolte à la moissonneuse batteuse expérimentale, en fonction du précédent cultural où Sol nu est le témoin sans couverture pendant la période d’interculture ; MB la moutarde brune ; NF la navette fourragère ; RF le radis fourragère ; VB la vesce du Bengale ; et MB+VB, NF+VB, RF+VB les mélanges bispécifiques des deux cultures précédemment nommées ; MB+RF+VB et NF+RF+VB les mélanges trispécifiques des trois cultures précédemment nommées. Le trait rouge représente le rendement moyen du témoin Sol nu. Les barres d’erreurs représentent les erreurs standards.

### III.4. Essai complémentaire au sein d’une parcelle d’agriculteur

Afin d’évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation dans le contexte de pratiques agricoles d’un agriculteur et de manière à sortir du cadre de dispositifs en parcelles expérimentales, un essai supplémentaire a été mené sur la parcelle d’un agriculteur, située dans le Gers, et reconnu comme étant naturellement infestée par du *V. dahliae*, car régulièrement louée par des entreprises semencières pour des essais de résistances variétales contre le champignon, favorisant le maintien de l’inoculum.

#### III.4.1. Matériel et méthodes de l’essai supplémentaire

##### III.4.1.1. Design expérimental et itinéraire cultural

L’essai a été mené au sein d’une parcelle située dans la commune de l’Isle Jourdain, près de Toulouse, dans le sud-Ouest de la France. Les CIMS testées ont été semées le 21 Octobre 2020, sur une parcelle ayant été cultivée précédemment avec un blé

dur. Les couverts sélectionnés sont le radis fourrager (var. Anaconda), la vesce du Bengale (var. Titane) et un mélange des deux variétés. Chaque traitement a été semé au sein d'une bande de 20 m de large et 100 m de long avec un semoir à céréales, à des densités équivalentes à celles des essais à Auzeville (80 gr.m<sup>-2</sup> pour les traitements monospécifiques et 40 gr.m<sup>-2</sup> pour le mélange, semé en design substitutif). Le témoin est une bande de la même dimension, laissée sans couverture pendant la période d'interculture. Les CIMS n'ont été ni irriguées ni traitées avec des produits phytopharmaceutiques, ni fertilisées. Les CIMS ont été broyées au broyeur à végétaux le 23 Mars 2021 mais n'ont pu être enfouis que deux jours plus tard pour des soucis organisationnels. La température moyenne le jour de la destruction était de 9.2°C, et aucune précipitation n'a été enregistrée la semaine suivant la destruction (entre le 23/03/2021 et le 30/03/2021). (source : /agroclim.inrae.fr station Auzeville-Tolosane). Un travail du sol ainsi qu'un épandage d'azote ont été réalisés 15 jours avant le semis du tournesol. La variété sensible MAS 82.OL a été semée le 06 Mai 2021.

#### III.4.1.2. Mesures réalisées

Des prélèvements de sol entre 0 et 60 cm ont été réalisés à la tarière au sein de 5 zones environ un mois avant destruction des CIMS (le 17/02/2021) et environ 15 jours après semis du tournesol (le 20/05/2021). Ces échantillons ont été analysés par les mêmes protocoles que ceux décrits dans l'article de la première partie de ce chapitre (§III.2.2), afin de déterminer les quantités d'azote minéral présentes dans le sol à ces deux temps de prélèvements. Les biomasses aériennes et racinaires des CIMS ont été prélevés au sein de quadrats de 0,5 m<sup>2</sup> dans 5 zones homogènes de chaque bande une semaine avant destruction des CIMS (le 15/03/2021) afin de déterminer les biomasses produites par hectare avant destruction des couverts. Un suivi de la Verticilliose du tournesol a été réalisé à deux dates : Le 15 Juillet 2020 et le 05 Août 2020, soit 70 jours et 91 jours après semis, respectivement. Les notations de sévérité ont été réalisés au sein de 5 zones sur 10 tournesols choisis avant l'apparition des symptômes. Enfin, des prélèvements manuels des capitules des tournesols suivis sur les zones de suivi de sévérité ont été récoltées à maturité du tournesol, le 08 Septembre 2021.

Les données recueillies ont été analysées avec des Anova à un facteur (traitement de CIMS) afin d'évaluer l'effet des différentes modalités de CIMS ou du témoin sur

les variables « sévérité de la Verticilliose », « quantité d'azote dans le sol » et « rendements en grain du tournesol ».

### III.4.2. Résultats obtenus dans le cadre de l'essai complémentaires et éléments de discussion

#### III.4.2.1. Caractérisation des biomasses produites par les cultures intermédiaires multi-services

Les biomasses produites par les parties aériennes et racinaires du radis fourrager et de la vesce du Bengale en culture monospécifique ou en mélange bispécifique sont représentées sur la Figure 56. Les semis relativement tardifs des CIMS, qui ont été suivis par des période de précipitations élevées et des températures faibles n'ont pas favorisé la production de biomasses élevées. Le radis fourrager en culture monospécifique a produit au total 0,6 t de MS.ha<sup>-1</sup> en comparaison de la vesce du Bengale a produit en moyenne environ 1,2 t de MS.ha<sup>-1</sup>. Le radis fourrager et la vesce du Bengale cultivés en mélange et semés à demi-densité, ont produit une biomasse totale de 0,7 t de MS.ha<sup>-1</sup>, répartie entre la biomasse du radis fourrager qui a atteint 0,3 t de MS.ha<sup>-1</sup> et celle de la vesce du Bengale qui a atteint 0,4 t de MS.ha (Figure 56 et Figure 57).

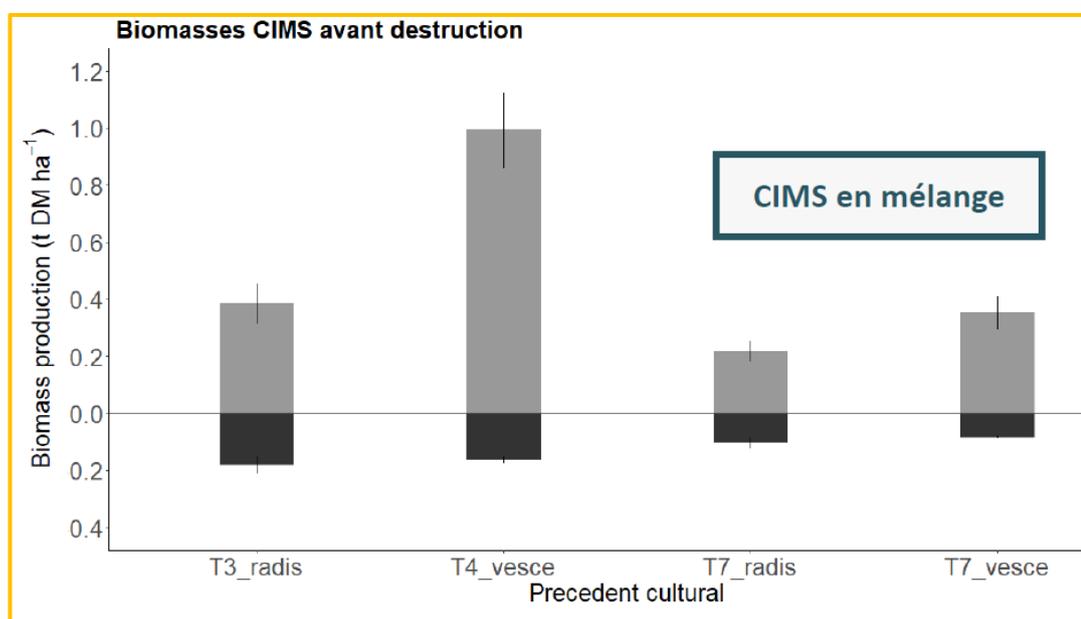


Figure 56 – Biomasses aériennes et racinaires moyennes (t de MS.ha<sup>-1</sup>) produites par les CIMS de l'essai mené en parcelle agricole dans le Gers, en fonction des traitements (radis fourrager et vesce du Bengale cultivés en monospécifique ou en bispécifique). Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.



Figure 57 – Photo des biomasses aériennes produites par le mélange radis fourrager et vesce du Bengale au sein de la parcelle agricole dans le Gers, le jour des prélèvements de biomasses, soit une semaine avant destruction des CIMS (Photo personnelle)

#### III.4.2.2. Quantités d'azote minéral mesurées dans le sol avant destruction des CIMS et après semis du tournesol

La Figure 58 représente les quantités d'azote minéral mesurées dans le sol un mois avant la destruction des CIMS et 15 jours après le semis du tournesol. Les quantités mesurées avant la destruction des CIMS étaient en moyenne de  $20 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , sans qu'aucune différence significative ne soit observée entre les traitements de CIMS en comparaison au sol nu. De la même manière, aucune différence significative n'a été observée entre les traitements après le semis du tournesol. Les quantités d'azote atteignent alors environ  $100 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  auxquelles se sont ajouté un épandage de 45 U d'azote réalisé par l'agriculteur avant le semis du tournesol. Ainsi, les quantités d'azote mesurées au semis du tournesol comprennent une part de la minéralisation des couverts et l'apport azoté, sans qu'aucune différence ne soit visible entre les différents traitements.

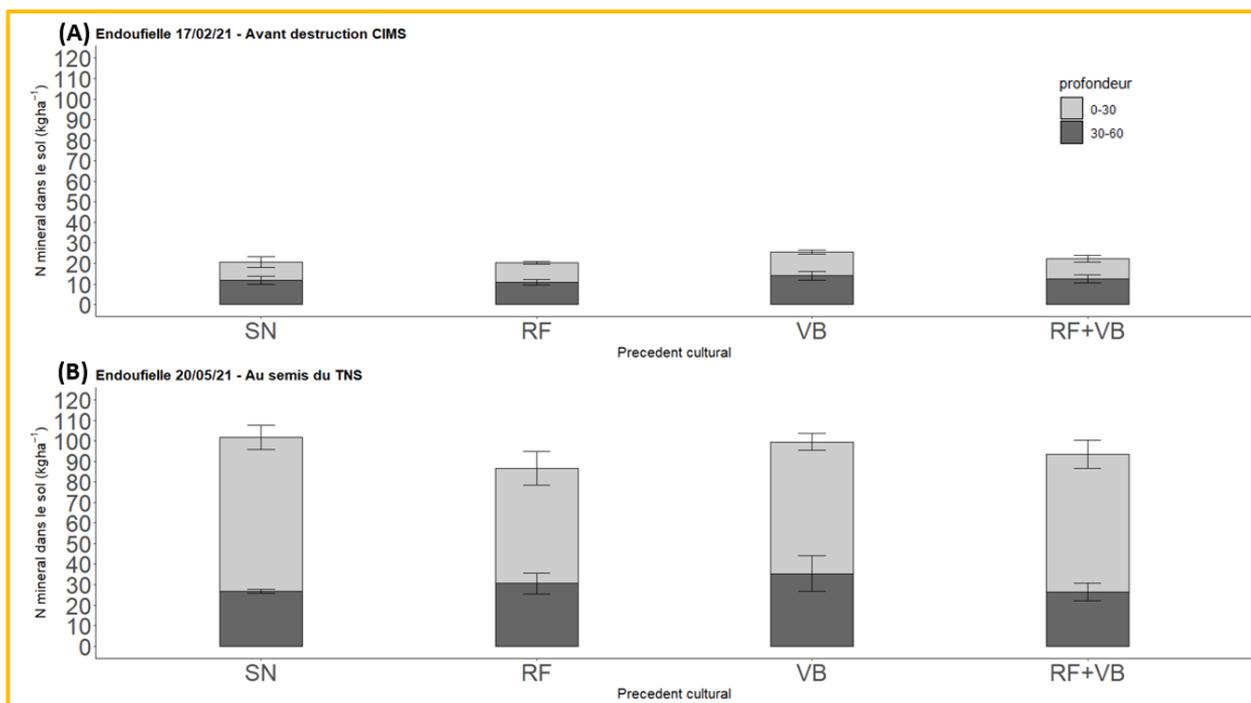


Figure 58 – Quantités d’azote minéral dans le sol (kg.ha<sup>-1</sup>) aux horizons 0-30 et 30-60 cm, mesurées avant destruction des CIMS et après semis du tournesol, en fonction des traitements de l’essai, où SN est le sol nu, RF le radis fourrager, VB la Vesce du Bengale et RF+VB le mélange radis fourrager et vesce du Bengale. Les barres d’erreurs représentent les erreurs standards.

#### III.4.2.3. Effets des CIMS sur la sévérité de la Verticilliose du tournesol

La Figure 59 représente les indices de sévérité de la Verticilliose du tournesol, mesurées à deux dates de suivi de la maladie. Des symptômes de Verticilliose ont pu être observés et la sévérité a atteint environ 50 % à maturité du tournesol. Néanmoins, aucune différence significative n’a pu être observée entre les symptômes des tournesols cultivés après des traitements avec CIMS, en comparaison avec la parcelle témoin sans CIMS. Cette absence d’effets pourrait s’expliquer par les biomasses relativement faibles qui ont été produites, couplés par un laps de temps assez important entre le broyage et l’enfouissement des CIMS (en vue d’une biofumigation), qui a peut-être pu provoquer une perte importante des GSLs et des ITCs par volatilisation.

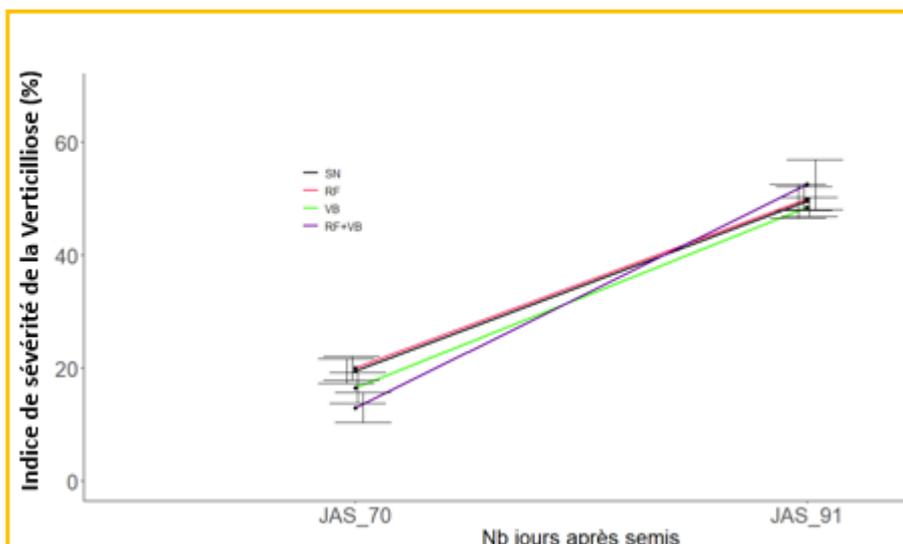


Figure 59 – Evolution de l'indice de la sévérité de la Verticilliose du tournesol (%) en fonction du nombre de jours après semis et du précédent cultural. La sévérité mesurée sur 10 tournesols répartis sur 5 zones de chaque traitement, où SN représente le sol nu, RF le radis fourrager, VB la vesce du Bengale et RF+VB le mélange Radis fourrager et Vesce du Bengale. Les mesures ont été réalisées à deux dates (70 JAS et 91 JAS). Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

#### III.4.2.4. Rendements manuels mesurés à maturité du tournesol

La Figure 60 représente les rendements manuels en fonction des traitements. Les rendements ont atteint en moyenne  $4,65 \text{ t.ha}^{-1}$ , sans qu'aucune différence significative ne soit observée entre les traitements. Les tournesols cultivés après de la vesce du Bengale ont présenté le plus de variabilité, avec un rendement variant entre  $1,92 \text{ t.ha}^{-1}$  et  $5,95 \text{ t.ha}^{-1}$  en fonction des cinq zones de prélèvements. Ces rendements ne reflètent cependant pas le rendement moyen de la parcelle compte tenu du fait que les prélèvements ont été réalisés sur des zones homogènes, en comparaison au reste de la parcelle de l'agriculteur. Le rendement fourni par l'agriculteur atteignait  $2,3 \text{ t.ha}^{-1}$  à l'échelle de la parcelle.

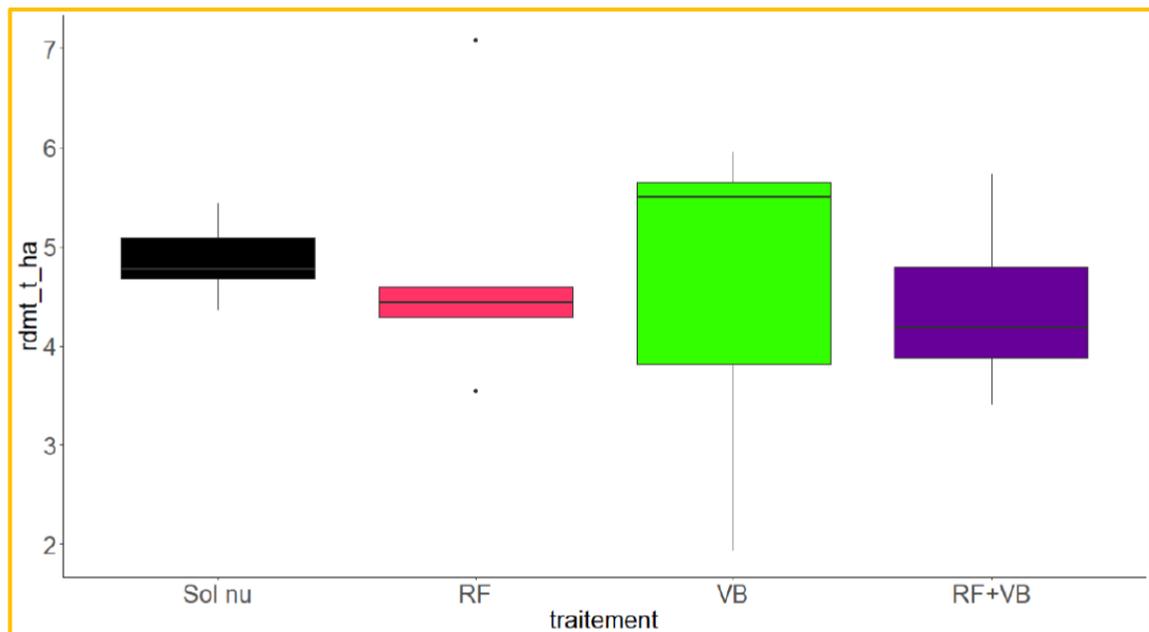


Figure 60 – Rendements du tournesol ( $t \cdot ha^{-1}$ ) estimés manuellement, en fonction des traitements de CIMS et du témoin, où Sol nu correspond au témoin sans couverture pendant la période d'interculture, RF correspondu au radis fourrager, VB à la vesce du Bengale et RF+VB au mélange composé de radis fourrager et de Vesce du Bengale.

### III.5. Discussion générale et conclusion du chapitre

Ce chapitre visait à évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur la régulation des dégâts et dommages de la Verticilliose du tournesol, en plein champ, grâce à quatre années d'expérimentation en parcelles expérimentales à Auzeville, et une année d'expérimentation en plein champ dans la parcelle d'un agriculteur. Les hypothèses de départ de ce chapitre étaient les suivantes :

- La régulation de la Verticilliose est fonction de la biomasse produite par les CIMS
- Des température douce et une quantité en eau non limitante permettent une régulation efficace de la Verticilliose du tournesol
- Les Fabacées augmentent les quantités d'azote disponibles dans le sol pour le tournesol en comparaison avec le sol nu
- Les Brassicacées et la biofumigation réduisent les dégâts et les dommages de la Verticilliose du tournesol en comparaison au sol nu
- Les Brassicacées ou les Fabacées permettent une amélioration des rendements en comparaison des sols nus, et les mélanges des deux permettent une

mutualisation des effets régulation et engrais verts, qui permettent également une amélioration des rendements.

Pour tester ces hypothèses, nous avons réalisé des mesures de biomasses de CIMS et de concentrations en GSLs, ainsi que des mesures de quantités d'azote dans le sol avant semis du tournesol pour caractériser au mieux les facteurs susceptibles d'impacter la Verticilliose du tournesol et les rendements de la culture. Des réductions significatives de la sévérité de la Verticilliose ont pu être mises en avant dans les parcelles expérimentales d'Auzeville en 2016, 2017 et 2020 après l'introduction d'une Brassicacée, en particulier le radis fourrager, à certaines dates de notation, et de la mise en œuvre de la biofumigation, avec une efficacité de la régulation, qui a varié entre 10 à 40 % (en 2020 et 2016, respectivement). Aucune régulation n'a été observée en 2019 en parcelles expérimentale (année où les conditions météorologiques n'étaient pas favorables à la réussite de la biofumigation) ou en parcelle d'agriculteur.

Ainsi, la régulation la plus efficace a été observée en 2016, année à laquelle les couverts étaient les mieux développés, atteignant jusqu'à 6 t de MS.ha<sup>-1</sup> pour le radis fourrager. Elle est suivie par l'année 2017 puis 2020, années durant lesquelles les couverts avaient produits des biomasses sèches relativement faibles (moins de 2 t de MS.ha<sup>-1</sup>). Ces observations peuvent suggérer que des biomasses importantes sont nécessaires à la réussite de la biofumigation. Un test de corrélation entre indice de sévérité de la Verticilliose et biomasses produites a été établie (Annexe IV) et a résulté en une corrélation négative et significative ( $p < 0,05$ ) s'élevant uniquement à -30%. Cette corrélation relativement faible suggère que plusieurs autres facteurs peuvent entrer en compte dans l'efficacité de la biofumigation, en plus de la biomasse produite, avec très certainement un fort effet « année » englobant de nombreuses variations d'ordre pédo-climatique et technique. Selon la littérature (Matthiessen and Kirkegaard, 2006 ; Michel et al., 2008), la météo est également un facteur clef pour la réussite de la biofumigation. L'absence de réduction des dégâts de la Verticilliose en 2019 en comparaison aux autres années semble confirmer l'importance de températures douce le jour de la biofumigation. Néanmoins, des régulations ont pu être observés malgré l'absence de précipitations après la réalisation de la biofumigation, contrairement à nos attentes. Un autre facteur à prendre en compte dans l'efficacité des régulations de la Verticilliose est le choix de la variété de tournesol puisque les ampleurs de

régulation n'ont pas été les mêmes en fonction des variétés (AUZ16 et AUZ17 en comparaison à AUZ19 et AUZ20). Ainsi, bien que les observations réalisées au sein de ces quatre années ne contredisent pas les hypothèses posées au sujet de l'importance de la biomasse et des conditions météorologiques dans la réussite de la biofumigation, il serait nécessaire de les conforter par des expérimentations en mésocosme, intégrant des gammes de biomasses testées et des gammes de températures, et permettant de s'affranchir des aléas pédo-climatiques et techniques. Ces expérimentations sont détaillées dans la partie V. Discussion et perspectives.

A l'échelle des 4 années d'essai, le radis fourrager semble être la CIMS la plus favorable à une régulation de la Verticilliose du tournesol. La vesce du Bengale a mené à des résultats contrastés en fonction des années et de l'incidence d'autres maladies telles que le phoma, avec des réductions de la Verticilliose en 2017 et 2020 et une augmentation en 2019. Aucune réduction de la Verticilliose, en comparaison au sol nu, n'a été observée l'année où les conditions météorologiques étaient défavorables à la biofumigation avec des températures trop faibles (en 2019) ou dans la parcelle de l'agriculteur, suite à une mauvaise implantation des CIMS ayant mené à des biomasses produites de moins de 1 t de MS.ha<sup>-1</sup>. La comparaison de la verticilliose en fonction de variétés de tournesol présentant une sensibilité contrastée au *V. dahliae*, n'a pas permis de montrer un effet des CIMS et de la biofumigation. Cela peut suggérer qu'une combinaison entre le levier variétal et la biofumigation n'a pas été suffisante pour maximiser les régulations de la Verticilliose dans ces conditions. Mais cela pourrait également être expliqué par une trop faible expression de la maladie.

Ces essais ont également permis de valider en partie l'hypothèse selon laquelle l'implantation d'une légumineuse, la vesce du Bengale dans le cas de cette thèse, permet d'améliorer les quantités d'azote dans le sol, disponibles pour le tournesol, puisqu'une augmentation significative de ces dernières ont pu être observés en 2019, avec un gain d'environ 40 kg.ha<sup>-1</sup> en comparaison au sol nu. Les autres années (2017 et 2020) ces augmentations n'étaient pas significatives.

Enfin, l'hypothèse d'augmentation des rendements grâce à des mélanges de CIMS permettant une mutualisation de CIMS n'a pas semblé être confirmée dans le cadre de notre essai. En effet, l'implantation de CIMS, en cycle relativement court (de

Septembre / Octobre à Janvier / début Mars en fonction des années), a permis une amélioration des rendements de l'ordre de 0.77 t.ha<sup>-1</sup> en 2020 observée sur les tournesols cultivés après de la vesce du Bengale. Les mélanges n'ont pas mené à des améliorations significatives des rendements. Sur l'ensemble des traitements testés sur 4 années, deux traitements (navette monospécifique et navette en mélange avec de la vesce du Bengale) ont conduit à une réduction significative du rendement, en 2019. Il est à noter que l'amélioration significative des rendements mesurée après le couvert de vesce s'est produite l'année à laquelle les biomasses de la vesce du Bengale étaient les plus élevées, observation confirmant l'hypothèse selon laquelle la biomasse est un facteur clef pour l'expression d'un service écosystémique potentiel (Gardarin et al., 2022; Lamichhane and Alletto, 2022)

Le deuxième objectif de ce chapitre était d'évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur la protection d'une variété de tournesol très peu sensible au tournesol. Ainsi, il visait à évaluer si la combinaison du levier variétal et du levier agroécologique de la mise en place de CIMS et de la biofumigation pouvait permettre une lutte mutualisation des effets aboutissant à une lutte intégrée efficace contre la Verticilliose du tournesol, voire une amélioration des rendements en grain de la culture. Les indices de sévérités observées sur la variété très peu sensible étaient, comme attendu, significativement plus faible que ceux observés sur la variété sensible (en moyenne 20% contre 40%, toutes variétés confonues). Aucune différence significative n'a pu être observée entre les tournesols témoins TPS à la verticilliose sans couvert pendant la période d'interculture et les tournesols TPS à la verticillios précédés par une CIMS (quelque soit le traitement). La combinaison des deux leviers n'a donc pas permis une meilleure protection du tournesol que celle mobilisant uniquement le levier de la biofumigation (sur variété sensible), et n'a pas non plus abouti à une augmentation des rendements en grains. Ces résultats seraient à confirmer dans des situations de plus fortes pression de maladie ou avec d'autres variétés aux résistances intermédiaires.

La troisième et dernière partie de ce chapitre avait pour objectif d'évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur la protection du tournesol selon les pratiques culturales mise en place par un agriculteur du Sud Ouest de la France. Ainsi, l'essai a été réalisé chez un agriculteur à Endoufielle, dans le Gers, qui a lui-même réalisé les différentes interventions culturales après que la semence de CIMS et de tournesol lui ait été fourni en Août. L'agriculteur n'ayant pas la possibilité et la

volonté d'irriguer un couvert, il a attendu les précipitations du mois de Novembre pour réaliser les semis. Ces semis tardifs ont contribué à un développement très faible des couverts et les biomasses obtenues (mesurées en Mars) étaient en moyenne inférieures à 1 t de MS.ha<sup>-1</sup>, contrairement à celles habituellement obtenus à Auzeville. La mise en œuvre de la biofumigation a également été contrainte, et il n'a pas été possible de broyer et d'enfouir le couvert le même jour. Pour rappel, il est préconisé de réaliser ces deux pratiques successivement afin de minimiser les pertes de produits de dégradation de GSLs par volatilisation. Il est donc probable que les quantités de molécules biocides produites, initialement faibles à cause des quantités de biomasses limitées, aient été volatilisées. L'itinéraire technique relatif au tournesol a été mis en place par l'agriculteur. Les mesures réalisés le long du cycle du développement du tournesol (suivi de la sévérité de la Verticilliose et estimations des rendements en grains) n'ont pas permis de mettre en évidence un effet des CIMS et de la biofumigation pour la protection du tournesol. La Vesce du Bengale, utilisée pour ses effets engrais verts, n'a pas non plus permis une amélioration significative de la quantité d'azote dans les sols avant le semis du tournesol (bien que celle-ci ait pu être lissée par les apports de l'agriculteur, réalisés avant nos prélèvements de sol) et n'a pas non plus permis une amélioration significative des rendements, contrairement à ce qui a pu être observé à Auzeville durant l'essai AUZ20. Ainsi, il ressort de cette essai une certaine difficulté à mettre en œuvre certaines pratiques permettant de maximiser les services fournis par les CIMS (telles que des semis précoces pour maximiser les biomasses des CIMS et une succession rapide du broyage et de l'enfouissement des couverts). Pourtant, avant d'atteindre une étape de conseil et d'extension de la mise en œuvre de la pratique de biofumigation, il semble nécessaire d'identifier et de confirmer la faisabilité d'un itinéraire technique optimal pour l'expression des services souhaités. Dans un second temps, il est également indispensable d'évaluer l'efficacité de la biofumigation au sein de réseaux d'agriculteurs pour assurer une généralité des résultats escomptés.

**Chapitre IV** – Evaluation des potentiels dis-services des cultures intermédiaires multi-services sur les communautés microbiennes du sol

## IV.1. Introduction générale du chapitre

Les chapitres précédents ont permis de mettre en évidence des effets régulateurs des broyats d'espèces utilisées tant que CIMS à l'encontre du développement de deux bioagresseurs telluriques du tournesol (*V. dahliae* et *O. cumana*). La régulation de *O. cumana* semble particulièrement efficace suite à son exposition *in vitro* à de la moutarde brune, en particulier lors de sa phase de germination, et à moindre mesure lors de sa phase de fixation. Toutes les Brassicacées utilisées (Moutarde brune, navette fourragère et radis fourrager) ont permis une régulation significative du développement du mycélium et des microsclérotés de *V. dahliae*, en milieu contrôlé. La régulation de la Verticilliose du tournesol est plus variable en plein champ, et l'efficacité du levier agroécologique de l'implantation des CIMS et de la biofumigation semble dépendre de nombreux facteurs techniques et climatiques. En fonction des années les Brassicacées monospécifiques semblent présenter un potentiel de régulation de la Verticilliose du tournesol, ainsi que la Vesce du Bengale monospécifique. Ce service de régulation biotique peut s'accompagner de services en lien avec le cycle de l'azote, avec l'observation d'une augmentation significative des quantités d'azote dans le sol avant le semis du tournesol lors d'une année. S'il semble nécessaire d'une part de confirmer la généralité de l'expression de ces services par des essais expérimentaux au sein de réseaux d'agriculteurs avant de pouvoir apporter du conseil au sujet de ces pratiques, il semble également nécessaire d'évaluer si les CIMS et la biofumigation n'engendrent pas de dis-services, avec notamment des effets régulateurs sur des communautés bénéfiques du sol. Ce chapitre vise donc, après un état de l'art des connaissances sur cette question, la démarche et les résultats obtenus pour répondre à la question des effets des CIMS et de la biofumigation sur ces communautés microbiennes, en s'intéressant d'abord précisément aux communautés impliquées dans la fixation azotée des Fabacées et aux champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) du tournesol. Puis, grâce à des méthodes de séquençage moléculaire de l'ADN du sol (PCR), les effets des CIMS et de la biofumigation sont évalués concernant les communautés bactériennes et fongiques de manière plus générale, avant de se focaliser à nouveau sur certains genres de bactéries symbiotiques des Fabacées et de CMA.

## IV.2. Introduction

L'intensification de l'agriculture pour augmenter la productivité a engendré une érosion de la biodiversité aussi bien aérienne que tellurique (Tilman et al., 2017; de Graaff et al., 2019). Les communautés microbiennes du sol ont longtemps été considérées comme une boîte noire, et les sols hébergent une diversité

insoupçonnée de micro-organismes encore mal comprise et considérée comme une voie de recherche prioritaire (Tiedje et al., 1999; van der Heijden and Wagg, 2013). L'acquisition de connaissances et la compréhension de l'impact des pratiques agricoles sur les communautés microbiennes du sol n'en sont qu'à leurs balbutiements (van der Heijden and Wagg, 2013). Pourtant, les communautés microbiennes peuvent influencer la productivité des cultures, en ayant un rôle central dans les cycles biogéochimiques et dans la fourniture de fonctions écologiques (van der Heijden et al., 2008). En particulier, les Fabacées sont connues pour être une porte d'entrée pour l'azote symbiotique dans les systèmes de culture, grâce à des bactéries capables de former des symbioses avec cette famille botanique et de fixer de l'azote atmosphérique converti en ammonium (Schneider and Huyghe, 2015). Une autre communauté capable d'améliorer la fourniture de nutriments à leurs symbiotes est celle des CMA, qui sont capables de fournir à la plante une résistance aux maladies et à la sécheresse et un enrichissement en de nombreux nutriments potentiellement limitants incluant l'azote, le phosphore, le fer et le zinc, en échange de carbone (van der Heijden et al., 2008).

Dans le cadre de cette étude concernant la succession CIMS – tournesol, ces deux communautés ont un intérêt particulier mais comme détaillé précédemment, les Brassicacées produisent des composés allélopathiques, tels que les ITCs, durant tout leur cycle de développement (Angus et al., 1994a; Brown and Morra, 1997), et durant le processus de biofumigation (Kirkegaard et al., 1993) qui pourraient potentiellement avoir un impact sur les communautés symbiotiques des Fabacées, comme cela a déjà été observé par Bressan et al. (2009), qui rapportent que les Brassicacées impactent fortement la structure et la composition des Rhizobiaceae, avec des sensibilités différentes selon les populations. Ils suggèrent que ces observations peuvent être le résultat d'une action direct ou indirect des produits de dégradation des GSLs. De plus, Hossain et al. (2015) ont observé que l'incorporation de moutarde blanche ou de moutarde brune pouvait réduire la formation de nodules sur les racines de pois cultivés à la suite, ils suggèrent également une action des ITCs (aliphatiques), bien qu'une réduction du nombre de nodules n'engendre pas de dégâts permanents puisqu'elle peut être compensé par une augmentation de la taille des nodules et de l'efficacité de la fixation (Pate and Dart, 1961). Par ailleurs, certaines espèces de Brassicacées peuvent être très compétitrices vis-à-vis de Fabacées associées dans leur acquisition des ressources

tels que (i) l'azote, avec comme exemples le colza, la moutarde (brune, blanche et d'Ethiopie) et la navette fourragère (Couëdel et al., 2018c) et (ii) le soufre, avec les exemples du colza, du radis et de la navette fourragère (Génard et al., 2017; Couëdel et al., 2018b, 2018a), ce qui peut s'expliquer par la capacité de ces espèces à développer rapidement leur système racinaire (Kristensen and Thorup-Kristensen, 2004). Ces caractéristiques (forte compétitivité et propriétés allélopathiques) font que les Brassicacées ont la réputation d'être des « poor companion crops » à l'égard des Fabacées associées (Couëdel et al., 2018c). Face à ces observations qui laissent suggérer qu'une association Brassicacée – Fabacée soit défavorable au développement de l'interaction symbiotique entre Fabacées et bactéries fixatrices d'azote, il y a un intérêt à évaluer, par des observations issues de dispositifs « au champ » si les Fabacées monospécifiques fixent plus d'azote que celles en association avec les Brassicacées. En effet, ces connaissances ne font actuellement pas consensus et ne concernent pas précisément les espèces et variétés étudiées dans le cadre de cette thèse.

Concernant les CMA, il ressort de la littérature que :

(i) La majorité des espèces de Brassicacées sont des cultures non-hôtes de CMA avec des exceptions ne faisant pas consensus (Vierheilig et al., 2000; Cosme et al., 2018) ce qui peut empêcher leur maintien pendant une période d'interculture lors de laquelle des Brassicacées sont semées. Une hypothèse majeure expliquant le caractère non-hôte des Brassicacées serait la formation des molécules biocides issus de la dégradation des GSLs, avec une variabilité des effets en fonction des profils (Vierheilig et al., 2000). Par exemple, la sinigrine, GSL précurseur de la production du 2-propenyl-ITC, peut significativement inhiber la germination de spores de CMA selon une étude menée au laboratoire (Cantor et al., 2011) ou réduire la diversité des CMA des racines de soja en comparaison avec des sols laissés en jachère, ou avec d'autres couverts testés (vesce velue et ray-grass d'Italie) selon Higo et al. (2019). Le gluconasturtiin, GSL précurseur du 2-Phenyl-ethyl-ITC, est également uniquement détecté dans les tissus des Brassicacées non-hôtes (Vierheilig et al., 2000). Le radis fourrager, qui ne semble pas contenir de sinigrine et contient peu ou pas de gluconasturtiin (Couëdel et al., 2018b), n'a pas eu d'effets négatifs sur la colonisation des racines de maïs par les CMA, en comparaison avec le contrôle sans couvert, lors d'une étude menée en plein champ, suggérant soit des quantités produites ou des durées de contact trop faibles entre CMA et ITCs,

ou alors une toxicité réduite de ces composés contre certaines structures des CMA (White and Weil, 2010). Lehman et al. (2012) n'ont pas non plus observé d'effets négatifs de Brassicaceae (radis fourrager, colza ou navette).

(ii) Les Fabacées sont, au contraire, hôtes de CMA (Brundrett, 2009) et permettent de fournir les conditions favorables au maintien de ces communautés.

(iii) Théoriquement, des mélanges de Brassicacées et de Fabacées pourraient permettre un maintien des communautés de CMA grâce à l'inclusion d'une culture hôte, et c'est effectivement l'hypothèse émise par Lehman et al. (2012), qui ont observé un effet globalement positif des mélanges sur les CMA, pouvant s'expliquer par une continuité dans les ressources fournies par les espèces utilisées en mélanges, en comparaison à des cultures mono-spécifiques.

Finalement, concernant la question des effets des CIMS sur les CMA, peu de consensus existe à l'issue des expérimentations obtenues en plein champ, et ces dernières évaluent principalement les effets des CIMS sans précisément mettre en œuvre une biofumigation pour en évaluer les conséquences. Encore une fois, les connaissances disponibles ne concernent pas précisément les espèces et variétés visées dans le cadre de cette thèse, car adaptées au Sud-Ouest de la France.

Au-delà de ces travaux expérimentaux très ciblés, l'avènement de méthodes de séquençage moléculaires haut-débit a démarré il y a une vingtaine d'années, a beaucoup progressé depuis (Tiedje et al., 1999; van der Heijden and Wagg, 2013) et a révolutionné l'étude des communautés microbiennes (Johnston-Monje and Lopez Mejia, 2020). Malgré son coût relativement élevé, le séquençage par Illumina MiSeq présente l'avantage d'être beaucoup plus puissant que les méthodes utilisées auparavant, et permet d'apprécier les communautés bactériennes et fongiques jusqu'à l'entité hiérarchique de la famille, voire du genre, contrairement à d'autres approches qui ne peuvent pas atteindre une entité hiérarchique aussi fine telles que l'électrophorèse ou de l'étude des acides gras dérivés des phospholipides (Hollister et al., 2013), ou encore la quantification de biomasses microbiennes grâce à des indicateurs tels que le carbone et l'azote utilisées dans certaines études. Néanmoins, toutes ces méthodes ont quand même permis d'aboutir à un certain nombre de résultats sur les effets des CIMS sur les communautés microbiennes et des effets globalement positifs sont mis en

évidence par la méta-analyse récente de Muhammad et al. (2021). Ce dernier n'émet aucune conclusion à l'égard de la biofumigation.

Ainsi, et pour rappel, les questions auxquelles tente de répondre ce chapitre sont les suivantes :

1. Une association entre Brassicacées et Fabacées a-t-elle un effet sur la capacité de la Fabacée à fixer symbiotiquement l'azote atmosphérique, en comparaison avec une Fabacée en culture monospécifique ?

2. Quels effets des CIMS et de la biofumigation sur le taux de mycorhization des racines de tournesol?

3.1 : Quels effets des CIMS sur les communautés à proximité des racines de CIMS (où les effets allélopathiques sont les plus importants) e la rhizosphère pendant le développement des couverts ?

3.2 : Quels effets des résidus des CIMS sur les communautés microbiennes après leur enfouissement et leur décomposition ?

Les hypothèses émises pour chacune de ces questions sont présentées dans la partie 1.4. Objectifs et hypothèses traitées dans la thèse.

## IV.3. Matériel et méthodes

### IV.3.1. Mesures de la fixation azotée

Afin de tester ces hypothèses, nous avons mobilisé les dispositifs mis en place à Auzeville en 2020. Les végétaux ont été prélevés avant la destruction des couverts en 2020 : nous avons prélevé des échantillons de parties aériennes de Fabacées cultivées en association bispécifique avec de la moutarde brune, de la navette fourragère ou du radis fourrager. Des Brassicacées à proximité des Fabacées prélevées ont également été échantillonnées pour servir de référence (voir équation ci-dessous). Les échantillons ont été lavés et séchés à 80°C pendant 48h puis finement broyés et conservés à température ambiante. Ils ont ensuite à nouveau été séchés à 70°C pendant 24h afin d'éliminer toute humidité des poudres de Fabacées ou Brassicacées. Pour chaque échantillon, 6 mg de poudre a été pesé, conditionné dans de l'étain, et envoyé au laboratoire INRAE FARE (Fractionnement des Agro Ressources et Environnement) pour le dosage de l'excès isotopique <sup>15</sup>N.

Le pourcentage d'azote atmosphérique fixé symbiotiquement a été calculé selon l'équation de Shearer and Kohl (1986) de la manière suivante :

$$\%Ndfa = \frac{\delta^{15}N_{ref} - \delta^{15}N_{ech}}{\delta^{15}N_{ref} - \beta_{Fix}} \times 100$$

Où :

-  $\delta^{15}N_{ref}$  correspond au  $\delta^{15}N$  moyen de plusieurs Brassicacées cultivées à proximité des Fabacées étudiées. Le  $\delta^{15}N$  étant un ratio entre deux isotopes stables de l'azote ( $^{15}N:^{14}N$ ), cette composante n'a pas d'unité.

-  $\delta^{15}N_{ech}$  correspond au  $\delta^{15}N$  de l'échantillon étudié (vesce monospécifique ou vesce cultivée en mélange bispécifique). Cette composante n'a pas d'unité car  $\delta^{15}N$  est un ratio.

-  $\beta_{fix}$  est un facteur de correction constant, unique à chaque espèce, qui correspond au  $\delta^{15}N$  d'une Fabacée dont la seule source d'azote est l'atmosphère et il varie entre -1% et 0. Dans le cas de notre étude, la valeur est une estimation moyenne de **-0,79**, référencée par Unkovich et al. (2008).

D'autre part, la teneur en azote contenu dans les tissus des vesces prélevées a également été dosée par un spectromètre de masse de rapport isotopique en flux continu (IRMS), afin de pouvoir calculer la quantité totale d'azote acquise par les parties aériennes des Fabacées, en appliquant l'équation suivante :

$$N_{acquis} (kg. ha^{-1}) \\ = Biomasse\ sèche \times N_{abs} \times 10$$

Où :

- La biomasse sèche est en  $t. ha^{-1}$

-  $N_{abs}$  est l'azote contenu dans les parties aériennes et mesuré par la méthode IRMS (en %).

Enfin, le produit de la quantité d'azote acquise et du taux de fixation symbiotique permet d'estimer la quantité d'azote présente dans les parties aériennes des Fabacées qui a été acquise grâce à de la fixation symbiotique ( $QN_{fix}$ ). Il est

également possible de calculer la quantité d'azote ayant comme origine l'azote minéral contenu dans le sol (QNmin) en retranchant ce produit au N acquis calculé ci-dessous (où QNShoots est exprimé et donc QNfix et QNmin sont exprimés en kg.ha<sup>-1</sup>):

$$QNfix = QNShoots \times \%Ndfa$$

$$QNmin = QNShoots - QNfix$$

Afin de pouvoir comparer les performances d'acquisition d'azote par les vesces du Bengale en culture monospécifique et celles en cultures associées, l'indice du Land Equivalent Ratio (LER) a été calculé. Il s'agit de la surface de sol nécessaire pour que la culture monospécifique et la culture en mélange acquièrent la même quantité d'azote (avec les mêmes espèces). L'indice a été calculé de la manière suivante :

LER pour l'acquisition de l'azote pour la Fabacée (les quantités sont exprimées en kg.ha<sup>-1</sup>) =

$$LER \text{ acquisition de l'azote par la légumineuse} = \frac{\text{Quantités acquises en mélange}}{\text{Quantités acquises en culture pure}}$$

Si les mélanges sont semés à une densité équivalente à 50% de celle des cultures pures, un LER inférieur à 0,5 signifie que l'espèce valorise moins bien les ressources en mélange qu'en culture monospécifique. Si le LER est supérieur à 0,5, le mélange valorise mieux les ressources que la culture monospécifique.

## IV.3.2. Mesures des taux de mycorhization des racines de tournesol

### IV.3.2.1. Choix des traitements

L'observation des taux de mycorhization étant une activité chronophage (20 à 30 minutes par échantillon estimés durant ce travail), il n'a pas été possible d'étudier l'effet de toutes les modalités de CIMS sur cette variable, en comparaison au témoin 'sol nu'. De ce fait, nous avons restreint le choix des parcelles étudiées à celui-ci : Référence témoin sol nu ; deux Brassicacées aux profils contrastés qui sont la moutarde brune, et le radis fourrager, la Fabacée du dispositif (Vesce du Bengale) et le mélange de ces trois espèces. Le choix des Brassicacées s'est portée sur ces deux espèces car la moutarde brune est riche en sinigrine.

#### IV.3.2.2. Prélèvements des racines de tournesols et conditionnement

Les prélèvements ont été réalisés au sein des dispositifs expérimentaux à Auzeville en 2020. Afin d'assurer une colonisation satisfaisante des racines de tournesol par les CMA, un délai de 5 à 6 semaines est nécessaire (Louarn, 2013b). Ainsi, les prélèvements des systèmes racinaires de tournesols ont été réalisés 49 jours après le semis en 2020 soit 7 semaines après le semis.

Le tournesol étant proche ou ayant atteint le stade bouton floral à cette période, et les systèmes racinaires étant développés en profondeur, il a été nécessaire de saisir l'opportunité de l'irrigation pour pouvoir réaliser les prélèvements. Ces derniers ont été réalisés à la bêche, entre 40 et 50 centimètres de profondeur, en prenant soin de prélever les mottes de terre agrégées au système racinaire afin de pouvoir prélever ce dernier de la manière la plus représentative possible, avec une quantité appréciable de racines tertiaires, qui sont susceptibles d'être les plus fortement mycorhizées (Gutjahr and Paszkowski, 2013).

Pour chaque traitement, le nombre d'échantillons prélevés est le suivant, au sein de zones homogènes en termes de densité d'implantation du tournesol : Trois à quatre tournesols au sein de **trois zones**, pour chacun des trois blocs du dispositif, pour chacun des 5 traitements. Les trois à quatre tournesols d'une même zone ont ensuite été poolés en fonction de chaque zone pour ne former qu'un échantillon lors du rinçage.

Les racines de chaque échantillon ont été laissées quelques minutes dans des bassines pour un premier lavage, qui a été complété par un lavage au jet d'eau claire.

Pour cette étude, les racines de tournesols ont été congelées à -20°C pour les stocker avant la suite des manipulations, mais cette méthode a fragilisé les tissus des racines selon nos observations postérieures. Pour cette raison, il à noter qu'il est préférable de les découper pour récupérer les racines tertiaires et ont été stockées dans de l'éthanol à 20% à 4°C à l'obscurité, en suivant les conseils d'experts du Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV). Les racines ont été conservées dans de l'éthanol à 20% à 4°C à l'obscurité entre chacune des manipulations décrites ci-dessous si nécessaire.

#### IV.3.2.3. Préparation des racines de tournesols pour l'observation des taux de mycorhization

Les étapes préalables de conditionnement des racines avant de pouvoir réaliser les comptages de taux de mycorhization sont les suivantes : Découpe des racines tertiaires, qui sont supposées être les plus mycorhizées ; Décoloration des racines ; Coloration des structures formées par les CMA (vésicules ou arbuscules, sans distinction entre les deux). Le mode opératoire de chaque étape est détaillé ci-dessous.

#### IV.3.2.4. Découpe des racines tertiaires de tournesols

Les racines tertiaires de moins de 0,2 cm (à vue d'œil) (Figure 61) ont été découpées à l'aide de ciseaux. La quantité élevée de racines obtenues suite à la découpe des trois à quatre tournesols (~10g) a permis de subdiviser les échantillons de chaque zone en deux sous-échantillons. Ainsi, pour chaque traitement, le nombre d'échantillons observés était de 18 échantillons (3 blocs \* 3 zones \* 2 sous-échantillons). Les échantillons ont été conservés dans des piluliers contenant de l'éthanol à 20% à 4°C à l'obscurité avant les colorations.

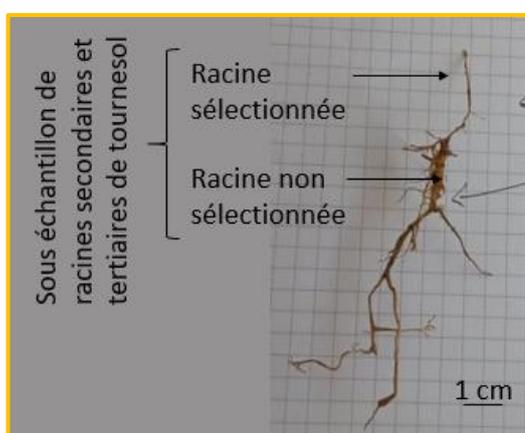


Figure 61 – Illustration du diamètre des racines tertiaires de tournesol sélectionnées pour l'observation des taux de mycorhization (Photo personnelle)

#### IV.3.2.5. Décoloration des racines et coloration des champignons mycorhiziens à arbuscules

##### VI.3.2.5.1. Décoloration des racines à l'hydroxyde de potassium

Les étapes suivantes permettent de décolorer les racines de tournesol. La première étape consiste à ajouter 25 ml de solution d'hydroxyde de potassium (KOH à 10% masse/volume dans de l'eau désionisée) par pilulier contenant les racines tertiaires de tournesols.

Du fait de la congélation des racines et de leur fragilisation, l'étape de décoloration a été adaptée pour ne pas qu'elle soit trop corrosive : Les racines sont laissées 48h dans la solution de KOH, à température ambiante. Les piluliers sont agités 30 min à l'agitateur à la mise en contact entre les racines et le KOH puis 24h après. Les racines sont ensuite rincées à l'eau pour enlever la solution de KOH.

#### *IV.3.2.5.2. Coloration des champignons mycorhiziens à arbuscules dans une solution de colorant acidifié*

Les étapes suivantes permettent de colorer uniquement les champignons endomycorhiziens dans les racines. La première étape consiste à ajouter 25 ml de solution de colorant acidifié (5% d'acide acétique et 5% d'encre Shaeffer, volume/volume dans de l'eau désionisée) dans le pilulier. Les piluliers sont placés au bain marie à 95°C pendant 10 min. La solution de colorant acidifié est filtrée pour récupérer les racines et pour que la solution puisse être réutilisée jusqu'à 5 fois. Les racines sont ensuite rincées abondamment à l'eau.

#### *IV.3.2.6. Comptage des taux de mycorhization*

Afin de réaliser les observations en aveugle et éviter les biais potentiels, une liste de correspondance a été utilisée pour labéliser les piluliers en remplaçant le nom des traitements avec une numérotation aléatoire. Les observations ont été réalisées à la loupe binoculaire (grossissement x20 à x40), à l'aide de la méthodologie de la *gridline intersect method* décrite par Giovannetti et Moss (1980). Elle consiste à positionner l'échantillon de racines tertiaires sur une boîte transparente possédant une grille de traits horizontaux séparés par 0,5 cm et à observer les intersections formées entre les traits et les racines (Figure 62). Lorsque la racine au point d'intersection comporte une structure arbusculaire, elle est comptabilisée et lorsqu'elle ne l'est pas, elle n'est pas comptée. La Figure 63 représente un exemple de chacune de ces situations. Aucune référence sur le nombre minimal d'intersections à observer n'ayant été trouvée, une première étape a été de le déterminer expérimentalement. Pour se faire, trois échantillons ont été observés deux fois de suite, en mélangeant les racines entre chaque observation. Le nombre minimal d'intersection à observer pour atteindre un résultat robuste a été considéré comme étant celui auquel les nombres d'intersection comptées aboutissaient au même taux de mycorhization, et les résultats des observations ont permis d'observer que le taux est identique entre les deux observations consécutives à partir de 500 intersections (figure 64). C'est donc

cette limite minimale qui a été conservée, bien qu'elle ait pu être dépassée pour certains échantillons.



Figure 62 –Echantillon de racines tertiaires de tournesol colorées à l'encre Shaeffer pour l'observation des CMA, placées sur une plaque marquée avec la grille de traits horizontaux de la méthode *grideline intersect* (Source de la photo : Juliette PAINEAU)

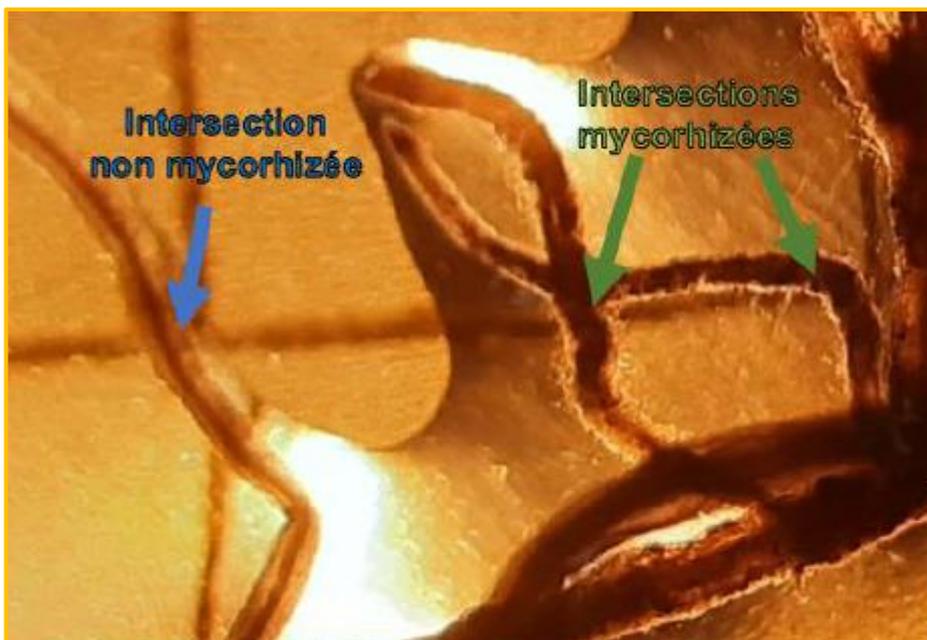


Figure 63 – Racines tertiaires non-mycorhizée (flèche bleue) ou présentant des structures formées par les CMA (flèche verte). Grossissement x40. (Photo prise par Juliette PAINEAU)

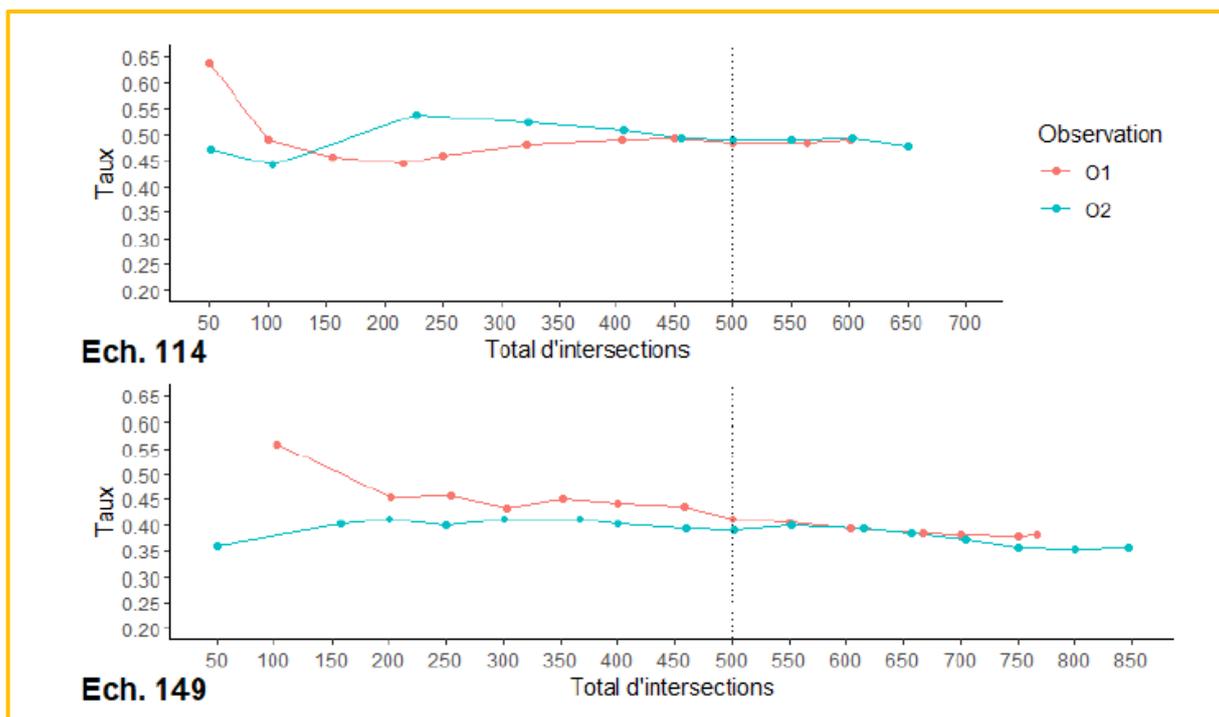


Figure 64 – Taux de mycorhization de deux échantillons choisis aléatoirement et observés deux fois consécutives, en mélangeant la disposition des échantillons de racines entre chaque observation, afin de déterminer combien d’intersection sont nécessaires pour aboutir à un taux de mycorhization reproductible

Enfin, toutes les observations ont été réalisées par le même observateur pour éviter un biais relatif à l’observateur.

#### IV.3.3. Analyse des communautés microbiennes du sol par approche metabarcoding d’ADNr 16S et 18S

Afin de répondre aux questions de recherche détaillées ci-dessus, des prélèvements de sol et de rhizosphère ont été effectués entre 2019 et 2020 sur le dispositif expérimental mis en place à Auzeville.

Avant le semis des CIMS, six échantillons de sol ont été prélevés aléatoirement sur la parcelle afin de pouvoir établir la caractérisation de l’état initial du sol, avant semis des CIMS, et l’hétérogénéité de celui-ci. Un jour avant la destruction des CIMS, six échantillons de sol composites ont été prélevés à la tarière, à une profondeur située entre 0 et 30 cm, au sein d’une zone où le couvert végétal était homogène, au sein des traitements suivants : Moutarde brune monospécifique, navette fourragère monospécifique, radis fourrager monospécifique, vesce du Bengale, et mélanges bispécifiques des Brassicacées citées avec la vesce (donc

Moutarde brune ou navette fourragère ou radis fourrager en association avec la vesce du Bengale). Les mêmes prélèvements ont été réalisés au sein du témoin 'sol nu' laissé sans couverture végétale pendant la période d'interculture (mais sans gestion des adventices, dont le développement était relativement négligeable). Chaque prélèvement composite a été répété trois fois, et le nombre total d'échantillons de sols prélevés est donc de 24 échantillons. La localisation GPS des zones prélevées a été enregistrée au GPS différentiel afin de pouvoir y revenir pour la 2ème date de prélèvements.

Un jour avant le semis du tournesol, soit exactement 89 jours après la destruction et l'enfouissement des CIMS, des prélèvements de sols entre 0 et 30 cm ont été réalisés à avec une tarière motorisée au même endroit que les premiers prélèvements (24 échantillons).

Rapidement après les prélèvements, les sols sont pesés et 50 g de chaque échantillon ont été envoyés à la plateforme GenoSol (INRAE, centre de Dijon). Cet envoi rapide permet d'éviter des modifications des structures de la communauté (variation de températures, hygrométrie...) ce qui peut favoriser ou défavoriser certaines communautés microbiennes et donc induire des biais lors de l'analyse. Une fois réceptionnés, les sols sont tamisés à 4 mm puis lyophilisés. Un gramme de sol lyophilisé par échantillon est utilisé pour l'extraction d'ADN. Les analyses effectuées permettent de quantifier la biomasse moléculaire et la diversité de bactéries et de champignons. Les différentes étapes du protocole sont brièvement décrites ci-dessous :

#### 1. Extraction et purification de l'ADN du sol

Le sol est soumis à une lyse mécanique (dans un broyeur en présence de billes) et chimique (en présence d'un tampon d'extraction). Une étape de précipitation (forte concentration saline) permet de séparer l'ADN des protéines dénaturées. ADN et protéines sont séparées par une étape de centrifugation et le surnageant est récupéré. Ce surnageant est à l'état dit brut et contient encore des éléments contaminants tels que des protéines, des sucres, des acides humiques. L'ADN est purifié en utilisant un tamis moléculaire réalisé sur colonne NucleoSpin Inhibitor Removal Column suivie par une séparation sur colonne d'affinité/exclusion contenant une membrane de silice, NucleoSpin Soil Column.

#### 2. Mesure de la Biomasse Moléculaire Microbienne

Cette dernière repose sur la quantification de l'ADN microbien brut (avant purification). Le protocole d'extraction normalisé ISO 11063 à partir d'1 gramme de sol a été utilisé.

3. Les modifications de structures des communautés bactériennes et fongiques ont été menées grâce l'amplification de gènes marqueurs 16S (F479/R888) et 18S (FF390/FR1) et le séquençage par les nouvelles techniques de séquençage. Cette technique permet de déterminer les structures des communautés bactériennes (ADNr 16S) et de champignons (ADNr 18s). Il permet ainsi de réaliser un inventaire taxonomique des organismes présents dans les sols échantillonnés. Le protocole utilisé a été développé par la plateforme GenoSol et repose sur une préparation de banques de gènes par PCR, avant le séquençage. Cette analyse permet d'obtenir des nombres d'unités taxonomiques opérationnelles (Operational taxonomic units – OTU, en anglais). Ces groupes sont établis avec un seuil de dissimilarité fixé à 5%, qui permet une finesse taxonomique au niveau du genre.

L'identification des genres d'intérêt pour la succession CIMS – Tournesol (Bactéries fixatrices d'azote et CMA) a été réalisé à partir des études de MacLean et al. (2007) et Remigi et al. (2016), et les genres identifiés (quelle que soit l'espèce de Fabacée qui y est associé) sont les genres suivants : Rhizobium, Allorhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium, Rhodopseudomonas, Methylobacterium et Neorhizobium.

#### IV.3.4. Analyses des données recueillies

##### IV.3.4.1. Taux de fixation symbiotique de l'azote atmosphérique

Les variables obtenues à l'issue de ces mesures et calculs sont :

- Les quantités d'azote acquises par les Fabacées cultivées en culture pures ou en association bispécifique avec les Brassicacées
- Les taux de fixation symbiotique de l'azote atmosphérique %Ndfa
- La répartition entre l'azote acquis à partir du sol et celui fixé à partir de l'atmosphère

Les deux premières mesures ont été comparés deux à deux entre la Fabacée monospécifique et les différentes Fabacées cultivées en mélanges bispécifiques. Lorsque les données suivaient une distribution normale et que les variances sont

homogènes, un test de Student a été appliqué. Lorsque l'une de ces hypothèses n'étaient pas respectée, un test non-paramétrique de Wilcoxon a été appliqué. Les différences ont été considérées comme significatives au seuil  $p = 0.05$

#### IV.3.4.2. Taux de mycorhization des racines de tournesol

Les comptages obtenus permettent de calculer un taux de mycorhization, en appliquant l'équation suivante :

$$\begin{aligned} & \text{Taux de mycorhization (\%)} \\ &= \frac{\text{nombre d'intersections mycorhizées observées}}{\text{nombre d'intersections totales observées}} \times 100 \end{aligned}$$

Afin d'améliorer l'homoscedasticité des données, les taux ont été transformés par la fonction suivante (Ahrens et al., 1990), où  $x$  est le taux de mycorhization :

$$\arcsin\sqrt{x}$$

L'homoscédasticité des données transformées en fonction des variables testées a été évaluée avec un test de Levene et la normalité des résidus avec un test de Shapiro Wilk. L'hypothèse d'homoscédasticité des variances n'ayant pas été respectée, un test de Kruskal-Wallis et une comparaison multiple sur rangs ont été réalisées (fonction Kruskal du package Agricolae). Les p-values des comparaisons multiples ont été ajustés avec la méthode de correction du False Discovery Rate (Pike, 2011). Les corrélations entre taux de mycorhization et biomasses des tournesols, des CIMS ou quantités d'azote présentes dans le sol avant semis du tournesol ont été réalisés par la méthode de corrélations des rangs de Spearman. Les différences ont été considérées comme significatives à  $p < 0,05$ . Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel Rstudio v 4.0.5.

#### IV.3.4.3. Communautés microbiennes du sol

Les données obtenues sont les suivantes : Biomasses moléculaire microbiennes, nombres de copies 16S (relatives aux bactéries) et nombre de copies 18S (relatives aux champignons). Conformément à Friberg et al., (2009), les données obtenues sont utilisées pour calculer les indices écologiques suivants, qui permettent d'appréhender le milieu dans sa globalité et de plus facilement interpréter les résultats observés, et de les comparer à d'autres études ayant utilisé ces indices :

**La richesse spécifique**, exprimée en nombre d'espèces, calculée à partir du logarithme du nombre d'OTU (noté S), il permet de rendre compte du nombre d'espèces présents dans un milieu

$$\ln(S)$$

**Indice d'équitabilité (Evenness)** : Calculé à partir de la richesse spécifique et de l'indice de Shannon, et il varie entre 0 et 1. Cet indice permet de représenter l'équitabilité numérique d'OTU au sein de l'échantillon et de rendre compte d'éventuels déséquilibres des communautés, en cas de valeurs relativement faibles. Il représente l'indice de Shannon divisé par l'indice de Shannon max :

$$E = \frac{-\sum p_i \times \ln p_i}{\ln S}$$

Où  $p_i$  est le pourcentage d'abondance d'une espèce présente et S est le nombre cardinal de la liste d'espèces présentes. L'indice n'a pas d'unité.

**Ratio 16S/18S** : Il correspond au ratio entre le nombre de copies du gène 18S et le nombre de copies du gène 16S par g. de sol. Il est habituellement compris entre 2 et 5%. Un ratio inférieur indique un environnement moins propice au développement des bactéries tandis qu'un ratio plus important est l'indicateur d'un environnement riche en matières carbonées complexes. Le ratio n'a pas d'unité.

Le nombre de répétition pour chaque traitement étant faible, les analyses ont été réalisées à l'échelle de la composition (Sol nu, Brassicacées, Fabacées et mélanges). Le nombre de répétitions à cette échelle étant déséquilibré ( $n = 3$  pour le témoin sol nu et la vesce,  $n = 9$  pour les Brassicacées et les mélanges), l'effet des CIMS sur les indices décrits ci-dessus (à chaque temps) a été analysé par des tests non-paramétriques de Kruskal Wallis. Le seuil de significativité a été fixé à  $p = 0,05$ . Les analyses ont été réalisées avec Rstudio v.4.0.5.

## IV.4. Résultats

### IV.4.1. Taux de fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par les Fabacées

#### IV.4.1.1. Azote acquis par les Fabacées en culture monospécifique ou en mélanges bispécifiques

La Figure 65A représente la quantité d'azote acquise par la Vesce du Bengale cultivée en composition monospécifique ou en mélange. La vesce du Bengale

cultivée en culture monospécifique a toujours significativement ( $p < 0,01$ ) acquis plus d'azote en comparaison avec celles cultivées en association avec chacune des trois espèces de Brassicacées (moutarde brune, navette fourragère ou radis fourrager). Ceci est la conséquence des différences de densités de semis (50% de la densité de semis de la culture monospécifique). En effet, les Fabacées monospécifiques ont absorbé en moyenne  $76,85 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  d'azote, tandis que les vesces en association avec de la moutarde brune, de la navette fourragère ou du radis fourrager ont absorbé 43,84 ou 35,94 ou 37,92  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  d'azote, respectivement.

Afin d'évaluer les performances des vesces en mélanges en comparaison aux vesces en culture pures, nous avons eu recours au calcul des LERp (Nabsorbé par les mélanges / Nabsorbé par les cultures pures), qui est représenté sur la Figures 65B. Les mélanges ont des LERp qui sont en moyenne supérieurs ou égaux à la droite de 0,5, en particulier dans le cas de la moutarde brune (LERp = 0,6), témoignant que la Fabacée en association avec la moutarde brune est plus efficace dans son acquisition d'azote que la vesce monospécifique.

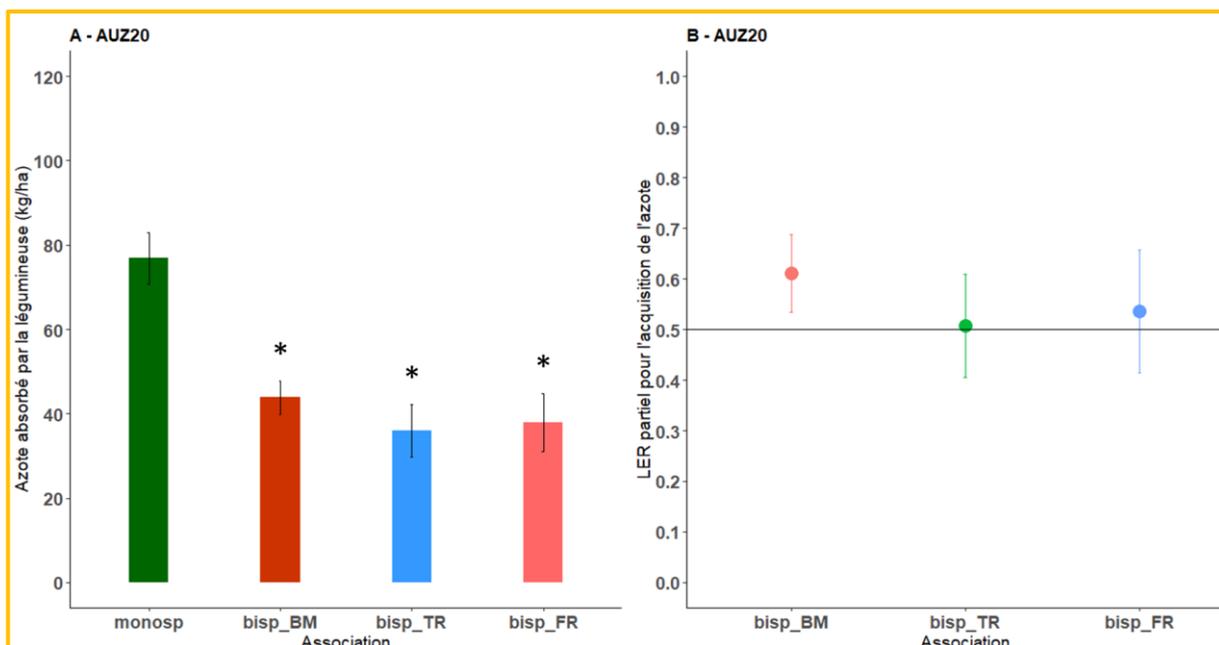


Figure 65 – Acquisition d’azote moyenne par les Fabacées monospécifiques ou en association bispécifique (A) et performance de cette acquisition par les mélanges (LERp, B), à Auzeville en 2020, en fonction des associations d’espèces où monosp correspond à la vesce du Bengale monospécifique, et où bisp\_BM, bisp\_TR et bisp\_FR correspondent aux associations entre Fabacées et moutarde brune, navette fourragère et radis fourrager, respectivement. Les étoiles représentent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre association et culture monospécifique. Les densités de semis des vesces bi-spécifiques correspondaient à environ 1/2 de la densité des cultures monospécifiques, le LERp est donc à comparer au seuil de 0,5 (barre noire).

Pour faire suite à cette analyse des quantités d’azote acquises, il y a un intérêt à déterminer la provenance de ce dernier (fixé ou issu de l’azote minéral du sol), afin de répondre à l’objectif d’évaluation des effets de l’association de Fabacées à des Brassicacées sur les taux de fixation symbiotique de l’azote atmosphérique.

#### IV.4.1.2. Azote fixé symbiotiquement par les Fabacées en culture monospécifique ou en mélanges bispécifiques

Les taux de fixation symbiotiques de l’azote atmosphérique mesurés en 2020 sur les parties aériennes des vesces du Bengale cultivées en culture monospécifique ou en mélange bispécifique ont varié entre 90,29% (Fabacée en association avec la navette) et 92,94% (Fabacée en association avec la moutarde) et comme le montre la Figure 66. Ces taux de fixations globalement élevés peuvent s’expliquer par des quantités d’azote minéral dans les sols initialement faibles, qui étaient en moyenne (tous traitements confondus), sur l’horizon 0-30 cm de 17,34 kg.ha<sup>-1</sup> en Octobre

2019, avant le semis des CIMS (précédent tournesol) et atteignaient  $26,63 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  sur l'horizon 0-60 cm. Aucune différence significative n'a été détectée entre les taux de fixation mesurés entre les vesces du Bengale cultivées en association et les vesces du Bengale cultivées en culture monospécifique, comme on peut l'observer sur les Figures 66. Ceci peut laisser supposer que le fait d'être en mélange avec les Brassicacées n'a pas d'impact négatif sur la capacité du rhizobium à permettre une fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par les Fabacées.

Ces taux permettent d'estimer la part d'azote acquis par la Fabacée par voie symbiotique et d'en déduire les parts acquises à partir du sol. Ces quantités sont représentées dans la Figure 67 ci-dessous, et elle montre que la majorité de l'azote acquis par les Fabacées (qu'elles soient en culture monospécifique ou bispécifique) provient de la fixation symbiotique. Néanmoins, les vesces en cultures monospécifiques semblent acquérir plus d'azote en provenance du sol que celles en mélanges bispécifiques. Cette observation pourrait s'expliquer par une compétition intra-spécifique pour l'azote inférieure que celle inter-spécifique avec les Brassicacées.

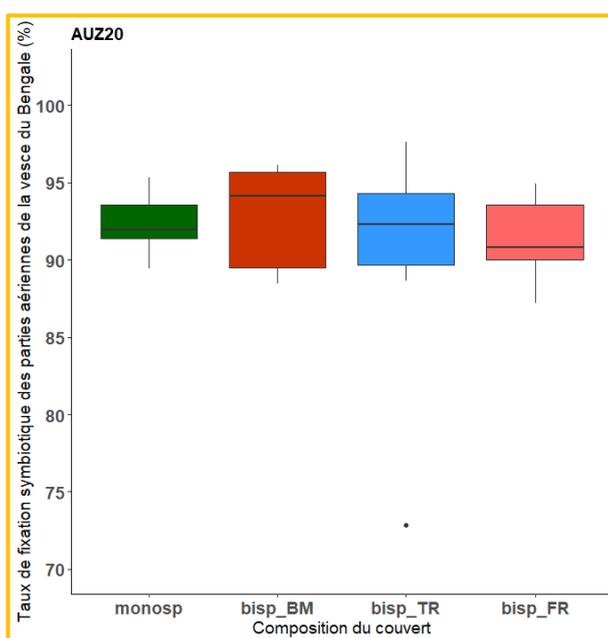


Figure 66 – Taux de fixation symbiotique des parties aériennes de la vesce du Bengale (%) à Auzville en 2020, en fonction des associations d'espèces où monosp correspond à la vesce du bengale en culture monospécifique, et où bisp\_BM, bisp\_TR et bisp\_FR correspondent aux associations entre Fabacées et moutarde brune, navette fourragère et radis fourrager, respectivement. Aucune différence significative n'a été détectée entre les taux de fixation de la vesce du Bengale monospécifique et ceux des vesces associées avec des Brassicacées.

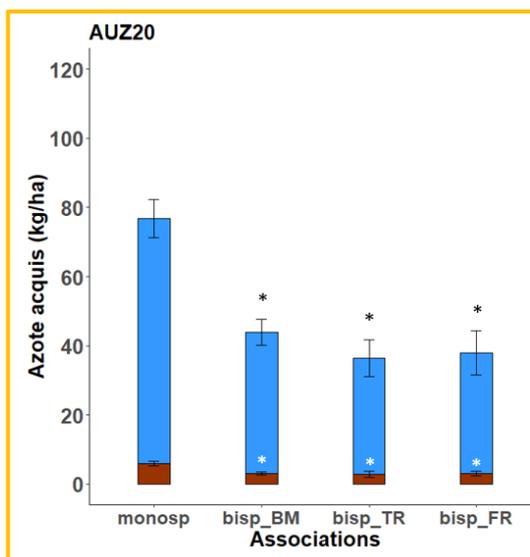


Figure 67 – Répartition de l'azote acquis ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) par les vesces du Bengale monospécifique et en mélange entre fixation de l'azote atmosphérique par voie symbiotique (en bleu) et prélèvement depuis le sol (en marron), à Auzeville en 2020, en fonction des associations d'espèces où monosp correspond à la vesce du Bengale en culture monospécifique, et où bisp\_BM, bisp\_TR et bisp\_FR correspondent aux associations entre Fabacées et moutarde brune, navette fourragère et radis fourrager, respectivement. Les étoiles représentent des différences significatives en comparaison au témoin monospécifique ( $p < 0,05$ ).

#### IV.4.2. Taux de mycorhization des racines de tournesol en fonction du précédent cultural

La Figure 68 représente les taux de mycorhization observés à Auzeville en 2020, en fonction des 5 traitements échantillonnés : Le sol nu, la moutarde brune, le radis fourrager, la vesce du Bengale et le mélange tri-spécifique de ces couverts. Les taux de mycorhization ont atteint en moyenne 14%, tous traitements confondus. Une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) a été observée en 2020 sur les racines de tournesols cultivées après un couvert de moutarde brune, en comparaison au témoin sol nu avec des pourcentages moyens de 21,96% et 11,73%, respectivement (Figure 68).

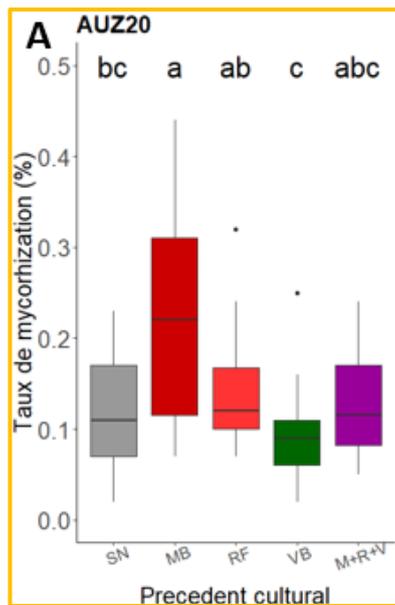


Figure 68 – Taux de mycorrhization des racines de tournesol (%) en fonction du précédent cultural à Auzeville en 2020. Les lettres représentent les traitements suivants : SN = Sol nu ; MB = Moutarde brune ; RF = Radis fourrager ; VB = Vesce du Bengale ; M+R+V = Mélange tri-spécifique composé de moutarde brune, radis fourrager et vesce du Bengale. Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$ ).

Afin de s'assurer que ces observations ne soient pas en lien avec la biomasse de la culture hôte (i.e. un hôte bien développé pourrait être colonisé par plus une grande quantité de CMA), un test de corrélation de Spearman a été réalisé entre ces taux et les biomasses produites par les tournesols de la même zone de prélèvement, quelques jours après les prélèvements des tournesols sur lesquels ont été faites les observations de taux de CMA. Aucune corrélation n'a été mise en évidence ( $\rho = -0,004$ ,  $p = 0,97$ ). Aucune corrélation n'a été observée entre ces taux et la biomasse des couverts de CIMS : L'analyse du lien entre taux de mycorrhization et biomasses tous traitements confondus n'a pas permis de faire ressortir de tendances ( $\rho = -0,09$ ,  $p = 0,51$ ) (Figure 69), mais la corrélation est significative pour les deux Brassicacées, lorsque qu'elles sont considérées séparément ( $\rho = -0,85$ ,  $p < 0,01$  et  $\rho = 0,66$ ,  $p < 0,05$  pour la moutarde brune et le radis fourrager, respectivement). Enfin, aucune corrélation significative n'a été identifiée entre les quantités d'azote avant le semis du tournesol et les taux de mycorrhization des racines de tournesol, lorsque tous les traitements ont été considérés ensemble (Figure 70).

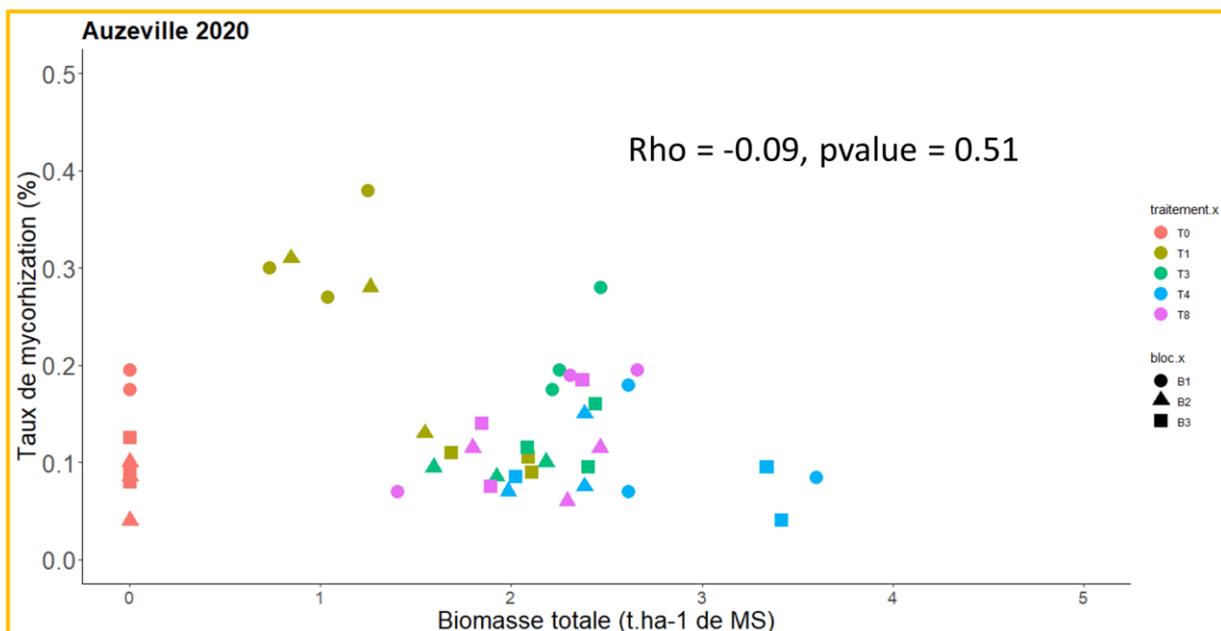


Figure 69 – Corrélation entre le taux de mycorrhization des racines de tournesol (%) et la biomasse totale (parties aériennes et racinaires, mélanges des trois espèces dans le cas du traitement tri-spécifique) (t.ha<sup>-1</sup> de MS) produites par les cultures intermédiaires à Auzeville en 2020. Les couleurs représentent les traitements avec T0 : sol nu ; T1 : Moutarde brune ; T3 : Radis fourrager ; T4 : Vesce du Bengale ; T8 : mélange de T1+T3+T4. Les formes représentent les blocs. Chaque point représente la moyenne de deux sous-répétitions de taux de mycorrhization.

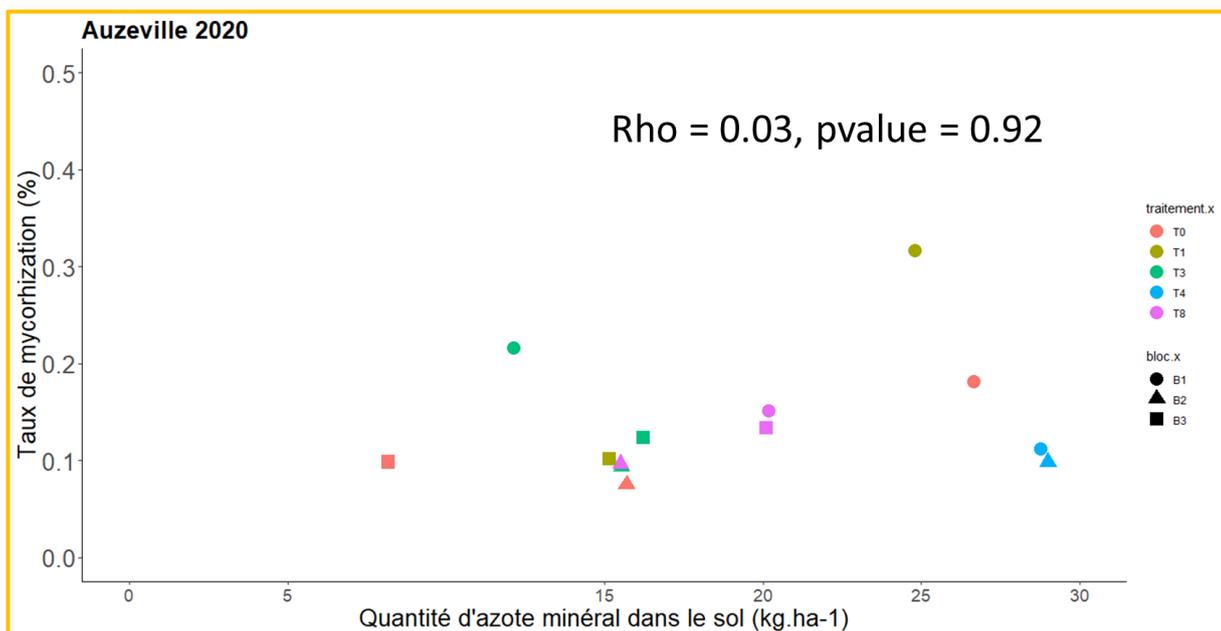


Figure 70 – Corrélation entre le taux de mycorrhization des racines de tournesol (%) la quantité d'azote minérale dans le sol avant le semis du tournesol (kg.ha<sup>-1</sup>) à Auzeville en 2020. Les couleurs représentent les traitements avec T0 : sol nu ; T1 : Moutarde brune ; T3 : Radis fourrager ; T4 : Vesce du Bengale ; T8 : mélange de T1+T3+T4. Les formes représentent les blocs. Chaque point représente la moyenne de deux sous-répétitions et de trois zones de mesures de taux de mycorrhization.

### IV.4.3. Effets des CIMS et de la biofumigation sur les communautés microbiennes des sols

#### IV.4.3.1. Effets des CIMS sur les biomasses moléculaires microbiennes mesurées dans le sol

Les biomasses moléculaires microbiennes ont été mesurées en fonction des traitements et des deux temps de prélèvements (T1 : Avant destruction des CIMS ; T2 : Avant semis du tournesol), sont présentées sur la Figure 71. Aucun effet significatif du traitement sur ces biomasses n'a été identifié ( $p > 0,05$ ).

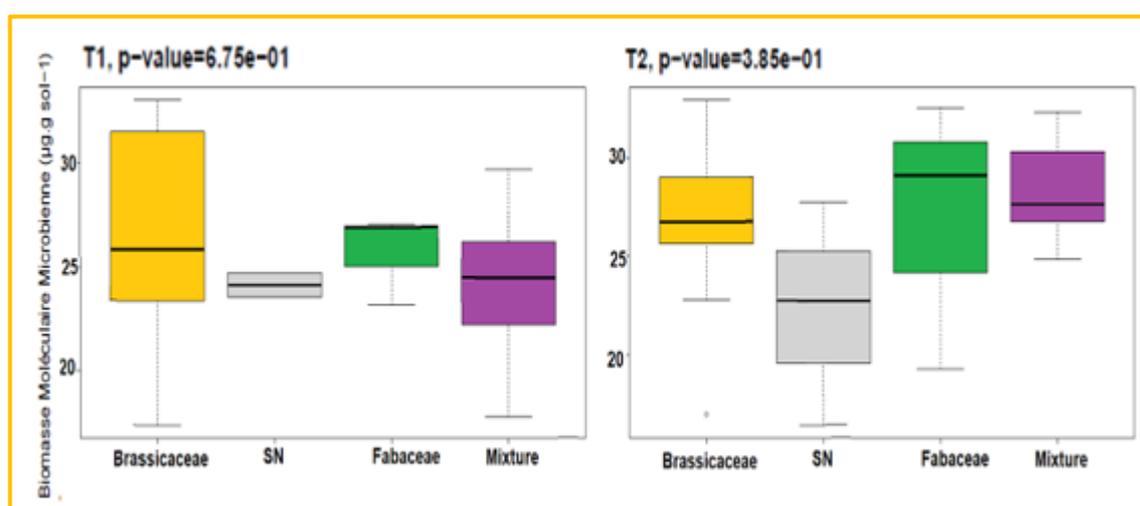


Figure 71 – Biomasses moléculaires microbiennes en fonction des traitement (traitements semés avec des Brassicacées, des Fabacées ou le mélange des deux, ou témoin sol nu), avant destruction des CIMS (T1) et avant semis du tournesol (T2). La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal Wallis.

#### IV.4.3.2. Effets des CIMS sur les ratios 16S/18S mesurés dans le sol

Les ratios 18S/16S, qui représentent les ratios du nombre de copies du gène 18S (champignon) sur celui du gène 16S (bactéries), en fonction des différents traitements de CIMS, aux deux dates de prélèvements (T1 : Avant destruction des CIMS et T2, avant semis du tournesol), sont présentés sur la Figure 72. Aucun effet significatif du traitement sur ces ratios n'été identifié ( $p > 0,05$ ). Néanmoins, il est possible d'observer une augmentation du ratio au temps T2 pour les Fabacées, après enfouissement et minéralisation de la Vesce du Bengale (Figure 71). En comparaison aux Brassicacées, les Fabacées ont des ratios C/N plus faibles, et des tissus lignés qui sont plus difficilement assimilables, ce qui peut modifier plus fortement les communautés fongiques.

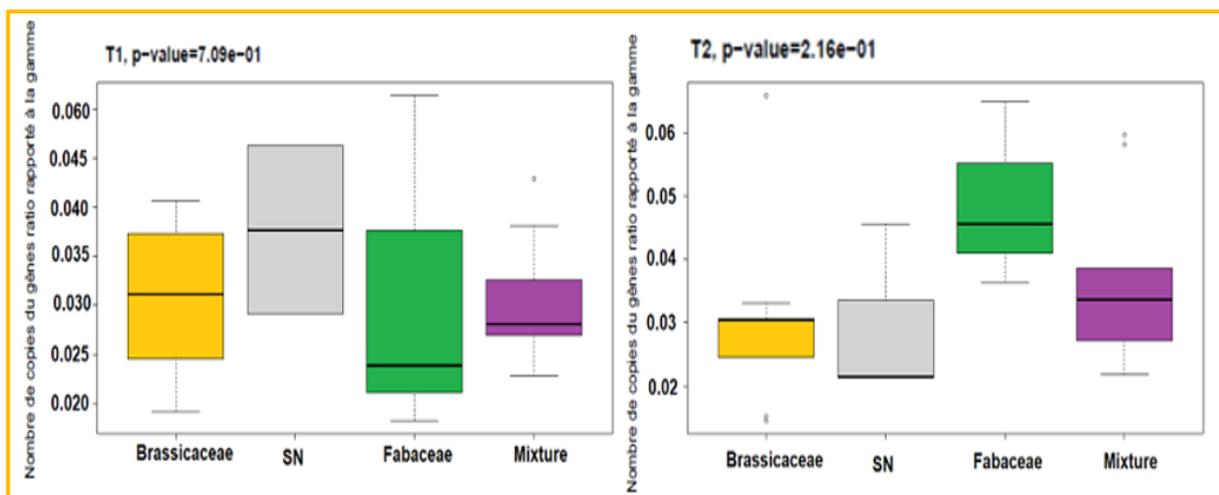


Figure 72 – Ratio 16S/18S en fonction de la composition des traitements (traitements semés avec des Brassicacées, des Fabacées ou le mélange des deux, ou témoin sol nu), avant destruction des CIMS (T1) et avant semis du tournesol (T2). La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal Wallis.

#### IV.4.3.3. Effets des CIMS sur la richesse spécifique du sol en copies 16S et 18S

L'observation de la richesse bactérienne et fongique (nombre d'OTUS déterminé par clustering à 5% de dissimilarité) ne montre pas d'effet significatif en fonction de la nature des CIMS aux deux dates de prélèvements (T1 : Avant destruction des CIMS et T2, avant semis du tournesol), ni pour les copies 16S (figure 73), ni pour les copies 18S (figure 74). Néanmoins, concernant les copies 16S et au temps T1, dans l'environnement rhizosphérique avant destruction des CIMS, on observe une diminution, non significative dans les sols issus des traitements Brassicacées et le mélange de Brassicacées et Fabacées, en comparaison au sol nu ou aux Fabacées monospécifiques (Figure 73). Il serait intéressant de faire une expérimentation en augmentant le nombre de répétitions pour voir si cet effet a une réalité biologique.

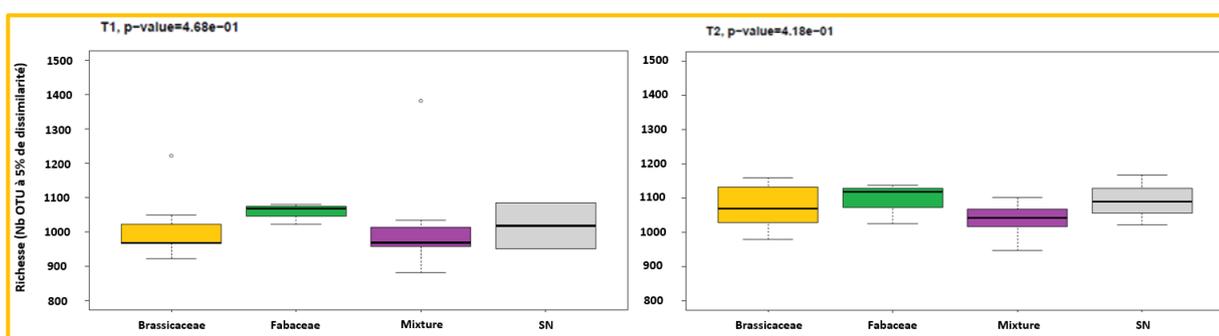


Figure 73 – Richesse spécifique calculée à partir des copies 16S en fonction des CIMS (traitements semés avec des Brassicacées, des Fabacées ou le mélange des deux, ou témoin sol nu), avant destruction des CIMS (T1) et avant semis du tournesol (T2). La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal Wallis.

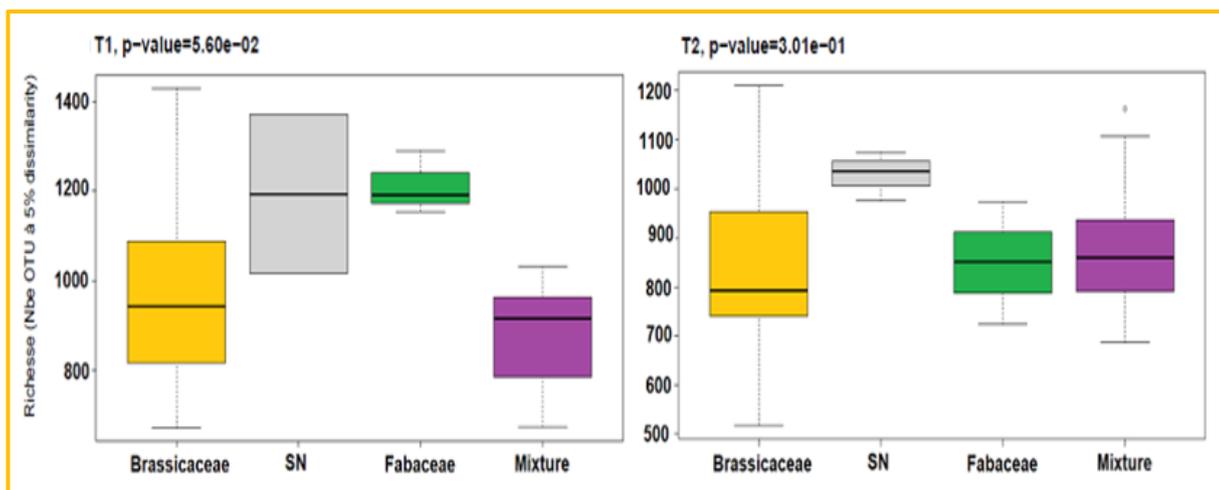


Figure 74 – Richesse spécifique calculée à partir des copies 18S en fonction des CIMS (traitements semés avec des Brassicacées, des Fabacées ou le mélange des deux, ou témoin sol nu), avant destruction des CIMS (T1) et avant semis du tournesol (T2). La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal Wallis.

#### IV.4.3.4. Indice d'équitabilité (Evenness) des communautés bactériennes et fongiques en fonction des CIMS et des dates de prélèvement

La distribution de la structure des communautés microbiennes a été mesurée avec l'équitabilité des communautés bactériennes et celle des communautés fongiques en fonction des traitements et des temps de prélèvements (T1 : Avant destruction des CIMS et T2, avant semis du tournesol) et les résultats sont représentées sur les Figures 75 et 76, respectivement. Cette valeur représente la variation de l'indice de Shannon (Disymétrie de la fréquence des OTUs) par rapport au shannon max (qui dépend de la richesse bactérienne). L'indice d'équitabilité des communautés bactériennes (Figure 75) se situe entre 0,6 et 0,8, et est donc proche de 1, suggérant une structure de communauté globalement équilibrée, quel que soit le traitement et le temps de prélèvement. L'indice est un peu plus faible dans le cas des communautés fongiques (Figure 76), se situant autour de 0,5 à 0,65. Néanmoins, aucun effet significatif du traitement sur l'équitabilité de la structure de la communauté n'a été identifié ( $p > 0,05$ ). Il est intéressant de retrouver une valeur plus forte pour les champignons au T2 pour la condition Brassicacées. Des expériences complémentaires pour évaluer l'effet de ces espèces en modifiant les conditions (Biomasses de CIMS par exemple) seraient à mener pour mieux caractériser ces effets.

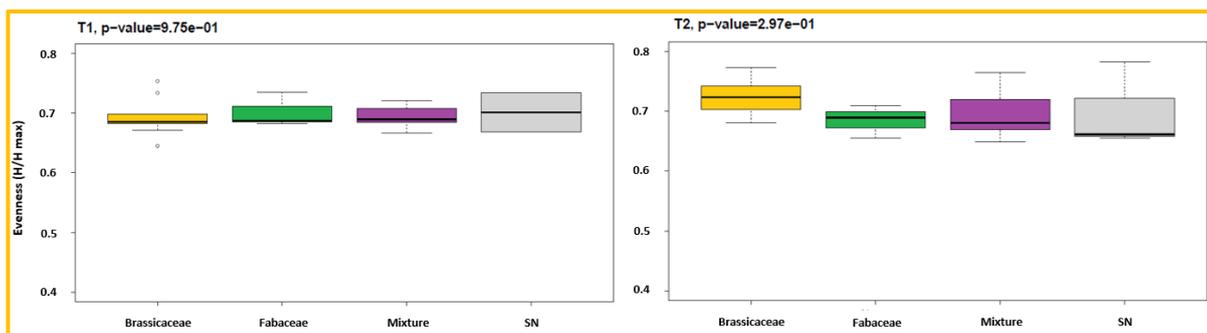


Figure 75 – Indice d'équitabilité calculé à partir des copies de 16S en fonction du traitement (traitements semés avec des Brassicacées, des Fabacées ou le mélange des deux, ou témoin sol nu), avant destruction des CIMS (T1) et avant semis du tournesol (T2). La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal Wallis.

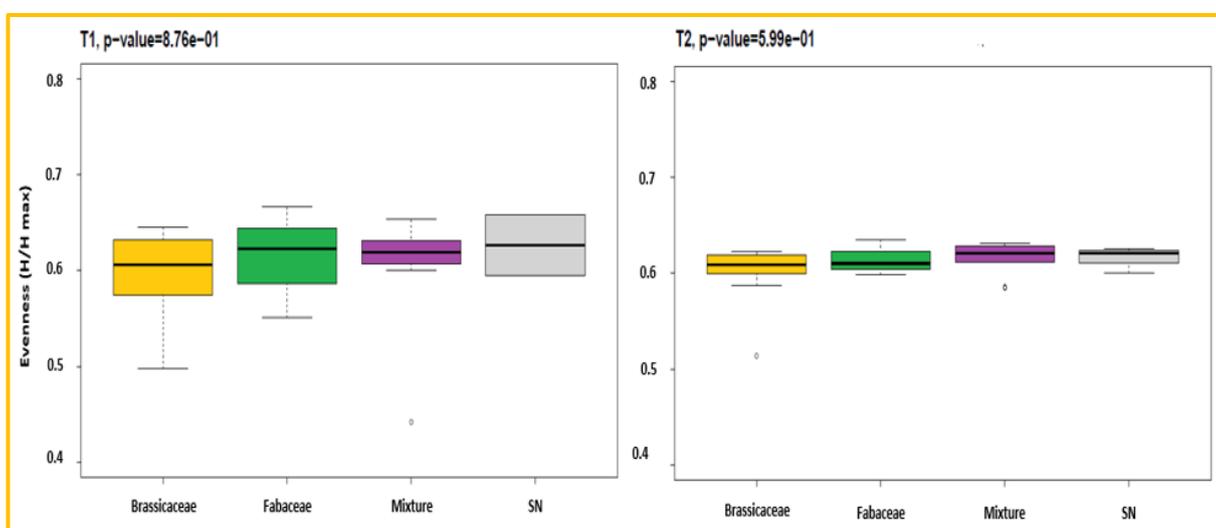


Figure 76 – Indice d'équitabilité calculé à partir des copies de 18S en fonction du traitement (traitements semés avec des Brassicacées, des Fabacées ou le mélange des deux, ou témoin sol nu), avant destruction des CIMS (T1) et avant semis du tournesol (T2). La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal Wallis.

#### IV.4.4. Effets des CIMS sur des communautés d'intérêt pour la succession culturale CIMS – Tournesol

Les études précédentes ont été faites en prenant la totalité des OTU détectées. Dans la suite du manuscrit un intérêt a été porté plus particulièrement aux espèces pouvant affecter la succession étudiée pendant la thèse.

##### IV.4.4.1. Bactéries symbiotiques des Fabacées

Le nombre de séquences assignées au genre bactérien *Bradyrhizobium* (bactérie symbiotique fixatrice d'azote) en fonction du traitement et de trois temps de prélèvements (avant semis des CIMS, avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol) est représenté sur la Figure 77. Un effet significatif du temps de

prélèvement ( $p < 0,01$ ) est observé, sans qu'il n'y ait de différences significatives entre traitements au sein du même temps de prélèvement.

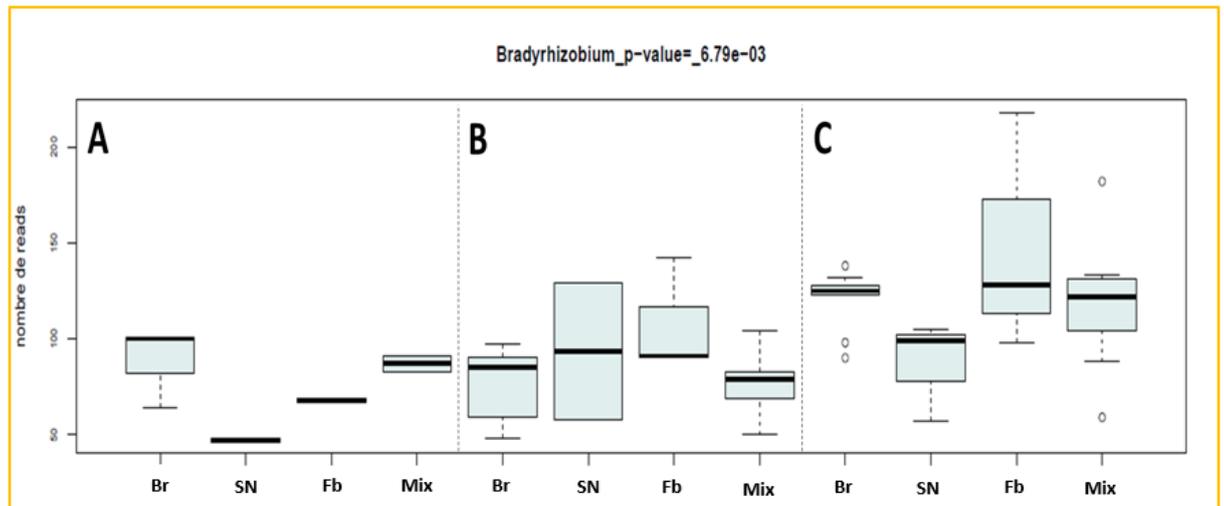


Figure 77 – Nombre de séquences (reads) 16S assignées au genre *Bradyrhizobium*, en fonction des trois dates de prélèvement (A) : avant semis des CIMS, (B) avant destruction des CIMS, (C) avant semis du tournesol, en fonction de la composition des CIMS et du témoin pour chacune des dates ; où Br représente les Brassicacées, SN le sol nu, Fb les Fabacées et Mix le mélange de Brassicacées et de Fabacées. La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal-Wallis.

Le nombre de séquences assignées aux genres bactériens *Allorhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium* et *Rhizobium* (bactéries symbiotiques fixatrices d'azote) en fonction du traitement et de trois temps de prélèvements (avant semis des CIMS, avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol) est représenté sur la Figure 78. Il est à noter que le genre *Rhizobium*, connu pour être capable de noduler les Fabacées du genre *Vicia*). Aucun effet significatif du temps de prélèvement ou du traitement sur le nombre de séquences n'a été identifié ( $p > 0,05$ ).

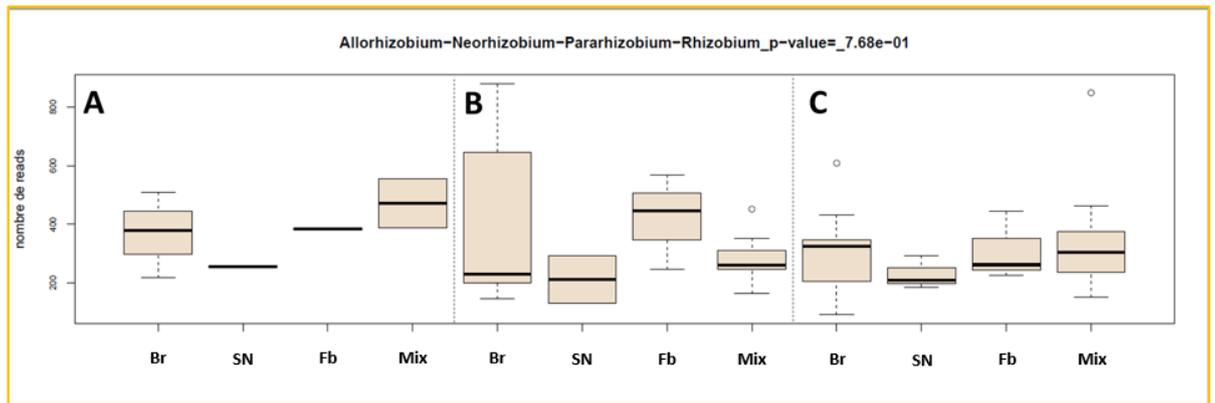


Figure 78 – Nombre de séquences (reads) 16S assignées aux genres *Allorhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium* et *Rhizobium*, en fonction des trois dates de prélèvement (A) : avant semis des CIMS, (B) avant destruction des CIMS, (C) avant semis du tournesol, en fonction de la composition des CIMS et du témoin pour chacune des dates.

Le nombre de séquences assignées aux bactéries du genre *Mesorhizobium* en fonction du traitement et de trois temps de prélèvements (avant semis des CIMS, avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol) est représenté sur la Figure 79. Aucun effet significatif du temps de prélèvement ou du traitement sur le nombre de séquences n'a été identifié ( $p > 0,05$ ).

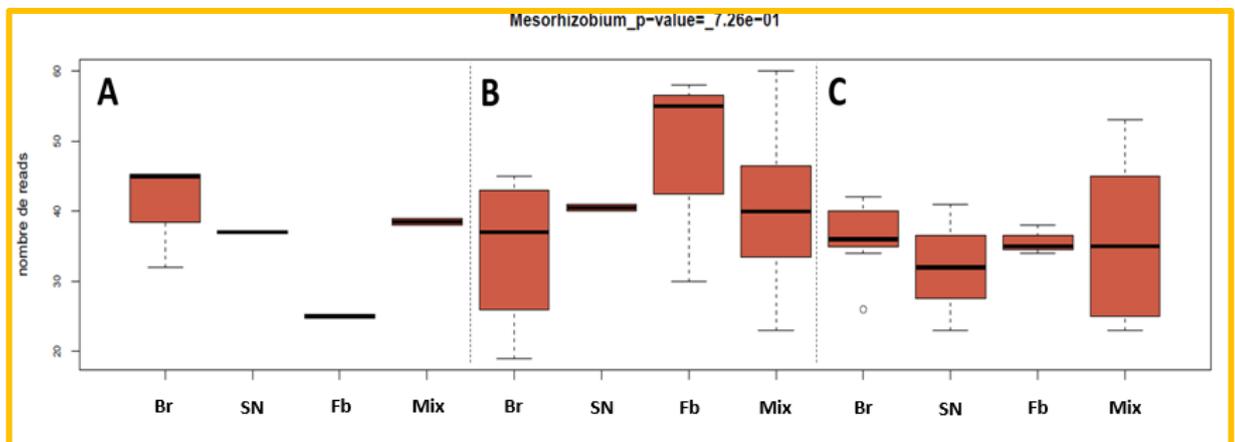


Figure 79 – Nombre de séquences (reads) 16S assignées au genre *Mesorhizobium* en fonction des trois dates de prélèvement (A) : avant semis des CIMS, (B) avant destruction des CIMS, (C) avant semis du tournesol, en fonction de la composition des CIMS et du témoin pour chacune des dates ; où Br représente les Brassicacées, SN le sol nu, Fb les Fabacées et Mix le mélange de Brassicacées et de Fabacées. La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal-Wallis.

#### IV.4.4.2. Champignons mycorhiziens à arbuscules

Le nombre de séquences assignées au genre *Rhizophagus* (CMA avec une affinité forte pour la culture du tournesol) en fonction du traitement et de trois temps de

prélèvements (avant semis des CIMS, avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol) est représenté sur la Figure 80. Une réduction significative du nombre de séquences assignées à ce genre est observée entre le temps de prélèvement 'Avant destruction des CIMS' et le temps de prélèvement 'Avant semis du tournesol', sans qu'aucune différence significative ne soit détectée entre traitements au sein de chacun de ces temps. Cela peut laisser supposer que l'une ou les pratiques et/ou processus mis en œuvre entre ces deux temps (broyage, enfouissement des couverts, production d'ITCs, deux passages de vibroculteur et minéralisation des résidus des CIMS) ont un impact négatif sur les CMA du genre *Rhizophagus*. Cet effet semble indépendant de la biofumigation et de la libération d'ITCs puisque le nombre de séquences observé dans les sols du traitement Brassicacée n'est pas significativement différent des autres traitements (Figure 80). Néanmoins, le nombre global des séquences détecté est globalement faible, et il est difficile de conclure de manière claire sur d'éventuels effets. L'effet positif des CIMS au T1 peut être dû à la présence de plantes installées plus qu'à l'effet de la conduite de culture pour la destruction des CIMS.

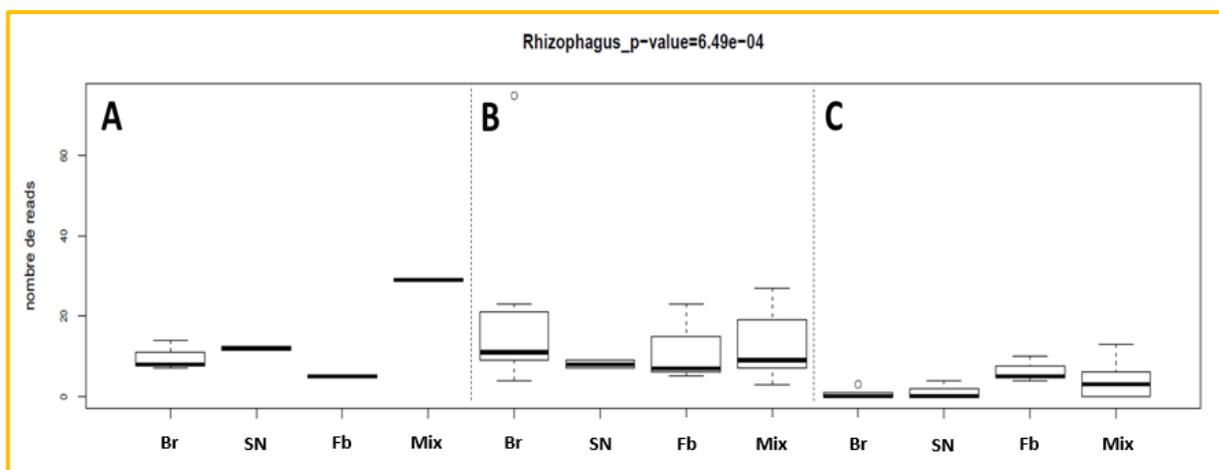


Figure 80 – Nombre de séquences (reads) 18S assignées au genre *Rhizophagus* en fonction des trois dates de prélèvement (A) : avant semis des CIMS, (B) avant destruction des CIMS, (C) avant semis du tournesol, en fonction de la composition des CIMS et du témoin pour chacune des dates ; ; où Br représente les Brassicacées, SN le sol nu, Fb les Fabacées et Mix le mélange de Brassicacées et de Fabacées. La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal-Wallis.

Le nombre de séquences assignées au genre *Funneliformis* (CMA sans affinité particulière avec la culture du tournesol) en fonction du traitement et de trois temps de prélèvements (avant semis des CIMS, avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol) est représenté sur la Figure 81. Une réduction du nombre de

séquences assignées à ce genre est observée entre le temps de prélèvement 'Avant destruction des CIMS' et le temps de prélèvement 'Avant semis du tournesol', laissant supposer que les interventions mécaniques et processus en œuvre entre ces deux temps ont impacté négativement la richesse du genre *Funneliformis*. Contrairement au genre *Rhizophagus*, le nombre de séquences détecté est plus élevé, et une réduction significative a pu être observée entre le nombre de séquences observées dans les sols du traitement Brassicacée et les sols du traitement mélanges de Brassicacées et de Vesce du Bengale (Figure 81). Ce résultat peut laisser supposer que les mélanges de Brassicacées et de Fabacées permettent une compensation des potentiels effets négatifs des Brassicacées en cultures pures.

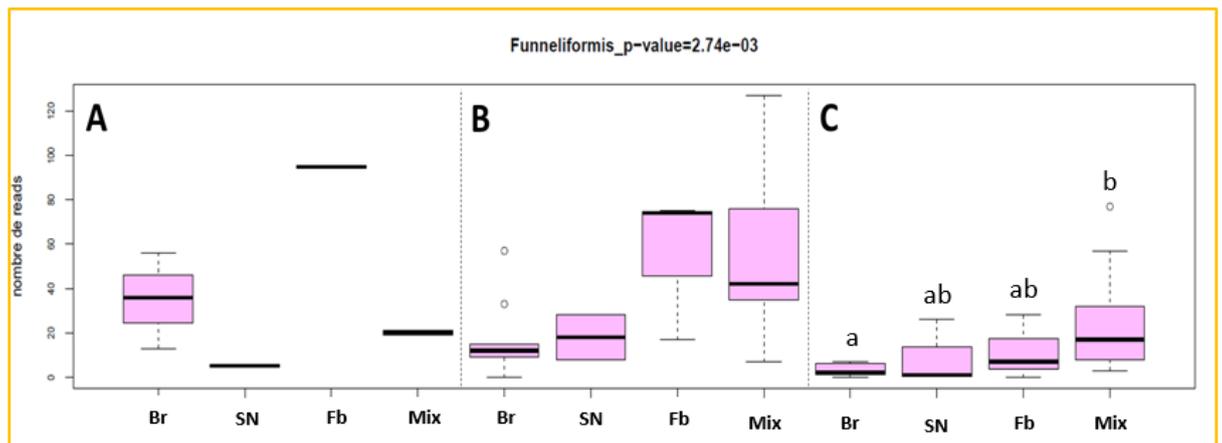


Figure 81 – Nombre de séquences (reads) 18S assignées au genre *Funneliformis* en fonction des trois dates de prélèvement (A) : avant semis des CIMS, (B) avant destruction des CIMS, (C) avant semis du tournesol, en fonction de la composition des CIMS et du témoin pour chacune des dates ; où Br représente les Brassicacées, SN le sol nu, Fb les Fabacées et Mix le mélange de Brassicacées et de Fabacées. La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal-Wallis.

Le nombre de séquences assignées au genre *Glomus* (CMA sans affinité particulière avec la culture du tournesol) en fonction du traitement et de trois temps de prélèvements (avant semis des CIMS, avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol) est représenté sur la Figure 82. La réduction du nombre de séquences assignées à ce genre est observée entre le temps de prélèvement 'Avant destruction des CIMS' et le temps de prélèvement 'Avant semis du tournesol', laissant supposer que la présence de plantes peut avoir un effet positif sur l'établissement de l'association symbiotique ou que les interventions mécaniques

et processus en œuvre entre ces deux temps peuvent avoir un effet négatif sur le genre *Glomus*. De plus, une réduction significative du nombre de séquences détecté est observée au temps avant semis du tournesol, entre le traitement Brassicacée en comparaison au traitement Fabacées, sans qu'il n'y ait de différences entre chacun de ces traitements et le mélange de ces deux traitements (Figure 82C). Ce résultat peut laisser supposer un effet négatif des Brassicacées cultivées en culture monospécifique, en comparaison à la vesce. Un mélange bispécifique pourrait permettre de réduire cet effet négatif puisque le nombre de séquences détectés est intermédiaire entre celui des Brassicacées monospécifiques et des Fabacées monospécifiques (Figure 82C).

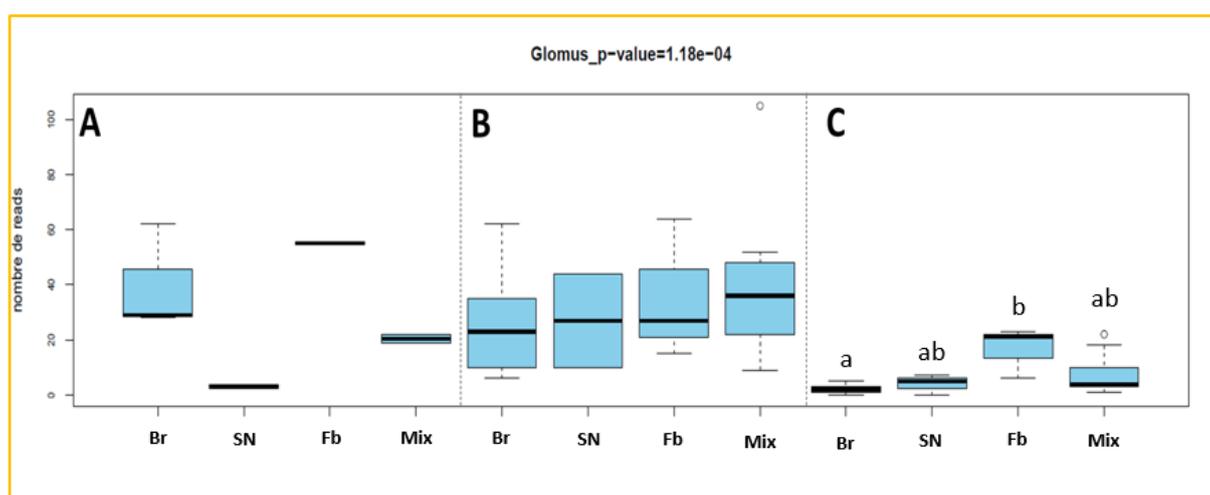


Figure 82 – Nombre de séquences (reads) 18S assignées au genre *Glomus* en fonction des trois dates de prélèvement (A) : avant semis des CIMS, (B) avant destruction des CIMS, (C) avant semis du tournesol, en fonction de la composition des CIMS et du témoin pour chacune des dates ; où Br représente les Brassicacées, SN le sol nu, Fb les Fabacées et Mix le mélange de Brassicacées et de Fabacées. La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal-Wallis.

Le nombre de séquences assignées au genre *Gigaspora* (CMA avec une affinité particulière avec la culture du tournesol) en fonction du traitement et de trois temps de prélèvements (avant semis des CIMS, avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol) est représenté sur la Figure 83. Le nombre de séquences assignée à ce genre ayant été détecté est faible (< 10 séquences) et s'explique par la caractéristique de ces champignons à avoir de longs hyphes, qui les rendent sensibles au travail du sol. Ces champignons sont donc très peu retrouvés en sols labourés par exemple. Aucun effet négatif du temps de prélèvement ou du traitement n'a été identifié, malgré l'observation d'une tendance à la réduction du nombre de séquences de ce champignon entre le temps 'avant destruction des

CIMS' et 'Avant semis du tournesol' (Figure 83C). Néanmoins, le nombre très réduit de séquences détectées pour ce genre limite les conclusions possibles à tirer.

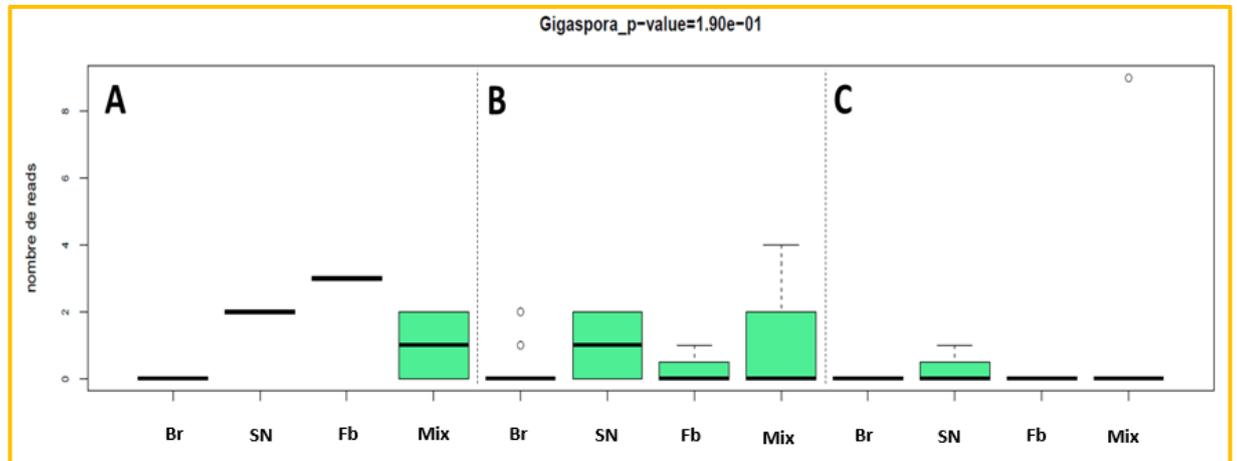


Figure 83 – Nombre de séquences (reads) 18S assignées au genre *Gigaspora* en fonction des trois dates de prélèvement (A) : avant semis des CIMS, (B) avant destruction des CIMS, (C) avant semis du tournesol, en fonction de la composition des CIMS et du témoin pour chacune des dates ; où Br représente les Brassicacées, SN le sol nu, Fb les Fabacées et Mix le mélange de Brassicacées et de Fabacées. La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal-Wallis.

Le nombre de séquences assignées au genre *Claroideoglossum* (CMA sans affinité particulière avec la culture du tournesol) en fonction du traitement et de trois temps de prélèvements (avant semis des CIMS, avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol) est représenté sur la Figure 84. Une réduction significative du nombre de séquences assignées à ce genre a été observée entre le temps de prélèvement 'avant destruction des CIMS' et le temps 'Avant semis du tournesol', ce qui peut laisser supposer que les pratiques agricoles et processus en œuvre entre ces deux temps ont pu impacter négativement la richesse de ce champignon, sans qu'il n'y ait de différences entre traitements au sein d'un même temps (Figure 84).

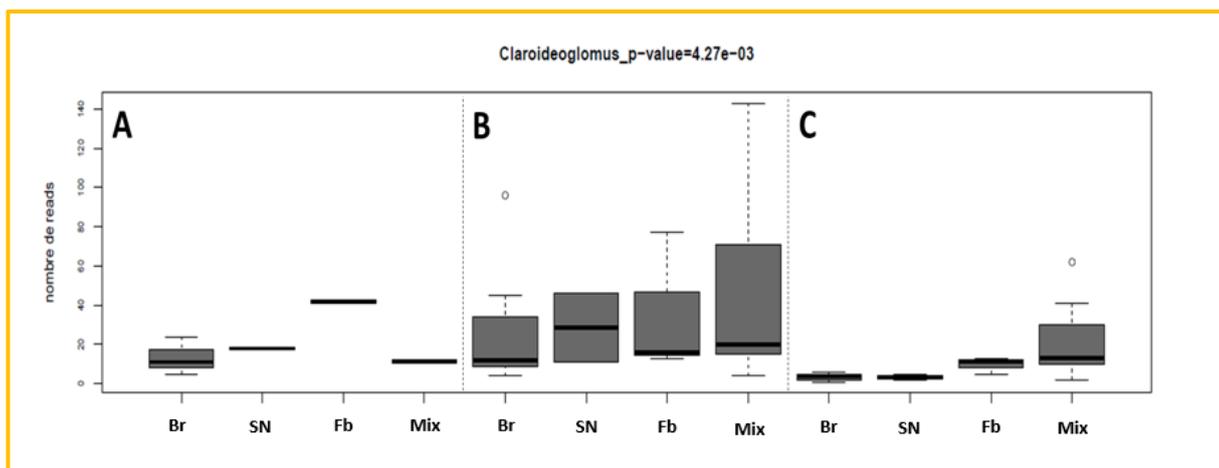


Figure 84 – Nombre de séquences (reads) 18S assignées au genre *Claroideoglomus* en fonction des trois dates de prélèvement (A) : avant semis des CIMS, (B) avant destruction des CIMS, (C) avant semis du tournesol, en fonction de la composition des CIMS et du témoin pour chacune des dates ; où Br représente les Brassicacées, SN le sol nu, Fb les Fabacées et Mix le mélange de Brassicacées et de Fabacées. La pvalue est obtenue suite à un test de Kruskal-Wallis.

#### IV.5. Discussion et conclusions sur les potentiels dis-services fournis par les cultures intermédiaires multi-services

Ce dernier chapitre avait pour objectif d'identifier de potentiels dis-services des CIMS et de la biofumigation sur les communautés microbiennes du sol, dans leur globalité, ou en se focalisant plus finement sur des communautés d'intérêt pour la succession CIMS – Tournesol, qui ont été choisies comme étant les bactéries symbiotiques des Fabacées et les CMA du tournesol. Les hypothèses initiales de ce chapitre étaient que :

- Les Brassicacées peuvent impacter la structure des communautés microbiennes par des effets allélopathiques en comparaison au sol nu ou à des non-Brassicacées, donc les Brassicacées ont une action sur les communautés microbiennes durant leur développement, avant même qu'elles ne soient broyées et enfouies pour mettre en œuvre une biofumigation.
- Les Brassicacées peuvent impacter la structure des communautés microbiennes suite à la biofumigation en comparaison au sol nu, donc après leur destruction.
- Les Fabacées peuvent impacter la structure par un effet engrais vert en comparaison au sol nu.

- Il peut y avoir une compensation des effets négatifs qu'induisent les Brassicacées via les processus d'allélopathie, de la biofumigation ou de la caractéristique des Brassicacées à ne pas être une culture hôte à CMA grâce à l'inclusion de Fabacées dans la composition du couvert, en comparaison à des Brassicacées cultivées en composition monospécifique. Ceci serait permis par la présence d'une culture hôte et une réduction des quantités d'ITCs produites, ainsi que leur dilution.

- Les Brassicacées et/ou les Fabacées ont un impact sur la famille des Gloméracées (à laquelle appartient le champignon mycorhizien arbusculaire du tournesol *Rhizophagus irregularis*)

- Les Brassicacées et/ou les Fabacées ont un impact sur la famille des Rhizobiacées (à laquelle appartient le genre *Rhizobium*, regroupant des espèces symbiotiques des Fabacées)

D'un point de vue global, au vu des résultats des analyses de biomasses moléculaires microbiennes et d'indices tels que la richesse en OTU des champignons ou des bactéries et l'équitabilité de leurs structures, aucun effet négatif des CIMS et de la biofumigation n'a pu être identifié. Ainsi, au regard de la stabilité des indices avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol, les hypothèses émises sur les effets des CIMS et de la biofumigation sur les structures ne peuvent donc pas être validées à l'issue de cet essai. Cependant, l'étude plus précise des communautés d'intérêt, soit par des approches indirectes (taux de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par les Fabacées ou taux de mycorhization des racines de tournesols) ou plus directes grâce à l'analyse du nombre relatif de séquences de genres appartenant aux communautés de bactéries symbiotiques et de CMA, a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

1 - L'association de la Vesce du Bengale avec une Brassicacée (Moutarde brune, navette fourragère ou radis fourrager) ne semble pas influencer la capacité des Fabacées à fixer l'azote atmosphérique par voie symbiotique. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Nyfeler et al. (2011), qui démontrent une réponse positive de la fixation atmosphérique par les Fabacées en mélange avec des non-Fabacées, en comparaison aux Fabacées monospécifiques, en particulier dans les sols où les niveaux d'azote étaient les plus faibles (74% à 82% pour N50 contre 56% à 76% pour N150, selon les années). L'absence de réduction des taux de fixation entre Fabacée monospécifique et Fabacée en association avec des Brassicacées,

observée dans le cadre de notre étude, peut suggérer que les Brassicacées n'engendrent pas de dis-service sur la capacité de la Fabacée à fixer l'azote. Néanmoins, il n'est pas à exclure que cette absence peut être la résultante de deux processus pouvant se compenser et que nous n'avons pas eu, la possibilité de distinguer : (i) une réduction de la capacité des bactéries symbiotiques à fixer l'azote, peut être due à une sensibilité des populations de Rhizobiaceae, tel que déjà observé par Bressan et al. (2009), et cet effet peut être masqué par (ii) une augmentation des taux de fixations à cause de la compétitivité des Brassicacées à acquérir de l'azote. L'absence de différences significatives entre le nombre de séquences de ces bactéries en fonction des différents traitements ne permet pas non plus de conclure sur cette question. Une perspective afin de réussir à isoler ces deux effets serait de comparer entre des Fabacées monospécifiques et des Fabacées associées en mélanges bispécifiques à des Brassicacées ainsi que des non-Brassicacées, en choisissant des espèces de Brassicacées et de non-Brassicacées exerçant la même compétition dans leur acquisition de l'azote. Le présent travail n'avait pas pour ambition de caractériser les interactions de compétition entre la Fabacée et la Brassicacée dans l'exploitation des ressources en nutriments et lumineuses mais il n'est pas à exclure que celles-ci peuvent intervenir dans les résultats observés. Il y aurait donc un intérêt à mener des expérimentations évaluant de manière plus exhaustives les interactions existantes entre Fabacées associées aux Brassicacées, notamment grâce à des comparaisons de profils racinaires.

2 - Pour ce qui est des résultats portant sur les taux de mycorhization des racines de tournesol, l'observation montre que les systèmes racinaires de tournesol cultivés après les sols témoins ou les différentes espèces de Brassicacées (moutarde brune ou radis fourrager), et de Fabacées (Vesce du Bengale) ou du mélange des deux, a permis l'observation de taux variant entre 5% et pouvant atteindre 45% dans le cas de certains traitements. Ces taux sont globalement faibles en comparaison à ceux rapportés dans d'autres études, avec des colonisations de systèmes racinaires de tournesols pouvant atteindre 37,6%, 43,5 voire 53,55% observés sur des tournesols cultivés après une jachère, une vesce ou après de l'orge, respectivement, à 95 jours après semis (García-González et al., 2016). Cela pourrait s'expliquer par un effet global de la mécanisation (tous traitements confondus) qui peut affecter négativement les communautés fongiques. Notre

étude n'a pas permis de confirmer les hypothèses initialement formulées concernant des effets bénéfiques des Fabacées. Elle a, contrairement à nos attentes, mené à l'observation d'une augmentation des taux de mycorhization des racines de tournesols cultivés après de la moutarde brune, sans qu'aucun effet de la vesce du Bengale n'ait pu être mis en avant. De manière divergente, Rosner et al. (2018) ont observé que les taux de mycorhization des racines de tournesols étaient significativement plus faibles après des couverts de Fabacées en comparaison à des sols nus. De plus, l'augmentation du taux de mycorhization suite au couvert de moutarde brune est en contradiction avec les résultats de ces auteurs, qui n'ont observé aucune différence entre les taux de mycorhization de racines de tournesols cultivés après un mélange de Brassicacées composé de moutarde des champs (*Sinapis arvensis* L.), de radis sauvage (*Raphanus raphanistrum* L.) et de Bourse de Judas (*Lepidium campestre* L.). Les auteurs suggèrent que l'absence d'effets négatifs des Brassicacées (en particulier du radis) pourrait être due à une volatilisation rapide des ITCs. D'autres études menées sur maïs rapportent des augmentations du taux de mycorhization sur les plants cultivés après une Fabacée, telle que la vesce velue, en comparaison à un témoin ou à de la moutarde brune, sans qu'il n'y ait de différences entre ces deux dernières modalités (Njeru et al., 2015; Higo et al., 2019). Les auteurs suggèrent que les taux de mycorhization réduits après les Brassicacées peuvent être dus aux ITCs produits par la moutarde brune, et au fait que ce soit une culture non-hôte de CMA favorisant une réduction des propagules de CMA pendant la période d'interculture.

3 – Les résultats des analyses de sol réalisées par des approches moléculaires n'ont globalement pas permis d'identifier d'effets des CIMS et de la biofumigation sur les indices mesurés (Richesse en copies 16S et 18S, équitabilité, biomasse moléculaire microbiennes) en fonction des différents traitements, avant destruction des CIMS et avant semis du tournesol. Cette partie de la thèse à vocation exploratoire permet néanmoins de dégager certaines tendances grâce à la comparaison de l'abondance relative des séquences assignées à certains genres appartenant à des communautés d'intérêt dans la succession CIMS – Tournesol. En effet, il a été possible d'observer que les genres de CMA *Funneliformis* et *Glomus* avaient des abondances relatives plus faibles après la biofumigation et les passages d'outils, ainsi que la minéralisation des résidus enfouis. Au sein du même temps d'échantillonnage, avant semis du tournesol, il a également été possible d'observer

des réductions significatives de l'abondance des séquences détectées sur les traitements de Brassicacées monospécifiques broyées et enfouies en comparaison, soit avec la Vesce du Bengale, dans le cas du genre *Glomus*, soit avec le mélange Brassicacées x Fabacées, dans le cas du genre *Funneliformis*. Bien qu'il ne soit pas possible de distinguer entre les effets de différentes pratiques et processus, cette réduction spécifique aux Brassicacées peut suggérer une action des ITCs et autres molécules potentiellement biocides qu'elles produisent suite à l'hydrolyse des GSLs. Et ce, même si ces résultats ne correspondent pas à ceux obtenus avec notre évaluation indirecte de l'effet des CIMS et de la biofumigation sur les CMA (grâce à la comparaison des taux de mycorhization dans les systèmes racinaires du tournesol). Bien que peu d'études existent sur les effets de la biofumigation sur les communautés microbiennes, il semblerait que les effets de la pratique dépendent du nombre de jours après sa mise en œuvre (Sennett et al., 2022). En effet, ces auteurs ont réalisé des analyses de sols qu'ils ont séquencés par MiSeq, et ils rapportent des réductions significatives de l'abondance et de l'équitabilité des communautés bactériennes 3 jours après une biofumigation réalisée avec de la moutarde brune (variété Caliente), en comparaison avec d'autres traitements (contrôle, résidus d'orge, ou encore fumigation chimique avec l'utilisation de metam sodium ou de chloropicrine). Ces perturbations des communautés bactériennes s'estompent dès le 8<sup>ème</sup> jour après biofumigation, et plus aucune différence significative n'est observée en comparaison avec le témoin jusqu'à la fin de l'expérimentation (160 jours après biofumigation). Les observations réalisées dans le cadre de notre étude ont été faites avant destruction des CIMS, afin d'évaluer les effets allélopathiques des CIMS et avant semis du tournesol, soit 3 mois après la biofumigation. Il se pourrait donc que les potentiels effets de la biofumigation aient eu le temps de s'estomper avant qu'on ne puisse les observer. Ces hypothèses sont néanmoins contradictoires avec les résultats obtenus par Friberg et al. (2009), qui, par le moyen d'analyses 16S et 18S en utilisant la méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (*Terminal restriction fragment length polymorphism*) ont observé des modifications de structures de communautés bactériennes après incorporation de la moutarde. Ces différences ont alors persisté jusqu'à 8 mois après incorporation de la Brassicacée. Les indices mesurés (nombre de fragments, diversité et équitabilité) ne différaient pas selon les traitements mais les auteurs soulignent que ces indices doivent être évalués avec précaution car les pics analysés pour les établir peuvent représenter

différentes espèces. Les effets étaient moindres sur les communautés fongiques. La méta-analyse de Muhammad et al. (2021), basée sur des études réalisées avec les méthodes d'analyse de phospholipides, ou de quantification du carbone ou de l'azote contenu dans la biomasse microbienne, démontre quant à elle que les couverts permettaient d'améliorer ces indices de 24, 40 et 51%, respectivement. Les résultats démontrent également que les champignons sont plus affectés par l'utilisation de couverts que les bactéries. Ceci correspond, dans une certaine mesure, aux résultats obtenus à l'échelle des genres de communautés microbiennes, qui permettaient d'identifier des différences significatives du nombre de séquences détectées et assignées aux CMA *Funneliformis* et *Glomus* en fonction des traitements de CIMS, ainsi que des réductions entre le temps de prélèvements ('Avant destruction des CIMS' et 'Avant semis du tournesol'), tandis que ces effets n'ont pas été observés concernant les genres de bactéries symbiotiques des Fabacées. Enfin, l'étude de Muhammad et al. (2021) met également en avant une réduction des indices étudiés suite aux couverts composés de mélanges, en comparaison aux Fabacées ou non-Fabacées monospécifiques. Ce résultat s'avère contraire à nos hypothèses de compensation grâce aux mélanges, et à certaines des observations de cette étude sur les CMA. Les auteurs suggèrent néanmoins que ce résultat proviendrait du nombre plus faible d'études sur le sujet, en comparaison aux cultures monospécifiques, ce qui engendre une évaluation incomplète des effets des mélanges sur les indices mesurés. Globalement, cette méta-analyse réalisée sur 81 articles, lui conférant une puissance statistique élevée, a permis de conclure que les couverts amélioraient la structure des communautés microbiennes en comparaison à l'absence de couverts, contrairement aux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse. Il n'est pas à exclure que l'absence de différences dans les indices mesurés dans cette étude puisse être également due à une forte hétérogénéité des communautés microbiennes présentes dans le sol. En effet, le sol a une hétérogénéité spatiale inhérente en terme de caractéristiques physico-chimiques, même à petite échelle (< 40 cm) au sein des agro-écosystèmes (Franklin and Mills, 2009). Selon ces mêmes auteurs, des facteurs tels que le carbone, l'azote, la distribution de la matière organique et la texture du sol impactaient l'organisation des organismes du sol, et la réponse était également dépendante selon les communautés étudiées. Notre faible nombre de répétitions n'a pas permis d'atténuer, voire de maîtriser, les effets de cette hétérogénéité malgré l'utilisation de données à l'échelle de la composition (Brassicacées

monospécifiques (n = 9), Fabacées monospécifiques (n=3), mélanges bispécifiques en comparaison (n =9) aux sols nus (n=3)).

## Chapitre V – Discussion générale et perspectives

La gestion des deux bioagresseurs telluriques étudiés dans le cadre de cette thèse, le *V. dahliae* et l'*O. cumana* est actuellement limitée à l'utilisation de variétés très peu sensibles, tolérantes voire résistantes. Aucune matière active n'est actuellement autorisée en France pour lutter contre la Verticilliose. Le recours aux herbicides est parfois recommandé dans les secteurs à fort risque Orobanche, si la plante parasite a déjà été observée les années précédentes. Les limites de ces méthodes de lutte sont les possibilités de contournements de résistance, régulièrement rapportés pour l'Orobanche, ainsi que la nécessité de limiter le recours à l'utilisation de produits phytopharmaceutiques. Ainsi, l'identification d'un levier supplémentaire permettant la protection de la culture du tournesol contre ces deux bioagresseurs semble nécessaire, afin de mettre en place une stratégie de lutte intégrée combinant plusieurs méthodes.

Le tournesol étant généralement cultivé dans le Sud-Ouest de la France au sein de rotations blé dur – tournesol, la période d'interculture avant son semis peut atteindre 9 mois et pourrait être valorisée grâce à l'insertion de CIMS, avec l'exemple des Brassicacées. Lorsque ces cultures sont broyées à la floraison puis enfouies, elles permettent la mise en œuvre du processus de biofumigation (Kirkegaard et al., 1993), dont la capacité à réguler des pathogènes telluriques a déjà été démontré au laboratoire sur de nombreux bioagresseurs telluriques (Smith and Kirkegaard, 2002) et en cultures maraîchères (Larkin et al., 2011; Michel, 2014). Afin d'évaluer la possibilité de transposer ce processus à la protection de la culture du tournesol, les objectifs de ce travail de thèse étaient d'évaluer, dans un premier temps, l'efficacité de broyats de différentes espèces de Brassicacées à réguler le développement de *V. dahliae* et la germination de *O. cumana*, dans le cadre de dispositifs expérimentaux au laboratoire qui maximisent l'efficacité de la biofumigation, avant de passer au plein champ pour *V. dahliae* dans un second temps. Dans le cas de l'Orobanche, des dispositifs en conditions contrôlées, en présence de tournesols, ont également été mis en place, afin de répondre à ce même objectif. Concernant la Verticilliose du tournesol, des expérimentations ont été menées au champ sur des parcelles naturellement infestées par le champignon, pendant 4 ans en parcelles expérimentales (en 2016, 2017, 2019 et 2020), et une année chez un agriculteur (en 2021). Pour ces essais, des Brassicacées (moutarde brune, navette fourragère et radis fourrager pour les essais en parcelles

expérimentales, et uniquement radis fourrager pour l'essai dans la parcelle de l'agriculteur) et une Fabacée (Vesce du Bengale) ont été testées. Les Brassicacées ont été utilisées pour leur capacité à produire des GSLs, et la Fabacée pour son intérêt dans l'enrichissement du sol en azote. En effet, aucune hypothèse sur d'éventuels effets de biorégulation n'étaient escomptés vis-à-vis de la Vesce du Bengale initialement, ces effets ayant été associés à ceux des molécules issues de la dégradation des GSLs, tels que les ITCs, dans ce travail de thèse. Ainsi, cette espèce pouvait servir d'espèce « non productrice de GSL » et permettre de préciser si les biorégulations observées étaient à imputer uniquement aux ITCs et autres molécules de dégradation, ou à d'autres composés présents chez les Vesce (qu'ils soient communs ou non avec des molécules présentes chez les Brassicacées). Afin d'évaluer une possible mutualisation entre ces effets, des mélanges bi-spécifique ou tri-spécifiques de ces différentes espèces ont été testés en plein champ. Enfin, un intérêt à également été porté aux éventuels dis-services produits par les CIMS et la biofumigation, en particulier pour des communautés d'intérêt pour la succession CIMS – Tournesol (*Rhizobium* des Fabacées et champignon mycorhiziens à arbuscules, CMA).

Cette thèse présente l'aspect méthodologique novateur de traiter des questions scientifiques dans un continuum *in vitro* – plein champ, dès que cela est possible. Malgré les différentes limites que chacun des dispositifs mis en œuvre peut présenter, une telle approche permet d'abord de s'affranchir de nombreux facteurs naturels pouvant entraîner une forte variabilité dans les processus de biorégulation traité, puis de les inclure afin d'identifier leur impact sur l'efficacité du processus. Elle associe également l'étude de deux bioagresseurs en forte recrudescence en France, en tentant de proposer des leviers agroécologiques en accord avec la transition agricole dans laquelle nous nous plaçons. L'étude du levier de la biofumigation est particulièrement innovant en grande culture puisque son utilisation se restreint actuellement principalement aux cultures maraîchères pour lutter contre la Verticilliose. Les travaux concernant la possibilité de contrôler *O. cumana* grâce aux CIMS et à la biofumigation sont, à notre connaissance, les premiers à être menés en France, et uniquement deux études sur le sujet ont été trouvés à l'échelle internationale. Enfin, contrairement aux études antérieures qui se focalisent principalement sur les services écosystémiques fournis par les CIMS afin de lutter contre des bioagresseurs d'importance économique, cette thèse vise

aussi à tenter d'évaluer si les pratiques agroécologiques de l'implantation des CIMS et de la mise en œuvre de la biofumigation n'engendreraient pas de « dommages colatéraux », assez peu explorés jusqu'ici dans la littérature, et sans consensus globaux, en particulier concernant la biofumigation.

Ces plus-values et innovations par rapport à l'état de l'art initial mènent inéluctablement à la rencontre de certaines limites, qui seront mise en évidence tout au long des sections composant cette discussion.

### V.1. Potentiel de régulation du *Verticillium dahliae* par l'utilisation de Brassicacées et/ou de Fabacées, et de la biofumigation

Les résultats obtenus dans le cadre des expérimentations menées au laboratoire (Chapitre II), avec les dispositifs en milieu hermétiquement fermé en boîtes de Petri contenant le mycélium du champignon, et verres contenant les broyats, ont permis d'observer des régulations significatives du développement du champignon et de la formation de microsclérotés, avec une variabilité en fonction des espèces testées. Ces essais ont permis d'observer que l'exposition du champignon à de la moutarde brune (var. Etamine), de la navette fourragère (var. Chicon) ou du radis fourrager (var. Anaconda / Terranova) broyés finement, et utilisés à des quantités équivalentes à 2 t de MS.ha<sup>-1</sup> réduisaient significativement la formation de mycélium à partir des microsclérotés sur milieu de culture (Potato dextrose agar, PDA).

Durant ces expérimentations, les concentrations en GSLs des variétés utilisées ont été quantifiées pendant une année, ces analyses étant limitées par leur coût élevé. Les GSLs tels qu'ils sont, ont peu ou pas d'activité biocides, et s'hydrolysent en ITCs des mêmes profils, mais à des quantités variables (en fonction du taux de conversion qui dépend de l'activité de l'enzyme myrosinase). Ainsi, une limite de ce travail a été de ne pas pouvoir corréliser entre molécules biocides et biorégulations observées. Néanmoins, il est possible, en s'appuyant sur l'analyse des concentrations en GSLs dans les tissus et sur des références bibliographiques, d'émettre l'hypothèse que les régulations observées soient dues aux effets biocides des ITCs (seuls ou en possible interaction avec d'autres produits de la dégradation des GSLs). D'autres molécules produites lors de la dégradation des tissus peuvent également être impliqués. Ces essais préliminaires visaient à valider le potentiel

biofumigant de ces variétés de Brassicacée pour des utilisations en plein champ afin de lutter contre la Verticilliose du tournesol. En effet, si les espèces étudiées avaient déjà été testées dans la littérature, le potentiel de régulation des variétés utilisées dans la thèse était jusqu'alors inconnu.

Au champ (chapitre III), le potentiel de ces espèces à réguler la Verticilliose du tournesol, évalué par des indices de sévérité, s'est avéré beaucoup plus variable, ne menant pas à un consensus sur l'efficacité des Brassicacées et de la biofumigation pour réduire les dégâts de la Verticilliose du tournesol (Chapitre III). Il semblerait que le radis fourrager (variété Anaconda) soit la Brassicacée la plus appropriée afin de réduire les dégâts de la Verticilliose, mais ce résultat, ainsi que l'ampleur de la réduction de la sévérité, ne se sont pas répétés chaque année. La réduction de la sévérité a diminué, en comparaison d'un sol nu, d'environ 10% (en 2020) à 40% (en 2016), tandis qu'aucune réduction n'a été observée en 2019, année lors de laquelle les conditions climatiques pour la réussite de la biofumigation étaient défavorables. Ces différences entre année peuvent majoritairement s'expliquer par les aléas climatiques et techniques qui peuvent être rencontrés lors d'essais menés en plein champ, qui représentent une limite majeure à la standardisation des conditions expérimentales pour une reproductibilité des résultats, d'année en année, mais dont on peut difficilement s'affranchir au champ.

Les facteurs de variabilité identifiés comme pouvant expliquer ces observations pourraient être :

- (i) La quantité de biomasse produite par les CIMS (Sarwar and Kirkegaard, 1998; Morris et al., 2020), qui conditionne les concentrations en GSLs dans les tissus, et donc potentiellement la libération des ITCs, à condition que l'efficacité de la conversion de ces derniers en molécules biocides soit bonne.
- (ii) les conditions météorologiques le jour de la destruction des couverts et après leur enfouissement (Michel, 2008), pour une durée d'environ une à deux semaines. Les GSL et les ITCs peuvent encore être détectés sur ces temps-là (Gimsing and Kirkegaard, 2006).
- (iii) la variété de tournesol utilisée. Les résultats des essais au champ ont également montré une réduction de la Verticilliose du tournesol supérieur avec la variété A en 2016 et 2017, en comparaison de la variété B en 2019 et 2020.

Ainsi, les résultats de cette thèse apportent les premiers résultats concernant les effets des CIMS et de la biofumigation sur la sévérité de la Verticilliose du Tournesol, dans la perspective de trouver un levier agroécologique à intégrer dans la stratégie de lutte contre le champignon. Ces connaissances étaient jusqu'alors restreintes aux cultures maraîchères.

Un autre facteur de variabilité des résultats obtenus pourrait être la distribution de l'inoculum dans le sol, qui peut être très hétérogène (Bressan et al., 2016) au sein d'une parcelle ou d'une parcelle à une autre, en fonction du précédent cultural. Il n'a néanmoins pas été possible d'évaluer les densités d'inoculum dans le cadre de cette thèse, malgré quelques tentatives menées, s'appuyant sur des protocoles basés sur la mise en culture d'échantillons de quelques mg de sol sur du milieu de culture sélectif au *V. dahliae* composé d'éthanol additionné de sels de potassium et d'amoxicilline (EPAA), comme décrit par Mansoori (2011). Cette forte source d'hétérogénéité devra être mieux maîtrisée dans des essais futurs afin de pouvoir identifier plus aisément les effets des CIMS, et en particulier ceux du radis fourrager pour conforter les résultats obtenus dans le cadre de ce travail, avant d'éventuelles recommandations d'utilisation des CIMS en tant que couvert pour lutter contre la Verticilliose.

Quelques pistes pratiques et techniques à mobiliser afin de pouvoir contrôler ces sources de variabilité des résultats, à mettre en œuvre lors de futurs essais en plein champ, en particulier chez des agriculteurs, seraient les suivantes :

1. Caractériser la variabilité intra-parcellaire de l'inoculum

La difficulté de la variabilité de l'inoculum dans le sol pourrait être partiellement ou totalement levée si les essais sont menés en milieux artificiellement infestés, assurant une certaine homogénéité de l'inoculum, en apportant une quantité connue d'inoculum de *V. dahliae* sur une parcelle. Cela permettrait d'homogénéiser la pression du pathogène, et de choisir les races de champignon utilisées, qui n'ont pas été identifiées dans le cadre de ce travail et qui pourraient, par des différences de pathogénicité et d'agressivité, influencer les résultats des effets des CIMS et de la biofumigation sur l'évolution de la Verticilliose du tournesol, cependant, la pertinence de ces infestations artificielles peut poser question lorsqu'il s'agit d'inoculer volontairement un champignon dont la conservation dans le sol peut

durer jusqu'à 14 ans et contre lequel seule la lutte variétale est actuellement opérationnelle. Dans le cadre de cette thèse, il a volontairement été décidé d'exclure cette piste. En revanche, la piste des inoculations artificielles est à mobiliser en priorité au sein d'essais en mésocosmes, qui seront discutés ci-dessous

Afin d'évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation sur la densité de l'inoculum de *V. dahliae*, il serait intéressant de réaliser, en amont du semis des CIMS et du semis du tournesol, des prélèvements de sols. Cela pourrait permettre d'évaluer, si possible, les effets des CIMS et de la biofumigation directement sur la densité des microscélérotés, mais également de déterminer une 'heat map' (carte thermique) décrivant la distribution spatiale du pathogène, afin de prendre cette information en considération dans le choix du nombre de répétitions et la distribution aléatoire des traitements. Des résultats d'une telle approche et un design expérimental associé ont déjà été proposés par Missonnier et al. (2017), dans le cadre d'essais en sélection variétale contre la Verticilliose du tournesol. Dans certaines situations, même si la densité de l'inoculum ne semble pas être réduite par la biofumigation, cette pratique permet, dans le cas d'autres patho-systèmes, de réduire l'activité et l'expression de maladies (Motisi, 2009). Les protocoles expérimentaux mis en place pour l'étude de la densité de l'inoculum devraient donc être réfléchis de manière à tenir compte de cela. En outre, ces études de la densité d'inoculum, en amont du choix des micro-parcelles, pourraient s'accompagner d'une caractérisation physico-chimique du sol, afin de tenter d'identifier et de mieux comprendre les éventuels déterminants de la variabilité de l'inoculum de *V. dahliae*. Il faut aussi considérer que l'inoculum puisse être déterminé par des interactions biotiques avec les autres organismes présents dans le sol, avec l'exemple du champignon *Fusarium equiseti* dont la densité des populations est corrélée négativement avec l'incidence de *V. dahliae* sur pomme de terre (Davis et al., 2010).

## 2. Maximiser la biomasse des cultures intermédiaires multi-services

Les résultats de cette étude suggèrent que des biomasses de CIMS élevées permettent d'atteindre les réductions les plus importantes de sévérité de la Verticilliose. Cette observation est en accord avec l'équation empirique de Kirkegaard and Sarwar (1998) selon laquelle le potentiel biofumigant d'une culture dépend de la biomasse produite, de la concentration en GSLs et de la sensibilité du bioagresseur vis-à-vis des molécules produites. Il semble donc nécessaire d'assurer un développement homogène et une production de biomasse importante des CIMS

pour pouvoir mener à bien un essai d'évaluation des effets des CIMS et de la biofumigation sur la Verticilliose du tournesol (ou tout autre bioagresseur tellurique). Ainsi, afin de réussir à établir un effet de la biofumigation sur la Verticilliose, les biomasses produites doivent être maximisées. Un soin particulier doit être apporté à la préparation du lit de semences, ainsi qu'à la date du semis de la culture choisie (Lamichhane and Alletto, 2022). Les résultats de cette étude semblent tendre vers une maximisation des biomasses en cas de semis en fin août ou début septembre, à condition que les quantités en eau soient propices au développement des couverts. Nos essais ont été irrigués 3 années sur 4 afin d'assurer des levées homogènes, pratique qui ne pourra pas forcément être mise en place chez un agriculteur. Le contexte de réchauffement climatique pourrait rendre la réussite des semis encore plus difficile les années à venir (Gardarin et al., 2022). Une alternative, sous le climat du Sud-Ouest de la France, serait de réaliser un semis opportuniste pendant un orage de fin d'été, fréquents dans la région, qui permettrait de travailler les sols argileux en conditions humides, puis de semer les CIMS. Certains auteurs proposent également de considérer l'utilisation de fertilisants afin de maximiser les biomasses et les concentrations en GSLs des Brassicacées, qui peuvent dépendre des apports en azote et en soufre (Li et al., 2007; Clarkson et al., 2015), pratique discutable dans le cadre de la transition agro-écologique.

### 3. Est-il vraiment nécessaire de caractériser les concentrations des GSLs des Brassicacées?

Les études visant à développer des approches systémiques pour l'étude de la biofumigation préconisent de quantifier les concentrations en GSLs afin de pouvoir établir un lien entre les régulations observées et la composition des Brassicacées utilisées (Kirkegaard and Matthiessen, 2004). Cela est régulièrement réalisé dans des études *in vitro* qui parviennent à établir un lien entre les ITCs et les régulations observées avec les exemples des études de Olivier et al. (1999) et Neubauer et al., (2014). A l'issue de cette étude, il ressort que cette mesure est d'une part très coûteuse, mais également difficile à mobiliser pour expliquer les régulations observées en plein champ, à cause de la grande variabilité des concentrations en GSLs au sein de la même année, et d'une année à une autre. Cette variabilité peut s'expliquer par des facteurs intrinsèques à la culture tels que la phénologie, et des facteurs environnementaux tels que des stress biotiques (dégâts de ravageurs selon

van Dam et al., 2009) ou abiotiques favorables à la synthèse de GSLs (quantités de soufre dans le sol selon Li et al., (2007)). De ce fait, cette mesure, difficilement valorisable, ne semble pas pertinente pour pouvoir répondre à la question d'évaluation des effets des CIMS et de la biofumigation sur les bioagresseurs telluriques, car il n'a pas été possible d'imputer les effets observés aux concentrations mesurées. De plus, il est connu que les GSLs eux-même ont une faible activité biologique (Brown and Morra, 1997; Manici et al., 1997), ce qui peut expliquer la difficulté d'établir un lien entre concentrations en GSLs et réductions de sévérité de maladie. Une concentration en GSLs mesurée dans les tissus ne reflète pas la concentration d'ITCs biocides convertis et présents dans le sol, qui dépend de nombreux facteurs en lien avec l'activité du complexe myrosinase (température et humidité par exemple, comme déjà détaillé dans le chapitre I. Pour finir, la littérature converge sur le fait que l'effet de la biofumigation ne se limite pas aux effets biocides dus aux ITCs mais à d'autres mécanismes liés à l'enfouissement de couverts végétaux accompagnés par des processus d'enrichissement du sol et de modifications dans les structures des communautés microbiennes (Kirkegaard and Matthiessen, 2004). Ces différents processus induits par la biofumigation sont difficiles à distinguer, bien que des auteurs tels que Michel (2014) suggère que les effets de régulation observés à court terme soient à imputer aux molécules biocides, puisqu'elles sont très volatiles, tandis que ceux à long-terme soient dues à des modifications de la composition du sol et de ses communautés microbiennes.

Néanmoins, les analyses de GSLs peuvent apporter d'autres informations utiles à la question. En outre, il existe également des méthodologies permettant de mesurer directement les ITCs produits, donnée qui serait plus pertinente à corrélérer avec les biorégulations observées. Ces deux points seront détaillés plus tard dans cette section. qui seront détaillées plus tard dans ce chapitre (Points V.3 et V.4).

#### 4. Choisir avec soin la date et le matériel utilisés pour détruire et enfouir les CIMS

Un consensus semble tendre au sujet de la nécessité de broyer et d'enfouir les Brassicacées pendant une journée où les températures sont douces, afin de favoriser l'activité de l'enzyme responsable de l'hydrolyse des GSLs en ITCs (Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Michel, 2008). Des études mettent aussi en

avant l'importance de conditions non-limitantes en eau (Matthiessen et al., 2004; Michel, 2008). Au cours de l'étude menée pendant la thèse, les destructions réalisées lors de journées où il faisait au moins 7 °C ont effectivement permis des réductions de la sévérité de la Verticilliose, tandis qu'aucune réduction n'a été observée en 2019, année où les CIMS ont été broyées pendant une journée où la température était de 2 °C. En revanche, des régulations ont été observées même les années sans précipitations importantes après le broyage (2016 et 2017, où il n'a pas plu plus que 5 mm après enfouissement). Cela s'explique peut-être par une humidité intrinsèque aux couverts, couplée à une humidité initiale du sol, qui suffiraient à une hydrolyse efficace lors de la pratique de la biofumigation (broyage et enfouissement) entre décembre à février (en fonction des années d'expérimentation). Ainsi, une irrigation ou des précipitations importantes ne semblent pas forcément indispensables à la réussite de la biofumigation, dans le cadre d'une destruction hivernale.

Concernant le matériel agricole et la répartition de la charge du travail, un soin particulier a été pris pour que l'enfouissement (réalisé au cover crop) soit réalisé au mieux une heure après le broyage (avec un broyeur à végétaux à fléau), ou au pire au cours de la même journée, afin de réduire les pertes d'ITCs par volatilisation. Cette mesure est relativement simple à mettre en place en parcelles expérimentales grâce à leur petite taille et à la disponibilité et l'investissement du personnel technique. Le matériel utilisé est assez commun en exploitations agricoles, néanmoins, le respect des délais pour la mise en œuvre de la pratique peut être plus contraignant puisque la taille des parcelles rend, de fait, chaque intervention plus longue, en particulier si plusieurs parcelles sont à broyer dans un temps court (à cause de contraintes météorologiques notamment). Pour ces raisons, une perspective serait l'utilisation de matériel combinant broyeur et outils d'enfouissement pour permettre un gain de temps et réduire les pertes d'ITCs par volatilisation, ainsi que le nombre de passages réalisés et le carburant utilisé, avec des exemples qui existent déjà tels que l'Heliodor 9, qui combine un déchaumeur à disque avec un broyeur répartiteur à couteaux.

##### 5. Identifier des variétés de tournesol permettant l'expression des effets des Brassicacées et de la biofumigation

L'une des limites du présent travail est le changement de variété utilisée entre les deux premières années d'expérimentation au champ et les années suivantes, à cause de l'arrêt de commercialisation de la première variété. En plus des autres facteurs de variabilité détaillés ci-dessus, il est possible que les sensibilités des variétés ne soient pas comparables, menant à une expression des symptômes de la Verticilliose qui seraient également différente. Aussi, les essais complémentaires réalisés sur la variété MAS 86.OL, considérée comme ayant un bon comportement vis-à-vis de la Verticilliose, n'a pas permis d'observer de différences dans les sévérités entre le témoin (sol nu) et les autres traitements, ce qui suggère qu'il n'y a pas pu avoir de complémentarité entre les leviers de contrôle de la Verticilliose (biofumigation et utilisation de cette variété résistante), dans nos conditions expérimentales. Il est à noter que les sévérités mesurées étaient, néanmoins, globalement faibles (20% tous traitements confondus sur MAS 86.OL et 40% sur MAS82.OL). Il y aurait donc un intérêt à réévaluer ces effets en conditions où les infestations soient plus importantes.

Ces éléments permettent d'avancer que le choix de la variété à utiliser est aussi un facteur clef dans l'étude des effets des CIMS et de la biofumigation sur la Verticilliose du tournesol. Enfin, les régulations significatives observées sur les tournesols cultivés après des Brassicacées n'ont pas pour autant permis des améliorations significatives du rendement du tournesol. Ces éléments montrent que des efforts sont encore nécessaires afin de déterminer l'association idéale de variétés de Brassicacées et de variétés de tournesols, permettant de maximiser les réductions des dégâts et se traduisant par une amélioration des rendements. Pour ce faire, une suggestion serait de restreindre le nombre de modalités de CIMS à évaluer, en se focalisant uniquement sur l'utilisation de radis fourrager, et d'augmenter le choix des variétés de tournesol à utiliser, qui seraient des variétés sensibles à la Verticilliose afin de ne pas masquer l'expression des dégâts.

Un autre couvert à valoriser, et dont les mécanismes restent à mieux caractériser, est celui de la vesce du Bengale. Ce couvert aura permis d'observer des réductions inattendues de la sévérité (indice ou AUDPC) de la Verticilliose (en 2017 et 2020), ou au contraire une augmentation de la sévérité (en 2019). Ces observations sont probablement à corrélérer avec la capacité de la vesce du Bengale à enrichir le sol en azote, qui peuvent à leur tour impacter l'expression du phoma (Seassau et al., 2010), qui pourrait accélérer le développement du *V. dahliae*. L'enrichissement en

azote peut aussi potentiellement impacter le *V. dahliae* de manière directe, par des effets toxiques (Tenuta and Lazarovits, 2002; Coccozza et al., 2021) ou indirecte, par la stimulation d'autres communautés microbiennes (Davis et al., 2010). Un suivi précis du pathosystème présenté par les tournesols aurait été opportun afin de corrélérer les sévérités des maladies observées, avec en particulier l'exemple du phoma et de la Verticilliose, mais il aurait été trop chronophage au vue du nombre de tournesols à suivre. Une autre limite de ce travail est, encore une fois, l'absence de données sur l'inoculum présent du sol qu'il n'a pas été possible de mettre en culture et de quantifier.

Enfin, la Vesce du Bengale est également le seul couvert à avoir permis une augmentation significative des rendements de tournesol (en 2020). Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires afin d'évaluer plus finement les effets de Fabacées sur les dégâts et dommages de la Verticilliose en présence et en absence d'autres pathogènes du tournesol connus pour être favorisés par l'enrichissement en azote. Elles pourraient se faire en parcelles où un complexe de pathogènes a été identifié, ou en conditions contrôlées où les pathogènes seraient inoculés artificiellement, tels que dans des systèmes en mésocosmes décrits plus tard dans ce chapitre.

## V.2. Potentiel de régulation de l'*Orobanche cumana* par l'utilisation de Brassicacées ou de Fabacées et de la biofumigation

L'efficacité de broyats de Brassicacées ou de Fabacées pour contrôler l'*O. cumana* a été évaluée selon différentes approches et à différents stades de développement du bioagresseur (germinations, fixations des nodules, des bourgeons ou des tubercules, émergences). Les résultats des premières expérimentations pour évaluer les effets des broyats sur la germination de l'Orobanche ont été obtenus en milieux contrôlés, en exposant des graines contenues dans des plaques 96 puits à des broyats, le tout maintenu dans des boîtes hermétiquement fermées et incubées en chambre de culture. L'exposition à des broyats a permis une inhibition de la germination, en particulier lors de l'utilisation de broyats de moutarde brune var. Etamine ; cette dernière ayant menée à des réductions de germination atteignant 100%, quel que soit le temps de conditionnement des graines ou l'approche utilisée pour induire la germination de ces dernières (induction

chimique ou naturelle au contact de racines de plantules de tournesols). Un lien entre ITCs (particulièrement celui issu de la sinigrine) et cette régulation a été avancé, bien que comme pour la régulation de *V. dahliae*, d'autres molécules (ITCs ou non) peuvent aussi être impliquées. Néanmoins, il est important de souligner que la limite de ce dispositif en conditions contrôlées est que la production et la persistance de ces ITCs sont maximales, contrairement à ce qui peut être rencontré en plein champ. De plus, les observations réalisées dans le cadre de ce dispositif étaient faites 7 jours après retrait des broyats et ajout d'un stimulant de la germination de l'Orobanche (tournesol et GR24+DCL). Ce laps de temps réduit présente la limite de ne pas permettre d'identifier une éventuelle temporalité dans les effets inhibiteurs observés. Les graines comptées comme non germées pouvaient donc être seulement inhibées et initier leur germination plus tardivement qu'à J+7 du retrait des broyats.

Nous avons tenté de lever ces deux limites par des essais complémentaires, réalisés en plaques de culture placées en chambre de culture pendant 40 jours, qui ont confirmé des réductions significatives des fixations de l'Orobanche aux racines de tournesols en présence de broyats de moutarde brune et de vesce du Bengale, en comparaison du témoin sans broyat. Les régulations étaient cependant moins importantes qu'en plaques 96 puits avec des réductions moyennes d'environ 5 à 15 orobanches fixées sur les racines, tous stades confondus, et en fonction des répétitions, en comparaison avec les témoins sur lesquels il était possible de comptabiliser une vingtaine de fixations. Enfin, le dernier dispositif en serre, dans des pots de 3 L, n'a pas permis de confirmer les premiers résultats, les broyats n'ayant pas entraîné de réduction significative des émergences, en comparaison avec le témoin, de leur l'apparition à 3 mois après le semis du tournesol. Ces différences de régulations observées en fonction des dispositifs s'expliquent probablement en majeure partie à cause de pertes en ITCs, par volatilisation ou par adsorption à la matière organique contenue dans le substrat utilisé (terreau et sable), la matière organique contenue dans ce substrat pourrait particulièrement mener à l'adsorption des ITCs. Un autre facteur serait l'humidité du substrat qui peut avoir impacté la germination ou le développement de l'Orobanche, réduisant potentiellement son développement du fait d'arrosages relativement fréquents. Ces résultats obtenus sur les émergences suggèrent donc que les variétés de moutarde brune et de vesce du Bengale, aux quantités testées (2 t de MS.ha<sup>-1</sup> pour les effets sur la germination d'*O. cumana* et 4 t de MS.ha<sup>-1</sup> pour les effets sur la

fixation ou sur les émergences) manquent d'efficacité pour contrôler les races d'Orobanche testées, qui sont considérées comme agressives, et sur les variétés et lignées de tournesols testées qui ont été choisies pour leur sensibilité à l'Orobanche afin de ne pas masquer d'effets. Ces recherches préliminaires seraient à poursuivre en veillant (i) aux quantités d'eau apportées qui peuvent possiblement réduire la germination ou le développement de *O. cumana* et/ou (ii) au substrat qui peut réduire la persistance des ITCs (adsorption rapide à la matière organique contenu dans le substrat utilisé). Si ces limites (ajustement de l'arrosage difficile, teneurs en matière organiques très élevées) peuvent être rencontrées lors d'essais en conditions expérimentales, aucune d'elles ne le seraient en parcelles agricoles. Il y a donc un intérêt fort à mener des essais supplémentaires, en plein champ, afin de tester les effets des broyats sur l'émergence d'Orobanches sur des variétés de tournesols aux sensibilités contrastées, afin d'évaluer si une combinaison de leviers est possible pour une méthode de lutte intégrée contre le bioagresseur. Un essai chez un agriculteur, dont la parcelle est située à Bourret (82), est en cours. Une bande de radis fourrager, de vesce du Bengale ainsi que le mélange des deux ont été semées en Novembre 2021, et une bande a été gardée sans couverture (en laissant les adventices se développer spontanément) pendant la période d'interculture afin qu'elle soit utilisée comme référence. Les couverts ont été broyés le 29 Mars 2022 puis enfouis (quelques jours plus tard). La variété de tournesol DKF3333, sensible à l'Orobanche, et déjà utilisée lors des essais au laboratoire, a été semée le 15 Avril 2022. Des linéaires de tournesols ont été identifiés à l'heure de la rédaction de ce manuscrit et ces tournesols seront suivis pour évaluer le nombre de tournesols présentant des Orobanches émergées, ainsi que le nombre d'émergences par pieds de tournesols fin aout 2022.

Cet essai pourrait permettre de continuer à caractériser les effets de la vesce du Bengale, qui a permis d'augmenter les taux de germination de l'Orobanche durant deux répétitions en plaques 96 puits. En effet, si ces tendances se confirment, la vesce du Bengale pourrait être utilisée non pas comme culture inhibitrice de la germination ou de la fixation, mais comme culture piège engendrant une germination suicide de l'Orobanche, phénomène déjà connu et étudié pour l'Orobanche rameuse du colza, dont la germination est justement stimulée par la production d'ITCs et dont des cultures intermédiaires de moutarde brune peuvent réduire le stock semencier selon des expérimentations menées par la chambre d'Agriculture de Vendée et Terres Inovia (ARVALIS, 2011).

Globalement, les mêmes pistes de réflexion préconisées pour la Verticilliose cidessus (Point 1 à 5) peuvent être appliquées à l'Orobanche pour l'étude du potentiel de la biofumigation dans la régulation du bioagresseur en plein champ, notamment en parcelles d'agriculteurs, afin de tenter de lever les différentes limites qui peuvent être rencontrées lors d'essais en plein champ détaillées cidessous (mauvaise implantation de couverts, hétérogénéité de l'inoculum du bioagresseur, faibles conversions de GSLs en ITCs, etc...).

Il est à noter qu'à notre connaissance, cette thèse apporte les premières briques concernant l'utilisation des CIMS et de la biofumigation comme méthode de lutte contre l'Orobanche du Tournesol, avec ces variétés de CIMS adaptées au contexte du Sud-Ouest de la France. A l'échelle internationale, seules deux études en conditions contrôlées existent concernant l'effets de broyats sur *O. cumana* (Pedraza et al., 2015 ; Strelnikov et al., 2020).

### V.3. Elargir la diversité des variétés et espèces testées pour lutter contre *V. dahliae* et *O. cumana*

Il serait également pertinent de réussir à caractériser des espèces et des variétés monospécifiques ou de mélanges capables de réguler les deux bioagresseurs. En effet, à l'état actuel des connaissances, il semblerait que ce soit le radis fourrager qui permettent les régulations les plus intéressantes du *V. dahliae*, tandis que l'inhibition de l'*O. cumana* semble être la plus importante suite à la moutarde brune, selon les expérimentations en conditions contrôlées. Le mélange des deux, en présence de vesce du Bengale, dans les parcelles à Auzeville a permis de constater que le couvert produisait une biomasse d'environ 1 à 2 t de MS.ha<sup>-1</sup> avec une prédominance du radis fourrager. Le mélange n'a pas impacté les quantités d'azote dans le sol, la sévérité de la Verticilliose ou encore les rendements du tournesol aux densités utilisés (1/3 des densités monospécifiques). Ce mélange pourrait continuer à être caractérisé afin de tenter d'aboutir à une régulation des bioagresseurs ciblés, avec par exemple, des modifications dans les densités de semis pour tenter de maximiser les biomasses produites et l'expression des services écosystémiques visés et de mutualiser une protection contre le *V. dahliae* et l'*O. cumana*.

Il n'est pas non plus à exclure que l'espèce ou la variété la plus adaptée pour répondre à cet objectif ne soit en réalité pas celles étudiées dans le cadre de cette

thèse. Tester une plus large gamme de variétés et d'espèces en plein champ étant coûteux et sujet à des facteurs de variabilité pouvant biaiser les résultats obtenus, une première étape consisterait à mieux comprendre les interactions entre ITCs et récepteurs de *O. cumana* et *V. dahliae* par des approches transcriptomiques et métabolomiques, pour déterminer, si par exemple, les inhibitions de germinations observées sont dues à une compétition entre les ITCs et les molécules stimulatrices de la germination émises par le tournesol. En effet, l'analyse transcriptomique basée sur l'étude des ARN messagers produits lors d'un processus de transcription d'un génome pourrait être réalisée à différents pas de temps. En prenant l'exemple de *O. cumana*, il s'agirait des étapes suivantes : caractériser les ARNm produits à l'état initial sur graines dormantes, et sur graines stimulées par du GR24 et DCL, afin de caractériser les ARNm produits lors de l'initiation de la germination. Ces mêmes analyses seraient également à faire en présence et en absence de broyats ou d'ITCs de synthèse, afin d'identifier une éventuelle régulation des ARNm produits lors de l'initiation de la germination, qui pourraient témoigner d'une inhibition de cette dernière, voire une compétition entre ITCs et ces molécules, sur les récepteurs de *O. cumana*. Le cas échéant, réussir à identifier les ITCs les plus compétitifs, et dont les effets perdureraient le plus dans le temps. D'autre part, l'analyse des profils et des concentrations de GSLs contenues dans une large gamme de variétés de CIMS, permettrait de déterminer les variétés et espèces ayant les concentrations les plus élevées en ces ITCs d'intérêt et les plus susceptibles de mener à un contrôle efficace de l'Orobanche.

#### V.4. Caractérisation en mésocosme du potentiel de biofumigation pour réguler *V. dahliae* et *O. cumana*

Un résultat flagrant ressortant de l'ensemble des travaux décrits ci-dessus est la différence de l'efficacité de la régulation de *V. dahliae* et *O. cumana* observée au laboratoire et celle observée sous serre et en plein champ. Plusieurs hypothèses ont été émises afin de les expliquer, avec des suggestions permettant de mieux contrôler la variabilité observée en plein champ. Expérimentalement, des dispositifs intermédiaires entre laboratoire et champ pourraient être mis en place pour valider les hypothèses émises, notamment sur les seuils de biomasses nécessaires à une biofumigation efficace, sur l'effet de la température et de l'humidité, et sur l'impact de l'inoculum initial de *V. dahliae* ou de *O. cumana* dans le sol. Il s'agirait par exemple d'inoculer artificiellement des sols avec une quantité

connue de microsclérotas, comme ce qui a été le cas pour les essais avec *O. cumana*, et d'évaluer les effets d'une gamme de biomasses de CIMS, le tout au sein d'un dispositif plus volumineux que les pots utilisés dans le cadre de la thèse, comme des bacs de culture, auxquels on ajouterait des broyats de CIMS cultivés au champ à hauteur de 2 t MS.ha<sup>-1</sup>. Une autre possibilité serait de cultiver directement les CIMS dans ces bacs de culture, puis de les broyer et de les incorporer directement. La comparaison entre broyats prélevés au champ puis enfouis avec CIMS cultivées directement dans ces bacs de culture pourrait permettre de mettre en avant l'action biocide des processus allélopathiques des Brassicacées tout au long de leur développement, bien qu'il soit connu que celle-ci soit plus faible que lors de la biofumigation (Motisi, 2009), en comparaison à celui des broyats uniquement, lors de l'apport externe de ces derniers, prélevés au champ.

De plus, un tel dispositif aurait l'avantage, contrairement à ce qui a déjà été fait dans le cadre de la thèse, de permettre une évaluation plus à long terme de la décomposition des broyats enfouis dans le sol. Il serait également possible de mieux caractériser grâce à ces dispositifs la dynamique de libération de molécules biocides, par exemple en utilisant des appareillages tels que ceux décrits par Deasy et al. (2016), qui consistent à utiliser des tubes en polytétrafluoroéthylène positionnés dans le sol et capables grâce à une microextraction sur phase solide de collecter les composés volatiles émis par les végétaux dans le sol (initialement les racines). Les gaz collectés peuvent ensuite être analysés par chromatographie en phase gazeuse afin de distinguer différents profils ainsi que l'abondance de molécules volatiles émises, telles qu'une large diversité d'ITCs mais également d'autres molécules telles que l'acétone. Cette méthode permet également de détecter les changements dans le temps des émissions gazeuses. Ainsi, il serait possible de faire un suivi entre les émissions des molécules biocides et la densité d'inoculum viable de *V. dahliae* afin de tenter de discriminer la part de la régulation des microsclérotas qui serait à imputer à ces molécules.

Un suivi de la dynamique de l'azote dans le sol pourrait également être réalisée, dans le même objectif que celui de l'évaluation des émissions d'ITCs et autres molécules biocides. Un tel dispositif pourrait également permettre d'évaluer un critère qui a peu varié durant ce travail de thèse, du fait de la réalisation d'essais dans le même contexte pédologique : le type de sol et sa richesse en matière organique. Ces derniers peuvent potentiellement influencer la persistance des

molécules biocides comme cela a été conclu par Neubauer et al. (2014) au laboratoire, qui ont observé que le potentiel de variétés biofumigantes qu'ils avaient testées (Moutarde brune, radis fourrager, moutarde blanche) était insuffisant pour contrôler efficacement *V. dahliae* en tant que méthode unique, en particulier dans les sols contenant plus de 1% de matière organique. Cet effet limitant de la matière organique avait déjà été observé par Matthiessen and Shackleton (2005) sur différents ITCs utilisés sous leur forme synthétique. Les résultats de Liu et al. (2020) démontrent que la texture du sol peut aussi affecter la dégradation de la sinigrine, et donc sa persistance dans le sol et la durée de contact avec les bioagresseurs ciblés. Ainsi, selon ces auteurs, il y avait une corrélation négative entre le taux de dégradation de ces ITCs et la proportion d'argiles dans les sols.

Ce type de dispositifs en bacs pourrait permettre d'inoculer conjointement les deux bioagresseurs, afin d'évaluer d'éventuels interactions entre les deux. Bien qu'aucune étude n'existe sur le sujet à l'heure de la rédaction de ce manuscrit, il serait probable que les symptômes de *V. dahliae* soient accentués par la présence de *O. cumana*, à cause de la déplétion hydrique engendrée par les fixations de *O. cumana*, du fait que *V. dahliae* soit un champignon vasculaire. En outre, ce dispositif faciliterait l'identification de variétés de CIMS capables de réguler conjointement les deux bioagresseurs. En plus de ces deux bioagresseurs, il serait aussi possible d'inoculer artificiellement les tournesols avec du phoma, dont des effets de surexpression des symptômes de *V. dahliae* ont été supposés pour expliquer une augmentation de la sévérité des symptômes de la Verticilliose suite à l'enfouissement de Vesce du Bengale en 2019 lors de ce travail de thèse.

#### V.5. Caractérisation de l'effet des CIMS et de la biofumigation à l'échelle de la rotation

Au-delà des questionnements sur l'effet des CIMS et de la biofumigation sur les bioagresseurs du tournesol, qui se situe à l'échelle de la succession CIMS – Tournesol, il serait judicieux d'évaluer des effets des CIMS à l'échelle de la rotation, problématique qui n'a pas du tout été abordée dans le cadre de la thèse, aux vues des délais limités. Comme détaillé précédemment, les mécanismes par lesquels les CIMS peuvent influencer les bioagresseurs sont multiples, difficile à distinguer et certains d'entre eux peuvent s'exprimer à long terme, avec comme exemples l'enrichissement en azote qui peut avoir des effets toxiques sur les microsclérotés

du *Verticillium* (Tenuta and Lazarovits, 2002; Coccozza et al., 2021), ou l'enrichissement en matière organique, qui pourrait entre autre stimuler des communautés microbiennes antagonistes au champignon (Matthiessen et al., 2004; Davis et al., 2010), comme cela a déjà été démontré par Michel (2014) qui n'avait pas observé d'effets de l'enfouissement de moutarde sur les microsclérotés qu'au long terme. Ainsi, il semble intéressant de mettre en place des essais à l'échelle de la rotation, afin d'observer des effets en année culturale n+1 sur les bioagresseurs telluriques de la culture suivante (blé dur, dans le cas de la rotation classique du Sud-Ouest) comme les fusariums, et surtout en année culturale n+2 avec un retour du tournesol sur la parcelle. Cela permettrait d'évaluer un effet à long terme sur l'inoculum du *V. dahliae* et sur l'expression de ses dégâts et dommages, en particulier si des CIMS et une biofumigation ont à nouveau été mis en œuvre pendant la période d'interculture entre le blé dur n+1 et le tournesol n+2. Cela pourrait permettre d'amenuiser de manière continue le stock d'inoculum de *V. dahliae*. Un exemple de succession culturale à étudier dans un premier temps est schématisé dans la figure 85.

## Caractérisation de l'effet des CIMS et de la biofumigation à l'échelle de la succession puis de la rotation

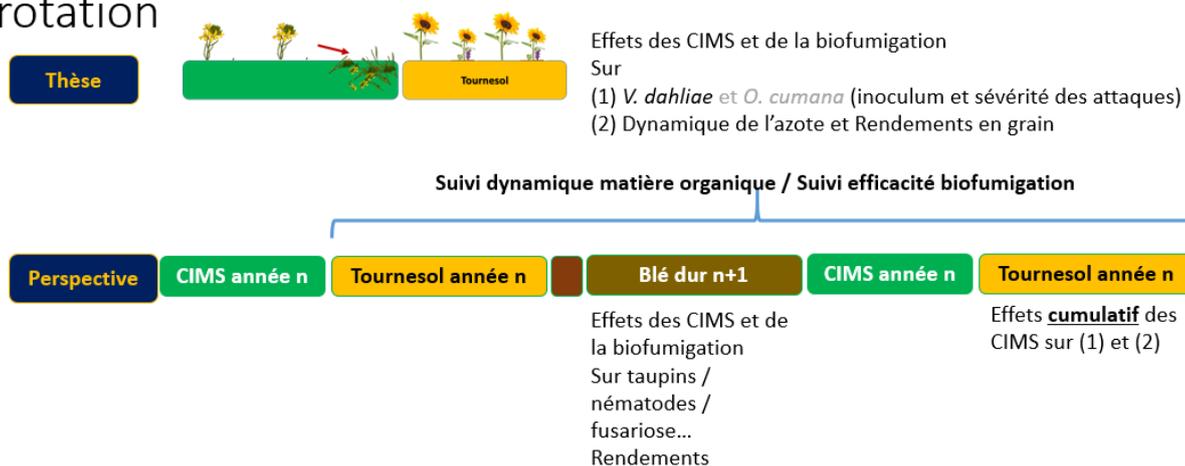


Figure 85 – Schéma récapitulatif de succession et rotation culturales à étudier dans le cas d'un dispositif visant à évaluer les effets des CIMS et de la biofumigation à plus long terme que durant la succession CIMS – Tournesol visée dans ce travail de thèse.

Dans les régions plus au Nord, il serait possible d'évaluer ces effets sur les stocks de sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum*, capables de se conserver dans les sols environ

4 ans (Cotic et al., 2012) et dont les résultats de la revue de littérature réalisée dans le cadre de cette thèse a permis de mettre en avant un potentiel prometteur des broyats Brassicacées (Ait-Kaci Ahmed et al., 2020), bien que plusieurs espèces de Brassicacées (18 genres et 32 espèces) aient été reportées comme étant hôtes du champignon (Purdy, 1979), avec comme exemples le colza et la moutarde brune (Garg et al., 2010). D'autre part, des travaux récents menés par Terres Inovia révèlent des pistes prometteuses sur l'utilisation de radis fourrager pour jouer le rôle de plantes pièges attractives d'altises et ainsi protéger la culture du colza contre les dégâts du coléoptère. Un stress biotique serait bénéfique pour la synthèse d'ITCs à condition que les biomasses ne soient pas trop fortement réduites afin de tout de même permettre une d'atteindre des biomasses favorables à la biofumigation.

#### V.6. Considérer la biofumigation au sein d'un bouquet de services écosystémiques

De manière générale, cette étude fait également ressortir qu'à elle seule, la biofumigation ne permet pas de réguler assez efficacement les dégâts de la Verticilliose pour permettre une amélioration significative des rendements. Même dans la situation la plus favorable à la réussite de la biofumigation pour réguler la Verticilliose (en 2016), la réduction des dégâts n'a pas permis une diminution des dommages au point d'améliorer significativement les rendements, malgré quelques tendances. De ce fait, la biofumigation devrait s'inscrire dans une stratégie de lutte intégrée, qui reste à définir. Cette étude a permis de constater que la combinaison entre variétés très peu sensible (TPS) et biofumigation n'a pas permis de gain particulier par rapport à la réduction de la sévérité de la Verticilliose des tournesols TPS cultivés après des couverts en comparaison au témoin sol nu. Il reste donc encore des connaissances à acquérir sur le choix des variétés de tournesols qui seraient les plus adaptées à cette pratique. L'effort de sélection variétale pourrait également être fourni dans l'amélioration des cultures biofumigantes de Brassicacées, avec de nombreuses pistes de travail possibles :

- L'augmentation des quantités de biomasses produites ou des concentrations de GSLs dans les tissus. La quantité d'ITCs produits et le potentiel biofumigant de la culture en dépendent. Tout ceci idéalement même à basses températures.

- Travailler sur les précocités de floraison des CIMS, puisque les concentrations en GSL y sont maximales, et adapter le choix des espèces/variétés en fonction des contextes climatiques et des systèmes de culture. Un objectif à atteindre pourrait être celui d'une floraison en février ou en mars (qui serait à déterminer en fonction du nombre de degrés jours à atteindre en fonction des climats de la région ciblée). Une floraison à cette période permet généralement d'avoir une fenêtre de destruction des couverts combinant les facteurs météorologiques de températures douces avec la possibilité d'avoir des précipitations prévues. Elle présente aussi l'avantage de permettre un démarrage de la minéralisation des CIMS afin de minimiser d'éventuelles immobilisations azotées, et de laisser assez de temps pour la préparation du lit de semences pour le semis du tournesol, s'il se fait en mai. En théorie, une durée de trois mois entre la biofumigation et le semis du tournesol ne devrait pas permettre une ré-augmentation du stock de l'inoculum ou de la banque de graines d'Orobanches, et donc préserver les effets assainissant potentiels de la méthode, hormis si les parcelles sont recontaminées par du matériel agricole, ou si des adventices hôtes de *V. dahliae* tels que le chénopode, l'amarante ou le trèfle blanc favorisent sa multiplication (Woolliams, 1966). Néanmoins, il ne s'agit que d'hypothèse et la dynamique de l'inoculum de *V. dahliae* en présence et en absence d'adventices hôtes entre la biofumigation et le semis du tournesol nécessiterait d'être évalué afin de déterminer avec exactitude si une augmentation de la durée entre biofumigation et culture à protéger a un impact sur l'incidence ou la sévérité d'une maladie sur la culture à protéger. La méta-analyse de Morris et al., (2020) suggère en tout cas que l'efficacité de la biofumigation baisse tellement lentement dans le temps, que le facteur de la durée ne devrait pas être discriminant dans la réflexion de la mise en place de la technique, contrairement à d'autres facteurs tels que l'espèce ou le genre de la culture biofumigante, sa biomasse, ou la quantité de GSLs produits.

Ces différentes pistes de travail et voies possibles en sélection variétale pourraient permettre de maximiser le potentiel de la biofumigation pour protéger la culture du tournesol. En outre, les services fournis par les CIMS ne se limitent pas à la régulation potentielle de *V. dahliae* ou de *O. cumana*, et l'implantation de CIMS semble, même en l'absence de la fourniture d'un service de régulation de bioagresseurs, plus avantageuse que des sols nus pendant la période d'interculture. Cette étude aura également permis de confirmer l'intérêt des CIMS, en particulier

des Fabacées à améliorer les quantités d'azote disponibles pour la culture du tournesol, comme cela a déjà pu être établi par le passé de manière globale concernant la culture de rente semée en suivant (Couëdel et al., 2018c). Ce service de soutien n'étant pas le seul, puisque les CIMS sont également bien connues pour leur fonction CIPAN largement documenté (Blanco-Canqui et al., 2015). Bien que des réductions de rendements aient pu être observées en 2019 (après de la navette fourragère ou le mélange navette fourragère et vesce du Bengale), l'étude aura aussi permis de mettre en avant une amélioration significative du rendement du tournesol suite à la vesce en 2020, comme cela a déjà été démontré pour la culture du maïs par Adeux et al. (2021), qui ont également observé un effet dépressif des rendements du tournesol cultivé après de la moutarde brune, lorsqu'il n'y avait aucun apport azoté. Ces résultats sont probablement à corrélérer aux ratio C/N des CIMS permettant une minéralisation et un apport en azote plus rapide dans le cas d'une Fabacée que dans le cas d'une Brassicacée. Des connaissances supplémentaires sont nécessaires pour évaluer si les CIMS aux C/N élevés peuvent finalement permettre des améliorations des rendements sur le long terme. Une autre voie de recherche serait l'évaluation d'effets cumulatifs de l'introduction de CIMS pendant l'interculture pendant plusieurs années de suite, afin de pouvoir appréhender non plus uniquement les effets d'un enrichissement en azote mais également celui d'un enrichissement en matière organique sur les rendements du tournesol.

#### V.7. Pas de dis-service majeur des CIMS et de la biofumigation contre les communautés microbiennes bénéfiques des sols

Aucune contre-indication majeure ne ressort de l'évaluation d'éventuels dis-services des CIMS et de la biofumigation vis-à-vis de communautés microbiennes du sol réalisée dans le cadre de ce travail de thèse. En effet, aucune réduction significative du taux de mycorhization des racines de tournesols n'a été mise en évidence, avec au contraire, quelques augmentations de ces taux suite à de la moutarde brune, en comparaison au sol laissé sans couverture pendant la période d'interculture. Il en est de même pour le taux de fixation azotée qui ne semble pas avoir été impacté chez les Fabacées cultivées en association avec des Brassicacées. Enfin, l'étude plus globale des communautés microbiennes par des approches moléculaires et par le calcul d'indices écologiques, n'a pas non plus mis en évidence de réduction de la richesse ou de la biomasse de ces communautés, ni de

déséquilibre de leur structure. Ces résultats vont dans le sens des conclusions tirées dans la revue de littérature de Couëdel et al. (2019) qui n'avaient pas non plus identifié de consensus quant à d'éventuels effets négatifs des CIMS et de la biofumigation en plein champ. Néanmoins, cette étude présente 3 limites qui nécessitent que les résultats nécessiteraient d'être consolidés (i) Par des essais en conditions plus favorables à la réussite de la biofumigation (lors de production de biomasses élevées, similaires à celles obtenues en 2016) (ii) En précisant plus finement les modalités testées (par exemple en se focalisant sur le radis fourrager et la Vesce du Bengale) afin de réduire le nombre de modalités en faveur d'une augmentation du nombre de répétitions, pour appliquer l'hétérogénéité de la distribution des communautés microbiennes du sol. (iii) Elle nécessiterait également d'être réalisée à plus long terme pour un suivi dynamique des effets de l'enrichissement du sol en matière organique, puisque la temporalité de l'essai à l'échelle d'une succession culturale CIMS - Tournesol ne permet peut être pas de rendre compte d'effets sur le long terme.

Par ailleurs, l'étude plus précise de l'abondance relative de genres de CMA (ex : *Glomus*, *Funneliformis* ou *Rhizophagus*) a pu mettre en évidence des tendances de réduction de l'abondance relative de quelques genres de CMA entre la destruction des CIMS et le semis du tournesol, pouvant plutôt être attribuée à la mécanisation qu'au processus de biofumigation lui-même. Néanmoins, des réductions significatives des abondances relatives des genres *Funneliformis* et de *Glomus* ont été observées suite aux traitements composés de Brassicacées, en comparaison aux traitements de Fabacées ou de mélanges des deux. Ces résultats nécessitent donc également d'être consolidés, d'autant plus qu'ils ne correspondent pas aux observations obtenues sur les taux de mycorhization des racines de tournesol, qui n'avaient pas fait ressortir de dis-services des CIMS.

Enfin, il est également à noter qu'aucun effet dépressif majeur des CIMS sur les rendements du tournesol n'a été observé au sein des 4 années d'expérimentation à Auzeville-Tolosane ou lors de l'essai en parcelle d'agriculteur, à l'exception de l'année 2019 où la navette fourragère en culture pure ou en mélange avec de la vesce du Bengale a mené à des réductions de rendements de l'ordre d'environ 0,5 t.ha<sup>-1</sup> en comparaison au sol nu, suggérant une éventuelle immobilisation de l'azote, bien qu'elle n'ait pas été identifiée lors des analyses de sol avant semis du tournesol, ou d'autres effets associés aux CIMS pouvant impacter négativement le

développement du tournesol (pré-emption en eau, difficulté du travail du sol, etc...). Ces réductions restent donc exceptionnelles, ce qui permet de nuancer les à priori qui existent sur les effets des CIMS, notamment en destruction tardive, qui peuvent impacter l'implantation de la culture printemps suivante et les rendements, comme rapporté par des essais en instituts techniques sur le maïs par exemple. Au contraire, une augmentation significative des rendements en grain, s'élevant à 0,7 t.ha<sup>-1</sup>, a été observée en 2020, suite à l'implantation de la Vesce du Bengale (monospécifique) et constitue un argument favorable à l'acceptabilité des CIMS par les agriculteurs, puisqu'il se traduit par un gain de 665 euros selon les dernières cotations de Mai 2022 (950 euros.t<sup>-1</sup>) (Sources en Annexe V), qui permet de rembourser le coût de l'implantation de la vesce du Bengale, qui est estimé aux alentours de 100 euros, (prix incluant la semence et le coût de l'implantation et de la destruction par broyage et enfouissement avec du matériel personnel). Une économie sur la fertilisation azotée du tournesol cultivé après la vesce du Bengale est aussi à souligner. Cette cotation (950 euros.t<sup>-1</sup>) étant très conjoncturelle, il est important de considérer les cotations des années passées, qui sont d'en moyenne 400 euros.t<sup>-1</sup>, induisant un gain de 280 euros.t<sup>-1</sup>. Cet argument économique concret vient s'insérer dans l'éventail de bénéfices écologiques largement discutés dans ce manuscrit (fertilité chimique, physique et biologique des sols, régulation de bioagresseurs avec des effets avérés sur les adventices, etc ...), permettant de promouvoir l'implantation de CIMS, qui progresse déjà significativement, notamment dans le Sud-Ouest, avec une augmentation très nette des surfaces cultivées avec des CIMS avant le tournesol ces dernières années. En effet, après avoir longtemps stagné à 3%, ce pourcentage a doublé entre 2018 et 2019 et a atteint environ 15% en 2020.

Pour conclure, l'implantation de CIMS et de la biofumigation sont des pratiques à promouvoir, pas uniquement à cause de leur potentiel biofumigant, dont l'efficacité dépend du contexte pédo-climatique et agronomique de sa réalisation, mais également pour d'autres services écosystémiques que ce travail a permis de souligner (augmentation des quantités d'azote dans le sol), ainsi que pour d'autres services écosystémiques bien connus et caractérisés dans la littérature.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour caractériser la manière d'optimiser l'efficacité de la biofumigation (biomasses à atteindre, variétés de CIMS ou de tournesol les plus adaptées, mécanisation à mettre en œuvre, etc ...) vis-à-vis

de la Verticilliose du tournesol et pour évaluer en plein champ ses effets sur l'*O. cumana*, ainsi que ses effets à l'échelle du système, sur des complexes parasitaires plus larges. De nombreuses pistes de recherches ont été évoquées dans les sections ci-dessus mais afin de pouvoir répondre aux objectifs de mise en place d'une lutte intégrée contre la Verticilliose du Tournesol et contre l'Orobanche du Tournesol, en vue d'améliorer la productivité du tournesol, les pistes à privilégier seraient :

(i) D'identifier les variétés de tournesol dont la sensibilité permettrait d'exprimer des niveaux de régulation de la Verticilliose optimaux, comme cela a pu être observé au sein des essais menés à Auzeville en 2016 et 2017.

(ii) De confirmer les résultats prometteurs obtenus grâce à la biofumigation mise en œuvre suite à l'implantation du radis fourrager au sein de réseaux expérimentaux, afin de valider la généralité de ce résultat, qui reste à ce stade encore trop variable pour pouvoir être transféré vers la profession agricole.

(iii) De poursuivre la caractérisation des effets de la Vesce du Bengale tant que CIMS mise en place avant la culture du tournesol, qui a produit des services écosystémiques prometteurs mais également variables en fonction des années (augmentation des quantités de azote dans le sol avant le semis du tournesol, régulation de la sévérité de la Verticilliose du tournesol, augmentation du rendement grain du tournesol).

Les travaux concernant l'Orobanche sont également à poursuivre, pour leur aspect novateur et prometteur, avec 2 volets à adresser en priorité qui sont :

(i) Elargir, par des approches *in vitro*, la gamme des variétés de CIMS testées, afin de déterminer les variétés les plus efficaces pour réguler le développement de *O. cumana* à différents stades (germination, ou fixation, ou émergence).

(ii) Evaluer les effets de régulation obtenus *in vitro* par des expérimentations en parcelles expérimentales (où des facteurs pédo-climatiques pourraient réduire les régulations observées, comme cela a été le cas pour la Verticilliose du tournesol) puis au sein de réseaux d'agriculteurs pour confirmer la généralité des résultats, avant le transfert vers la profession agricole.



## Annexes

### Annexe I – Stades repères de la culture du tournesol (source : Terres Inovia)

#### Germination - levée



**Germination (09)**  
**Stade A1**  
Apparition des hypocotyles en crosse



**Levée (10)**  
**Stade A2**  
Emergence des cotylédons - cotylédons étalés

#### Phase végétative stade B1/B2 (12)

*La première paire de feuilles opposées apparaît entre les cotylédons et mesure environ 4 cm de long ; les pétioles sont visibles du dessus.*



**Stade B3/B4 (14)**  
La seconde paire de feuilles opposées apparaît et mesure environ 4 cm de long; les pétioles sont visibles du dessus.

**Stade B5 (15)**  
La cinquième feuille a 4 cm de long et son pétiole est visible du dessus.

**Stade Bn (19)**  
La nième paire de feuille a 4 cm de long et son pétiole est visible du dessus.

#### Phase bouton floral



**Stade E1 (51)**  
Apparition du bouton floral étroitement inséré au milieu des jeunes feuilles : stade bouton étoilé.



**Stade E2 (53)**  
Le bouton se détache de la couronne foliaire. Son diamètre varie de 0.5 à 2 cm. Les bractées sont nettement distinguables des feuilles.



**Stade E4 (57)**  
Le bouton est nettement dégagé des feuilles à l'horizontale. Son diamètre varie de 5 à 8 cm. Une partie des bractées se déploie.

#### Floraison



**Stade F1 (61)**  
Le bouton floral s'incline; les fleurs ligulées sont perpendiculaires au plateau.



**Stade F3.2 (63)**  
Début floraison. Les trois cercles de fleurons les plus externes ont leurs anthères visibles et dégagées et leurs stigmates déployés. Les trois cercles suivants ont leurs anthères visibles et dégagées.



**Stade F3.5 (65)**  
Les trois cercles de fleurons les plus externes ont été fécondés. Les trois cercles suivants ont leurs anthères et leurs stigmates visibles et déployés. Les trois cercles suivants ont leurs anthères visibles et dégagées, les akènes de la périphérie sont gris.

#### Maturation



**Stade M0 (80)**  
Début maturation. Chute des fleurs ligulées. Le dos du capitule est encore vert.



**Stade M3 (89)**  
Le dos du capitule est marbré de brun. Les bractées sont brunes. La tige se dessèche. L'humidité de la graine avoisine les 15%.



**Stade M4 (92)**  
Tous les organes de la plante sont brun foncé. L'humidité de la graine avoisine les 10%.

## Biofumigation to protect oilseed crops: focus on management of soilborne fungi of sunflower<sup>☆</sup>

Neïla Ait-Kaci Ahmed<sup>1</sup>, Grégory Dechamp-Guillaume<sup>2</sup> and Célia Seassau<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Toulouse, INRAE, UMR AGIR, 31320 Castanet-Tolosan, France

<sup>2</sup> Université de Toulouse, INRAE, INP-ENSAT Toulouse, UMR AGIR, 31320 Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup> Université de Toulouse, INRAE, INP-EIP Toulouse, UMR AGIR, 31320 Castanet-Tolosan, France

Received 23 March 2020 – Accepted 21 September 2020

**Abstract** – Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the three most productive oilseed crops worldwide. Soilborne diseases limit yields and are challenging to manage. The fungi *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Macrophomina phaseolina* can survive in the soil for many years and spread. Following the ban on fumigants, biofumigation, which consists of growing, chopping and incorporating a Brassicaceae cover crop to allow biocidal compounds production in the soil, may be an alternative. Biocidal effects of the hydrolysis of glucosinolate into active compounds, such as isothiocyanates, have been shown in laboratory studies, but the effectiveness of biofumigation varies more in the field. The present study reviews the main factors that determine effective biofumigation to protect sunflower. Since the toxicity of isothiocyanates to pathogens varies widely among the latter, we reviewed studies that assessed the suppressive effect of products of glucosinolate hydrolysis on *V. dahliae*, *S. sclerotiorum* and *M. phaseolina*. Farmers can use many mechanisms to increase isothiocyanate production, which may protect sunflower crop effectively. Increasing biomass production and chopping the cover crop during mild temperatures and before rainy periods could increase biofumigation effectiveness. Further field experiments are needed to confirm the potential of biofumigation to control soilborne diseases of sunflower and assess potential disservices to beneficial soil communities, given their potential key role in the control of soilborne pathogens.

**Keywords:** *Helianthus annuus* / cover crops / Brassicaceae / glucosinolates / agroecological crop protection

**Résumé** – Protéger les cultures oléagineuses par la biofumigation: le cas de la gestion des champignons telluriques du tournesol. Le tournesol (*Helianthus annuus* L.) est l'une des trois cultures oléagineuses les plus productives dans le monde. Les pathogènes telluriques limitent sa productivité et leur contrôle est difficile. Les champignons telluriques *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Macrophomina phaseolina* peuvent survivre plusieurs années dans le sol et sont en recrudescence. Suite à l'interdiction de plusieurs fumigants, la biofumigation, qui consiste en la mise en place, la destruction et l'incorporation de culture intermédiaire de Brassicacées permettant la production de composés biocides dans le sol, pourrait être une alternative. L'effet biocide des produits de l'hydrolyse des glucosinolates, tels que les isothiocyanates, a été démontré au laboratoire, mais l'efficacité de la biofumigation est variable en plein champ. Cette revue a pour objectif de recenser les déterminants majeurs de l'efficacité de la biofumigation pour la protection du tournesol. La toxicité des isothiocyanates étant variable selon les bioagresseurs visés, le second objectif est de recenser les études ayant évalué les effets suppressifs des produits de la dégradation des glucosinolates, contre les champignons telluriques *V. dahliae*, *S. sclerotiorum* et *M. phaseolina*. Les agriculteurs peuvent mettre en place plusieurs leviers afin d'améliorer la production d'isothiocyanates, permettant potentiellement une protection efficace de la culture du tournesol. Maximiser la production de biomasse puis détruire le couvert lors de températures douces et avant une période pluvieuse pourraient améliorer l'efficacité de la biofumigation. Des expérimentations en plein champ

<sup>☆</sup> Contribution to the Topical Issue “Innovative Cropping Systems / Systèmes innovants de culture”

\*Correspondence: [celia.seassau@purpan.fr](mailto:celia.seassau@purpan.fr)

supplémentaires sont nécessaires pour confirmer le potentiel de la biofumigation pour contrôler les pathogènes telluriques du tournesol et évaluer ses potentiels disservices contre les communautés microbiennes du sol, au regard de leur importance potentielle dans le contrôle des pathogènes telluriques.

**Mots clés :** *Helianthus annuus* / cultures intermédiaires multi-services / Brassicaceae / glucosinolates / protection agroécologique des cultures

## 1 Introduction

### 1.1 Oilseed crop production and protection

#### 1.1.1 Factors that limit crop yield

Since 2015, soybean (*Glycine max*), rapeseed (*Brassica napus* subsp. *napus*) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) have been the three main oilseed crops produced worldwide (FAOSTAT, 2020). In 2018, their worldwide production was ca. 345, 75 and 50 million t/annum, respectively (FAO, 2020). While the global area of these crops is expanding, unfavorable weather conditions threaten their production (FAO, 2018). Despite the moderate water requirements of sunflower, drought is the main environmental factor that limits its growth (Debaeke *et al.*, 2017a), and high temperature can decrease its final production of seeds and oil (Harris *et al.*, 1978). In most European countries that produce sunflower (Romania, Spain, France, Bulgaria, and Hungary), yield gaps of 1.1–2.4 t/ha have been reported, and climate change could be partly responsible for them (Debaeke *et al.*, 2017a). Biotic stress also limits oilseed crop production worldwide. At least 30 sunflower diseases are known. The most damaging and widespread fungal diseases are downy mildew (*Plasmopara halstedii*), phoma black stem (*Phoma macdonaldii*), phomopsis stem canker (*Phomopsis helianthi*), white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) and *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae*) (Seassau, 2010; Vear, 2016; Debaeke *et al.*, 2017b), most of which are soilborne pathogens (*P. halstedii*, *S. sclerotiorum*, *V. dahliae*). More recently, *Cadophora malorum* has been reported as a new soilborne fungus of sunflower (Martin-Sanz *et al.*, 2018; Molinero-Ruiz, 2019). In the context of climate change, *Macrophomina phaseolina* could be favored by ground dryness and temperatures of 28–30 °C (Šárová *et al.*, 2003). *S. sclerotiorum* and *V. dahliae* could tolerate unfavorable periods better (Wilhem, 1955; Debaeke *et al.*, 2017a) via their long-term structures – sclerotia and microsclerotia (MS), respectively –, which remain viable in the soil for many years (Mol *et al.*, 1995; Ćosić *et al.*, 2012).

#### 1.1.2 The challenge of managing soilborne fungi

Protecting crops from soilborne organisms is more challenging than protecting them from foliar pests (Matthiessen and Kirkegaard, 2006). Soilborne fungi such as *V. dahliae* and *M. phaseolina* can survive as MS up to 14 years (Wilhem, 1955) and 4 years (Watanabe, 1973), respectively. *S. sclerotiorum* produces sclerotia that may survive for 3 years (Ćosić *et al.*, 2012). Soilborne pathogens can coexist in the soil (Raaijmakers *et al.*, 2009), and their heterogeneous distribution makes monitoring them costly and usually ineffective (Matthiessen and Kirkegaard, 2006). For many oilseed diseases, genetic resistance is one of the most effective protection methods, but it breaks down frequently due to the appearance of new virulent

strains, as observed for sunflower diseases (Vear, 2016; Debaeke *et al.*, 2017b; Molinero-Ruiz, 2019). To reduce the pressure of soilborne pathogens, farmers used to fumigate vegetable and ornamental crops intensively with methyl bromide (Hoffmann and Malkomes, 1974; Duniway, 2002; Martin, 2003). However, methyl bromide was phased out under the Montreal Protocol in 2005 due to its depleting effects on the ozone layer (Laegdsmand *et al.*, 2007; Gimsing and Kirkegaard, 2009). Other synthetic compounds were subsequently used to control soilborne pathogens, such as 1,3-dichloropropene (phased out in the European Union [EU] in 2007), chloropicrin (phased out in the EU in 2012) and methyl-isothiocyanate (MITC), the primary breakdown product of metam-sodium (Ibekwe, 2004). MITC has a broad biocidal activity but alters important soil functions such as nutrient cycling (Macalady *et al.*, 1998). It is also highly volatile, with much of it transferred to the atmosphere after application (Dungan *et al.*, 2003).

Like for genetic resistance, maintaining the efficacy of pesticides after repeated use is difficult (Matthiessen and Kirkegaard, 2006). Synthetic fumigants may become less toxic due to soilborne pathogens developing resistance (Goldman *et al.*, 1994) and/or increased biodegradation of their chemicals (Warton *et al.*, 2003). This latter misunderstood phenomenon comes from the ability of microorganisms, mainly bacteria, to catabolize xenobiotics in the soil after repeated exposures with a short interval between applications (Warton *et al.*, 2003; Matthiessen and Kirkegaard, 2006). Microorganisms can accelerate the degradation, which decreases their persistence and effectiveness for soilborne pathogens (Warton *et al.*, 2003; Di Primo *et al.*, 2003). This phenomenon has been observed with metam sodium used for potato (*Solanum tuberosum*) *Verticillium* wilt (VW) (Di Primo *et al.*, 2003). When a soil develops increased biodegradation, fumigation requires several years before it can recover an effective biocidal effect (Warton *et al.*, 2003). In the meantime, the use of fumigants seems ineffective and wasteful (Matthiessen and Kirkegaard, 2006).

#### 1.1.3 Alternatives for managing soilborne diseases

The breakdown of resistance and the current context of agroecological transition have decreased the use of broad-spectrum fumigants (Warmington and Clarkson, 2016) and increased interest in alternative methods of crop protection (Martin, 2003). Reliance on combined and natural mechanisms to protect crops has been encouraged by Integrated Pest Management (IPM), as described in the EU Framework Directive 2009/128/EC. IPM is implemented through eight principles, and the first one is based on preventing and/or suppressing harmful organisms using a variety of methods, such as crop rotations. IPM favors the use of sustainable biological methods (Barzman *et al.*, 2015). Since isothiocyanates (ITCs) are biologically active compounds, and MITC is

widely used as a fumigant, there is interest in transposing this biocidal activity of biological sources of ITCs to suppress soilborne pathogens and diseases (Brown and Morra, 1997; Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Gimsing and Kirkegaard, 2006). This natural alternative to fumigation, called “biofumigation” (Kirkegaard *et al.*, 1993), involves growing, chopping and incorporating crops that produce ITCs. Brassicaceae (crucifers) are widely used for this technique (see part 2).

The utility of biofumigation has been observed for protecting vegetable crops (Michel, 2014; Morris *et al.*, 2020) and, to a lesser extent, wheat (*Triticum aestivum*, Kirkegaard *et al.*, 2000) and beetroot (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, Motisi *et al.*, 2009). Many studies of *in vitro* approaches have shown promising results of biofumigation for soilborne diseases. In the field, however, the effectiveness of biofumigation has varied more (Motisi *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2020). Nonetheless, mechanisms for suppressing pathogens effectively in the field are increasingly understood (Kirkegaard and Matthiessen, 2004; Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Morris *et al.*, 2020), and biofumigation appears to be an environmentally friendly defense strategy (Lazzeri *et al.*, 2004) considered as a part of IPM (Gimsing and Kirkegaard, 2009; Kruger *et al.*, 2013). Among oilseed crops, sunflower seems to be particularly suitable for protection using biofumigation. It is sown in spring, after a long fallow period when soils are usually left bare. A Brassicaceae cover crop introduced during this period would fit into the rotation easily, thus diversifying it. It would also improve:

- soil structure and reduce erosion (Thorup-Kristensen *et al.*, 2003; Justes *et al.*, 2012);
- nutrient management, through catch crop and green manure effects for nitrates and sulfates (Constantin *et al.*, 2011; Couëdel *et al.*, 2018a; Couëdel *et al.*, 2018b);
- soil organic matter (Kirkegaard and Matthiessen, 2004).

To follow the fundamental agroecological principle of diversifying crop rotations (Altieri, 1999), this review does not discuss rapeseed protection using Brassicaceae cover crops and biofumigation. However, it does present studies that used Brassicaceae as a biofumigant crop. Biotic stresses are not still a major issue for soybean in France (Lamichhane *et al.*, 2020) or in Europe. This is in part because soybean is currently grown on small areas and in diversified rotations (Lamichhane *et al.*, 2020). The interest in biofumigation to protect soybean remains low and studies rare. Thus, this review excludes soybean protection using biofumigation, although some studies showed promising results. Fayzalla *et al.* (2009) showed that soybean root rot and soybean wilt, caused by *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *M. phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*, could be reduced with mustard in field conditions.

With a focus on sunflower, the objectives of this review are to:

- highlight the main factors that determine effective biofumigation;
- review studies on laboratory or field experiments performed to evaluate suppressive effects of synthetic GSLs/ITCs or Brassicaceae incorporation on *V. dahliae*, *S. sclerotiorum* and *M. phaseolina*.

Since studies of sunflower protection using biofumigation are rare (to our knowledge), most studies concerned other plant hosts. Thus, after describing the biofumigation concept and process briefly, factors that drive ITC production are detailed to provide a set of mechanisms that results in effective biofumigation. Suppressing effects of glucosinolate (GSL) products on sunflower soilborne diseases are reviewed based on studies of a variety of host crops. Finally, non-GSL-related suppressive effects of biofumigation and the utility of including Fabaceae with Brassicaceae to protect sunflower against soilborne disease are also discussed.

## 2 The biofumigation process

### 2.1 Biofumigation concept and the use of Brassicaceae

Biofumigation is defined as the suppressive effect of GSL-containing species on soilborne pathogens through the liberation of volatile compounds, mainly ITCs, released after hydrolysis of GSLs by the enzyme myrosinase during tissue disruption and incorporation into the soil (Kirkegaard *et al.*, 1993; Kirkegaard and Matthiessen, 2004). GSLs occur naturally in families of the order Capparales: Tovariaceae, Resedaceae, Cappareaeae, Moringaceae and mainly Brassicaceae (Fenwick *et al.*, 1983; Brown and Morra, 1997; Van Dam *et al.*, 2009). They are widely cultivated as vegetables (cabbage [*B. oleracea* var. *capitata*], radish [*Raphanus raphanistrum* subsp. *sativus*], and rocket [*Eruca vesicaria* ssp. *sativa*]), condiments (mustard [*Brassica juncea*]), forage (fodder radish [*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*] and turnip rape [*Brassica rapa* subsp. *rapa*]), oilseed crops and cover crops during fallow periods. However, plants that contain GSLs can be used to control soilborne pathogens through biofumigation (Kirkegaard *et al.*, 1993; Brown and Morra, 1997; Matthiessen and Kirkegaard, 2006) and are considered to be a biological alternative to conventional soil fumigation (Brown and Morra, 1997; Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Laegdsmand *et al.*, 2007; Clarkson *et al.*, 2015). Bactericidal activity of ITCs has been reported (Brown and Morra, 1997; Smith and Kirkegaard, 2002; Bending and Lincoln, 2000), as have fungicidal (Angus *et al.*, 1994; Manici *et al.*, 2000; Smith and Kirkegaard, 2002), nematocidal (Lazzeri *et al.*, 1993; Riga, 2011; Ntalli and Caboni, 2017), insecticidal (Borek *et al.*, 1995a; Borek *et al.*, 1998) and herbicidal activities (Haramoto and Gallandt, 2004). Biofumigation can reduce pest abundance and disease incidence (Morris *et al.*, 2020), but its degree of pest suppression can vary significantly. Some studies concluded that biofumigation did not suppress soilborne pathogens (reviewed by Kirkegaard and Matthiessen, 2004; Motisi *et al.*, 2010). After rape incorporation, Davis *et al.* (1996) observed no significant differences in *V. dahliae* population in the soil compared to that without residue incorporation, while the incidence of VW on potato was reduced significantly compared to that on potato grown after a fallow period. VW can be caused by an interaction between *V. dahliae* and nematodes like *Pratylenchus penetrans* (Martin *et al.*, 1982; Rowe and Powelson 2002) or *Pratylenchus neglectus* (Scholte and s’Jacob, 1990) which may facilitate the penetration of *V. dahliae* in roots, but no information is available about the direct effect of residue

incorporation on *P. neglectus* in this study. However, no significant correlation has been found between VW symptoms or yield and the nematode. Hartz *et al.* (2005) also reported that biofumigation (with mustard) did not significantly reduce *V. dahliae* population in the soil or VW on tomato (*Solanum lycopersicum*). A review of Motisi *et al.* (2010) noted an increase in disease intensity after biofumigation for some pathogens. Moreover, some studies may not be published because they unexpectedly observe no significant effects of biofumigation (Morris *et al.*, 2020). This variability is due to the many biological and physical factors that influence the effectiveness of biofumigation (Motisi *et al.*, 2010). Thus, knowledge about GSL and ITC production, and a systematic approach to field research through analytical studies are needed (Kirkegaard and Matthiessen, 2004).

## 2.2 The GSL-myrosinase system

GSLs are organic anions characterized by a common  $\beta$ -thioglucose, a sulfonated oxime moiety and a side-chain group (Fenwick *et al.*, 1983). This side chain determines the type of GSL: aromatic, aliphatic or indolyl (Fenwick *et al.*, 1983; Brown and Morra, 1997; Mithen, 2001). To date, 132 GSLs have been identified in Brassicaceae tissues (Couëdel *et al.*, 2019). Native GSLs have little or no biocidal activity or toxicity (Manici *et al.*, 1997). Species that contain GSL produce myrosinase, a group of similar-acting enzymes (Brown and Morra, 1997) that are also produced by some microorganisms in soils (Gimsing and Kirkegaard, 2009). In intact plant tissues, GSLs and myrosinase are physically separated (Gimsing and Kirkegaard, 2009). The isolation seems to be intercellular (Brown and Morra, 1997), with GSLs in the vacuoles and myrosinase in specialized myrosin cells (Höglund *et al.*, 1992). Both compounds are distributed throughout Brassicaceae tissues (Wittstock and Gershenzon, 2002), and cells must be disrupted physically for them to contact each other (Brown and Morra, 1997). The result is rapid hydrolysis into biologically active products such as ITCs and other products of GSL degradation, such as nitriles, organic cyanides, oxazolidinethiones and ionic thiocyanates (Brown and Morra, 1997; Gardiner *et al.*, 1999). Mature tissues have less myrosinase activity (Iversen and Baggerud, 1980).

## 2.3 GSL-hydrolysis products and non-GSL products

The biocidal effect of the products of GSL hydrolysis is function of the chemical composition of the GSL side chain, their concentration, environmental conditions and the exposure time of the target organism (Fenwick *et al.*, 1983; Lazzeri *et al.*, 1993; Laegdsmand *et al.*, 2007; Gimsing and Kirkegaard, 2009). Each compound differs in its persistence in the soil, stability and toxicity (Borek *et al.*, 1995b; Manici *et al.*, 2000).

ITCs are produced rapidly after Brassicaceae tissues are disrupted (Morra and Kirkegaard, 2002). Their concentration in the soil peaks 30 min after incorporation and can be detected for up to 12 days (Gimsing and Kirkegaard, 2006). ITCs are highly volatile, and the shorter their side chain is, the more volatile they are (Brown and Morra, 1997). Due to their high

volatility, their toxicity is assumed to spread around the point of chopping (Angus *et al.*, 1994). Only aliphatic and aromatic GSLs produce ITCs (Matthiessen and Kirkegaard, 2006), and they are recognized as the most biologically active products of GSL hydrolysis, with broad-spectrum activity (Fenwick *et al.*, 1983; Brown and Morra, 1997; Matthiessen and Kirkegaard, 2006). ITCs are toxic because of their irreversible interaction with proteins, mainly nucleophilic reagents (Brown and Morra, 1997; Borek *et al.*, 1995a). The reaction damages the protein structure and functions of pest cells (Dufour *et al.*, 2015).

Despite the lower toxicity of the other products of GSL hydrolysis, they may also help control soilborne organisms and work synergistically with ITCs (Brown and Morra, 1997). Other non-GSL secondary metabolites, such as sulfur-containing organic compounds (*e.g.* sulfoxides, amino acids such as methionine and cysteine, sulfonium compounds) may also have toxic effects on soil organisms (Bending and Lincoln, 1999).

## 3 Increasing biofumigation effectiveness for sunflower production

With more than 350 genera (Beilstein *et al.*, 2006; Abideen *et al.*, 2013) and 3200 species (Abideen *et al.*, 2013), Brassicaceae present a wide scope for farmers to choose the most promising crops for effective biofumigation, based on their GSL concentrations and profiles, and biomass production (Sarwar *et al.*, 1998). Farmers can act at multiple levels to improve the biofumigation potential (Borek *et al.*, 1995b; Brown and Morra, 1997; Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Gimsing and Kirkegaard, 2009):

- choice of Brassicaceae species;
- amount and profile of GSLs produced by the crop;
- rate of GSL conversion into ITCs;
- persistence of biocidal compounds in the soil.

### 3.1 The choice of the biofumigant Brassicaceae species

Morris *et al.* (2020) emphasized that species in the genus *Eruca* and *Raphanus* had the highest biofumigation effectiveness. However, most studies about biofumigation concern brown, white or Ethiopian mustard and rape (rapeseed and forage rape) (Sarwar *et al.*, 1998; Kirkegaard and Matthiessen, 2004; Reau *et al.*, 2005; Clarkson *et al.*, 2015). Brown mustard has high concentrations of sinigrin GSL, which hydrolyzes into 2-propenyl-ITCs. Considered as a highly toxic ITC (Motisi, 2009), it may explain brown mustard's promising results for crop protection (see part 4). The utility of choosing forage rape cultivars as a biofumigant crop was demonstrated by Gardiner *et al.* (1999), who studied products of hydrolysis after incorporation of cv. Dwarf Essex. Plants were incorporated using a rototiller at the bud-to-early-flowering stage. The most abundant product of hydrolysis measured in the soil was the 2-phenylethyl-ITC (2-PE-ITC), obtained from the aromatic 2-phenylethyl-GSL (2-PE-GSL), the main GSL in the roots of both cultivars. Smith and Kirkegaard (2002) demonstrated the toxicity of this ITC to pests. Moreover, Larkin *et al.* (2010)

measured a lower VW incidence on potato after forage rape (cv. Dwarf Essex) incorporation as green manure compared to a continuous potato (non-rotation) control. However, farmers harvest rapeseed crops to produce oil, so destroying them at the flowering stage and/or incorporating them as a green manure seems unrealistic in the context of oilseed crop production. The advantage of rapeseed would rely more on an allelopathic effect during development, with continuous production of ITCs by its living roots (Rumberger and Marschner, 2003) or after harvest, during roots decomposition (Reau *et al.*, 2005), both of which would provide a source of biocidal compounds (mainly ITCs) against soilborne fungi. Rumberger and Marschner (2003) demonstrated this phenomenon, observing that live roots of canola cv. Monty (low root GSL) and cv. Rainbow (high root GSL) released 2-PE-ITC continuously into the rhizosphere, which affected soil microbial communities (bacteria and eukaryotes) without accumulating in the soil. Despite the interest in rape for its allelopathic and, to a lesser extent, biofumigant effects, the trend since the 1960s has been to select and breed varieties with lower GSL concentrations. Thus, “double-low” varieties (*i.e.* low in erucic acid and GSLs) have been introduced (Boag *et al.*, 1990). GSLs may be undesirable or even toxic to mammals (rats and roe deer) when GSL concentrations increase in rape tissues (Fenwick *et al.*, 1983; Boag *et al.*, 1990). It is possible, however, to breed canola with higher 2-PE-ITC concentration without affecting shoot or seed GSL concentrations (Potter *et al.*, 2000). Since the GSL concentration necessary to have a toxic effect on soilborne pathogens remains unknown, low-GSL cultivars may still have biocidal effects (Couëdel *et al.*, 2019). For example, Kirkegaard *et al.* (2000) found no significant difference in the decrease in inoculum survival of the fungus *G. graminis* var. *tritici* between canola with high (cv. Tamara and cv. Karoo) and low (cv. Oscar and cv. Monty) root GSL concentrations, even though the pairs of varieties produced different 2-PE-ITC concentrations. In a pot experiment, Michel *et al.* (2008) showed that the number of live MS of *V. dahliae* in soils after the low GSL canola (cv. Talent) were approximately 60 MS/g of soil, compared to that in an unamended control (approximately 90 MS/g of soil), but the differences were not significant. To our knowledge, no study has examined the potential of rapeseed to control soilborne diseases of sunflower in field (through biofumigation and/or allelopathic effects). Seassau *et al.* (2016) observed, *in vitro*, a significant reduction in the germination or the development of *V. dahliae* (strains from sunflower) exposed to rapeseed (cv. Mosa), selected for its low GSL concentration compared to the unamended control.

Although most studies have focused on Brassicaceae green manures for biofumigation, seed meals could be used as an alternative strategy (Mazzola *et al.*, 2001) since they have more biological activity than green manures. GSLs are concentrated in the seeds and retained in the meal after crushing (Borek and Morra 2005). Thus, seed meals can be a source of GSLs (Brown and Morra, 1997; Morra and Borek, 2010) that stimulate soil microbial communities and suppress soilborne pathogens (Mazzola *et al.*, 2017). This alternative, however, would be better suited for small areas of crops with high commercial value than large areas of sunflower because of the high cost of seed meals.

### 3.2 Increasing GSL concentrations and profiles

A positive relation exists between GSL concentrations in Brassicaceae tissues and their ability to suppress pests and diseases during biofumigation (Morris *et al.*, 2020). The concentration and the profiles of GSLs (aliphatic, aromatic and indolyl) vary among Brassicaceae species (Kirkegaard and Sarwar, 1998; Bellostas *et al.*, 2004; Bhandari *et al.*, 2015) and between their shoots and roots (Kirkegaard and Sarwar, 1998; Van Dam *et al.*, 2009; Bhandari *et al.*, 2015). Roots usually have higher GSL concentrations than shoots, even though roots have lower biomass than shoots (Gimsing and Kirkegaard, 2006; Van Dam *et al.*, 2009; Bhandari *et al.*, 2015). This difference may be explained by a higher pathogen pressure belowground than aboveground (Van Dam *et al.*, 2009; Bhandari *et al.*, 2015). Biotic stress, such as herbivore damage and pathogen infection, increases GSL concentrations in Brassicaceae tissues (Van Dam *et al.*, 2009). It is important that biotic stress does not decrease biomass production too much, however, because a positive relation exists between Brassicaceae biomass and its GSL concentrations (Kirkegaard and Sarwar, 1998). A large amount of biomass is thus required for effective biofumigation (Clarkson *et al.*, 2015). Morris *et al.* (2020) predicted that less than 0.53 t dry matter of biomass/ha would result in ineffective biofumigation. Thus, it is important that cover crops be established well to maximize their biomass. While application of fertilizers (nitrogen and sulfur) increases GSL concentrations (Booth *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2007), applying them to cover crops is neither recommended nor profitable.

The effectiveness of biofumigation also depends on the growth stage of the plant. During development of Brassicaceae, GSLs turn over or redistribute within its organs (Booth *et al.*, 1991). GSL concentration peaks at the early flowering stage in the whole plant, then it starts to decrease in shoots and roots and increase in the seeds, whose GSL concentration peaks at maturity (Booth *et al.*, 1991; Sarwar and Kirkegaard, 1998; Michel, 2008). Because seeds have much less biomass than shoots and roots, which decreases the amount of biomass available for biofumigation (Morris *et al.*, 2020), the optimal timing for biofumigation is at the maximum value of biomass × GSL concentration (Matthiessen and Kirkegaard, 2006). The recommended stage at which to destroy crops is thus flowering (Michel, 2008), which also has the advantage of avoiding seed-set.

### 3.3 Improving the conversion of GSLs into ITCs

For effective biofumigation, maximizing the hydrolysis reaction that converts GSLs into ITCs is crucial to generate high ITC concentration in the soil (Borek *et al.*, 1995b; Brown and Morra, 1997; Gimsing and Kirkegaard, 2009). Under laboratory conditions, Brassicaceae sometimes released only 19% of the total potential ITCs produced (Brown *et al.*, 1991). This conversion efficiency reached 62.5–100% for Brassicaceae seed meals in sterile sand (Neubauer *et al.*, 2015). In the field, the efficiency was estimated at 60% (Gimsing and Kirkegaard, 2006). The efficiency depends mainly on agronomic practices and soil and climate conditions. The stage of development of the Brassicaceae for biofumigation

must be considered, due to the decrease in myrosinase activity in mature tissues (Iversen and Baggerud, 1980). Brassicaceae tissues must be chopped finely to maximize contact between myrosinase and GSLs (Matthiessen and Kirkegaard, 2006). Thus, chopping at high speed and using hammers instead of blades is recommended (Matthiessen *et al.*, 2004; Michel, 2008). Dilution with large amounts of water is then crucial to ensure tissue maceration and soil moisture to hydrolyze GSLs into ITCs and other products (Matthiessen *et al.*, 2004; Michel, 2008; Gimsing and Kirkegaard, 2009). ITC concentration increased by up to 7–10-fold when 42 mm of water was added to a soil after biofumigation (Matthiessen *et al.*, 2004). However, Gimsing and Kirkegaard (2006) observed no difference after irrigating with 18 mm over 3 hours after biofumigation. Warmer temperatures also increase hydrolysis (Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Michel, 2008; Gimsing and Kirkegaard, 2009). Matthiessen and Shackleton (2005) observed that the biological activity of 2-PE-ITC was significantly lower at 5 °C than at 10–20 °C. Consequently, farmers should carefully choose the day on which to perform biofumigation. Days with temperatures above 10 °C and with rain forecast to fall within a few days could improve the conversion of GSLs into ITCs, which would favor effective biofumigation. In the soil, a pH around neutral results in ITC production, while acid pH favors nitrile production (Brown and Morra, 1997).

### 3.4 Maximize persistence of ITCs in the soil

Un-hydrolyzed GSLs and the ITCs produced persist in soils from a few days to a few weeks (Brown and Morra, 1997), with the concentrations of GSL and ITC peaking 30 min after Brassicaceae incorporation (Gimsing and Kirkegaard, 2006) to 30 hours (Gardiner *et al.*, 1999). Maximizing the persistence of ITCs is crucial to increase the duration of exposure of soilborne pathogens, which increases biofumigation effectiveness (Borek *et al.*, 1995b; Brown and Morra, 1997).

The main pathway of ITC losses is volatility (Brown and Morra, 1997). To decrease these losses, solarization is used with vegetable crops to trap volatile ITCs (Morris *et al.*, 2020). This technique consists of covering the soil with transparent polyethylene sheets (Katan, 1981), but it is impractical over larger areas, such as those of oilseed crops. Thus, rapid incorporation of the chopped Brassicaceae is highly recommended (Gimsing and Kirkegaard, 2006; Michel, 2008). Sorption on soil components is another pathway of ITC loss. For example, ITCs had lower toxicity in soils with high organic matter content (>1%) (Gimsing and Kirkegaard, 2009; Neubauer *et al.*, 2014), which suggests that ITCs reacted with organic matter's nucleophilic reagents. Soil pH and texture had little influence on ITC persistence in the soil (Brown and Morra, 1997), unlike heavy rainfall (70–90 mm), which could cause ITCs to leach, thus reducing their persistence (Laegdsmand *et al.*, 2007).

Microbial degradation is a key factor that influences ITC losses in the soils (Brown and Morra, 1997). Using an autoclaved soil in biofumigation experiments increased the stability of ITCs (Rumberger and Marschner, 2003). Farmers have little influence on this factor, but soils that have never been fumigated may not experience increased biodegradation

(Warton *et al.*, 2003). Because fumigation is used less often with oilseed crops than with vegetable crops, mainly because of the high cost of protecting large areas, soils of oilseed crops may not experience this increased biodegradation.

## 4 Suppressive effects of GSL products on the soilborne diseases of sunflower targeted

Under optimal conditions that maximize GSL concentrations, their conversion into ITCs and persistence in the soil, the effectiveness of biofumigation will depend greatly on the target species, since pathogens vary greatly in their sensitivity to ITCs (Brown and Morra, 1997; Smith and Kirkegaard, 2002). To assess the sensitivity of sunflower pathogens to biofumigation, this review focuses on laboratory or field experiments performed to evaluate suppressive effects of synthetic GSLs/ITCs or Brassicaceae incorporation on *V. dahliae*, *S. sclerotiorum* and *M. phaseolina* (Tab. 1). Since studies of sunflower protection using biofumigation are rare (to our knowledge), most studies concerned other plant hosts of these pathogens, mainly vegetable.

### 4.1 Experiment using synthetic ITCs/GSLs

*In vitro* studies of synthetic ITCs or synthetic GSL + myrosinase tested the sensitivity of pathogens and screened the most effective GSL profiles (Tab. 1, part a). Neubauer *et al.* (2014) tested five ITCs, all of which were lethal to *V. dahliae* MS. Aromatic ITCs (benzyl-ITC and phenylethyl-ITC obtained by Glucotropaeolin and Gluconasturtiin hydrolysis) were much more toxic than aliphatic ITCs. Among the same profiles of ITCs (aromatic or aliphatic), ITCs with lower molecular weight tended to be more effective than ITCs with higher molecular weight. To suppress *S. sclerotiorum*, aromatic ITCs were also more effective than aliphatic ITCs. Overall, benzyl-ITC was the most effective ITC against *S. sclerotiorum* mycelial development and sclerotia (Kurt *et al.*, 2011), while methyl-ITC and allyl-ITC were among the most effective ITCs at reducing mycelial growth (Kurt *et al.*, 2011; Ojaghian *et al.*, 2012). For *M. phaseolina*, mycelial development was also reduced by allyl-ITC (Mazzola *et al.*, 2017).

### 4.2 Experiments using Brassicaceae (*in vitro* or in pots)

To screen the potentially most effective varieties and/or species of Brassicaceae, and to assess effects of hydrolysis products of GSLs to manage soilborne fungi, experiments were performed using Brassicaceae biomass (*e.g.* crushed, ground, macerated) instead of synthetic compounds (Tab. 1, part b). To control *V. dahliae*, *S. sclerotiorum* and *M. phaseolina*, mustard varieties, especially *Brassica juncea* (brown/Indian mustard), were used mainly as a source of GSLs and ITCs in biofumigation studies. Mustard species often showed significant suppression of *V. dahliae* (Olivier *et al.*, 1999; Neubauer *et al.*, 2015; Seassau *et al.*, 2016), *S. sclerotiorum* (Ojaghian *et al.*, 2012; Rahimi *et al.*, 2014; Warmington and Clarkson, 2016) and *M. phaseolina* (Mazzola *et al.*, 2017). Some cultivars of turnip rape (*Brassica rapa*), forage radish

**Table 1.** Summary of the suppressive effects of GSLs/ITCs or Brassicaceae against three soilborne fungi of sunflower: *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Macrophomina phaseolina* using synthetic GSLs-/ITCs *in vitro* or in pot (a), Brassicaceae *in vitro* or in pot (b), Brassicaceae in greenhouse and in the field (c), and at the rotation scale (d). Target pathogen/plant: fungus studied and plant from which it was isolated (when mentioned); methods: GSLs/ITCs used or destruction/incorporation mechanisms of the Brassicaceae; Brassica species (cv./var.): the Brassicaceae and the cultivar or variety (when mentioned) used for biofumigation; crop to protect: the host plant; GSL/ITC measured: compounds in the Brassicaceae; 2-PE-ITC: 2-phenylethyl-isothiocyanate; a.o.t.: among other treatments; Br: Brassicaceae; M.p: *Macrophomina phaseolina*; MS: microsclerotia; NA: not available; NS: not significant; S.s: *Sclerotinia sclerotiorum*; UC: unamended/untreated control; V.d: *Verticillium dahliae*; VW: *Verticillium wilt*.

(a) <i>In vitro</i> or in pot experiments using synthetic ITCs/GSLs			
Target pathogen/plant	Methods	Main results	Reference
<i>V. dahliae</i> /strawberry	Soil infested with MS exposed to 3 aliphatic (methyl ITC, 2-propenyl ITC, 4-methylsulfinyl-3-butenyl-ITC) and 2 aromatics (benzyl-ITC, 2-PE ITC) <i>versus</i> UC	All ITCs suppressed MS Aromatic ITC were more toxic than aliphatic ITC	Neubauer <i>et al.</i> (2014)
<i>V. dahliae</i> /strawberry	22 natural soil and sterile quartz sand infested with MS exposed to 150 nmol/g of 2-propenyl-ITC <i>versus</i> UC	In sterilized soil: 100% of MS suppressed	Neubauer <i>et al.</i> (2014)
<i>S. sclerotiorum</i> /mustard and lupin	S.s and other pathogens exposed to different concentrations of 2-PE-ITC <i>versus</i> UC	In natural soil: 9% to 92% of MS suppressed S.s had among the lowest tolerance to 2-PE-ITC than other pathogens	Smith and Kirkegaard (2002)
<i>S. sclerotiorum</i> /potato	Mycelium exposed to different concentrations of pure-ITC (methyl, allyl and butyl-ITC) <i>versus</i> UC	Reduction of the mycelial growth 100% of inhibition at the highest concentration of methyl and allyl ITCs	Ojaghian <i>et al.</i> (2012)
<i>S. sclerotiorum</i> /various crops	S.s exposed to different concentrations of pure aliphatic ITC (methyl, allyl, butyl and ethyl) and aromatic (ethyl, phenyl, benzyl and 2-PE) <i>versus</i> UC	Methyl and benzyl-ITC reduced mycelial growth Benzyl-ITC reduced sclerotia viability All ITCs (except low concentration of phenyl and 2-PE) reduced the production of apothecial	Kurt <i>et al.</i> (2011)*
<i>S. sclerotiorum</i> /various crops	Infested soils transplanted with pepper seedlings exposed to synthetic ITCs (Kurt <i>et al.</i> , 2011*)	Allyl and 2-PE ITCs reduced the incidence of S.s on pepper by 76.7% and 70% at low concentration, respectively	Kurt <i>et al.</i> (2011)
<i>S. sclerotiorum</i> /NA	Sclerotia of S.c or other pathogens exposed to different concentrations of synthetic GSLs (2-propenyl, 2-hydro-3-butenyl, benzyl, and methylsulfinylalkyl)	GSLs inhibited S.s growth Methylsulfinylalkyl was the most effective	Manici <i>et al.</i> (1997)
(b) <i>In vitro</i> and pot experiment studies using Brassicaceae			
Target pathogen	Methods	Main results	Reference
<i>V. dahliae</i> /sunflower	Brassica species (cv./var.) Mycelium or MS exposed to shoots and roots of <i>B. juncea</i> (Etamine), <i>S. alba</i> (Abraham), <i>B. rapa</i> (Avalon), <i>B. napus</i> (Mosa), <i>R. sativus</i> (Anaconda)	GSL/ITC measured Main GSL measured in shoots and roots: <i>S. alba</i> -4-hydroxybenzyl, <i>B. napus</i> : 2-PE, <i>B. juncea</i> : 2-propenyl, <i>B. rapa</i> -4-pentyl, 2-PE and 1-methoxy-3-indolylmethyl NA	Seassau <i>et al.</i> (2016)
<i>V. dahliae</i> /eggplant and cotton	Mycelium exposed to powdered tissues of Br	Br reduced mycelial growth ( <i>B. juncea</i> , the most effective) and MS germination ( <i>B. rapa</i> , the most effective)	Fan <i>et al.</i> (2008)
<i>V. dahliae</i> /NA	Mycelium exposed to macerated leaf and stem of Br Br sampled at flowering <i>versus</i> UC	1 g of <i>B. oleracea</i> reduced mycelial growth by 68.7% Br reduced the radial growth of V.d and reached 100% for 19 cv. of <i>B. nigra</i> and 20 cv. of <i>B. juncea</i>	Olivier <i>et al.</i> (1999)
<i>V. dahliae</i> /strawberry	19 cv. of <i>B. juncea</i> , <i>R. sativus</i> and <i>S. alba</i>	Main ITC measured in shoots: allyl, 2-PE, benzyl, 3-butenyl Main GSLs measured in shoots: <i>B. juncea</i> :	Neubauer <i>et al.</i> (2014)

**Table 1.** (continued).

<i>V. dahliae</i> /strawberry	Sterile quartz sand infested with MS amended with freeze-dried ground Br sampled at mid-flowering or non-Br species <i>versus</i> UC MS exposed to seed meals of Br or autoclaved seed meals <i>versus</i> UC	16 cv. of <i>S. alba</i> , <i>B. carinata</i> , <i>B. juncea</i> , <i>B. napus</i>	2-propenyl, <i>S. alba</i> : benzyl, <i>R. sativus</i> : 4-methylthio-3-butenyl Main GSL/ITC measured in seeds: <i>S. alba</i> : 4-hydroxybenzyl, <i>B. napus</i> : 3-butenyl, 4-pentenyl, 2-PE <i>B. juncea</i> and <i>B. carinata</i> : 2-propenyl-GSL NA	Shoot of <i>B. juncea</i> was the most efficient to reduce viable MS (69.3 to 81.3%) than other Br or UC Seed meals of <i>B. juncea</i> and <i>B. carinata</i> reduced viable MS by 92.4 to 100%. NS effects of <i>S. alba</i> and <i>B. napus</i>	Neubauer <i>et al.</i> (2015)
<i>V. dahliae</i> /soils naturally infested	Infested soil amended with grinded shoots of Br sampled at flowering and soils heavily watered <i>versus</i> UC (a.o.t)	<i>B. juncea</i> (ISCI-99, ISCI-20–high GSL); <i>B. napus</i> (Talent – low GSL)	NA	Living MS were reduced by 66% with ISCI-99, 55% with ISCI-20. NS effect of Talent	Michel <i>et al.</i> (2008)
<i>S. sclerotiorum</i>	S.s exposed to powder of Br (shoot, root, seeds) dried, hydrolysed and freeze <i>versus</i> UC	<i>B. juncea</i> (Cutlass), <i>B. rapa</i> (Parkland, Echo), <i>B. napus</i> (Hyola401, RGS003)	Main ITC measured in shoots: <i>B. juncea</i> (Cutlass): allyl	<i>B. juncea</i> (Cutlass) was the most effective to inhibit radial growth	Rahimi <i>et al.</i> (2014)
<i>S. sclerotiorum</i> /potato	Mycelium and sclerotia exposed to macerated or irradiated dried tissues of Br (shoots and roots sampled at the 10-leaf stage) <i>versus</i> non-Br or UC	<i>B. napus</i> (Metah), <i>B. juncea</i> (Bresska), <i>B. campestris</i> (Orrega)	Main ITC measured: methyl, allyl, butyl	All Br reduced mycelial growth and sclerotia formation <i>B. juncea</i> was the most effective	Ojaghian <i>et al.</i> (2012)
<i>S. sclerotiorum</i> /oil rape	Mycelium exposed to powdered tissues of Br	<i>B. oleracea</i> (Caulorapa)	NA	1 g of <i>B. oleracea</i> reduced mycelial growth by ~20%	Fan <i>et al.</i> (2008)
<i>S. sclerotiorum</i> /lettuce	Mycelium and sclerotia exposed to a dry powder of Br sampled at flowering <i>versus</i> UC (a.o.t)	<i>B. juncea</i> (Vittaso, Pacific Gold, Caliente 99), <i>B. napus</i> (Temple – low GSL control), <i>E. sativa</i> (Nemat), <i>R. sativus</i> (Terranova), <i>S. alba</i> (Brisant), Biofence	Main GSLs measured: <i>B. juncea</i> : 2-propenyl, <i>S. alba</i> : 4-hydroxybenzyl, <i>R. sativus</i> : 4-methylsulfinyl-3-butenyl, <i>E. sativa</i> : 4-methylthiobutyl NA	All Br (especially <i>R. sativus</i> ) reduced germination of S.s <i>B. juncea</i> were the most effective to inhibit mycelial growth	Warrington and Clarkson (2016)
<i>M. phaseolina</i> /NA	Infested soil amended with mustard cake <i>versus</i> UC (a.o.t)	<i>B. juncea</i> (NA)	NA	Reduction of M.p by 100% after 30 days	Sharma <i>et al.</i> , 1995
<i>M. phaseolina</i>	Infested soil pasteurized or non-pasteurized amended with seed meals of Br <i>versus</i> UC	<i>B. juncea</i> (Pacific Gold), <i>B. napus</i> (Athena), <i>S. alba</i> (NA)	Main GSLs measured: <i>B. juncea</i> : 2-propenyl, <i>B. napus</i> : 3-butenyl, <i>S. alba</i> : 4-OH-benzyl	Non-pasteurized soils: inconsistent reduction of M.p density, reduction of roots infection of strawberry Pasteurized soils: M.p density increased	Mazzola <i>et al.</i> (2017)
(c) Field and greenhouse studies					
Target pathogen/Methods	Brassica species (cv./var.) <i>B. juncea</i> (Etamine), <i>R. sativus</i> (Sunflower (Athena)), <i>B. rapa</i> (Chicon)	Crop to protect (cv./var.) Sunflower (Kaplan)	GSL/ITC measured	Main results	Reference
<i>V. dahliae</i>	1 field/2 years: Br chopped at early flowering, incorporated and the soil was compacted <i>versus</i> bare soil (UC)	<i>B. juncea</i> (Pacific Gold), <i>B. napus</i> (Athena), <i>S. alba</i> (NA)	Measured in shoots and roots: overall during the 2 years: <i>B. juncea</i> : 2-propenyl, <i>R. sativus</i> : 4-methylthio-3-butenyl and 1-methoxy-3-butenyl and 1-methoxy-3-indolylmethyl, <i>B. rapa</i> : 2-hydro-3-butenyl and 1-methoxy-3-indolylmethyl	Br reduced VW severity both years <i>R. sativus</i> was the most effective (pers. comm.)	Galaup <i>et al.</i>
<i>V. dahliae</i>	1 greenhouse/1 year: soils infested with MS sampled from fields exposed to biofumigation <i>versus</i> sterile soils (UC)	<i>B. napus</i> (Dwarf Essex)	Eggplants (Imperial Black Beauty)	Br reduced eggplants biomass compared to UC	Pinkerton <i>et al.</i> (2000)

**Table 1.** (continued).

<i>V. dahliae</i>	<i>B. napus</i> (Dwarf Essex)	Norway Maple trees	NA	Br combined with solarization reduce VW severity compare to Br sole crop	Pinkerton <i>et al.</i> (2000)*
1 field/2 years: Br cut at ground level, chopped, spread and rotovated below 25 cm depth, irrigated (field capacity) compared to non-Br species and bare soil, all treatments were solarized or non-solarized (a.o.t)	<i>B. oleracea</i> (italica)	Cauliflower (White Rock)	NA	MS densities decreased after Br compared to initial densities (50 to 75% reduction) VW severity was lower after Br compared to UC	Subbarao <i>et al.</i> (1999)
1 field/2 years: broccoli residue chopped, incorporated, and disked <i>versus</i> UC (a.o.t)	<i>B. napus</i> (Humus), <i>B. juncea</i> (Pacific Gold), <i>S. alba</i> (Ida Gold, ISCI 20), Caliente	Tomato (Halley)	For above ground biomass during one year: <i>B. juncea</i> : 2-propenyl, <i>S. alba</i> : benzyl 4-hydroxybenzyl	The plant height, the number of harvestable heads and the weight of total harvest increased compared to UC	Hartz <i>et al.</i> (2005)
6 field trials/2 years: Br flail-mowed, incorporated both years and rolled; sprinkler-irrigated the second year compared to non-Br species and bare soil (UC) (a.o.t)( <i>B. juncea</i> × <i>S. alba</i> )	<i>B. juncea</i> (ISCI20)	Grafted eggplants (Prosperosa)	NA	NS suppressive effect on V.d in the soil Overall, no effect on tomato fruit productivity in the six field trials compared to bare soil	Garribaldi <i>et al.</i> (2009)
1 field/3 years: Br chopped at flowering and incorporated into the soil <i>versus</i> UC (a.o.t)	<i>B. oleracea</i> (Marine)	Artichoke (Blanca de Tudela)	NA	Partial results of biofumigation Biofumigation combined with grafting was more efficient MS densities remained low compared to UC (NS)	Berbegal <i>et al.</i> (2008)
2 fields/1 year: fresh cauliflower residues disk-incorporated twice below 25–30 cm depth and irrigated <i>versus</i> UC (a.o.t)	<i>B. oleracea</i> (Excelsior)	Potato (Russet Burbank)	NA	Inconsistent effects of Br residue on disease incidence, severity, and yield Br reduced V.d inoculum by 50% and VW by 69% at highest rate	Ochiai <i>et al.</i> (2007)
2 fields/2 years: Br compared to non-Br species and UC	<i>B. juncea</i> (ISCI-20)	Strawberry (Elsanta)	NA	NS effect on root infection and yield compared with UC	Michel <i>et al.</i> (2008)
1 field/1 year: Br incorporated at flowering with a rototiller (twice) compared to non-Br species and UC	<i>B. juncea</i> (ISCI-20)	Sweet pepper (Red beefhorn, Somborka)	NA	Reduction of MS by 19% compared with UC	Michel <i>et al.</i> (2008)
2 farms/1 year: Br finely mulched at flowering and incorporated with a rototiller <i>versus</i> UC (a.o.t)	<i>B. juncea</i> (ISCI-99 and Etamine)	Tomato (Admiró)	Methylsulfinylalkyl, benzyl, 2-propenyl, and 2-hydro-3-butenyl	Overall, reduction of MS in both farms (48% to 74%)	Michel (2014)
1 Greenhouse/1 year: dried Br sampled at full flowering, incorporated below 20 cm depth, irrigated (35 mm), compared to non-Br and UC (a.o.t)	Biofence	Tomato (Admiró)	NA	Short-term: NS effect on MS reduction Long-term: MS reduced by 80%	Michel (2014)
1 greenhouse/1 year: biofence expanded on soil surface (250 g/m <sup>2</sup> ), incorporated below 20 cm depth, irrigation (20 mm water + biofence flowable) 6 times, compared to non-Br and UC (a.o.t)	Biofence	Tomato (Admiró)	NA	NS effect of biofence and biofence FL	Michel (2014)

**Table 1.** (continued).

<i>M. phaseolina</i>	1 field/2 years: mustard oil cake amendment or mustard residues mixed (hand spade), incorporated below 30 cm depth, irrigated or not <i>versus</i> UC (a.o.t)	<i>B. juncea</i> (Pusa bold)	Cluster bean	NA	Reduction of M.p and dry root rot Mustard oil cake was more effective by 38% Lodha (2002) than mustard residues NS effect on strawberry plant biomass, total number of fruit produced and total fruit biomass Mazzola <i>et al.</i> (2017)	Mawar and Larkin <i>et al.</i> (2010)
<i>M. phaseolina</i>	1 field/2 years: Seed meal incorporated, and plots irrigated (surface saturation)	<i>B. juncea</i> (Pacific Gold), <i>B. alba</i> (Ida Gold)	Strawberry (Camarosa)	NA		
(d) Rotation scale studies						
Target pathogen	Methods	Brassica species (cv./var.)	Crop to protect	GSL/ITC measured	Main results	Reference
<i>V. dahliae</i>	10 years of 2-year rotation with potato—Br (1 × Br—1 × P) Br was either incorporated as green manure (Dwarf Essex) or harvested without incorporation (canola) compared to non-Br Crops and continuous potato (1 × P—1 × P)	<i>B. napus</i> (canola), <i>B. napus</i> (Dwarf Essex)	Potato (Russet Burbank)	NA	Overall, rapeseed reduced VW and canola had inconsistent effects Higher tuber yields after Canola (+6.8%) compared to continuous potato, and inconsistent effects of rapeseed Inconsistent effects of Br on V.d population in the soil Reduction in VW NS differences of the yield compared to bare soil (see Davis <i>et al.</i> , 1996)	Larkin <i>et al.</i> (2010)
<i>V. dahliae</i>	7 years with potato—Br rotation (3 × Br—2 × P—1 × Br—1 × P) Br was incorporated into the soil by disking or rotovating compared to non-Br species and barre soil	<i>B. napus</i> (Dwarf Essex and Bridger)	Potato (Russet Burbank)	NA		Davis <i>et al.</i> (2010)
<i>V. dahliae</i>	5 years with potato—Br rotation (3 × Br—2 × P) Br was incorporated into the soil by disking or rotovating compared to non-Br species and barre soil (UC)	<i>B. napus</i> (Dwarf Essex and Bridger)	Potato (Russet Burbank)	NA		Davis <i>et al.</i> (1996)
<i>V. dahliae</i>	2 fields with strawberry—Br rotation compared to non-Br rotation (a.o.t) Br was harvested and residues flailed shredded, air dried on the soil surface for 48 h and incorporated into the soil below 15–20 cm depth with a rototiller	<i>B. oleracea</i> (Marathon), <i>B. oleracea</i> (Oliver)	Strawberry (Selva)	NA	Reduction in VW Reduction of MS density (up to 83%), and VW severity in the rotation with Br Increase of strawberry growth	Subbarao <i>et al.</i> (2007)

(*Raphanus sativus*), Kohlrabi (*Brassica oleracea* cv. caulorapa) and *B. napus* were among the most effective species, but were more variable than *B. juncea*. In these studies, anti-fungal effects of ITCs and other products of GSL hydrolysis were assessed on mycelial growth and/or the long-term survival structures of the pathogens. Effectiveness of Brassicaceae varied among the forms of the pathogens. Seassau *et al.* (2016) showed that mycelial growth of *V. dahliae* isolated from sunflower was suppressed mainly by *B. juncea*, while MS germination was suppressed mainly by *B. rapa*. Since biofumigation occurs a few months before sunflower sowing, its suppressive effects would affect long-term survival structures of pathogens because of the low persistence of GSLs and ITCs.

### 4.3 Field approaches to biofumigation

*In vitro* and pot studies have shown promising biocidal effects on *V. dahliae*, *S. sclerotiorum* and *M. phaseolina*. In field conditions, however, results varied more among studies (Tab. 1, part c), due to the many factors that influence the effectiveness of biofumigation. The only study of sunflower crop protection reported a significant reduction in VW incidence and severity following three Brassicaceae cover crops and biofumigation compared to that with a bare soil (Galaup *et al.*, pers. comm.). In both years of its field experiment, *R. sativus* was the Brassicaceae that reduced VW incidence the most, followed by *B. rapa* and *B. juncea*. The ability of biofumigation with a given species to reduce VW varied between years due to differences in the biomass incorporated into the soil each year. The largest reduction in VW was associated with the largest biomass produced. In strawberry (*Fragaria × ananassa*) field experiments, Michel *et al.* (2008) observed a significant reduction of MS in soils after biofumigation with *B. juncea*. Conversely, Hartz *et al.* (2005) considered *B. juncea* an ineffective biofumigant: it did not decrease the density of *V. dahliae* in the soil and had no effect on tomato productivity compared to a fallow control. Michel (2014) observed no significant effects of *B. juncea* on *V. dahliae* density in the soil, in the short-term, but a reduction of 80% was observed a few months after biofumigation. Because of the low persistence of ITCs, they could not have caused this suppressive effect. Instead, the reduction in MS may have been caused by stimulation of specific groups of microbial communities during mustard decomposition and organic matter addition, as supported by other studies (Mazzola *et al.*, 2007; Ochiai *et al.*, 2008; Mazzola *et al.*, 2017). Thus, organic inputs could improve soil biological status by increasing both the diversity and size of populations of beneficial species through physico-chemical changes (Ochiai *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2010; Omirou *et al.*, 2011).

## 5 Non-GSL-related suppressive effects on pathogens, and the multifunctionality of Brassicaceae

Pathogen suppression by green manure addition has been attributed to indirect effects of higher microbial competition rather than a direct effect on pathogen inoculum (Davis *et al.*,

1996; Davis *et al.*, 2010). This involvement of microbial communities was supported by long-term studies at the rotation scale when Brassicaceae and non-Brassicaceae species were incorporated (Tab. 1, part d). Davis *et al.* (2010) observed that cover crops reduced VW on potatoes more than fallow did. Sudangrass (*Sorghum vulgare* var. sudanense cv. Monarch) was a more effective cover crop than *B. napus* cv. Dwarf Essex and cv. Bridger. The authors also suggested that another beneficial effect of sudangrass was the potential control of root knot nematodes. Larkin *et al.* (2010) also observed a significant reduction in VW on potato after a canola cover crop and to a lesser extent after a rapeseed cover crop. Davis *et al.* (2010) and Larkin *et al.* (2010) concluded that, beside the direct toxic effects of products of GSL hydrolysis, VW may have been suppressed due to a change in microbial communities that increased microbial competition after cover crop incorporation. The reduction in VW may be explained by the increase in *Fusarium equiseti* in the soil observed by Davis *et al.* (2010), which suggests a potential antagonism between the two fungi.

Increasingly, biofumigation benefits are considered along with other green manure benefits, such as addition of organic matter to soils (Kirkegaard and Matthiessen, 2004). This non-GSL-related pathway of suppression may be involved in reducing pathogens and disease severity in the studies that used low-GSL cultivars observed by Kirkegaard *et al.* (2000) and Michel *et al.* (2008). The potential key role of microbial communities in suppressing pathogens emphasizes the need to assess potential disservices of products of GSL hydrolysis on these beneficial communities. To date, these disservices and their influence have been rarely studied, and the review of Couëdel *et al.* (2019) reported inconsistent impacts of Brassicaceae on non-target species. No effect of Brassicaceae incorporation was observed on nitrifying bacteria in field studies (Omirou *et al.*, 2011). Conversely, Bending and Lincoln (2000) observed that application of ITCs disrupted microbial communities, reducing the growth of nitrifying bacteria in clay-loam soils. One mechanism to avoid these potential disservices could be cover crop mixtures (Couëdel *et al.*, 2019), which would provide more nutrients, and thus increase microbial diversity and activity, while preserving GSL production. Couëdel *et al.* (2018c) showed that, compared to Brassicaceae sole crops, 50/50 bi-species mixtures of Brassicaceae and Fabaceae reduced GSL production/ha by an average of only 19%. Mixtures would maintain most of the potential of Brassicaceae to suppress pathogens and could mutualize other benefits provided by either Brassicaceae or Fabaceae. Couëdel *et al.* (2018a) showed that this mixture captured the same amount of nitrate as Brassicaceae alone and had a larger nitrogen-green manure effect. This mixture also provided the same sulphate-catch crop and sulfur-green manure effects as Brassicaceae sole crops (Couëdel *et al.*, 2018b). This result could be due to increased biomass production and abiotic-resource-use efficiency (Jensen, 1996). Besides protecting against pathogens and nutrient enrichment, mixtures provide a bundle of ecosystem services. They reduce soil disturbance and erosion, maximize water-use efficiency, increase long-term carbon sequestration and support pollinators and other beneficial insects (Therond *et al.*, 2017; Justes and Richard, 2017; Chapagain *et al.*, 2020). Thus, mixtures of Brassicaceae and

Fabaceae could increase sunflower productivity. Combining cover cropping of mixtures with biofumigation represents a holistic multi-pest protection approach that relies on several ecological mechanisms, which is in line with the principles of IPM. Besides diversifying rotations (which may provide break-crop effects), encouraged by IPM Principle 1 (P1), it is a major environmentally friendly protection method (Lazzeri *et al.*, 2004). It may prevent reliance on the synthetic compounds used in fumigation (Clarkson *et al.*, 2015), and thus fulfill the principles of giving preference to non-chemical methods (P4), selecting pesticides to avoid undesired impacts of broad-spectrum fumigants on non-target beneficial communities (P5) and reducing pesticide use (P6). Some of biofumigation's ability to protect of sunflower would be due to the ITCs produced by Brassicaceae, and developing resistance to them is highly improbable because of the complex cluster of chemically different components involved (Ntalli and Caboni, 2017). Moreover, ITC toxicity varies among pests (Smith and Kirkegaard, 2002), which could allow for specific actions on targeted pests (P5). The potential increase in some antagonist fungi (*e.g.* *Fusarium* spp., as reported by Davis *et al.* (2010)) after incorporating cover crops represents another ecological mechanism to suppress soilborne pathogens (Médiène *et al.*, 2011), which could be enhanced by including Fabaceae in mixtures, because it could diversifies the tissues incorporated (Couédel *et al.*, 2019).

Some principles of IPM, however, could be difficult to implement for soilborne fungi of sunflower. Monitoring microscopic and heterogeneous pathogens such as *V. dahliae*, as recommended by P2, would be too expensive. Thus, it is challenging to determine thresholds for intervention (P3). Nevertheless, biofumigation could still help farmers reach the underlying objectives of IPM: minimize use of broad-spectrum biocides, environmental contamination, disruption of beneficial communities and development of resistance (Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Barzman *et al.*, 2015).

## 6 Conclusion

Soilborne diseases threaten sunflower productivity. VW, sclerotinia head and stalk rots, and charcoal rot have been expanding worldwide in the past several years or could be in the future. They are challenging to manage because of their ability to survive in the soil and the lack of sustainable effective control methods. Thus, biofumigation could be an interesting agroecological alternative for protecting sunflower, especially as a part of IPM. This review showed that multiple factors must be considered for effective biofumigation. For sunflower production, a biofumigant crop can be grown during the fallow period just before sunflower. Ideally, the Brassicaceae should be chopped at early flowering, temperatures of ca. 10 °C minimum and just before a rainy period, since high temperatures and soil water content increase the hydrolysis of GSLs into ITCs. Brassicaceae should be incorporated quickly into the soil after pulverization to reduce volatile losses.

For effective suppression by biofumigation, Brassicaceae with high GSL concentrations are recommended. The types of GSLs/ITCs produced by Brassicaceae are also important to consider, since the biocidal effect of GSLs depend on the target pathogen. According to the ITCs tested and the Brassicaceae

incorporated, long-term survival structures and mycelia of *V. dahliae*, *S. sclerotiorum* and *M. phaseolina* were susceptible most of the time.

While aromatic ITCs and mustards seem to be the most effective, an increasing number of studies emphasize non-GSL-related effects of Brassicaceae and non-Brassicaceae cover crops. Nutrient enrichment after incorporating cover crops has strong effects on microbial communities that may stimulate antagonist species of pathogens in the soil. These effects are supported by studies that show negative correlations between microbial activity/diversity and the incidence of symptoms. The potential key role of microbial communities in the suppressive effect of Brassicaceae incorporation could explain the positive results obtained with Brassicaceae with low GSL concentration, such as canola. This highlights the need to assess effects of Brassicaceae incorporation on beneficial communities precisely, since the results to date are scarce and inconsistent. Nonetheless, cover crop mixtures that include Fabaceae could be an interesting mechanism to avoid potential disservices to beneficial communities, while maintaining suppressive effects on target pathogens. Further research, including field experiments, are needed to confirm the benefits of these mixtures.

## References

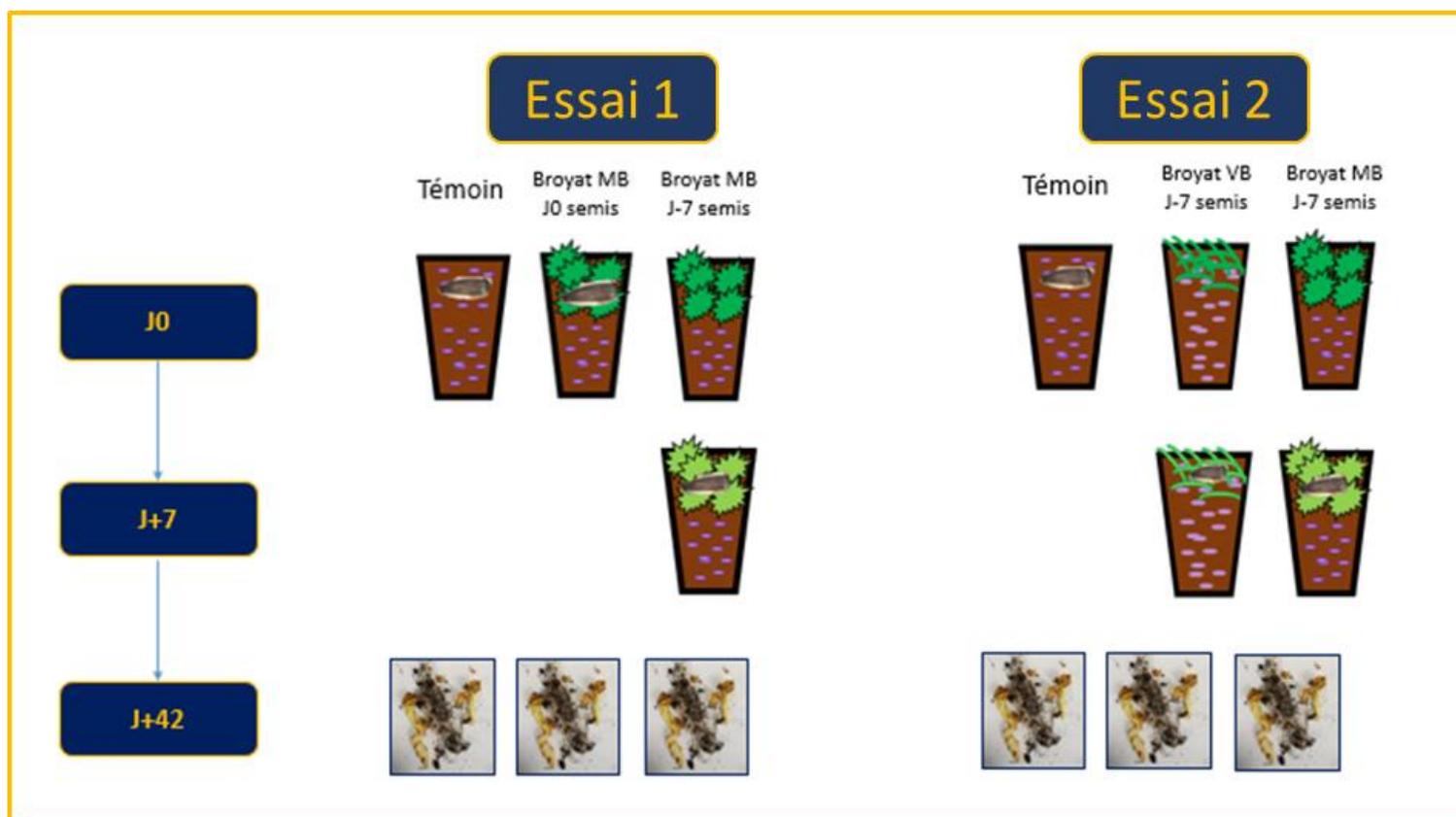
- Abideen SNU, Nadeem F, Abideen SA. 2013. Genetic variability and correlation studies in *Brassica napus* L. genotypes. *Int J Inn Appl St* 2(4): 574–581.
- Altieri MA. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ* 74: 19–31.
- Angus JF, Gardner PA, Kirkegaard JA, Desmarchelier JM. 1994. Biofumigation: isothiocyanates released from brassica roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant Soil* 162: 107–112.
- Barzman M, Bärberi P, Birch ANE, *et al.* 2015. Eight principles of integrated pest management. *Agron Sustain Dev* 35: 1199–1215.
- Beilstein MA, Al-Shehbaz IA, Kellogg EA. 2006. Brassicaceae phylogeny and trichome evolution. *Am J Bot* 93(4): 607–619.
- Bellostas N, Sørensen JC, Sørensen H. 2004. Qualitative and quantitative evaluation of glucosinolates in cruciferous plants during their life cycles. *Agroindustria* 3(3): 5–10.
- Bending GD, Lincoln SD. 1999. Characterisation of volatile sulphur-containing compounds produced during decomposition of *Brassica juncea* tissues in soil. *Soil Biol Biochem* 31(5): 695–703.
- Bending GD, Lincoln SD. 2000. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. *Soil Biol Biochem* 32(8–9): 1261–1269.
- Berbegal M, García-Jiménez J, Armengol J. 2008. Effect of cauliflower residue amendments and soil solarization on *Verticillium* wilt control in artichoke. *Plant Dis* 92(4): 595–600.
- Bhandari SR, Jo JS, Lee JG. 2015. Comparison of glucosinolate profiles in different tissues of nine *Brassica* crops. *Molecules* 20(9): 15827–15841.
- Boag B, Smith WM, Griffiths DW. 1990. Observations on the grazing of double low oilseed rape and other crops by roe deer. *Appl Anim Behav Sci* 28(3): 213–220.
- Booth EJ, Walker KC, Griffiths DW. 1991. A time-course study of the effect of sulphur on glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*) from the vegetative stage to maturity. *J Sci Food Agric* 56(4): 479–493.
- Borek V, Elbertson LR, McCaffrey JP, Morra MJ. 1995a. Toxicity of aliphatic and aromatic isothiocyanates to eggs of the black vine

- weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J Econ Entomol* 88(5): 1192–1196.
- Borek V, Morra MJ, Brown PD, McCaffrey JP. 1995b. Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitrile in soil. *J Agric Food Chem* 43(7): 1935–1940.
- Borek V, Elberson LR, McCaffrey JP, Morra MJ. 1998. Toxicity of isothiocyanates produced by glucosinolates in Brassicaceae species to black vine weevil eggs. *J Agric Food Chem* 46(12): 5318–5323.
- Borek V, Morra MJ. 2005. Ionic thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) production from 4-hydroxybenzyl glucosinolate contained in *Sinapis alba* seed meal. *J Agric Food Chem* 53(22): 8650–8654.
- Brown PD, Morra MJ, McCaffrey JP, Auld DL, Williams L. 1991. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. *J Chem Ecol* 17(10): 2021–2034.
- Brown PD, Morra MJ. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate containing plants. *Adv Agron* 61: 167–231.
- Chapagain T, Lee EA, Raizada MN. 2020. The potential of multi-species mixtures to diversify cover crop benefits. *Sustainability* 12(2058): 1–16.
- Clarkson J, Michel V, Neilson R. 2015. Mini-paper-Biofumigation for the control of soil-borne diseases. Available from [http://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/agri-eip/files/9\\_eip\\_sbd\\_mp\\_biofumigation\\_final\\_0.pdf](http://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/agri-eip/files/9_eip_sbd_mp_biofumigation_final_0.pdf).
- Constantin J, Beaudoin N, Laurent F, Cohan JP, Duyme F, Mary B. 2011. Cumulative effects of catch crops on nitrogen uptake, leaching and net mineralization. *Plant Soil* 341: 137–154.
- Ćosić J, Jurković D, Vrandečić K, Kaučić D. 2012. Survival of buried *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia in undisturbed soil. *Helia* 35(56): 73–78.
- Couédel A, Alletto L, Tribouillois H, Justes E. 2018a. Cover crop crucifer-legume mixtures provide effective nitrate catch crop and nitrogen green manure ecosystem services. *Agric Ecosyst Environ* 254: 50–59.
- Couédel A, Alletto L, Justes E. 2018b. Crucifer-legume cover crop mixtures provide effective sulphate catch crop and sulphur green manure services. *Plant Soil* 426(1–2): 61–76.
- Couédel A, Alletto L, Kirkegaard J, Justes E. 2018c. Crucifer glucosinolate production in legume-crucifer cover crop mixtures. *Eur J Agron* 96: 22–33.
- Couédel A, Kirkegaard J, Alletto L, Justes E. 2019. Crucifer-legume cover crop mixtures for biocontrol: toward a new multi-service paradigm. *Adv Agron* 157: 55–139.
- Davis JR, Huisman OC, Westermann DT, *et al.* 1996. Effects of green manures on *Verticillium* wilt of potato. *Phytopathology* 86(5): 444–453.
- Davis JR, Huisman OC, Everson DO, Nolte P, Sorensen LH, Schneider AT. 2010. Ecological relationships of *Verticillium* wilt suppression of potato by green manures. *Am J Potato Res* 87(4): 315–326.
- Debaeke P, Casadebaig P, Flenet F, Langlade N. 2017a. Sunflower crop and climate change: vulnerability, adaptation, and mitigation potential from case-studies in Europe. *OCL* 24(1): D102.
- Debaeke P, Bedoussac L, Bonnet C, *et al.* 2017b. Sunflower crop: environmental-friendly and agroecological. *OCL* 24(3): D304.
- Di Primo P, Gamliel A, Austerweil M, *et al.* 2003. Accelerated degradation of metam-sodium and dazomet in soil: characterization and consequences for pathogen control. *Crop Prot* 22(4): 635–646.
- Dufour V, Stahl M, Baysse C. 2015. The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology* 161(2): 229–243.
- Dungan RS, Gan J, Yates SR. 2003. Accelerated degradation of methyl isothiocyanate in soil. *Water Air Soil Poll* 142(1–4): 299–310.
- Duniway JM. 2002. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology* 92(12): 1337–1343.
- Fan CM, Xiong GR, Qi P, Ji GH, He YQ. 2008. Potential biofumigation effects of *Brassica oleracea* var. *caulorapa* on growth of fungi. *J Phytopathol* 156(6): 321–325.
- FAOSTAT. 2020. Available from <http://www.fao.org/faostat/fr> (last consult 30/06/2020).
- FAO. 2018. FAO food outlook July 2018. Available from <http://www.fao.org/3/ca0239en/CA0239EN.pdf> (last consult 30/06/2020).
- FAO. 2020. FAO food outlook June 2020. Available from <http://www.fao.org/3/ca9509en/ca9509en.pdf> (last consult 30/06/2020).
- Fayzalla EA, El-Barougy E, El-Rayes MM. 2009. Control of soil-borne pathogenic fungi of soybean by biofumigation with mustard seed meal. *J Appl Sci* 9(12): 2272–2279.
- Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ, VanEtten CH. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 18(2): 123–201.
- Gardiner JB, Morra MJ, Eberlein CV, Brown PD, Borek V. 1999. Allelochemicals released in soil following incorporation of rapeseed (*Brassica napus*) green manures. *J Agric Food Chem* 47(9): 3837–3842.
- Garibaldi A, Gilardi G, Clematis F, Gullino ML, Lazzeri L, Malaguti L. 2009. Effect of green *Brassica* manure and *Brassica* defatted seed meals in combination with grafting and soil solarization against *Verticillium* wilt of eggplant and *Fusarium* wilt of lettuce and basil. In: 7th International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfection, Leuven, Belgium, Sep. 13–18, 2009. Conference Proceedings, p. 295.
- Gimsing AL, Kirkegaard JA. 2006. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of *Brassica* biofumigants. *Soil Biol Biochem* 38(8): 2255–2264.
- Gimsing AL, Kirkegaard JA. 2009. Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochem Rev* 8: 299–310.
- Goldman GH, Hayes C, Harman GE. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends Biotechnol* 12(12): 478–482.
- Haramoto ER, Gallandt ER. 2004. *Brassica* cover cropping for weed management: a review. *Renew Agric Food Syst* 19(4): 187–198.
- Harris HC, McWilliams JR, Mason WK. 1978. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Aust J Agric Res* 29: 1203–1212.
- Hartz TK, Johnstone PR, Miyao EM, Davis RM. 2005. Mustard cover crops are ineffective in suppressing soilborne disease or improving processing tomato yield. *HortScience* 40(7): 2016–2019.
- Hoffmann GM, Malkomes HP. 1974. Bromide residues in vegetable crops after soil fumigation with methyl bromide. *Agric Environ* 1(3): 321–328.
- Höglund AS, Rödin J, Larsson E, Rask L. 1992. Distribution of napin and cruciferin in developing rape seed embryos. *Plant Physiol* 98(2): 509–515.
- Ibekwe AM. 2004. Effects of fumigants on non-target organisms in soils. *Adv Agron* 83: 2–37.
- Iversen TH, Baggerud C. 1980. Myrosinase activity in differentiated and undifferentiated plants of Brassicaceae. *Z Pflanzenphysiol* 97(5): 399–407.
- Jensen ES. 1996. Grain yield, symbiotic N<sub>2</sub> fixation and interspecific competition for inorganic N in pea-barley intercrops. *Plant Soil* 182(1): 25–38.
- Justes E, Richard G. 2017. Contexte, concepts et définition des cultures intermédiaires multi-services. *Innov Agron* 62: 1–15.
- Justes E, Beaudoin N, Bertuzzi P, *et al.* 2012. The use of cover crops to reduce nitrate leaching: effect on the water and nitrogen balance and other ecosystem services. Synopsis of the study report. France: INRA, 68 p.

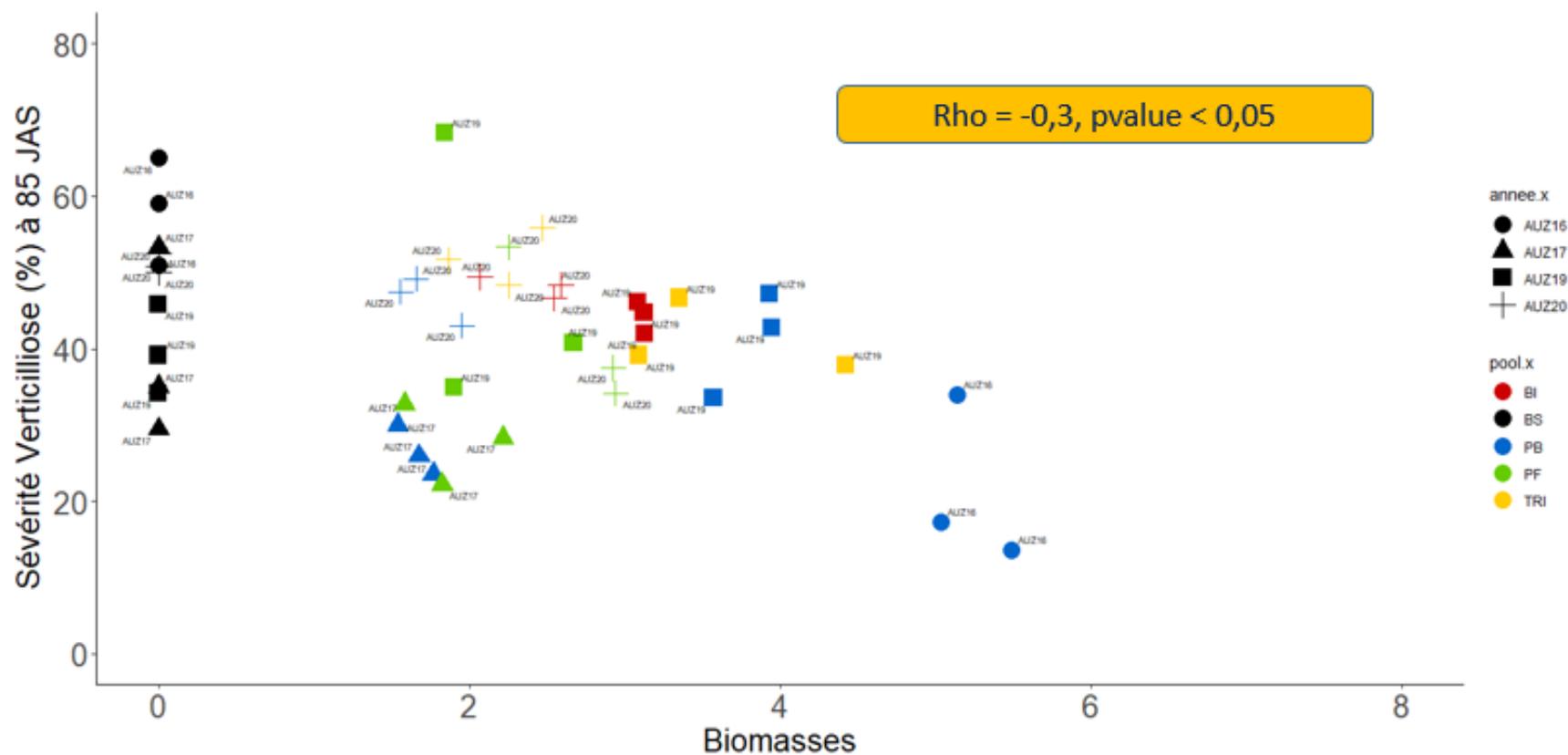
- Katan J. 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Annu Rev Phytopathol* 19(1): 211–236.
- Kirkegaard JA, Gardner PA, Desmarchelier JM, Angus JF. 1993. Biofumigation: using *Brassica* species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. In: 9th Australian Research Assembly on Brassicas, Wagga Wagga, Australia, Oct. 5–7, 1993. Conference Proceedings, p. 77.
- Kirkegaard JA, Sarwar M. 1998. Biofumigation potential of brassicas. I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant Soil* 201: 71–89.
- Kirkegaard JA, Sarwar M, Wong PTW, Mead A, Howe G, Newell M. 2000. Field studies on the biofumigation of take-all by *Brassica* break crops. *Aust J Agric Res* 51: 445–456.
- Kirkegaard JA, Matthiessen JN. 2004. Developing and refining the biofumigation concept. *Agroindustria* 3(3): 233–239.
- Kruger DHM, Fourie JC, Malan AP. 2013. Cover crops with biofumigation properties for the suppression of plant-parasitic nematodes: a review. *S Afr J Enol Vitic* 34(2): 287–295.
- Kurt S, Günes U, Soyulu EM. 2011. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of synthetic pure isothiocyanates against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pest Manag Sci* 67(7): 869–875.
- Laegdsmand M, Gimsing AL, Strobel BW, Sørensen JC, Jacobsen OH, Hansen HCB. 2007. Leaching of isothiocyanates through intact soil following simulated biofumigation. *Plant Soil* 291(1–2): 81–92.
- Lamichhane JR, Constantin J, Schoving C, *et al.* 2020. Analysis of soybean germination, emergence, and prediction of a possible northward establishment of the crop under climate change. *Eur J Agron* 113: 125972.
- Larkin RP, Griffin TS, Honeycutt CW. 2010. Rotation and cover crop effects on soilborne potato diseases, tuber yield, and soil microbial communities. *Plant Dis* 94(12): 1491–1502.
- Lazzeri L, Tacconi R, Palmieri S. 1993. *In vitro* activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. *J Agric Food Chem* 41(5): 825–829.
- Lazzeri L, Curto G, Leoni O, Dallavalle E. 2004. Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. *J Agric Food Chem* 52(22): 6703–6707.
- Li S, Schonhof I, Krumbein A, Li L, Stützel H, Schreiner M. 2007. Glucosinolate concentration in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapifera* L.) roots as affected by nitrogen and sulfur supply. *J Agric Food Chem* 55(21): 8452–8457.
- Macalady JL, Fuller ME, Scow KM. 1998. Effects of metam sodium fumigation on soil microbial activity and community structure. *J Environ Qual* 27(1): 54–63.
- Manici LM, Lazzeri L, Palmieri S. 1997. *In vitro* fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *J Agric Food Chem* 45(7): 2768–2773.
- Manici LM, Lazzeri L, Baruzzi G, Leoni O, Galletti S, Palmieri S. 2000. Suppressive activity of some glucosinolate enzyme degradation products on *Pythium irregulare* and *Rhizoctonia solani* in sterile soil. *Pest Manag Sci* 56(10): 921–926.
- Martin MJ, Riedel RM, Rowe RC. 1982. *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans*: interactions in the early dying complex of potato in Ohio. *Phytopathology* 72(6): 640–644.
- Martin FN. 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annu Rev Phytopathol* 41(1): 325–350.
- Martin-Sanz A, Rueda S, Garcia-Carneros AB, Molinero-Ruiz L. 2018. *Cadophora malorum*, a new threat for sunflower production in Russia and Ukraine. In: International Symposium, Sunflower and Climate Change, Toulouse, France, Feb. 5–6, 2018. Conference Proceedings, p. 52.
- Matthiessen JN, Warton B, Shackleton MA. 2004. The importance of plant maceration and water addition in achieving high *Brassica*-derived isothiocyanate levels in soil. *Agroindustria* 3(3): 277–281.
- Matthiessen JN, Shackleton MA. 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. *Pest Manag Sci* 61(11): 1043–1051.
- Matthiessen JN, Kirkegaard J. 2006. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Crit Rev Plant Sci* 25: 235–265.
- Mawar R, Lodha S. 2002. Brassica amendments and summer irrigation for the control of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* in hot arid region. *Phytopathol Mediterr* 41(1): 45–54.
- Mazzola M, Granatstein DM, Elfving DC, Mullinix K. 2001. Suppression of specific apple root pathogens by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content. *Phytopathology* 91(7): 673–679.
- Mazzola M, Brown J, Izzo AD, Cohen MF. 2007. Mechanism of action and efficacy of seed meal-induced pathogen suppression differ in a Brassicaceae species and time-dependent manner. *Phytopathology* 97(4): 454–460.
- Mazzola M, Agostini A, Cohen MF. 2017. Incorporation of *Brassica* seed meal soil amendment and wheat cultivation for control of *Macrophomina phaseolina* in strawberry. *Eur J Plant Pathol* 149(1): 57–71.
- Médiène S, Valantin-Morison M, Sarthou JP, *et al.* 2011. Agroecosystem management and biotic interactions: a review. *Agron Sustain Dev* 31(3): 491–514.
- Michel VV. 2008. Biofumigation – principe et application. *Rev Suisse Vitic Arboric Hortic* 40(2): 95–99.
- Michel VV, Dahal-Tscherrig S, Ahmed H, Dutheil A. 2008. Biofumigation to control *Verticillium* wilt of strawberry: potency and pitfalls. In: Workshop on Integrated Soft Fruit Production, East Malling, United Kingdom, Sep. 24–27, 2007. Conference Proceedings, p. 169.
- Michel VV. 2014. Ten years of biofumigation research in Switzerland. *Asp Appl Biol* 126: 33–42.
- Mithen R. 2001. Glucosinolates – biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regul* 34(1): 91–103.
- Mol L, Scholte K, Vos J. 1995. Effects of crop rotation and removal of crop debris on the soil population of two isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathol* 44(6): 1070–1074.
- Molinero-Ruiz L. 2019. Recent advances on the characterization and control of sunflower soilborne pathogens under climate change conditions. *OCL* 26: 2.
- Morra MJ, Kirkegaard JA. 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. *Soil Biol Biochem* 34(11): 1683–1690.
- Morra MJ, Borek V. 2010. Glucosinolate preservation in stored Brassicaceae seed meals. *J Stored Prod Res* 46(2): 98–102.
- Morris EK, Fletcher R, Veresoglou SD. 2020. Effective methods of biofumigation: a meta-analysis. *Plant Soil* 446(1): 379–392.
- Motisi N. 2009. Réguler les maladies d'origine tellurique par une culture intermédiaire de Brassicacées : mécanismes d'action et conditions d'expression dans une rotation betterave-blé. Thèse de doctorant. Agrocampus Ouest, Université européenne de Bretagne.
- Motisi N, Montfort F, Faloya V, Lucas P, Doré T. 2009. Growing *Brassica juncea* as a cover crop, then incorporating its residues provide complementary control of *Rhizoctonia* root rot of sugar beet. *Field Crop Res* 113: 238–245.

- Motisi N, Doré T, Lucas P, Montfort F. 2010. Dealing with the variability in biofumigation efficacy through an epidemiological framework. *Soil Biol Biochem* 42, 2044–2057.
- Neubauer C, Heitmann B, Müller C. 2014. Biofumigation potential of Brassicaceae cultivars to *Verticillium dahliae*. *Eur J Plant Pathol* 140(2): 341–352.
- Neubauer C, Hüntemann K, Heitmann B, Müller C. 2015. Suppression of *Verticillium dahliae* by glucosinolate-containing seed meal amendments. *Eur J Plant Pathol* 142(2): 239–249.
- Ntalli N, Caboni P. 2017. A review of isothiocyanates biofumigation activity on plant parasitic nematodes. *Phytochem Rev* 16(5): 827–834.
- Ochiai N, Powelson ML, Dick RP, Crowe FJ. 2007. Effects of green manure type and amendment rate on *Verticillium* wilt severity and yield of Russet Burbank potato. *Plant Dis* 91(4): 400–406.
- Ochiai N, Powelson ML, Crowe FJ, Dick RP. 2008. Green manure effects on soil quality in relation to suppression of *Verticillium* wilt of potatoes. *Biol Fert Soils* 44(8): 1013–1023.
- Ojaghian MR, Jiang H, Xie GL, Cui ZQ, Zhang J, Li B. 2012. *In vitro* biofumigation of Brassica tissues against potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol J* 28(2): 185–190.
- Olivier C, Vaughn SF, Mizubuti ES, Loria R. 1999. Variation in allyl isothiocyanate production within *Brassica* species and correlation with fungicidal activity. *J Chem Ecol* 25(12): 2687–2701.
- Omirou M, Rousidou C, Bekris F, *et al.* 2011. The impact of biofumigation and chemical fumigation methods on the structure and function of the soil microbial community. *Microb Ecol* 61(1): 201–213.
- Pinkerton JN, Ivors KL, Miller ML, Moore LW. 2000. Effect of soil solarization and cover crops on populations of selected soilborne plant pathogens in western Oregon. *Plant Dis* 84(9): 952–960.
- Potter MJ, Vanstone VA, Davies KA, Rathjen AJ. 2000. Breeding to increase the concentration of 2-phenylethyl glucosinolate in the roots of *Brassica napus*. *J Chem Ecol* 26(8): 1811–1820.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënnel-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321(1–2): 341–361.
- Rahimi F, Rahmanpour S, Rezaee S, Larijani K. 2014. Effect of volatiles derived from *Brassica* plants on the growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Arch Phytopathol Pfl* 47(1): 15–28.
- Reau R, Bodet JM, Bordes JP, *et al.* 2005. Effets allélopathiques des Brassicacées *via* leurs actions sur les agents pathogènes telluriques et les mycorhizes : analyse bibliographique. *Parite* 1. *OCL* 12(3): 261–271.
- Riga E. 2011. The effects of *Brassica* green manures on plant parasitic and free living nematodes used in combination with reduced rates of synthetic nematicides. *J Nematol* 43(2): 119–121.
- Rowe RC, Powelson ML. 2002. Potato early dying: management challenges in a changing production environment. *Plant Dis* 86(11): 1184–1193.
- Rumberger A, Marschner P. 2003. 2-phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biol Biochem* 35(3): 445–452.
- Šárová J, Kudlikova I, Zalud Z, Veverka K. 2003. *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid moving north temperature adaptation or change in climate? *J Plant Dis Prot* 110: 444–448.
- Sarwar M, Kirkegaard JA. 1998. Biofumigation potential of brassicas: II. Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. *Plant Soil* 201(1): 91–101.
- Scholte K, s'Jacob JJ. 1990. Effect of crop rotation, cultivar and nematicide on growth and yield of potato (*Solanum tuberosum* L.) in short rotations on a marine clay soil. *Potato Res* 33(2): 191–200.
- Sarwar M, Kirkegaard JA, Wong PTW, Desmarchelier JM. 1998. Biofumigation potential of brassicas, III *In vitro* toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant Soil* 201: 103–112.
- Seassau C. 2010. Étiologie du syndrome de dessèchement précoce du tournesol : implication de *Phoma macdonaldii* et interaction avec la conduite de culture. Thèse de doctorat. INP Toulouse.
- Seassau C, Desserre D, Desplanques J, Mestries E, Dechamp-Guillaume G, Alletto L. 2016. Control of *Verticillium dahliae* causing sunflower wilt using Brassica cover crops. In: 19th International Sunflower Conference, Edirne, Turkey, Jun. 1–3, 2016. Conference Proceedings, p. 718.
- Sharma SK, Aggarwal RK, Lodha S. 1995. Population changes of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* in oil-cake and crop residue-amended sandy soils. *Appl Soil Ecol* 2(4): 281–284.
- Smith BJ, Kirkegaard JA. 2002. *In vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathol* 51(5): 585–593.
- Subbarao KV, Hubbard JC, Koike ST. 1999. Evaluation of broccoli residue incorporation into field soil for *Verticillium* wilt control in cauliflower. *Plant Dis* 83(2): 124–129.
- Subbarao KV, Kabir Z, Martin FN, Koike ST. 2007. Management of soilborne diseases in strawberry using vegetable rotations. *Plant Dis* 91(8): 964–972.
- Therond O, Tichit M, Tibi A, *et al.* 2017. Volet « écosystèmes agricoles » de l'évaluation française des écosystèmes et des services écosystémiques. Rapport d'étude. France: INRA, 966 p.
- Thorup-Kristensen K, Magid J, Jensen LS. 2003. Catch crops and green manures as biological tools in nitrogen management in temperate zones. *Adv Agron* 79: 227–302.
- Van Dam NM, Tytgat TO, Kirkegaard JA. 2009. Root and shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. *Phytochem Rev* 8(1): 171–186.
- Vear F. 2016. Changes in sunflower breeding over the last fifty years. *OCL* 23(2): D202.
- Warmington R, Clarkson JP. 2016. Volatiles from biofumigant plants have a direct effect on carpogenic germination of sclerotia and mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Soil* 401(1–2): 213–229.
- Warton B, Matthiessen JN, Shackleton MA. 2003. Cross-enhancement: enhanced biodegradation of isothiocyanates in soils previously treated with metham sodium. *Soil Biol Biochem* 35(8): 1123–1127.
- Watanabe T. 1973. Survivability of *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby in naturally-infested soils and longevity of the sclerotia formed *in vitro*. *Jpn J Phytopathol* 39(4): 333–337.
- Wilhem S. 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* 45: 180–181.
- Wittstock U, Gershenzon J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr Opin Plant Biol* 5(4): 300–307.

Annexe III – Description schématique de la temporalité des deux essais menés afin d'évaluer les effets des broyats de moutarde brune et de vesce du Bengale sur les fixations de *O. cumana* par un dispositif en plaques de cultures incubées en chambre de culture. Lors de l'essai 1, les facteurs étudiés étaient le traitement broyat : Présence de moutarde brune ou absence (traitement témoin) et la date de semis (le jour de l'incorporation des broyats ou 7 jours après l'incorporation des broyats). Lors de l'essai 2, seul le facteur « broyat » est évalué avec comme modalités : Témoin sans broyat, moutarde brune et vesce du Bengale. Les observations sont réalisées environs un mois après le démarrage de l'essai. Les abréviations MB et VB correspondent respectivement à Moutarde Brune et Vesce du Bengale.

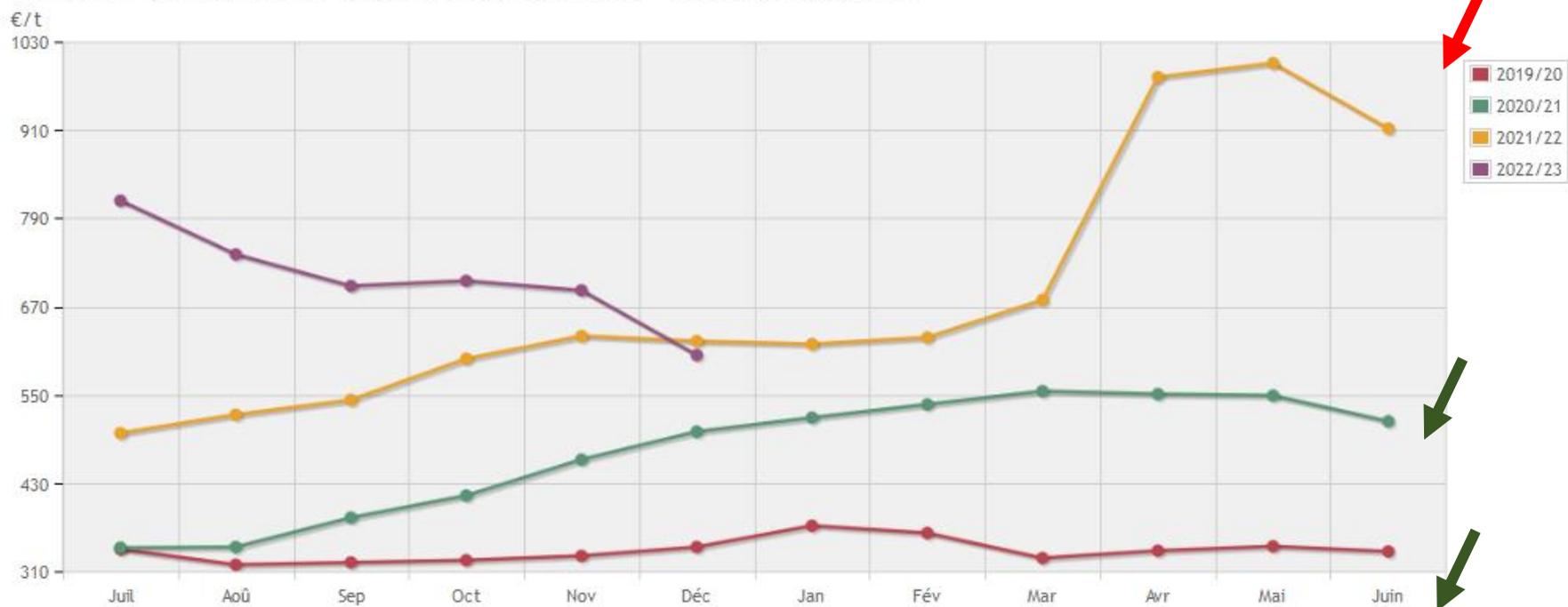


Annexe IV – Indice de sévérité de la Verticilliose (%) mesuré à 85 jours après semis en fonction des biomasses produites selon le précédent cultural à l'échelle de la composition (témoin sol nu, Brassicacées, Fabacées, associations bispécifiques ou trispécifique des deux familles botaniques). Les données ont été recueillies durant 4 ans, au sein des 4 dispositifs à Auzeville AUZ16, AUZ17, AUZ19 et AUZ20. Les abréviations AUZ, BI, BS, PB, PF, Rho et TRI correspondent à Auzeville, bispécifique, « bare soil » (sol nu), Brassicacées en pures, Fabacées en pures, le symbole conventionnel de la corrélation de Spearman et trispécifique.



Annexe V – Cotations du marché du tournesol (prix en euros) en fonction des mois, pour les 4 dernières années (2019 à 2022). La flèche rouge permettent de signaler la cotation exceptionnelle et conjoncturelle rencontrée pendant la rédaction du manuscrit et utilisée pour les calculs de marge réalisée dans la discussion du manuscrit. Les flèches vertes indiquent un exemple de cotation plus habituelle, qui a également été utilisée pour les calculs. Source des données : [www.agro.basf.fr](http://www.agro.basf.fr) - Cours et marchés du tournesol

Evolution pluriannuelle du cours du tournesol - Rendu St Nazaire



## Références bibliographiques du manuscrit

- Abideen, S.N.U., Nadeem, F., Abideen, S.A., 2013. Genetic Variability and Correlation Studies in *Brassica napus* L. Genotypes 2, 1-8.
- Adeux, G., Cordeau, S., Antichi, D., Carlesi, S., Mazzoncini, M., Munier-Jolain, N., Bàrberi, P., 2021. Cover crops promote crop productivity but do not enhance weed management in tillage-based cropping systems. *European Journal of Agronomy* 123, 126221. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126221>
- Agreste, 2019. Pratiques culturales en grandes cultures 2017, 30.
- Agridea, 2007. Agridea - Tournesol.
- Ahrens, W.H., Cox, D.J., Budhwar, G., 1990. Use of the Arcsine and Square Root Transformations for Subjectively Determined Percentage Data. *Weed sciences* 38, 452–458. <https://doi.org/10.1017/S0043174500056824>
- Ait Kaci Ahmed, N., Galaup, B., Desplanques, J., Dechamp-Guillaume, G., Seassau, C., 2022. Ecosystem Services Provided by Cover Crops and Biofumigation in Sunflower Cultivation. *Agronomy* 12, 120. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010120>
- Ait-Kaci Ahmed, N., Dechamp-Guillaume, G., Seassau, C., 2020. Biofumigation to protect oilseed crops: focus on management of soilborne fungi of sunflower. *OCL* 27, 59. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020052>
- Alabouvette, C., Marty, J. R., 1977. Influence des conditions climatiques et culturales sur l'expression de quelques maladies du Tournesol. *Annales de Phytopathologie* 9, 487-493.
- Alberio, C., Izquierdo, N.G., Aguirrezábal, L.A.N., 2015. Sunflower Crop Physiology and Agronomy, in: *Sunflower*. Elsevier, pp. 53–91. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50009-X>
- Aly, R., Goldwasser, Y., Eizenberg, H., Hershenhorn, J., Golan, S., Kleifeld, Y., 2001. Broomrape (*Orobancha cumana*) Control in Sunflower (*Helianthus annuus*) with Imazapic. *Weed Technology* 15, 306–309.
- Angus, J.F., Gardner, P.A., Kirkegaard, J.A., Desmarchelier, J.M., 1994a. Biofumigation: Isothiocyanates released from brassica roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil* 162, 107–112. <https://doi.org/10.1007/BF01416095>
- Antonova, T.S., Araslanova, N.M., Strelnikov, E.A., Ramazanova, S.A., Guchetl, S.Z., Chelyustnikova, T.A., 2013. Distribution of highly virulent races of sunflower broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in the southern regions of the Russian Federation. *Russian Agricultural Sciences*, 39, 46–50. <https://doi.org/10.3103/S1068367413010023>
- ARVALIS, 2011. Cultures intermédiaires : impacts et conduite. Editions Arvalis, 236 pp.
- Aubertot, J.-N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Grill, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., 2011. Pesticides, agriculture et environnement. Expertise scientifique collective INRA - Cemagref. Editions Quæ. 68p. <https://doi.org/10.3917/quae.exper.2011.01>
- Auger, B., Pouvreau, J.-B., Pouponneau, K., Yoneyama, Kaori, Montiel, G., Le Bizec, B., Yoneyama, Koichi, Delavault, P., Delourme, R., Simier, P., 2012. Germination Stimulants of *Phelipanche ramosa* in the Rhizosphere of *Brassica napus* Are Derived from the Glucosinolate Pathway. *MPMI* 25, 993–1004. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-12-0006-R>

- Beilstein, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Kellogg, E.A., 2006. Brassicaceae phylogeny and trichome evolution. *American Journal of Botany* 93, 607–619.  
<https://doi.org/10.3732/ajb.93.4.607>
- Bending, G.D., Lincoln, S.D., 2000. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1261–1269. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00043-2)
- Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., Bianciotto, V., 2016. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. *Frontiers in Microbiology*. 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01559>
- Bhandari, S., Jo, J., Lee, J., 2015. Comparison of Glucosinolate Profiles in Different Tissues of Nine Brassica Crops. *Molecules* 20, 15827–15841.  
<https://doi.org/10.3390/molecules200915827>
- Bhat, R.G., Subbarao, K.V., 1999. Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89, 1218–1225. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.12.1218>
- Blanco-Canqui, H., Ruis, S.J., 2020. Cover crop impacts on soil physical properties: A review. *Soil Science Society of America Journal* 84, 1527–1576.
- Blanco-Canqui, H., Shaver, T.M., Lindquist, J.L., Shapiro, C.A., Elmore, R.W., Francis, C.A., Hergert, G.W., 2015. Cover Crops and Ecosystem Services: Insights from Studies in Temperate Soils. *Agronomy Journal* 107, 2449–2474.  
<https://doi.org/10.2134/agronj15.0086>
- Bonciu, E., Pandia, O., Olaru, A.L., Saracin, I., Rosculete, E., 2020. Some aspects regarding the genetic and biotechnological progress of the *Helianthus annuus* L. 20, 1-6.
- Bonnet, C., Gaudio, N., Alletto, L., Raffaillac, D., Bergez, J.-E., Debaeke, P., Gavaland, A., Willaume, M., Bedoussac, L., Justes, E., 2021. Design and multicriteria assessment of low-input cropping systems based on plant diversification in southwestern France. *Agronomy for Sustainable Development*. 41, 65. 1-19.  
<https://doi.org/10.1007/s13593-021-00719-7>
- Booth, E.J., Walker, K.C., Griffiths, D.W., 1991. A time-course study of the effect of sulphur on glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*) from the vegetative stage to maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 56, 479–493.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740560408>
- Borek, V., Elberson, L.R., McCaffrey, J.P., Morra, M.J., 1995. Toxicity of Aliphatic and Aromatic Isothiocyanates to Eggs of the Black Vine Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 88, 1192–1196.  
<https://doi.org/10.1093/jee/88.5.1192>
- Bressan, M., Blum, A., Castel, L., Trinsoutrot-Gattin, I., Laval, K., Gangneux, C., 2016. Assessment of *Verticillium flax* inoculum in agroecosystem soils using real-time PCR assay. *Applied Soil Ecology* 108, 176–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.010>
- Bressan, M., Roncato, M.-A., Bellvert, F., Comte, G., Haichar, F. el Z., Achouak, W., Berge, O., 2009. Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. *ISME J* 3, 1243–1257.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2009.68>
- Brown, P.D., Morra, M., 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Advances in Agronomy*, 61, 65p.
- Brundrett, M.C., 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting

- information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320, 37–77.  
<https://doi.org/10.1007/s11104-008-9877-9>
- BSV, 2021. Analyse de risque élaborée à l'échelle des territoires aquitaine et ouest occitanie. N°33 – 8 juillet 2021. Edition ouest Occitanie. 4p.
- Cabelguenne, M., Debaeke, P., 1998. Experimental determination and modelling of the soil water extraction capacities of crops of maize, sunflower, soya bean, sorghum and wheat, *Plant and Soil* 202, 175-192.
- Campbell, C.L., Madden, L.V., 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons, New York, 532p.
- Cantor, A., Hale, A., Aaron, J., Traw, M.B., Kalisz, S., 2011. Low allelochemical concentrations detected in garlic mustard-invaded forest soils inhibit fungal growth and AMF spore germination. *Biological Invasions* 13, 3015–3025. <https://doi.org/10.1007/s10530-011-9986-x>
- Castro-Torres, I.G., De la O-Arciniega, M., Gallegos-Estudillo, J., Naranjo-Rodríguez, E.B., Domínguez-Ortiz, M.Á., 2014. *Raphanus sativus* L. var *niger* as a source of Phytochemicals for the Prevention of Cholesterol Gallstones: Phytochemicals in black radish for the prevention of gallstones. *Phytotherapy Research* 28, 167–171.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.4964>
- Champolivier, Debaeke, P., Merrien, 2011. Pourquoi irriguer le tournesol, une culture réputée tolérante à la sécheresse ? *Innovations Agronomiques* 14, 151-164.
- Chhajed, S., Mostafa, I., He, Y., Abou-Hashem, M., El-Domiaty, M., Chen, S., 2020. Glucosinolate Biosynthesis and the Glucosinolate–Myrosinase System in Plant Defense. *Agronomy* 10, 1-25. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111786>
- Cimmino, A., Masi, M., Rubiales, D., Evidente, A., Fernández-Aparicio, M., 2018. Allelopathy for Parasitic Plant Management. *Natural Product Communications* 13, 1-6. 1934578X1801300. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300307>
- Clarkson, J., Michel, V., Neilson, R., 2015. Mini-paper - Biofumigation for the control of soil-borne diseases. *Epi-Agri Agriculture and Innovation*. 7p.
- Cocozza, C., Abdeldaym, E.A., Brunetti, G., Nigro, F., Traversa, A., 2021. Synergistic effect of organic and inorganic fertilization on the soil inoculum density of the soilborne pathogens *Verticillium dahliae* and *Phytophthora* spp. under open-field conditions. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 8, 1-11.  
<https://doi.org/10.1186/s40538-021-00223-w>
- Cosic, J., Jurkovic, D., Vrandecic, K., Kaucic, D., 2012. Survival of buried *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia in undisturbed soil. *Helia* 35, 73–78.  
<https://doi.org/10.2298/HEL1256073C>
- Cosme, M., Fernández, I., Van der Heijden, M.G.A., Pieterse, C.M.J., 2018. Non-Mycorrhizal Plants: The Exceptions that Prove the Rule. *Trends in Plant Science* 23, 577–587.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.004>
- Couëdel, A., Alletto, L., Justes, É., 2018a. Crucifer-legume cover crop mixtures provide effective sulphate catch crop and sulphur green manure services. *Plant and Soil* 426, 61–76. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3615-8>
- Couëdel, A., Alletto, L., Kirkegaard, J., Justes, É., 2018b. Crucifer glucosinolate production in legume-crucifer cover crop mixtures. *European Journal of Agronomy* 96, 22–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.eja.2018.02.007>

- Couëdel, A., Alletto, L., Seassau, C., brin, antoine, 2021. CRUCIAL - Services écosystémiques produits par les cultures intermédiaires multiservices de légumineuses et de crucifères. *Innovations Agronomiques* 84, 217-225.
- Couëdel, A., Alletto, L., Tribouillois, H., Justes, É., 2018c. Cover crop crucifer-legume mixtures provide effective nitrate catch crop and nitrogen green manure ecosystem services. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 254, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.11.017>
- Couëdel, A., Kirkegaard, J., Alletto, L., Justes, É., 2019. Crucifer-legume cover crop mixtures for biocontrol: Toward a new multi-service paradigm, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 55–139. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.05.003>
- da Silva, F.D.B., de Aquino, L.A., Panozzo, L.E., Lima, T.C., Berger, P.G., Dias, D.C.F. dos S., 2016. Influence of Boron on Sunflower Yield and Nutritional Status. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 47, 809–817. <https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1146894>
- Daayf, F., Nicole, M., Boher, B., Pando, A., Geiger, J.P., 1997. Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 103, 125-136.
- Davis, J.R., Everson, D.O., 1986. Relation of *Verticillium dahliae* in Soil and Potato Tissue, irrigation Method, and N-Fertility to Verticillium Wilt of Potato. *Disease Control and Pest Management* 76, 730–736.
- Davis, J.R., Huisman, O.C., Everson, D.O., Nolte, P., Sorensen, L.H., Schneider, A.T., 2010. Ecological Relationships of Verticillium Wilt Suppression of Potato by Green Manures. *American Journal of Potato Research* 87, 315–326. <https://doi.org/10.1007/s12230-010-9135-6>
- de Graaf, R.M., Krosse, S., Swolfs, A.E.M., te Brinke, E., Prill, N., Leimu, R., van Galen, P.M., Wang, Y., Aarts, M.G.M., van Dam, N.M., 2015. Isolation and identification of 4- $\alpha$ -rhamnosyloxy benzyl glucosinolate in *Noccaea caerulescens* showing intraspecific variation. *Phytochemistry* 110, 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.016>
- de Graaff, M.-A., Hornslein, N., Throop, H.L., Kardol, P., van Diepen, L.T.A., 2019. Effects of agricultural intensification on soil biodiversity and implications for ecosystem functioning: A meta-analysis, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 1–44. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.01.001>
- de Carvalho, L. B., de Vargas Pereira, L., & Michelon, M. F. (2015). Pesticide resistance in intensive agricultural fields: a global issue. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 14(3), 201-202.
- De Notaris, C., Olesen, J.E., Sørensen, P., Rasmussen, J., 2020. Input and mineralization of carbon and nitrogen in soil from legume-based cover crops. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 116, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10705-019-10026-z>
- Deasy, W., Shepherd, T., Alexander, C.J., Birch, A.N.E., Evans, K.A., 2016. Field-based Evaluation of a Novel SPME-GC-MS Method for Investigation of Below-ground Interaction between *Brassica* Roots and Larvae of Cabbage Root Fly, *Delia radicum* L.: Analysis of Root Volatiles from Field-grown *Brassica* by SPME-GC-MS. *Phytochemical Analysis* 27, 343–353. <https://doi.org/10.1002/pca.2634>
- Debaeke, P., Bedoussac, L., Bonnet, C., Bret-Mestries, E., Seassau, C., Gavaland, A., Raffaillac, D., Tribouillois, H., Véricel, G., Justes, E., 2017a. Sunflower crop: environmental-friendly and agroecological. *OCL* 24, D304. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017020>

- Debaeke, P., Casadebaig, P., Flenet, F., Langlade, N., 2017b. Sunflower crop and climate change: vulnerability, adaptation, and mitigation potential from case-studies in Europe. OCL 24, D102. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016052>
- Debaeke, P., Casadebaig, P., Langlade, N.B., 2021. New challenges for sunflower ideotyping in changing environments and more ecological cropping systems. OCL 28, 29. <https://doi.org/10.1051/ocl/2021016>
- Debaeke, P., Izquierdo, N.G., 2021. Crop Physiology: Case Histories for Major Crops. Chapter 16 : Sunflower. Elsevier, Pays-Bas, 22p.
- Delavault, P., 2015. Knowing the Parasite: Biology and Genetics of Orobanche. Helia 38, 15–29. <https://doi.org/10.1515/helia-2014-0030>
- Di Primo, P., Gamliel, A., Austerweil, M., Steiner, B., Beniches, M., Peretz-Alon, I., Katan, J., 2003. Accelerated degradation of metam-sodium and dazomet in soil: characterization and consequences for pathogen control. Crop Protection 22, 635–646. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00004-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00004-8)
- Dominguez, J., Alvarado, J., Espinosa, J.L., Falcon, M., Mateos, A., Navarro, F., 2004. Use of sunflower cultivars with resistance to imidazolinone herbicides to control broomrape (*Orobanche cumana*) infection Disease Control, Proc. 16th International Sunflower Conference, Fargo, ND USA, 6.
- Donald, P. F., Green, R. E., & Heath, M. F. (2001). Agricultural intensification and the collapse of Europe's farmland bird populations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1462), 25-29.
- Dunn, R.R., 2010. Global Mapping of Ecosystem Disservices: The Unspoken Reality that Nature Sometimes Kills us: Ecosystem Disservices. Biotropica 42, 555–557. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2010.00698.x>
- Duriez, P., 2019. Caractérisation génétique, moléculaire et physiologique du locus Or7 de résistance à Orobanche cumana chez le tournesol. Thèse de doctorat, Université de Toulouse 3 Paul Sabatier. 144 pp.
- Duriez, P., Vautrin, S., Auriac, M.-C., Bazerque, J., Boniface, M.-C., Callot, C., Carrère, S., Cauet, S., Chabaud, M., Gentou, F., Lopez-Sendon, M., Paris, C., Pegot-Espagnet, P., Rousseaux, J.-C., Pérez-Vich, B., Velasco, L., Bergès, H., Piquemal, J., Muños, S., 2019. A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to *Orobanche cumana*. Nature Plants 5, 1211–1215. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0556-z>
- EFSA Panel on Plant Health (PLH), 2014. Scientific opinion on the pest categorisation of *Verticillium dahliae* Kleb. EFS2 12. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3928>
- El-Dabaa, M.A.T., Ahmed, S.A.-E., Messiha, N.K., El-Masry, R.R., 2019. The allelopathic efficiency of *Eruca sativa* seed powder in controlling *Orobanche crenata* infected *Vicia faba* cultivars. Bulletin of the National Research Centre 43, 37. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0079-9>
- Erreguerena, I.A., Rojo, R., Quiroz, F.J., Clemente, G.E., Escande, A.R., 2019. Relationship between *Verticillium dahliae* inoculum and sunflower wilt in Argentina. Canadian Journal of Plant Pathology 41, 576–584. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1620860>
- Evans, A. E., Mateo-Sagasta, J., Qadir, M., Boelee, E., & Ippolito, A. (2019). Agricultural water pollution: key knowledge gaps and research needs. *Current opinion in environmental sustainability*, 36, 20-27.

- Fahey, J.W., 2006. Isothiocyanates into oil from glucosinolate-containing plants and method of producing products with oil containing isothiocyanates extracted from glucosinolate-containing plants. N° de brevet US 2006/0127996 A1, Johns Hopkins University, Washington, United States, 11p.
- FAO, 2021. Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4479en>
- FAOSTAT, 2022. FAOSTAT [WWW Document]. URL <https://www.fao.org/faostat/fr/#home> (accessed 2.14.22).
- Fenwick, G.R., Heaney, R.K., Mullin, W.J., VanEtten, C.H., 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 18, 123–201. <https://doi.org/10.1080/10408398209527361>
- Fernández-Aparicio, M., Emeran, A.A., Rubiales, D., 2010. Inter-cropping with berseem clover (*Trifolium alexandrinum*) reduces infection by *Orobanche crenata* in legumes. *Crop Protection* 29, 867–871. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.03.004>
- Fernández-Aparicio, M., Flores, F., Rubiales, D., 2009. Recognition of root exudates by seeds of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche*) species. *Annals of Botany* 103, 423–431. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn236>
- Fernández-Aparicio, M., Masi, M., Maddau, L., Cimmino, A., Evidente, M., Rubiales, D., Evidente, A., 2016a. Induction of Haustorium Development by Sphaeropsidones in Radicles of the Parasitic Weeds *Striga* and *Orobanche*. A Structure–Activity Relationship Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 5188–5196. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01910>
- Fernández-Aparicio, M., Reboud, X., Gibot-Leclerc, S., 2016b. Broomrape Weeds. Underground Mechanisms of Parasitism and Associated Strategies for their Control: A Review. *Frontiers in Plant Science* 7, 1-23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00135>
- Fernández-Aparicio, M., Yoneyama, K., Rubiales, D., 2011. The role of strigolactones in host specificity of *Orobanche* and *Phelipanche* seed germination. *Seed Science Research* 21, 55–61. <https://doi.org/10.1017/S0960258510000371>
- Fernández-Martínez, J.M., Pérez-Vich, B., Velasco, L., 2015. Sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.), in: *Sunflower*. Elsevier, pp. 129–155. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50011-8>
- Fick, G.N., Zimmer, D.E., 1974. Monogenic Resistance to Verticillium Wilt in Sunflowers <sup>1</sup>. *Crop Science* 14, 895–896. <https://doi.org/10.2135/cropsci1974.0011183X001400060037x>
- Finney, D.M., Buyer, J.S., Kaye, J.P., 2017. Living cover crops have immediate impacts on soil microbial community structure and function. *Journal of Soil and Water Conservation* 72, 361–373. <https://doi.org/10.2489/jswc.72.4.361>
- FranceAgriMer, 2021. <https://www.franceagrimer.fr/>
- Franco, J.G., Saliendra, N., Sanderson, M., Liebig, M., Archer, D., 2016. Long-Term Agroecosystem Research: The Potential for Sunflower to Provide Multiple Ecosystem Services in Diverse Cropping Systems. Fargo, ND USA. 1p.
- Franklin, R. B., & Mills, A. L. (2009). Importance of spatially structured environmental heterogeneity in controlling microbial community composition at small spatial scales in an agricultural field. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1833-1840.
- Friberg, H., Edel-Hermann, V., Faivre, C., Gautheron, N., Fayolle, L., Faloya, V., Montfort, F., Steinberg, C., 2009a. Cause and duration of mustard incorporation effects on soil-borne plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 2075–2084. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.017>

- Friberg, H., Edel-Hermann, V., Faivre, C., Gautheron, N., Fayolle, L., Faloya, V., Montfort, F., Steinberg, C., 2009b. Cause and duration of mustard incorporation effects on soil-borne plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 2075–2084. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.017>
- García-González, I., Quemada, M., Gabriel, J.L., Hontoria, C., 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal activity responses to winter cover crops in a sunflower and maize cropping system. *Applied Soil Ecology* 102, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.006>
- García-Ruiz, R., García-Carneros, A.B., Molinero-Ruiz, L., 2014. A New Race of *Verticillium dahliae* Causing Leaf Mottle of Sunflower in Europe. *Plant Disease* 98, 1435–1435. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0360-PDN>
- Gardarin, A., Celette, F., Naudin, C., Piva, G., Valantin-Morison, M., Vrignon-Brenas, S., Verret, V., Médiène, S., 2022. Intercropping with service crops provides multiple services in temperate arable systems: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 42, 39. <https://doi.org/10.1007/s13593-022-00771-x>
- Garg, H., Kohn, L.M., Andrew, M., Li, H., Sivasithamparam, K., Barbetti, M.J., 2010. Pathogenicity of morphologically different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus* and *B. juncea* genotypes. *European Journal of Plant Pathology* 126, 305–315. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9547-7>
- Génard, T., Etienne, P., Diquélou, S., Yvin, J.-C., Revellin, C., Lâiné, P., 2017. Rapeseed-legume intercrops: plant growth and nitrogen balance in early stages of growth and development. *Heliyon* 3, e00261. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00261>
- Gevezova, M., Dekalska, T., Stoyanov, K., Hristeva, T., Kostov, K., Batchvarova, R., Denev, I., 2012. Recent advances in Broomrapes research *Journal of Bioscience and Biotechnology* 1, 15.
- Gimsing, A.L., Kirkegaard, J.A., 2009. Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Reviews* 8, 299–310. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9105-5>
- Gimsing, A.L., Kirkegaard, J.A., 2006. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of Brassica biofumigants. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2255–2264. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.024>
- Giovannetti, 1980. Evaluation of techniques for measuring CMA infections in roots. *New Phytologist* 84, 489-500.
- Goldwasser, Y., Kleifeld, Y., Golan, S., Bargutti, A., Rubin, B., 1995. Dissipation of methamsodium from soil and its effect on the control of *Orobanche aegyptiaca*. *Weed Research* 35, 445–452. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1995.tb01641.x>
- Grassini, P., Indaco, G.V., Pereira, M.L., Hall, A.J., Trápani, N., 2007. Responses to short-term waterlogging during grain filling in sunflower. *Field Crops Research* 101, 352–363. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.12.009>
- Grenz, J.H., Iştoc, V.A., Manschadi, A.M., Sauerborn, J., 2008. Interactions of sunflower (*Helianthus annuus*) and sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) as affected by sowing date, resource supply and infestation level. *Field Crops Research* 107, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.02.003>
- Griffon, M. (2007). L'agriculture intensive devra connaître des changements inévitables. *Cahiers Agricultures*, 16(2), 1-2.
- Gulya, T., 2007. New strain of *Verticillium dahliae* in North America. *Helia* 30, 115–120. <https://doi.org/10.2298/HEL0747115G>

- Gulya, T.J., 1997. Sunflower Diseases - Gulya - 1997 - Agronomy Monographs - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/agronmonogr35.c6> (accessed 2.14.22).
- Gutjahr, C., Paszkowski, U., 2013. Multiple control levels of root system remodeling in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in Plant Science* 4, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00204>
- Haramoto, E.R., Gallandt, E.R., 2004. Brassica cover cropping for weed management: A review. *Renewable Agriculture and Food Systems* 19, 187–198. <https://doi.org/10.1079/RAFS200490>
- Harris, H.C., McWilliam, J.R., Mason, W.K., 1978. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Australian Journal of Agricultural Research* 29, 1203–1212. <https://doi.org/10.1071/ar9781203>
- Hart, M.M., Forsythe, J.A., 2012. Using arbuscular mycorrhizal fungi to improve the nutrient quality of crops; nutritional benefits in addition to phosphorus. *Scientia Horticulturae* 148, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.018>
- Hartz, T.K., Johnstone, P.R., Miyao, E.M., Davis, R.M., 2005. Mustard Cover Crops Are Ineffective in Suppressing Soilborne Disease or Improving Processing Tomato Yield. *HortSci* 40, 2016–2019. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.7.2016>
- Higo, M., Tatewaki, Y., Gunji, K., Kaseda, A., Isobe, K., 2019. Cover cropping can be a stronger determinant than host crop identity for arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing maize and soybean. *PeerJ* 7, e6403. <https://doi.org/10.7717/peerj.6403>
- Hirsch, A.M., Lum, M.R., Downie, J.A., 2001. What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? *Plant Physiology* 127, 1484–1492. <https://doi.org/10.1104/pp.010866>
- Hollister, E.B., Hu, P., Wang, A.S., Hons, F.M., Gentry, T.J., 2013. Differential impacts of brassicaceous and nonbrassicaceous oilseed meals on soil bacterial and fungal communities. *FEMS Microbiol Ecol* 83, 632–641. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12020>
- Hossain, S., Bergkvist, G., Glinwood, R., Berglund, K., Mårtensson, A., Hallin, S., Persson, P., 2015. Brassicaceae cover crops reduce *Aphanomyces* pea root rot without suppressing genetic potential of microbial nitrogen cycling. *Plant and Soil* 392, 227–238. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2456-y>
- Huber, D., Römheld, V., Weinmann, M., 2012. Relationship between Nutrition, Plant Diseases and Pests, in: *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Elsevier, pp. 283–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00010-8>
- Hussain, M., Farooq, S., Hasan, W., Ul-Allah, S., Tanveer, M., Farooq, M., Nawaz, A., 2018. Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives. *Agricultural Water Management* 201, 152–166. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.01.028>
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Davis, R.M., Usami, T., Platt, H.W., Subbarao, K.V., 2011. Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. *PLoS ONE* 6, e28341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028341>
- Ingels, C., Horn, M.V., Bugg, R., Miller, P.R., 1994. Selecting the right cover crop gives multiple benefits. *California Agriculture* 48, 43–48. <https://doi.org/10.3733/ca.v048n05p43>

- Jestin, C., Martin-Monjaret, C., 2016. *Orobanche cumana* : opter pour la bonne stratégie de lutte Perspectives agricoles 430, 28-31.
- Jiménez-Díaz, R.M., Cirulli, M., Bubici, G., del Mar Jiménez-Gasco, M., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C., 2012. Verticillium Wilt, A Major Threat to Olive Production: Current Status and Future Prospects for its Management. *Plant Disease* 96, 304–329.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0496>
- Jiménez-Ruiz, J., Leyva-Pérez, M. de la O., Schilirò, E., Barroso, J.B., Bombarely, A., Mueller, L., Mercado-Blanco, J., Luque, F., 2017. Transcriptomic Analysis of *Olea europaea* L. Roots during the *Verticillium dahliae* Early Infection Process. *Plant Genome* 10, 1-15.  
<https://doi.org/10.3835/plantgenome2016.07.0060>
- Joel, D.M., Chaudhuri, S.K., Plakhine, D., Ziadna, H., Steffens, J.C., 2011. Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochemistry* 72, 624–634.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.037>
- Johnson, B.J., 1971. Effect of Weed Competition on Sunflowers. *Weed science*. 19, 378–380.  
<https://doi.org/10.1017/S0043174500049183>
- Johnston-Monje, D., Lopez Mejia, J., 2020. Botanical microbiomes on the cheap: Inexpensive molecular fingerprinting methods to study plant-associated communities of bacteria and fungi. *Applications in Plant Sciences* 8, 1-12. <https://doi.org/10.1002/aps3.11334>
- Jouffert P., Labalette F., Thibierge J., 2011. Atouts et besoins en innovations du tournesol pour une agriculture durable. *Innovations Agronomiques* 14, 1-17.
- Justes, E., Beaudoin, N., Bertuzzi, P. [et al], 2012. Réduire les fuites de nitrate au moyen de cultures intermédiaires : conséquences sur les bilans d'eau et d'azote, autres services écosystémiques Rapport d'étude INRA, France, 416p.
- Justes, E., Minette, S., Alletto, L., Bonnet, C., Raffailac, D., Véricel, G., 2017. Les CIMS, un pilier de la re-conception des systèmes de culture pour une production agroécologique Carrefours de l'innovation agronomique, Toulouse, France, 11.
- Justes, E., Richard, G., 2017. Contexte, Concepts et Définition des cultures intermédiaires multi-services. *Innovations Agronomiques* 62, 1-15.
- Kebreab, E., Murdoch, A.J., 1999. A quantitative model for loss of primary dormancy and induction of secondary dormancy in imbibed seeds of *Orobanche* spp. *Journal of Experimental Botany* 50, 211-219.
- Kevan, 1989. *Pollination: Crops and Bees*. Ministry of Agriculture and Food, 1-14.
- Kirkegaard, J., Matthiessen, J., 2004. Developing and refining the biofumigation concept. *Agroindustria*, 3, 233-240.
- Kirkegaard, J.A., Gardner, P.A., Desmarchelier, J.M., Angus, J.F., 1993. Biofumigation-using Brassica species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. *Proceedings of the 9th Australian Research Assembly on Brassicas*. Agricultural Research Institute, Wagga Wagga, 77–82.
- Kirkegaard, J.A., Sarwar, M., 1998. Biofumigation potential of brassicas - I - Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant and Soil* 201, 71-89.
- Kirkegaard, J.A., Simpfendorfer, S., Holland, J., Bambach, R., Moore, K.J., Rebetzke, G.J., 2004. Effect of previous crops on crown rot and yield of durum and bread wheat in northern NSW. *Australian Journal of Agricultural Research* 55, 321.  
<https://doi.org/10.1071/AR03178>

- Klosterman, S.J., Atallah, Z.K., Vallad, G.E., Subbarao, K.V., 2009. Diversity, Pathogenicity, and Management of *Verticillium* Species. *Annual Review of Phytopathology* 47, 39–62. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081748>
- Knodel, J.J., Charlet, L.D., Gavloski, J., 2010. Integrated Pest Management of Sunflower Insect Pests in the Northern Great Plains, NDSU Extension Service, Fargo, ND USA 20.
- Knowles, P.F., 1978. Morphology and Anatomy, in: Carter, J.F. (Ed.), *Agronomy Monographs*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 55–87. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr19.c3>
- Kristensen, H.L., Thorup-Kristensen, K., 2004. Root Growth and Nitrate Uptake of Three Different Catch Crops in Deep Soil Layers. *Soil Science Society of America Journal* 68, 1-9.
- Labrousse, P., Arnaud, M.C., Serieys, H., Berville, A., Thalouarn, P., 2001. Several Mechanisms are Involved in Resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. *Annals of Botany* 88, 859–868. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1520>
- Labrousse, P., Delmail, D., Arnaud, M.C., Thalouarn, P., 2010. Mineral nutrient concentration influences sunflower infection by broomrape (*Orobanche cumana*). *Botany* 88, 839–849. <https://doi.org/10.1139/B10-057>
- Laegdsmand, M., Gimsing, A.L., Strobel, B.W., Sørensen, J.C., Jacobsen, O.H., Hansen, H.C.B., 2007. Leaching of isothiocyanates through intact soil following simulated biofumigation. *Plant and Soil* 291, 81–92. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9176-2>
- Lamichhane, J.R., Alletto, L., 2022. Ecosystem services of cover crops: a research roadmap. *Trends in Plant Science* S1360138522000863. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.03.014>
- Larkin, R.P., Honeycutt, C.W., Olanya, O.M., 2011. Management of Verticillium Wilt of Potato with Disease-Suppressive Green Manures and as Affected by Previous Cropping History. *Plant Disease* 95, 568–576. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0670>
- Lazzeri, L., 1993. *In vitro* activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 825-829.
- Lazzeri, L., Curto, G., Leoni, O., Dallavalle, E., 2004. Effects of Glucosinolates and Their Enzymatic Hydrolysis Products via Myrosinase on the Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6703–6707. <https://doi.org/10.1021/jf030776u>
- Le Clef, E., Kemper, T., 2015. Sunflower Seed Preparation and Oil Extraction, in: *Sunflower*. Elsevier, pp. 187–226. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50014-3>
- Lecomte, V., Nolot, J.M., 2011. Place du tournesol dans le système de culture. *Innovations Agronomiques* 14, 59-76.
- Lehman, R.M., Taheri, W.I., Osborne, S.L., Buyer, J.S., Douds, D.D., 2012. Fall cover cropping can increase arbuscular mycorrhizae in soils supporting intensive agricultural production. *Applied Soil Ecology* 61, 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.008>
- Li, S., Schonhof, I., Krumbein, A., Li, L., Stützel, H., Schreiner, M., 2007. Glucosinolate Concentration in Turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapifera* L.) Roots as Affected by Nitrogen and Sulfur Supply. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8452–8457. <https://doi.org/10.1021/jf070816k>

- Liu, J., Wang, X., Fang, W., Yan, D., Han, D., Huang, B., Zhang, Y., Li, Y., Ouyang, C., Cao, A., Wang, Q., 2020. Soil properties, presence of microorganisms, application dose, soil moisture and temperature influence the degradation rate of Allyl isothiocyanate in soil. *Chemosphere* 244, 125540.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125540>
- Louarn, J., 2013. Exploitation des champignons mycorhiziens à arbuscules pour la protection du tournesol contre *O. cumana*. Thèse de doctorat, Université de Toulouse 3 Paul Sabatier. 285 pp.
- Louarn, J., Boniface, M.-C., Pouilly, N., Velasco, L., Pérez-Vich, B., Vincourt, P., Muñoz, S., 2016. Sunflower Resistance to Broomrape (*Orobanche cumana*) Is Controlled by Specific QTLs for Different Parasitism Stages. *Frontiers in Plant Sciences* 7, 1-14.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00590>
- Louarn, J., Carbonne, F., Delavault, P., Bécard, G., Rochange, S., 2012. Reduced Germination of *Orobanche cumana* Seeds in the Presence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi or Their Exudates. *PLoS ONE* 7, 1-10. e49273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049273>
- Lucas, P., 2007. Le concept de la protection intégrée des cultures. *Innovations Agronomiques* 1, 15-21.
- Ma, Y., Jia, J., An, Y., Wang, Z., Mao, J., 2013. Potential of Some Hybrid Maize Lines to Induce Germination of Sunflower Broomrape. *Crop Sciences*. 53, 260–270.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci2012.03.0197>
- Malcolm, G.M., Kuldau, G.A., Gugino, B.K., Jiménez-Gasco, M. del M., 2013. Hidden Host Plant Associations of Soilborne Fungal Pathogens: An Ecological Perspective. *Phytopathology* 103, 538–544. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-12-0192-LE>
- Manici, L.M., Lazzeri, L., Palmieri, S., 1997. *In Vitro* Fungitoxic Activity of Some Glucosinolates and Their Enzyme-Derived Products toward Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2768–2773. <https://doi.org/10.1021/jf9608635>
- Mansoori, B., 2011. An improved ethanol medium for efficient recovery and estimation of *Verticillium dahliae* populations in soil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33, 88–93. <https://doi.org/10.1080/07060661.2010.534894>
- Duca, M., Aliona, G., Adriana, A., 2013. The biological cycle of sunflower broomrape. *Journal of Plant Development* 20, 71-78.
- Markell, S.G., Harveson, R.M., Block, C.C., Gulya, T.J., 2015. Sunflower Diseases, in: *Sunflower*. Elsevier, pp. 93–128. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50010-6>
- Martin, F.N., 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology* 41, 325–350.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095514>
- Martín-Sanz, A., Malek, J., Fernández-Martínez, J.M., Pérez-Vich, B., Velasco, L., 2016. Increased Virulence in Sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) Populations from Southern Spain Is Associated with Greater Genetic Diversity. *Frontiers in Plant Science* 7, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00589>
- Martín-Sanz, A., Rueda, S., García-Carneros, A.B., González-Fernández, S., Miranda-Fuentes, P., Castuera-Santacruz, S., Molinero-Ruiz, L., 2018. Genetics, Host Range, and Molecular and Pathogenic Characterization of *Verticillium dahliae* From Sunflower Reveal Two Differentiated Groups in Europe. *Frontiers in Plant Science* 9, 288.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00288>

- Massignam, A.M., Chapman, S.C., Hammer, G.L., Fukai, S., 2009. Physiological determinants of maize and sunflower grain yield as affected by nitrogen supply. *Field Crops Research* 113, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.06.001>
- Matthiessen, J., Warton, B., Shackleton, M., 2004. The importance of plant maceration and water addition in achieving high Brassica- derived isothiocyanate levels in soil. *Agroindustria* 3, 277-285.
- Matthiessen, J.N., Kirkegaard, J.A., 2006. Biofumigation and Enhanced Biodegradation: Opportunity and Challenge in Soilborne Pest and Disease Management. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 235–265. <https://doi.org/10.1080/07352680600611543>
- Matthiessen, J.N., Shackleton, M.A., 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. *Pest Management Science* 61, 1043–1051. <https://doi.org/10.1002/ps.1086>
- Maury, P., Langlade, N., Grieu, P., Rengel, D., Sarrafi, A., Debaeke, P., Vincourt, P., 2011. Ecophysiologie et génétique de la tolérance à la sécheresse chez le tournesol. *Innovations Agronomiques* 17, 123-138.
- Meisinger, J.J., Hargrove, W.L., Mikkelsen, R.L., Williams, J.R., Benson, V.W., 1991. Effects of cover crops on groundwater quality. In: Hargrove, W.L. (Ed.), *Cover Crops for Clean Water, Soil and Water Conservation Society*. 57–68.
- Merah, O., 2015. Genetic Variability in Glucosinolates in Seed of *Brassica juncea* : Interest in Mustard Condiment. *Journal of Chemistry* 2015, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/606142>
- Merrien, A., Milan, M.J., 1992. *Physiologie du tournesol*. Ed Cetiom. Paris, 65 p.
- Mestries, E., 2022. Evolution culture du tournesol en France. Presented at the Carrefour du Tournesol.
- Mestries, E., 2017. Maladies du tournesol : le verticillium très présent dans le Sud-Ouest. *Perspectives agricoles* 5, 18-22.
- Mestries, E., Desanlis, M., Seassau, C., Moinard, J., Debaeke, P., Dechamp-Guillaume, G., 2011. Impact de la conduite de culture sur les maladies du tournesol. *Innovations Agronomique* 14, 91-108.
- Mestries, E., Lecomte, V., 2012. Tournesol et verticillium: État des lieux et moyens de lutte dans le Sud-Ouest. In *Proceedings of the Réunion Technique Régionale CETIOM, Ondes, France, 7 December 2012*; pp. 1–12. 11.
- Mestries, E., Seassau, C., Debaeke, P., Dechamp-Guillaume, G., 2010. Phoma du tournesol et dessèchement précoce: un lien maintenant bien établi. *Perspectives agricoles*, 62-65.
- Michel, V., 2008. Biofumigation: principe et application. *Revue suisse Viticulture Arboriculture Horticulture* 40, 95-99.
- Michel, V.V., 2014. Ten years of biofumigation research in Switzerland. Workshop on Integrated Soft Fruit Production. East Malling (United Kingdom) 24-27 September 2007. 169-176.
- Millennium Ecosystem Assessment (Program) (Ed.), 2005. *Ecosystems and human well-being: synthesis*. Island Press, Washington, DC.
- Missonnier, H., Jacques, A., Bang, J., Daydé, J., Mirleau-Thebaud, V., 2017. Accounting for biotic spatial variability in fields: Case of resistance screening against sunflower Verticillium wilt. *PLoS ONE* 12, e0181050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181050>
- Mithen, R., 2001. Glucosinolates – biochemistry, genetics and biological activity *Plant Growth Regulation* 34, 91–103.

- Mohamed, K.I., Papes, M., Williams, R., Benz, B.W., Peterson, A.T., 2006. Global Invasive Potential of 10 Parasitic Witchweeds and Related Orobanchaceae. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 35, 281–288. <https://doi.org/10.1579/05-R-051R.1>
- Mol, L., Van Riessen, H.W., 1995. Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*: II. Quantitative analysis of the luring effect of crops. *European Journal of Plant Pathology* 101, 679–685. <https://doi.org/10.1007/BF01874872>
- Molinero-Ruiz, M.L., Melero-Vara, J.M., García-Ruiz, R., Domínguez, J., 2006. Pathogenic diversity within field populations of *Orobanche cumana* and different reactions on sunflower genotypes. *Weed Research* 46, 462–469. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2006.00517.x>
- Moriondo, M., Giannakopoulos, C., Bindi, M., 2011. Climate change impact assessment: the role of climate extremes in crop yield simulation. *Climatic Change* 104, 679–701. <https://doi.org/10.1007/s10584-010-9871-0>
- Morra, M.J., Kirkegaard, J.A., 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1683–1690. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00153-0)
- Morris, E.K., Fletcher, R., Veresoglou, S.D., 2020. Effective methods of biofumigation: a meta-analysis. *Plant and Soil* 446, 379–392. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04352-y>
- Motisi, N., 2009. Réguler les maladies d’origine tellurique par une culture intermédiaire de Brassicacées: mécanismes d’action et conditions d’expression dans une rotation betterave-blé. Thèse de Doctorat Université AgroCampus Ouest, 267p.
- Muhammad, I., Wang, J., Sainju, U.M., Zhang, S., Zhao, F., Khan, A., 2021. Cover cropping enhances soil microbial biomass and affects microbial community structure: A meta-analysis. *Geoderma* 381, 114696. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114696>
- Nakano, R.T., Yamada, K., Bednarek, P., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., 2014. ER bodies in plants of the Brassicales order: biogenesis and association with innate immunity. *Frontiers in Plant Science* 5, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00073>
- Neild, R.E., Seeley, M.W., 1977. Growing Degree Days Predictions for Corn and Sorghum Development and Some Applications to Crop Production in Nebraska. *Historical Research Bulletins of the Nebraska Agricultural Experiment Station (1913-1993)*. 1-15.
- Neubauer, C., Heitmann, B., Müller, C., 2014. Biofumigation potential of Brassicaceae cultivars to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 140, 341–352. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0467-9>
- Neubauer, C., Hüntemann, K., Heitmann, B., Müller, C., 2015. Suppression of *Verticillium dahliae* by glucosinolate-containing seed meal amendments. *European Journal Plant Pathology* 142, 239–249. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0607-x>
- Njeru, E.M., Avio, L., Bocci, G., Sbrana, C., Turrini, A., Bàrberi, P., Giovannetti, M., Oehl, F., 2015. Contrasting effects of cover crops on ‘hot spot’ arbuscular mycorrhizal fungal communities in organic tomato. *Biology and Fertility of Soils* 51, 151–166. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0958-z>
- Nolot V. et Lecomte J. M., 2011. Place du tournesol dans le système de culture. *Innovations Agronomiques* 14, 59-76.
- Nyfelner, D., Huguenin-Elie, O., Suter, M., Frossard, E., Lüscher, A., 2011. Grass–legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agriculture*,

- Ecosystems & Environment 140, 155–163.  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.11.022>
- Ochiai, N., Powelson, M.L., Crowe, F.J., Dick, R.P., 2008. Green manure effects on soil quality in relation to suppression of *Verticillium* wilt of potatoes. *Biology and Fertility of Soils* 44, 1013–1023. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0289-z>
- Olivier, C., Vaughn, S.F., Mizubuti, E.S.G., Loria, R., 1999. Variation in allyl isothiocyanate production within brassica species and correlation with fungicidal activity 25, 2687–2701.
- Omirou, M., Rousidou, C., Bekris, F., Papadopoulou, K.K., Menkissoglou-Spiroudi, U., Ehaliotis, C., Karpouzas, D.G., 2011. The Impact of Biofumigation and Chemical Fumigation Methods on the Structure and Function of the Soil Microbial Community. *Microbial Ecology* 61, 201–213. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9740-4>
- Park, C.S., Marx, G.D., Moon, Y.S., Wiesenborn, D., Chang, K.C.S., Hofman, V.L., 2015. Alternative Uses of Sunflower, in: Schneiter, A.A. (Ed.), *Agronomy Monographs*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 765–807.  
<https://doi.org/10.2134/agronmonogr35.c17>
- Parker, C., 2013. The Parasitic Weeds of the Orobanchaceae, in: Joel, D.M., Gressel, J., Musselman, L.J. (Eds.), *Parasitic Orobanchaceae: Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 313–344. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38146-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38146-1_18)
- Parker, C., 2012. Parasitic Weeds: A World Challenge. *Weed science*. 60, 269–276.  
<https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00068.1>
- Parker, C., Riches, C., 1993. *Parasitic weeds of the world: biology and control*. CAB International, Wallingford, UK. 55p.
- Pate, J.S., Dart, P.J., 1961. Nodulation studies in legumes: IV. The influence of inoculum strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. *Plant and Soil* 15, 329–346. <https://doi.org/10.1007/BF01379467>
- Pedraza, 2015. Effect of *Sinapis alba* as organic amendment on sunflower broomrape control in southern Spain. Thèse de Doctorat, Université de Cordoue. 314p.
- Pedraza, V., González-Verdejo, C.I., Perea, F., Saavedra, M., Alcántara, C., 2015. Effect of *Sinapis alba* as organic amendment on sunflower broomrape control in southern Spain. XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, SEMh 2015, “La Malherbología y la Transferencia Tecnológica” Sevilla, España, 19 al 22 de octubre de 2015 35–41.
- Pegg, G.F., Brady, B.L., 2002. *Verticillium wilts*. CABI Pub, Wallingford, Oxon, UK ; New York. 522p.
- Pellerin, S., Mollier, A., Morel, C., Plenchette, C., 2007. Effect of incorporation of *Brassica napus* L. residues in soils on mycorrhizal fungus colonisation of roots and phosphorus uptake by maize (*Zea mays* L.). *European Journal of Agronomy* 26, 113–120.  
<https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.07.007>
- Pellet, D., Grosjean, Y., 2007. Fumure azotée du tournesol: intérêt de la méthode Hélotest pour la Suisse. *Revue Suisse Agricole* 39, 1-5.
- Penaud, A., Moinard, J., Molinero-Demilly, V., Pauchet, I., Bataillon, C., Labrouhe, D.T.D., 2003. Evolution du mildiou du tournesol en France : le point sur les dernières données du réseau de surveillance. AFPP - septième conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, France, 2-9.

- Pérez-Vich, B., Akhtouch, B., Knapp, S.J., Leon, A.J., Velasco, L., Fernández-Martínez, J.M., Berry, S.T., 2004. Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 92–102. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1599-7>
- Peyronnet, C., Pressenda, F., Quinsac, A., Carré, P., 2012. Impact du décorticage du tournesol sur la valeur nutritionnelle et l'intérêt économique des tourteaux en fabrication d'aliments composés. *OCL* 19, 341–346. <https://doi.org/10.1051/ocl.2012.0486>
- Pike, N., 2011. Using false discovery rates for multiple comparisons in ecology and evolution: False discovery rates for multiple comparisons. *Methods in Ecology and Evolution* 2, 278–282. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00061.x>
- Pilorgé, E., 2020. Sunflower in the global vegetable oil system: situation, specificities and perspectives. *OCL* 27, 34. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020028>
- Porter, I., Banks, J., Mattner, S., Fraser, P., 2009. Global Phaseout of Methyl Bromide Under the Montreal Protocol: Implications for Bioprotection, Biosecurity and the Ozone Layer, in: Gisi, U., Chet, I., Gullino, M.L. (Eds.), *Recent Developments in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21st Century*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 293–309. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9_21)
- Pouvreau, J.-B., Poulin, L., Huet, S., Delavault, P., 2021. Strigolactone-Like Bioactivity via Parasitic Plant Germination Bioassay, in: Prandi, C., Cardinale, F. (Eds.), *Strigolactones*. Springer US, New York, NY, pp. 59–73. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1429-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1429-7_6)
- Press, M., Graves, J., 1995. *Parasitic Plants*. Springer Science & Business Media.
- Pullman, G.S., DeVay, J.E., Garber, R.H., 1981. Soil solarization and thermal death: A logarithmic relationship between time and temperature for four soilborne plant pathogens. *Phytopathology* 959–964.
- Purdy, L., 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. *The American Phytopathological Society* 69, 1–6.
- Quiroz, F., Corromolas, A., Rojo, R., Perezfernandez, J., Escande, A., 2008. Effects of no tillage and genetic resistance on sunflower wilt by *Verticillium dahliae*. *Soil and Tillage Research* 99, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.still.2007.12.007>
- Rauf, S., 2008. Breeding sunflower (*Helianthus annuus* L.) for drought tolerance *Communications in Biometry and Crop Science* 3 (1), 29–44.
- Raupp, F.M., Spring, O., 2013. New Sesquiterpene Lactones from Sunflower Root Exudate as Germination Stimulants for *Orobanche cumana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 10481–10487. <https://doi.org/10.1021/jf402392e>
- Reau, R., Bodet, J.-M., Bordes, J.-P., Dore, T., Ennaifar, S., Moussart, A., Nicolardot, B., Pellerin, S., Plenchette, C., Quinsac, A., Sausse, C., Seguin, B., Tivoli, B., 2005. Effets allélopathiques des Brassicacées via leurs actions sur les agents pathogènes telluriques et les mycorhizes : analyse bibliographique. *Partie 1*. *OCL* 12, 261–271. <https://doi.org/10.1051/ocl.2005.0261>
- Rice, E.L., 1984. *Allelopathy*. Academic Press. Second edition. pp. 422.
- Rondanini, D., Mantese, A., Savin, R., Hall, A.J., 2006. Responses of sunflower yield and grain quality to alternating day/night high temperature regimes during grain filling: Effects of timing, duration and intensity of exposure to stress. *Field Crops Research* 96, 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.05.006>

- Rosner, K., Bodner, G., Hage-Ahmed, K., Steinkellner, S., 2018. Long-term Soil Tillage and Cover Cropping Affected Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Nutrient Concentrations, and Yield in Sunflower. *Agronomy Journal* 110, 2664–2672. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.03.0177>
- Rubiales, D., Fernández-Aparicio, M., Wegmann, K., Joel, D.M., 2009. Revisiting strategies for reducing the seedbank of *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Weed Research* 49, 23–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2009.00742.x>
- Rumberger, A., Marschner, P., 2003a. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 445–452. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00296-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00296-1)
- Rumberger, A., Marschner, P., 2003b. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 445–452. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00296-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00296-1)
- Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., 1998. Biofumigation potential of brassicas: II. Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. *Plant and Soil* 201, 91–101.
- Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W., Desmarchelier, J.M., 1998. Biofumigation potential of brassicas - III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens *Plant and Soil* 201: 103–112, 1998.
- Sausse, C., Baux, A., Bertrand, M., Bonnaud, E., Canavelli, S., Destrez, A., Klug, P.E., Olivera, L., Rodriguez, E., Tellechea, G., Zuil, S., 2021a. Contemporary challenges and opportunities for the management of bird damage at field crop establishment. *Crop Protection* 148, 105736. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105736>
- Sausse, C., Chevalot, A., Lévy, M., 2021b. Hungry birds are a major threat for sunflower seedlings in France. *Crop Protection* 148, 105712. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105712>
- Sausse, C., Lévy, M., 2021. Bird damage to sunflower: international situation and prospects. *OCL* 28, 34. <https://doi.org/10.1051/ocl/2021020>
- Schneider, A., Huyghe, C., 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Edition Quae, Versailles 515pp.
- Schneiter, A.A., 1992. Production of semidwarf and dwarf sunflower in the northern Great Plains of the United States. *Field Crops Research* 30, 391–401. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(92\)90007-V](https://doi.org/10.1016/0378-4290(92)90007-V)
- Schneiter, A.A., Miller, J.F., 1981. Description of Sunflower Growth Stages. *Crop Sciences*. 21, 901–903. <https://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100060024x>
- Scotti, R., Bonanomi, G., Scelza, R., Zoina, A., & Rao, M. A. (2015). Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 333-352.
- Seassau, C., 2016. Control of *Verticillium dahliae* causing sunflower wilt using Brassica cover crops. International Sunflower Conference, Edirne, Turkey, 1-9.
- Seassau, C., 2010. Etiologie du syndrome de dessèchement précoce du tournesol : implication de *Phoma macdonaldii* et interaction avec la conduite de culture. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 209p.
- Seassau, C., Aubertot, J.-N., Debaeke, P., Dechamp-Guillaume, G., Mestries, E., Munos, S., 2016. Les avancées pour une meilleure gestion des principaux bioagresseurs du tournesol. Journées d’Echanges Tournesol, Jun 2016, Toulouse, France. 36pp.
- Seassau, C., Dechamp-Guillaume, G., Mestries, E., Debaeke, P., 2010. Nitrogen and water management can limit premature ripening of sunflower induced by *Phoma*

- macdonaldii*. Field Crops Research 115, 99–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.10.009>
- Seiler, G.J., 1997. Anatomy and Morphology of Sunflower, in: Schneiter, A.A. (Ed.), Agronomy Monographs. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 67–111.  
<https://doi.org/10.2134/agronmonogr35.c3>
- Sennett, L.B., Goyer, C., Burton, D.L., Zebarth, B.J., Whitney, S., 2022. Chemical fumigation and biofumigation alter soil bacterial community diversity and composition. FEMS Microbiology Ecology 98, fiac026. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac026>
- Shabana, Y.M., Müller-Stöver, D., Sauerborn, J., 2003. Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. orthoceras for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. Biological Control 26, 189–201.  
[https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00130-5](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00130-5)
- Shearer, G., Kohl, D.H., 1986. N<sub>2</sub>-Fixation in Field Settings: Estimations Based on Natural <sup>15</sup>N Abundance. Functional Plant Biol. 13, 699–756. <https://doi.org/10.1071/pp9860699>
- Škorić, D., Joița-Păcureanu, M., Gorbachenko, F., Gorbachenko, O., Maširević, S., 2021. Dynamics of change in broomrape populations (*Orobanche cumana* Wallr.) in Romania and Russia (Black Sea area). Helia 44, 1–14. <https://doi.org/10.1515/helia-2020-0025>
- Smith, B.J., Kirkegaard, J.A., 2002. *In vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. Plant Pathology 51, 585–593. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00744.x>
- Strelnikov, E., Antonova, T., Gorlova, L., Trubina, V., 2020. The environmentally safe method of control of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) parasitizing on sunflower. BIO Web Conf. 21, 00039. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202100039>
- Subbarao, K.V., Hubbard, J.C., Koike, S.T., 1999. Evaluation of Broccoli Residue Incorporation into Field Soil for Verticillium Wilt Control in Cauliflower. Plant Disease 83, 124–129.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.2.124>
- Subbarao, K.V., Kabir, Z., Martin, F.N., Koike, S.T., 2007. Management of Soilborne Diseases in Strawberry Using Vegetable Rotations. Plant Disease 91, 964–972.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-0964>
- Tenuta, M., Lazarovits, G., 2002. Ammonia and Nitrous Acid from Nitrogenous Amendments Kill the Microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 92, 255–264.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.3.255>
- Terres inovia, 2021a. Pucerons : Gestion en cours de campagne [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/ravageurs-du-tournesol-les-pucerons> (accessed 2.14.22).
- Terres Inovia, 2021b. Maladies du tournesol : gestion durable du risque mildiou [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/maladies-du-tournesol-gestion-durable-du-risque-mildiou> (accessed 3.20.22).
- Terres Inovia, 2020a. Tournesol : quelles sont les pratiques culturales? [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/tournesol-queelles-sont-les-pratiques-culturales> (accessed 2.14.22).
- Terres Inovia, 2020b. Les vrai-faux de l'irrigation du tournesol [WWW Document]. Terre-net. URL <https://www.terre-net.fr/observatoire-technique-culturelle/strategie-technique-culturelle/article/les-vrai-faux-de-l-irrigation-du-tournesol-217-169811.html> (accessed 2.14.22).

- Terres inovia, 2020c. Gestion des adventices difficiles en tournesol et en soja [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/gestion-des-adventices-difficiles-en-tournesol-et-en-soja>
- Terres inovia, 2020d. Stratégies herbicides en tournesol [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/strategies-herbicides-en-tournesol> (accessed 2.15.22).
- Terres inovia, 2019a. Le tournesol : une culture qui s'adapte à différents modes d'implantation [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/le-tournesol-une-culture-qui-s-adapte-a-differents-modes-d-implantation> (accessed 2.14.22).
- Terres Inovia, 2019b. Le tournesol : une culture qui s'intègre à toutes les exploitations agricoles [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/le-tournesol-une-culture-qui-s-integre-a-toutes-les-exploitations-agricoles> (accessed 2.14.22).
- Terres Inovia, 2019c. Fertilisation du tournesol: optimiser la fertilisation phosphatée et potassique - Terres Inovia [WWW Document]. URL <https://www.terresinovia.fr/-/fertilisation-du-tournesol-optimiser-la-fertilisation-phosphatee-et-potassique> (accessed 2.14.22).
- Terres inovia, 2019e. Privilégier une fertilisation azotée en végétation plutôt qu'au semis du tournesol [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/privilegier-une-fertilisation-azotee-en-vegetation-plutot-qu-au-semis-du-tournesol> (accessed 2.14.22).
- Terres inovia, 2019f. Désherbage du tournesol: privilégier les méthodes de lutte agronomique [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/desherbage-du-tournesol-privilegier-les-methodes-de-lutte-agronomique> (accessed 2.15.22).
- Terres inovia, 2019g. Mieux connaître l'*orobanche cumana* [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/mieux-connaître-l-orobanche-cumana> (accessed 2.15.22).
- Terres inovia, 2019h. Maladies du tournesol : diagnostiquer les symptômes foliaires [WWW Document]. Terres Inovia. URL <https://www.terresinovia.fr/-/maladies-du-tournesol-diagnostiquer-les-symptomes-foliaires> (accessed 2.17.22).
- Terres Univia, 2022. Tournesol - Les espèces cultivées - Cultures & utilisation - Terres Univia [WWW Document]. URL <https://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/tournesol> (accessed 2.14.22).
- Therond, O., Duru, M., 2019. Agriculture et biodiversité: les services écosystémiques, une voie de réconciliation? *Innovations Agronomiques* 75, 29-47.
- Thorup-Kristensen, K., 2006. Effect of deep and shallow root systems on the dynamics of soil inorganic N during 3-year crop rotations. *Plant and Soil* 288, 233–248. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9110-7>
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T.L., Flynn, S.J., 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13, 109–122. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(99\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00026-8)
- Tilman, D., Clark, M., Williams, D.R., Kimmel, K., Polasky, S., Packer, C., 2017. Future threats to biodiversity and pathways to their prevention. *Nature* 546, 73–81. <https://doi.org/10.1038/nature22900>

- Todesco, M., Bercovich, N., Kim, A., Imerovski, I., Owens, G.L., Dorado Ruiz, Ó., Holalu, S.V., Madilao, L.L., Jahani, M., Légaré, J.-S., Blackman, B.K., Rieseberg, L.H., 2022. Genetic basis and dual adaptive role of floral pigmentation in sunflowers. *eLife* 11, e72072. <https://doi.org/10.7554/eLife.72072>
- Tribouillois, H., Bedoussac, L., Couédel, A., Justes, E., 2017. Acquisition des ressources et production de services écosystémiques par les mélanges bi-spécifiques de cultures intermédiaires. *Innovations Agronomiques* 62, 1-17.
- Tribouillois, H., Cohan, J.-P., Justes, E., 2016. Cover crop mixtures including legume produce ecosystem services of nitrate capture and green manuring: assessment combining experimentation and modelling. *Plant and Soil* 401, 347–364. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2734-8>
- Tscharntke, T., Klein, A. M., Kruess, A., Steffan-Dewenter, I., & Thies, C. (2005). Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity–ecosystem service management. *Ecology letters*, 8(8), 857-874.
- Ueno, K., Furumoto, T., Umeda, S., Mizutani, M., Takikawa, H., Batchvarova, R., Sugimoto, Y., 2014. Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. *Phytochemistry* 108, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.018>
- Uhlich, H., 1963-, Pusch, J., 1962-, Barthel, K.-J., 1940-, 1995. *Sommerwurzarten Europas*. Westarp Wissenschaften.
- Unkovich, M., Cadisch, G., Australian Centre for International Agricultural Research (Eds.), 2008. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems, ACIAR monograph series. ACIAR, Canberra. 260pp.
- Uppal, A.K., El Hadrami, A., Adam, L.R., Tenuta, M., Daayf, F., 2008. Biological control of potato *Verticillium* wilt under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts. *Biological Control* 44, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.020>
- Valetti, L., Iriarte, L., Fabra, A., 2016. Effect of previous cropping of rapeseed (*Brassica napus* L.) on soybean (*Glycine max*) root mycorrhization, nodulation, and plant growth. *European Journal of Soil Biology* 76, 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.08.005>
- van Dam, N.M., Tytgat, T.O.G., Kirkegaard, J.A., 2009. Root and shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. *Phytochemistry Reviews* 8, 171–186. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9101-9>
- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11, 296–310. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- van der Heijden, M.G.A., Wagg, C., 2013. Soil microbial diversity and agro-ecosystem functioning. *Plant and Soil* 363, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1545-4>
- Vear, F., 2016. Changes in sunflower breeding over the last fifty years. *OCL* 23, D202. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016006>
- Vear, F., Muller, M.-H., 2011. Progrès variétal chez le tournesol: l'apport des ressources génétiques au sein du genre *Helianthus* *Innovations Agronomiques* 14, 139-150.
- Velasco, L., Fernández-Martínez, J.M., Fernández, J., 2015. Sunflower Production in the European Union in: *Sunflower*. Elsevier, pp. 555–573. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50024-6>

- Velasco, L., Pérez-Vich, B., Fernández-Martínez, J.M., 2016. Research on resistance to sunflower broomrape: an integrated vision. OCL 23, D203. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016002>
- Vierheilig, H., Bennett, R., Kiddle, G., Kaldorf, M., Ludwig-Müller, J., 2000. Differences in glucosinolate patterns and arbuscular mycorrhizal status of glucosinolate-containing plant species: RESEARCH Glucosinolates and AM colonization. New Phytologist 146, 343–352. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00642.x>
- Viguie, A., de Labrouhe, D.T., Vear, F., 2000. Inheritance of several sources of resistance to Phomopsis stem canker (*Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Euphytica 116, 167–179.
- Warton, B., Matthiessen, J., Shackleton, M.A., 2003. Cross-enhancement: enhanced biodegradation of isothiocyanates in soils previously treated with metham sodium. Soil Biology and Biochemistry 35, 1123–1127. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00164-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00164-0)
- Westwood, J.H., Foy, C.L., 1999. Influence of Nitrogen on Germination and Early Development of Broomrape (*Orobancha* spp.). Weed Science 47, 2–7.
- Wheeler, T.A., Bordovsky, J.P., Keeling, J.W., Keeling, W., McCallister, D., 2020. The effects of tillage system and irrigation on Verticillium wilt and cotton yield. Crop Protection 137, 105305. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105305>
- Wheeler, T.A., Bordovsky, J.P., Keeling, J.W., Mullinix, B.G., 2012. Effects of Crop Rotation, Cultivar, and Irrigation and Nitrogen Rate on Verticillium Wilt in Cotton. Plant Disease 96, 985–989. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0111-RE>
- White, C.M., Weil, R.R., 2010. Forage radish and cereal rye cover crop effects on mycorrhizal fungus colonization of maize roots. Plant and Soil 328, 507–521. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0131-x>
- Wilhelm, S., 1955. Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and field. Phytopathology 45, 180–181.
- Winde, I., Wittstock, U., 2011. Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate–myrosinase system. Phytochemistry 72, 1566–1575. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.016>
- Woolliams, 1966. Host plants of *Verticillium dahliae* in economic, weed and natives plants of interior british columbia [WWW Document]. URL <https://www.nrcresearchpress.com/doi/pdfplus/10.4141/cjps66-110> (accessed 5.12.20).
- Wortman, S.E., Francis, C.A., Bernards, M.L., Drijber, R.A., Lindquist, J.L., 2012. Optimizing Cover Crop Benefits with Diverse Mixtures and an Alternative Termination Method. Agronomy Journal 104, 1425. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0185>
- Xiao, C.L., Subbarao, K.V., 1998. Relationships Between *Verticillium dahliae* Inoculum Density and Wilt Incidence, Severity, and Growth of Cauliflower. Phytopathology 88, 1108–1115. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.10.1108>
- Yoneyama, Koichi, Xie, X., Yoneyama, Kaori, Kisugi, T., Nomura, T., Nakatani, Y., Akiyama, K., McErlean, C.S.P., 2018. Which are the major players, canonical or non-canonical strigolactones? Journal of Experimental Botany 69, 2231–2239. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery090>

## Références bibliographiques citées au sein de l'article

[Neila Ait Kaci Ahmed](#), [Benoit Galaup](#), [Jérémy Desplanques](#), [Grégory Dechamp-Guillaume](#), [Celia Seassau](#). [Ecosystem Services Provided by Cover Crops and Biofumigation in Sunflower Cultivation](#)

*Agronomy*, MDPI, 2022, 12 (1), pp.120.

## References

1. FAO. Available online: <https://www.fao.org/3/cb4479en/cb4479en.pdf> (accessed on 9 November 2021).
2. Le Clef, E.; Kemper, T. Sunflower seed preparation and oil extraction. In *Sunflower Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, 1st ed.; Martínez-Force, E., Turgut Dunford, N., Salas, J.J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 187–226. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00069-7>.
3. Debaeke, P.; Bedoussac, L.; Bonnet, C.; Bret-Mestries, E.; Seassau, C.; Gavaland, A.; Raffailac, D.; Tribouillois, H.; Véricel, G.; Justes, E. Sunflower crop: Environmental-friendly and agroecological. *OCL Oilseeds Fats Crops Lipids* **2017**, *24*, D304. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017020>.
4. Champolivier, L.; Debaeke, P.; Merrien, A. Pourquoi irriguer le tournesol, une culture réputée tolérante à la sécheresse? *Innov. Agron.* **2011**, *14*, 151–164.
5. Velasco, L.; Fernández-Martínez, J.M.; Fernández, J. Sunflower production in the European Union. In *Sunflower Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, 1st ed.; Martínez-Force, E., Turgut Dunford, N., Salas, J.J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 555–573. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00069-7>.
6. Lecomte, V.; Nolot, J.M. Place du tournesol dans le système de culture. *Innov. Agron.* **2011**, *14*, 59–76.
7. Jouffret, P.; Labalette, F.; Thibierge, J. Atouts et besoins en innovations du tournesol pour une agriculture durable. *Innov. Agron.* **2011**, *14*, 1–17.
8. Alberio, C.; Izquierdo, N.G.; Aguirrezábal, L.A.N. Sunflower Crop Physiology and Agronomy. In *Sunflower Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, 1st ed.; Martínez-Force, E., Turgut Dunford, N., Salas, J.J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 53–91. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00069-7>.
9. Debaeke, P.; Casadebaig, P.; Flenet, F.; Langlade, N. Sunflower crop and climate change: Vulnerability, adaptation, and mitigation potential from case-studies in Europe. *OCL Oilseeds Fats Crops Lipids* **2017**, *24*, D102. <https://doi.org/10.1051/ocl/2016052>.
10. Harris, H.; McWilliam, J.; Mason, W. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Aust. J. Agric. Res.* **1978**, *29*, 1203–1212. <https://doi.org/10.1071/ar9781203>.
11. Franceagrimer. Available online: <https://www.franceagrimer.fr> (accessed on 15 June 2021).
12. Seassau, C. Etiologie du syndrome de dessèchement précoce du tournesol: Implication de *Phoma macdonaldii* et interaction avec la conduite de culture. Ph.D. Dissertation, Université Fédérale de Toulouse, Toulouse, France, 2010.
13. Couëdel, A.; Alletto, L.; Tribouillois, H.; Justes, E. Cover crop crucifer-legume mixtures provide effective nitrate catch crop and nitrogen green manure ecosystem services. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2018**, *254*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.11.017>.
14. Poisson-Bammé, B.; Pérès, A. Survie du phoma du tournesol (*Leptosphaeria lindquistii*) sur les résidus de récolte. In Proceedings of the 6th International Conference on Plant Diseases, AFPP, Tours, France, 6–8 December 2000; pp.331–338.
15. Mestries, E. Lutter contre le verticillium grâce aux variétés. *Perspect. Agric.* **2013**, *406*, 24–28.
16. Uppal, A.; El Hadrami, A.; Adam, L.; Tenuta, M.; Daayf, F. Biological control of potato Verticillium wilt under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and

- plant extracts. *Biol. Control* **2008**, *44*, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.020>.
17. Rowe, R.C.; Powelson, M.L. Potato Early Dying: Management Challenges in a Changing Production Environment. *Plant Dis.* **2002**, *86*, 1184–1193. <https://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.11.1184>.
  18. Soesanto, L. Ecology and biological control of *Verticillium dahliae*. Ph.D. Dissertation, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2000.
  19. Mestries, E.; Lecomte, V. Tournesol et verticillium: État des lieux et moyens de lutte dans le Sud-Ouest. In Proceedings of the Réunion Technique Régionale CETIOM, Ondes, France, 7 December 2012; pp. 1–12.
  20. Wilhem, S. Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* **1995**, *45*, 180–181.
  21. Lloyd, M.G.; McRoberts, N.; Gordon, T.R. Cryptic Infection and Systemic Colonization of Leguminous Crops by *Verticillium dahliae*, the Cause of Verticillium Wilt. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 3166–3171. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-19-0850-re>.
  22. Pegg, G.F.; Brady, B.L. *Verticillium Wilts*, 1st ed.; CABI: 2002; 552p. <http://doi.org/10.1079/9780851995298.0000>.
  23. Hartz, T.; Johnstone, P.; Miyao, E.; Davis, R. Mustard Cover Crops Are Ineffective in Suppressing Soilborne Disease or Improving Processing Tomato Yield. *HortScience* **2005**, *40*, 2016–2019. <https://doi.org/10.21273/hortsci.40.7.2016>.
  24. Larkin, R.P.; Honeycutt, C.W.; Olanya, O.M. Management of Verticillium Wilt of Potato with Disease-Suppressive Green Manures and as Affected by Previous Cropping History. *Plant Dis.* **2011**, *95*, 568–576. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-10-0670>.
  25. Woolliams, G.E. Host range and symptomatology of *Verticillium dahliae* in economic, weed, and native plants in interior British Columbia. *Can. J. Plant Sci.* **1966**, *46*, 661–669. <https://doi.org/10.4141/cjps66-110>.
  26. Duniway, J.M. Status of Chemical Alternatives to Methyl Bromide for Pre-Plant Fumigation of Soil. *Phytopathology* **2002**, *92*, 1337–1343. <https://doi.org/10.1094/phyto.2002.92.12.1337>.
  27. Villarino, M.; Larena, I.; Melgarejo, P.; De Cal, A. Effect of chemical alternatives to methyl bromide on soil-borne disease incidence and fungal populations in Spanish strawberry nurseries: A long-term study. *Pest Manag. Sci.* **2021**, *77*, 766–774.
  28. Debaeke, P.; Bret-Mestries, E.; Aubertot, J.N.; Casadebaig, P.; Champolivier, L.; Dejoux, J.F.; Seassau, C. Sunflower agronomy: 10 years of research in partnership within the “Sunflower” Technological Joint Unit (UMT) in Toulouse. *OCL Oilseeds Fats Crops Lipids* **2020**, *27*, 14.
  29. Ait Kaci Ahmed, N.; Dechamp-Guillaume, G.; Seassau, C. Biofumigation to protect oilseed crops: Focus on management of soilborne fungi of sunflower. *OCL Oilseeds Fats Crops Lipids* **2020**, *27*, 59. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020052>.
  30. Kirkegaard, J.A.; Gardner, P.A.; Desmarchelier, J.M.; Angus, J.F. Biofumigation: Using Brassica species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. In Proceedings of the 9th Australian Research Assembly on Brassicas, Wagga Wagga, Australia, 5–7 October 1993; pp. 1–77.
  31. Kirkegaard, J.A.; Matthiessen, J.N. Developing and refining the biofumigation concept. *Agroindustria* **2004**, *3*, 233–239.
  32. Fenwick, G.R.; Heaney, R.K.; Mullin, W.J.; VanEtten, C.H. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1983**, *18*, 123–201. <https://doi.org/10.1080/10408398209527361>.
  33. Brown, P.D.; Morra, M.J. Control of Soil-Borne Plant Pests Using Glucosinolate-Containing Plants. In *Advances in Agronomy*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1997; Volume 61, pp. 167–231.
  34. van Dam, N.M.; Tytgat, T.O.G.; Kirkegaard, J.A. Root and shoot glucosinolates: A comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 171–186. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9101-9>.

35. Mithen, R. Glucosinolates—Biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regul.* **2001**, *34*, 91–103. <https://doi.org/10.1023/a:1013330819778>.
36. Olivier, C.; Vaughn, S.F.; Mizubuti, E.S.G.; Loria, R. Variation in Allyl Isothiocyanate Production Within Brassica Species and Correlation with Fungicidal Activity. *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 2687–2701. <https://doi.org/10.1023/A:1020895306588>.
37. Neubauer, C.; Heitmann, B.L.; Müller, C. Biofumigation potential of Brassicaceae cultivars to *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2014**, *140*, 341–352. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0467-9>.
38. Seassau, C.; Desserr, D.; Desplanques, J.; Mestries, E.; Dechamp-Guillaume, G.; Alletto, L. Control of *Verticillium dahliae* causing sunflower wilt using Brassica cover crops. In Proceedings of the 19th International Sunflower Conference, Edirne, Turkey, 29 May–3 June 2016; p. 1230.
39. Michel, V.V. Ten years of biofumigation research in Switzerland. In Proceedings of the 5th International Symposium of Biofumigation, Newport, UK, 9 September 2014; Volume 126, pp. 1–5.
40. Matthiessen, J.N.; Kirkegaard, J. Biofumigation and Enhanced Biodegradation: Opportunity and Challenge in Soilborne Pest and Disease Management. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2006**, *25*, 235–265. <https://doi.org/10.1080/07352680600611543>.
41. Subbarao, K.V.; Hubbard, J.C.; Koike, S.T. Evaluation of Broccoli Residue Incorporation into Field Soil for *Verticillium* Wilt Control in Cauliflower. *Plant Dis.* **1999**, *83*, 124–129. <https://doi.org/10.1094/pdis.1999.83.2.124>.
42. Matthiessen, J.N.; Warton, B.; Shackleton, M.A. The importance of plant maceration and water addition in achieving high Brassica-derived isothiocyanate levels in soil. *Agroindustria* **2004**, *3*, 277–281.
43. Gimsing, A.; Kirkegaard, J. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of Brassica biofumigants. *Soil Biol. Biochem.* **2006**, *38*, 2255–2264. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.024>.
44. Michel, V.V. Biofumigation – principe et application. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* **2008**, *40*, 95–99.
45. Morris, E.K.; Fletcher, R.; Veresoglou, S. Effective methods of biofumigation: A meta-analysis. *Plant Soil* **2020**, *446*, 379–392. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04352-y>.
46. Booth, E.J.; Walker, K.C.; Griffiths, D.W. A time-course study of the effect of sulphur on glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*) from the vegetative stage to maturity. *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *56*, 479–493. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740560408>.
47. Sarwar, M.; Kirkegaard, J.A. Biofumigation potential of brassicas II: Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. *Plant Soil* **1998**, *201*, 91–101.
48. Motisi, N.; Doré, T.; Lucas, P.; Montfort, F. Dealing with the variability in biofumigation efficacy through an epidemiological framework. *Soil Biol. Biochem.* **2010**, *42*, 2044–2057. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.016>.
49. Justes, E.; Mary, B.; Nicolardot, B. Quantifying and modelling C and N mineralization kinetics of catch crop residues in soil: Parameterization of the residue decomposition module of STICS model for mature and non mature residues. *Plant Soil* **2009**, *325*, 171–185. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9966-4>.
50. Alonso-Ayuso, M.; Gabriel, J.L.; Quemada, M. The Kill Date as a Management Tool for Cover Cropping Success. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109587>.
51. Phillips, D.A. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1980**, *31*, 29–49. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.31.060180.000333>.
52. Peoples, M.B.; Brockwell, J.; Herridge, D.F.; Rochester, I.J.; Alves, B.J.R.; Urquiaga, S.; Boddey, R.M.; Dakora, F.D.; Bhattarai, S.; Maskey, S.L.; et al. The contributions of nitrogen-fixing crop

- legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* **2009**, *48*, 1–17. <https://doi.org/10.1007/bf03179980>.
53. Tonitto, C.; David, M.; Drinkwater, L. Replacing bare fallows with cover crops in fertilizer-intensive cropping systems: A meta-analysis of crop yield and N dynamics. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2006**, *112*, 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.07.003>.
54. Massignam, A.; Chapman, S.; Hammer, G.; Fukai, S. Physiological determinants of maize and sunflower grain yield as affected by nitrogen supply. *Field Crops Res.* **2009**, *113*, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.06.001>.
55. Couëdel, A.; Kirkegaard, J.; Alletto, L.; Justes, É. Crucifer-legume cover crop mixtures for biocontrol: Toward a new multi-service paradigm. In *Advances in Agronomy*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; Volume 157, pp. 55–139.
56. Couëdel, A.; Alletto, L.; Kirkegaard, J.; Justes, É. Crucifer glucosinolate production in legume-crucifer cover crop mixtures. *Eur. J. Agron.* **2018**, *96*, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2018.02.007>.
57. Rosner, K.; Bodner, G.; Hage-Ahmed, K.; Steinkellner, S. Long-term Soil Tillage and Cover Cropping Affected Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Nutrient Concentrations, and Yield in Sunflower. *Agron. J.* **2018**, *110*, 2664–2672. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.03.0177>.
58. Tribouillois, H.; Cohan, J.-P.; Justes, E. Cover crop mixtures including legume produce ecosystem services of nitrate capture and green manuring: Assessment combining experimentation and modelling. *Plant Soil* **2016**, *401*, 347–364. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2734-8>.
59. APC; INRAE. *Crop Phenotyping and AgroEcology Experimental Facility*; 2018. INRAE – Castanet-Tolosan. <https://doi.org/10.15454/1.5483266728434124E12>.
60. Tribouillois, H.; Dürr, C.; Demilly, D.; Wagner, M.-H.; Justes, E. Determination of Germination Response to Temperature and Water Potential for a Wide Range of Cover Crop Species and Related Functional Groups. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161185>.
61. de Graaf, R.M.; Krosse, S.; Swolfs, A.E.; Brinke, E.T.; Prill, N.; Leimu, R.; van Galen, P.M.; Wang, Y.; Aarts, M.G.; van Dam, N.M. Isolation and identification of 4- $\alpha$ -rhamnosyloxy benzyl glucosinolate in *Noccaea caerulescens* showing intraspecific variation. *Phytochemistry* **2015**, *110*, 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.016>.
62. Willey, R.W. Intercropping—Its importance and research need: Part 1. Competition and yield advantages. *Field Crop Abstr.* **1979**, *32*, 1–10.
63. Bedoussac, L.; Justes, E. A comparison of commonly used indices for evaluating species interactions and intercrop efficiency: Application to durum wheat–winter pea intercrops. *Field Crops Res.* **2011**, *124*, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.05.025>.
64. Lemaire, G.; Gastal, F. N uptake and distribution in plant canopies. In *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops*, 1st ed.; Lemaire, G., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1997; pp. 3–43. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-60684-7>.
65. Debaeke, P.; Raffaillac, D. Normalized SPAD index and Nitrogen Nutrition Index (NNI): Two indicators of plant N status for sunflower crop. In *Proceeding of the 9th ESA Congress*, Varsovie, Poland, 4–7 September 2006; pp. 83–84.
66. Li, X.; Zhang, Y.; Ding, C.; Xu, W.; Wang, X. Temporal patterns of cotton Fusarium and Verticillium wilt in Jiangsu coastal areas of China. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12581. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12985-1>.
67. Campbell, C.L.; Madden, L.V. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 1990.
68. Ahrens, W.H.; Cox, D.J.; Budhwar, G. Use of the Arcsine and Square Root Transformations for Subjectively Determined Percentage Data. *Weed Sci.* **1990**, *38*, 452–458. <https://doi.org/10.1017/s0043174500056824>.

69. Zhou, Y.; Roosendaal, L.; Van Eerd, L.L. Increased nitrogen retention by cover crops: Implications of planting date on soil and plant nitrogen dynamics. *Renew. Agric. Food Syst.* **2020**, *35*, 720–729. <https://doi.org/10.1017/s1742170519000383>.
70. Sievers, T.; Cook, R.L. Aboveground and Root Decomposition of Cereal Rye and Hairy Vetch Cover Crops. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2018**, *82*, 147–155. <https://doi.org/10.2136/sssaj2017.05.0139>.
71. Paplomatas, E.J.; Bassett, D.M.; Broome, J.C.; DeVay, J.E. Incidence of Verticillium wilt and yield losses of cotton cultivars (*Gossypium hirsutum*) based on soil inoculum density of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **1992**, *82*, 1417–1420.
72. Harris, D.C.; Yang, J.R. The relationship between the amount of *Verticillium dahliae* in soil and the incidence of strawberry wilt as a basis for disease risk prediction. *Plant Pathol.* **1996**, *45*, 106–114. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-96.x>.
73. Thorup-Kristensen, K. Are differences in root growth of nitrogen catch crops important for their ability to reduce soil nitrate-N content, and how can this be measured? *Plant Soil* **2001**, *230*, 185–195. <https://doi.org/10.1023/a:1010306425468>.
74. Thorup-Kristensen, K.; Magid, J.; Jensen, L.S. Catch crops and green manures as biological tools in nitrogen management in temperate zones. In *Advances in Agronomy*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2003; pp. 227–302.
75. Elhakeem, A.; Bastiaans, L.; Houben, S.; Couwenberg, T.; Makowski, D.; van der Werf, W. Do cover crop mixtures give higher and more stable yields than pure stands? *Field Crops Res.* **2021**, *270*, 108217. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108217>.
76. Castro-Torres, I.G.; De la O Arciniega, M.; Gallegos-Estudillo, J.; Naranjo-Rodríguez, E.B.; Domínguez-Ortiz, M. Ángel *Raphanus sativus* L. var niger as a source of Phytochemicals for the Prevention of Cholesterol Gallstones. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 167–171. <https://doi.org/10.1002/ptr.4964>.
77. Neubauer, C.; Hüntemann, K.; Heitmann, B.; Müller, C. Suppression of *Verticillium dahliae* by glucosinolate-containing seed meal amendments. *Eur. J. Plant Pathol.* **2015**, *142*, 239–249. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0607-x>.
78. Klose, S.; Ajwa, H.A.; Browne, G.T.; Subbarao, K.; Martin, F.N.; Fennimore, S.A.; Westerdahl, B.B. Dose Response of Weed Seeds, Plant-Parasitic Nematodes, and Pathogens to Twelve Rates of Metam Sodium in a California Soil. *Plant Dis.* **2008**, *92*, 1537–1546. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-11-1537>.
79. Matthiessen, J.N.; A Shackleton, M. Biofumigation: Environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. *Pest Manag. Sci.* **2005**, *61*, 1043–1051. <https://doi.org/10.1002/ps.1086>.
80. Gimsing, A.L.; Kirkegaard, J. Glucosinolates and biofumigation: Fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 299–310. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9105-5>.
81. Seassau, C.; Dechamp-Guillaume, G.; Mestries, E.; Debaeke, P. Nitrogen and water management can limit premature ripening of sunflower induced by *Phoma macdonaldii*. *Field Crops Res.* **2010**, *115*, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.10.009>.
82. Ochiai, N.; Powelson, M.L.; Dick, R.P.; Crowe, F.J. Effects of Green Manure Type and Amendment Rate on Verticillium Wilt Severity and Yield of Russet Burbank Potato. *Plant Dis.* **2007**, *91*, 400–406. <https://doi.org/10.1094/pdis-91-4-0400>.
83. Davis, J.R.; Huisman, O.C.; Westermann, D.T.; Hafez, S.L.; Everson, D.O.; Sorensen, L.H.; Schneider, A.T. Effects of green manures on Verticillium wilt of potato. *Phytopathology* **1996**, *86*, 444–453.
84. Wheeler, T.A.; Bordovsky, J.P.; Keeling, J.W.; Mullinix, J.B.G. Effects of Crop Rotation, Cultivar, and Irrigation and Nitrogen Rate on Verticillium Wilt in Cotton. *Plant Dis.* **2012**, *96*, 985–989. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-11-0111-re>.
85. Cocozza, C.; Abdeldaym, E.A.; Brunetti, G.; Nigro, F.; Traversa, A. Synergistic effect of organic and inorganic fertilization on the soil inoculum density of the soilborne pathogens *Verticillium*

- dahliae* and *Phytophthora* spp. under open-field conditions. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2021**, *8*, 24. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00223-w>.
86. Tenuta, M.; Lazarovits, G. Ammonia and Nitrous Acid from Nitrogenous Amendments Kill the Microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **2002**, *92*, 255–264. <https://doi.org/10.1094/phyto.2002.92.3.255>.
87. Davis, J.R.; Huisman, O.C.; Everson, D.O.; Nolte, P.; Sorensen, L.H.; Schneider, A.T. Ecological Relationships of Verticillium Wilt Suppression of Potato by Green Manures. *Am. J. Potato Res.* **2010**, *87*, 315–326. <https://doi.org/10.1007/s12230-010-9135-6>.
88. Huber, D.; Römheld, V.; Weinmann, M. Relationship between Nutrition, Plant Diseases and Pests. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd ed.; Marschner, P., Ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2012; pp. 283–298. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384905-2.00010-8>.
89. Parr, M.; Grossman, J.M.; Reberg-Horton, S.C.; Brinton, C.; Crozier, C. Nitrogen Delivery from Legume Cover Crops in No-Till Organic Corn Production. *Agron. J.* **2011**, *103*, 1578–1590. <https://doi.org/10.2134/agronj2011.0007>.
90. Larkin, R.P.; Griffin, T.S.; Honeycutt, C.W. Rotation and Cover Crop Effects on Soilborne Potato Diseases, Tuber Yield, and Soil Microbial Communities. *Plant Dis.* **2010**, *94*, 1491–1502. <https://doi.org/10.1094/pdis-03-10-0172>.
91. Adeux, G.; Cordeau, S.; Antichi, D.; Carlesi, S.; Mazzoncini, M.; Munier-Jolain, N.; Bàrberi, P. Cover crops promote crop productivity but do not enhance weed management in tillage-based cropping systems. *Eur. J. Agron.* **2020**, *123*, 126221. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126221>.
92. Davis, J.R.; Huisman, O.C.; Everson, D.O.; Schneider, A.T. Verticillium wilt of potato: A model of key factors related to disease severity and tuber yield in Southeastern Idaho. *Am. J. Potato Res.* **2001**, *78*, 291–300. <https://doi.org/10.1007/bf02875694>.
93. Zavatta, M.; Muramoto, J.; Milazzo, E.; Koike, S.; Klonsky, K.; Goodhue, R.; Shennan, C. Integrating broccoli rotation, mustard meal, and anaerobic soil disinfestation to manage verticillium wilt in strawberry. *Crop Prot.* **2021**, *146*, 105659. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105659>.

## Publications scientifiques et communications associées à ce travail de thèse

[Neïla Ait-Kaci Ahmed](#), [Gregory Dechamp-Guillaume](#), [Celia Seassau](#). **[Biofumigation to protect oilseed crops: focus on management of soilborne fungi of sunflower](#)**

*OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, EDP, 2020, 27, [10.1051/ocl/2020052](https://doi.org/10.1051/ocl/2020052)

[Neila Ait Kaci Ahmed](#), [Celia Seassau](#). **[Effets multi services des cultures intermédiaires sur le tournesol : implantation et gestion des bioagresseurs](#)**

*UMT PACTOLE, Journée Tournesol 2020*, Nov 2020, Toulouse, France

[Neïla Ait Kaci Ahmed](#), [Dessere Diane](#), [Desplanques Jérémy](#), [Galaup Benoit](#), [Dechamp-Guillaume Grégory](#) and Celia Seassau. [Potential of brassica cover crop and biofumigation to reduce \*Verticillium dahliae\* germination and Sunflower Verticillium Wilt](#)  
*Biofumigation 7 Symposium*, Mar 2021, Crans-Montana, Switzerland

[Neila Ait Kaci Ahmed](#), [Benoit Galaup](#), [Jérémy Desplanques](#), [Grégory Dechamp-Guillaume](#), [Celia Seassau](#). [Ecosystem Services Provided by Cover Crops and Biofumigation in Sunflower Cultivation](#)  
*Agronomy*, MDPI, 2022, 12 (1), pp.120. [{10.3390/agronomy12010120}](#)

## Activités d'enseignement réalisées durant la thèse

Enseignements à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT) :

En 2eme et 3eme année

Disciplines enseignées :

Agronomie et Ecophysiologie

U.E Enseignées :

- TP Décrire, identifier, analyser les composants des agroécosystèmes **18h**
- TP Ressources-agro –relations plante et environnement **34h**
- TP Agriculture Urbaine **4h**
- Cours et TD Systèmes de cultures Innovants **6h**

**Enseignements réalisés à l'Ecole d'Ingénieurs Purpan :**

TP sur la reconnaissance des maladies fongiques en grandes cultures, arboriculture et vigne.  
**20h**

**Abstract:**

Sunflower has agro-ecological benefits (low input, drought tolerant) and is an important oilseed crop. The crop is sown after an fallow period during which the soil remains uncovered, which can expose it to nutrient leaching. Also, two soilborne pests of the crop (*Verticillium dahliae* and *Orobanche cumana*) are expanding. Fallow period could be enhanced by sowing cover crops, such as Brassicaceae for their nitrate catching effects and allelopathic properties, which allow for the production of molecules with biocidal potential, especially during crushing and burial (biofumigation). In addition, Fabaceae can enhance nitrogen level in the soil. Their association could lead to a mutualisation of these effects.

The objective of the thesis was to evaluate the ecosystem services provided by the introduction of Brassicaceae or a Fabaceae, as sole crop or as mixtures, and biofumigation on sunflower. Potential dis-services on microbial communities of agronomic interest were also studied.

The selected cover crops were brown mustard, forage radish, turnip rape and purple vetch. Laboratory experiments involving exposure of *V. dahliae* and *O. cumana* to grinded tissues showed regulation of *V. dahliae* development on culture medium by Brassicaceae and of *O. cumana* germination (predominant effect of brown mustard) and more variable effects of grinded tissues on the number of Orobanche attachments or emergences.

In the field, the regulation of Verticillium wilt is more variable. Fodder radish seems to be the most promising cover crop to control this disease, with a reduction in damage reaching 40% in 2016. However, this control could depend on different factors (meteorological and technical). The effects of cover crops on soil nitrogen levels and yields, compared to bare soil, are also variable depending on the year and the species of cover crops. An increase in nitrogen (+50 kg.N.ha<sup>-1</sup>) was observed in 2019, following purple vetch. An increase in sunflower yield was observed (+0.7 t.ha<sup>-1</sup>) following purple vetch in 2020, but reductions (-0.5 to -0.6 t.ha<sup>-1</sup>) were also noted. Finally, no dis-service to microbial communities was identified during this thesis work.

Cover crops and biofumigation, in particular fodder radish or purple vetch, have the potential to provide ecosystem services, but their expression depends on the weather conditions and the crop itinerary. Further research is needed to confirm the observed effects, and could be based on a wider diversity of species and varieties of radish, vetch and sunflower to be evaluated. Validations within experimental networks of farmers could also be envisaged.

**Auteur :** Neila AIT KACI AHMED

**Titre :** Evaluation des services et dis-services écosystémiques rendus par les cultures intermédiaires multi-services et par la biofumigation pour améliorer la productivité du tournesol

**Directeurs de thèse :** Célia SEASSAU et Grégory DECHAMP-GUILLAUME

**Soutenance :** 06 Octobre 2022

**Discipline :** Agrosystèmes, écosystèmes et environnement

**Adresse :** UMR 1248 AGIR – INRAE – INP - 24 chemin de Borde Rouge 31326 Castanet-Tolosan

**Mots clefs :** *Verticillium dahliae*, *Orobanche cumana*, *Helianthus annuus*, Brassicacées, Fabacées

### **Résumé :**

Le tournesol présente des atouts agro-écologiques (économe en intrants, tolérant à la sécheresse) et occupe une place importante parmi les cultures oléagineuses. La culture est semée après une interculture pendant laquelle le sol reste sans couverture, ce qui peut l'exposer à une lixiviation de nutriments. Aussi, deux bioagresseurs telluriques de la culture (*Verticillium dahliae* et *Orobanche cumana*) sont en expansion. L'interculture pourrait être valorisée par l'implantation de cultures intermédiaires multi-services (CIMS), telles que des Brassicacées pour leurs effets pièges à nitrates et leurs propriétés allélopathiques, qui permettent une production de molécules au potentiel biocide, notamment lors de son broyage et de son enfouissement (biofumigation). De plus, des Fabacées peuvent enrichir le sol en nitrates. Leur association pourrait induire une mutualisation de ces effets.

L'objectif de la thèse était d'évaluer des services écosystémiques fournis par l'introduction de Brassicacées ou une Fabacée, seules ou associées, et de la biofumigation sur le tournesol. Des potentiels dis-services sur des communautés microbiennes d'intérêt agronomique ont aussi été étudiés.

Les CIMS choisies étaient la moutarde brune, le radis fourrager, la navette fourragère et la vesce du Bengale. Les expérimentations menées au laboratoire qui visaient à exposer *V. dahliae* et *O. cumana* à des broyats ont mis en évidence des régulations du développement du *V. dahliae* sur milieu de culture grâce aux Brassicacées et de la germination d'*O. cumana* (effet prédominant de la moutarde brune) et des effets plus variables des broyats sur le nombre de fixations ou d'émergences d'Orobanche.

Au champ, la régulation de la Verticilliose est plus variable. Le radis fourrager semble être la CIMS la plus prometteuse pour lutter contre cette maladie, avec une réduction des dégâts ayant atteint 40% en 2016. Cependant, cette régulation pourrait dépendre de différents facteurs (météorologiques et techniques). Les effets des CIMS sur les quantités d'azote dans le sol et des rendements, en comparaison au sol nu, sont également variables en fonction des années et des CIMS. Une augmentation de l'azote (+50 kg.N.ha<sup>-1</sup>) a été observée en 2019, suite à la vesce du Bengale. Une augmentation du rendement du tournesol a été observée (+0.7 t.ha<sup>-1</sup>) suite à la vesce du Bengale en 2020, mais des réductions (-0.5 à -0.6 t.ha<sup>-1</sup>) sont également à noter suite à un mélange. Aucun dis-service à l'égard de communautés microbiennes n'a été identifié durant ce travail de thèse.

Les CIMS et la biofumigation, en particulier le radis fourrager ou la vesce du Bengale, auraient le potentiel de fournir des services écosystémiques, mais leur expression dépend des conditions météorologiques et de l'itinéraire cultural mis en place. Des travaux sont nécessaires afin de confirmer les effets observés, et pourraient s'appuyer sur une plus large diversité d'espèces et de variétés de radis, de vesces ainsi que de tournesols à évaluer. Des validations au sein de réseaux d'expérimentation chez des agriculteurs pourraient aussi être envisagées.