



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Agrosystèmes, écosystèmes et environnement

Présentée et soutenue par

Célia SEASSAU

Le Mardi 2 février 2010

Titre :

*Etiologie du syndrome de dessèchement précoce du tournesol : implication de *Phoma macdonaldii* et interaction avec la conduite de culture*

JURY

Patrice Rey - Professeur ENITAB - Président du Jury

Vincent Lecomte - Ingénieur régional CETIOM - Examineur

Christian Gary - Directeur de recherche CIRAD-INRA-SupAgro - Rapporteur

Philippe Lucas - Directeur de recherche INRA - Rapporteur

Grégory Dechamp-Guillaume - Professeur INP-ENSAT - Directeur de thèse

Philippe Debaeke - Directeur de recherche INRA - Directeur de thèse

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries*

Unité de recherche : *UMR INRA/INPT-ENSAT 1248 AGrosystèmes et développement territorial*

Directeur(s) de Thèse : *Grégory Dechamp-Guillaume et Philippe Debaeke*

Rapporteurs : *Christian Gary et Philippe Lucas*

Remerciements

Pendant les dernières semaines de rédaction de ma thèse, je pensais que le meilleur moment serait la rédaction des remerciements. Mais avec un peu de recul, c'est indéniablement le plus délicat. Trois années d'une aventure collective s'achèvent, et beaucoup de moments partagés sont bien loin d'être oubliés...

Avant de citer toutes les personnes, qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail de thèse, je tenais à remercier le Cetiom et la région Midi-Pyrénées pour avoir financé ces trois années de recherche, ainsi que l'ASEDI-SO et Promosol pour ces petites escapades respectives à Cordoue en soutenant ma participation au 17^e colloque international sur le tournesol, et à Tours à la 9^e conférence internationale sur les maladies des plantes.

Le plus grand des MERCI sera sans aucun doute pour mes « chefs » Grégory Dechamp-Guillaume et Philippe Debaeke. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez pu m'apporter. Vous cherchiez quelqu'un qui ait le goût du terrain ? Je pense avoir rempli ma part du contrat. Mais en signant, j'étais loin d'imaginer à quel point cette aventure serait mémorable. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en me permettant de travailler à vos côtés. Merci pour votre encadrement exemplaire (je n'aurais pu espérer mieux), vos précieux conseils, vos remarques constructives, et votre grande disponibilité. Vous m'avez apportée différemment (une triangulaire bien hiérarchisée), mais d'une complémentarité qui n'aurait pu être plus parfaite !

Pour m'avoir accompagné à chaque instant de cette thèse, je remercie tout autant que mes « chefs », Emmanuelle Mestries. Merci de m'avoir fait partager ton expérience et tes connaissances sur le « pied sec ». Ton aide et ta disponibilité m'ont été des plus précieuses dans la réflexion comme sur le terrain, et je ne t'en remercierai jamais assez. Ton entrain, ton soutien dans ce projet, et ton dynamisme m'ont permis d'avancer et de garder le sourire à chaque isolement, notation, pied arraché...

Tout ce travail aurait été impossible sans l'aide de toutes les personnes qui se sont investies sur le terrain à mes côtés. Je ne remercierai jamais assez les techniciens de l'INRA avec qui j'ai pu travailler en totale confiance et main dans la main. Un grand merci tout particulièrement à Didier Raffailac et Michel Labarrère, avec qui j'ai partagés de superbes moments au champ comme à la serre. Merci pour m'avoir apporté votre expérience de terrain, votre aide précieuse, et ces moments d'évasion hors de mon bureau même si le travail y était parfois dur. Un grand merci également à Pierre Perrin, pour son aide précieuse en serre comme au champ, ces paris de rugby, potager et pauses C&C. Je n'oublie pas non plus Colette Quiquiry et Nathalie Seguin, qui se sont investies dans ce travail, et je vous en remercie infiniment. Merci également au domaine et plus particulièrement à Eric Bazerte pour avoir conduit les essais et sa partenaire sur la piste, mais laisser conduire le volant de sa mois-bat pour moissonner mon champ. Je remercie également Anthony Doumenc, Julien Sanyas, Alain Bammé, et Vanessa Demoisson du Cetiom, pour leur gentillesse et leur rigueur à conduire les essais à En-Crambade et Grignon, qui m'ont été indispensables à ce travail de thèse. J'ai également une pensée pour Pierre Jouffret et André Estragnat qui m'ont fait confiance et soutenu dans ce projet, et pour ces discussions qui m'ont ouvert l'esprit.

Je remercie également tous les stagiaires qui m'ont accompagné. Sans l'aide de Guillaume, Aude, Cécilia, Aurélie, Cyril, et Antonio, tout ceci n'aurait pas été possible. Votre dynamisme, motivation et bonne humeur m'ont été des plus bénéfiques. Je peux dire sans me

tromper que nous nous souviendrons longtemps de ces journées de contaminations et de notations au champ et en serre, ainsi que tous ces isolements au labo...

Je suis également très reconnaissante à Jean-Noël Aubertot, Francis Flénet, Bruno Grezes-Besset, Pierre Maury d'avoir accepté de participer à mon comité de pilotage. Une mention spéciale sera décernée à Jean-Noël pour avoir ajouté « homoscédasticité » et « transformation arc-sinus » à mon vocabulaire... Gomez et Gomez sont même devenus mes partenaires de travail, qui l'eu cru ! Merci pour ces amortis et quelques smatches qui m'ont permis de reconsidérer ma technique de travail !

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Eric Justes et Laurent Deslandes, ainsi que Nicolas Langlade et Pierre Jouffret pour leur aide ponctuelle mais des plus cruciales lors de la préparation de la soutenance. Vos conseils m'ont permis d'avoir un autre regard sur mon travail et d'être fin prête pour le jour « J ». Comme une suite logique, pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer mon travail de thèse, je remercie Christian Gary et Philippe Lucas, rapporteurs, ainsi que Patrice Rey et Vincent Lecomte, membres du jury, de m'avoir fait l'honneur d'examiner et de débattre autour de ce travail.

Ces trois années n'auraient pas aussi « parfaites », sans l'accueil des personnes de l'UMR AGIR. Un grand merci à Françoise Roux pour la gestion administrative des doctorants et qui trouve toujours la solution pour améliorer notre quotidien ! Merci également à Geneviève Santoro, Maryse Perreu et Christel Moder pour leur disponibilité. Je n'oublie pas non plus Pablo Cruz et Eric Lecloux pour leur gentillesse et sans qui Mr Shapiro Wilk n'aurait pu me guider tout au long de mes escapades statisticiennes... J'en profite pour remercier mes amis jeunes docteurs ou en devenir (Pierre, Lucie, Clémentine, Lucie, Solenne, Guillaume & Laurent) pour leur bonne humeur, conseils, soutien et petits plats !

Je souhaiterais désormais remercier ma famille et mes amis pour avoir contribué grandement à ce que ces 3 années se passent aussi bien ... En effet, quoi de plus important que le soutien et la reconnaissance de ses proches au quotidien et pendant les dernières semaines de la rédaction ? J'ai une pensée particulière pour mes parents, Michèle et Martial. Je ne vous remercierai jamais assez pour l'éducation que vous m'avez apportée, la chance de pouvoir étudier dans des conditions privilégiées, et me laissant voyager au gré de mes envies pour repiquer du riz en Asie et compter des fougères en Guadeloupe. Vous avez toujours cru en mes capacités, tout comme Tanguy Lafarge (mon maître de stage de Master 2), Jean Yves Dubuisson (mon Prof de fac) et je vous en remercie du fond du cœur. J'en profite pour vous pardonner vos infractions clandestines sur le site 3 jours avant la soutenance, et tout ce stress que vous avez partiellement réussi à contenir ! Je remercie tout autant ma tante Nicole et ma grand-mère Hélène pour leurs si bons petits plats et leurs pensées de Nice qui m'ont réchauffé le cœur pendant cet hiver rigoureusement rédactionnel. Pour leur soutien quotidien et leur incroyable patience, je ne remercierai jamais assez Laurent et Romain ! Qui eu cru que ce petit *scone* et cette après-midi « ca passera de mode » nous conduisent aussi loin... Vous avez su me booster quand il le fallait, me réconforter quand j'en avais besoin, m'accompagner dans mon oxygénation, et bien lourde tâche que de rassurer les angoisses de ma Moutmoutte ! Bref je dirais simplement que vous êtes des amis, des vrais ! Ceux sur qui on peut toujours compter et qui sont toujours là au RDV ! Un trio qui a pu alterner avec duo pour le boulot ou l'apéro. Merci également à Julien, Boris, Laurent, Hamid, Bastien et Max pour tous ces bons moments passés. En parlant de ça, je remercie James, mon sourcier préféré, et Farid pour ses petites pauses gustatives. Je remercie aussi mes amis : de Vergons et en particulier Marianne ma petite salade et Serge pour leur joie de vivre communicative, de Fac (Annabelle, Nicolaï, Timothée, Luc, Emile, Davis et Lucas) et Meryll mon éternel binôme, de l'INAPG Marion et

Elise mais surtout Natacha sans qui je ne serai pas en train d'écrire ces remerciements aujourd'hui. Si ce 18 mai 2006 tu ne m'avais pas envoyé en plaisantant cette offre de thèse, je serais certainement perdue quelque part en P...

Voilà, une page se tourne, mais merci à vous tous de m'avoir permis d'écrire la première...

Table des matières

Chapitre 1. Introduction	1-22
Contexte de l'étude.....	1
Cycle de développement du tournesol	4
La conduite de culture du tournesol	6
Choix variétal et implantation	6
Irrigation et fertilisation	7
Les principales maladies limitant la production quantitative et qualitative du tournesol	7
Le Mildiou.....	8
Le Sclerotinia	8
Le Phomopsis	9
Le Phoma.....	10
Etat des connaissances sur l'étiologie du dessèchement précoce du tournesol.....	15
Le syndrome du dessèchement précoce	15
Origine du dessèchement précoce : implication seule du Phoma ou présence d'un complexe parasitaire ?	17
Un enjeu pour les producteurs de tournesol : limiter les pertes de rendement par une conduite de culture adaptée	17
Questions de recherche et démarche scientifique	20
Chapitre 2. Matériels et méthodes	23-46
I. Matériel biologique.....	23
I. A. Matériel végétal : Choix des variétés de tournesol pour les essais	23
I. B. Matériel fongique : choix des souches de <i>Phoma macdonaldii</i> et de <i>Macrophomina phaseolina</i> pour la contamination artificielle.....	23
I. B. 1. Prélèvements de tissus sur tournesol et isolements des pathogènes présents sur milieu de culture.....	23
I. B. 2. Choix d'une souche de <i>Phoma macdonaldii</i>	24
I. B. 3. Choix d'une souche de <i>Macrophomina phaseolina</i>	27
II. Conduite de culture, dispositif expérimental et méthodes de contaminations artificielles en serre.....	29
II. A. Conduite de culture des essais	31
II. A. 1. Substrat des plantes.....	31
II. A. 2. Désinfection des semences et semis	31
II. A. 3. Environnement climatique dans la serre.....	32
II. A. 4. Le régime hydrique.....	32
II. A. 5. Fertilisation minérale	34
II. B. Dispositif expérimental des essais en serre et méthodes de contamination artificielle par du <i>Phoma macdonaldii</i>	34
II. B. 1. Les différentes méthodes de contamination artificielle par <i>Phoma macdonaldii</i>	34
II. B. 2. Méthode de contamination artificielle du substrat par des microsclérotos de <i>Macrophomina phaseolina</i>	36

III. Mise en place et conduite des essais au champ	37
III. A. Dispositif expérimental	39
III. B. Conduite de culture des essais	39
III. B. 1. Fertilisation azotée	39
III. B. 2. Irrigation	40
III. C. Contamination artificielle et naturelle	40
IV. Variables étudiées en serre et au champ	41
IV. A. Mesures des variables environnementales	41
IV. B. Mesures de variables biologiques	41
IV. B. 1. Phénologie des plantes	41
IV. C. Architecture des plantes	42
IV. C. 1. Surface foliaire	42
IV. C. 2. Efficacité d'interception du rayonnement par le couvert végétal	42
IV. C. 3. Sénescence foliaire	42
IV. D. Indicateurs du statut azoté de la culture	43
IV. D. 1. Teneur en azote des tissus (<i>Nm</i>)	43
IV. D. 2. Indice de nutrition azotée (INN)	43
IV. D. 3. Teneur en chlorophylle des tissus (SPAD)	44
IV. E. Elaboration du rendement (serre)	44
IV. F. Progression des attaques de <i>Phoma</i> au collet et suivi du dessèchement précoce des plantes	44
V. Analyses statistiques	46

Chapitre 3. Le dessèchement précoce : complexe parasitaire ou implication seule du *P. macdonaldii* **47-60**

I. Mise en évidence d'un complexe parasitaire de bas de tige en parcelles agricoles	48
I. A. Objectif de l'expérimentation	48
I. B. Matériels et méthodes	48
I. C. Résultats	48
I. C. 1. Fréquence globale de <i>Phoma</i> , <i>Macrophomina</i> et <i>Fusarium</i> spp. sur les plantes prélevées en fin de cycle cultural	48
I. C. 2. Fréquence différentielle de <i>Phoma</i> , <i>Macrophomina</i> et <i>Fusarium</i> spp. selon les tissus considérés	49
I. C. 3. Fréquence de <i>Phoma</i> , <i>Macrophomina</i> et <i>Fusarium</i> spp. sur les pieds secs avérés	50
I. D. Discussion	51
I. E. Conclusion	52
II. <i>P. macdonaldii</i> : agent causal principal du dessèchement précoce ?	53
II. A. Objectif de l'expérimentation	53
II. B. Dispositif expérimental	54
II. C. Variables mesurées	54
II. C. 1. Suivis de la progression de la maladie et de ses dégâts	54
II. C. 2. Observation du système racinaire et mise en évidence de <i>Phoma</i> et de <i>Macrophomina</i> par des isolements	54
II. D. Résultats	55
II. D. 1. Suivi des pieds secs et de la sénescence	55

II. D. 2. Observation des symptômes au collet et sur racine pour chaque traitement « inoculum ».....	56
II. D. 3. Isolements de <i>Phoma</i> et <i>Macrophomina</i> sur les organes infectés	58
II. E. Discussion	58
II. F. Conclusion.....	60

Chapitre 4. Origine du dessèchement précoce et caractérisation du pied sec 61-89

I. Evaluation of <i>P. macdonaldii</i> inoculation methods to reproduce sunflower premature ripening.....	62
I. A. Introduction	62
I. B. Materials and methods	64
I. B. 1. Experimental design and crop management systems	64
I. B. 2. Fungal isolates.....	65
I. B. 3. Inoculum	65
I. B. 4. Infected residues and mycelium inoculum experiment.....	65
I. B. 5. Pycniospores dose-response experiment.....	66
I. B. 6. Isolation	67
I. B. 7. Sample preparation for microscopy and imaging techniques	67
I. B. 8. Disease assessment and data analyses	67
I. C. Results.....	68
I. C. 1. Infected residues and mycelium inoculation.....	68
I. C. 2. Pycniospores and mycelium inoculation	72
I. D. Discussion.....	74
II. Caractérisation physiologique et morphologique d'un pied sec présentant une nécrose encerclante au collet.....	78
II. A. Objectif de l'expérimentation.....	78
II. B. Dispositif expérimental.....	78
II. C. Variables mesurées.....	79
II. C. 1. Suivi de la progression de la maladie, de la mortalité des plantes et observations des symptômes au collet.....	79
II. C. 2. Mesures de surface foliaire et de sénescence	79
II. C. 3. Suivi de la consommation en eau des plantes	79
II. C. 4. Composantes du rendement.....	80
II. D. Résultats.....	80
II. D. 1. Suivi de la mortalité des plantes.....	80
II. D. 2. Vitesse de sénescence des plantes.....	81
II. D. 3. Suivi de la consommation en eau des plantes contaminées et des plantes témoins	82
II. D. 4. Observation de la morphologie de bas de tige des plantes contaminées.....	83
II. D. 5. Effet du pied sec sur la nuisibilité	86
II. E. Discussion	86
II. F. Conclusion.....	89

Chapitre 5. La conduite de culture peut-elle moduler l'expression du syndrome de dessèchement précoce ? 91-116

I. Nitrogen and water management can limit premature ripening of sunflower induced by <i>Phoma macdonaldii</i>	92
I. A. Introduction	92
I. B. Materials and methods.....	93
I. B. 1. Experimental design and crop management systems	93
I. B. 2. <i>Phoma</i> isolates and plant inoculation	95
I. B. 3. Disease assessment.....	95
I. B. 4. Assessment of crop nitrogen and water status.....	96
I. B. 5. Statistical analyses.....	97
I. C. Results	97
I. C. 1. Effect of climate and crop management on plant water and plant nitrogen status.	97
I. C. 2. Effect of year on AUDPC and PR.....	98
I. C. 3. Effect of artificial inoculation and natural infection on AUDPC and PR.....	99
I. C. 4. Effects of individual agronomic factors on AUDPC and PR.....	99
I. D. Discussion	105
I. E. Conclusion	108
II. L'augmentation de la densité de peuplement peut-elle accélérer le dessèchement précoce du tournesol ?	109
II. A. Objectif de l'expérimentation	109
II. B. Dispositif expérimental et conduite de culture.....	109
II. B. 1. Variables mesurées et traitement statistique	110
II. C. Résultats	110
II. C. 1. Effet de la densité de peuplement sur le dessèchement précoce en contamination artificielle par <i>P. macdonaldii</i>	110
II. C. 2. Effet de la densité de peuplement sur la vitesse d'apparition du dessèchement précoce après contamination artificielle.....	112
II. D. Discussion.....	114
II. D. Conclusion.....	115

Chapitre 6. Proposition d'un modèle conceptuel pour expliquer les effets de l'azote et de la densité de peuplement sur le dessèchement précoce 117-148

I. Effet de la fertilisation azotée et de la densité de peuplement sur le microclimat dans un couvert de tournesol	119
I. A. Objectif de l'expérimentation	119
I. B. Variables mesurées.....	119
I. B. 1. Mesures microclimatiques.....	119
I. B. 2. Mesures SPAD	120
I. B. 3. Teneur en azote des plantes.....	120
I. B. 4. Mesure de l'efficacité d'interception	120
I. B. 5. Suivi de l'infection au collet	120
I. B. 6. Traitement statistique	121
I. C. Résultats	121
I. C. 1. Effet de l'azote sur le microclimat sous le couvert végétal.....	121

I. C. 2. Effet de la densité de peuplement sur le microclimat sous le couvert de tournesol	125
I. D. Discussion	129
I. E. Conclusion	130
II. Effet de l'azote et de la densité de peuplement sur la morphologie de la tige au collet..	132
II. A. Objectif de l'expérimentation	132
II. B. Variables mesurées et traitement statistique	132
II. B. 1. Mesure du diamètre au collet de la plante.....	132
II. B. 2. Suivi d'apparition des symptômes	132
II. B. 3. Traitement statistique.....	133
II. C. Résultats.....	133
II. C. 1. Effet de l'azote sur la morphologie de la tige au collet, et conséquences sur la progression du pathogène et le dessèchement précoce	133
II. C. 2. Effet de la densité de peuplement sur la morphologie du collet, et ses conséquences sur la progression du pathogène et le dessèchement précoce.....	135
II. D. Discussion.....	137
II. E. Conclusion.....	138
III. Effet du statut azoté sur le développement du pathogène dans les tissus de la plante ...	139
III. A. Objectif de l'expérimentation.....	139
III. B. Variables mesurées et traitement statistique.....	139
III. B. 1. Mesures SPAD	139
III. B. 2. Suivi de l'évolution des nécroses au collet.....	139
III. B. 3. Suivi de l'apparition des pieds secs et de la sénescence.....	140
III. B. 4. Traitement statistique	140
III. C. Résultats.....	140
III. C. 1. Caractérisation des différents niveaux de fertilisation	140
III. C. 2. Evolution des nécroses au collet.....	141
III. C. 3. Suivi de la sénescence et de l'apparition des pieds secs.....	143
III. D. Discussion	145
III. E. Conclusion	147

Chapitre 7. Conclusions et perspectives

149-164

<i>P. macdonaldii</i> est l'agent causal du syndrome de dessèchement précoce du tournesol résultant d'attaques de bas de tige	151
Le dessèchement précoce est occasionné par une attaque de bas de tige qui induit un arrêt de la transpiration des plantes et une sénescence accélérée.	151
Vers un diagnostic du pied sec au champ	152
Reproduire le syndrome de dessèchement précoce pour l'évaluation variétale et la préconisation culturale : intérêts et limites des méthodes de contamination artificielle. ..	155
L'utilisation des résidus de cultures	155
La contamination artificielle par des spores de <i>P. macdonaldii</i>	156
La conduite de culture est un levier permettant de contrecarrer l'évolution du dessèchement précoce du tournesol.....	158
Une alimentation azotée abondante favorise la progression du pathogène dans la plante et rend possible l'expression généralisée du syndrome.....	158
Une densité de peuplement élevée accélère et amplifie le syndrome de dessèchement précoce.....	159

Un régime hydrique limitant après floraison précipite le dessèchement des plantes par une rupture assez brutale de la transpiration.....	159
Quelles implications opérationnelles pour la conduite de culture du tournesol ?	160
Vers un outil d'évaluation intégré de l'itinéraire technique tenant compte du complexe parasitaire du tournesol.....	163
Références bibliographiques	165
Annexes	175

Chapitre 1. Introduction

Figure I. 1 : Evolution des rendements (q/ha) et de la surface cultivée en tournesol (1000 ha) en France entre 1973 et 2007. (Source : SCEES, ONIOL) -1-

Figure I. 2. Surfaces départementales (ha) allouées au tournesol en 2007 (Source : SCEES, ONIOL) - 2-

Figure I. 3. Symptômes caractéristiques d'une attaque de *Phoma* sur les différents organes du tournesol -10-

Figure I. 4. Cycle biologique de *Phoma macdonaldii* / *Leptosphaeria lindquistii* -12-

Figure I.5. Variabilité morphologique des colonies de *Phoma macdonaldii* et de la pigmentation des souches -13-

Figure I. 6. Description et symptômes des principales maladies du tournesol (Mildiou, Phomopsis, *Phoma* et Sclerotinia), facteurs favorisant la maladie et mesures préventives. (Source : AGRIDEA, 2006) -15-

Tableau I. 1 . Efficacité actuelle des méthodes de lutte mises en œuvre sur tournesol (source : Expertise scientifique collective "Pesticides, agriculture et environnement" (Aubertot et al., 2006) -16-

Figure I. 7. Parcelle de coteau présentant des zones de dessèchement précoce à la suite d'une attaque de bas de tige par du *Phoma* dans le Lauragais (31), début août 2005 -20-

Figure I. 8. Parcelle de tournesol desséchée précocement en plaine à la suite d'une attaque de bas de tige par du *Phoma* dans le Lauragais (31), le 30 août 2006 -21-

Figure I. 8. Schéma conceptuel des relations entre l'agent pathogène (*Phoma* seul ou complexe parasitaire), la plante hôte (le tournesol), l'environnement et la conduite de culture. Les cadres en violet et en vert correspondent aux variables liées aux agents pathogènes et au système de culture (SDC) respectivement. Seul les facteurs écrits en noir seront étudiés et testés expérimentalement pour l'étude sur l'étiologie du dessèchement précoce du tournesol -22-

Chapitre 2. Matériels et méthodes

Figure II. 1. Fragments prélevés entre la tige et le système racinaire sur des cannes de tournesol -24-

Figure II. 2 Méthode de contamination artificielle par une pastille de mycélium de *Phoma macdonaldii* au collet de la plante de tournesol -25-

Figure II. 3. Echelle de notation des dégâts provoqués par *Phoma* sur collet et racines de tournesol allant de la classe 0 (pied sain) à la classe 4 (pied sec) -26-

Figure II. 4. Contamination artificielle au collet par des microsclérotés de *Macrophomina* par la méthode des cure-dents (Young, 1943) -28-

Figure II. 5. Observation de symptômes au collet, pour la variété Heliasol RM, 4 semaines après contamination par un cure-dent témoin (A), portant par des microsclérotés de *Macrophomina* des souches M1 (B) et M2 (C) -29-

Tableau II. 1. Tableau récapitulatif des expérimentations menées en serre entre 2007 et 2009 sur les domaines expérimentaux d’Auzeville (Auz), En-Crambade (EC) et Grignon (Gri)	-30-
Figure II. 6. Serre d’Auzeville (gauche) et tunnel bâché d’En-Crambade (droite)	-32-
Figure II. 7. Schéma représentant la gamme de poids des pots entre la capacité au champ et le poids sec, permettant de piloter le stress hydrique des plantes pour les maintenir dans une zone de stress entre 30 % et 50 % de la réserve utile du substrat	-33-
Figure II. 8. Extraction d’une suspension de spores de <i>Phoma macdonaldii</i> (B) à partir d’une culture de la souche monopycniospore MPH2 (A), déposée sur un disque de cellulose pour une contamination artificielle au collet (C)	-36-
Figure II. 9 . Contamination artificielle à la floraison par des microsclérotés de <i>Macrophomina phaseolina</i> à partir du sol	-37-
Tableau II. 2. Tableau récapitulatif des expérimentations menées au champ entre 2006 et 2009 sur le domaine expérimental d’Auzeville	-38-
Figure II. 10. Représentation graphique du calcul de l’AUDPC	-45-
 Chapitre 3. Le dessèchement précoce : complexe parasitaire ou implication seule du <i>P. macdonaldii</i>	
Figure III. 1. Fréquence de <i>Phoma</i> , <i>Macrophomina</i> et <i>Fusarium</i> spp. entre le 2 août et le 4 septembre 2006 indépendamment du tissu isolé	-49-
Figure III. 2. Fréquence de <i>Phoma</i> , <i>Macrophomina</i> et <i>Fusarium</i> spp. entre le 2 août et le 4 septembre 2006 en fonction de l’origine des tissus prélevés sur les cannes de tournesol : tige, collet, cortex, moelle, pivot et rhizoderme	-50-
Figure III. 3. Fréquence de <i>Phoma</i> , <i>Macrophomina</i> et <i>Fusarium</i> spp. sur des pieds de tournesol desséchés précocement entre le 2 août et le 4 septembre 2006, en fonction de l’origine des tissus prélevés : tige, collet, cortex, moelle, pivot et rhizoderme	-50-
Figure III. 4. Evolution du nombre de plantes mortes contaminées par <i>Phoma</i> , <i>Macrophomina</i> , <i>Phoma+Macrophomina</i> , et de plantes témoins non contaminées en fonction des jours après contamination au collet par <i>P. macdonaldii</i> à Auzeville (A), SAuz07 et En-Crambade (B), SEC07	-55-
Tableau III. 1. Moyenne de AUDPC _{PR} et de la proportion de pieds secs pour chaque traitement « inoculum » jusqu’à 84 DPI pour les sites d’Auzeville (SAuz07) et d’En-Crambade (SEC07).	-56-
Figure III. 5. Proportion de plantes contaminées par <i>Phoma</i> , <i>Macrophomina</i> , <i>Phoma+Macrophomina</i> , et plantes témoins non contaminées présentant une note collet et racine classe 0,1, 2, et 3 à Auzeville (A) et En-Crambade (B) en 2007	-57-
Tableau III. 2. Isolement de <i>P. macdonaldii</i> et <i>M. phaseolina</i> à partir de tissus du collet, de la tige et des racines pour chaque traitement « inoculum » à Auzeville et En-Crambade.	-58-

Chapitre 4. Origine du dessèchement précoce et caractérisation du pied sec

Figure IV. 1. **A** and **B**, Stem and root lesions on sunflower cv. Heliasol RM after artificial inoculation with *P. macdonaldii*. **A**, *Phoma* stem girdling necrosis after mycelium inoculation at stem base (arrow) with spreading of the fungus to the stem, and **B**, black bulges and necrosis (arrow) on plants grown with *P. macdonaldii* infested buried residue. **C**, Stem base cross-section of cv. Heliasol RM from plants noninoculated. bar = 250 µm. **D**, **E** and **F**, Stem base cross-section of plants inoculated with *P. macdonaldii* mycelium. **D**, Secondary xylem tissues colonized with *P. macdonaldii* hyphae (arrow). bar = 100 µm, **E**, primary xylem tissues colonized with *P. macdonaldii* hyphae. bar = 100 µm, and **F**, pith tissues extensively colonized with *P. macdonaldii* hyphae. bar = 100 µm.

-69-

Table IV. 1. AUDPCDS, Final percent of girdling necrosis (Final DS), AUDPCPR and final percent of premature ripened (final PR) of cv. Heliasol RM following artificial inoculation with *P. macdonaldii* mycelium at stem base at early bud stage; buried residues before sawing in Auzeville (SAuz07), En-Crambade (SEC07) and Grignon (SGri08); residues left at soil surface at early bud stage (SGri08); or non-inoculated plants (Control) -70-

Table IV. 2. Plant premature ripened (PR) and isolation of *P. macdonaldii* from sunflower cv. Heliasol RM following artificial inoculation with *P. macdonaldii* mycelium at stem base at early bud stage, infested buried residues and some left at the soil surface before sawing presenting stem base necrosis or not; or non-inoculated plants (Control) in Auzeville (SAuz07) and En-Crambade (SEC07) -72-

Figure IV. 2. Effect of artificial inoculation at stem base with mycelium, different pycniospore concentrations of *P. macdonaldii* and not inoculated (control) on the percent of sunflower cv. Heliasol RM with *Phoma* necrosis girdling stem base in SAuz08. Vertical bars indicate the LSD0.05 value. -73-

Figure IV. 3. Effect of artificial inoculation at stem base with different pycniospore concentrations, mycelium of *P. macdonaldii* or not inoculated (control) on the final percent of premature ripening at 78 days post inoculation (DPI) in SAuz08 (black bars) and in SAuz09 (squared bars). For each vertical bar, vertical lines represent the standard error of the mean. Premature ripening (%) means with different letters are significantly different by Fisher's protected LSD0.05 test. Values in vertical bars are the AUDPCPR calculated according to Campbell and Madden (1990) and based on the percent of plants premature ripened from inoculation at 78 DPI -74-

Figure IV. 4. Pourcentage de plantes mortes contaminées artificiellement au collet par *P. macdonaldii* et de plantes non contaminées (Témoins) en 2007 (**A**) et en 2009 (**B**) -81-

Figure IV. 5. Evolution de la surface chlorophyllienne d'un échantillon de plantes contaminées artificiellement au collet par *P. macdonaldii* et de plantes non contaminées (Témoins) en 2007 (**A**) et en 2009 (**B**) -82-

Figure IV. 6. Cumul moyen de la quantité d'eau évapotranspirée à depuis le début du stress hydrique à la floraison pour un échantillon de plantes contaminées artificiellement au collet par le *P. macdonaldii* et de plantes non contaminées (Témoin) en 2007 (**A**) et en 2009 (**B**) -83-

Tableau IV. 3. Observations morphologiques au collet pour des plantes contaminées artificiellement par *Phoma* et notées 'pieds secs' ou non à 83 DPI en 2007 et 77 DPI en 2009 -84-

Figure IV. 7. Bas de tige d'une plante notée 'pied sec' (**A**) et d'une plante non desséchée (**B**) toutes deux contaminées artificiellement au collet par *P. macdonaldii*. Observation à 83 DPI (2007) -84-

Figure IV. 8. Coupe longitudinale d'un bas de tige issu d'une plante notée 'pied sec' (A), et d'une plante non desséchée précocement (B) après contamination artificielle au collet par *P. macdonaldii* -85-

Tableau IV. 4. Comparaison de l'humidité des grains, du nombre de grains par capitule, ainsi que du poids de 1000 grains (PMG) entre les 21 pieds secs contaminés artificiellement au collet par *P. macdonaldii* et les 8 plantes témoins (Récolte 2009) -86-

Chapitre 5. La conduite de culture peut-elle moduler l'expression du syndrome de dessèchement précoce ?

Table V. 1 - Mean monthly temperature and relative humidity, and total monthly rainfall during the sunflower growing season recorded at a weather station near the experimental site -94-

Table V. 2 - Description of the main aspects of the crop management experiments carried out at INRA Auzeville from 2006 to 2008 -95-

Table V. 3 - Actual : potential evapotranspiration ratio ($ET_a : ET_0$) calculated by the SUNFLO model and Nitrogen Nutrition Index (NNI) values for cv. Heliasol RM under both water regimes (irrigated and rainfed) and three levels of N fertilization (N0, N75, N 150) throughout the disease development period after natural infection from 2006 to 2008. High values of ($ET_a : ET_0$) indicated an adequate water supply and water stress by ($ET_a : ET_0$) below 1. A value of $NNI \geq 1$ indicated a crop with ample N supply (N non-limiting); $NNI = 1$ was optimal N nutrition and below 1, N deficiency -98-

Table V. 4 - Mean values of AUDPC and final percentage of sunflowers prematurely ripened (PR) showing effects of two cultivars (cv. Heliasol and cv. Melody), different levels of N fertilization (N150, N75, N0) and two water regimes (irrigated, rainfed) with artificial inoculation (AI) and natural infection (NI) over the three years (2006 to 2008) -100-

Figure V. 1 - Relation between the percentage of sunflowers affected by premature ripening (PR) for 72 pairs of plots differing only for irrigation (irrigated, rainfed) from 2006 to 2008) -101-

Figure V. 2 - Relation between the percentage of sunflowers affected by premature ripening (PR) for 54 pairs of plots differing only in the quantity of N applied, from 2006 to 2008). Low nitrogen: 0 kg N ha⁻¹; High nitrogen: 150 kg N ha⁻¹ -102-

Figure V. 3 - Relationship between the percentage of sunflowers affected by premature ripening (PR) and the Nitrogen Nutrition Index (NNI) for cv. Heliasol RM in artificial inoculation (AI) and natural infection (NI) in 2006, 2007 and 2008 -102-

Figure V. 4 - Annual disease progress curves of premature ripening (PR) plants on both sunflower cultivars (cv. Heliasol RM and cv. Melody) for non-limiting (N150, irrigated) and stressed (N0, rainfed) nitrogen supply and water regime in artificial inoculation (A) and natural infection (B) -104-

Tableau V. 5. Analyse de variance de l'effet de la densité de peuplement sur l'AUDPC_{PR} entre 64 et 81 DPI en 2008 et 42 et 77 DPI en 2009 et de la proportion finale de pieds secs à 81 et 77 DPI en 2008 et 2009 respectivement -111-

Tableau V. 6 . Moyenne d'AUDPC_{PR} et proportion finale de pieds secs pour chaque densité de peuplement depuis la contamination artificielle jusqu'à 81DPI en 2008 et 77 DPI en 2009 -111-

Figure V. 5. Relation entre la proportion de plantes desséchées précocement pour 12 couples de parcelles qui ne diffèrent que par la densité de peuplement : D1 (4) vs. D3 (9 plantes/m²) en 2008 et 2009. -112-

Figure V. 6. Evolution du pourcentage de pieds secs aux densités de peuplement D1, D2 et D3 (4, 6,5, 9 plantes/m²) pour des traitements non limitants en azote et en eau (N150, irrigué) ou carencés (N0, non irrigué) après contamination artificielle au collet par *P. macdonaldii* en 2008 et 2009 -113-

Chapitre 6. Proposition d'un modèle conceptuel pour expliquer les effets de l'azote et de la densité de peuplement sur le dessèchement précoce

Figure VI. 1 : Modèle conceptuel présentant l'effet du régime hydrique, de l'azote, de la densité de peuplement et de l'infection par *P. macdonaldii* sur une variété sensible au dessèchement précoce. (T : température, HR : humidité relative) -118-

Tableau VI. 1. Teneur en chlorophylle des tissus foliaires (unités SPAD) et teneur en azote des parties aériennes (%) réalisées à la floraison à 21 DPI en 2008 et 14 DPI en 2009 pour caractériser les différents niveaux de fertilisation -121-

Tableau VI. 2. Mesures de l'efficacité d'interception du PAR réalisées au stade F35⁺/F4 en 2008 et F1⁻/F4⁻ en 2009 sur les parcelles fertilisées en N0, N75/N50 et N150 -122-

Tableau VI. 3 . Moyennes des températures et humidités relatives journalières sous le couvert de tournesol pour trois niveaux de fertilisation azotée pour la période comprise entre la contamination artificielle et l'apparition des premiers secs à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009 -123-

Tableau VI. 4. Analyse de variance de l'effet de la fertilisation azotée (N0, N75/N50, N150) sur la température et l'humidité relative moyenne journalière pour la période comprise entre la contamination artificielle au collet et l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009 -123-

Tableau VI. 5. Nombre de jours où la température moyenne journalière est supérieure à 25°C et l'humidité relative moyenne journalière supérieure à 80 % pour les différents niveaux de fertilisation azotée en D3 pendant les mois de juillet et août 2008 et 2009 -124-

Figure VI. 2. Evolution du pourcentage de plantes infectées après contamination artificielle et naturelle par *P. macdonaldii* pour la densité de peuplement D2 (6,5 plantes/m²) toutes fertilisations azotées (N0, N75/50, N150) et tous régimes hydriques confondus (irrigué, non irrigué) en 2008 (A) et 2009 (B) -125-

Tableau VI. 6. Analyse de variance de l'effet de la fertilisation azotée en D3 sur l'AUDPC_{DS} depuis la contamination artificielle jusqu'à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009, et de la proportion finale de pieds secs à 81 DPI en 2008 et 77 DPI en 2009 -125-

Tableau VI. 7. Teneur en chlorophylle des limbes (unités SPAD) et teneur en azote des tissus (%) réalisées à la floraison à 21 DPI en 2008 et 14 DPI en 2009 pour caractériser les différents niveaux de densité de peuplement en N75/N50 -126-

Tableau VI. 8. Mesure de l'efficacité d'interception du PAR par le couvert de tournesol réalisées au stade F35⁺/F4 en 2008 et F1⁻/F4⁻ en 2009 pour deux densités de peuplement contrastées (4 et 9 plantes/m²) -126-

- Figure VI. 3.** Evolution de la température, de l'humidité relative moyenne journalière sous le couvert et des précipitations entre la contamination et l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI en 2008 (A) et 42 DPI en 2009 (B) en D1 (4 plantes/m²) et D3 (9 plantes/m²) -127-
- Tableau VI. 9.** Température et humidité relative moyennes sous le couvert pour des densités de peuplement contrastées à 4 et 9 plantes/m² entre la contamination artificielle et l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009 -128-
- Tableau VI. 10.** Nombre de jours où la température moyenne journalière est supérieure à 25°C et l'humidité relative moyenne journalière supérieure à 80 % pour les densités de semis de 4 (D1) et 9 (D3) plantes/m² en juillet et en août 2008 et 2009 -128-
- Tableau VI. 11.** Analyse de variance de l'effet de la densité de peuplement en N75/N50 sur l'AUDPC (nécrose encerclante) depuis la contamination artificielle jusqu'aux premiers pieds secs, et proportion finale de pieds secs à 81 DPI en 2008 et 77 DPI en 2009 -128-
- Tableau VI. 12.** Moyennes du diamètre (mm) au collet en fonction de la fertilisation azotée (N0, N75/N50 et N150) et de la densité de peuplement (D1, D2 et D3) mesurées au stade F35-F4⁺ (27 DPI) en 2008 et au stade F4-M0 (22 DPI) en 2009 -133-
- Tableau VI. 13.** Moyennes d'AUDPC_{DS} pour chaque niveau de fertilisation azotée en fonction de la densité de peuplement depuis la contamination artificielle jusqu'à l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009 -134-
- Figure VI. 4.** Corrélation entre le diamètre au collet (mm) mesuré à la floraison et la proportion de pieds secs à 81 DPI en 2008 et 77 DPI en 2009 en D3 pour les trois niveaux de fertilisation azotée et les deux régimes hydriques -135-
- Tableau VI. 14.** Moyennes des diamètres au collet pour trois densités de peuplement (4, 6.5 et 9 plantes/m²) en fonction des différents niveaux de fertilisation azotée, mesurés au stade F35-F4⁺ (27 DPI) en 2008 et au stade F4-M0 (22 DPI) en 2009 -135-
- Tableau VI. 15.** Moyennes d'AUDPC_{DS} pour chaque densité de peuplement en fonction des différents niveaux de fertilisation azotée depuis la contamination artificielle jusqu'à l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009 -136-
- Figure VI. 5.** Relation entre le diamètre au collet et la proportion finale de pieds secs pour les trois densités de peuplement en N150 en régime hydrique « non irrigué » et « irrigué » en 2008 et 2009 -137-
- Tableau VI. 16.** Moyennes des mesures SPAD réalisées sur l'ensemble des plantes témoins et contaminées pour le traitement « azote » en N0, N50, N150 jusqu'à 13 DPI, puis sur un sous-échantillon de 15 plantes à partir de 21 DPI -141-
- Tableau VI. 17.** Moyennes des mesures SPAD réalisées à 43 DPI sur un échantillon de plantes témoins et contaminées pour le traitement « azote » en N150, N50 et N0 -141-
- Figure VI. 6. Progression horizontale du pathogène.** Evolution du pourcentage de plantes présentant une nécrose encerclante au collet en fonction du traitement azoté (N0, N50, N150), après la contamination au collet par du mycélium de *P. macdonaldii* -142-
- Figure VI. 7. Progression verticale du pathogène.** Evolution du pourcentage de plantes présentant des nécroses au niveau du nœud cotylédonaire (A) et au-dessus du nœud cotylédonaire (B) après contamination au collet par du mycélium de *P. macdonaldii* en fonction du traitement azoté (N0, N50, N150) -143-

Figure VI. 8. Evolution du nombre de plantes mortes pour les trois niveaux de fertilisation azotée (N0, N50 et N150) en fonction des jours après contamination (DPI) : plantes contaminées au collet par du mycélium de *P. macdonaldii* et plantes témoins. Les barres verticales indiquent la valeur du $LSD_{0.05}$ -144-

Tableau VI. 18. $AUDPC_{PR}$ et proportion de pieds secs après contamination par du mycélium de *P. macdonaldii* au collet à 50, 62 et 70 jours après contamination (DPI). -144-

Chapitre 7. Conclusions et perspectives

Figure VII. 1. Schéma conceptuel présentant les symptômes externes observés lors du dessèchement précoce d'une plante après inoculation par des spores de *P. macdonaldii* et les mécanismes physiologiques internes impliqués dans ce syndrome dépendant de la conduite de culture du tournesol, du milieu, et des conditions climatiques. Les facteurs en noir ont été étudiés, ceux en gris sont issus de la littérature. Les flèches pleines mettent en évidence des relations établies expérimentalement entre les facteurs au champ et en serre, les flèches tiretées et pointillées indiquent les conséquences indirectes et issues de la littérature respectivement. -150-

Tableau VII. 1. Caractéristiques morphologiques et physiologiques pour reconnaître un tournesol desséchés précocement au champ, après infection par *P. macdonaldii*, en relation avec le cycle de développement de la plante et la zone de culture -154-

Chapitre 1. Introduction

Contexte de l'étude

Ces dernières années, les débouchés de la culture de tournesol se sont diversifiés. Au-delà de la production d'huile alimentaire et de tourteaux pour l'alimentation animale, l'arrivée sur le marché de variétés oléiques agronomiquement performantes offre de nouvelles perspectives alimentaires (huiles recombinaées), industrielles (lipochimie, biomatériaux) et énergétiques (diester en complément du colza). Deuxième culture oléagineuse après le colza, le tournesol représente à lui seul le quart de la production européenne de graines oléagineuses. Depuis les années 2005 – 2007, la production d'huiles végétales en Europe stagne autour de 10 Mt, alors que la consommation a doublé du fait des conversions en diester (Béghin, 2008). La politique d'incorporation progressive mais obligatoire de biocarburants dans les carburants d'origine fossile en France (7 % d'ici 2010) a renforcé la demande en huiles végétales, notamment à fortes teneurs en acide oléique. Ainsi la demande supplémentaire en tournesol pour satisfaire ce nouveau besoin a été évaluée à 300.000 ha à l'horizon 2010. L'augmentation de 21 % des surfaces de tournesol en France entre 2007 et 2008, avec 600.000 ha cultivés en 2008, est cependant loin de compenser la diminution de 42 % de la surface cultivée observée depuis les années 1990 (Figure I. 1).

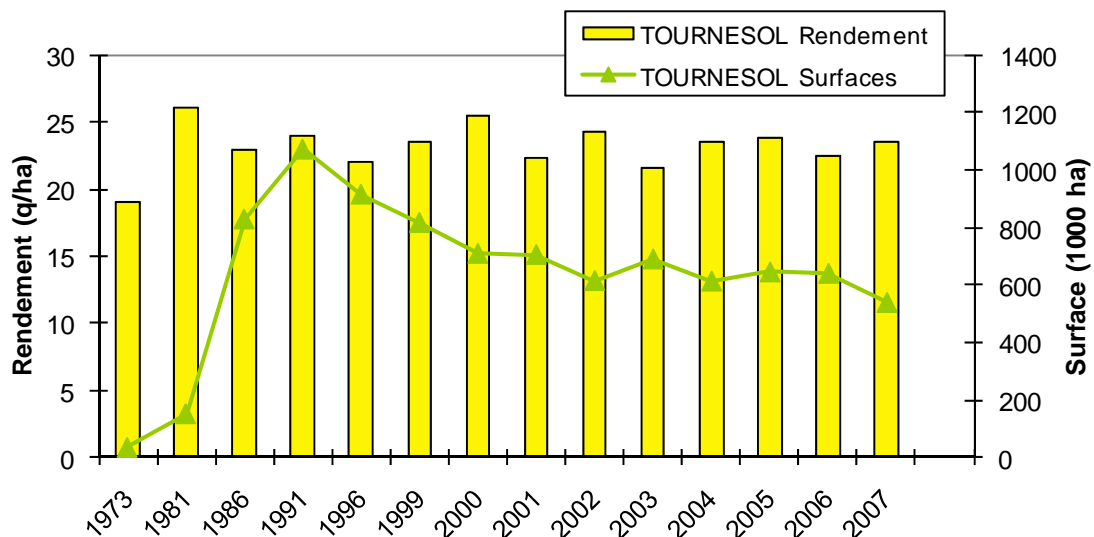


Figure I. 1 : Evolution des rendements (q/ha) et de la surface cultivée en tournesol (1000 ha) en France entre 1973 et 2007. (Source : SCEES¹, ONIOL²)

¹ Service central des enquêtes et études statistiques (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche)

² Office National Interprofessionnel des Oléagineux, protéagineux et cultures textiles

En France, après la réforme « Mac Sharry » de la Politique Agricole Commune (1992) qui a introduit les aides compensatoires en grande culture, un désintérêt pour les aspects techniques liés à la culture du tournesol s'est généralisé dans le monde agricole. La culture a eu tendance à se cantonner aux situations pédoclimatiques plus contraignantes du sud-ouest de la France (sols peu profonds et situations non irriguées) où l'intensification est particulièrement limitée, rendant la culture du tournesol peu compétitive vis-à-vis des autres grandes cultures, notamment celles qui bénéficiaient de 'primes' à l'irrigation (maïs, soja, pois) (Figure I. 2).

De nombreux facteurs limitants d'origine biotique (maladies cryptogamiques) et abiotiques (contrainte hydrique) (Merrien et Milan, 1992) contribuent au plafonnement des rendements entre 20 et 25 quintaux par hectare. Le progrès génétique n'est pas en cause. Le potentiel des meilleures variétés avoisine les 45 quintaux par hectare dans les milieux les plus favorables (Cetiom³). De plus, 20-30 variétés sont inscrites chaque année au Catalogue Officiel après l'épreuve du CTPS⁴, contribuant à un progrès annuel du rendement de 1.3 % entre 1960 et 2000 (Vear et al, 2003).

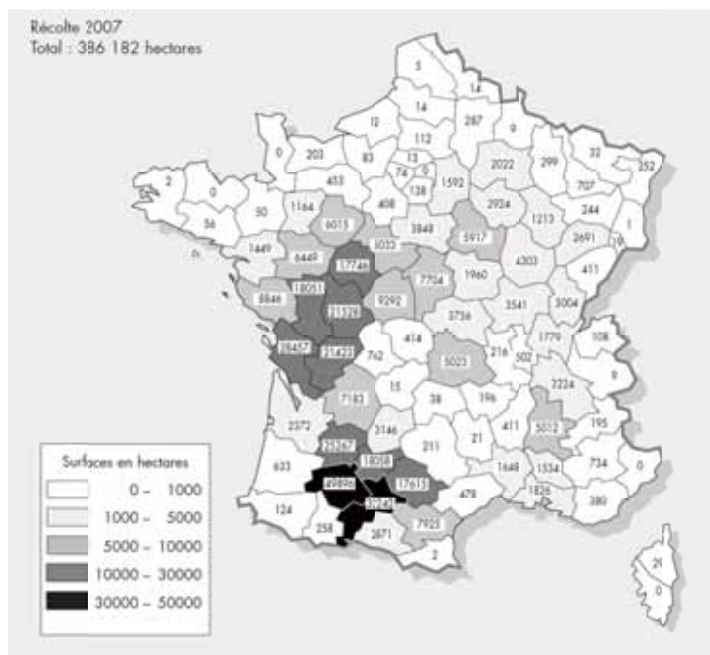


Figure I. 2. Surfaces départementales (ha) allouées au tournesol en 2007 (Source : SCEES, ONIOL)

Bon précédent à blé (libération précoce de la parcelle, conditions hydriques et structurales favorables pour l'implantation simplifiée d'une céréale à l'automne), la culture présente de nombreux atouts agronomiques et environnementaux (culture peu exigeante en intrants minéraux et phytosanitaires, économe en eau d'irrigation) (Cetiom, 2001 a-b). Ainsi, face au

³ Centre technique interprofessionnel des oléagineux métropolitains

⁴ Comité technique permanent de la sélection des plantes cultivées

changement climatique à venir, et la perspective accrue de sécheresse, le tournesol, culture réputée tolérante à la sécheresse, pourrait jouer un rôle central dans les assolements du sud de la France (Debaeke et Aboudrare, 2004; Aboudrare et al., 2006) La filière française travaille ainsi en vue de combler le manque d'attractivité pour le tournesol, par des initiatives visant à accroître la productivité et la compétitivité de la culture, et de définir de nouveaux marchés. Un projet de recherche interdisciplinaire (« Tournesol 2010 ») associant l'agronomie, la génétique, l'écophysiologie et la pathologie, a été mis en place en 2004 par les acteurs de la recherche publique (INRA, ENSAT) et privée (Cetiom, Sofiproteol⁵, Oleosem⁶). En concentrant 80 % des moyens européens sur son territoire, et en s'appuyant sur une filière semencière bien structurée (Promosol), la France est au cœur de la recherche en génétique sur le tournesol. La sélection de variétés tolérantes à la sécheresse et aux principales maladies est une priorité pour les généticiens en vue d'une plus grande stabilité du rendement. Par ailleurs, pour améliorer la réponse agronomique de la culture, une Unité Mixte Technologique (UMT « Tournesol ») associant l'INRA, l'ENSAT et le Cetiom a été créée à Toulouse en 2006. Les pistes de travail sont de (i) connaître les effets des facteurs limitants majeurs de la culture et d'évaluer des méthodes permettant d'en réduire les conséquences sur la production (rendement, qualité), et (ii) de développer des outils (modèles) pour mieux raisonner les choix techniques à l'échelle du bassin de collecte et de la parcelle en vue d'une maîtrise de la richesse en huile, par un conseil d'itinéraire technique (dont le choix variétal) adapté au contexte et aux objectifs de l'agriculteur.

Bien que sensible à un cortège de maladies : le Mildiou (*Plasmopara halstedii*), le Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*), le Phomopsis (*Diaporthe helianthi*), et le Phoma (*Phoma macdonaldii*), pour les plus nuisibles (Gulya et al., 1997), la culture de tournesol doit continuer à jouer un rôle important dans les systèmes de culture à bas niveaux d'intrants (« culture citoyenne »). La volonté sociale de réduire les applications de pesticides, dont les modalités ont été analysées lors de l'expertise scientifique collective "Pesticides, agriculture et environnement" (Aubertot et al., 2006), s'est aujourd'hui traduite par des décisions politiques (Grenelle de l'Environnement). Une réduction de 50 % des applications de pesticides, mesurée sur la base des Indices de Fréquence de Traitement (IFT)⁷, est désormais inscrite dans le plan d'action «Ecophyto 2018» du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche,

⁵ Etablissement Financier de la Filière Française des Huiles et Protéines Végétales

⁶ Association des industries des semences de plantes oléagineuses

⁷ Indicateur de pression basé sur les pratiques phytosanitaires, qui permet de mesurer l'intensité du recours aux pesticides sur une culture ou une succession de cultures. D'après ECOPHYTO R&D, vers des systèmes de culture économes en produits phytosanitaires (Brunet et al., 2009)

sous réserve de la proposition par la recherche de méthodes de substitution non chimiques (Brunet et al., 2009). Les principaux axes de recherche de cette mesure permettant de faire évoluer les modes de production concernent : (i) l'évaluation des progrès en matière de diminution de l'usage des pesticides, (ii) l'innovation dans la conception et la mise au point des itinéraires techniques et des systèmes de cultures économes en pesticides, et (iii) le renforcement des réseaux de surveillance sur les bioagresseurs et sur les effets non intentionnels de l'utilisation des pesticides. Cette mention suppose donc de disposer de solutions techniques applicables mais aussi de méthodes de raisonnement adaptées pour être appliquées de manière cohérente, laissant place à la notion de production intégrée des cultures (Heitefuss, 1989). Ce précepte mis en œuvre pour construire et favoriser une gestion plus écologique de la culture, par une complémentarité de méthodes de lutte chimiques et non chimiques, incite à recourir à une modification profonde des systèmes agricoles.

Pour que la culture de tournesol conserve son rôle central dans la diversification des systèmes de culture du Sud de la France et réponde aux nouvelles exigences phytosanitaires, il est nécessaire de maîtriser le développement des bioagresseurs par une combinaison de méthodes de protection associant la résistance génétique, la lutte biologique, et le contrôle cultural (Meynard et al., 2003). Cette dernière méthode fait appel à des modifications de la succession culturale, des dates de semis et de récolte, de la fertilisation (NPK), de la densité de peuplement et de l'irrigation (Zadoks, 1993 ; Flint et Gouveia, 2001 ; Delos et al., 2002). Bien que l'IFT de la culture de tournesol soit bas (~1), la réduction de l'usage des fongicides est un objectif à poursuivre aux vues de l'image environnementale de la culture, très pratiquée d'ailleurs en agriculture biologique. Par ailleurs, face à certaines impasses techniques ou génétiques en matière de protection, le développement du contrôle cultural qui passe par une compréhension des interactions entre la maladie, le climat, le peuplement, et les pratiques culturales est une nécessité.

Cycle de développement du tournesol

Le tournesol appartient à la famille des Composées (astéracées), du genre *Helianthus*, espèce *annuus*. Plante à grand développement végétatif, aux larges feuilles, sa hauteur varie de 2 à 4 mètres, et son système racinaire est de type pivotant avec une racine principale et un fort réseau de racines secondaires. L'inflorescence est un grand capitule (diamètre de 15 à 40 cm) très large, à fleurs ligulées (de l'ordre de 1500) contenues par le réceptacle. Les fruits sont des akènes à péricarpe membraneux, non soudés à la graine, qui entoure une amande

contenant 55 à 70% d'huile. Le cycle complet dure de 120 à 150 jours selon la précocité du cultivar. La floraison débute généralement entre le 65ème et le 70ème jour après la levée, mais des variations existent selon les variétés et les conditions de culture, ce qui suggère une interaction forte entre la plante et son environnement.

Le développement phénologique de la culture entre le semis et la maturité physiologique est couramment séparé en une succession de stades identifiés de manière visuelle ou physiologique (Merrien, 1992 ; Connor et Hall, 1997). Différentes échelles de notations phénologiques ont ainsi été proposées pour le tournesol (Schneiter et Miller, 1981). L'échelle du CETIOM (basée sur des observations morphologiques : nombre de feuilles puis stades du bouton et du capitule) a été mise en place et largement utilisée par la suite (CETIOM, 2004). C'est donc cette échelle de phénologie qui sera utilisée dans cette étude. Elle divise le cycle en 5 périodes clés, codifiées en stades repères (Annexe 1 et 2).

- La **Phase « Semis-Levée (A0-A1) »** qui dure de 7 à 20 jours selon l'humidité du lit de semence et la température du sol.
- La **Phase « Levée - Stade 5 paires de feuilles » (A1-B10)**. Durant cette phase, les parties aériennes (capteurs d'énergie solaire) et le système racinaire pivotant (capteur d'eau et d'éléments minéraux) se mettent en place. La plante privilégie en début de cycle la mise en place du système racinaire, et la vitesse de croissance des racines est trois fois supérieure à celle des feuilles. A la fin de cette phase (Stade B8), l'initiation des ébauches florales démarre, et la différenciation complète des pièces florales s'achève plus tard (Stade E1). L'alimentation en eau est très importante lors de l'initiation foliaire ; un déficit hydrique durant cette phase peut réduire le nombre d'ébauches foliaires formées.
- La **Phase « 5 paires de feuilles - Début floraison » (B10-F1)**. C'est la phase de croissance exponentielle de la culture. La surface foliaire et le système racinaire atteignent leurs maxima à la floraison. D'une durée de 40 à 50 jours, c'est également la période d'absorption maximale des éléments minéraux (azote, bore...).
- La **floraison (F1-F4)**. Pour une plante donnée, cette période dure de 8 à 10 jours. Au cours de cette phase, la plante est très sensible aux contaminations sur capitule et à un déficit d'alimentation en eau, 10 jours de stress hydrique pouvant entraîner une chute de rendement de 30 à 35%. La composante du rendement la plus affectée est le nombre de graines, la sécheresse entraînant l'avortement des ovules.

- Le **remplissage des graines (F4-M3)**. Les augmentations de matière sèche sont faibles pendant cette phase qui se traduit par une redistribution des assimilats et une migration des réserves des parties végétatives (feuilles, tiges...) vers les graines. C'est également la phase de synthèse active des acides gras et de synthèses protéiques à partir des acides aminés provenant de la dégradation des protéines des feuilles et des tiges. Poids de 1000 graines et teneur en huile sont affectés par le stress hydrique souvent marqué pendant la phase de remplissage dans les conditions du sud-ouest de la France.

La conduite de culture du tournesol

Choix variétal et implantation

Le tournesol est fréquemment cultivé avant une céréale (blé dur, blé tendre). La conservation dans le sol des résidus de culture ou des sclérotés, permettant la dissémination de certaines maladies du tournesol impose un délai de retour long du tournesol sur une même parcelle conduisant à des rotations diversifiées. Cependant les rotations tournesol-blé sont les plus fréquemment observées dans le Sud-Ouest de la France en l'absence d'irrigation. Le tournesol est le plus souvent implanté après un travail profond (charrue ou chisel).

Les variétés proposées sont des hybrides, et le choix d'une variété s'effectue en fonction de sa productivité, du débouché visé et de la zone de culture. La productivité et la sensibilité des variétés oléiques et classique aux maladies sont assez comparables actuellement. Outre la productivité et la richesse en huile, la sensibilité à la verse (hauteur de tige) et les niveaux de tolérance aux différentes maladies (Phomopsis, Sclerotinia, Mildiou) sont des critères de choix importants.

L'implantation du tournesol dans la parcelle doit être réalisée le plus tôt possible pour valoriser au mieux le rayonnement solaire du début de l'été et atteindre la floraison avant que le risque de sécheresse ne soit trop important. Les périodes habituelles de semis en France, compte tenu du climat moyen des différentes régions, se situent du 20/03 au 20/04 en région Midi-Pyrénées, du 1/04 au 30/04 en Pays de Loire, Poitou-Charentes et dans le Sud-Est, du 5/04 au 30/04 dans les régions au Nord de la Loire. Le semis est réalisé en rangs avec un écartement de 45 à 60 cm entre rangs (optimum pour la capture d'énergie lumineuse et l'exploration du sol par le système racinaire), et le peuplement optimal se situe vers 60 000 pieds/ha. Cependant la pratique du semis à écartement de 75-80 cm est fréquente en région

d'élevage ou chez les maïsiculteurs. Les enquêtes parcellaires, réalisée par le Cetiom en 2004 et 2006, révèlent souvent des peuplements aux environs de 45 000 - 50 000 plantes/ha.

Irrigation et fertilisation

Ces dernières années viennent encore une fois de démontrer les capacités du tournesol à s'adapter aux conditions sèches. Si ses besoins en eau optimaux sont couverts par 420 mm sur l'ensemble de son cycle (pluies et réserves en eau du sol), son système racinaire lui permet également de bien exploiter les réserves disponibles dans chaque horizon du sol. Plus que la quantité, c'est la répartition de cette eau au cours du cycle qui compte. En cas de léger déficit en début de cycle, la plante s'adapte en diminuant sa croissance végétative (surface foliaire) au profit de la phase de remplissage des graines. L'irrigation est très peu pratiquée (< 5 %) bien que le tournesol puisse être présent dans la sole irrigable pour des raisons agronomiques liées à la rotation. L'irrigation encadrant la floraison (2 x 30-35 mm) est la pratique la plus courante.

La fertilisation azotée se pratique au semis par un apport initial de 60 à 80 unités, complété parfois au stade 14 feuilles afin de mieux répondre aux besoins croissants de la plante. Cependant un excès d'azote peut augmenter le risque de verse, de maladies, et retarder la récolte pouvant entraîner une baisse de la teneur en huile. Comme pour les autres cultures, les doses à apporter se raisonnent en fonction des besoins de la plante, de l'objectif de rendement et de la fourniture par le milieu. L'optimum de fertilisation peut ainsi varier de 0 à 120 kg N/ha selon les situations.

Les principales maladies limitant la production quantitative et qualitative du tournesol

Le tournesol est une culture confrontée à de nombreuses maladies qui entraînent des pertes de rendement et de teneur en huile variables suivant les années, les conditions environnementales et les pratiques culturales. Parmi ces maladies, quatre sont reconnues comme particulièrement dommageables pour la culture et sont le fait d'organismes fongiformes ou de champignons: le Mildiou, le Sclerotinia, le Phomopsis, et le Phoma.

Le Mildiou

Présent depuis plus de 40 ans sur le territoire français, le Mildiou (*Plasmopara halstedii* Berl. & De Toni) touche toutes les zones de culture du tournesol, et se caractérise par un retard de croissance important, des taches chlorotiques et un feutrage blanc qui recouvre la face inférieure des feuilles. Ces attaques peuvent donner lieu à une infection systémique entraînant un nanisme persistant des plantes les plus atteintes (Tourvieille et al., 2000). Avec des taux d'attaque variables, le Mildiou devient visible au-delà de 10 % de plantes atteintes et peut être particulièrement dommageable lorsque 80 % des plantes sont nanifiées ou détruites (Chollet et al., 2002). La recherche sur le Mildiou a pu bénéficier d'importants efforts pour développer des outils de reconnaissance de races et de gènes de résistances. Ces dernières années ont été marquées par une présence particulièrement faible du Mildiou en culture (Note commune SPV⁸ - CETIOM - INRA, Avril 2009) ; peu favorisée par des conditions printanières sèches (2005-2006), mais également grâce aux résistances variétales et au traitement de semences anti-Mildiou (à base de méfénoxam) non encore confrontées à des populations résistantes au sein des nouvelles races du pathogène. Ces moyens de lutte ont permis un bon contrôle de la maladie, malgré des conditions printanières favorables à son expression en 2007 et surtout 2008. Cependant, considéré comme « agent nuisible de quarantaine » par l'Union Européenne, la lutte contre le Mildiou doit intégrer l'ensemble des moyens de gestion durable pour limiter son développement en tournesol (arrêté du 9 novembre 2005 du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche). Les moyens agronomiques doivent être systématiquement considérés (raisonnement de la date de semis) et les solutions génétiques et chimiques raisonnées en fonction du risque local prenant en compte les résultats de la surveillance du territoire.

Le Sclerotinia

La sclérotiniose est une maladie persistante du tournesol, car le Sclérotinia (*Sclerotinia sclerotiorum* Muntanola-Cvetkovic et al.) est un champignon pathogène polyphage qui se conserve de longues années dans le sol sous la forme de sclérotés. Les dégâts dépendent du taux d'attaque et de la dynamique de l'infection, fortement liés aux conditions climatiques. Le

⁸ Service de la Protection des Végétaux

Sclerotinia est capable d'attaquer tous les organes de la plante, occasionnant une pourriture blanche des tissus (Chollet et al., 2002). Les attaques sur capitule sont les plus dommageables et peuvent occasionner des pertes de rendement de 50 %. Les attaques au collet sont également fréquentes. Contrairement au Mildiou, le tournesol ne présente pas de résistance totale face au Sclerotinia. La résistance est quantitative (mettant en jeu plusieurs gènes) et une même variété peut présenter des niveaux de résistance différents selon le type d'attaque (Thuault et Tourvieille, 1988). La lutte génétique reste une pièce maîtresse de la protection, mais les tolérances variétales disponibles peuvent cependant s'avérer insuffisantes en cas de forte pression, lorsque les conditions sont favorables au développement du champignon. La lutte génétique doit donc s'accompagner de mesures agronomiques (raisonnement de la date et densité de semis, de la fertilisation azotée, de l'irrigation), d'autant qu'aucun moyen de lutte fongicide contre ces différentes formes d'attaque n'est actuellement disponible. Seule la lutte à l'aide d'un agent biologique Constans® WG (préparation fongique biologique à base de spores de *Coniothyrium minitans*) est actuellement homologuée.

Le Phomopsis

Observé pour la première fois en 1984 dans le sud ouest de la France, le Phomopsis (teleomorph: *Diaporthe helianthi* Muntanola-Cvetkovic et al.) a fortement progressé et recouvre depuis 1992 toute la zone de culture du tournesol (Delos et Moinard, 1995). Le Phomopsis peut attaquer les feuilles, le capitule, et certaines attaques précoces sur tige peuvent être foudroyantes, occasionnant de très fortes pertes de rendement jusque 15 quintaux par hectare et des pertes en huile de 25 %, à la suite d'un dessèchement des feuilles et de la tige (Masirevic et Gulya, 1992). L'utilisation de génotypes tolérants et de fongicides est à la base du contrôle de la maladie, bien maîtrisée à l'heure actuelle (Gulya et al., 1997). Des études sur les effets de la conduite de culture ont montré que la fréquence et la gravité des attaques de Phomopsis augmentent avec la densité de peuplement et la dose d'azote (Debaeke et al, 2003). Si la stratégie de rationnement végétatif n'est pas suffisante à elle seule pour maîtriser le Phomopsis, son association avec un semis tardif permet d'atteindre des niveaux d'attaque proches de ceux obtenus en semis précoce, avec protection chimique (Debaeke et al., 2001). La rentabilité des conduites "bas intrants", ne recevant pas de fongicides, suppose l'utilisation de variétés tolérantes et l'absence d'une forte hygrométrie en juin, ce qui s'observe 4 années sur 5 dans le Sud-Ouest de la France.

Le Phoma

La maladie des taches noires, causée par le Phoma : *Phoma macdonaldii* (Boerema, 1970), téléomorphe *Leptosphaeria lindquistii* (Frezzi, 1968 ; McDonald, 1964) est la dernière maladie à être apparue en France dans les années 90 (Pères et Letof, 1996). Les symptômes les plus visibles de cette maladie sont des nécroses débutant à la base du pétiole, se propageant rapidement sur la tige, formant de larges taches noires et encerclantes, pouvant également attaquer les cotylédons, les feuilles, le capitule et la zone collet-racine (Figure I. 3) (McDonald, 1964). Contrairement au Phomopsis, les attaques ne se situent pas directement sur la feuille. Elles débutent souvent à l'insertion du pétiole (auget) là où il y a de l'eau libre, et l'infection est de ce fait moins sensible à l'hygrométrie que pour le Phomopsis. Mais depuis 1996, une forme plus préjudiciable de la maladie a été mise en évidence, et concerne les **attaques de bas de tige (ou Phoma du collet)** qui seraient à l'origine du **dessèchement précoce du tournesol, également appelé syndrome « pied sec »** (Gulya et al., 1984 ; Donald et al., 1987). Ce syndrome, en continuelle expansion, s'est désormais étendu à toutes les zones de production du tournesol (Pilorgé, 1997) et apparaît à l'heure actuelle particulièrement dommageable pour la culture.



Figure I. 3. Symptômes caractéristiques d'une attaque de *Phoma* sur les différents organes du tournesol

Les résidus de tournesol ont longtemps été considérés comme la principale source d'inoculum primaire à l'origine des épidémies de *P. macdonaldii*. Les faibles rotations de culture, principalement tournesol-blé, et un travail du sol simplifié ont contribué à augmenter l'inoculum en laissant les résidus infectés à la surface du sol. A la fin de l'hiver et au début du printemps, les résidus infectés produisent des périthèces (organes de reproduction sexuée) et

des pycnides (organes de reproduction asexuée) qui libèrent respectivement des ascospores et des pycnospores (Frezzy, 1964-1968 ; Maric et al., 1983), dotées d'un pouvoir pathogène important (Penaud et Pérès, 1994 ; Pérès et Poisson, 1998). Leur dynamique de libération s'opère de manière simultanée, continue et durable du printemps au début de l'été, avec des émissions de pycniospores plus importantes que celles des ascospores (Pérès et Le Sourné, 2000). Les résidus enfouis puis ramenés à la surface gardent leur pouvoir infectieux quelque soit leur âge (Poisson-Bammé et Pérès, 2000). L'inoculum produit sur des résidus âgés de plus d'un an est la forme asexuée du champignon (Pérès et Letof, 1996 ; Poisson-Bammé et Pérès, 2000).

Le tournesol est sensible à *P. macdonaldii* depuis le stade cotylédonaire jusqu'à la floraison (Pérès et Letof, 1996 ; Penaud, 1997), avec une sensibilité plus importante au stade bouton floral (Pérès et Le Sourné, 2000). L'infection se manifeste dans une large gamme de températures (5 °C à 30 °C) avec un optimum à 25 °C (Gulya et al., 1997). Une humidité relative de 80 %, maintenue par de courtes séquences de mouillage, semble favoriser la contamination (Roustae et al., 2000b ; Weeraratne et Priyantha, 2003). Le mycélium et les spores de *Phoma*, issues de la germination des ascospores et/ou des pycniospores sont impliqués dans l'infection primaire des différents organes de la plante (Figure I. 4). La pénétration du champignon dans la plante peut se faire directement à travers la cuticule par perforation mécanique, ou indirectement à travers les stomates, en l'absence d'appressorium (Abou Al Fadil et al., 2009). Le plasmalemme se disloque, ce qui se traduit par une perte rapide de l'intégrité des cellules et favorise la colonisation de l'agent pathogène. Contaminée, la plante manifeste des symptômes de taches noires là où des pycnides vont libérer des pycniospores à l'origine de contaminations secondaires.

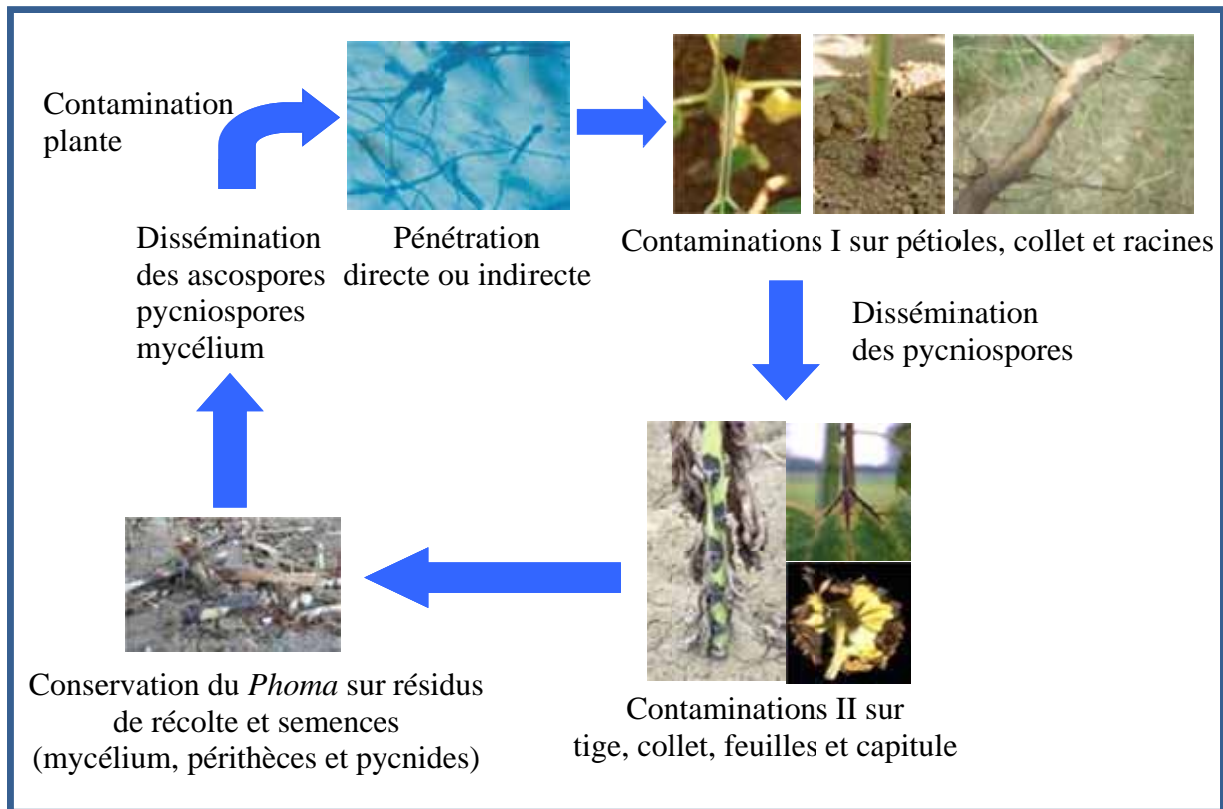


Figure I. 4. Cycle biologique de *Phoma macdonaldii* / *Leptosphaeria lindquistii*

Phoma macdonaldii présente une variabilité phénotypique importante, que ce soit au niveau de la croissance radiale, de la pycnidogénèse, de l'agressivité, de la morphologie des colonies et de la pigmentation (Roustaee et al., 2000b ; Larfeil, 2003) (Figure I. 5). A l'heure actuelle, des génotypes de tournesol présentant une résistance partielle à *Phoma* ont été observés au champ (Pérès et al., 1994) et en conditions contrôlées (Roustaee et al., 2000a ; Bert et al., 2004 ; Abou Al Fadil, 2007a ; Abou Al Fadil, 2007b), mais il n'existe pas de génotype totalement résistant. Roustaee et al., (2000a) ont pu mettre en évidence que cette résistance partielle de la maladie des taches noires était conférée par un ou plusieurs gènes à effets additifs⁹. La variabilité de l'agressivité des symptômes provoqués par des isolats de *Phoma macdonaldii* sur des génotypes de tournesol met également en évidence une interaction souche x variété qui suggère la présence de gènes de résistance spécifiques au sein des organes infectés (Abou Al Fadil, 2006).

⁹ Gènes dont l'effet net est la somme des effets de leurs allèles individuels, ils ne présentent ni dominance ni épistasie



Figure I.5. Variabilité morphologique des colonies de *Phoma macdonaldii* et de la pigmentation des souches

Pour une lutte efficace contre les maladies les plus nuisibles de la culture du tournesol, des connaissances épidémiologiques sur les agents pathogènes responsables des dégâts et des dommages pour la culture, ainsi que sur les interactions plante x pathogène dans l'environnement de culture sont nécessaires. Ces connaissances permettent de construire les bases d'un raisonnement du contrôle cultural (Figure I. 6 et Tableau I. 1). **A ce jour il n'existe aucune classification de variétés résistantes, ni de traitements fongicides homologués efficaces, contre les attaques au collet à l'origine supposé du dessèchement précoce. Ceci renforce donc l'intérêt d'étudier des méthodes de lutte alternatives, par les pratiques culturales, pour envisager un contrôle de la maladie.** Reconnue comme la deuxième maladie préoccupante pour le tournesol après le Mildiou (Alignan et al., 2006), le syndrome du dessèchement précoce attribué à *Phoma* est devenu une priorité de recherche pour les acteurs de la filière. Des enquêtes réalisées par le Cetiom, ont montré l'importance de la pression de la maladie dans le Sud-ouest de la France. Entre 2006 et 2009, 98 à 100 % des parcelles suivies présentaient des attaques de *Phoma* au collet (étude réalisée sur 110 parcelles agricoles). La proportion de ces parcelles atteintes de dessèchement précoce est quant-à elle en perpétuelle expansion avec des taux d'attaque de 71, 85, 67 et 91 % de 2006 à 2009. Compte tenu de la pression de la maladie toujours plus forte et du faible nombre de publications sur le *Phoma* (23 entre 1975 et 2009), comparé au Mildiou (139), au sclerotinia (110) et au phomopsis (37), l'importance de produire des connaissances sur la maladie est nécessaire (d'après ISI Web of Science). **C'est donc dans ce nouvel enjeu scientifique et économique que s'inscrit ce travail de thèse avec comme objectifs la compréhension de l'étiologie du dessèchement précoce et de l'impact de la conduite de culture sur la maladie.**






Mildiou <i>Plasmopara helianthi halstedii</i>	Phomopsis <i>Diaporthe helianthi</i>	Phoma <i>Phoma macdonaldi</i>	Sclerotiniose <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
			
			
Description et symptômes			
Aspect général <ul style="list-style-type: none"> Mort des plantules Nanisme des plantes, feuillage crispé vert pâle Sur feuilles <ul style="list-style-type: none"> Tache anguleuse, vert pâle à jaune, le long des nervures à partir du pétiole Feutrage blanc à la face inférieure Sur capitule <ul style="list-style-type: none"> Capitule dressé face au ciel 	Sur feuille <ul style="list-style-type: none"> Tache brun-rouge, triangulaire, du bord du limbe vers le pétiole et la tige Sur tige <ul style="list-style-type: none"> Nécrose profonde brun-rouge frangée, encerclant la tige à la base d'un pétiole Plante cassée Nécrose se raye à l'ongle Sur capitule <ul style="list-style-type: none"> Nécrose sèche, brun-rouge arrondie ou triangulaire, depuis une bractée ou une feuille capitulaire Dessèchement du capitule 	Sur feuille <ul style="list-style-type: none"> A la face supérieure, suite de petites lésions brun-noir sur la nervure centrale Sénescence prématurée du feuillage Sur collet et tige <ul style="list-style-type: none"> Nécrose superficielle bruno-noire contour net, arrondie à l'aisselle d'une feuille ou d'un cotylédon Nécrose ne se raye pas à l'ongle Sur capitule <ul style="list-style-type: none"> Nécrose sèche noire, arrondie depuis une bractée ou une feuille capitulaire Taches noires confluentes 	Sur collet et tige <ul style="list-style-type: none"> Tache de pourriture blanche et humide Flétrissement et mort de la plante Formation de sclérotas Sur feuille <ul style="list-style-type: none"> Pourriture gris-beige à l'extrémité des feuilles Destruction du bouton floral Sur capitule <ul style="list-style-type: none"> Pourriture blanc-beige entre les graines et au dos du capitule Destruction des tissus, seules restent les fibres Présence de sclérotas Egrainage
Différenciation : ---	en appuyant avec le pouce sur la partie de la tige atteinte		
	<ul style="list-style-type: none"> mou 	<ul style="list-style-type: none"> ferme 	<ul style="list-style-type: none"> écrasé
Facteurs favorisant la maladie			
<ul style="list-style-type: none"> Semence infectée Sol infecté. Les spores persistent 8 à 10 ans dans le sol Repousses de tournesol infectées Levée par temps humide 	<ul style="list-style-type: none"> Résidus de récolte Humidité et chaleur lors de la formation du bouton floral Présence simultanée de phomopsis 	<ul style="list-style-type: none"> Levée lente en conditions humides Pluies fréquentes Présence simultanée de phomopsis 	<ul style="list-style-type: none"> Rotation chargée en colza, tournesol et légumineuses Humidité élevée lors de la formation du bouton floral Feuillage crispé par les pucerons
Mesures préventives			
<ul style="list-style-type: none"> Minimum 3-4 ans d'interruption entre deux tournesols Éliminer les plantes malades Éliminer les repousses de tournesol Semences traitées 	<ul style="list-style-type: none"> Choix variétal Broyer et enfouir les résidus de récolte Éviter les fortes densités de semis Lutte contre les adventices Fumure N : pas d'excès Irrigation à proscrire sur parcelle infectée 	<ul style="list-style-type: none"> Broyer et enfouir les résidus de récolte Lutte contre les adventices 	<ul style="list-style-type: none"> Choix variétal Éviter les fortes densités de semis Lutte contre les adventices Fumure N : pas d'excès Irrigation : fortes doses espacées plutôt qu'apports fréquents

Figure I. 6. Description et symptômes des principales maladies du tournesol (Mildiou, Phomopsis, Phoma et Sclerotinia), facteurs favorisant la maladie et mesures préventives. (Source : AGRIDEA¹⁰, 2006)

¹⁰ Association suisse pour le développement de l'agriculture et de l'espace rural

Tableau I. 1. Efficacité actuelle des méthodes de lutte mises en œuvre sur tournesol (source : Expertise scientifique collective "Pesticides, agriculture et environnement" (Aubertot et al., 2006))

Bioagresseurs		Mildiou	Sclerotinia	Phomopsis	Phoma
Importance actuelle des bioagresseurs		+++	+++	+++	+++
Efficacité actuelle des méthodes de lutte mises en œuvre	Lutte chimique	+++ (1)	-	+++	++ (4)
	Résistance variétale	+++ (2)	++	+++	+
	Lutte biologique	-	+ (3)	+++	-
	Méthodes de lutte physique	-	-	-	-
	Système de culture	+	++	+	+

Les (+) indiquent l'efficacité de la méthode de lutte, les (-) qu'il n'existe pas de méthode de lutte

1. Traitement de semences (mefenoxam), pas de lutte fongicide en végétation
2. Efficace mais risque de contournement (nouvelles races physiologiques de Mildiou)
3. Contans (lutte contre les sclérotés par un champignon *Coniothyrium minitans*)
4. Efficace mais non rentable sur tiges, inefficace sur attaques au collet (les plus nuisibles)

Etat des connaissances sur l'étiologie du dessèchement précoce du tournesol

Le syndrome du dessèchement précoce

Le terme de dessèchement précoce a été employé pour la première fois au Canada en association avec le tournesol par Sackston (1950) pour décrire un flétrissement prématuré de la plante. Depuis, les recherches dans le domaine public et privé se sont efforcées de comprendre l'étiologie de ce syndrome, et des progrès substantiels ont été réalisés à partir des années 80. Les symptômes externes se traduisent par une sénescence prématurée des feuilles, une nécrose de la tige et des racines, accompagnés d'un capitule de petite taille, occasionnant une diminution du rendement plus ou moins importante selon la précocité du syndrome. Les plantes affectées peuvent être réparties aléatoirement dans un champ, ou apparaître de manière uniforme, sans lien direct avec la topographie ou le type de sol. Les causes potentielles peuvent être d'origine biotique (champignons, bactéries et insectes) ou abiotiques (conditions environnementales, nature du sol et conduite de culture) (Gulya et al., 1984). Si chacun de ces facteurs peut agir indépendamment sur la croissance et le développement du

tournesol, ils peuvent interagir et accentuer la sévérité de la maladie, rendant l'étude des causes primaires plus complexes.

Le dessèchement précoce du tournesol peut être causé par l'infection d'agents pathogènes qui, associée à des conditions environnementales et à une conduite de culture défavorable au tournesol, ou à l'inverse favorable au pathogène, peuvent amplifier ce syndrome.

De nombreux agents pathogènes sont susceptibles de causer un dessèchement précoce de la plante, dès lors qu'ils attaquent les feuilles, la tige ou les racines. C'est le cas par exemple du *Macrophomina* (*Macrophomina phaseolina* Tassi) (Charcoal rot) (Guillaumin et Pierson, 1976 ; Jimenez-Diaz et al., 1983), de *Sclerotinia sclerotiorum* (*Sclerotinia* basal stem rot or wilt) et du verticillium (*Verticilium dahliae* Reinke & Berthier) (*Verticillium* wilt) (Hoes et Huang, 1975). Une observation rapide de parcelles atteintes de dessèchement précoce a souvent conduit à un emploi inapproprié de ce terme pour une maladie connue qui n'a pas été identifiée, sous estimant la présence de pathogènes. Une observation attentive des symptômes permet souvent d'identifier l'agent causal de ce syndrome. En présence de microsclérotés en périphérie de la moelle (*Verticilium*), dans la moelle (*Macrophomina*), ou de sclérotés racinaires ou aériens (*Sclerotinia*), le terme de « dessèchement précoce causé par *Verticilium* » ou un autre pathogène responsable, serait dès lors plus approprié. Le terme de « dessèchement précoce » doit alors être réservé aux cas où les causes du syndrome restent inconnues. Depuis la fin des années 90, un nouveau pathogène pouvant induire un dessèchement précoce du tournesol a émergé en France. Le Phoma, qui induit une nécrose encercleante de bas de tige, pourrait être à l'origine de ce syndrome.

Le dessèchement précoce (ou prématuré) du tournesol se traduit par une sénescence et une défoliation de la plante avant la maturité physiologique de la plante, qui présente une nécrose encercleante au collet caractéristique du Phoma, un pivot peu développé et nécrotique (Donald et al., 1987).

Origine du dessèchement précoce : implication seule de *Phoma* ou présence d'un complexe parasitaire ?

La présence de nécroses au collet accompagnant souvent des attaques de *Phoma* sur tige a conduit à mettre en cause ce pathogène dans le syndrome 'pied sec'. Cependant, si le *Phoma* a souvent été isolé à partir de ces nécroses noires, il est également fréquemment associé à d'autres agents pathogènes (McDonald, 1964). La présence de *Macrophomina*, de *Verticillium* et de *Fusarium* (Pérès et al., 2000), a fait émerger la question de l'origine pathologique principale du dessèchement précoce et des éventuelles interactions entre les agents pathogènes (facteurs aggravants). La reproduction de symptômes par la seule inoculation par *Phoma macdonaldii* suggère le rôle majeur de ce champignon (Pérès et Letof, 1996). Cependant, des questions subsistent sur l'implication des autres agents pathogènes qui pourrait être (i) obligatoire, évoquant l'idée d'un complexe parasitaire (Pérès et al., 2000), ou (ii) secondaire, le *Macrophomina* n'étant alors qu'un pathogène opportuniste de fin de cycle (Saumon et al., 1984 ; Davet, 1996), se développant là où la maturité est accélérée.

Un enjeu pour les producteurs de tournesol : limiter les pertes de rendement par une conduite de culture adaptée

L'apparition tardive d'attaques de *Phoma macdonaldii* sur tige (maladie des taches noires) entraîne des pertes de rendement oscillant entre 2 et 7 quintaux par hectare (Maric et al., 1987 ; Penaud, 1996). Les lésions de *Phoma* encerclantes au collet, qui conduisent au dessèchement précoce du tournesol, peuvent occasionner des pertes de rendement potentielles de 13 quintaux par hectare (Pérès et al., 2000). La nuisibilité est attribuée à l'interruption prématurée du remplissage des akènes se traduisant par un plus faible poids de 1000 grains. Le capitule présente un aspect brun-noir recroquevillé, de petite taille, surtout lors d'attaques précoces. L'étude de la nuisibilité bute d'une part sur la difficulté de reproduire expérimentalement et régulièrement des pieds secs, et d'autre part de disposer d'une protection continue et efficace vis à vis des attaques de *Phoma* au collet. Si les méthodes de lutte chimique par l'application de traitements fongicides (dithane par exemple) ont montré des effets sur les attaques de *Phoma* sur tige (Penaud, 1996), l'efficacité de ces traitements s'avère partielle et peu efficace sur les attaques au collet, complexifiant l'estimation de la nuisibilité au champ.

Dans ce contexte d'étude, où la protection chimique et la résistance génétique sont encore limitées, le contrôle cultural peut s'avérer être une solution alternative pour

contrecarrer l'évolution inquiétante du dessèchement précoce en France. Cette méthode de lutte pourrait se décomposer en : (i) une lutte physique (gestion des résidus de culture pour limiter l'inoculum dans les parcelles), et (ii) une lutte culturale (date et densité de semis, régime hydrique et fertilisation azotée appropriés) permettant un contrôle des bioagresseurs pour limiter ou retarder leur développement dans la culture. De récents travaux sur la gestion des résidus de colza infectés par le *Phoma* (*Leptosphaeria maculans*) ont montré que la gestion des résidus de culture par le travail du sol, jusqu'alors peu considérée dans les méthodes de protection, influe significativement sur l'état sanitaire de la parcelle (Schneider et al., 2006). De plus, étudier les relations entre les pratiques culturales, les états du sol et du couvert, et le développement de la maladie, s'avère essentiel pour mieux comprendre l'étiologie du dessèchement précoce. Des travaux réalisés sur le *Phoma* tige ont pu mettre en évidence un effet notable de la conduite de culture sur l'expression de la maladie. La fréquence et la gravité des attaques sur tige augmentent en effet avec l'alimentation en eau, la fertilisation azotée, et des effets de la densité de peuplement ont été constatés (Debaeke et Pérès, 2003). Ces conduites ont également été rapportées comme propices aux infections du tournesol par *Alternaria*, *Phomopsis* et *Sclerotinia* (Debaeke, 2002). A l'inverse, l'expression de *Macrophomina* se retrouve moins marquée en année humide, et en système irrigué (Edmunds, 1964 ; Alabouvette et Bremeersch, 1975). En conditions sèches, l'augmentation de la densité de peuplement ou de l'azote, diminue la réserve en eau du sol (Taylor, 1965), fragilise la plante et favorise l'apparition du *Macrophomina*.

Chaque élément du système de culture est à même d'agir sur l'état sanitaire des cultures (Zadoks, 1993) et, puisque les pratiques culturales sont toutes susceptibles, à divers degrés, d'affecter la dynamique des bioagresseurs (Palti, 1981), ces effets pourraient être utilisés comme leviers pour un contrôle maîtrisé non-chimique des bioagresseurs (Aubertot et al., 2006)

Dans le cas du dessèchement précoce par une attaque de *Phoma* au collet, tout reste à démontrer. Les premières observations sur des parcelles d'agriculteurs tendent à montrer que ce syndrome serait plus présent sur les zones séchantes de côteaux (en lien possible avec la nature du sol : profondeur, texture, teneur en macro- ou oligo-éléments) (Figure I.7), mais la

présence de la maladie en zones de plaine (sols profonds) pose encore bien des interrogations sur l'étiologie de la maladie (Figure I. 8).



Figure I. 7. Parcelle de coteau présentant des zones de dessèchement précoce à la suite d'une attaque de bas de tige par *P. macdonaldii* dans le Lauragais (31), début août 2005



Figure I. 8. Parcelle de tournesol desséchée précocement en plaine à la suite d'une attaque de bas de tige par *P. macdonaldii* dans le Lauragais (31), le 30 août 2006

Questions de recherche et démarche scientifique

L'étude de l'étiologie du dessèchement précoce et la recherche de solutions faisant appel au contrôle cultural, posent des questions à l'interface de la phytopathologie et de l'agronomie, se traduisant par l'explicitation des relations entre l'agent pathogène (Phoma seul ou complexe parasitaire), la plante hôte (le tournesol), l'environnement (sol, climat, microclimat) et la conduite de culture. Afin de mieux comprendre les interactions entre ces différents facteurs, un schéma conceptuel peut être proposé, pour rendre compte des différentes relations susceptibles de conduire à ce syndrome (Figure I. 8).

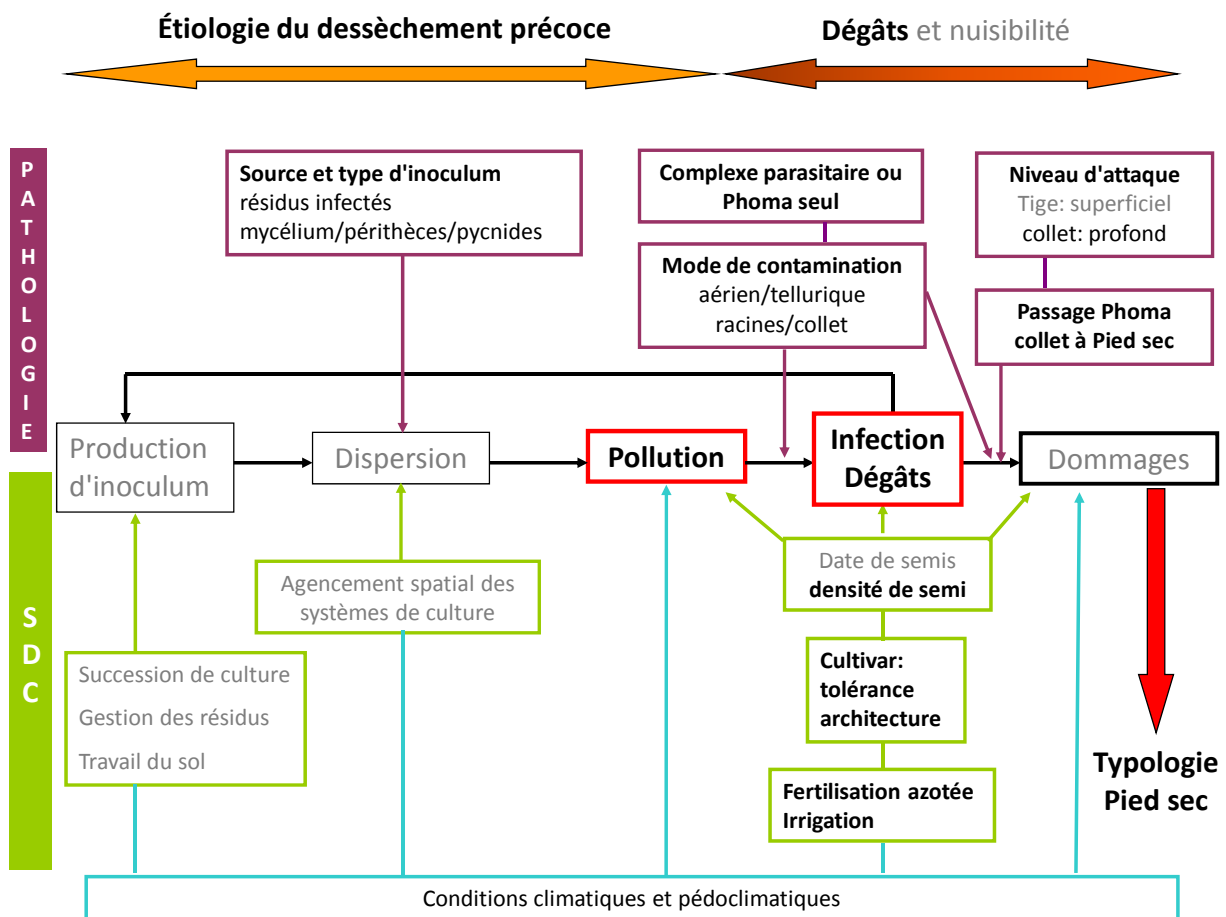


Figure I. 9. Schéma conceptuel des relations entre l'agent pathogène (Phoma seul ou complexe parasitaire), la plante hôte (le tournesol), l'environnement et la conduite de culture. Les cadres en violet et en vert correspondent aux variables liées aux agents pathogènes et au système de culture (SDC) respectivement. Seul les facteurs écrits en noir seront étudiés et testés expérimentalement pour l'étude sur l'étiologie du dessèchement précoce du tournesol.

Sur la base de ce schéma conceptuel, **quatre questions de recherche**, chacune articulée autour d'un chapitre, ont été posées dans le but de comprendre l'origine pathologique et physiologique de ce syndrome, et les facteurs de la conduite de culture favorables à l'infection et au développement de *P. macdonaldii*. La complexité de ce syndrome, et l'absence de connaissances élémentaires pour formaliser l'existant en vue d'une modélisation nous ont conduit à baser cette étude essentiellement sur une approche expérimentale. Des essais ont ainsi été menés au champ sur le domaine de l'INRA d'Auzeville (31), et en conditions semi-contrôlées (serre) sur ce même site ainsi que dans deux stations expérimentales du Cetiom, partenaire de cette étude : En-Crambade (31) et Thiverval-Grignon (78) entre 2006 et 2009. En parallèle, des observations et prélèvements de résidus de cannes de tournesol ont été réalisés en parcelles d'agriculteurs dans la région du Lauragais (31) pour quantifier la variabilité inter-annuelle et intra-parcellaire des attaques dans une zone de rotations courtes tournesol-blé dur caractéristique des coteaux du Sud-Ouest de la France.

Les quatre questions de recherche posées sont :

1. **Quel est l'agent pathogène responsable d'une plante desséchée précocement et présentant une attaque de Phoma au collet ?**

Avant de s'intéresser aux conditions propices au dessèchement précoce du tournesol, il apparaissait primordial de lever les interrogations relatives à l'origine pathologique de ce syndrome. **Les agents pathogènes associés à *P. macdonaldii* sur le système racinaire et le bas de tige de pieds secs de tournesol ont été identifiés et leur rôle a été étudié.** La question de l'agent causal du dessèchement précoce a donc été posée comme préambule à cette étude.

2. **Quelle est l'origine pathologique et physiologique du dessèchement précoce ?**

La présence de nécroses encerclantes de Phoma à la base de la tige, la sénescence rapide de la partie aérienne de la plante, associée à une dégradation du système racinaire, sont autant de symptômes visibles qui posent la question majeure de l'origine pathologique et physiologique du dessèchement précoce. Il devient dès lors fondamental de s'interroger sur ce point afin **d'étudier si les contaminations aériennes provoquent le dessèchement de la plante, ou si l'attaque du système racinaire est à l'origine du pied sec.** Reproduire expérimentalement les symptômes du dessèchement précoce, en serre et au champ, avec une méthode de

contamination artificielle optimale devient alors une étape clé pour **caractériser** dans un second temps **les mécanismes physiologiques à l'origine du pied sec**.

3. **Est-ce que la conduite de culture peut jouer sur la fréquence et la gravité du dessèchement précoce du tournesol ?**

Pour palier à la lutte chimique, peu efficace contre les attaques de Phoma au collet, et en l'absence de tolérances variétales bien établies, le contrôle cultural pourrait constituer une alternative pour contrecarrer l'évolution généralisée du dessèchement précoce en France. **L'étude de facteurs agronomiques contribuant à l'expression du phénomène**, a donc été réalisée sur des parcelles expérimentales. Les effets du **régime hydrique**, et de la **fertilisation azotée** ont été testés sur **deux variétés** présentant une sensibilité a priori contrastée face au dessèchement précoce. L'effet de la **densité de peuplement** a été testé dans un second temps sur la variété la plus sensible.

4. **Comment expliquer les effets de la fertilisation azotée et de la densité de peuplement ?**

Après avoir mis en évidence un effet de la conduite de culture, on proposera **un modèle conceptuel, permettant d'expliquer dans quelle mesure la fertilisation azotée et la densité de peuplement peuvent jouer sur le dessèchement précoce**. Trois aspects pouvant avoir un effet sur l'infection et la progression du pathogène seront ainsi étudiées : (i) le **microclimat sous le couvert végétal**, (ii) la **morphologie de bas de tige** de la plante, et (iii) **l'effet de la teneur en azote des tissus sur le développement du pathogène**.

A la suite de ces quatre chapitres, une conclusion rappellera les résultats marquants de cette étude sur l'étiologie du dessèchement précoce, et un schéma conceptuel théorique reliant la conduite de culture et le développement de la maladie permettant d'expliquer les avancées dans ce domaine sera proposé. Les perspectives de recherche et applications potentielles proposées viseront ainsi à améliorer la culture du tournesol soumise de manière permanente et généralisée à ce syndrome.

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

I. Matériel biologique

I. A. Matériel végétal : Choix des variétés de tournesol pour les essais

Deux variétés de tournesol classique ont été utilisées pour les différentes expérimentations au champ. Il s'agit d'hybrides simples cv. Heliasol RM (Semences de France, mi-précoce), sensible à *P. macdonaldii*, et de cv. Melody (NK, mi-tardive), partiellement résistante au Phoma (Mestries, communication personnelle). Le cultivar Heliasol, riche en huile, présente une certaine stabilité du rendement et de la teneur en huile, et une bonne réponse à l'apport tardif d'azote en raison d'une architecture de type « parasol » ; cv. Mélody, est plus tardive à maturité, plus productive, assez grande mais considérée comme sensible aux carences azotées (Annexe 3). Elle est réputée plus tolérante à la sécheresse. Dans le cadre des expérimentations en milieu semi-contrôlé (serre ou tunnel), les essais ont été conduits sur la variété cv. Heliasol RM. L'objectif de cette étude étant de comprendre l'étiologie du dessèchement précoce induit par *Phoma* et l'effet de la conduite de culture sur ce syndrome, l'utilisation de deux variétés présentant un comportement contrasté vis-à-vis de l'agent pathogène était nécessaire et suffisante. L'utilisation d'une plus grande diversité génétique pourrait s'envisager dans un second temps pour étudier le déterminisme de la tolérance du tournesol aux pieds sec et évaluer des sources de résistance exploitables.

I. B. Matériel fongique : choix des souches de *Phoma macdonaldii* et de *Macrophomina phaseolina* pour la contamination artificielle

I. B. 1. Prélèvements de tissus sur tournesol et isolements des pathogènes présents sur milieu de culture

Des fragments d'organes de cannes de tournesol sont prélevés sur le rhizoderme, le cortex et les racines secondaires du système racinaire, et sur l'épiderme, le cortex et la moelle du collet (zone entre la partie racinaire et aérienne) et de la tige (5 à 10 cm au dessus du collet) (Figure II. 1). Deux échantillons de chaque organe sont prélevés à l'aide d'un scalpel désinfecté entre les prélèvements, puis désinfectés indépendamment par immersion dans une solution d'eau de Javel à 1 degré chlore pendant 1 minute. Les échantillons sont ensuite rincés dans 3 bains successifs d'eau distillée stérile pendant 1 min, puis séchés sur un papier filtre

stérile afin de retirer l'excédent d'eau, avant d'être déposés sur un milieu « potato dextrose agar » (PDA) (DIFCO) (39 g/litre de PDA, 150 mg/litre de streptomycine, pH 6) en boîte de Petri. Entre chaque échantillon, les bains de javel et d'eau sont changés. Les boîtes sont ensuite placées dans un incubateur à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ avec une alternance de 12 h de jour/nuit à une intensité lumineuse de $37 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

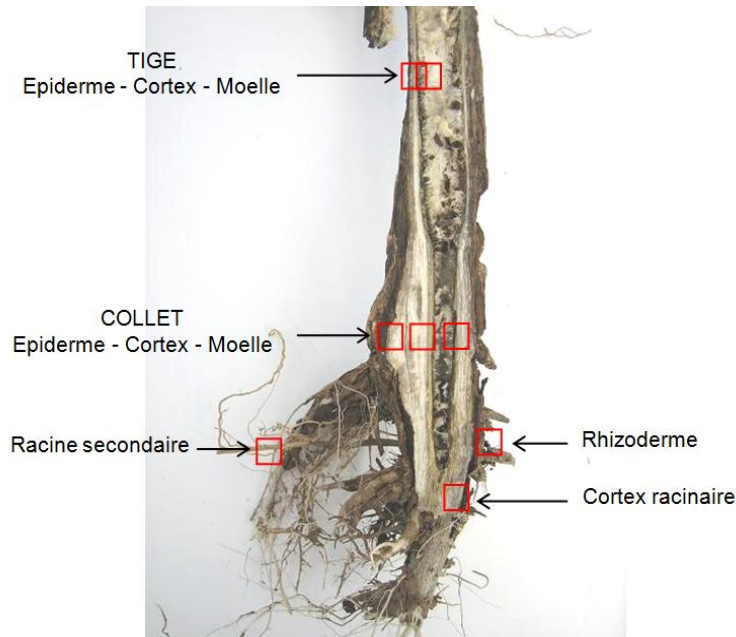


Figure II. 1. Fragments prélevés entre la tige et le système racinaire sur des cannes de tournesol

Après 2 jours de mise en culture, *Macrophomina phaseolina* et *Fusarium* spp. peuvent être mis en évidence. Le mycélium de *Phoma macdonaldii* commence à se développer et à induire des pycnides au-delà de 3 à 4 jours dans ces conditions. Une semaine est nécessaire pour une identification optimale de ce pathogène, lorsqu'il est associé à d'autres pathogènes, compte tenu de sa faible vitesse de croissance.

I. B. 2. Choix d'une souche de *Phoma macdonaldii*

Afin de reproduire artificiellement et expérimentalement des symptômes de dessèchement précoce à la suite d'une attaque de *Phoma* au collet, 10 isolats de *Phoma macdonaldii* prélevés sur des pieds secs de tournesol de 8 parcelles d'agriculteurs de la région Lauragais (31) ont été choisis (Annexe 4 et 5). Ces isolats sont issus de prélèvements au niveau du collet (1), de la moelle (5) et du cortex (1) de bas de tige, et du rhizoderme (3). En parallèle, une souche monopycniospore (MP6) (Roustae et al., 2000b), connue pour son agressivité lors de contaminations artificielles sur plantes et plantules, a servi de souche de référence pour évaluer l'agressivité des isolats testés.

I. B. 2. a. *Méthode de contamination artificielle par du mycélium de Phoma*

Pour tester chacun des 10 isolats, 5 plantes de cv. Heliasol RM et 5 plantes de cv. Melody ont été contaminées artificiellement au collet au stade E1 en serre (Figure II. 2). Le collet de la plante est dégagé. Une pastille de mycélium (7 mm de diamètre) est déposée au contact du collet (face mycélium contre collet), recouverte d'un coton humide, et l'ensemble est entouré d'une bande de papier aluminium pour éviter le dessèchement de la pastille. Cinq à six jours plus tard, la pastille, le coton et l'aluminium sont retirés.



Figure II. 2 Méthode de contamination artificielle par une pastille de mycélium de *Phoma macdonaldii* au collet de la plante de tournesol

I. B. 2. b. *Suivi de notation des symptômes au collet et observation du système racinaire des plantes contaminées*

Une semaine après la contamination artificielle un suivi de la progression de l'infection au collet est réalisé sur chacune des plantes contaminées par les différents isolats. La notation de la maladie se fait suivant une grille de notation constituée de 5 classes de symptômes au collet et sur racines (Figure II. 3). Parmi les 10 isolats comparés à la souche monopycniospore MP6, 4 apparaissent particulièrement agressifs par les nécroses occasionnées au collet des plantes contaminées artificiellement. Les collets de ces plantes présentent tous des nécroses encerclantes (note 2) qui ont progressé très rapidement jusqu'au nœud cotylédonaire de la plante. Les isolats ainsi sélectionnés sont issus des prélèvements au

collet (1), de la moelle (1) et du rhizoderme (2). Afin de choisir la souche qui sera utilisée pour les contaminations postérieures, des souches monopycniospores ont été isolées à partir de ces isolats.

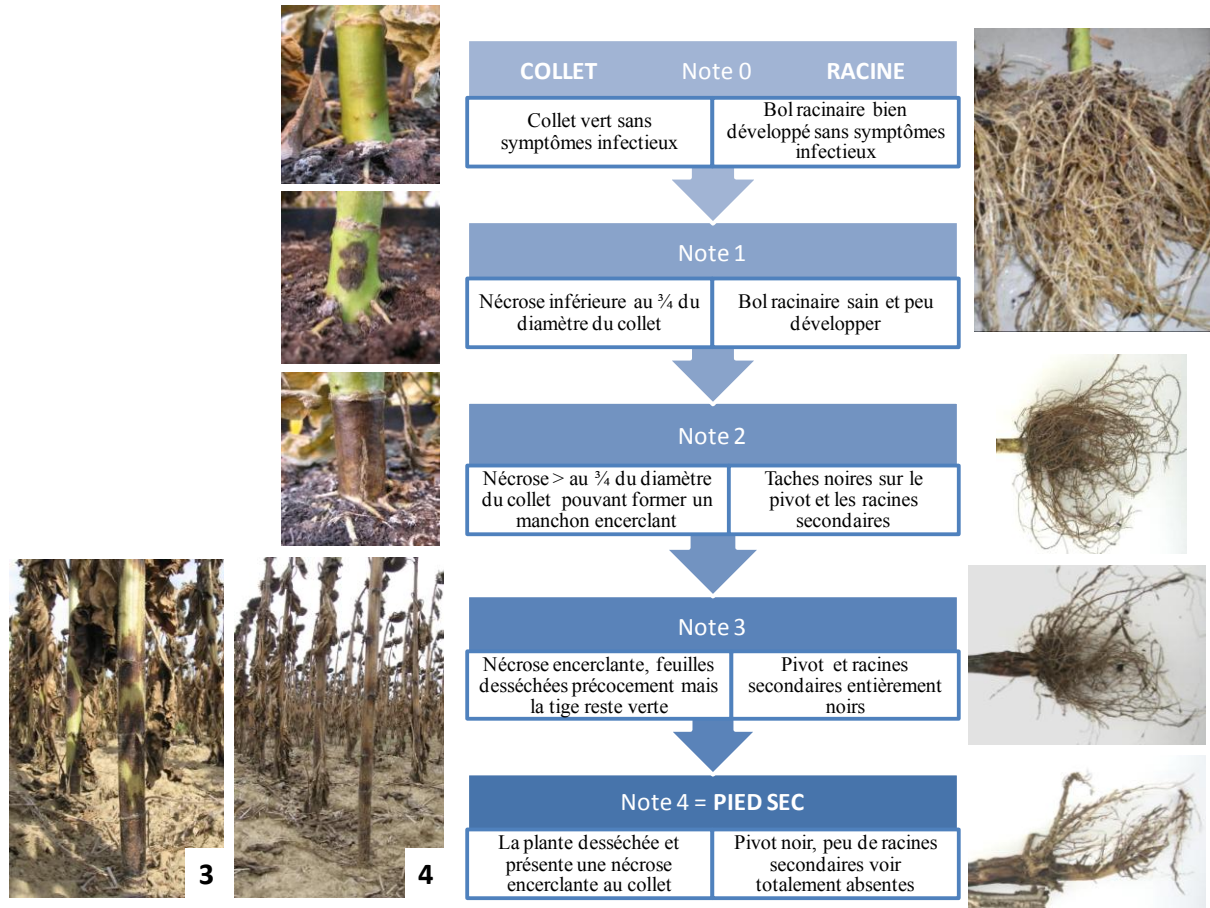


Figure II. 3. Echelle de notation des dégâts provoqués par *P. macdonaldii* sur collet et racines de tournesol allant de la classe 0 (pied sain) à la classe 4 (pied sec)

I. B. 2. c. *Isolement de souches monopycniospores*

Pour chacun des isolats de *Phoma*, une suspension mère de pycniospores est réalisée dans de l'eau distillée stérile, après photo-induction de la conidiogenèse (héméroperiode de 12h). Par dilutions successives, chaque suspension est amenée à une concentration d'environ 1 pycniospore/ μl . Des gouttes de 1 μl sont déposées sur une lamelle stérilisée placée aseptiquement sur une chambre de Van Tieghem afin d'éviter le dessèchement de la préparation. Après observation au microscope, les gouttes ne renfermant qu'une seule pycniospore sont prélevées à l'aide d'un morceau de papier filtre stérile, puis déposées aseptiquement à la surface du substrat nutritif PDA. Le milieu est ensuite mis à incuber à $25 \pm$

1°C sous un régime photopériodique de 12 heures jour/nuit à une intensité lumineuse de 37 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Seize souches monopycniospores ont ainsi été isolées.

I. B. 2. d. *Test d'agressivité des souches monopycniospores de Phoma sur plantule*

L'agressivité de chacune des 16 souches monopycniospores a été testée sur 5 plantules de cv.Heliasol RM car les symptômes observés sur plantes adultes sont comparables à ceux observés sur plantule (Abou al Fadil, 2006). Les graines de cv. Heliasol RM sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium à 6 degrés chlore pendant 5 minutes, puis rincées trois fois 5 minutes à l'eau distillée. Les graines sont ensuite semées dans le terreau à 2 cm de profondeur dans des bacs (48 x 35 x 10 cm) à raison de 20 plantes par bac. Les plantes sont ensuite placées en serre (§ II. B. 4) jusqu'à la fin de l'expérimentation. Au stade B2 (deux paires de feuilles), une pastille de mycélium de *Phoma macdonaldii* est appliquée contre le collet de la plante puis recouverte de terreau pour éviter la dessiccation de la gélose. Deux observations de progression de symptômes ont été réalisées 5 et 10 jours après contamination et parmi les 16 souches monopycniospores, 3, issues du prélèvement sur rhizoderme, moelle et collet se sont avérées particulièrement agressives. La souche monopycniospore finalement choisie pour effectuer les contaminations artificielles tout au long de ces travaux de thèse (souche MPH2) provient d'un collet de pied sec de la parcelle agricole 4 (Annexe 4 et 5).

I. B. 2. e. *Conservation des souches monopycniospores au glycérol*

Une suspension de la souche MPH2 est réalisée dans de l'eau distillée stérile, après photo-induction de la conidiogénèse. Par dilutions successives, la suspension est amenée à une concentration de 10^6 pycniospores/ μl , après comptage du nombre de spores sur une cellule de Fuchs-Rosenthal au microscope. Cette suspension est ensuite conservée dans du glycérol stérile (V/V) (SIGMA) dans un micro tube de 1,5 ml après homogénéisation extemporanée du mélange. La suspension est ensuite plongée quelques minutes dans l'azote liquide puis stockée à -80 °C au congélateur

I. B. 3. *Choix d'une souche de Macrophomina phaseolina*

Pour tester l'implication de *Macrophomina* seul ou en association avec *Phoma* dans le syndrome de dessèchement précoce du tournesol, deux souches de *Macrophomina phaseolina* (M1 et M2) ont été isolées sur des échantillons de moelle au niveau du collet de

pieds secs provenant de la parcelle agricoles 9 du Lauragais (Annexes 4 et 5). Pour sélectionner la souche la plus agressive, 8 génotypes de tournesol ont été inoculés par chacune des souches de *M. phaseolina* par la méthode dite des « cure-dents » (Figure II. 4) (Young, 1943). Des cures dents en bois stériles sont déposés sur milieu PDA, avec de la gélose contenant des microsclérotés de *Macrophomina*, puis mis en culture à 30 °C pendant 5 jours avec alternance de 12h jour/nuit. A la floraison, stade phénologique où la plante présente une très forte réceptivité au pathogène (Saumon *et al.*, 1984 ; Blanco-Lopez *et al.*, 1983), le bas de tige est transpercé afin d’insérer le cure-dent colonisé par *M. phaseolina*. De la vaseline est appliquée de part et d’autre de la tige aux points d’entrée et de sortie du cure-dent. Les plantes sont soumises à une contrainte hydrique favorable à la progression du pathogène (Jimenez-Diaz *et al.*, 1983). Huit plantes témoins ont également été contaminées par des cure-dents non inoculés.

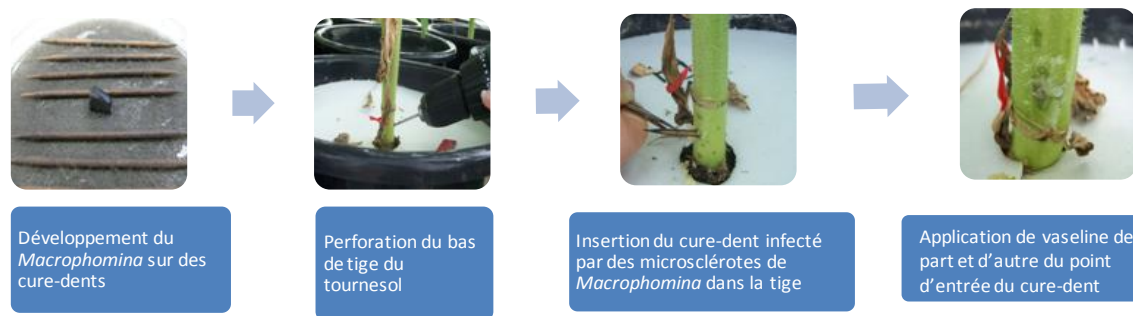


Figure II. 4. Contamination artificielle au collet par des microsclérotés de *Macrophomina* par la méthode des cure-dents (Young, 1943).

En l’absence d’inoculum, les plantes témoins n’ont développé aucun symptôme externe et ont continué leur cycle de développement normalement (Figure II. 5, A). A l’inverse, les plantes inoculées par des cure-dents portant de microsclérotés de *Macrophomina* ont présenté des nécroses au collet, plus ou moins prononcées selon la souche. La souche M1 s’est avérée la plus agressive entraînant des nécroses mesurant jusqu’à 30 cm le long de la tige, alors qu’après contamination par la souche M2, les nécroses n’ont pas dépassé 10 cm (Figure II. 5, B et C). La souche M1 a donc été choisie pour les contaminations postérieures.

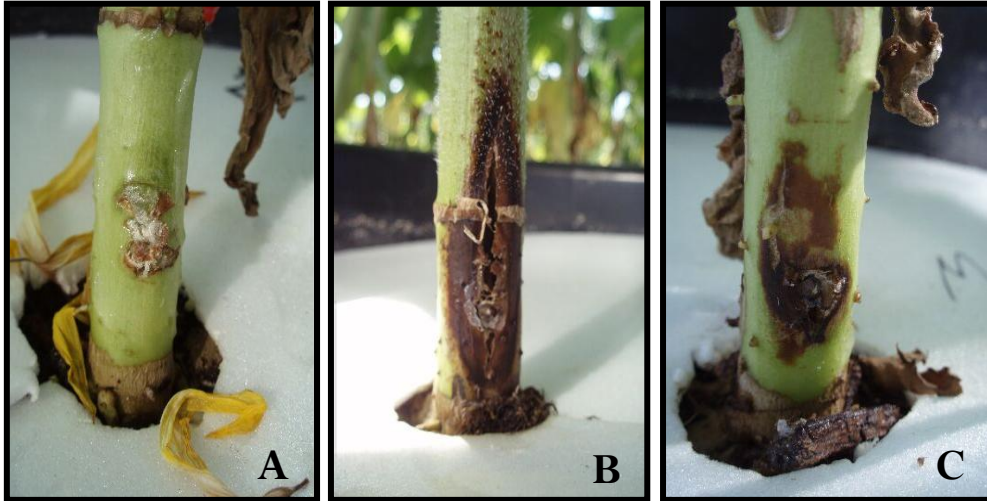


Figure II. 5. Observation de symptômes au collet, pour la variété cv. Heliasol RM, 4 semaines après contamination par un cure-dent témoin (A), portant par des microsclérotos de *Macrophomina* des souches M1 (B) et M2 (C).

II. Conduite de culture, dispositif expérimental et méthodes de contaminations artificielles en serre

Cinq expérimentations ont été conduites en conditions semi-contrôlées entre 2007 et 2009, dont 3 sur le domaine d'Auzeville (SAuz07, SAuz08 et SAuz09), 1 à En-Crambade (SEC07) et 1 à Grignon (SSGri08). Pour chacune des expérimentations, les protocoles communs concernant la conduite de culture seront exposés dans un premier temps, puis le dispositif expérimental et les méthodes de contamination artificielles dans un second temps. Le Tableau II. 1 résume l'objectif de chacune des expérimentations ainsi que les principales conduites et modalités de contamination artificielles de ces essais.

Tableau II. 1. Tableau récapitulatif des expérimentations menées en serre entre 2007 et 2009 sur les domaines expérimentaux d'Auzeville (Auz), En-Crambade (EC) et Grignon (Gri)

	SAuz07	SAuz08	SAuz09	SEC07	SGri08
Questions de recherche	<p>Q1 : Existe-t-il un complexe parasitaire <i>Phoma/Macro</i> à l'origine du dessèchement précoce (DP) ?</p> <p>Q2 : Le DP est-il d'origine aérienne ou tellurique ?</p> <p>Q3 : Comment caractériser un pied sec <i>Phoma</i> (morphologie et physiologie) ?</p>	<p>Q4 : Les spores de <i>Phoma</i> sont-elle plus à même de reproduire des pieds secs ?</p> <p>Q5 : Existe-t-il un effet dose [spores] pour une contamination optimale dans le but de reproduire artificiellement des pieds secs ?</p>	<p>Q3 : Cf. Auz07</p> <p>Q4 : Cf. Auz08</p> <p>Q6 : La progression du pathogène dans les tissus de la plante est-elle favorisée par une fertilisation azotée excessive?</p>	<p>Q1 : Cf. Auz07</p> <p>Q2 : Cf. Auz07</p>	<p>Q2 : Cf. Auz07</p>
Chapitre correspondant	<p>Q1 : Ch3-2</p> <p>Q2 : Ch4-1</p> <p>Q3 : Ch4-2</p>	<p>Q4 : Ch4-1</p> <p>Q5 : Ch4-1</p>	<p>Q3 : Ch4-2</p> <p>Q4 : Ch4-1</p> <p>Q6 : Ch6-2</p>	<p>Q1 : Ch3-2</p> <p>Q2 : Ch4-1</p>	<p>Q2 : Ch4-1</p>
Date de semis	20 février 2007	30 septembre 2008	23 mars 2009	2 avril 2007	26 mars 2008
Méthode de contamination	<p>- <i>Phoma</i> résidus enfouis au semis</p> <p>- <i>Phoma</i> mycélium</p> <p>- <i>Phoma</i>+Macro</p> <p>- <i>Macrophomina</i></p>	<p>- <i>Phoma</i> mycélium</p> <p>- <i>Phoma</i> spores 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ spores/ml</p>	<p>- <i>Phoma</i> mycélium (1)</p> <p>- <i>Phoma</i> spores 10⁶ spores/ml (2)</p>	<p>- <i>Phoma</i> résidus enfouis au semis</p> <p>- <i>Phoma</i> mycélium</p> <p>- <i>Phoma</i>+Macro</p> <p>- <i>Macrophomina</i></p>	<p>- <i>Phoma</i> résidus enfouis au semis</p> <p>- <i>Phoma</i> résidus en surface au stade E1</p> <p>- <i>Phoma</i> mycélium</p>
Date et stade de contamination	20 avril / 27 avril <i>Phoma</i> : E3/E4 Macro : F1/F2	19 novembre <i>Phoma</i> : E3/E4	12 mai <i>Phoma</i> : E3/E4	14 mai / 15 juin <i>Phoma</i> : E1 Macro : F1/F2	7 mai <i>Phoma</i> : E1
Fertilisation N, P, K	(150, 50, 50)	(150, 50, 50)	(150, 50, 50) (50, 50, 50) Non fertilisé	(150, 50, 50)	(150, 50, 50)
Irrigation	Stress hydrique post floraison	Stress hydrique post floraison	Stress hydrique post floraison	Stress hydrique post floraison	Stress hydrique post floraison
Nb de plante / traitement contamination et témoin	Contaminé : 25 Témoin : 20	Contaminé : 27 Témoin : 24	Contaminé (1) N150,N50,N0 : 24 Contaminé (2) N150 : 24 Témoin : 8	Contaminé : 60 Témoin : 20	Contaminé : 24 Témoin : 10
Nb total de plantes	120	160	120	250	82
Dispositif	3 blocs	4 blocs	4 blocs	4 blocs	3 blocs
Fin de l'essai	3 août 2007	29 janvier 2008	20 août 2009	6 août 2007	7 août 2008

II. A. Conduite de culture des essais

II. A. 1. Substrat des plantes

Sur le site d'Auzeville et de Grignon, le choix du substrat s'est porté sur un mélange terre végétale/sable/terreau afin d'obtenir un mélange souple, homogène, assez aéré, de densité suffisante, ayant une bonne capacité de rétention d'eau (terreau) mais permettant des échanges entre le fond et le haut du pot (sable). Selon ces critères, la composition retenue s'est traduite par un mélange de 50% de sol de texture argilo-limoneuse (capacité de rétention), de 40% de terreau et de 10% de sable (drainage). La terre utilisée pour ce mélange provient de parcelles qui n'ont pas été cultivées depuis 30 années (sol nu travaillé) et où la présence éventuelle de *Phoma* est négligeable, ce pathogène se conservant principalement sur les résidus de culture. Sur le site d'En-Crambade, en l'absence de terre de cette nature, le substrat utilisé était composé d'un mélange de 60 % de terreau et de 40 % de sable pour éviter d'éventuelles sources d'inoculum externe.

II. A. 2. Désinfection des semences et semis

Les semences de cv. Heliasol RM non traitées sont désinfectées avant le semis dans un bain d'eau de Javel à 6 degrés chlore pendant 5 minutes, puis rincées abondamment à l'eau claire pour éliminer l'excédent de Javel. Ce traitement permet, outre la désinfection des semences, de faciliter la germination. L'oxygénation brutale des semences à l'eau de Javel inhibe les composés phénoliques qui piègent l'O₂ des téguments de la graine et empêchent l'oxygénation de l'embryon. Une fois les phénols oxydés, l'oxygénation de l'embryon est alors optimale pour permettre une levée de la dormance tégumentaire et une germination homogène.

Pour les expérimentations menées sur le site d'Auzeville, les graines désinfectées sont mises à germer en boîte de Pétri pendant 3 à 4 jours, puis semées à raison d'une graine par pot dès l'apparition de la radicule. Sur les sites d'En-Crambade et de Grignon, 4 graines désinfectées sont directement semées en pots à 2 cm de profondeur puis démarriées dès l'apparition des cotylédons pour ne laisser qu'une seule plantule par pot, qui aura été recentrée. Après le repiquage ou le semis, les réserves des pots sont remplies afin d'éviter l'assèchement en surface. La capacité des pots était de 15 litres à Auzeville et Grignon et de 12 litres à En-Crambade.

II. A. 3. Environnement climatique dans la serre

Sur les stations d'Auzeville et de Grignon, les essais ont été menés en serre, alors qu'à En-Crambade les essais ont été réalisés sous un tunnel bâché (Figure II. 6). La régulation de la température dans la serre a donc pu être fixée à 17 °C la nuit et 25 °C le jour. Pendant les journées estivales, la température est régulée par un système de refroidissement par "cooling", permettant de maintenir une température inférieure de 6 °C à la température extérieure. Une photopériode de 14 h était appliquée en début de cycle par l'utilisation de lampes à sodium de 400W (SON-T AGRO, Philips à Auzeville et Blanc Europe MBS, Claude à Grignon), lorsque le rayonnement global dans la serre était inférieur à 250 W/m². La disposition de ces lampes est telle qu'elles puissent éclairer de façon optimale 6 à 8 plantes.



Figure II. 6. Serre d'Auzeville (gauche) et tunnel bâché d'En-Crambade (droite).

II. A. 4. Le régime hydrique

L'irrigation est effectuée à l'aide d'un système de goutte à goutte relié à une pompe électrovanne où chaque goutteur permet un débit de 2 litres/h. Les besoins en eau de la plante sont pilotés par un boîtier relié aux électrovannes et la quantité d'eau apportée est identique pour l'ensemble des plantes. De la levée à la floraison, l'irrigation n'est pas limitante, permettant ainsi un développement optimal des plantes. A partir de la floraison, un stress hydrique est appliqué jusqu'à la récolte, pour reproduire les conditions séchantes observées sur les parcelles en coteaux. La réserve en eau du substrat est ainsi maintenue entre 30 % et 50 % de la réserve utile. Il s'agit de se situer dans une zone de contrainte hydrique modérée

affectant la transpiration et l'activité photosynthétique de la plante (Casadebaig et al., 2008). Sur le site d'En-Crambade et de Grignon, le stress hydrique est piloté par le système d'irrigation en réduisant l'apport d'eau des plantes. La quantité d'eau apportée est définie par des pesées réalisées entre la floraison et la récolte au printemps 2007 sur le site d'Auzeville. Les pesées sont effectuées tous les 2 à 3 jours (selon les conditions de température dans la serre) sur un sous-échantillon de 16 plantes afin de déterminer la quantité d'eau perdue entre chaque arrosage. La quantité d'eau apportée par plante pour ramener le substrat à 50 % de la réserve utile, correspondant à un poids de 12,73 kg, est calculée selon la Figure II. 7. Le poids à la capacité au champ a été identifié après ressuyage de 4 pots, le poids sec après un passage à l'étuve du substrat de ces pots pendant 5 jours à 80 °C, et le point de flétrissement défini après analyse de sol par le laboratoire de l'INRA d'Arras.

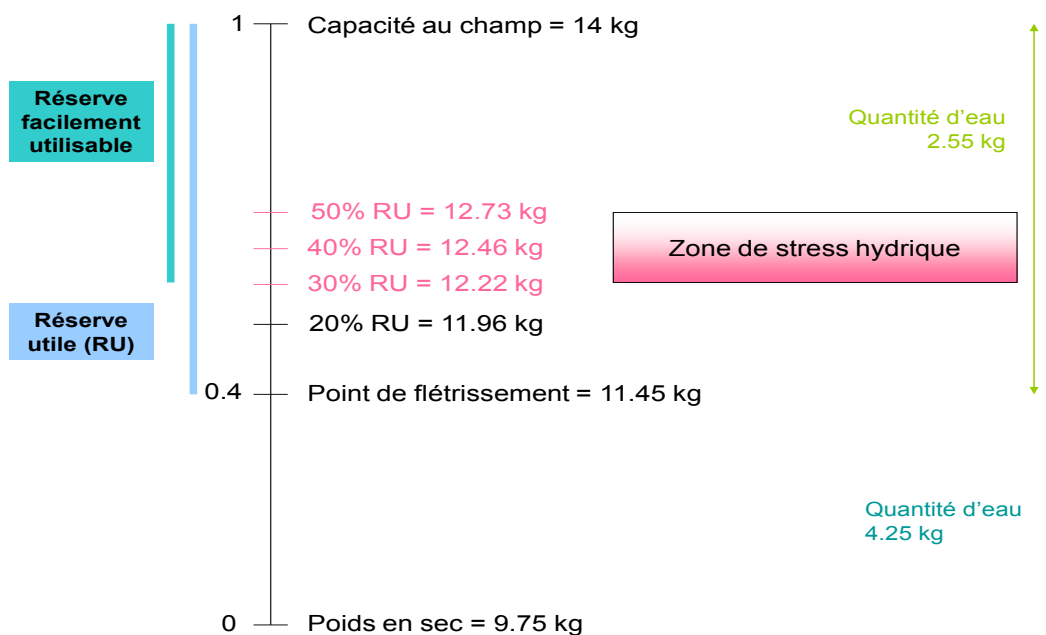


Figure II. 7. Schéma représentant la gamme de poids des pots entre la capacité au champ et le poids sec, permettant de piloter le stress hydrique des plantes pour les maintenir dans une zone de stress entre 30 % et 50 % de la réserve utile du substrat.

II. A. 5. Fertilisation minérale

La fertilisation a été apportée à partir d'une solution N, P, K contenant 13,26 g NO_3NH_4 , 4,42 g P_2O_5 , et 4,42 g K_2O et correspondant à un apport équivalent en culture de 150 kg N, 50 kg P, et 50 kg K/ha. Cette solution a été apportée soit (i) en continu à l'aide d'une pompe doseuse DOSATRON reliée au système d'irrigation automatisé entre le stade 7/8 feuilles et F1/F2 pour l'expérimentation SAuz07, soit (ii) manuellement pour les autres expérimentations, à des stades fixés, par dilution dans un volume d'eau correspondant à la quantité d'eau apportée chaque jour à la plante. Quatre apports ont été réalisés pour les expérimentations SAuz08 et SAuz09 aux stades : 4/8 feuilles, 8/10 feuilles, E1/E2 et F1/F2 en 2008, et 9/12 feuilles, E1, E2/E3 et F35 en 2009. Sur les sites d'En-Crambade et Grignon, 3 apports ont été réalisés aux stades : 16/17 feuilles, E4 et M0 (SEC07), et B6 et E1 (SGri08). Pour les expérimentations Auz08, Auz09 et EC07, un complément en oligoéléments (Cu, Fe, Mn, Mo et Zn) a été ajouté à la solution N, P, K (150, 50, 50). Pour l'essai SAuz09, un niveau de fertilisation intermédiaire en N, P, K (50, 50, 50) a également été testées aux mêmes stades que pour la fertilisation N, P, K (150, 50, 50). Cette solution contenait 4,42 g NO_3NH_4 , 4,42 g P_2O_5 , et 4,42 g K_2O .

II. B. Dispositif expérimental des essais en serre et méthodes de contamination artificielle par *Phoma macdonaldii*

Les essais mis en place en serre sur les 3 sites d'expérimentation avaient pour objectif de tester différentes méthodes de contamination artificielles par *Phoma*, afin d'établir un protocole permettant de reproduire des pieds secs de tournesol en conditions semi-contrôlées, et de répondre aux questions relatives à : (i) la recherche de l'agent pathogène responsable du dessèchement précoce (*Phoma* vs *Macrophomina*), et (ii) la détermination de l'origine aérienne ou tellurique du dessèchement précoce. En parallèle, ces essais visaient à établir une typologie des faciès 'pied sec' à la suite d'une attaque de bas de tige par *Phoma*.

II. B. 1. Les différentes méthodes de contamination artificielle par *Phoma macdonaldii*

II. B. 1. a. Contamination artificielle par du mycélium de *Phoma*

Cette méthode de contamination, réalisée au stade bouton floral, a été exposée plus haut au § I. B. 2. a.

II. B. 1. b. *Contamination artificielle par des résidus infectés par P. macdonaldii*

Pour l'expérimentation SAuz07, des résidus de tournesol, porteurs de pycnides et de périthèces de *Phoma macdonaldii* et présentant une nécrose encerclante au niveau du collet (note 2), ont été collectés en janvier 2007 à Beateville (31), sur une parcelle de blé succédant au tournesol. Des résidus de même type ont été collectés mi-mars 2007 pour les contaminations de l'essai SEC07. Les contaminations de SGri08 ont été réalisées à partir de résidus de tournesol infectés par la souche monopycniospore de *Phoma macdonaldii* MPH2 provenant d'essais au champ conduits à Auzeville en 2007 (CAuz07). Les résidus ont été déposés au dessus d'un couvert herbeux pour être exposés aux conditions climatiques locales les mois suivants la récolte et permettre au pathogène de continuer son cycle de développement. Avant la contamination, les résidus de tournesol ont été fendus et la moelle retirée. Le matériel a été choisi en fonction de la densité de pycnides de *Phoma* présentes et l'absence visible d'autres pathogènes (microscélérotés de *Macrophomina* par exemple). Dix fragments de bas de tige de 10 à 15 cm ont été enfouis avant le semis en périphérie de chaque pot pour ne pas gêner le développement du pivot et augmenter la probabilité de contact entre résidus et racines. Ce protocole de contamination racinaire par *P. macdonaldii* a été suivi pour les essais SAuz07, SEC07 et SGri08. Une contamination supplémentaire a été menée à SGri08, qui consistait à déposer 10 fragments de résidus infectés à la surface du pot pour une contamination aérienne au stade E1 par le *Phoma*.

II. B. 1. c. *Contamination artificielle par des spores de Phoma macdonaldii*

Les contaminations par des spores de *Phoma* sont réalisées à partir d'une goutte de la souche MPH2 conservée à -80 °C dans le glycérol (§ I. B. 2. e) remise en culture sur milieu PDA à 25 °C avec alternance de 12 h jour/nuit pendant 10 jours pour induire l'émission de pycnides (Figure II. 8. A). Les spores sont ensuite prélevées après arrosage d'un morceau de gélose contenant des pycnides, placées dans une boîte de Petri, avec de l'eau stérile, pour permettre la libération des spores (Figure II. 8. B). La concentration de cette suspension est ensuite déterminée à l'aide d'une cellule de Fuchs-Rosenthal et ajustée à 10^6 spores/ml. Cette suspension mère peut ensuite être employée directement pour les contaminations artificielles sur tournesol (essai SAuz08 et SAuz09) ou diluée pour des contaminations à des concentrations à 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 spores/ml (essai Auz08).

La contamination est réalisée en prélevant un volume de 70 µl d'une solution de spores homogénéisée extemporanément, déposé sur un disque stérile de papier filtre en cellulose de 6 mm de diamètre (type antibiogramme), puis appliqué « côté spores » contre le collet de la plante. Le disque est ensuite maintenu autour du collet pendant 7 jours avec du Parafilm®M pour éviter son dessèchement (Figure II. 8. C).

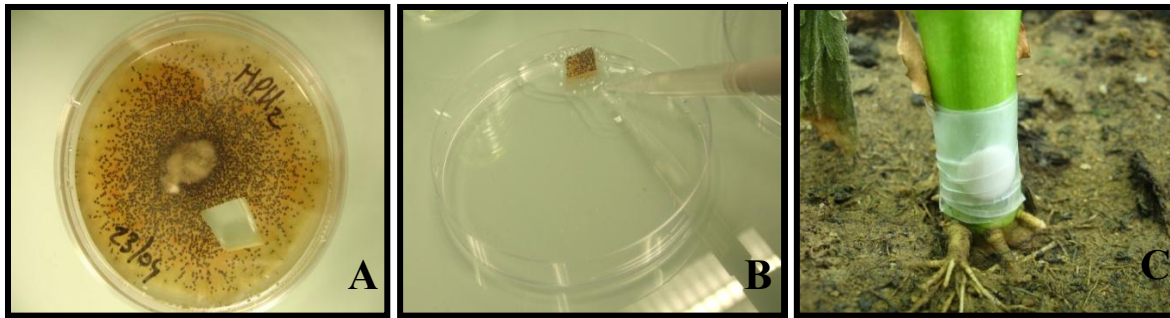


Figure II. 8. Extraction d'une suspension de spores de *Phoma macdonaldii* (B) à partir d'une culture de la souche monopycniospore MPH2 (A), déposée sur un disque de cellulose pour une contamination artificielle au collet (C).

II. B. 2. Méthode de contamination artificielle du substrat par des microsclérotos de *Macrophomina phaseolina*

Pour tester l'implication de *Macrophomina phaseolina* dans le dessèchement précoce, des plantes ont été contaminées artificiellement par apport de microsclérotos dans le sol. Cette méthode de contamination, réalisée à la floraison, apparaît être la plus efficace mais également la plus naturelle (Alexandrov, 2000). Pour chaque plante, trois boîtes de Petri contenant des microsclérotos de *M. phaseolina* souche M1 sont broyées au mixer (Moulinex Masterchef Delicio) avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Le volume final de l'homogénéat ainsi obtenu est ajusté à un volume correspondant à la quantité d'eau d'irrigation journalière apportée par plante, (Figure II. 9). Le collet et les racines superficielles sont dégagés de la terre puis arrosés avec la suspension de microsclérotos afin de favoriser le contact entre les microsclérotos et les racines. La terre dégagée est ensuite remise en place.



Figure II. 9. Contamination artificielle par des microsclérotés de *Macrophomina phaseolina* dans le sol à la floraison.

Si la quantité de microsclérotés apportée par plante est supposée homogène, un comptage des microsclérotés de *Macrophomina* est réalisé sur 60 prélèvements de 5 µl de suspension de microsclérotés. Chaque échantillon est filtré (par vide d'air) sur un entonnoir cylindro-conique à plaque filtrante contenant un papier filtre n°1 Whatman et les microsclérotés retenus par le filtre sont ensuite comptés sous loupe binoculaire. Ainsi, la quantité moyenne de microsclérotés apportée par plante était de $6,6 \times 10^6$ microsclérotés.

III. Mise en place et conduite des essais au champ

Quatre expérimentations ont été conduites au champ entre 2006 et 2009 sur le domaine d'Auzeville (CAuz06, CAuz07, CAuz08 et CAuz09). Pour chacune des expérimentations, la conduite de culture des essais sera présentée dans un premier temps, puis le Tableau II. 2 résumera les caractéristiques propres à chacune des expérimentations à la fin de cette partie. Les principaux facteurs de variation de la conduite de culture testés sont : le régime hydrique (irrigué ou non), la fertilisation azotée (absence, fertilisation intermédiaire ou importante), la sensibilité de la variété (sensible : cv. Heliasol RM ou partiellement résistant : cv. Melody), et la densité de peuplement (6.5 plantes/m² et deux niveaux encadrant la pratique courante : 4 et 9 plantes/m²). Au sein de ces différentes conduites, les plantes ont été contaminées artificiellement (AI) par une pastille de mycélium de *Phoma macdonaldii*, ou

soumises, en l'absence d'application de fongicides, à une contamination naturelle (AI) variable selon le climat de l'année.

Tableau II. 2. Tableau récapitulatif des expérimentations menées au champ entre 2006 et 2009 sur le domaine expérimental d'Auzeville

	CAuz06	CAuz07	CAuz08	CAuz09
Questions de recherche	<p>Q1 : Comment la conduite de culture, et plus particulièrement le régime hydrique, la fertilisation azotée et la sensibilité du cultivar, influent sur le syndrome de dessèchement précoce à la suite d'attaques naturelles ou artificielles (plus précoces) de <i>Phoma</i> au collet?</p> <p>Q2 : Le microclimat sous le couvert végétal, généré par des peuplements denses sous de forts régimes de fertilisation azotée, peut-il favoriser la progression du pathogène et contraindre la plante à un dessèchement plus précoce ?</p> <p>Q3 : La morphologie de bas de tige des plantes, contrastée suivant les régimes azotés, peut-elle modifier la progression du pathogène dans les tissus de la plante et par conséquent la proportion de plantes atteintes de dessèchement précoce ?</p>		<p>Q1 : Comment la conduite de culture, et plus particulièrement, le régime hydrique, la fertilisation azotée et la densité de peuplement, influent sur le syndrome de dessèchement précoce à la suite d'attaques naturelles ou artificielles de <i>Phoma</i> au collet ?</p> <p>Q2 : Le microclimat sous le couvert végétal, généré par des peuplements denses sous l'effet combiné de l'azote et de densités de peuplement élevées, peut-il favoriser la progression du pathogène et contraindre la plante à un dessèchement plus précoce ?</p> <p>Q3 : La morphologie de bas de tige des plantes, contrastée suivant les régimes azotés et la densité de peuplement, peut-elle modifier la progression du pathogène dans les tissus et par conséquent la proportion de plantes atteintes de dessèchement précoce ?</p>	
Chapitre correspondant	<p>Q1 : Ch5-1 (eau, N, variété)</p> <p>Q2 : Ch6-1</p> <p>Q3 : Ch6-2</p>		<p>Q1 : Ch5-1 (eau, N) et Ch5-2 (densité)</p> <p>Q2 : Ch6-1</p> <p>Q3 : Ch6-2</p>	
Variables étudiées du système de culture	Régime hydrique Fertilisation N Variété AI/NI	Régime hydrique Fertilisation N Variété AI/NI	Régime hydrique Fertilisation N Peuplement AI/NI	Régime hydrique Fertilisation N Peuplement AI/NI
Précédent culturel	Sorgho	Sorgho	Sorgho (sec) Maïs (irrigué)	Sorgho (sec) Maïs (irrigué)
Date de semis	19 avril	24 avril	16 mai	14 mai
Variété	cv. Heliasol RM cv. Melody	cv. Heliasol RM cv. Melody	cv. Heliasol RM	cv. Heliasol RM
Date de levée	30 avril 2006	24 avril 2007	16 mai 2008	14 mai 2009
Densité de peuplement	6,5 plantes/m ²	6,5 plantes/m ²	4, 6.5, 9 plantes/m ²	4, 6.5, 9 plantes/m ²
Fertilisation N	N0, N150	N0, N75, N150	N0, N75, N150	N0, N50, N150
Irrigation (mm)	Sec : 50 mm Irrigué : 220 mm	Sec : 0 mm Irrigué : 80 mm	Sec : 20 mm Irrigué : 120 mm	Sec : 20 mm Irrigué : 70 mm
Contamination	8 juin – stade E1/E2	6 juin – stade E1/E2	1 juillet – stade E1	30 juin – stade E1
Méthode de contamination	Mycélium de <i>Phoma</i>	Mycélium de <i>Phoma</i>	Mycélium de <i>Phoma</i>	Mycélium de <i>Phoma</i>
Nb plantes suivies	25 plantes x 3 rép x 2 (eau) x 2 (N) x 2 (variété) x 2 (contamination) = 1200	25 plantes x 3 rép x 2 (eau) x 3 (N) x 2 (variété) x 2 (contamination) = 1800	25 plantes x 3 rép x 2 (eau) x 3 (N) x 3 (densité) x 2 (contamination) = 2700	25 plantes x 3 rép x 2 (eau) x 3 (N) x 3 (densité) x 2 (contamination) = 2700
Fin de l'essai	12 septembre 2006	10 septembre 2007	29 septembre 2008	25 septembre 2009

III. A. Dispositif expérimental

Au sein de chaque parcelle expérimentale, le de travail du sol a consisté à effectuer un labour (début octobre), puis un passage de vibroculteur (entre janvier et mars), complété par un passage de germinator 2 jours avant le semis (avril). Les parcelles ont été choisies pour leur faible reliquat azoté laissé par la culture précédente : sorgho (CAuz06 et CAuz07), et sorgho/maïs (CAuz08 et CAuz09), permettant une variation de l'état nutritionnel du tournesol par la fertilisation azotée. Les expériences ont été conduites selon un dispositif expérimental *split-plot* à 4 facteurs et 3 répétitions. En raison des contraintes d'irrigation (rampe), le régime hydrique a été placé en « main plot », la fertilisation azotée étant arrangée en sous-parcelles (« subplots »). L'azote a été appliqué en bande au sein des parcelles principales (sec, irrigué). Lors des essais CAuz06 et CAuz07, les variétés cv. Heliasol RM et cv. Melody ont été semées au sein de chaque traitement azoté à double densité puis démarquées à 6,5 plantes/m², et contaminées artificiellement ou naturellement. Dans le cas des essais CAuz08 et CAuz09 (Annexe 6), le dispositif expérimental était identique à celui mené les 2 années précédentes, mais le facteur variété a été remplacé par le facteur densité. Les essais ont été conduits uniquement sur la variété la plus sensible (cv. Heliasol RM) à 3 densités de peuplement soit 4 (D1), 6.5 (D2) et 9 plantes/m² (D3). Chaque parcelle élémentaire d'une superficie de 37 m² (CAuz06), 22 m² (CAuz07), et 18 m² en CAuz08 et CAuz09, était composée de 6 rangs de tournesol espacés de 0,60 m.

III. B. Conduite de culture des essais

III. B. 1. Fertilisation azotée

En CAuz06, deux niveaux de fertilisation ont été testés (0 et 150 kg N/ha), et trois entre 2007 et 2009. Les traitements non fertilisés (N0) et fortement azotés (N150) étaient comparables pour les quatre années d'expérimentations. En CAuz07 et CAuz08, un traitement intermédiaire de 75 kg N/ha (N75) a été réalisé, alors qu'en CAuz09, 50 kg N/ha (N50) ont été apportés. Au semis, 75 kg N/ha ont été apportés pour les traitements N75 et N150, et 50 kg N/ha en N50. Une seconde application de 75 kg N/ha a été réalisée au stade bouton floral (E1) pour les traitements N150.

III. B. 2. Irrigation

Deux modalités contrastées ont été conduites pour chacun des essais : une modalité irriguée, non limitante en eau tout au long de la culture du tournesol, et une modalité non-irriguée après floraison pour simuler les conditions séchantes des zones de coteaux propices au syndrome de dessèchement précoce en fin de cycle de la culture.

La quantité d'eau, apportée à la culture par aspersion (*sprinkler*), et la fréquence des irrigations ont été décidées en fonction des précipitations mesurées et du déficit hydrique du sol. En CAuz06, six irrigations de 220 mm ont été apportées à la culture sur les parcelles irriguées pour palier les conditions environnementales particulièrement sèches, et 50 mm aux parcelles non-irriguées au semis pour faciliter la levée et l'assimilation de la fertilisation azotée. En CAuz07, 80 mm ont été apportés en 2 temps pour satisfaire les besoins en eau des parcelles irriguées alors que les parcelles non-irriguées n'ont pas reçu d'irrigation. En 2008, 120 mm ont été apportés aux parcelles irriguées et 20 mm aux parcelles non-irriguées pour l'assimilation de l'azote. Année particulièrement pluvieuse, l'irrigation avait dans le cas présent pour objectif de créer un différentiel avec les parcelles « non-irriguées ». En CAuz09, les parcelles non-irriguées ont reçu 20 mm au semis, et 70 mm pour les parcelles irriguées.

III. C. Contamination artificielle et naturelle

Au sein de chaque parcelle élémentaire, 25 plantes ont été choisies en contamination artificielle (AI) et naturelle (NI) sur les 2 rangs centraux pour les densités de peuplement de 6,5 et 9 plantes/m², et sur les 4 rangs centraux pour les densités de 4 plantes/m². Les plantes ont été sélectionnées au stade bouton floral (E1), quelques jours avant la contamination artificielle, pour leur homogénéité de développement et l'absence de pathogènes visibles au collet et sur tige. Sur les parcelles en NI, aucune action n'a été réalisée sur les 25 plantes, et un suivi des attaques naturelles de *Phoma* au collet a été réalisé. Pour la modalité en AI, les 25 plantes sélectionnées ont été contaminées au collet par une pastille de mycélium de *Phoma*, maintenue par un coton humide et un film d'aluminium (§ I. B. 2. a), au stade E1/E2. La pastille a été retirée 1 semaine après contamination et un suivi de progression des symptômes au collet a été réalisé en parallèle des observations en NI.

IV. Variables étudiées en serre et au champ

IV. A. Mesures des variables environnementales

L'acquisition de variables climatiques a permis de diagnostiquer les contraintes éventuellement subies par la culture. Pour les expérimentations réalisées au champ sur le site d'Auzeville, les précipitations (mm/jour) ainsi que les températures minimales et maximales de l'air (°C), ont été mesurées quotidiennement sur le cycle cultural par une station météorologique (CE-180, Cimel, France) placée en bordure des essais. En parallèle, des mesures du microclimat sous le couvert végétal ont été effectuées sur les essais CAuz08 et CAuz09 à l'aide de thermohygromètres (MP 100-A, Rotronic, France). Placés à une hauteur de 40 cm au-dessus du sol, ces capteurs, qui enregistrent la température et l'humidité relative de l'air toutes les 30 minutes, sont reliés à une centrale d'acquisition CR10X (Campbell Scientific Inc.).

Dans la serre d'Auzeville, la température et l'humidité relative sont mesurées à l'aide de thermohygromètres (MP 103-A, Rotronic, France), toutes les 30 minutes et les valeurs sont moyennées sur la journée. Les mesures microclimatiques en serre sont spatialisées en 3 points pour tenir compte de l'hétérogénéité de cet environnement.

IV. B. Mesures de variables biologiques

IV. B. 1. Phénologie des plantes

Les étapes importantes du cycle du tournesol ont été identifiées au moyen d'une série d'appréciations visuelles des stades phénologiques de la plante suivant une échelle établie par le Cetiom, en prononçant le stade lorsque 50 % des individus l'ont atteint. Les principaux stades retenus sont postérieurs à la phase végétative et concernent l'initiation et la mise en place du bouton floral (E1 à E4/E5), la floraison (fleurs ligulées perpendiculaires au capitule, F1), la fin de la floraison (chute des fleurs ligulées, F4) et la maturité physiologique (M0 à M4) (Annexes 1 et 2). L'évolution de la phénologie de la culture a été suivie plusieurs fois par semaine lors des essais en serre, et toutes les semaines lors des essais au champ.

IV. C. Architecture des plantes

IV. C. 1. Surface foliaire

En serre, la surface foliaire maximale des plantes isolées à été déterminée par la mesure de la longueur (L) et de la largeur (l) d'un limbe sur deux, la surface foliaire de la plante (SF) étant très proche du double de la somme des surfaces des feuilles impaires. La surface individuelle des limbes (SF_i) est calculée à l'aide d'une relation linéaire reliant le produit $L \times l$ à leur surface ($R^2 = 0.992$, $RMSE = 5.886$) :

$$\text{si, } Lxl < \frac{c}{a-b} \text{ alors, } SFi = a Lxl \text{ sinon, } SFi = b Lxl + c \quad (1)$$

où Lxl et SFi sont exprimés en cm^2 ; $a= 0.684$; $b= 0.736$; $c= -8.860$.

Le passage de SF mesurée (SF_{1/2}) à SF plante (SF) se fait selon la relation établie par Casadebaig (2008) où:

$$SF = 1.91 \times SF_{1/2} + 14.17 \quad (2)$$

IV. C. 2. Efficience d'interception du rayonnement par le couvert végétal

L'estimation de l'efficience d'interception du couvert est obtenue par l'utilisation d'un capteur portable : le Picqhélios (AERIC, Balma) (Picq, 1988 ; Debaeke and Raffailac, 1996) permettant de réaliser un bilan radiatif rapide et non destructif du couvert de tournesol. Des mesures dynamiques, réalisées par un passage au sein des 2 interrangs centraux de chaque parcelle élémentaire, permettent de déterminer la fraction de rayonnement photosynthétique actif ($fPAR_i$) intercepté par le couvert, à l'aide de capteurs mesurant de manière simultanée le rayonnement incident et le rayonnement intercepté par la plante. L'application de la loi de Beer permet d'approcher l'indice foliaire de la culture (LAI) moyennant une hypothèse sur le coefficient d'extinction de la lumière dans le couvert (k , entre 0.85 et 0.90 pour les variétés actuelles).

IV. C. 3. Sénescence foliaire

En serre, lorsque la surface foliaire maximale des plantes est atteinte, les mesures de sénescence sont réalisées par une estimation visuelle du pourcentage de la surface non chlorophyllienne des feuilles. Le pourcentage de la surface sénescente d'une feuille sur deux,

défini par tranche de 10 %, est ensuite déduit de la surface foliaire maximale déterminée précédemment (§ IV. C. 1).

IV. D. Indicateurs du statut azoté de la culture

IV. D. 1. Teneur en azote des tissus (Nm)

Le dosage de la teneur en azote (%N) est réalisé sur un échantillon de plantes séchées à l'étuve pendant 48 h à 80 °C puis broyées. A partir de ce broyat, un sous-échantillon est prélevé, broyé de nouveau plus finement à 1 mm avant d'être étuvé de nouveau à 60 °C durant 24 h pour être ensuite analysé au CHN-2000 Carbon/Hydrogen/Nitrogen determinator (LECO). La méthode utilisée est la méthode dite de Dumas (1831), basée sur la combustion totale d'une prise d'essai de l'échantillon. Les gaz résultant de la combustion sont mesurés par une cellule infrarouge en ce qui concerne le carbone et par conductivité thermique pour l'azote. Les résultats sont donnés en % de la prise d'essai sèche.

IV. D. 2. Indice de nutrition azotée (INN)

L'état nutritionnel azoté des plantes a été quantifié au moyen de l'indice de nutrition azoté (INN) suivant l'équation (Lemaire et Gastal, 1997) :

$$INN = \frac{Nm}{Nc} \quad (3)$$

où, Nm et Nc sont exprimés en pourcentage de la matière sèche aérienne (MSA, t/ha), Nm est la concentration totale en azote des parties aériennes (§ IV. D. 1) ; Nc la teneur en azote critique calculée pour la valeur de MSA à partir de la loi de dilution. Nc est calculé pour le tournesol suivant l'équation suivante (Debaeke et Raillaç, 2006) :

$$Nc = 5,03 \times MSA^{-0,447} \quad (4)$$

Nc correspond à la concentration minimale en azote nécessaire à la culture pour produire une matière sèche maximale. Une valeur d'INN ≥ 1 indique une culture non limitée en azote, une valeur d'INN = 1, une nutrition azotée optimale, et une valeur de INN < 1 indique une carence azotée.

IV. D. 3. Teneur en chlorophylle des tissus (SPAD)

La teneur en azote foliaire peut être approchée par une mesure non destructive de la concentration en chlorophylle des limbes, ces deux variables étant fortement corrélées jusqu'à la floraison pour le tournesol (Debaeke et Rfaillac, 2006). La valeur SPAD est obtenue à l'aide d'un Chlorophyllmeter SPAD 502 MINOLTA, par contact direct de la 7^{ème} feuille sous-capitulaire ; 4 points de mesure sont réalisés par limbe puis moyennés, et 5 à 10 plantes sont échantillonnées par parcelle élémentaire selon la taille du dispositif.

IV. E. Elaboration du rendement (serre)

Les capitules des plantes desséchées précocement et des plantes non contaminées ont été récoltées à la suite de l'essai en serre à Auzeville en 2009 (SAuz09). Pour chaque échantillon, les capitules, regroupés par bloc, ont été battus. L'humidité moyenne des akènes est calculée après passage à l'étuve pendant 48 h. A partir du nombre de capitules, du poids d'akènes par capitule et du poids de mille akènes (PMG), le nombre d'akènes moyen par plante est calculé.

$$Nb \text{ d'akènes par plante} = \frac{\frac{Poids \text{ akènes sec}}{PMG} \times 10^3}{Nb \text{ capitules}} \quad (5)$$

IV. F. Progression des attaques de *Phoma* au collet et suivi du dessèchement précoce des plantes

Un suivi de la progression des attaques de *Phoma* de bas de tige et de plantes desséchées précocement a été réalisé à partir de la date de la contamination artificielle au collet jusqu'à la maturité physiologique des plantes saines (Figure II. 3). Dans le cas du suivi de la maladie en contamination naturelle, la notation a débuté à la même date qu'en contamination artificielle. La référence temporelle utilisée pour suivre la progression de la maladie au collet est le nombre de jours après contamination artificielle, et l'abréviation DPI (Days Post Inoculation) sera utilisée tout au long cette étude.

Deux variables ont été utilisées pour décrire la maladie :

- La proportion de plantes présentant un collet avec une nécrose encerclante de bas de tige (note 2).

- La proportion de plantes desséchées précocement (à maturité ou pour une valeur de DPI donnée). Dans le cas des expérimentations menées au champ, les pieds secs de tournesol correspondent à une note 4 (plante desséchée), mais dans le cas des essais en serre, un pied sec correspond à une note 3 (plante flétrie). Dans cette situation, la plante présente un manchon noir au collet et l'ensemble des feuilles est desséché précocement, mais la tige conserve cependant une coloration jaune-verte persistante. Au champ, la transition entre les notes 3 et 4 est très rapide, de l'ordre de quelques jours, alors qu'en pot sous serre, ce passage peut durer de 3 à 4 semaines.

Pour tenir compte de la dynamique d'évolution de la maladie, on calcule l'AUDPC (Area Under Disease Progression Curve), qui correspond à l'aire sous la courbe de la progression de la maladie (Figure II. 10). Cette variable synthétique est calculée selon l'équation suivante (Campbell et Madden, 1990):

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} (y_i + y_{i+1})/2 * (t_{i+1} - t_i) \quad (6)$$

où n est le nombre d'évaluations, y le pourcentage de plantes présentant des nécroses encercclantes ou atteintes de dessèchement précoce, et t le DPI de chaque évaluation.

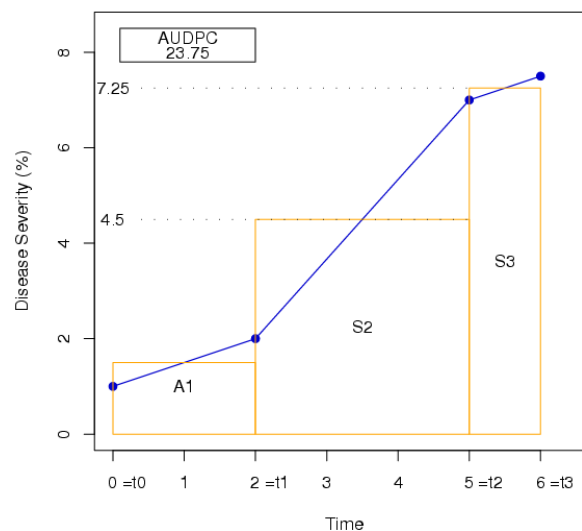


Figure II. 10. Représentation graphique du calcul de l'AUDPC

Deux valeurs différentes d'AUDPC ont ainsi pu être calculées en relation avec les deux variables ponctuelles présentées précédemment :

- AUDPC_{DS} (« Disease severity ») qui tient compte de la proportion de plantes présentant des nécroses encercantes au collet (\geq note 2) en fonction des DPI.
- AUDPC_{PR} (« Premature ripening ») qui tient compte de la proportion de pieds secs (\geq note 3) en fonction des DPI.

La terminologie anglaise proposée ici permet de conserver une cohérence entre les variables utilisées dans les publications et le reste de la thèse.

V. Analyses statistiques

Les variables d'intérêt ont été analysées par un modèle linéaire généralisé du logiciel Statgraphics Plus 5.1 (Rockville, MA, USA). Lorsque la normalité n'était pas vérifiée, une transformation de variable a été faite (Gomez and Gomez, 1984). La normalité des résidus a ainsi été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk (intervalle de confiance de 0.95) et l'homoscédasticité des variances par le test de Levene (intervalle de confiance de 0.95). Lorsque les différences étaient significatives entre traitements pour les variables d'intérêt, les données ont été comparées par le test de Fisher (LSD_{0.05}). Pour une année donnée, les moyennes suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres après une analyse LDS_{0.05}.

*Chapitre 3. Le dessèchement précoce :
complexe parasitaire ou implication seule
du P. macdonaldii*

Chapitre 3. Le dessèchement précoce: complexe parasitaire ou implication seule de *P. macdonaldii*

A partir des différentes observations de cas de pieds secs, a émergé la question de l'agent pathogène responsable du dessèchement précoce ou des éventuelles interactions avec d'autres agents pathogènes. Pérès et al. (2000) ont isolé différents champignons à partir des tissus de plantes desséchées précocement et présentant des attaques de *Phoma* au collet. Outre la présence de *Phoma macdonaldii*, dans la plupart des cas, *Macrophomina phaseolina*, *Verticillium dahlia* et des *Fusarium* spp., ont été retrouvés à des fréquences variables. Le fait que la seule contamination au collet par *P. macdonaldii* ait permis de reproduire le syndrome de dessèchement précoce suggère que celui-ci pourrait jouer un rôle majeur dans ce syndrome. Mais la présence de ce complexe parasitaire pose la question du pathogène initialement responsable, et de ceux qui ne sont que des opportunistes.

Ce chapitre sera composé de deux parties complémentaires qui auront pour objectif de mettre en avant les principaux pathogènes impliqués dans le dessèchement précoce du tournesol et plus particulièrement le rôle de *P. macdonaldii*. Dans un premier temps, nous mettrons en évidence la présence de *Phoma*, de *Macrophomina* et de *Fusariums spp.* en fin de cycle de culture du tournesol ainsi que les différents organes de la plante colonisés par ces champignons. Puis, dans un second temps, l'étude se concentrera sur l'implication de *P. macdonaldii* et de *M. phaseolina* dans le dessèchement précoce afin de déterminer l'agent causal de ce syndrome.

I. Mise en évidence d'un complexe parasitaire de bas de tige en parcelles agricoles

I. A. Objectif de l'expérimentation

Au cours de la saison 2006, des plantes de tournesol présentant des nécroses au collet et/ou un état de dessèchement précoce lié à ces nécroses de bas de tige ont été prélevées sur 14 zones de 8 parcelles agricoles du Lauragais (Haute-Garonne) entre le 6 août et le 4 septembre (Annexe 4 et 5). L'objectif de cet échantillonnage était de mettre en évidence les différents pathogènes associés à ces symptômes de fin de cycle cultural, ainsi que les tissus de la plante colonisés par ces pathogènes. Pour cela, des isollements de tissus prélevés entre le pivot racinaire et le bas de la tige ont été réalisés en laboratoire (ENSAT Auzeville) (*Ch II. § I. B. 1*). La présence de *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*, et de *Fusarium* spp. a été notée pour chacun des isollements. La présence de *Verticillium dahliae* n'a pu être mise en évidence sur ces échantillons.

I. B. Matériels et méthodes

Un échantillon de 7 à 8 plantes a été prélevé les 2, 9, 17, 22, 28 août et le 4 septembre sur chacune des zones suivies, soit un total de 390 plantes présentant des symptômes au collet dont 82 pieds secs. Pour chacun des prélèvements, les plantes d'une même parcelle pour une date donnée ont été regroupées dans une poche de papier kraft en vue de l'analyse pathologique réalisée à posteriori d'octobre à décembre 2006. Pour chacune de ces plantes, deux prélèvements de tissus ont été réalisés sur l'épiderme de la tige et du collet, le cortex et la moelle de bas de tige, le rhizoderme et le cortex du pivot. Les échantillons, désinfectés à l'eau de Javel, ont ensuite été mis en culture sur milieu PDA (*Ch. II § I. B. 1*). Après dix jours d'incubation, les agents pathogènes sont identifiés en fonction de la date de prélèvement de la plante et du tissu concerné. Au total, 4680 isollements ont été constitués (390 plantes x 2 répétitions x 6 zones de la plante).

I. C. Résultats

I. C. 1. Fréquence globale de *Phoma*, *Macrophomina* et *Fusarium* spp. sur les plantes prélevées en fin de cycle cultural

Les isollements réalisés sur l'ensemble des tissus « bas de tige » ont permis de mettre en évidence la présence de *Phoma*, *Macrophomina* et de *Fusarium* spp. sur les cannes de

tournesol entre le 2 août et le 4 septembre 2006. La présence de *Phoma* a progressé significativement ($P < 0,0001$) au cours de la maturation du tournesol avec une fréquence maximale sur les prélèvements du 4 septembre (Figure III. 1). La fréquence de *Macrophomina* a été supérieure à celle de *Phoma* dès les premières dates de prélèvement et la présence du champignon a été très fréquemment mise en évidence jusqu'au 22 août. Entre le 28 août et le 4 septembre, la fréquence de *Macrophomina* était moindre mais 30 à 35 % des plantes présentaient des microsclérotés. Les *Fusarium spp.* ont été isolés tout au long de la

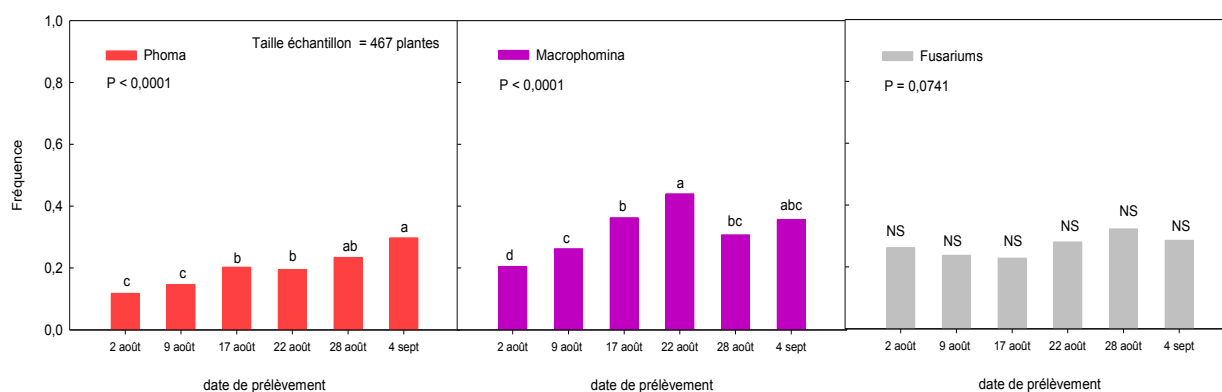


Figure III. 1. Fréquence de *Phoma*, *Macrophomina* et *Fusarium spp.* entre le 2 août et le 4 septembre 2006 indépendamment du tissu isolé.

I. C. 2. Fréquence différentielle de *Phoma*, *Macrophomina* et *Fusarium spp.* selon les tissus considérés

Les isolements réalisés sur l'appareil aérien et le système racinaire de la plante ont permis de démontrer que *Phoma*, *Macrophomina* et *Fusarium spp.* pouvaient coloniser l'ensemble des organes de la plante, mais dans des proportions variables. *Phoma* a été principalement isolé au niveau de la partie aérienne de la plante, la tige et le collet étant les organes les plus fréquemment infectés (Figure III. 2). Le pathogène a pu également être mis en évidence au niveau des tissus conducteurs de la plante (moelle et cortex), ainsi qu'au niveau racinaire (pivot et rhizoderme) mais avec une faible fréquence. A l'inverse, *Macrophomina* et des *Fusarium spp.* ont été majoritairement isolés au niveau des tissus racinaires (pivot et rhizoderme) et dans une moindre mesure sur les tissus aériens. La présence de *Macrophomina* reste cependant très marquée au niveau du cortex et de la moelle. En comparaison, la fréquence de *Fusarium spp.* est très faible au niveau du cortex, de la moelle et de la tige par rapport aux prélèvements effectués au collet et sur les organes racinaires.

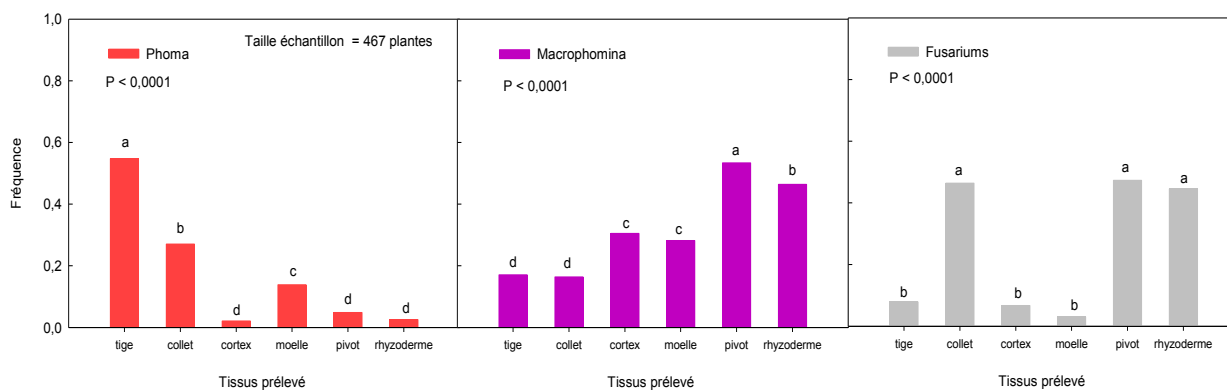


Figure III. 2. Fréquence de *Phoma*, *Macrophomina* et *Fusarium* spp. entre le 2 août et le 4 septembre 2006 en fonction de l'origine des tissus prélevés sur les cannes de tournesol : tige, collet, cortex, moelle, pivot et rhizoderme.

I. C. 3. Fréquence de *Phoma*, *Macrophomina* et *Fusarium* spp. sur les pieds secs avérés

La fréquence de *Phoma*, *Macrophomina* et *Fusarium* spp. a été mise en évidence sur les tissus des organes aériens et racinaires de 82 plantes de tournesol desséchées précocement entre le 2 août et le 4 septembre. Les tissus des 'pieds secs' colonisés par ces différents champignons, potentiellement pathogènes, sont identiques à ceux qui ont été déterminés plus haut sur des plantes présentant des attaques de bas tige attribuées à *Phoma* mais non desséchées précocement. *Phoma macdonaldii* reste le principal pathogène isolé sur les tissus aériens, *Macrophomina* et *Fusarium* spp. étant fréquemment isolés sur des tissus racinaires. La fréquence de *Fusarium* spp. au niveau du cortex a significativement augmenté ($P < 0,0001$) sur les plantes desséchées précocement, mais peu en comparaison de celle de *Macrophomina* qui a plus que doublé dans le cas de pieds secs (Figure III. 3).

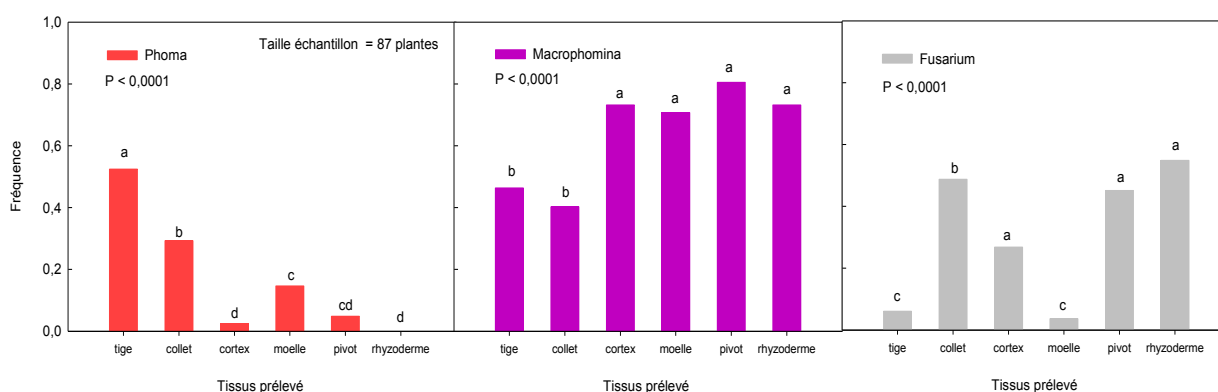


Figure III. 3. Fréquence de *Phoma*, *Macrophomina* et *Fusarium* spp. sur des pieds de tournesol desséchés précocement entre le 2 août et le 4 septembre 2006, en fonction de l'origine des tissus prélevés : tige, collet, cortex, moelle, pivot et rhizoderme.

I. D. Discussion

Les analyses pathologiques réalisées sur des plantes présentant des nécroses de bas de tige et sur des plantes desséchées précocement avec une attaque au collet caractéristique d'une infection par *P. macdonaldii* ont permis de mettre en évidence la présence de *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina* et *Fusarium* spp. en fin de cycle cultural du tournesol, dans les différents tissus aériens et racinaires de la plante. Contrairement aux *Fusarium* spp. dont la fréquence ne varie pas au cours du temps, celle de *P. macdonaldii* et de *M. phaseolina* a significativement ($P < 0,0001$) augmenté pendant la phase de maturation du tournesol. Ces observations sont en accord avec ce qui a pu être montré dans la littérature où *P. macdonaldii* est fréquemment isolé dès la mi-floraison (Pérès et Poisson-Bammé, 1999), alors que *Macrophomina* et *Fusarium* spp. se manifestent principalement en fin de cycle de la culture (Alabouvette et Bremeersch, 1975 ; Saumon et al., 1984). La fréquence de *Macrophomina*, significativement ($P < 0,0001$) supérieure à celle de *Phoma* et de *Fusarium* spp., peut s'expliquer par des conditions particulièrement sèches sur les parcelles agricoles en 2006 (faible pluviométrie estivale, sols de coteau superficiels à moyennement profonds) (Annexe 7). Ces conditions, propices à la prolifération du pathogène (Jimenez-Diaz et al., 1983) ou plus exactement défavorables à la plante-hôte, favorisent l'expression des symptômes sur tournesol, et favorisent *Macrophomina* (Edmunds, 1964 ; Alabouvette et Bremeersch, 1975).

Les différents isolements ont permis de mettre en évidence une présence significative ($P < 0,0001$) de *Phoma* sur les organes aériens de la plante (tige et collet), contrairement à *Macrophomina* et aux *Fusarium* spp. fréquemment isolés sur des tissus racinaires (pivot et rhizoderme). Cependant, tous les organes isolés sont susceptibles d'être infectés et colonisés par ces pathogènes, qu'il s'agisse de prélèvements issus de tissus externes ou internes comme la moelle et le cortex de bas de tige de la plante. Les prélèvements issus de plantes non desséchées précocement présentant des nécroses au collet, et ceux issus de pieds secs ne montrent pas de différences pour les organes colonisés par chacun des champignons. Seule la fréquence d'observation d'isolement des champignons a été affectée, *Macrophomina* ayant été fréquemment isolé sur les organes de pieds secs. L'abondance de ce champignon sur les différents isolements effectués conduit cependant à s'interroger sur l'ampleur de la contamination et à un biais éventuel surestimant sa présence. Ce champignon produit un grand nombre de microsclérotés qui se forment dans les tissus sénescents de la plante et se dispersent très facilement dans le sol lors de la dégradation des résidus de culture

(Alabouvette et Bremeersch, 1975). Le stockage des échantillons dans une même poche a pu conduire à une dispersion des microsclérotés de *Macrophomina* des plantes infectées vers des plantes indemnes du champignon. De plus, la croissance radiale de *Macrophomina*, très rapide sur milieu PDA, peut avoir conduit à une surestimation de la fréquence de ce champignon comparé à celle de *Phoma* et de *Fusarium* spp.. Les microsclérotés de *Macrophomina* se différencient dès le deuxième jour de culture (Alabouvette et Bremeersch, 1975), et les boîtes de Petri sont totalement colonisées après 5 jours de mise en culture. Les *Fusarium* spp. ont une vitesse de croissance comparable à celle de *M. phaseolina* et les filaments mycéliens sont observés 2 jours après mise en culture à des températures optimales de 28°C (Davet, 1976). A l'inverse, *P. macdonaldii*, qui présente une importante variabilité de la croissance radiale (Larfeil, 2003), a une croissance très lente qui s'avère peu compétitive par rapport à *Macrophomina* et aux *Fusarium* spp., et peut ainsi avoir conduit à une sous-estimation importante de la présence de *P. macdonaldii* dans les échantillons isolés.

I. E. Conclusion

Les isollements réalisés à partir d'échantillons prélevés sur des parcelles agricoles du Lauragais en sol argilo-calcaire confortent les premiers travaux révélant la présence importante de *Phoma*, *Macrophomina* et *Fusarium* spp. sur des plantes desséchées précocement. Si la proportion de pieds secs augmente fortement en fin de cycle, la fréquence de *Fusarium* spp. reste constante pendant la phase de maturation des plantes, confortant le rôle secondaire attribué à ce champignon dans le dessèchement précoce. A l'inverse, la forte présence de *Phoma* et de *Macrophomina* en fin de cycle, décrite dans la littérature et confirmée par les isollements réalisés, nous invite à déterminer plus précisément l'implication de chacun de ces deux agents pathogènes dans le syndrome « pieds secs », afin de mettre en avant l'agent causal principal du syndrome.

II. *P. macdonaldii* : agent causal principal du dessèchement précoce ?

II. A. Objectif de l'expérimentation

Le dessèchement précoce du tournesol conduisant la plante à l'état de pied sec apparaît principalement dû à l'existence d'un complexe parasitaire composé de *Phoma macdonaldii* et *Macrophomina phaseolina*, affectant la zone collet-système racinaire de la plante. *Phoma*, dominant sous la forme d'attaques de bas de tige généralement profondes, atteint aussi bien les zones internes (destruction de la moelle) que les zones externes (colonisation du collet et du pivot). La présence importante de *Macrophomina* dans la zone collet-racine des pieds secs en association avec *Phoma* est ressortie nettement des isollements réalisés sur des pieds secs de tournesol.

A l'heure actuelle, l'origine du dessèchement précoce reste controversée et deux hypothèses sont avancées: (i) un complexe parasitaire favoriserait ou induirait le dessèchement précoce du tournesol (Pinochet, 1997 ; Pérès et al., 2000), (ii) *P. macdonaldii* seul pourrait causer une pourriture de la tige et le dessèchement précoce de la plante sans la présence obligatoire de pathogènes secondaires (Donald et al., 1987 ; Carson, 1991). Pour tenter de répondre à cette question relative à l'origine pathologique du dessèchement précoce, il a été choisi de tester expérimentalement l'implication de *P. macdonaldii* et de *M. phaseolina* dans ce syndrome complexe. Des plantes de tournesol ont ainsi été contaminées artificiellement en serre par : (i) du mycélium de *Phoma* au collet, (ii) des microsclérotés de *Macrophomina* au niveau du sol, ou (iii) une double contamination *Phoma* et *Macrophomina*. La méthode de contamination par du mycélium de *Phoma* a été validée par des essais préliminaires qui permettent de reproduire des symptômes de dessèchement précoce. La méthode de contamination par *Macrophomina*, qui consiste à apporter des microsclérotés, via le sol, à la floraison du tournesol apparaît dans la littérature comme la plus efficace et la plus naturelle pour reproduire un dessèchement précoce de la plante par *Macrophomina* (Alexandrov, 2000).

Hypothèse : *Phoma macdonaldii* est le principal agent pathogène à l'origine du dessèchement précoce du tournesol et *Macrophomina phaseolina* serait un parasite secondaire.

II. B. Dispositif expérimental

Les essais ont été réalisés au printemps 2007 à Auzeville (SAuz07) et En-Crambade (SEC07). On se reportera au *Ch. II § II* pour une description détaillée des dispositifs en serre et sous tunnel. Les plantes de la variété cv. Heliasol RM ont reçu une fertilisation NPK (150 kg N, 50 kg P, 50 kg K/ha) aux stades 7/8 feuilles et F1/F2 pour l'essai SAuz07, et 16/17 feuilles et M0 à SEC07. De la levée à la floraison, l'irrigation n'était pas limitante puis la quantité d'eau apportée a ensuite été réduite, et la fraction d'eau transpirable du substrat maintenue entre 30 % et 50 % jusqu'à la fin de l'expérimentation (*Ch. II. § II. A. 4*). La contamination artificielle a été réalisée en deux temps : une contamination au stade E3-E4 (SAuz07) et E1 (SEC07) par une pastille de mycélium de *P. macdonaldii* appliquée au collet (*Ch. II. § I. B. 2. a*), et/ou une contamination au stade F1 par une suspension de microsclérotés de *M. phaseolina* apportée au substrat (*Ch. II. § II. B. 2*). Pour chaque traitement « inoculum » 25 et 60 plantes ont été contaminées en SAuz07 et SEC07 et 20 plantes témoins étaient maintenues saines, réparties sur 3 (SAuz07) et 4 blocs (SEC07) complets randomisés.

II. C. Variables mesurées

II. C. 1. Suivis de la progression de la maladie et de ses dégâts

Un suivi de la progression de la maladie au collet a été réalisé pour chaque modalité du traitement « inoculum » *Phoma* (P), *Macrophomina* (M), et *Phoma* + *Macrophomina* (P+M) selon la grille de notation mise en place par le Cetiom (*Ch. II. § I. B. 2. b*). En parallèle, un suivi de la mortalité des plantes a été réalisé sur l'ensemble des plantes contaminées et non contaminées, depuis le jour de la contamination artificielle au collet par *Phoma* jusqu'à 100 jours après la contamination (100 DPI). La proportion de plantes desséchées précocement jusqu'à 84 DPI (soit 7 jours avant la maturité physiologique des premiers témoins) a permis de calculer la variable synthétique AUDPC_{PR} (*Ch. II. § IV. F*).

II. C. 2. Observation du système racinaire et mise en évidence de *Phoma* et de *Macrophomina* par des isolements

A la fin des expérimentations, toutes les plantes ont été déracinées, le système racinaire nettoyé, et noté visuellement (*Ch. II. § I. B. 2. b*). L'échelle de notation racinaire utilisée pour *P. macdonaldii* a été transposée pour les contaminations par *Macrophomina*. Des

isolements de la tige, du collet et des racines ont ensuite été réalisés pour mettre en évidence la présence éventuelle des deux champignons incriminés sur ces organes (Ch. II. § I. B. 1).

II. D. Résultats

II. D. 1. Suivi des pieds secs et de la sénescence

Les premières plantes desséchées ont été observées à Auzeville (SAuz07) dès 36 DPI et 32 DPI après contamination artificielle par *Phoma* et par P+M (Figure III. 4. A), et à En Crambade (SEC07) à partir de 42 DPI et 77 DPI pour ces mêmes traitements (Figure III. 4. B). Seules les plantes contaminées au collet par *Phoma* (avec ou sans *Macrophomina*) sont atteintes de dessèchement précoce mais la dynamique d'apparition des pieds secs varie en fonction du site d'expérimentation. À Auzeville, deux phases de mortalité ont été observées : (i) une phase précoce (57 DPI) où 64 % des plantes P et P+M étaient atteintes de dessèchement précoce, et (ii) une phase tardive (90 DPI) où les plantes infectées (mais non « pied sec ») et les plantes saines sont entrées en sénescence. Ce même schéma a pu être observé à En Crambade, mais plus tardivement et de manière moins prononcée.

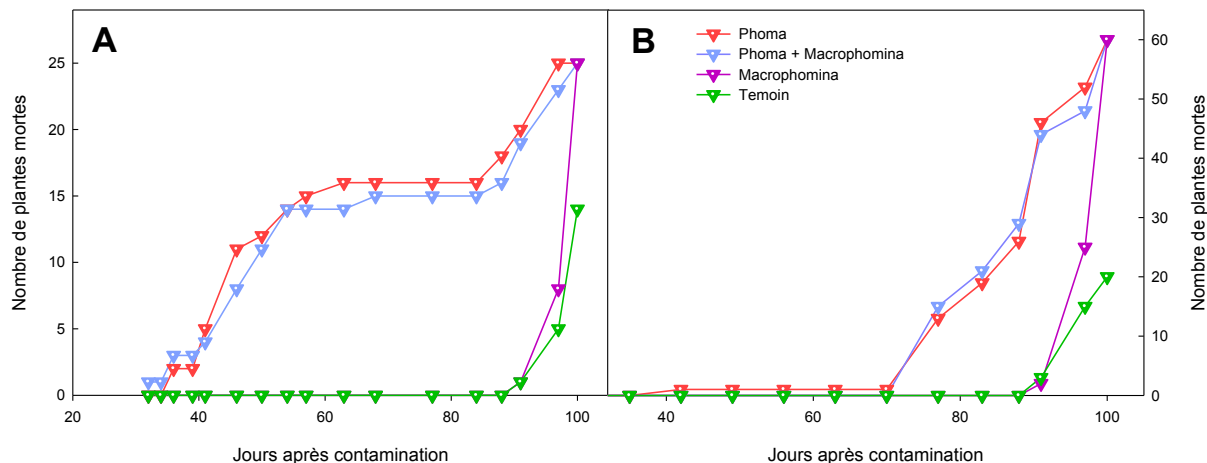


Figure III. 4. Evolution du nombre de plantes mortes contaminées par *Phoma*, *Macrophomina*, *Phoma+Macrophomina*, et de plantes témoins non contaminées en fonction des jours après contamination au collet par *P. macdonaldii* à Auzeville SAuz07(A) et En-Crambade SEC07 (B).

La précocité de l'apparition de plantes desséchées à Auzeville, à la suite d'une contamination artificielle par P et P+M, permet d'obtenir des valeurs d'AUDPC_{PR} significativement ($P < 0,0001$) différentes et supérieures à celles calculées pour une contamination par *Macrophomina*. A l'inverse, l'apparition tardive de pieds secs à En-

Crambade ne permet pas de discriminer les traitements « inoculum » par cette variable, et les valeurs d'AUDPC_{PR} ne varient pas significativement entre les traitements. La proportion finale de pieds secs à 83 DPI est significativement différente ($P < 0,003$) pour les 2 sites selon les traitements « inoculum ». Avec 64 % et 61 % de plantes desséchées précocement après une contamination par P et P+M à Auzeville, et 32 % et 35 % pour En-Crambade pour les mêmes traitements, la proportion de pieds secs entre ces deux modes de contamination n'est pas significativement différente. Par contre, une contamination par *Macrophomina* seul n'a pas permis d'induire de dessèchement précoce des plantes.

Tableau III. 1. Moyenne de AUDPC_{PR} et de la proportion de pieds secs pour chaque traitement « inoculum » jusqu'à 84 DPI pour les sites d'Auzeville (SAuz07) et d'En-Crambade (SEC07).

	AUDPC _{PR}		Pieds secs fin (%)	
	Auzeville	En-Crambade	Auzeville	En-Crambade
Traitement				
<i>Phoma</i> (P)	24,77 a	1,50 a	64,35 a	32,26 a
<i>Phoma</i> + <i>Macrophomina</i> (P +M)	21,03 a	0,88 a	61,11 a	35,00 a
<i>Macrophomina</i> (M)	0 b	0 a	0 b	0 b
Témoin (T)	0 b	0 a	0 b	0 b
F/t value	49,85	2,19	21,73	9,69
$P > F$	0,0001	0,1593	0,0013	0,0035

II. D. 2. Observations des symptômes au collet et sur racine pour chaque traitement « inoculum »

Les observations de symptômes de *Phoma* bas de tige (note 2) ont permis de mettre en évidence un taux d'attaque de 98 %, et la contamination additionnelle par *Macrophomina* n'a pas modifié la progression des nécroses au collet. Les plantes contaminées uniquement par des microsclérotés de *Macrophomina* et les plantes témoins présentent toutes un collet sain (note 0) tout au long de l'expérimentation (Figure III. 5). Ces observations ont pu être vérifiées sur les deux sites expérimentaux.

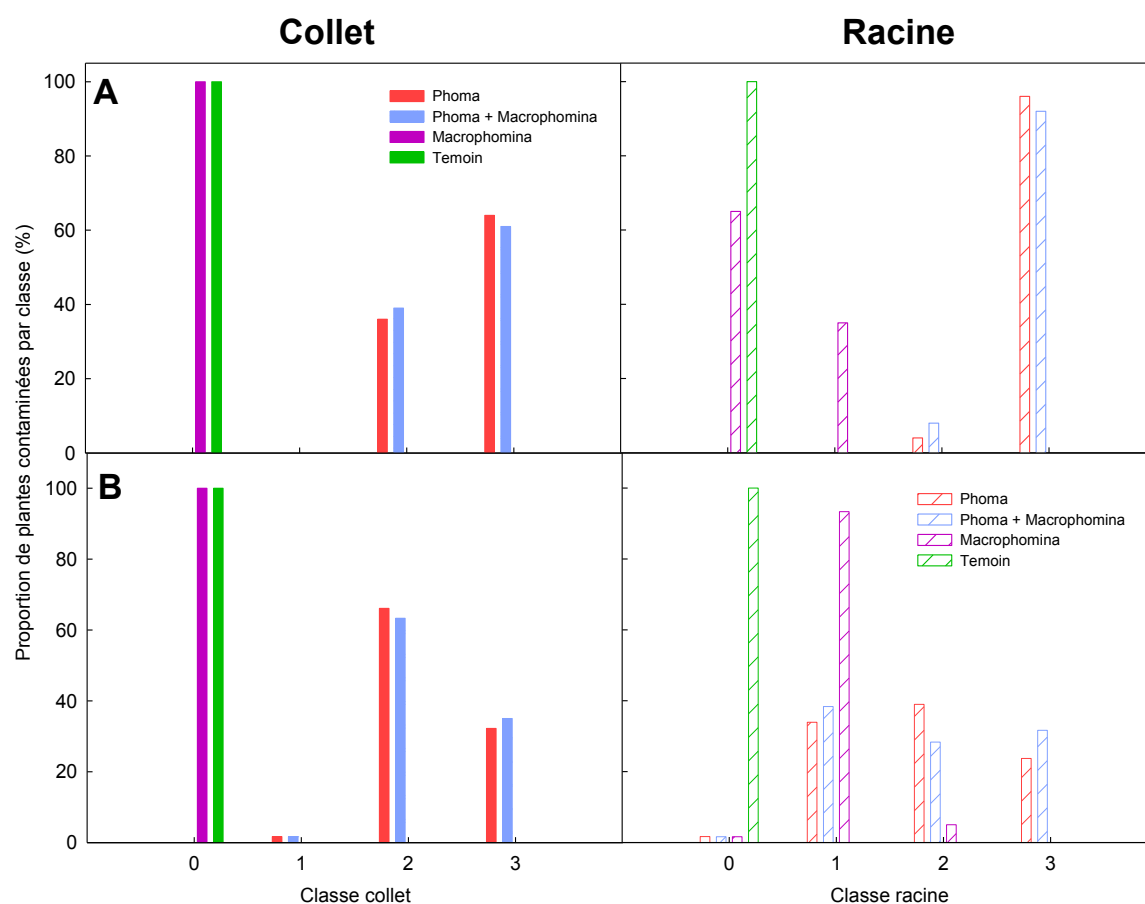


Figure III. 5. Proportion de plantes contaminées par *Phoma*, *Macrophomina*, *Phoma+Macrophomina*, et de plantes témoins non contaminées présentant une note collet et racine classe 0,1, 2, et 3 à Auzeville (A) et En-Crambade (B) en 2007.

Les observations racinaires des plantes contaminées artificiellement par P et P+M mettent en évidence une dégradation du système racinaire plus ou moins prononcée selon le champignon inoculé. À Auzeville, le système racinaire des plantes présente d'importantes nécroses allant jusqu'à une dégradation totale (note 3-4). Mais la présence de *Macrophomina* conjuguée à celle de *Phoma* n'augmente pas l'intensité de cette dégradation. Sur le site d'En-Crambade, les systèmes racinaires sont moins dégradés après contamination par *Phoma*, mais les pivots présentent cependant des nécroses. La contamination seule par *Macrophomina* n'entraîne pas de dégradations importantes du système racinaire, même si celui-ci est moins développé que les témoins et peut présenter des nécroses sur le pivot et les racines secondaires.

II. D. 3. Isolements de *Phoma* et *Macrophomina* sur les organes infectés

Les isolements de plantes contaminées artificiellement sur les traitements P et P+M ont permis de confirmer la présence des deux pathogènes sur les organes aériens et racinaires avec des proportions variables. Dans le cas de contaminations artificielles par *Phoma*, le champignon est principalement isolé au niveau du point d'infection et des tissus aériens (collet, tige), et plus faiblement au niveau racinaire (Tableau III. 2). Les isolements des tissus internes montrent que *Phoma* a cependant colonisé le cortex et la moelle mais dans une moindre mesure. La présence de *Macrophomina* est par contre majoritaire au niveau des tissus racinaires. Mais les isolements au niveau du collet ont permis de montrer clairement une infection des tissus superficiels (épiderme) et internes (cortex, moelle) par ce champignon. En l'absence d'une contamination artificielle par *Macrophomina*, le pathogène a tout de même été isolé sur des plantes contaminées artificiellement uniquement par *Phoma* et sur des plantes témoins, en plus grande proportion sur le site d'En-Crambade.

Tableau III. 2. Isolement de *P. macdonaldii* et *M. phaseolina* à partir de tissus du collet, de la tige et des racines pour chaque traitement « inoculum » à Auzeville et En-Crambade.

Méthode de contamination	Pieds secs	Isolement de plantes ^a																	
		Collet ^b						Tige ^c						Racine					
		Epiderme		Cortex		Moelle		Epiderme		Cortex		Moelle		Racine II ^{ère}		Rhizoderme		Cortex	
		P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M
Auzeville																			
<i>Phoma</i>	6/8	8	0	7	0	4	0	7	0	3	0	2	1	0	0	0	1	1	3
<i>Phoma</i> + <i>Macrophomina</i>	4/8	8	1	3	2	2	3	3	1	1	0	0	0	0	2	0	2	0	0
<i>Macrophomina</i>	0/8	-	-	2	7	0	1	-	-	-	-	-	-	1	4	0	3	0	0
Témoin	0/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
En-Crambade																			
<i>Phoma</i>	17/27	25	2	-	-	16	11	-	-	-	-	-	-	8	4	-	-	-	-
<i>Phoma</i> + <i>Macrophomina</i>	20/35	29	5	-	-	16	18	-	-	-	-	-	-	1	33	-	-	-	-
<i>Macrophomina</i>	0/19	0	18	-	-	0	11	-	-	-	-	-	-	0	19	-	-	-	-
Témoin	0/3	0	0	-	-	0	1	-	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-

^a Les valeurs correspondent au nombre de plantes où *P. macdonaldii* (P) et *M. phaseolina* (M) ont été isolés

^b Au niveau de la nécrose au collet

^c 4 à 5 cm au-dessus de la nécrose au collet

II. E. Discussion

L'objectif de cette expérimentation était d'étudier l'implication de *P. macdonaldii* et de *M. phaseolina*, seuls ou en association, dans le dessèchement précoce du tournesol. La présence de nécroses au collet a permis de valider rapidement la réussite des contaminations

par *Phoma*. Dans le cas des contaminations artificielles par des microsclérotés de *Macrophomina* seuls, les observations du système racinaire et les isollements réalisés après récolte ont permis de confirmer la réussite des contaminations artificielles.

Le dessèchement précoce du tournesol, conduisant la plante à l'état de pied sec, a été longtemps associé à l'existence d'un complexe parasitaire sur la partie bas de tige et le système racinaire de la plante (Pérès et al., 2000). Dans ces travaux, la présence de *Phoma* et de *Macrophomina* dans la zone collet-racine des pieds secs était la cause de la désorganisation et de la réduction du système racinaire. Cependant, dans le cadre de cette étude, les contaminations par *Phoma*, sans *Macrophomina*, ont conduit aux mêmes symptômes de dégradation du système racinaire. Après contamination par *Macrophomina*, les racines présentent quelques nécroses noires et des microsclérotés sont observées, mais les dégâts engendrés sont sans commune mesure avec ceux occasionnés par *Phoma*. Si dans la littérature certains auteurs tendent à montrer que *Macrophomina* joue un rôle prépondérant dans le dessèchement précoce du tournesol (Pérès et Poisson-Bammé, 1999) ; Pérès et al., 2000), cette hypothèse n'a pu être vérifiée dans les conditions de cette étude. L'absence de pieds secs après une contamination par *Macrophomina*, non imputable à un échec éventuel de la contamination artificielle (la présence du champignon ayant été vérifiée par les isollements post-récolte), suggère le rôle secondaire de ce pathogène dans le dessèchement précoce. A l'inverse, la présence de pieds secs, après contamination par *Phoma*, démontre l'implication majeure de ce pathogène dans le syndrome étudié ; la présence de *Macrophomina* n'a pas augmenté le dessèchement précoce. Ces résultats confirment les premiers travaux de Donald et al., (1987) et de Carson (1991), tendant à démontrer que *P. macdonaldii* serait l'agent causal principal du dessèchement précoce tel qu'il se manifeste de manière généralisé dans les zones de production du tournesol. Ceci ne remet pas en cause la notion de complexe parasitaire associé au syndrome 'pieds secs' mais suggère une hiérarchie dans l'intervention des différents pathogènes. Les pathogènes présents sur les pieds secs de tournesol en fin de cycle, comme *Macrophomina*, ne seraient par conséquent que des parasites secondaires (Saumon et al., 1984) qui profitent de l'épuisement des réserves (sucres réducteurs) de la plante (Davet et Serieys, 1987) pour coloniser les racines puis les tiges (Alabouvette et Bremeersch, 1975). Dans les tiges, *M. phaseolina* se comporterait ainsi comme un pathogène opportuniste envahissant les tissus sénescents (Saumon et al., 1984) ; ni vraiment parasite, ni simplement saprophyte, ce champignon est capable de s'introduire dans des tissus encore vivants mais dont les défenses sont affaiblies (Davet et Serieys, 1987 ; Davet, 1996). Ces

constatations pourraient également expliquer la très forte présence de *Macrophomina* dans les isolements de plantes desséchées précocement présentées au Ch. III. 1.

La variation du pourcentage de pieds secs entre En-Crambade (30 %) et Auzeville (65 %) pourrait s'expliquer par des conditions microclimatiques contrastées sur les deux sites. A Auzeville, la température dans la serre, régulée par la présence de cooling n'a pas excédé 29°C lors des journées les plus chaudes (fin juillet), alors que, sous le tunnel d'En-Crambade, la température maximale a atteint plus de 40°C. Le développement de *P. macdonaldii* étant optimal à 25 °C (Abou al Fadil, 2006), la progression du champignon a ainsi pu être fortement limitée à En Crambade, d'où une plus faible proportion de pieds secs. A l'inverse, ces conditions ont été propices au développement de *Macrophomina* qui affectionne des températures élevées (entre 30 et 35 °C) (Jimenez-Diaz et al., 1983 ; Macini et al., 1995). Ceci a pu être vérifié par la présence importante du champignon sur les organes isolés à En Crambade. Cependant, cette prolifération de *Macrophomina* n'a pas induit pour autant un dessèchement précoce du tournesol par à ce seul champignon, et ce malgré des systèmes racinaires plus dégradés qu'à Auzeville.

II. F. Conclusion

Si la présence d'un complexe parasitaire *Phoma / Macrophomina* fréquemment observé au champ sur des pieds secs de tournesol a longtemps été considérée comme la condition de l'expression du dessèchement précoce d'origine pathologique, les expérimentations mises en place, dans deux environnements contrastés favorables à l'expression de *Phoma* dans un cas, et à *Macrophomina* dans l'autre, ont permis de montrer le rôle majeur de *Phoma* dans ce syndrome. Malgré des contaminations par *Macrophomina* qui ont généré des nécroses du système racinaire et une prolifération de microsclérotés dans les organes de la plante, aucun pied sec n'a pu être observé du fait de ce seul champignon, confirmant l'hypothèse de son rôle secondaire dans le syndrome de dessèchement précoce. A l'inverse, les nécroses au collet induites par *Phoma*, associées à une dégradation importante du système racinaire, confortent l'hypothèse de *P. macdonaldii* comme agent causal du dessèchement précoce. Les dégâts observés au collet et sur racines posent maintenant la question de l'origine aérienne ou racinaire du dessèchement précoce.

Chapitre 4. Origines du dessèchement précoce et caractérisation du pied sec

Chapitre 4. Origines du dessèchement précoce et caractérisation du pied sec

Dans le précédent chapitre, nous avons pu mettre en évidence que le dessèchement précoce du tournesol est fréquemment associé à la présence de pathogènes secondaires, comme le *Macrophomina* et les *Fusariums*. Cependant il résulte principalement d'une infection de bas de tige par *P. macdonaldii* sans l'implication obligatoire d'autres pathogènes. Les observations de symptômes au collet et au niveau racinaire ont pu montrer que la contamination de bas de tige par *Phoma* pouvait se généraliser au sein de la plante et conduire à une importante dégradation du système racinaire. De telles observations nous ont amenés à nous interroger sur l'origine aérienne et/ou racinaire du pied sec à la suite d'une contamination par *Phoma*. Le dessèchement précoce du tournesol serait-il ainsi lié aux nécroses présentes au collet qui entraîneraient une dégradation du système racinaire postérieure au dessèchement de la partie aérienne ? Ou la dégradation du système racinaire serait-elle la cause première du dessèchement de la partie aérienne de la plante ? Pour répondre à ces questions, des essais ont été menés en serre en 2007 et 2008 sur les stations d'Auzeville (SAuz07 et SAuz08), d'En-Crambade (SEC07) et de Grignon (SGri08). L'effet de contaminations aériennes par différents types d'inoculum de *Phoma* (mycélium, spores ou résidus affleurants) a été comparé à des contaminations racinaires, par des résidus enfouis, pour étudier si (i) la maladie progressait du collet vers les racines (contamination au collet), ou au contraire si (ii) la maladie progressait des racines vers les parties aériennes de la plante (contamination racinaire). La première partie de ce chapitre fait l'objet d'une publication soumise à la revue *Plant Disease* intitulée : « Evaluation of *P. macdonaldii* inoculation methods to reproduce sunflower premature ripening ». Dans un second temps, pour mieux caractériser le fonctionnement d'un pied sec résultant d'une attaque de *Phoma* et comprendre les processus sous-jacents au dessèchement précoce, des essais ont été conduits en serre à Auzeville en 2007 et 2009 (SAuz07 et SAuz09). Pour cette question plus physiologique, des suivis dynamiques de la consommation en eau des plantes et de la vitesse de sénescence ont été associés à des observations morphologiques de bas de tige.

I. Evaluation of *P. macdonaldii* inoculation methods to reproduce sunflower premature ripening

C. Seassau^a, P. Debaeke^a, E. Mestries^c and G. Dechamp-Guillaume^b

Soumis le 19 septembre 2009 à : *Plant Disease*

^a INRA, UMR AGIR, BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France

^b ENSAT, INPT, UMR AGIR, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France

^c CETIOM, ENSAT, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France

I. A. Introduction

Sunflower premature ripening (PR) is regarded as one of the most widespread and detrimental diseases in sunflower production in France, where moderate to severe outbreaks have occurred over the past decade. The incidence and severity of the disease increased dramatically in the early 90s and the entire French sunflower cropping area is now affected (Penaud and Pérès, 1994; Pérès and Letof, 1996). Epidemics have caused extensive damage with direct losses in grain yield in France of up to 1.3 t/ha (Pérès et al., 2000).

Phoma macdonaldii Boerema (teleomorph: *Leptosphaeria lindquistii*) (McDonald, 1964) has been reported as the causal agent of sunflower PR (Penaud and Pérès, 1994). *P. macdonaldii* has been observed in western (Penaud and Pérès, 1994) and eastern Europe (Maric and Schneider, 1979), Southern Asia (Weeraratne and Priyantha, 2003), Argentina (Velazquez and Formento, 2000), Australia (Miric et al., 1999) and the USA (Donald et al., 1987). Sackston (1950) first described a wilt and stalk rot of unknown etiology as “premature ripening” (PR), and early evidence showed that stem base girdling canker caused by *P. macdonaldii* was its primary cause. Before PR, crops show loss of vigour from mid- to late summer, leaves become wilted and necrotic, the stalk turns dark brown to black, and this is followed by senescence and plant death a few weeks before physiological maturity (Donald et al., 1987).

Sunflower residues have long been considered as the major source of primary inoculum in *P. macdonaldii* epidemics. Short rotations (mainly 2 year sunflower-wheat) and simplified soil tillage of wheat crops could have increased the inoculum by leaving infected residues on the soil surface. Primary inoculum originates from overwintering fungal structures

(perithecia, pycnidia and mycelia) in crop debris, which are spread to healthy plants by splashing rain and by windblown ascospores and conidia produced during wet conditions (Gulya et al., 1987). Perithecia and pycnidia were observed on sunflower stalk residues after several years (Maric et al., 1981) and buried residues brought back to soil surface retained their infectious power whatever their age (Poisson-Bammé and Pérès, 2000). However, inoculations from infected buried residues were suggested to result in less *P. macdonaldii* attacks than residues left on the soil surface (Pérès and Poisson, 2000). Although spore infections were reported to be pathogenic (Pérès and Le Sourné, 2000; Pérès and Poisson, 2000), uncertainty remains about the relative importance of pycniospores, ascospores and mycelium in causing sunflower PR.

Donald et al. (1987) first observed that the root systems of the girdled plants were poorly developed and necrotic and *P. macdonaldii* was isolated from the basal stalk tissue of PR plants. In contrast, Pérès and Poisson (2000) found that roots of girdled plants were well developed and *P. macdonaldii* seldom isolated from roots. There was thus controversy about whether PR originates as the result of root system attacks (soilborne) or the consequence of stem base infection (aerial). Up till now, it was not clear whether PR is due to direct root infection, to basal stem infection progressing towards the roots, or to basal stem girdling inhibiting nutrient transport into the roots and thus starving them to death.

Recent investigations showed that crop management such as additional nitrogen (Debaeke, and Pérès, 2003) and limited water supply after anthesis (Seassau, et al., 2010), can significantly influence the incidence of *P. macdonaldii* attacks and PR. Premature ripening was also greatest when plants were inoculated at star bud stage, and decreased considerably when plants were inoculated at earlier or later growth stages (Pérès and Le Sourné, 2000). Taking account of these agronomic factors influencing the disease, the first objective of this study was to assess the efficiency of artificial inoculation methods (from infected residues, mycelium or pycniospores) in reproducing PR on a cultivar susceptible to *P. macdonaldii* in a controlled environment. The second objective was to improve understanding of the origin of PR and to determine whether it comes from an initial root system infection then a spread of the pathogen into the stem, or directly from stem base girdling followed by plant wilting and death.

I. B. Materials and methods

I. B. 1. Experimental design and crop management systems

Five greenhouse experiments were conducted during a 5 month period: at INRA, Auzeville in 2007 (SAuz07), in 2008 (SAuz08) and in 2009 (SAuz09) (Haute-Garonne, France), at CETIOM En-Crambade (Haute-Garonne, France) in 2007 (SEC07) and at Grignon (Yvelines, France) in 2008 (SGri08). Seeds of cv. Heliasol RM, a commercial sunflower cultivar, were obtained from Semences de France (KWS AG). This cultivar had been described as susceptible to *P. macdonaldii* and premature ripening by previous variety assessment in field trials (Seassau et al., 2010). Before sowing, unprotected seeds were sterilized in a beaker of 9 % sodium hypochlorite for 5 min and rinsed four times in sterile, distilled water. Four seeds were sown in 15 liters pots filled with a mixture of 50 % clay to silt-clay soil uncultivated for more than 30 years, 40 % potting compost and 10 % sand at Auzeville and Grignon, and in 12 liters pots filled with 60 % potting compost and 40 % sand at En-Crambade.

In the greenhouse at Auzeville and Grignon, photoperiod, temperature and air humidity were regulated while at En-Crambade, the experiment was carried out in a hoop tunnel. A 14-h photoperiod was applied the first months of the experimentation with 400W High Pressure Sodium vapor lamp (SON-T AGRO, Philips) at Auzeville and at Grignon (Blanc Europe MBS, Claude) with light switched off when global radiation was above 250 W/m². The temperature in the greenhouse was maintained at 17°C night and 25 ± 5°C day. During summer, air humidity and temperature were regulated by evaporative cooler and exhaust fans in the two greenhouses. Mineral fertilization was supplied by three applications of NPK solution (50 kg N, 20 kg P, 20 kg K /ha) until star bud stage. Plants were irrigated daily by a 2 liter/h emitter to fulfill the plant water requirements until flowering. Then, automatic irrigation was stopped and water supply reduced. The fraction of transpirable soil water was kept between 30 and 50 % by weighing plants every 2 days and water request was added manually. Insects and foliar diseases were carefully controlled using standard labeled chemicals to prevent unwanted leaf senescence. Aphids were treated with tau-fluvalinate (Mavrik Flo, Makhteshim Agan France) and pyrimicarbe (Pirimor G, Syngenta Agro SAS) at a rate of 72 g/ha and 0.5 kg/ha respectively. Citrus whiteflies (Aleyrodidae) were treated by pymetrozine (Chess Pro, Syngenta Agro SAS) at a rate of 40 g/ha at Grignon. Powdery

mildew (*Erysiphe cichoracearum*) was treated by wettable sulfur (Phytosoufre, Bayer France SAS) at 10g/liter.

I. B. 2. Fungal isolates

A single *P. macdonaldii* monopycniospore (MPH2) strain was used in this study, selected for its severe aggressiveness. The strain was isolated from an infected sunflower stem base residue exhibiting severe black stem lesions which was collected near Auzeville. Isolation of the strain was performed according to the protocol of Roustae et al. (2000b) and stored at - 80 °C with Glycerol (V/V, Becton Dickinson and Company

I. B. 3. Inoculum

Residues. In the SAuz07 experiment, sunflower residues infected with *P. macdonaldii* were collected in January 2007 from a field located close to the experimental site. In the SEC07 experiment, the material was collected in mid-March 2007 on plots inoculated by *P. macdonaldii* during the 2006 season. Part of the residues collected in SAuz07 was used in the SGri08 experiment for artificial inoculation. Residues were exposed to local climatic conditions after harvest and placed outside on short grass in conditions that favor the completion of the fungal life cycle. Before inoculation, stalk residues infected with *P. macdonaldii* pycnidia and visually devoid of other fungus were slit and pith was removed..

Mycelia. Mycelium production was derived from the frozen suspension of pycniospore MPH2 at 1×10^6 spores/ml conserved with Glycerol. Inoculum was plated on Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) (Difco) (39 g/liter of PDA, 150 mg/liter of streptomycin, pH 6) and grown at 25 °C for 10 days in the dark.

Spores. Spore production was derived from the suspension of pycniospore MPH2. A drop of suspension was incubated on PDA at 25 °C alternating 12 h light and dark cycles for 15 days to induce pycnidia. Spores were harvested by placing one cm² of PDA with pycnidia in a Petri dish containing sterile, distilled water. The concentration of pycniospores in suspension was determined using a hemacytometer and adjusted with sterile, distilled water to 1×10^6 spores/ml.

I. B. 4. Infected residues and mycelium inoculum experiment

Three experiments were carried out to evaluate the relative importance of infected residues and mycelium on PR incidence. Inoculation methods were: (i) a 6 mm diameter disk

of PDA with *P. macdonaldii* mycelium was placed at the stem base and drying of the disk was avoided by applying a moist cotton wool plug covered with aluminum foil around the stem base, (ii) ten fragments of stalk sunflower residues of 10 to 15 cm long infected with *P. macdonaldii* were random buried per pot, and (iii) ten fragments of stalk sunflower residues of 10 to 15 cm long infected were placed on the soil surface per pot. In SGri08, the three methods were tested on cv. Heliasol RM. In SAuz07 and SEC07, inoculation methods (i) and (ii) were tested except that in method (ii), some fragments of residues remained at the soil surface. In SGri08, residues remaining at the soil surface were water-sprayed twice a week to maintain the moisture required for spore emission. The burial of residues in method (ii) was prior to planting. Stem base inoculation with a mycelium disk (i) as well as positioning of residues on the soil surface (iii) were completed at star bud stage. The mycelium disk was left for seven days and residues remained throughout the experiment.

The experimental lay-out was a randomized complete block design in three blocks for SAuz07 and SGri08 and four blocks for SEC07. Eight plants (SAuz07, SGri08) and 20 plants (SEC07) per block were evaluated for eaCh III inoculation method and disease-free treatment (control).

I. B. 5. **Pycniospores dose-response experiment**

To determine the amount and type of inoculum required for maximizing disease incidence and premature ripening, four concentrations (1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 and 1×10^6 spores/ml) of pycniospores in suspension were evaluated in comparison with a mycelium inoculation in SAuz08, and 1×10^6 spores/ml was compared with a mycelium inoculation in SAuz09. The experiment was a randomized complete block design in four blocks. Eight plants per block were evaluated for eaCh III inoculation method and disease-free treatment (control). The methods used were: (i) a 6 mm diameter disk of PDA with MPH2 mycelium placed at the stem base with moist cotton wool plug covered with aluminum and (ii) 70 μ l of pycniospores suspension pipetted on a 6 mm-diameter disk of sterilized cellulose applied at stem base and maintained with Parafilm®M. Pycniospore concentrations at 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 and 1×10^6 spores/ml were prepared just before inoculation. Control plants received a disk with 70 μ l of sterile distilled water fixed at plant stem base with Parafilm®M. Plants were inoculated at star bud stage with mycelium or pycniospore suspension. Mycelia or monopycniospores disks were maintained on the stem base for seven days.

I. B. 6. Isolation

Sunflowers infected with buried residues and mycelium in Auz-07 and EC-07 were dissected as plant died and isolations of *P. macdonaldii* were performed on a sample of plant. Prior to sampling, root tissues were rinsed to remove soil. Small sections of the plant were removed at the stem base, stem level (4 to 5 cm above stem base necrosis), and root level with sterilized forceps and scalpels. Samples from Auz-07 were collected on the epidermis, cortex and pith of the stem base and higher up the stem. Roots samples were collected on roots hair, rhizoderm and cortex. Samples collected at EC-07 included epidermis and pith of the stem base, and root hairs. Samples were rinsed separately in a beaker of 1% sodium hypochlorite for 1 min then three times 1 min with sterile distilled water, and blotted dry before growing. Then tissues were laid onto PDA medium (39 g/liter of PDA, 150 mg/liter of streptomycin, pH 6) and incubated for 10 days at 25°C under alternating periods of illumination and darkness to induce sporulation.

I. B. 7. Sample preparation for microscopy and imaging techniques

A sample of plants inoculated with *P. macdonaldii* mycelium from the Auzeville experiment was chosen for optical microscopy. Because of tissue hardness, slices of stem, stem base, and root samples were cut in 6 transversal sections. Then tissues were sectioned (130 to 140 µm thick) on a vibratome (Series 1000, TPI, St. Louis, MO, USA) with a steel knife. Each slice was flooded with lactophenol cotton blue for 1 min and rinsed with distilled water.

Image acquisition was performed with a CCD camera (colour Coolview, Photonic Science, Robertsbridge, UK) mounted on an inverted microscope (DMIRBE, Leica, Reuil-Malmaison, France).

I. B. 8. Disease assessment and data analyses

The development of necrotic areas at the stem base induced by *P. macdonaldii* inoculation was assessed regularly using a visual 0-3 scale: 0 = healthy plant, 1 = less than $\frac{3}{4}$ of the stem base circumference black, 2 = lesion spots girdling the stem base, 3 = all leaves wilted and plant completely dead. Disease severity (DS) was the percent of plants with *Phoma* girdling necrosis at the stem base of the plant (scale 2) and premature ripening (PR) was the percent of plants completely dry before physiological maturity with lesions girdling the stem base (scale 3). In the infected residues and mycelium inoculum experiment, the

assessment was made weekly from inoculation at the stem base up to 83 days post inoculation (DPI) and twelve recordings were taken. In pycniospore dose-response experiment, eight recordings were taken up to 78 DPI. DS and PR were assessed by the area under disease progress curve. $AUDPC_{DS}$ and $AUDPC_{PR}$ were calculated according to the equation of Campbell and Madden (1990):

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} (y_i + y_{i+1})/2 * (t_{i+1} - t_i) \quad (1)$$

where n is the number of evaluations, y the DS or the percentage of PR, and t the DPI of each evaluation. Besides $AUDPC_{DS}$ and $AUDPC_{PR}$, the final percent of PR sunflowers was estimated at the end of each disease assessment experiments.

The independent variables $AUDPC_{DS}$, $AUDPC_{PR}$ and the final percent of PR plants were analyzed with analyses of variance via the general linear model procedure of Statgraphics Plus 5.1 statistical software (Rockville, MA, USA) with replicate as a random variable. For each analysis of variance, homoscedasticity by Levene's test (confidence level of 0.95) and the normality of the residuals by the Shapiro-Wilks test (confidence level of 0.95) was tested. Prior to ANOVA, square-root normalizing transformations were carried out to $AUDPC_{DS}$ and $AUDPC_{PR}$, and arcsine normalizing transformations were applied to the final percent of DS and PR in infected residues and mycelium inoculum experiment (Gomez and Gomez, 1984). Where the F ratio was significant ($P < 0.05$), differences between treatment means were determined using protected least significant differences (LSD). Data were also analyzed separately by year and site in infected residues and mycelium inoculum experiment. Linear correlation (Pearson's coefficient of correlation) between DS and PR was determined to measure the degree of association between pairs of variables. In pycniospores and mycelium inoculation experiment, expected versus observed plant PR at 83 DPI was analyzed with a logistic model.

I. C. Results

I. C. 1. Infected residues and mycelium inoculation

Disease symptoms at the stem base became apparent 7 days after artificial inoculation with *P. macdonaldii* mycelium disk and all plants presented necrosis. Upwardly expanding

necrotic lesions above the leading edge of the infection extended as much as 15 cm on the stem above the surface (Figure IV. 1. A). Plants grown with *P. macdonaldii* infected residues did not consistently exhibit stem base and root symptoms. Artificial inoculation with buried residues and a few fragments left on the soil surface in Auz-07 and EC-07 induced 52 % and 3.3 % of black lesions at the stem base respectively. In the Gri-08 experiment, plants grown with buried infected residues presented 8.3 % of stem base necrosis whereas inoculation with residues left on the soil surface induced 78.3 % of stem base symptoms. The root of some plants inoculated with buried residues presented black bulges and necroses through contact with the residues (Figure IV. 1. B). The three experimental sites did not differ significantly in AUDPC_{DS} and final DS based on the percent of plants with Phoma girdling necrosis at the stem base, and AUDPC_{PR} and the final PR percent variables. However, these variables were highly contrasted according to inoculation method. Inoculation with *P. macdonaldii* mycelium significantly ($P < 0.0001$) affected AUDPC_{DS} and DS (Table IV. 1).

Table IV. 1. AUDPCDS, Final percent of girdling necrosis (Final DS), AUDPCPR and final percent of premature ripened (final PR) of cv. Heliasol RM following artificial inoculation with *P. macdonaldii* mycelium at stem base at early bud stage; buried residues before sawing in Auzeville (SAuz07), En-Crambade (SEC07) and Grignon (SGri08); residues left at soil surface at early bud stage (SGri08); or non-inoculated plants (Control).

Inoculation method	AUDPC _{DS} ^{x,z}	Final DS (%) ^{y,z}	AUDPC _{PR} ^{x,z}	Final PR (%) ^{y,z}
Auzeville (Auz-07)				
Mycelium	64.15 a	96.3 a	24.04 a	64.0 b
Buried residues	3.17 d	16.7 d	0.27 d	4.0 d
Control	0 d	0 d	0 d	0 d
En-Crambade (EC-07)				
Mycelium	45.18 b	96.7 a	1.49 c	32.2 c
Buried residues	0.16 d	1.7 d	0 d	0 d
Control	0 d	0 d	0 d	0 d
Grignon (Gri-08)				
Mycelium	57.00 ab	82.7 b	2.49 b	82.6 a
Residues left at soil surface	6.59 c	35.1 c	0.91 c	30.4 c
Buried residues	0 d	0 d	0 d	0 d
Control	0 d	0 d	0 d	0 d

^x AUDPC was calculated according to Campbell and Madden (1990) up to 83 days post inoculation. Disease severity (DS) is based on the percentage of plants with *Phoma* necrosis girdling stem base and premature ripening (PR) is based on the percent of plants dry before physiological maturity.

^y The final DS and PR was taken 83 days from the start of epidemic.

^z Within each column, mean values followed by different letters in a column are significantly different from one another based on LSD. 0.05.

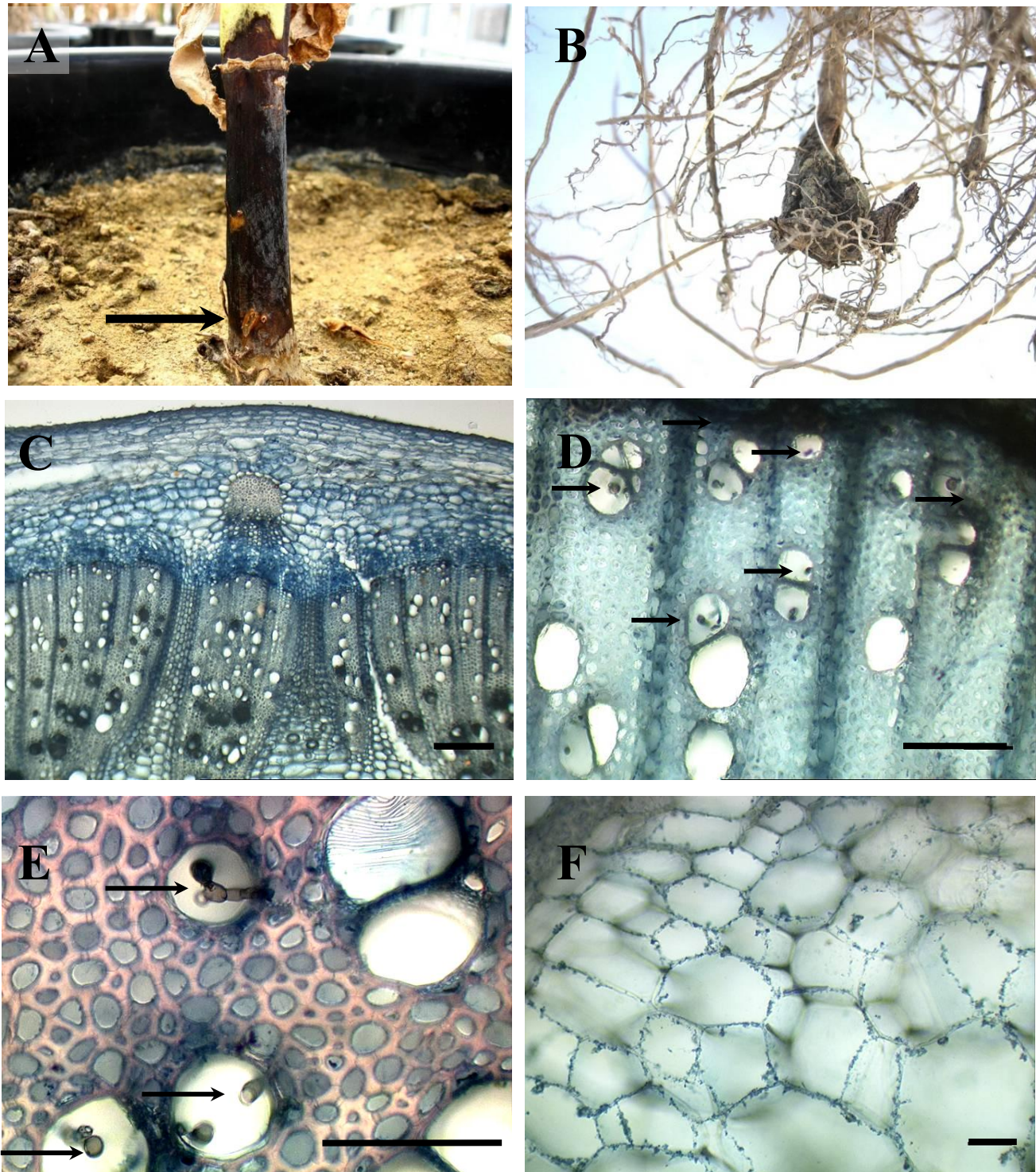


Figure IV. 1. A and B, Stem and root lesions on sunflower cv. Heliasol RM after artificial inoculation with *P. macdonaldii*. A, *Phoma* stem girdling necrosis after mycelium inoculation at stem base (arrow) with spreading of the fungus to the stem, and B, black bulges and necrosis (arrow) on plants grown with *P. macdonaldii* infested buried residue. C, Stem base cross-section of cv. Heliasol RM from plants noninoculated. bar = 250 μm . D, E and F, Stem base cross-section of plants inoculated with *P. macdonaldii* mycelium. D, Secondary xylem tissues colonized with *P. macdonaldii* hyphae (arrow). bar = 100 μm , E, primary xylem tissues colonized with *P. macdonaldii* hyphae. bar = 100 μm , and F, pith tissues extensively colonized with *P. macdonaldii* hyphae. bar = 100 μm .

These differences between inoculation methods were observed also for AUDPC_{PR} and the final PR percent variables. Inoculation with mycelium at the stem base induced the significantly ($P < 0.0001$) highest AUDPC_{PR} and final PR, followed by inoculation methods with infected residues on the soil surface (Gri-08) and buried residues in Auz-07. Plants with buried residues in EC-07 were lightly infected by Phoma necrosis, and remained symptomless in Gri-08 as for non-inoculated plants. All PR plants showed encircling stem base necrosis and Pearson's correlation coefficient for the percent of plants with Phoma necrosis girdling stem base and PR at 83 DPI was $r = 0.971$ ($P < 0.001$) (Auz-07), $r = 0.887$ ($P = 0.0001$) (EC-07) and $r = 0.994$ ($P < 0.0001$) (Gri-08).

In SAuz07 and SEC07, samples of plants inoculated with *P. macdonaldii* mycelium, buried residues and non-inoculated plants were used for pathogen isolation. A χ^2 analyses indicated that, for each location, either inoculation treatment significantly affected plant mortality ($P = 0.0015$ for Auzeville and $P < 0.0001$ for En-Crambade; Table IV. 2). Mycelium inoculation induced the highest plant mortality while only some plants inoculated with buried residues presented stem base necrosis. *P. macdonaldii* was frequently isolated at the leading edge of the infection and in the stem when plants presented stem base necrosis (Table IV. 2). The presence of the pathogen was mainly observed on superficial tissues (epiderm and cortex) of the stem base and above. In contrast, *P. macdonaldii* was seldom isolated from hair roots, rhizoderm and cortex roots. In plants inoculated with buried residues that did not present stem base necrosis, *P. macdonaldii* was not isolated from pith. Non-inoculated control plants remained symptomless and *P. macdonaldii* was not recovered.

Microscopic evaluations were performed on thin sections of stem (base and above) and root tissues after artificial inoculation with *P. macdonaldii* mycelium from SAuz07 site. At the leading edge of the infection, hyphae were abundant in the pith, primary and secondary xylem, cambium, phloem, and cortex of girdling necrosis at the stem base and above (Figure IV. 1. D, E and F). Microscopic observations on green tissues of the stem above necroses showed that hyphae were mainly present in the primary xylem and the pith (Figure IV. 1. E and F) and were not observed in superficial tissues. Hyphae were not observed in root tissues.

Table IV. 2. Plant premature ripened (PR) and isolation of *P. macdonaldii* from sunflower cv. Heliasol RM following artificial inoculation with *P. macdonaldii* mycelium at stem base at early bud stage, infested buried residues and some left at the soil surface before sawing presenting stem base necrosis or not; or non-inoculated plants (Control) in Auzeville (SAuz07) and En-Crambade (SEC07).

Inoculation methods	Plant PR (83 DPI) ^d	Isolation from plants - Auzeville ^a								
		stem base ^b			Stem ^c			Root		
		Epiderm	Cortex	Pith	Epiderm	Cortex	Pith	Hair	Rhizoderm	Cortex
Auzeville (SAuz07)										
Mycelium	6/8	8/8	7/8	4/8	7/8	3/8	2/8	0/8	0/8	1/8
Buried residues (total)	1/8	2/8	2/8	2/8	2/8	1/8	1/8	2/8	2/8	2/8
Plants with stem base necrosis	1/4	2/4	2/4	2/4	2/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Plants without stem base necrosis	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4	1/4
Control	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
En-Crambade (SEC07)										
Mycelium	17/27	25/27	2/2	16/27	-	-	-	8/27	-	-
Buried residues (total)	0/15	5/15	-	0/15	-	-	-	1/15	-	-
Plants with stem base necrosis	0/2	2/2	-	0/2	-	-	-	0/2	-	-
Plants without stem base necrosis	0/13	3/13	-	0/13	-	-	-	1/13	-	-
Control	0/3	0/3	-	0/3	-	-	-	0/3	-	-

^a Values are the number of plants from which *P. macdonaldii* was recorded out of the total number of plants sampled.

^b At the leading edge of the infection

^c At 4 to 5 cm above stem base necrosis

^d Mortality data were analyzed with a logistic model. Auzeville: χ^2 , $P = 0.0015$ and En-Crambade: χ^2 , $P < 0.0001$.

I. C. 2. Pycniospores and mycelium inoculation

Necrotic stem base lesions appeared as early as 7 days after inoculation with *P. macdonaldii* pycniospore suspensions and mycelium. Necrotic lesions could extend several centimeters above the leading edge of the infection with both inoculation methods. However, plants inoculated with low concentrations of spores (1×10^3 and 1×10^4 spores/ml) had small lesions that spread slowly compared with plants inoculated with higher concentrations (1×10^5 and 1×10^6 spores/ml) and mycelium. Differences on DS evolution were observed according to inoculation method and spore concentration. From 43 days post inoculation (DPI), DS of plants with *Phoma* girdling increased significantly ($P = 0.0012$) when plants were inoculated with 1×10^5 , 1×10^6 spores/ml and mycelium (Figure IV. 2). More than 92 % of plants inoculated with mycelium and 1×10^6 spores/ml had *Phoma* necrosis girdling stem base and no significant differences were observed between the 2 methods. In contrast, plants inoculated with 1×10^3 spores/ml had the lowest DS with 14 % at 78 DPI.

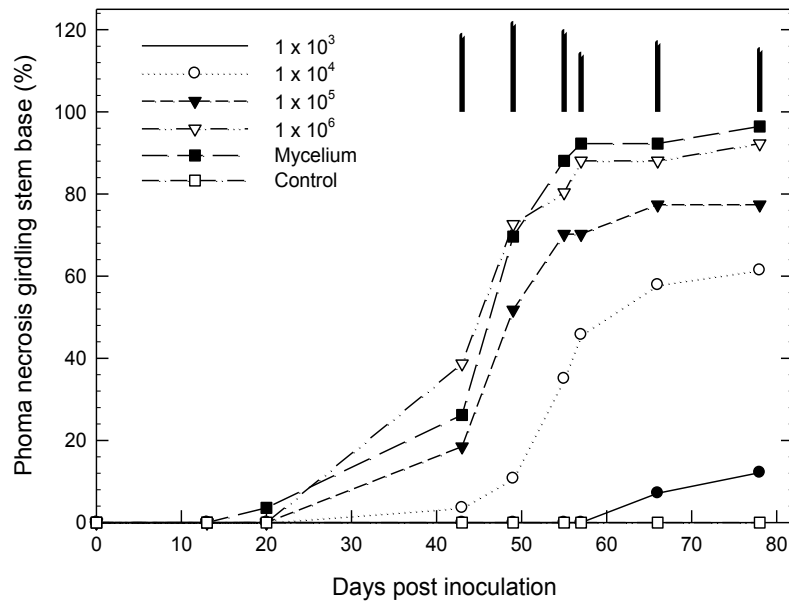


Figure IV. 2. Effect of artificial inoculation at stem base with mycelium, different pycniospore concentrations of *P. macdonaldii* and not inoculated (control) on the percent of sunflower cv. Heliasol RM with *Phoma* necrosis girdling stem base in SAuz08. Vertical bars indicate the LSD0.05 value.

Premature ripened plants were observed from 55 DPI with inoculation $\geq 1 \times 10^4$ spores/ml and mycelium and from 66 DPI with 1×10^3 spores/ml. AUDPC_{PR} integrating PR occurrence over time up to 78 DPI varied significantly ($P = 0.0005$) according to spore concentrations and mycelium inoculation. The lowest and highest AUDPC_{PR} were observed with 1×10^3 and 1×10^6 spores/ml respectively (Figure IV. 3). The final percent of PR plants also differed significantly ($P < 0.0001$) according to inoculation method. The total number of PR plants increased linearly with increasing levels of inoculum concentration. Final PR was lowest and highest when plants were inoculated with 1×10^3 and 1×10^6 spores/ml, respectively. No significant differences were observed between inoculation with mycelium and 1×10^6 spores/ml. All PR plants showed girdling stem base necrosis and Pearson's correlation coefficient for the percent of plants with *Phoma* necrosis girdling stem base (Fig. 2) and PR was $r = 0.871$ ($P < 0.0001$) at 49 DPI and increased up to 78 DPI with $r = 0.941$ ($P < 0.0001$).

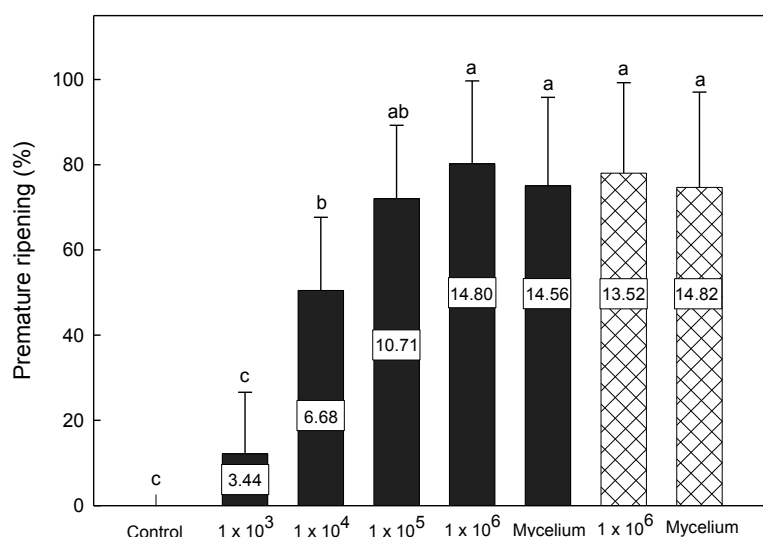


Figure IV. 3. Effect of artificial inoculation at stem base with different pycniospore concentrations, mycelium of *P. macdonaldii* or not inoculated (control) on the final percent of premature ripening at 78 days post inoculation (DPI) in SAuz08 (black bars) and in SAuz09 (squared bars). For each vertical bar, vertical lines represent the standard error of the mean. Premature ripening (%) means with different letters are significantly different by Fisher’s protected LSD0.05 test. Values in vertical bars are the AUDPCPR calculated according to Campbell and Madden (1990) and based on the percent of plants premature ripened from inoculation at 78 DPI.

I. D. Discussion

This study aimed at reproducing sunflower premature ripening in greenhouse conditions to obtain a better understanding of disease emergence with contrasted inoculum type and artificial inoculation methods. Results showed that infected residues, mycelium and pycniospores of *P. macdonaldii* can infect sunflower stem base and roots, and induce symptoms that may lead to plant death. These findings agree with earlier studies in other sunflower production areas (Donald et al., 1987 ; Gulya et al., 1984 ; Pérès and Poisson, 2000 ; Pérès et al., 2000). The existence of a fungal complex (*Phoma macdonaldii*, *Fusarium sp.* and *Macrophomina phaseolina*) has long been associated with sunflower PR (Donald et al., 1987 ; Pérès et al., 2000). This study showed that *P. macdonaldii* is particularly involved in premature death and can, alone produce PR.

Symptoms and spread of the disease after inoculation at the stem base, and time to PR emergence in greenhouse were similar to field results with cv. Heliasol RM and other cultivars under a high level of N fertilization and a limited post anthesis water regime (Seassau et al., 2010). Inoculation with mycelium and spores concentration at 1 x 10⁵ and 1 x 10⁶ spores/ml were identified as the methods that significantly ($P < 0.0001$) promoted

establishment of the pathogen leading to PR while inoculation with spore concentrations at 1×10^3 , 1×10^4 spores/ml, buried residues or residues on the soil surface resulted in low PR rates. Although this study was conducted using only one cultivar, these results are in agreement with a previous report (Pérès and Poisson, 2000), where inoculation with pycniospores suspension of *P. macdonaldii* at the stem base induced more girdling necrosis and PR than inoculation with infected residues. Stem base inoculation methods with mycelium or spores suspension at 1×10^6 spores/ml could thus be suitable for the efficient evaluation of a large number of sunflower genotypes for resistance to PR. Currently, genetic variability for partial resistance only to *Phoma* black stem have been reported in both field (Pérès et al., 1994) and controlled conditions (Bert et al., 2004 ; Rachid Al-Chaarani et al., 2002 ; Roustae et al., 2000a). Programs screening for resistance to *Phoma* black stem at present use spore suspensions at 1×10^6 spores/ml deposited at the intersection of the leaf petiole and the stem (Larfeil, 2003). The present results indicate that resistance to *Phoma* black stem and PR could be screened with the same spore inoculum and crop management favoring disease development. Then, partial resistance genotypes identified should be used in crossing programs for breeding of durable resistance to sunflower PR.

Disease severity was used in addition to AUDPC_{DS} to evaluate efficient inoculation methods with *P. macdonaldii* leading to PR. The relationship between DS and PR was established in greenhouse condition and in the field (Carson, 1991 ; Donald et al., 1987 ; Pérès and Poisson, 2000). A close correlation between the proportion of plants with girdling necrosis at the stem base and the final percent of PR was observed after inoculation with mycelium and spores. Disease severity could be used as an early and quantifiable indicator to estimate plant susceptibility to PR and screen resistant genotypes before PR emergence, of interest in large scale breeding programs where single-date assessments are a considerable advantage. Furthermore, it has been shown that whatever the phenological plant stage, reaction to pathogen spread from seedling stage to mature sunflowers did not change (Larfeil, 2003). It should be thus interesting to continue experiments and test whether correlations between *Phoma* girdling and PR are obtained after early inoculation. Ability to reproduce disease symptoms and sunflower PR in greenhouse could allow rapid progress in breeding for disease resistance. Screening is most commonly conducted under field conditions; however, field screening has limitations depending on natural occurrence of suitable environment conditions and pathogen inoculum, and can usually be conducted only once in a year. Although only a limited number of plants can be evaluated under greenhouse conditions,

experiments could be carried out twice a year for a primary screening of genotypes before field evaluation.

Extensive necrosis of the stem tissues spread several centimeters above the leading edge of the infection after inoculation with spores, mycelium and infected residues on the soil surface. In contrast, plants inoculated with buried infected residues had few stem base necroses and only plants with fragments of residues remaining on the soil surface in SAuz07 and SEC07 presented girdling necroses. The highest AUDPC_{DS} and DS in SAuz07 with buried residues may have been favored by controlled air humidity and temperature in the greenhouse. Drier climatic conditions in the hoop tunnel of SEC07 with temperatures up to 40°C may have restricted fungal spread into the plant (Roustae et al., 2000b ; Weeraratne and Priyantha, 2003) and could explain that this experimental site resulted in the lowest final PR whatever inoculation method. Apart from growing conditions, plants inoculated with buried residues presented well-developed root balls that may present black bulges and necrosis through contact with infected residues. *P. macdonaldii* was isolated from these bulges and roots necrosis; however the fungus was rarely isolated from roots tissues compared with stem tissues in plants presenting girdling necrosis. Microscopic observations showed that hyphae of *P. macdonaldii* spread primarily in the xylem and upwardly to the stem. Hardness of root tissues may have restrained microscopic observations of *P. macdonaldii* hyphae; there have been reports of infection of the vascular system of sunflower seedling roots (Abou Al Fadil et al., 2009). Despite sparse inoculation of *P. macdonaldii* in roots, buried residues can infect root systems (Pérès and Le Sourne, 2000) which provide an infection pathway for the pathogen, but hyphae were not observed in the stem after inoculation with buried residues. Within the stem base, a chemical protection zone, also called barrier zone, is formed by parenchyma that contains phenol compounds, helping the plants to stop the fungal progression (Deflorio et al., 2009 ; Shigo, 1982). This phenomenon, mainly studied for tree pathogens, could explain limited progression of the fungus to the stem. Although large quantities of inoculum were buried with crop residues, if they do not lead to girdling stem base necrosis, they will not cause sunflower PR. These findings have provided a better understanding of the origin sunflower premature death that should primarily be ascribed to aerial infections at the stem base than to root infections.

Maric et al. (1981) described the presence of perithecia and pycnidia on residues aged several years and suggested that residues can be long-term sources of inoculum (Pérès and Letof, 1996). Large quantities of residues on the soil surface in SGri08 favored PR more than

in SAuz07 and SEC07 where very little residues remained. This supported the finding that spread of the disease largely depends on the quantity of infected residues remaining on the soil surface (Schneider et al., 2006). In southwestern France, sunflower is mainly planted in rotation with wheat. Short rotations and simplified soil tillage of wheat crops have tended to increase the amount of inoculum by leaving infected sunflower residues on the soil surface. As soil tillage determines the vertical distribution of residues, it must have a pronounced effect on disease spread. Contact of residue with soils, especially when buried, promotes greater microbial activity, accelerating decomposition (Parr and Papendick, 1978). Residues in no-till systems decompose more slowly than residues under reduced-tillage systems. Buried residues brought back to soil surface were found to be less infectious than non-buried residues (Poisson-Bammé and Pérès 2000). Thus, residues in no-till systems will favor the survival of *P. macdonaldii* and inoculum production for longer periods of time.

In conclusion, sunflower premature ripening results from aerial infections more than soilborne attacks. Residues left on the soil surface that produce ascospores, pycniospores and mycelium are the main source of *P. macdonaldii* inoculum. Cultural practices that can minimize the quantity of these residues should reduce stem base infection and frequency of sunflower PR. Practices such as tillage, sunflower residue management and rotation could play significant roles in reducing the risk of the disease. In addition, this study showed that artificial inoculation at the stem base with high pycniospores concentration and mycelium of *P. macdonaldii* could be used for screening genotypes having high levels of partial resistance to PR. Inoculation with 1×10^6 spores/ml was the most effective method of artificial inoculation and could be applied in screening for resistance to both *Phoma* black stem and premature ripening.

II. Caractérisation physiologique et morphologique d'un pied sec présentant une nécrose encerclante au collet

II. A. Objectif de l'expérimentation

Les contaminations au collet par une suspension de spores ou une pastille de mycélium de *Phoma macdonaldii* induisent des nécroses encerclantes de bas de tige qui prédisposent le tournesol au syndrome de dessèchement précoce. Celui-ci se traduit par un dessèchement brutal du feuillage de la plante bien avant la sénescence naturelle du tournesol. L'objectif de cette partie est de décrire ce phénomène par des expérimentations en serre, qui n'a jusqu'à présent pas été caractérisé de manière dynamique. Pour cela, des plantes ont été contaminées artificiellement au collet par du mycélium de *P. macdonaldii*. Un suivi de la consommation en eau et de la vitesse de sénescence a été réalisé sur un échantillon de ces plantes contaminées, ainsi que sur des plantes témoins non inoculées. Par ces mesures simples, nous voulions établir un lien entre la présence du pathogène dans les tissus conducteurs de la plante et la modification physiologique des plantes contaminées. En parallèle de ces mesures, des observations de la morphologie de bas de tige ont été réalisées afin d'établir une typologie du pied sec.

Hypothèse 1 : Un pied sec se caractérise par une chute précoce de la transpiration de la plante entraînant une sénescence brutale du feuillage et l'arrêt anticipé de la consommation d'eau.

II. B. Dispositif expérimental

Les essais ont été réalisés en serre à Auzeville en 2007 et 2009 (SAuz07 et SAuz09). La description détaillée du dispositif et des conduites de culture ont été présentées au *Ch. II § II*. Les plantes de la variété cv. Heliasol RM ont reçu une fertilisation NPK (150 kg N, 50 kg P, 50 kg K/ha) aux stades 7/8 feuilles et F1/F2 pour l'essai SAuz07, et aux stades 9-12 feuilles, E1, E2/E3 et F35 pour l'essai SAuz09. De la levée à la floraison, l'irrigation n'était pas limitante et la fraction d'eau transpirable du substrat a été maintenue entre 30 % et 50 % à partir de la floraison jusqu'à la fin de l'expérimentation. Au stade E3-E4, 25 plantes ont été contaminées par une pastille de mycélium de *P. macdonaldii* appliquée au collet et 20 plantes non contaminées ont servi de témoins en 2007 contre 8 en 2009.

II. C. Variables mesurées

II. C. 1. Suivi de la progression de la maladie, de la mortalité des plantes et observations des symptômes au collet.

La progression de la maladie au collet a été suivie sur les plantes contaminées par *P. macdonaldii*, ainsi que la sénescence et la maturation des plantes contaminées et des témoins entre la contamination et 100 DPI. Des observations de la morphologie externe du bas de tige (aspect du collet, couleur de la nécrose, présence éventuelle de fissures) ont été réalisées en fin de cycle sur les plantes contaminées, puis complétées par des observations internes à partir de coupes longitudinales du collet.

II. C. 2. Mesures de surface foliaire et de sénescence

Deux mesures de surface foliaire ont été réalisées le 4 mai (stade E5/F1) et 14 mai (stade F2/F3.2) en 2007 ; en 2009, trois mesures ont été effectuées le 15 mai (stade E4), le 20 mai (stade E5/F1) et le 28 mai (stade F2) (*Ch. II § IV. C. 1*). La mesure de surface foliaire maximale correspond à la dernière mesure réalisée au stade F2/F3.2 pour les deux années d'expérimentation. A partir de ce stade, 8 mesures de sénescence ont été réalisées entre le 16 mai (26 DPI) et le 12 juillet 2007 (83 DPI) et 9 mesures entre le 4 juin (23 DPI) et le 30 juillet (79 DPI) en 2009 (*Ch. II § IV. C. 3*). Les mesures de surface foliaire et de sénescence des plantes ont été réalisées sur un sous-échantillon homogène (taille et nombre de feuilles) de 8 plantes contaminées les deux années et sur 8 plantes témoin en 2007 contre 4 en 2009.

II. C. 3. Suivi de la consommation en eau des plantes

A partir de la floraison, l'irrigation automatique est stoppée pour l'ensemble du dispositif expérimental, et les goutteurs du sous-échantillon de plantes contaminées et de plantes témoins utilisées pour les mesures de surface foliaire et de sénescence ont été retirés. Le pilotage du stress hydrique et le suivi de la consommation en eau des plantes sont réalisés par des pesées effectuées tous les 2 à 3 jours (selon les conditions environnementales de la serre), ce qui permet de connaître la quantité d'eau perdue par plante pendant cette période (*Ch. II § II. A. 4*). Une fois le poids « sec » connu, les plantes sont arrosées manuellement pour revenir à un poids de 12,73 kg correspondant à 50 % de la réserve en eau du pot. Vingt-deux pesées ont été réalisées entre 19 DPI et 73 DPI en 2007 et 19 pesées entre 15 DPI et 70 DPI en 2009.

II. C. 4. Composantes du rendement

Les capitules de l'ensemble des pieds secs (21 plantes) et des plantes non contaminées (8 plantes) ont été récoltés le 30 juillet (79 DPI) et le 30 août 2009 (110 DPI) respectivement sur l'essai SAuz09. Les capitules, regroupés par bloc, ont été battus. Le nombre d'akènes a été compté, l'humidité moyenne des akènes calculée après un passage à l'étuve pendant 48h, puis le poids sec d'akènes par capitule a été déterminé ainsi que le poids de 1000 akènes (PMG) (*Ch. II § IV. E*). En 2007, aucune évaluation de ce type n'a été réalisée.

II. D. Résultats

II. D. 1. Suivi de la mortalité des plantes

Le suivi de la mortalité des plantes contaminées et des plantes témoins a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les traitements. Les premières plantes mortes ont été observées au stade M0, M1.1, avant la maturité physiologique naturelle (M3). Il ne s'agit dans ce cas que de plantes contaminées artificiellement au collet par *P. macdonaldii*. Les premiers pieds secs ont été observés à 36 DPI en 2007 et à 42 DPI en 2009, alors que la maturité physiologique des premières plantes non contaminées a été observée à partir de 90 DPI (Figure IV. 4). La mortalité des plantes contaminées se décompose en trois phases. Pendant la première phase, le nombre de plantes desséchées précocement augmente très rapidement jusqu'à 60 DPI. Ceci a concerné 66 % des plantes contaminées en 2007 et 69 % en 2009. A la suite de cette mortalité précoce, un palier est observé et aucune plante morte n'est comptabilisée avant 88 DPI en 2007 et 87 DPI en 2009. Une troisième phase de mortalité s'étale jusque 100 DPI. Elle concerne les plantes contaminées non pieds secs restantes et l'ensemble des témoins. Dans ce cas, il ne s'agit plus de dessèchement précoce mais de maturité physiologique. Les plantes sont considérées pieds secs jusqu'à 77 DPI, soit 10 jours avant la maturité des premiers témoins. Les plantes mortes a posteriori sont considérées sénescents.

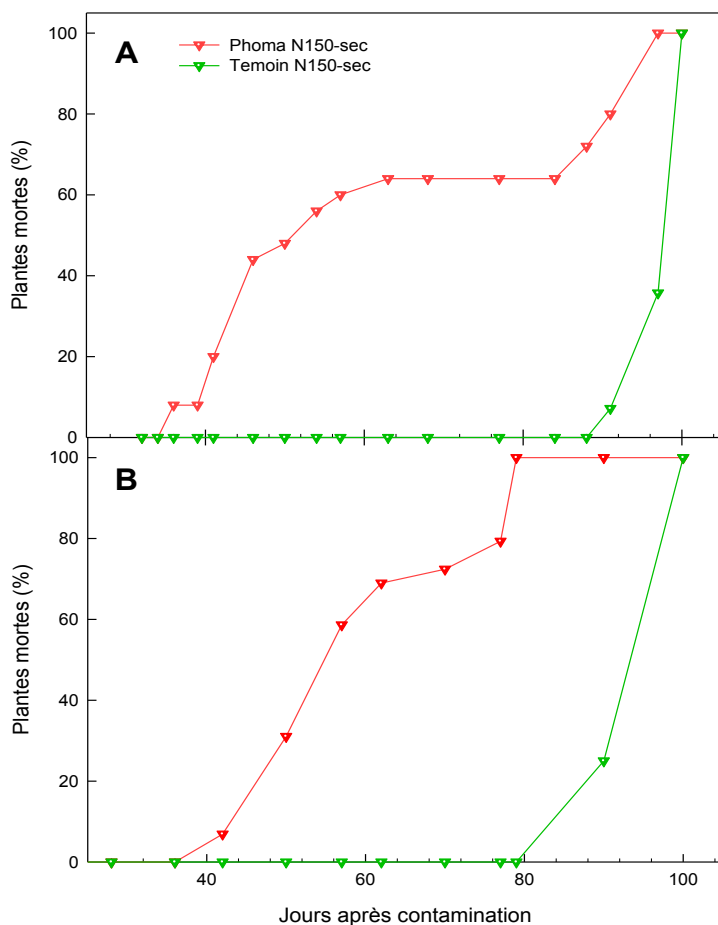


Figure IV. 4. Pourcentage de plantes mortes contaminées artificiellement au collet par *P. macdonaldii* et de plantes non contaminées (Témoins) en 2007 (A) et en 2009 (B).

II. D. 2. Vitesse de sénescence des plantes

Au début de l'expérimentation, les surfaces foliaires moyennes des échantillons de plantes témoins et de plantes contaminées sont sensiblement équivalentes à la floraison (Figure IV. 5). A partir de 20 DPI, la sénescence des feuilles basales a commencé, la surface chlorophyllienne verte diminue et reste comparable entre les deux traitements jusqu'à 39 DPI pour les deux années expérimentales. A ce stade, la contamination artificielle n'a pas eu d'effet apparent sur le fonctionnement de la plante. Cependant, dès l'apparition des premiers pieds secs à 45 DPI, la surface foliaire chlorophyllienne des plantes contaminées chute brusquement jusqu'à 62 DPI, date à laquelle toutes les plantes contaminées sont notées pieds secs. A l'inverse, la surface foliaire des témoins décroît progressivement. A 80 DPI, le feuillage des témoins n'est pas entièrement sénescent et la surface foliaire chlorophyllienne active des témoins avoisine les 1000 cm² par plante en 2007 et 2009.

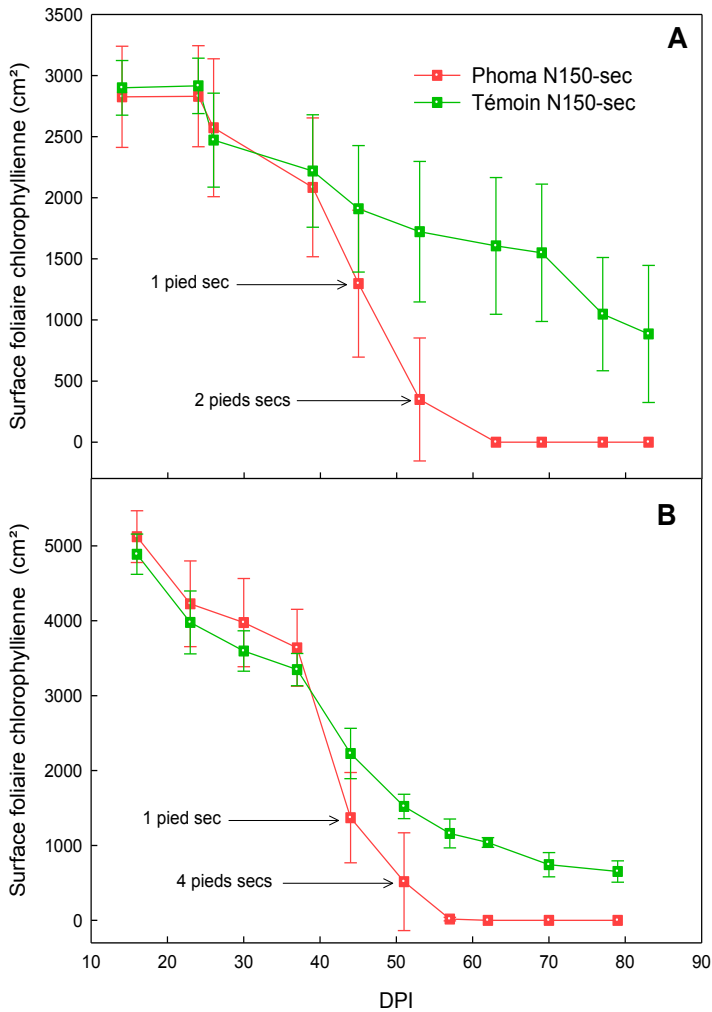


Figure IV. 5. Evolution de la surface chlorophyllienne d'un échantillon de plantes contaminées artificiellement au collet par *P. macdonaldii* et de plantes non contaminées (Témoins) en 2007 (A) et en 2009 (B).

II. D. 3. Suivi de la consommation en eau des plantes contaminées et des plantes témoins

Le cumul de la quantité d'eau transpirée par les plantes contaminées et témoins, maintenues à partir de la floraison dans une gamme de stress comprise entre 30 % et 50 % de la réserve en eau du pot, est représenté sur la Figure IV. 6. La consommation moyenne en eau de ces plantes est identique jusqu'à 44 DPI en 2007. Au delà, la consommation en eau des plantes contaminées a sensiblement diminué, jusqu'à un arrêt total de la consommation des plantes à 58 DPI, stade où toutes les plantes contaminées sont desséchées précocement. A l'inverse, la consommation d'eau cumulée des plantes témoins progresse de manière linéaire jusqu'à 73 DPI (Figure IV. 6. A). Le même phénomène est observé en 2009 mais le décrochement de la consommation en eau entre plantes contaminées et témoins est beaucoup plus précoce (Figure IV. 6. B). Dès 23 DPI, les plantes contaminées consomment légèrement moins d'eau que les témoins. Cette différence s'accroît sensiblement à partir de 42 DPI. Dès

57 DPI, phase où toutes ces plantes sont desséchées précocement, un arrêt de la consommation en eau est mesuré.

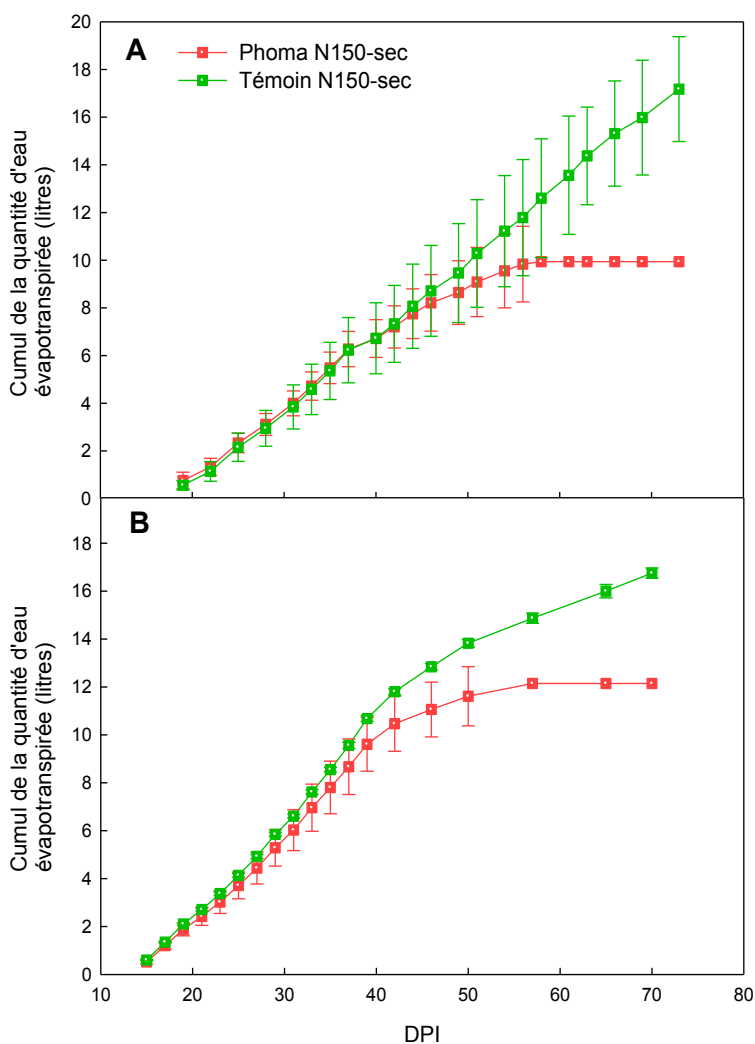


Figure IV. 6. Cumul moyen de la quantité d'eau évapotranspirée depuis le début du stress hydrique à la floraison pour un échantillon de plantes contaminées artificiellement au collet par *P. macdonaldii* et de plantes non contaminées (Témoin) en 2007 (A) et en 2009 (B).

II. D. 4. Observation de la morphologie de bas de tige des plantes contaminées

La contamination artificielle par du mycélium de *P. macdonaldii* n'a permis d'obtenir que 70 % de pieds secs sur les deux années d'expérimentation, alors que les conditions de contamination et de conduite de culture étaient identiques. La comparaison de la morphologie de bas de tige des plantes contaminées a permis de mettre en évidence des différences morphologiques importantes pouvant potentiellement expliquer qu'une plante se dessèche précocement ou continue son cycle normalement. Les observations morphologiques de collets notés pieds secs ou non sont présentées dans le Tableau IV. 3.

Tableau IV. 3. Observations morphologiques au collet pour des plantes contaminées artificiellement par *Phoma macdonaldii* et notées ‘pieds secs’ ou non pieds secs à 83 DPI en 2007 et 77 DPI en 2009.

	Nombre de plantes observées	Nécrose au collet		Couleur de la nécrose		Morphologie du collet		Présence de fissures au collet
		Non encerclante	Encerclante	Noire	Marron	Resserré	Renflé	
2007								
Pieds secs	16	-	16	16	-	16	-	Non
Pieds non desséchés	9	-	9	-	9	-	9	Oui (++)
2009								
Pieds secs	19	-	19	17	2	19	-	Non
Pieds non desséchés	6	3	3	-	6	-	6	Oui (++)

Pour les deux années d’expérimentation, les plantes desséchées précocement présentent une morphologie de bas de tige caractéristique : une nécrose encerclante au collet, de couleur noire, progressant le long de la tige sur plus de 20 cm au dessus du point d’infection. La nécrose est lisse, sans fissures externes, et la morphologie de bas de tige se caractérise par un rétrécissement important du diamètre au collet en comparaison d’une plante non contaminée (Tableau IV. 3 ; Figure IV. 7 A).

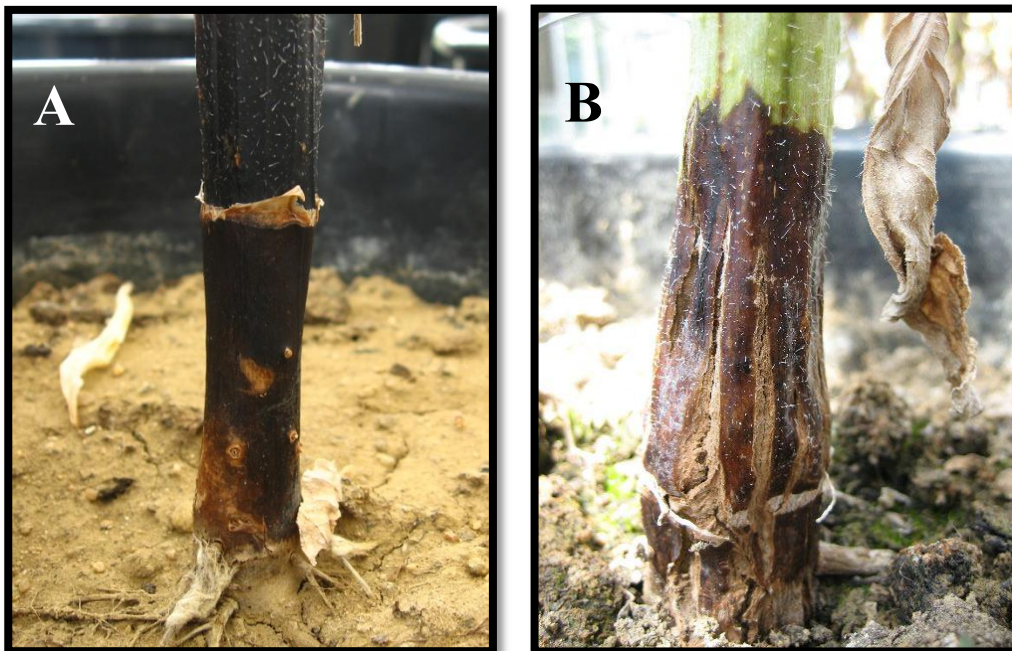


Figure IV. 7. Bas de tige d’un pied sec (A) et d’une plante non desséchée (B) après contamination artificielle au collet par *P. macdonaldii*. Observation à 83 DPI (2007).

Les plantes contaminées mais non desséchées précocement peuvent également présenter une nécrose encerclante au collet mais la morphologie du bas de tige est très différente de celle d'un pied sec. La nécrose est toujours marron, et la progression verticale des symptômes le long de la tige est rarement supérieure à 10 cm. Le bas de tige de la plante présente un renflement important parcouru de nombreuses fissures plus ou moins profondes (Tableau IV. 3 ; Figure IV. 7 B).

Les observations internes des tissus contaminés par *P. macdonaldii*, à partir d'une coupe longitudinale de bas de tige, mettent en évidence une coloration gris-marron des tissus secondaires au niveau du collet et le long de la tige. La moelle est également affectée avec un aspect très fragmenté, de couleur marron-verdâtre (Figure IV. 8). Les renflements observés au niveau du collet des plantes contaminées mais non 'pieds secs' (Figure IV. 8 B) se traduisent par une excroissance importante des tissus secondaires au niveau du point d'infection (Figure IV. 8 B), contrairement aux pieds secs qui ont un diamètre de bas de tige profondément réduit (Figure IV. 8. A).

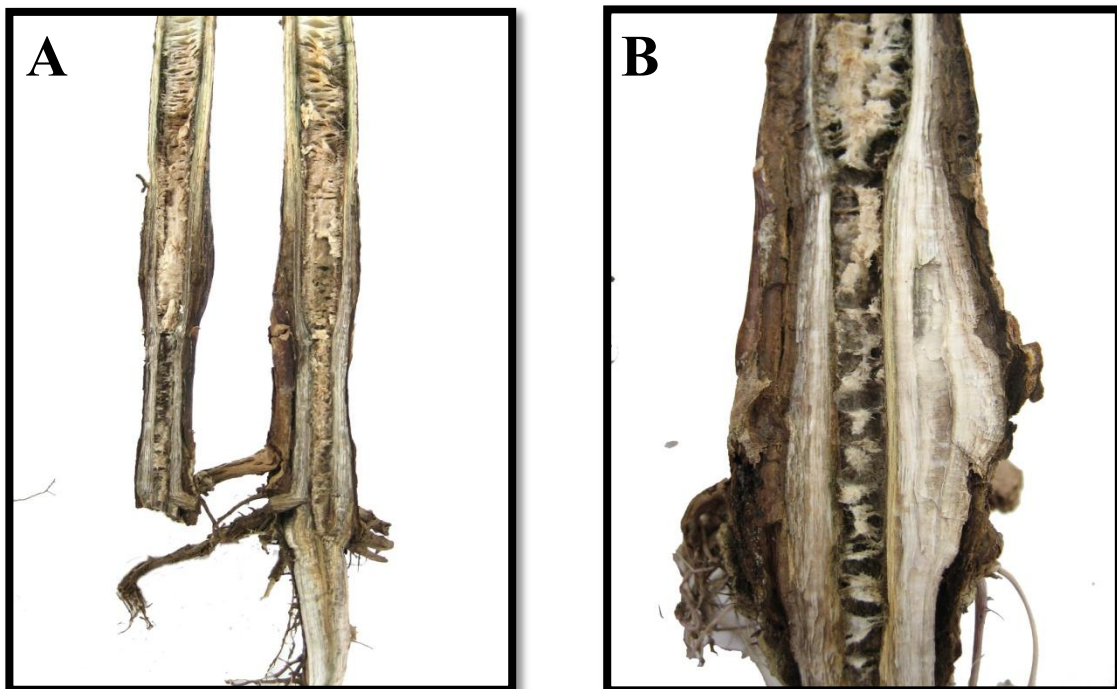


Figure IV. 8. Coupe longitudinale d'un bas de tige issu d'une plante notée 'pied sec' (A), et d'une plante non desséchée précocement (B) après contamination artificielle au collet par *P. macdonaldii*.

II. D. 5. Effet du pied sec sur la nuisibilité

La nuisibilité consécutive au pied sec a été estimée en 2009 par comparaison de l'humidité des grains, du nombre de grains moyen par capitule et du poids de 1000 grains (à 0 % d'humidité) entre les plantes contaminées ayant évolué en pieds secs et les plantes saines. Le dessèchement précoce réduit significativement ($P < 0,001$) l'humidité des grains et le poids de 1000 grains (Tableau IV. 4). Néanmoins, le nombre de grains par capitule ne diffère pas significativement entre les deux traitements.

Tableau IV. 4. Comparaison de l'humidité des grains, du nombre de grains par capitule, et du poids de 1000 grains (PMG) entre les 21 pieds secs contaminés artificiellement au collet par *P. macdonaldii* et les 8 plantes témoins (Récolte 2009).

	Nombre de plantes	Humidité des grains (%)	Nombre de grains par capitule	PMG (g) à 0 % d'humidité
Pieds secs	21	1,68 b	1043 a	33,86 b
Témoins	8	4,40 a	963 a	37,69 a
F/t value		95,59	1,56	26,04
P > F		< 0,0001	0,2520	0,0014

II. E. Discussion

Les premières études sur le dessèchement précoce avaient pu mettre en évidence une diminution de la vigueur des plantes se traduisant par un flétrissement des feuilles quelques semaines avant la sénescence naturelle (Sackston, 1950 ; Donald et al., 1987). Dans le cadre de nos essais, ce syndrome s'est traduit par une mort précoce des plantes à partir de 40 DPI, alors que les plantes non contaminées n'étaient qu'au stade M0 (début du remplissage des grains). Le suivi de la consommation en eau et l'évolution de la surface foliaire chlorophyllienne des pieds secs a permis de caractériser plus finement ce syndrome. La surface foliaire active des plantes contaminées a diminué sensiblement dès 40 DPI, chutant de 74 % (2007) et de 71 % (2009) jusqu'à 63 DPI, contre 20 % et 45 % respectivement pour les plantes non contaminées. Parallèlement à cette chute brutale de la surface foliaire, la quantité d'eau évapotranspirée des plantes en voie de dessèchement est en moyenne deux fois inférieure à celle des témoins. Alors que les témoins ont consommé 6,8 (2007) et 4,0 (2009) litres d'eau entre 40 et 60 DPI, les plantes contaminées n'ont consommé que 3,2 et 1,7 litres pendant cette période. Cette réduction précoce de la transpiration par les plantes malades

pourrait s'avérer être un indicateur du dessèchement précoce de la plante. La sénescence rapide serait ainsi une conséquence directe de la diminution puis de l'arrêt de l'alimentation hydrique de la plante.

Les observations morphologiques du bas de tige de pieds secs, qui mettent en évidence un collet resserré pour les plantes contaminées par *P. macdonaldii*, pourraient expliquer cette réduction de la consommation en eau des plantes. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : (i) la progression du pathogène se fait dans les vaisseaux de la plante, et plus particulièrement dans le xylème secondaire (Abou Al Fadil et al., 2009 ; Seassau et al., submitted), (ii) le diamètre des vaisseaux du xylème des plantes infectées est sensiblement réduit après contamination par un agent pathogène (Pennypacker et Leath, 1986 ; Mepsted et al., 1995a), et (iii) les hyphes du pathogène peuvent obstruer les vaisseaux conducteurs de la plante (Beckman, 1964 ; Robb et al., 1981). La progression du pathogène pourrait ainsi conduire à boucher progressivement les vaisseaux (Put et Clercx, 1988) réduisant ainsi fortement le flux transpiratoire. La contrainte hydrique subie par les plantes infectées serait ainsi plus prononcée que pour les plantes non contaminées soumises à un régime hydrique limitant post-floraison, accélérant ainsi la sénescence foliaire (Thomas et Stoddart, 1980; Gan et Amasino, 1997). Ce phénomène a pu être mis en évidence pour le tournesol (Yegappan et al., 1982 ; Whitfield et al., 1989), mais également chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) (Davies et al., 1999), le soja (DeSouza et al., 1997 ; Brededan et Egli, 2003) et le maïs (*Zea mays* L.) (Aparicio-Tejo et Boyer, 1983). Le stress hydrique continu accélérerait ainsi la sénescence par une remobilisation rapide de l'azote des feuilles vers les organes puits (Sionit and Kramer, 1977; DeSouza et al., 1997).

Le stress hydrique, plus prononcé pour les plantes contaminées en voie de dessèchement précoce, pourrait être à l'origine des pertes de rendement associées à ce syndrome. En l'absence de maladies, les effets d'un stress hydrique post-floraison sur les composantes du rendement du tournesol sont multiples. S'il tend à réduire le diamètre de l'inflorescence (Yegappan et al., 1982), un stress important pendant la floraison et le remplissage des grains conduit à un nombre important de grains vides (Human et al., 1990). La rupture d'alimentation en eau, amplifiée par la présence du pathogène dans les tissus conducteurs, pourrait ainsi avoir affecté le remplissage des grains et donc le poids de 1000 grains.

Parallèlement, 1/3 des plantes contaminées ont présenté une sénescence comparable à celle des témoins. Dans 87 % des cas, ces plantes présentaient des nécroses encerclantes au

collet, mais la morphologie de bas de tige pour ces plantes était très différente de celle des pieds secs. Celles-ci présentaient toujours une nécrose renflée, de couleur marron, avec de nombreuses fissures. L'observation de coupes longitudinales de ces bas de tiges renflés à permis de mettre en évidence une importante assise de tissus secondaires. Ces excroissances cellulaires, produites par les cellules vivantes du parenchyme bordant les vaisseaux, peuvent obstruer les vaisseaux devenus non fonctionnels par le champignon et permettre à la plante de circonscrire la progression d'un agent pathogène (Lepoivre, 2003). Cette hypertrophie serait ainsi une réaction de défense de la plante pour limiter la progression du pathogène dans les tissus. L'alimentation de la plante en ressources serait ainsi maintenue par la mise en place en parallèle de ces tissus secondaires fonctionnels (Lucas et Dickinson, 1998) évitant ainsi le dessèchement précoce de la plante. Cependant, comment expliquer que pour une même variété, un même inoculum, une même méthode de contamination et une même conduite de culture, 1/3 des plantes développent une morphologie de bas de tige pouvant contrecarrer l'évolution de *P. macdonaldii* ? La disposition des plantes dans la serre ne semble pas avoir d'effet direct, la répartition des pieds secs étant aléatoire au sein des essais. La quantité et l'âge de l'inoculum pourraient éventuellement être un facteur explicatif. Si le contact entre la pastille et le collet n'est pas optimal à la suite de la contamination artificielle (l'application du coton humide et de l'aluminium pouvant légèrement déplacer la pastille), la quantité d'inoculum au contact de la plante peut être réduite. La plante pourrait ainsi induire rapidement des mécanismes de défense pour limiter l'infection et la progression du pathogène. Par ailleurs, la vitesse de croissance de *P. macdonaldii*, particulièrement lente sur milieu de culture PDA, pourrait influencer sur l'agressivité du champignon. Une pastille de mycélium prélevée en périphérie de la zone de croissance du pathogène pourrait être plus agressive qu'au centre, là où l'inoculum est plus ancien. Face à un pouvoir pathogène potentiellement réduit, la plante pourrait réussir à mettre en place des mécanismes de défense précoces limitant la progression du pathogène et conduisant au dessèchement précoce.

II. F. Conclusion

Le dessèchement précoce du tournesol résulte d'une infection au collet par *P. macdonaldii* qui induit une nécrose encerclante de bas de tige, noire, progressant le long de la tige et entraînant un rétrécissement du diamètre du bas de tige. La nécrose des tissus secondaires, associée à la présence du pathogène dans les vaisseaux conducteurs de la plante

est à l'évidence à l'origine d'une rupture de l'alimentation hydrique dans la plante, qui se traduit par un arrêt de transpiration et une sénescence foliaire brutale. Ces modifications physiologiques ont des conséquences directes sur les composantes du rendement, et notamment sur le poids moyen d'un akène réduit de 10 % dans nos conditions. On ne peut exclure une réduction du nombre d'akènes par capitule dans le cas d'attaques plus précoces. Une évaluation des dommages pour la culture (rendement, teneur en huile et en acides gras) mériterait d'être conduite en peuplement dense au champ.

Dans certains cas, une plante contaminée peut développer des mécanismes de défense limitant l'infection par l'obstruction de vaisseaux devenus non fonctionnels par la présence de *P. macdonaldii*. La mise en place de tissus secondaires parallèles permettrait ainsi à la plante de poursuivre son cycle de développement. Cependant l'origine de la mise en place de ces mécanismes de défense reste posée compte tenu qu'aucun élément apparent ne semble prédisposer la plante à cette adaptation. En conditions d'infections naturelles, la variabilité de l'inoculum primaire ainsi que les conditions microclimatiques sous le couvert végétal pourraient expliquer un taux de pieds secs souvent inférieur à 100 % même en condition de contamination renforcée.

*Chapitre 5. La conduite de culture peut-elle
moduler l'expression du syndrome de
dessèchement précoce ?*

Chapitre 5. La conduite de culture peut-elle moduler l'expression du syndrome de dessèchement précoce ?

L'apparition et le développement de maladies en pathologie végétale sont généralement conditionnés par des facteurs biotiques comme l'agressivité de la souche de l'agent pathogène, la quantité et la nature de l'inoculum. A cela, différents facteurs abiotiques tels que la température et l'hygrométrie, liés aux conditions de culture, à l'état du sol et au climat, peuvent influencer sur la progression de l'épidémie. Dans le cas du dessèchement précoce du tournesol, ces facteurs semblent avoir un effet prononcé sur l'expression de la maladie. La sénescence précoce du tournesol, contaminé au collet par *P. macdonaldii*, est étroitement corrélée à la rupture de l'alimentation hydrique dans la plante, induite par la présence du pathogène dans les vaisseaux et les conditions de cultures contraignantes pour la plante. Ainsi la disponibilité en eau pour la plante (réserve en eau du sol, irrigation, précipitations) pourrait moduler la gravité de ce syndrome. Plus largement, dans le cadre de l'évaluation de méthodes de protection intégrée, il apparaissait pertinent de s'intéresser à l'effet des pratiques culturales pouvant amplifier cette maladie syndrome. Le choix s'est donc porté sur l'étude au champ des effets croisés du régime hydrique (limitant ou non en post-floraison), de la fertilisation azotée et de la densité de peuplement, sur le devenir d'infections par *P. macdonaldii*, qu'elles soient artificielles ou naturelles. Des essais ont été menés sur deux variétés (cv. Heliasol RM et cv. Melody), présentant une sensibilité contrastée vis-à-vis de *Phoma*. Menés entre 2006 et 2009 sur le site de l'INRA d'Auzeville (CAuz06, CAuz07, CAuz08 et CAuz09), ces essais ont permis d'étudier la variabilité du syndrome DP au cours d'années présentant des conditions climatiques très contrastées.

Ce chapitre se décompose en deux parties. La première traite des effets d'un régime hydrique contrasté (limitant ou non en post-floraison) et de différents apports azotés, sur le dessèchement précoce après contamination naturelle ou artificielle par du mycélium de *P. macdonaldii*. Cette partie fait l'objet d'un article publié dans la revue *Field Crop Research* intitulé : « Nitrogen and water management can limit premature ripening of sunflower induced by *Phoma macdonaldii* ». La seconde partie aborde les effets de la densité de peuplement, associés à des régimes hydriques et azotés contrastés, sur le dessèchement précoce après contamination artificielle par *P. macdonaldii* d'une variété sensible de tournesol (cv. Heliasol RM).

I. Nitrogen and water management can limit premature ripening of sunflower induced by *Phoma macdonaldii*

C. Seassau^a, G. Dechamp-Guillaume^b, E. Mestries^c and P. Debaeke^a

Publié dans: *Field Crop Research* **115** (2010), 99–106

^a INRA, UMR AGIR, BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France

^b ENSAT, INPT, UMR AGIR, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France

^c CETIOM, ENSAT, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France

I. A. Introduction

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is a major oilseed crop grown under a wide range of agro-ecological conditions worldwide. However, fungal diseases are often considered as severe constraints for its yield stability (Gulya et al., 1997). Among fungal pathogens, *Phoma macdonaldii* Boerema (teleomorph: *Leptosphaeria lindquistii*) (McDonald, 1964) is one of the most widespread and detrimental diseases in sunflower production. *P. macdonaldii* has been reported worldwide (Gulya et al., 1997) as the causal agent of black stem disease. In France, the incidence and severity of the disease increased dramatically in the early 90s and the entire sunflower cropping area is now affected by *Phoma* black stem (Penaud and Pérès, 1994; Pérès and Letof, 1996). Short rotations (mainly sunflower-wheat) and simplified soil tillage of wheat crops may have increased inoculum since infected stubble remains on the soil surface (Poisson-Bammé and Pérès, 2000).

The disease is mainly characterized by the appearance of black lesions on the stem (McDonald, 1964). With a severe attack, the lesions girdle the stem and, through coalescence of several spots, the whole stem becomes black. Even when *P. macdonaldii* infections result in extensive pith decay, seed yield losses observed in inoculated trials are generally slight, especially if infections occur late in the seed-filling stage (Carson, 1991; Penaud, 1996). Lesions at the foliar nodes are not particularly damaging in terms of yield as compared to infection at the stem base. Sackston (1950) first described a wilt and stalk rot of unknown etiology as “premature ripening” (PR), and earlier evidence showed that stem base girdling canker caused by *P. macdonaldii* was its primary cause. Before PR, crops show loss of vigour from mid- to late summer, leaves become wilted and necrotic, the stalk turns dark brown to

black, and this is followed by senescence and plant death a few weeks before physiological maturity (Donald et al., 1987). In France, the impact of PR on yield has not been clearly assessed, but yield losses up to 1.3 t ha⁻¹ have been reported (Pérès et al., 2000).

Few studies have aimed at a better understanding of the etiology of premature ripening of sunflower and the identification of agronomic factors that promote the disease. Although different genotypic susceptibilities to *Phoma* black stem have been observed (Darvishzadeh and Sarrafi, 2007), environmental factors were suggested to play a key role in disease development and PR occurrence (Carson, 1991). Field studies showed that additional nitrogen increased the incidence of *P. macdonaldii* attacks at leaf nodes and stem base (Velazquez and Formento, 2000; Debaeke and Pérès, 2003). However, effects of crop management on PR have never been reported. In this context, there was need for detailed knowledge of agronomic factors involved in sunflower PR. This paper reports experimentation with two cultivars that differed in their susceptibility to PR, under contrasted water and N fertilization levels during three seasons, to assess the effects of water regime and N supply on premature ripening following artificial inoculation or natural infection with *P. macdonaldii*.

I. B. Materials and methods

I. B. 1. Experimental design and crop management systems

Three field experiments were carried out at INRA, Auzeville, near Toulouse (Haute-Garonne, south-western France) over three years (2006 to 2008) (CAuz06, CAuz07 et CAuz08). From preliminary variety screenings, two cultivars were selected, differing in their susceptibility to PR (data not shown): cv. Heliasol RM, susceptible to PR, and cv. Melody, with a higher level of partial resistance.

Prior to sowing, soil cores were taken to 120 cm depth for analysis. The soil was a deep silty-clay to clay with a pH of 7.8 to 8.2 and soil nitrate content ranged from 30 to 37 kg ha⁻¹ in 2006, from 57 to 85 kg ha⁻¹ in 2007 and from 15 to 28 kg ha⁻¹ in 2008. Previous crops were sorghum in 2006, 2007 and 2008 (rainfed plots) and maize in 2008 (irrigated plots).

The experiment was arranged as a 4-factor split-plot design with three replicates, with water regime (irrigated or not) as the main plots. N fertilization, the subplot treatment, was applied in strips. Within each N treatment, cultivars, as sub-subplots, were arranged at random and were either artificially inoculated (AI), or left subject to natural infection (NI). The crop was

sown in April 2006 and 2007, and in May 2008 due to rainy conditions in April (85 mm) (Table V. 1). Plant density was 6.5 plants m⁻² after thinning. Each plot consisted of six rows, with a row width of 60 cm. Plot size was 37, 22 and 18 m² in 2006, 2007 and 2008 respectively. Since inoculum of *Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet, (Phomopsis stem canker) was regularly present, and strongly competes with *Phoma*, Punch CS was applied in June (0.6-0.8 l ha⁻¹ of flusilazole + carbendazim, (DuPont)).

Table V. 1 - Mean monthly temperature and relative humidity, and total monthly rainfall during the sunflower growing season recorded at a weather station near the experimental site.

Month	Temperature (°C)			Relative Humidity (%)			Rainfall (mm)		
	2006	2007	2008	2006	2007	2008	2006	2007	2008
April	11.1	17.8	11.7	58	67	77	0.0	4.5	85.0
May	16.7	15.9	16.5	74	76	78	30.5	113.5	60.5
June	20.9	19.4	19.4	63	71	70	21.0	80.5	36.0
July	25.2	20.5	21.3	62	67	66	21.5	13.5	40.5
August	20.5	20.4	21.1	61	67	68	28.0	57.5	37.5
September	20.3	17.2	18.7	70	68	72	88.5	32.5	36.0
April-September	19.1	18.5	18.1	65	69	72	189.5	302.0	295.5

In 2006, two levels of N fertilization were applied, and three were made in 2007 and 2008. Unfertilized control plots (N0) and high N rates of 150 kg ha⁻¹ (N150) were compared over the three years of the experiment. In 2007 and 2008, an intermediate rate of 75 kg N ha⁻¹ (N75) was also applied. At sowing, 75 kg N ha⁻¹ was applied as urea in N75 and N150, and then a second application of 75 kg N ha⁻¹ was made at early bud stage for the N150 treatment. Quantity and timing of sprinkler irrigation were decided according to rainfall and soil water deficit. In 2006, a dry year, six irrigations were applied, giving 220 mm on irrigated plots and 50 mm was applied to rainfed plots for seedling emergence and N incorporation. In 2007, 80 mm of irrigation was applied at two periods to satisfy water requirements on the irrigated treatment while the rainfed treatment received no irrigation. In 2008, 120 mm were applied to irrigated plots and 20 mm was applied on rainfed plots for N incorporation. Factors studied and experimental layouts are summarized in Table V. 2. Over the three years of experimentation, individual factors were combined to create contrasting crop management systems. A range from 12 to 24 treatments was assessed by combining two water regime (rainfed vs irrigated), N fertilization (2 levels in 2006 and 3 in 2007, 2008), and infection (AI

and NI) on both cv. Melody and cv. Heliasol RM in 2006 and 2007, and only on cv. Heliasol RM in 2008. In 2006, the treatment N150 - rainfed was not tested in AI for either cultivar.

Table V. 2 - Description of the main aspects of the crop management experiments carried out at INRA Auzeville from 2006 to 2008.

Year	Cropping data				Cultivar(s)	Treatments			
	Sowing date	Plant Density (pl m ²)	Emergence date	Experimentation duration (days) ^a		N fertilization (kg ha ⁻¹)	Irrigation (mm) (rainfed - irrigated)	Artificial inoculation date	Disease assessment duration (days)
2006 ^b	19 April	6,5	30 April	121	Heliasol RM Melody	0-150	50 - 220	8 June	82
2007	12 April	6,5	24 April	126	Heliasol RM Melody	0 - 75 - 150	0 - 80	6 June	82
2008	5 May	6,5	16 May	127	Heliasol RM	0 - 75 - 150	20 - 120	1 July	81

^a From emergence till final severity estimation

^b The N150 - rainfed treatment was not tested in artificial inoculated plots for both cultivars in 2006

I. B. 2. *Phoma* isolates and plant inoculation

One *P. macdonaldii* monopycniospore strain was used in these studies, selected for its severe aggressiveness. The strain was isolated from an infected sunflower residue showing severe black stem base lesions in a sunflower field located close to the trial site. Isolation and conservation of the strain was performed according to the method of Roustae et al. (2000b). Inoculum was plated on Petri dishes containing potato dextrose agar (Difco) (39 g l⁻¹, 150 mg of streptomycin, pH 6) and grown at 25 °C for 10 days in the dark. Inoculation of the AI plots was carried out at star bud stage on 25 uniform plants tagged within the two central rows. A 6 mm diameter disk of PDA with mycelium was placed at the stem base and left for five days. Drying of the disk was avoided by applying a moist cotton wool plug covered with aluminum foil around the stem base.

I. B. 3. Disease assessment

Development of necrotic areas at the stem base induced by *P. macdonaldii* was assessed from 12, 8 and 7 days after artificial inoculation in 2006, 2007 and 2008, respectively. The disease was scored using a 0-4 scale: 0 = healthy plant, 1 = less than ¾ of the stem base circumference black, 2 = spots circling the stem base, 3 = all leaves wilted but

the stem green, 4 = plant completely dry. A PR plant was thus defined as one completely dry before physiological maturity with necroses circling the stem base. Disease symptoms were observed weekly on the 25 tagged plants for all treatments on AI and NI plots. A few plants affected by other fungal diseases (*Phomopsis* stem canker, *Sclerotinia* stalk rot, *Verticillium* wilt) were ignored and only *Phoma* was observed on the remaining tagged plants throughout disease scoring. Disease assessment was continued up to 82 days post inoculation (DPI) in 2006 and 2007, and 81 DPI in 2008, one week before the onset of normal senescence. At least 13 recordings were taken in 2006 and 11 in 2007 and 2008.

Over the three years of experiment, 100 % of AI and NI tagged plants were infected by *P. macdonaldii*, equivalent to a disease score of ≥ 2 . Disease development was assessed by the area under disease progress curve (AUDPC) and the final percentage of PR plants. The percentage of PR plants was recorded weekly and used to calculate AUDPC for all experiments. The AUDPC was calculated according to the equation of Campbell and Madden (1990):

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} (y_i + y_{i+1})/2 * (t_{i+1} - t_i) \quad (1)$$

where n is the number of evaluations, y the percent of PR and t the DPI of each evaluation. The final percentage of PR plants was that at the last observation.

I. B. 4. Assessment of crop nitrogen and water status

The N nutrition status for each treatment was quantified using the Nitrogen Nutrition Index (NNI), calculated as follows (Lemaire and Gastal, 1997):

$$NNI = N_m/N_c \quad (2)$$

where N_m is the total N concentration measured for all the aerial parts and N_c is the critical total N concentration calculated for the weight of aerial dry matter (ADM) measured *in situ*; N_m and N_c are expressed as % of ADM. N_c is the minimum N concentration needed to obtain the maximum dry matter production by the crop. In a preliminary study, Debaeke and Raffailac (2006) proposed the following critical dilution curve for sunflower:

$$N_c = 5.03 \times ADM^{-0.447} \quad (3)$$

NNI was calculated on 5 plants of cv. Heliasol RM for each treatment over the three years of experiment at flowering on AI or NI plots. A value of $NNI \geq 1$ indicated a crop with ample N supply (N non-limiting); $NNI = 1$ was optimal N nutrition and below 1, N deficiency.

The crop model SUNFLO developed by Casadebaig (2008) for dynamic simulation of response of sunflower cultivars to a range of soil, weather and management conditions was applied to the different water x nitrogen situations. The model accounted for plant phenology, leaf area index development and stomatal response to soil water deficit in non-diseased plants. The output variable used in this study was the ratio of actual to potential evapotranspiration ($ET_a : ET_0$) over the period from stem base inoculation to physiological maturity, which can be used as an index of plant water stress under healthy conditions. High values of $(ET_a : ET_0)$ indicated an adequate water supply and water stress by $(ET_a : ET_0)$ below 1.

I. B. 5. Statistical analyses

The independent variables AUDPC and the final percent of PR plants were analysed with multifactor analysis of variance procedure of Statgraphics Plus 5.1 statistical software (Rockville, MA, USA). For each analysis of variance, homoscedasticity by Levene's test (confidence level of 0.95) and the normality of the residuals by the Shapiro-Wilk's test (confidence level of 0.95) were tested. Prior to ANOVA, square-root transformations were carried out to AUDPC. Arcsine transformations were applied to PR percentage data (Gomez and Gomez, 1984). When significant differences were found at $P \leq 0.05$, means were compared using Fisher's protected least significant difference test (95 % LSD).

For each year, PR was subjected to variance component analysis to estimate variability of infection, cultivar, water regime and N fertilization.

I. C. Results

I. C. 1. Effect of climate and crop management on plant water and plant nitrogen status

Climatic conditions in the three years differed greatly in temperature, relative humidity and rainfall (Table V. 1). Mean temperature from April to September 2006 was the highest compared with 2007 and 2008. Temperatures throughout disease development were particularly high in 2006, with a mean of 25.2 °C in July, compared with 20.5 °C in 2007 and 21.3 °C in 2008. Rainfall during the cropping season was 300 mm in 2007 and 2008 but only 190 mm in 2006.

The simulated $ET_a : ET_0$ ratio for cv. Heliasol RM (from plant inoculation to physiological maturity) was used as a water stress index (Table V. 3). The ratio varied with irrigation and nitrogen management between years and climatic conditions. In irrigated plots, $ET_a : ET_0$ was above 0.81 for all levels of N and all years. In rainfed plots, this ratio was always below 0.73. Predicted water stress was higher in fertilized plots, especially under rainfed management. Highly fertilized plots had Nitrogen Nutrition Indices (NNI) from 0.86 to 1.2 (Table V. 3) whereas values for unfertilized plots were from 0.45 to 0.62, except in 2007 when NNI was 0.77 due to a high nitrogen content in the soil of rainfed plots (20 kg ha⁻¹ more than in irrigated treatments). In 2008, an intermediate NNI was observed in N75 treatment. In 2007, NNI in N75 was comparable to N150 in 2007 because of a high initial soil N content. With N150, rainfed plots had lower NNI than irrigated plots.

Table V. 3 - Actual : potential evapotranspiration ratio ($ET_a : ET_0$) calculated by the SUNFLO model and Nitrogen Nutrition Index (NNI) values for cv. Heliasol RM under both water regimes (irrigated and rainfed) and three levels of N fertilization (N0, N75, N 150) throughout the disease development period after natural infection from 2006 to 2008. High values of ($ET_a : ET_0$) indicated an adequate water supply and water stress by ($ET_a : ET_0$) below 1. A value of $NNI \geq 1$ indicated a crop with ample N supply (N non-limiting); $NNI = 1$ was optimal N nutrition and below 1, N deficiency.

Year	Irrigation	ET actual : ET potential ($ET_a:ET_0$)			Nitrogen Nutrition Index (NNI)		
		N-Fertilization			N-Fertilization		
		N0	N75	N150	N0	N75	N150
2006	Irrigated	0.85	-	0.81	0.58	-	1.04
	Rainfed	0.56	-	0.51	0.62	-	0.86
2007	Irrigated	0.85	0.82	0.82	0.45	0.99	0.98
	Rainfed	0.73	0.70	0.70	0.77	1.10	0.95
2008	Irrigated	0.87	0.83	0.83	0.59	0.79	1.20
	Rainfed	0.72	0.68	0.68	0.57	0.69	0.95

I. C. 2. Effect of year on AUDPC and PR

Disease severity was analyzed as AUDPC and final PR over the three years. These variables were calculated for AI and NI, cultivars, water regimes and N fertilization (Table V. 4). The highest AUDPC values were observed in 2006 but did not differ significantly from those in 2007 and 2008. Significant differences ($P < 0.05$) in final percent of PR were

observed between 2006 and 2007 for all crop management systems taken together. In 2007, PR was highest (47.5 %), followed by 2008 (41.9 %) and 2006 (39.7 %).

I. C. 3. Effect of artificial inoculation and natural infection on AUDPC and PR

AUDPC and final PR were higher after artificial inoculation (AI) than under natural infection (NI) (Table V. 4). The differences were significant ($P < 0.05$) in 2006 and 2007 but not in 2008. The highest percent of PR was observed in 2007 after AI with 52 % of dead plants. In 2006, PR was the lowest with NI and increased by a factor of 1.5 with AI. Final PR in 2008 was comparable to the other years, but no significant difference was observed between AI and NI. Variance components analyses showed that the total variance in PR over the three years was not explained completely by the 2 types of infection.

I. C. 4. Effects of individual agronomic factors on AUDPC and PR

I. C. 4. a. Cultivar

Cultivar susceptibility was tested in 2006 and 2007. Significant differences ($P < 0.05$) were observed between cv. Heliasol RM and cv. Melody except in 2006, when AUDPC value in NI did not differ significantly from AI (Table V. 4). Disease was more severe on cv. Heliasol RM than on cv. Melody with both AI and NI. AUDPC was the highest in 2006 with 7.49 for cv. Heliasol RM in AI and 4.64 for cv. Melody. PR was most severe in 2007 with 67.5 % for cv. Heliasol RM compared to 36.6 % for cv. Melody after AI. Variance components analyses showed that cultivar explained 31 % and 27 % of the total variance in PR in 2006 and 2007, respectively.

I. C. 4. b. Water regime

In 2006 and 2007, a significant ($P < 0.05$) effect of water regime on the disease development was observed (Table V. 4). In 2008, no significant differences were observed between irrigated and rainfed plots. Plots under rainfed condition showed higher AUDPC and PR values than irrigated ones, the greatest disease severity being observed in the absence of irrigation in 2006 when climatic conditions were very dry and hot throughout disease development (Table V. 2).

Table V. 4 - Mean values of AUDPC and final percentage of sunflowers prematurely ripened (PR) showing effects of two cultivars (cv. Heliasol and cv. Melody), different levels of N fertilization (N150, N75, N0) and two water regimes (irrigated, rainfed) with artificial inoculation (AI) and natural infection (NI) over the three years (2006 to 2008)

Treatment	AUDPC ^w												Final PR (%) ^x											
	2006				2007				2008				2006			2007			2008					
	4.83 A ^y				4.14 A				3.60 A				39.7 B			47.5 A			41.9 AB					
Year	AI ^z		NI		AI		NI		AI		NI		AI ^y		NI		AI		NI		AI		NI	
Inoculation method	6.07	A	3.60	B	4.83	A	3.45	B	3.83	A	3.37	A	48.0	A	31.4	B	52.0	A	43.0	B	45.8	A	38.0	A
Cultivar																								
Heliasol RM	7.49	a ^y	4.47	a	6.78	a	4.48	a	3.83		3.37		60.9	a	40.4	a	67.5	a	52.6	a	45.8		38.0	
Melody	4.64	b	2.73	a	2.87	b	2.42	b	-		-		35.1	b	22.4	b	36.6	b	33.3	b	-		-	
Water regime																								
Irrigated	3.27	b	1.70	b	4.02	b	2.48	b	3.51	a	2.42	a	23.7	b	14.5	b	43.5	b	29.4	b	46.6	a	34.7	a
Rainfed	8.86	a	5.50	a	5.63	a	4.42	a	4.16	a	4.32	a	72.3	a	48.3	a	60.5	a	56.6	a	44.9	a	41.4	a
Fertilizer																								
High (N150)	9.0	a	5.10	a	9.17	a	6.96	a	8.55	a	7.17	a	66.3	a	43.2	a	82.6	a	69.5	a	85.3	a	68.3	a
Usual (N75)	-		-		4.45	b	2.90	b	2.31	b	2.35	b	-		-		58.8	b	48.0	b	43.3	b	33.7	b
None (N0)	3.13	b	2.11	b	0.86	c	0.49	c	0.64	b	0.59	b	29.7	b	19.5	b	14.6	c	11.5	c	8.7	c	12.0	c

^wCalculated according to Campbell and Madden (1990)

^xFinal PR (%) taken 81 days from the start of epidemic

^yFor a given treatment, means followed by different capital letters in a row are significantly different from one another, whereas means followed by different small letters in a column are significantly different from one another based on L.S.D. _{0.05}.

^zThe treatment N150 – rainfed was not tested for cv. Heliasol RM and cv. Melody

In that year, AUDPC under rainfed management was 2.7 and 3.2 times greater than in the irrigated treatment with AI and NI respectively, and PR was increased three-fold. The same pattern was observed in 2007 to a lesser extent, with PR increased by 1.4 and 1.9 times with AI and NI respectively. In 84 % of the 72 pairs of plots differing only by water regime, PR was greatest in absence of irrigation (Figure V. 1). PR in rainfed plots was above PR in irrigated plots in 100% of cases in 2006, 92% in 2007 and 56% in 2008. From the variance component analyses, water regime in 2006 explained 29 % of the total variance in PR, but had no significant effect in 2007 and 2008, two years with high rainfall from July to September (104 mm and 111 mm respectively) (Table V. 2). However, over the three years, rainfed conditions increased PR by a mean of 20 percentage points (Figure V. 1).

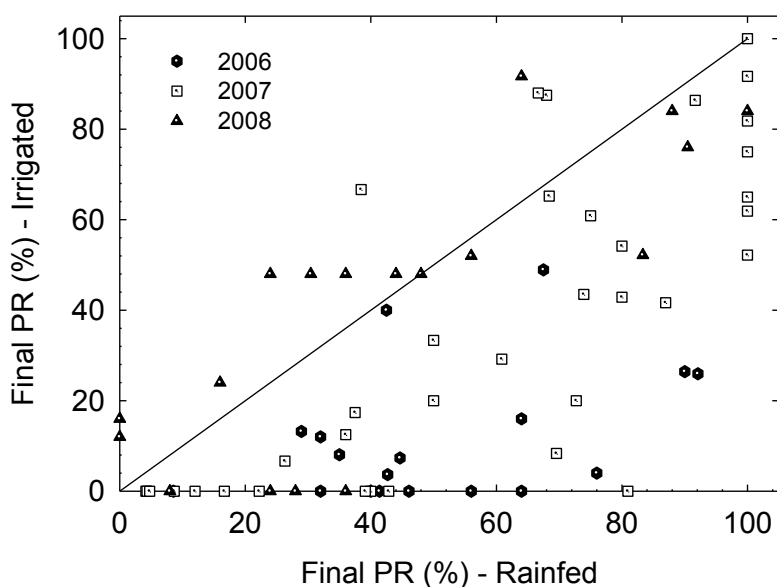


Figure V. 1 - Relation between the percentage of sunflowers affected by premature ripening (PR) for 72 pairs of plots differing only for irrigation (irrigated, rainfed) from 2006 to 2008)

I. C. 4. c. N fertilization

Variance component analyses demonstrated that N fertilization was the main factor increasing PR. N supply explained 26 %, 62 % and 81 % of PR in 2006, 2007 and 2008, respectively. ANOVA showed a significant ($P < 0.05$) effect of N fertilization on AUDPC and PR (Table V. 4) except in 2008, where no significant differences were observed between N0 and N75 for AUDPC values. In 2007 and 2008, AUDPC values were increased 11 to 14 times under the N150 treatment compared with N0. The final percent of PR was 82.6 % and 85.3 % for N150 plots with AI in 2007 and 2008 respectively (Table V. 4).

In 52 of the 54 pairs of plots differing only for N150 vs N0, PR was greater under N150 (Figure V. 2). PR in N150 plots was above PR in N0 plots in 89% of cases in 2006,

96% in 2007 and 100% in 2008. The relative plant nitrogen status was indicated by the Nitrogen Nutrition Index (NNI) at flowering.

The relationship between PR and NNI for cv. Heliasol RM from 2006 to 2008 is shown in Figure V. 3. Significant regressions were observed between NNI at flowering and PR in AI plots ($R^2_{AI} = 0.80$) and NI plots ($R^2_{NI} = 0.57$). Maximal PR values were observed, with N75 and N150 treatments, for NNI values ≥ 0.9 . Conversely, low PR was associated with NNI values below 0.6, when N deficiency was severe.

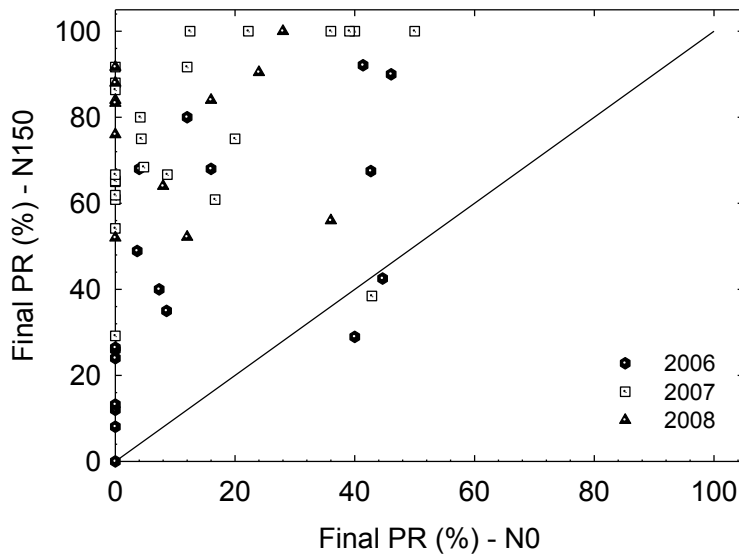


Figure V. 2 - Relation between the percentage of sunflowers affected by premature ripening (PR) for 54 pairs of plots differing only in the quantity of N applied, from 2006 to 2008). Low nitrogen: 0 kg N ha⁻¹; High nitrogen: 150 kg N ha⁻¹

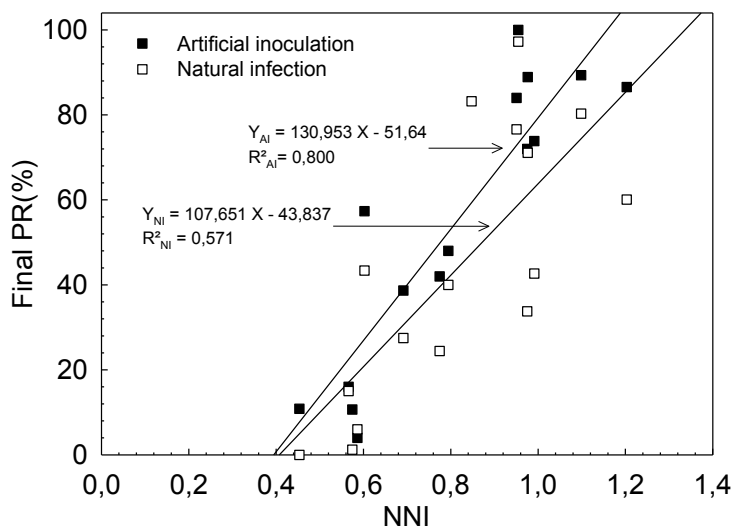


Figure V. 3 - Relationship between the percentage of sunflowers affected by premature ripening (PR) and the Nitrogen Nutrition Index (NNI) for cv. Heliasol RM in artificial inoculation (AI) and natural infection (NI) in 2006, 2007 and 2008.

I. C. 4. d. *Effect of combined water and nitrogen factors on PR*

Annual disease progress curves of PR integrating the effects of N fertilization and water regime for both cultivars with AI and NI (Figure V. 4) show significant effects of crop management. N150 plots had the highest percent of PR, except in 2006 when PR was greater in rainfed-N0 than in irrigated-N150 conditions. The first PR plants appeared in rainfed-N150 treatment, and the final percent of PR was the highest in these plots for both cultivars and infection methods. Next highest levels were obtained in irrigated-N150, rainfed-N0 and irrigated-N0 crop management in 2007, 2008 and for cv. Heliasol RM in AI in 2006. In 2007, 100 % of PR plants were observed in rainfed-N150 plots and 0 % in irrigated-N0 ones with cv. Heliasol RM (Figure V. 4b). The time-course of PR differed between cultivars: for all years and treatments, cv. Heliasol RM was affected by PR earlier, and to a greater extent, than cv. Melody (Figure V. 4).

A stepwise linear regression was calculated integrating NNI and ETa : ET₀ (Table V. 3) aimed at explaining PR values of cv. Heliasol after AI and NI (Eq. (4)).

$$\begin{aligned} \text{PR (AI + NI)} &= 27.8 + 118.3 \text{ NNI} - 102.1 (\text{ETa} : \text{ET}_0) \\ R^2 &= 0.787 \end{aligned} \tag{4}$$

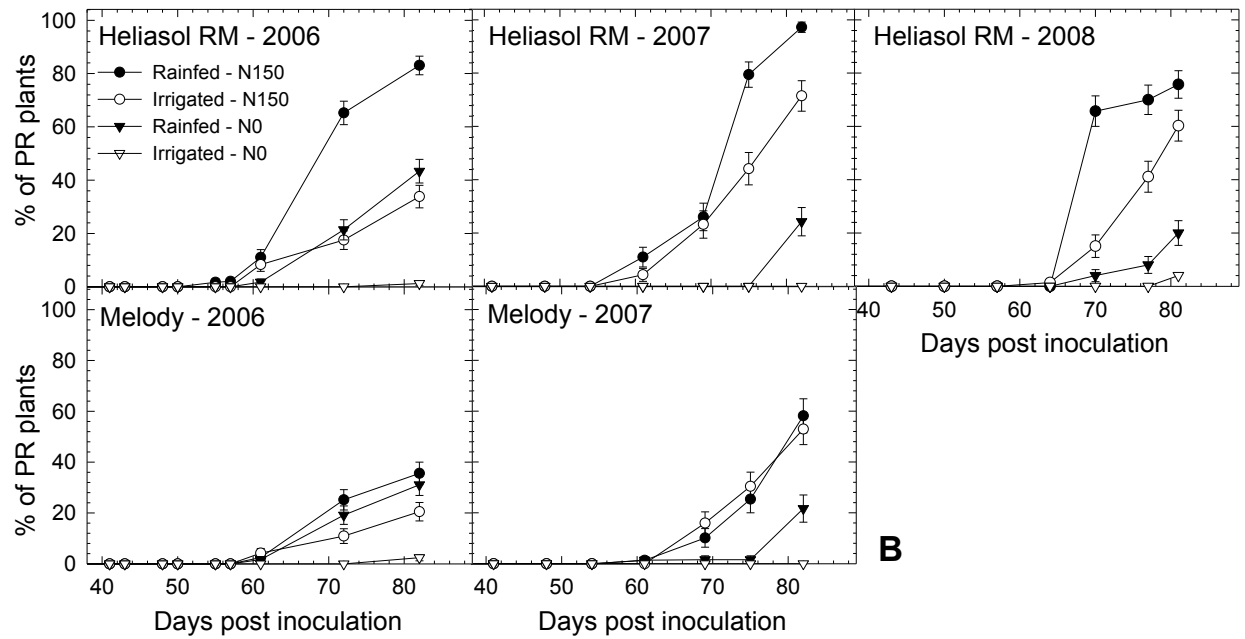
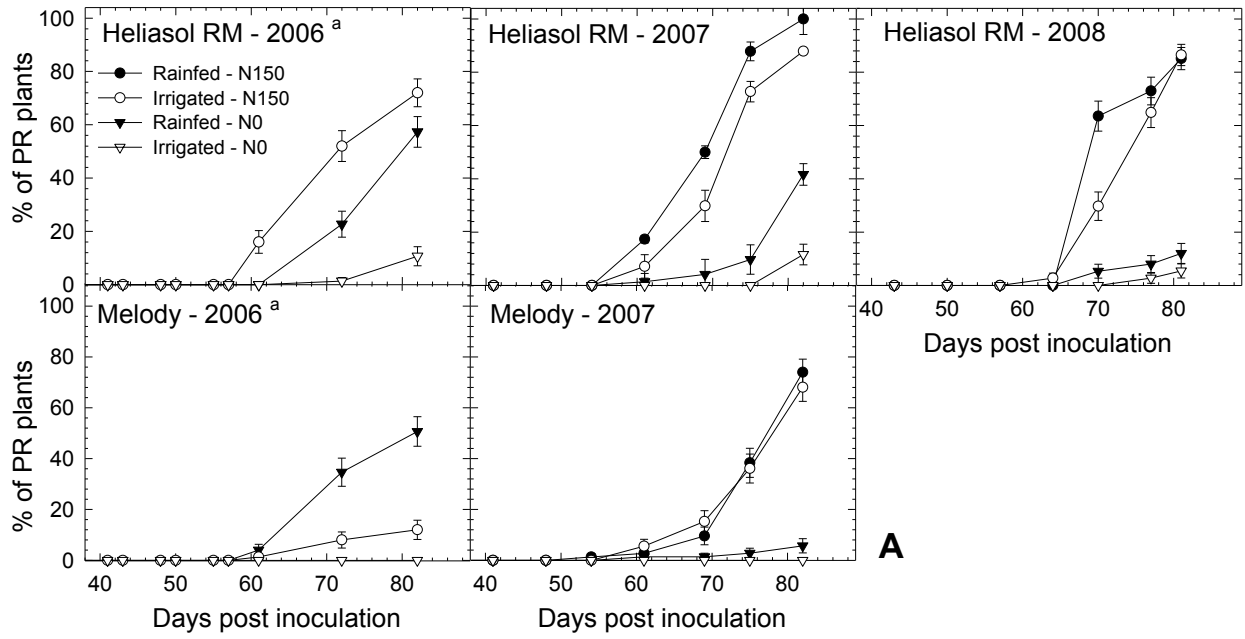
PR increased significantly with increased N (NNI) ($P < 0.05$) and decreased with increased water availability (ETa : ET₀)

The stepwise linear regression of PR for AI plots (Eq. (5)) explained more variance than that for NI plots (Eq. (6)).

$$\begin{aligned} \text{PR (AI)} &= 33.8 + 103.2 \text{ NNI} - 102.7 (\text{ETa} : \text{ET}_0) \\ R^2 &= 0.904 \end{aligned} \tag{5}$$

$$\begin{aligned} \text{PR (NI)} &= 61.5 + 104.6 \text{ NNI} - 138.4 (\text{ETa} : \text{ET}_0) \\ R^2 &= 0.809 \end{aligned} \tag{6}$$

However, nitrogen and water regime had a similar impact on PR in both AI and NI, so the difference may come from the fact that artificial inoculation permitted control infection date, pathogen strain and quantity of inoculum.



I. D. Discussion

This research was conducted to determine how agronomic factors such as nitrogen fertilization and the water regime can influence occurrence and the severity of sunflower premature ripening. Our results with artificial inoculation and natural infection indicated that high levels of nitrogen fertilization and absence of irrigation were the main factors increasing PR emergence for both susceptible and partially resistant cultivars.

Artificial inoculation on the surface of the stem base confirmed the involvement of *P. macdonaldii* in sunflower PR and gave reproducible disease symptoms. With natural infection, the timing of disease development and pathogen aggressiveness were not controlled. AUDPC and PR were higher with AI than NI for all cultivar and crop management conditions. Diversity between *P. macdonaldii* strains for aggressiveness (Abou Al Fadil, 2006) could partially explain differences between NI and AI for percent PR. However, differences with AI between years were observed which suggests that climatic conditions probably affected pathogen development and the resulting PR. Pathogen growth rate is largely dependent on temperature and relative humidity (RH), with optimum growth between 20 to 30 °C and RH above 80 % (Roustae et al., 2000b ; Weeraratne and Priyantha, 2003). Final percent of PR was the lowest in 2006 when high temperatures and low rainfall may have hindered the first stages of progression of *P. macdonaldii* in the stem base (data not shown) and thus slightly reduced PR. Conversely, high rainfall and RH in 2007 and 2008 may have been favourable for pathogen growth and PR. Observations carried out on a hundred farms in south-western France showed the same year effect on PR. In 2007, 85 % of farms were affected by PR, compared with 71 % and 67 % in 2006 and 2008 respectively (data not shown).

As reported in the literature, nitrogen is by far the commonest element affecting plant disease (Huber and Thompson, 2007). This study emphasized the negative effect of N fertilization on sunflower PR. A high level (N150) increased significantly the level of crop susceptibility giving high AUDPC and PR values. Conversely, poor host nutrition in the form of deficiency or unbalanced applications of N was less damaging for the crop in agreement with earlier reports on *Phoma* black stem (Gulya et al., 1997; Debaeke and Pérès, 2003). An increase of N supply has also been shown to enhance disease severity of foliar disease pathosystems and *Fusarium* head blight – wheat pathosystems leading to premature death of the spikelet (Lemmens et al., 2004). The microclimate resulting from dense canopies, induced

by high N fertilization, may have constituted a major climatic parameter in disease epidemiology and successful infection (Huber and Gillespie, 1992). An experiment carried out in 2008 aimed at investigating the role of microclimate on PR by testing three plant densities (4, 6 and 9 plants m⁻²). At all densities, 100% of the plants were infected by *P. macdonaldii* but the highest percent of PR plants was observed at the highest density (data not shown). Thus, microclimatic conditions within the canopy were probably not limiting for infection at the stem base in contrast to fungal infection of leaves such as with *Diaporthe helianthi* (Phomopsis stem canker). The severity of PR appears more likely to be determined by physiological and anatomical changes that could affect host susceptibility to the pathogen, such as alteration of cell wall constituents such as lignins, reduction of cell wall thickness and a decrease in phytotoxic phenolic compounds or their toxicity (Jensen and Munk, 1997). The susceptibility plants may thus vary without changing the facility with which they can be colonized by *P. macdonaldii*. Moreover, a high nitrogen supply could be trophic. This is a necrotrophic fungus which may have access to a wider range of N sources than biotrophic pathogens (Walters and Bingham, 2007).

Water stress occurring during the infection period induced significantly more PR than under irrigated conditions. This was observed in 2006 and 2007 where rainfed conditions were contrasted with irrigated management. High rainfall in 2008 resulted in an absence of significant differences between rainfed and irrigated treatments for both AUDPC and PR. This differs from an earlier report, based on field surveys, which indicated a lack of consistent relationships between water availability and PR (Pérès et al., 2000). A predisposition to disease is often observed in host plants during water shortage. Boyer (1995) proposed two mechanisms to explain how water stress increases susceptibility of plants to pathogens: (i) reduced photosynthate production induced by drought reduces defence mechanisms and/or (ii) a reduction plant but not pathogen growth would give more rapid disease spread and increased symptom severity in the host. Nardini and Salleo (2005) reported that water stress during active sunflower growth reduced plant size and that the diameter of the widest xylem vessels was narrowed by 20 % as an adaptation to the risk of occurrence of vascular embolisms (Mepsted et al., 1995b). However, under water stress, vascular wilt pathogens are involved in xylem vessel blockage (Beckman, 1964; Robb et al., 1981) leading to the death of the plant. *P. macdonaldii* hyphae were observed in the xylem of 10 day-old seedlings (Abou Al Fadil et al. 2009) and of PR plants of cv. Heliasol RM (data not shown). The same strong vessel-plugging capacity observed for *Fusarium oxysporum* and *Verticillium* species (Put and

Clerkx, 1988) could be involved in sunflower PR. Rainfed conditions may have reduced hydraulic conductance and PR may have occurred by vessel-clogging, and embolism of xylem elements. Thus, water stress may be an agronomic factor which increases rather than induces PR, contrary to nitrogen fertilization.

The study emphasized the individual effects of N fertilization and water regime on disease severity. However, integrating the two factors modified significantly AUDPC and PR expression in the field. A high nitrogen supply associated with post-anthesis water stress was most damaging for the crop, whereas no fertilization and full irrigation was less damaging especially for the partially resistant cultivar. Whatever the water regime, fertilized plots had more PR plants than unfertilized ones. Haefele et al. (2008) reported that high N fertilizer rates increased the drought risk in water-limited field situations as a result of greater biomass development and leaf area index, and the related high transpiration. This phenomenon, called “haying-off” in cereals (Taylor, 1965), was expressed by the ratio of actual to potential evapotranspiration ($ET_a : ET_0$). An excess of nitrogen results more rapidly in soil water exhaustion and transpiration drop so it is necessary to manage the canopy for an effective control of sunflower PR. Avoiding excessive N fertilization by a soil N budget method can significantly minimize disease severity. The Nitrogen Nutrition Index (NNI) can be used as an indicator of plant N status and of the related risk of PR. The correlation between the final PR estimate and NNI at flowering was significant when plotting all the crop management treatments. However, for a reliable evaluation of this indicator, additional experiments should be performed including more cultivars in multi-local experiments. In addition, N supply should be adapted to cultivar susceptibility: the N optimum for a susceptible cultivar should be lower than for a partially resistant one. Since genotypes with partial resistance to *P. macdonaldii* have been described (Abou Al Fadil et al., 2009), the choice of the cultivar should be taken into account to limit PR in the future. In this study, the susceptibility to the disease was tested only on two cultivars, but significant differences were confirmed between them. Cv. Heliasol RM, more susceptible to PR, always showed higher AUDPC and PR than cv. Melody, whatever the growing conditions and biotic pressure. Such differences provided evidence of the key role of host susceptibility in PR and its cropping management.

I. E. Conclusion

This study attempted to identify the most crucial agronomic elements of the sunflower premature ripening disease induced by *P. macdonaldii* in south-western France. The combination of high nitrogen fertilization and rainfed conditions resulted in high disease pressure every year. Additionally, differences in susceptibility of sunflower cultivars could be exploited more instead of developing fungicide protection. Cropping of resistant varieties in combination with appropriate nutrition and other cultural practices could reduce inoculum pressure and PR. Promising cultivars should therefore be screened at high N supplies and under water-limited conditions, a procedure which could be used in resistance tests during breeding programmes. It is now important to develop flexible fertilizer management advice for farmers, adjusted to the highly variable and diverse rainfed environments.

II. L'augmentation de la densité de peuplement peut-elle accélérer le dessèchement précoce du tournesol ?

II. A. Objectif de l'expérimentation

Les expérimentations menées au champ en 2006, 2007 et 2008 ont pu mettre en évidence un effet significatif de la conduite de culture sur le dessèchement précoce. Il en ressort qu'un fort apport en azote et un régime hydrique limitant après floraison conduisent à une proportion de pieds secs significativement supérieure à celle observée sur des parcelles irriguées et carencées en azote. Pour compléter notre appréhension de l'itinéraire technique, il était donc important d'évaluer l'effet de la densité de peuplement sur le dessèchement précoce ; facteur-clé de la conduite de culture pouvant constituer un levier de contrôle complémentaire dans le cadre d'une protection intégrée du tournesol. Deux expérimentations ont ainsi été conduites au champ à Auzeville en 2008 (CAuz08) et 2009 (CAuz09) sur la variété cv. Heliasol RM. Afin d'estimer l'effet de la densité de peuplement sur le dessèchement précoce, un suivi d'apparition des pieds secs sur des plantes contaminées artificiellement au collet par *P. macdonaldii* a été mis en place, pour diverses combinaisons factorielles de densité de peuplement, de fertilisation azotée, et régime hydrique.

Hypothèse : Des densités de peuplement élevées induisent une plus forte proportion de plantes atteintes de dessèchement précoce, et ce, d'autant plus que le régime hydrique est limitant après floraison et que l'alimentation azotée de la plante est pléthorique en période végétative.

II. B. Dispositif expérimental et conduite de culture

Les essais ont été réalisés à Auzeville en 2008 et 2009 (CAuz08 et SAuz09) ; la description détaillée du dispositif et des conduites de culture sont présentées au *Ch. II § III*. Trois facteurs agronomiques (irrigation, azote et peuplement) ont été croisés dans le cadre d'un split-plot avec pour parcelle principale le régime hydrique (irrigué ou non), la fertilisation azotée en sous-parcelle (0, 75, 150 kg N/ha en 2008 et 0, 50, 150 kg N/ha en 2009), et la densité de peuplement en dernier niveau (D1 : 4, D2 : 6.5, D3 : 9 plantes/m²). L'essai a été conduit avec la variété cv. Heliasol RM, et l'ensemble des modalités a été testé

sur 25 plantes contaminées artificiellement au collet par du mycélium de *P. macdonaldii* au stade bouton floral (E1/E2). Les essais ont été semés à double densité puis démariés pour obtenir les densités souhaitées. Le traitement « densité de peuplement » a été répété trois fois et disposé aléatoirement, au sein de chaque bande azotée.

II. B. 1. Variables mesurées et traitement statistique

II. B. 1. a. Evolution du dessèchement précoce après contamination artificielle

Un suivi des pieds secs a été réalisé sur l'ensemble des modalités « régime hydrique x azote x densité » après contamination artificielle au collet. Les premiers pieds secs ont été observés à 64 DPI en 2008 et à 44 DPI en 2009. Les plantes mortes au-delà de 81 DPI en 2008 et 77 DPI en 2009 n'ont plus été comptabilisées comme des « pieds secs ». Le suivi d'apparition des pieds secs a permis de calculer l'AUDPC_{PR}, qui intègre la proportion de pieds secs entre 64 et 81 DPI en 2008 et 42 et 77 DPI en 2009 (*Ch. II § IV. F*).

II. B. 1. b. Analyses statistiques

Les variables d'intérêt ont été analysées pour le traitement « densité » (effet aléatoire) en fonction des traitements « régime hydrique » et « azote » (effet fixe) par un modèle linéaire généralisé du logiciel Statgraphics Plus 5.1 (Rockville, MA, USA). Une transformation racine carrée a été appliquée à la variable AUDPC_{PR} et une transformation arc sinus au pourcentage final de pieds secs (Gomez and Gomez, 1984).

II. C. Résultats

II. C. 1. Effet de la densité de peuplement sur le dessèchement précoce en contamination artificielle par *P. macdonaldii*

L'AUDPC_{PR}, qui intègre la progression du dessèchement précoce pour chaque densité de peuplement, varie significativement ($P < 0.0002$) entre D1, D2, D3 pour les deux années d'expérimentation. Ceci est également vérifié pour la proportion finale de pieds secs observée à 81 DPI en 2008 et 77 DPI en 2009 qui diffère significativement ($P < 0.005$) entre les trois densités de peuplement testées (Tableau V. 5).

Tableau V. 5. Analyse de variance de l'effet de la densité de peuplement sur l'AUDPC_{PR} entre 64 et 81 DPI en 2008 et 42 et 77 DPI en 2009, et de la proportion finale de pieds secs à 81 et 77 DPI en 2008 et 2009 respectivement.

	AUDPC _{PR}			Pieds sec final (%)		
	df	F/t value	P > F	df	F/t value	P > F
Source de variation						
Densité de peuplement 2008	2	10,81	0,0002	2	5,90	0,0051
Densité de peuplement 2009	2	10,72	0,0001	2	9,79	0,0003

L'intensité du dessèchement précoce augmente de D1 vers D3. Les valeurs d'AUDPC_{PR} et du pourcentage final de pieds secs sont significativement plus élevées à des densités de peuplement ≥ 6.5 plantes/m² qu'aux faibles densités (4 plantes/m²), et ce indépendamment du « régime hydrique » ou du niveau de « fertilisation azotée » (Tableau V. 6).

Tableau V. 6. Moyenne d'AUDPC_{PR} et proportion finale de pieds secs pour chaque densité de peuplement depuis la contamination artificielle jusqu'à 81DPI en 2008 et 77 DPI en 2009.

	AUDPC _{PR}		Pieds sec final (%)	
	2008	2009	2008	2009
Densité de peuplement				
D1 (4 plantes/m ²)	1,70 b	5,76 b	33,56 b	50,44 b
D2 (6.5 plantes/m ²)	3,59 a	8,38 a	45,78 a	68,12 a
D3 (9 plantes/m ²)	3,68 a	8,55 a	45,61 a	71,53 a

La différence d'incidence du dessèchement précoce est particulièrement marquée lorsque l'on compare les couples de parcelles D1 et D3 pour un même régime hydrique et un même niveau de fertilisation azotée (Figure V. 5). Dans 83 % des cas en 2008 et 100 % des cas 2009, le pourcentage de pieds secs est supérieur pour la densité la plus élevée (D3).

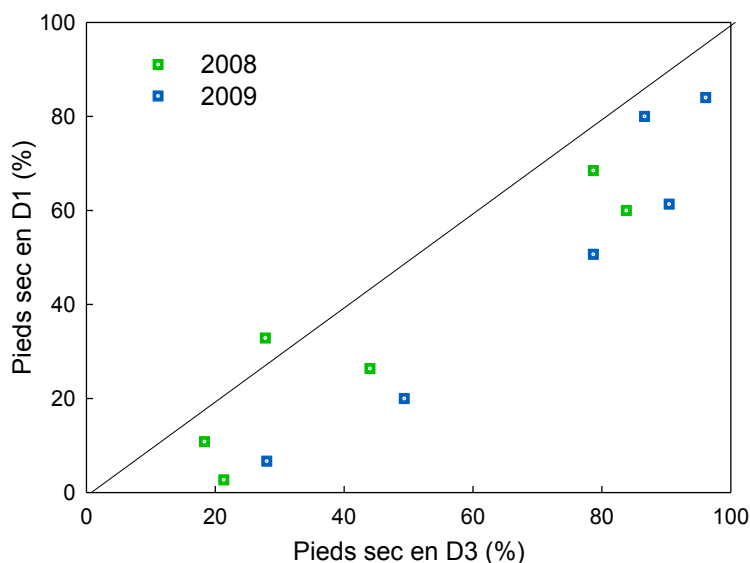


Figure V. 5. Relation entre la proportion de plantes desséchées précocement pour 12 couples de parcelles qui ne diffèrent que par la densité de peuplement : D1 (4) vs D3 (9 plantes/m²) en 2008 et 2009.

II. C. 2. Effet de la densité de peuplement sur la vitesse d'apparition du dessèchement précoce après contamination artificielle

Le suivi des plantes atteintes de dessèchement précoce, pour des traitements non limitants en intrants (irrigué, N150) et carencés (non irrigué, N0), et pour les 3 niveaux de peuplements D1, D2 et D3, est représenté sur la Figure V. 6. La comparaison de l'évolution des dégâts, en 2008 et 2009, met en évidence un effet de la densité de peuplement sur la vitesse d'apparition des pieds secs, plus précoce pour les densités de peuplement élevées (D2 et D3). En 2008, les premiers pieds secs en N150 sont observés dès 64 DPI en D2 et D3, contre 70 DPI en D1. En 2009, le même schéma a pu être observé, plus précocement, dès 44 DPI en D2 et D3 contre 56 DPI en D1 en N150. En l'absence d'azote, les premiers pieds secs sont observés plus tardivement qu'en N75/N50 et N150, aussi bien en D2 et D3 (70 DPI en 2008 et 57 DPI en 2009) qu'en D1 (77 et 70 DPI pour ces mêmes années). Cette précocité s'accompagne de proportions finales de pieds secs plus importantes en D2 et D3 qu'en D1. L'effet année est également un facteur qui influe sur la précocité de la maladie, la proportion de pieds secs ayant été significativement ($P < 0,0001$) plus importante en 2009 qu'en 2008.

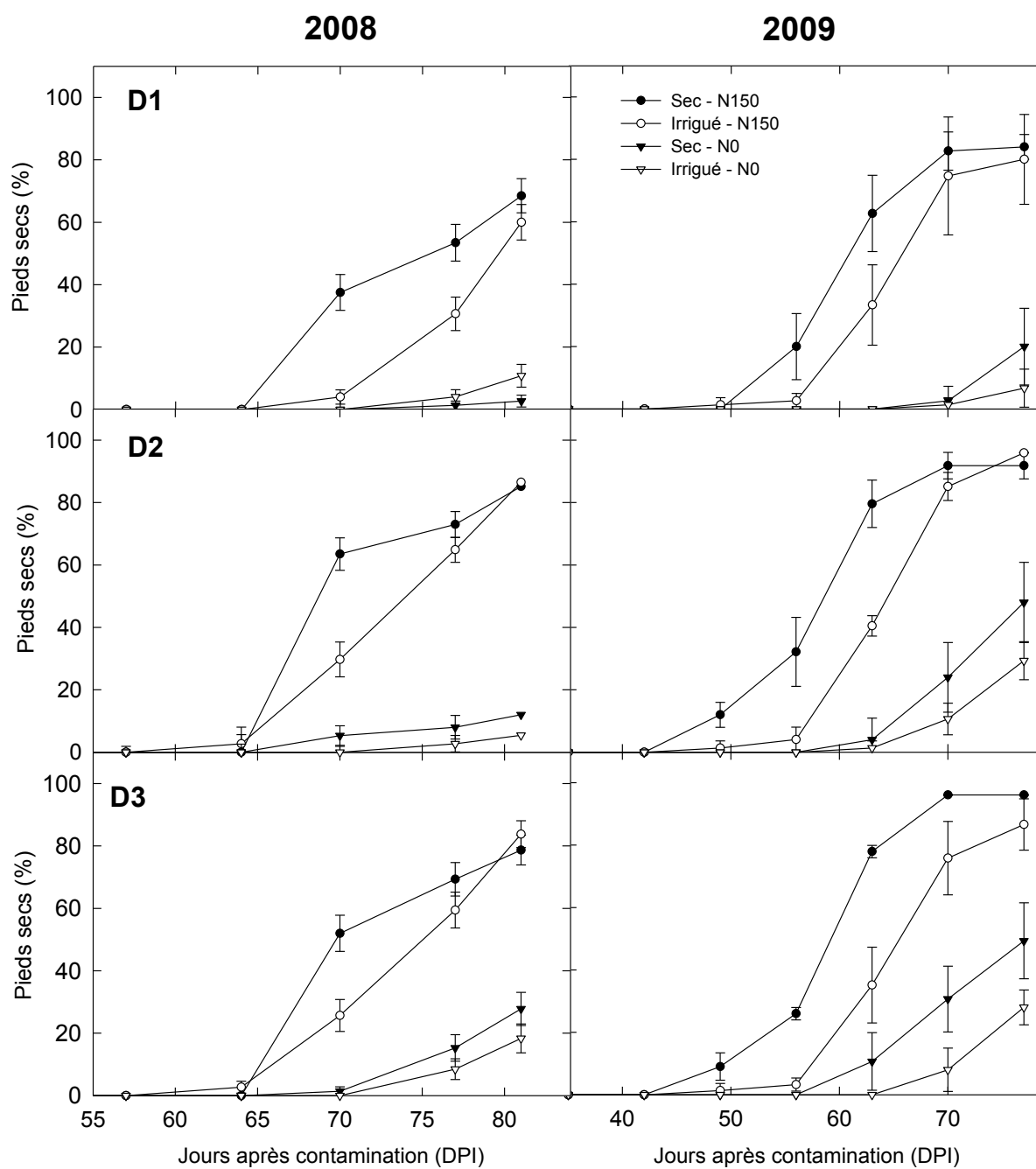


Figure V. 6. Evolution du pourcentage de pieds secs aux densités de peuplement D1, D2 et D3 (4, 6.5, 9 plantes/m²) pour des traitements non limitants en azote et en eau (N150, irrigué) ou carencés (N0, non irrigué) après contamination artificielle au collet par *P. macdonaldii* en 2008 et 2009.

II. D. Discussion

Des essais au champ avaient précédemment pu mettre en évidence un effet significatif de la fertilisation azotée et du régime hydrique (pour une densité D2) sur le syndrome de dessèchement précoce du tournesol après contamination artificielle au collet par *P. macdonaldii* (Seassau et al., 2010). Cependant, l'effet de la densité de peuplement sur l'expression de la maladie, essentiel de la conduite de culture, n'avait pas encore été démontré. Les essais menés sur deux années contrastées à Auzeville (2008 et 2009), comparant la proportion de pieds secs pour trois densités de peuplement (4, 6.5 et 9 plantes/m²) ont pu mettre en évidence un effet significatif ($P < 0.005$) de ce facteur. Les plantes issues de peuplements denses sont plus rapidement et plus fortement atteintes de dessèchement précoce qu'en faible peuplement. Cette sensibilité se traduit par une incidence de pieds secs et une valeur d'AUDPC_{PR} significativement ($P < 0.0002$) plus élevées en D2 et D3 qu'en D1. Le retard observé en D1, jamais compensé, conduit à une proportion finale de pieds secs significativement ($P < 0,005$) plus faible qu'en D3 : - 36 % et - 42 % en 2008 et 2009 respectivement, sans qu'une interaction avec le régime hydrique ou le statut azoté soit observée. Pour de forts niveaux de fertilisation azotée, où le risque dessèchement précoce est important, l'effet de la densité de peuplement est moins prononcé que pour des traitements non fertilisés. En effet, le pourcentage de pieds secs en « sec-N150-D1 » est inférieur de 10 (2008) et 12 points (2009) à celui mesuré en D3, alors qu'en « sec-N0-D1 », ce même pourcentage est inférieur de 19 et 29 points pour les deux années d'expérimentation.

Quelque soit la densité de peuplement, l'azote apparaît comme le principal facteur de la conduite de culture induisant le dessèchement précoce de la plante. Un peuplement élevé serait, au même titre qu'un régime hydrique limitant en post-floraison, un facteur accélérant de la proportion de pieds secs. La forte incidence de pied sec en N150-D3 pourrait résulter de conditions microclimatiques plus favorables qu'en situation carencée en azote ou conduites à faible densité. Des peuplements denses, bien alimentés en azote, développent un indice foliaire important, qui maintient une humidité relative supérieure dans le tiers inférieur du peuplement (Stanojevic, 1985). Ces conditions seraient dès lors propices à la réussite des contaminations et à la progression des pathogènes dans la plante (Huber et Gillespie, 1992), comme cela a pu être observé pour le Phomopsis du tournesol (Debaeke et al., 2000a). L'azote et la densité de tiges modifient également le phénotype de la plante en peuplement. A de fortes densités de semis, les tiges tendent à s'étioler (Sedghi et al., 2008). Dans nos

conditions, la compétition entre les plantes pour la lumière (Gubbels et Dedio, 1988) a modifié significativement ($P < 0,0001$) la hauteur moyenne du peuplement qui était de 135,6 et 129,5 cm en D3, et de 119,5 et 115,4 cm en D1, en 2008 et 2009 respectivement. Cette croissance apicale s'accompagné d'une réduction du diamètre au collet d'environ 6 mm. Les tissus des tiges à plus faible diamètre seraient plus rapidement colonisés par le champignon et donc plus sensibles au dessèchement précoce. Cette hypothèse pourrait expliquer le taux de pieds secs plus élevé en D3 qu'en D1.

Pour une même conduite de culture, la proportion de pieds secs a été contrastée entre les deux années, relatif aux conditions climatiques. L'importance des précipitations en 2008 n'a pas permis d'obtenir une conduite de culture très limitante en eau. A l'inverse, les conditions sèches de 2009, notamment pendant la phase de remplissage du grain, ont pu accélérer et amplifier le dessèchement précoce (Annexe 7). La densité de peuplement peut avoir modifier la disponibilité en eau des plantes. Aux fortes densités, les plantes sont soumises à une compétition supplémentaire pour cette ressource et la disponibilité en eau par plante est supposée inférieure à celle de plantes semées à plus faible densité, et ce malgré la réduction de la surface foliaire par plante. Le stress hydrique post-floraison serait ainsi plus prononcé en D3 qu'en D1, pouvant amplifier la proportion de pieds secs aux fortes densités de peuplement pour un régime hydrique « non irrigué », et ce d'autant plus que la disponibilité naturelle (pluie, réserve en eau du sol) est faible.

II. E. Conclusion

La conduite de culture influe significativement sur le dessèchement précoce du tournesol, que se soit par un apport élevé d'azote, un régime hydrique limitant en post-floraison ou une forte densité de peuplement. Un fort reliquat d'azote ou un déficit hydrique estival marqué jouent sur l'importance du syndrome. Si l'azote apparaît être le facteur causal déterminant de l'expression du dessèchement précoce, une densité de peuplement élevée et une contrainte hydrique post-floraison accélérerait l'expression du dessèchement. L'effet de la densité de peuplement est plus prononcé pour de faibles niveaux de fertilisation azotée. Compte tenu de ces observations, il apparaît important de prendre en considération ce facteur de la conduite. Le dessèchement précoce pourrait ainsi être favorisé, à de fortes densités de peuplement, par un microclimat, et une morphologie de bas de tige propices aux contaminations et à la progression du pathogène dans les tissus.

*Chapitre 6 - Proposition d'un modèle
conceptuel pour expliquer les effets de
l'azote et de la densité de peuplement sur
le dessèchement précoce*

Chapitre 6. Proposition d'un modèle conceptuel pour expliquer les effets de l'azote et de la densité de peuplement sur le dessèchement précoce

A la suite de quatre années d'expérimentation au champ, la conduite de culture du tournesol apparaît comme un levier d'action pour limiter la pression du dessèchement précoce au sein du peuplement. Plusieurs hypothèses ont pu être avancées pour expliquer les effets de la fertilisation azotée, du régime hydrique et de la densité de peuplement, seuls ou en interaction, sur la création de conditions favorables à l'infection et au développement du pathogène dans la plante. Les différents effets et les conséquences sur l'infection et la progression du pathogène dans la plante sont résumés sur la Figure VI. 1.

Parmi les différentes hypothèses avancées, toutes ne peuvent être testées, par manque de temps, ou car elles font appel à d'autres champs disciplinaires. Par ailleurs notre objectif n'est pas d'expliquer dans le détail les effets observés mais plutôt de conforter le réalisme des hypothèses avancées quant à l'effet des éléments de la conduite de culture, et ce, pour disposer d'une base solide en vue de la construction d'itinéraires techniques intégrés. Il a donc été choisi de tester les effets de la fertilisation azotée et de la densité de peuplement sur : (i) le microclimat sous le couvert végétal [azote et densité], (ii) la morphologie de bas de tige et plus particulièrement le diamètre au collet [azote et densité], et (iii) la progression du pathogène dans les tissus [azote]. Ces différents points sont représentés en rouge sur la Figure VI. 1 et seront traités en trois parties indépendantes.

Le dispositif expérimental mobilisé pour l'étude du microclimat (I) et de la morphologie de bas de tige (II), est identique à celui explicité au Chapitre V. II et s'appuie sur les essais mis en place au champ à Auzeville en 2008 (CAuz08) et 2009 (CAuz09). L'évaluation de l'importance du statut azoté de la plante sur la progression du pathogène (partie V. III) a été menée en serre à Auzeville en 2009 (SAuz09).

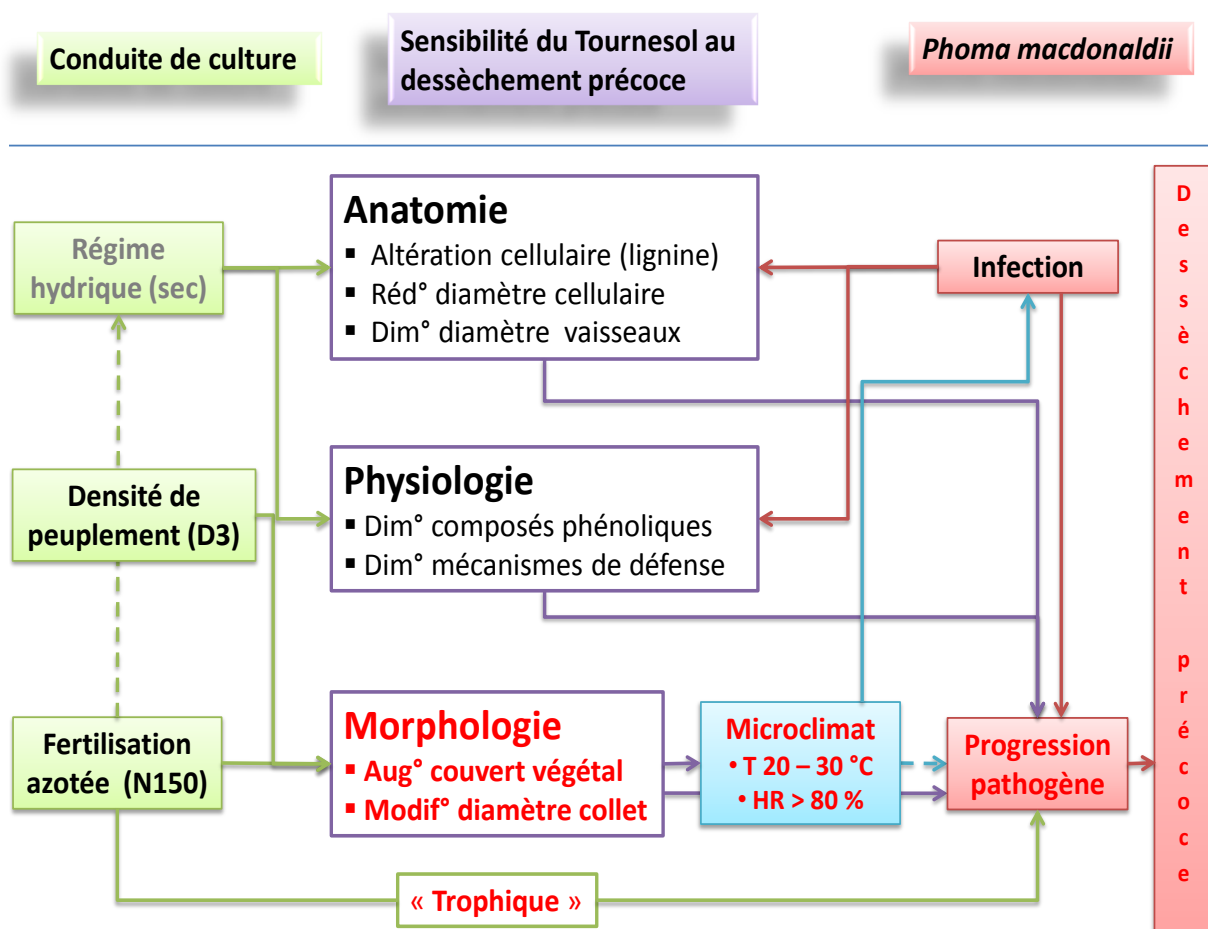


Figure VI. 1 : Modèle conceptuel présentant l'effet du régime hydrique, de l'azote, de la densité de peuplement et de l'infection par *P. macdonaldii* sur une variété sensible au dessèchement précoce. (T : température, HR : humidité relative)

I. Effet de la fertilisation azotée et de la densité de peuplement sur le microclimat dans un couvert de tournesol

I. A. Objectif de l'expérimentation

Des mesures de microclimat ont été réalisées pour caractériser l'environnement (température et humidité relative) à la base du couvert de tournesol pour des peuplements de 4 (D1) et 9 plantes /m² (D3), irriguées ou non, et ayant reçu des niveaux de fertilisation azotée contrastés (N0, N75, N150 en 2008 et N0, N50, N150 en 2009). Les variations de microclimat, relatives aux niveaux de fertilisation azotée, ont été mesurées en D3 ; celles relatives à la densité de peuplement (D1 et D3) ont été mesurées sur les parcelles du traitement intermédiaire en azote (N75/N50). Les peuplements ont été caractérisés par des mesures d'efficacité d'interception du rayonnement et de la teneur en azote des tissus. En parallèle, un suivi de l'infection a été réalisé après contamination artificielle ou naturelle au collet, ainsi qu'un suivi de la progression du pathogène au collet et de la proportion de pieds secs. L'objectif était ainsi d'étudier, pour des peuplements contrastés, l'effet de variations microclimatiques sous le couvert végétal et d'évaluer si les variations observées étaient de nature à expliquer les différences de dessèchement précoce observées pour ces mêmes peuplements.

Hypothèse 1 : Un peuplement dense et/ou bien alimenté en azote contribue à entretenir un microclimat favorable à l'infection et à la progression de *Phoma macdonaldii* dans la plante.

I. B. Variables mesurées

I. B. 1. Mesures microclimatiques

La température et l'humidité relative sous le couvert (à 40 cm du sol) ont été mesurées entre la contamination artificielle et 81 DPI en 2008 et 71 DPI en 2009 (*Ch. II § IV. A.*). Un thermohygromètre a été placé au sein de parcelles en irrigué et en sec pour les trois niveaux de fertilisation en D3 et pour les traitements azotés N0 et N75 en D1.

I. B. 2. Mesures SPAD

La teneur en chlorophylle des feuilles a été mesurée à l'aide d'un chlorophyll meter Minolta SPAD 502 le 21 juillet 2008 (21 DPI) au stade F3.2 et le 13 juillet 2009 (14 DPI) au stade E5/F3.2 (*Ch. II § IV. D. 3*). Les mesures ont été réalisées sur un sous-échantillon de 5 plantes des parcelles élémentaires soit 15 plantes au total (3 répétitions) pour chaque modalité « régime hydrique x azote x densité »

I. B. 3. Teneur en azote des plantes

Un échantillon de cinq plantes a été prélevé à la floraison au stade F3.2 sur chaque parcelle élémentaire en 2008 et 2009. La teneur en azote des parties aériennes (tige + feuilles + capitule) a été mesurée par la méthode Dumas (1831) (*Ch. II § IV. D. 1*). Les résultats sont donnés en % de la prise d'essai sèche.

I. B. 4. Mesure de l'efficacité d'interception

Les mesures d'efficacité d'interception du PAR ont été faites à l'aide d'un Picqhélios (*Ch. II § IV. C. 2*). Deux prises de mesure dynamique ont été réalisées au sein de deux inter-rangs centraux pour chaque parcelle élémentaire au stade F35⁺/F4 en 2008 et F1⁻/F4⁻ en 2009, (surface foliaire maximale).

I. B. 5. Suivi de l'infection au collet

Un suivi de l'infection après contaminations naturelle et artificielle par une pastille de mycélium de *Phoma macdonaldii* a été réalisé jusqu'à 81 DPI en 2008 et 77 DPI en 2009. En contamination naturelle, le suivi a été réalisé sur des parcelles soumises aux différents régimes hydriques et traitements « azote » pour une densité de peuplement D2 (6,5 plantes/m²). Le suivi de la progression des symptômes au collet en contamination artificielle a été réalisé pour l'ensemble des modalités. La proportion de plantes présentant une nécrose comprise entre les 3/4 et l'intégralité de la surface du collet (classe 2), considérée comme un indicateur étroitement corrélé au syndrome de dessèchement précoce, a permis de calculer une AUDPC_{DS} « disease severity » pour discriminer les différents traitements « azote » et « densité » en ce qui concerne la progression du pathogène (*Ch. II § IV. F*). L'AUDPC_{DS} intègre les notations réalisées depuis la contamination jusqu'à l'apparition des premiers pieds secs observés à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009.

I. B. 6. Traitement statistique

Les mesures de SPAD et de teneur en azote des tissus, réalisées fin floraison en 2008 et 2009, ne montrent pas de différences significatives entre les conduites « irriguées » et « non irriguées » en D3. Celles-ci ont donc été regroupées pour analyser l'effet de la fertilisation azotée quelque soit le « régime hydrique ».

I. C. Résultats

I. C. 1. Effet de l'azote sur le microclimat sous le couvert végétal

I. C. 1. a. Caractérisation du peuplement en fonction des différents niveaux de fertilisation

I. C. 1. a. i. Teneur en azote des plantes

La teneur en chlorophylle des tissus foliaires (SPAD) varie significativement en 2008 ($P = 0,0343$) et en 2009 ($P = 0,0057$) en fonction de la fertilisation apportée. Les plantes fertilisées en N150 ont une valeur de SPAD supérieure à celle mesurée en N75/N50 et en N0 (Tableau VI. 1). Si le traitement N75 se classe comme un traitement azoté intermédiaire entre N0 et N150 en 2008, N50 n'est pas significativement différent de N0 en 2009. La teneur en azote des tissus (%) varie significativement ($P = 0,0035$) pour les trois niveaux de fertilisation azotée en 2008, et entre N0/N50 et N150 en 2009 ($P = 0,0023$). Plus la fertilisation azotée est importante, plus la concentration en azote des tissus est importante. La réponse de la fumure azotée est marquée par de faibles reliquats azotés (précédent sorgho).

Tableau VI. 1. Teneur en chlorophylle des tissus foliaires (unités SPAD) et teneur en azote des parties aériennes (%) réalisées à la floraison à 21 DPI en 2008 et 14 DPI en 2009 pour caractériser les différents niveaux de fertilisation.

	Valeurs SPAD (s.u)		Teneur en azote (%)	
	2008	2009	2008	2009
Fertilisation azotée				
N0	30,05 b	30,60 b	1,02 c	1,31 b
N75 (2008) ou N50 (2009)	33,51 ab	30,76 b	1,36 b	1,32 b
N150	36,67 a	34,38 a	2,06 a	1,92 a

I. C. 1. a. ii. *Efficienc e d'interception du rayonnement par le couvert de tournesol*

Les mesures de Picqhélios réalisées sur les parcelles fertilisées en N0, N75/N50 et N150 montrent que la fertilisation azotée a eu un effet significatif ($P < 0,0001$) sur le développement du couvert. L'efficienc e d'interception en N150 et N75/N50 en 2008 et 2009 est très supérieure à celle mesurée en l'absence d'azote (Tableau VI. 2). Si la différence entre N75/N50 n'est pas significativement supérieure à celle mesurée en N150, les différents niveaux de fertilisation azotée ont permis cependant d'obtenir une gamme de trois couverts contrastés.

Tableau VI. 2. Mesures de l'efficienc e d'interception du PAR réalisées au stade F35⁺/F4 en 2008 et F1⁻/F4⁻ en 2009 sur les parcelles fertilisées en N0, N75/N50 et N150.

	Efficienc e d'interception (%)	
	2008	2009
Fertilisation azotée		
N0	81,0 b	82,3 b
N75 (2008) ou N50 (2009)	87,2 a	93,0 a
N150	88,5 a	96,1 a

I. C. 1. b. *Caractérisation du microclimat en fonction des différents niveaux de fertilisation*

Pour étudier l'effet de la fertilisation azotée sur le microclimat, les variations de température et d'humidité relative ont été mesurées sous les différents couverts N0, N75/N50 et N150 jusqu'à l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI et 42 DPI en 2008 et 2009 pour une densité de peuplement de 9 plantes/m². Les variations de température et d'humidité relative sous le couvert varient légèrement entre les différents niveaux de fertilisation. L'humidité relative est la variable microclimatique la plus sensible ; les valeurs étant supérieures en N150 par rapport aux plus faibles disponibilités en azote pour les deux années d'expérimentation (Tableau VI.3).

Tableau VI. 3. Moyennes des températures et humidités relatives journalières sous le couvert de tournesol pour trois niveaux de fertilisation azotée entre la contamination artificielle et l'apparition des premiers secs à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009.

	Température (°C)		Humidité relative (%)	
	2008	2009	2008	2009
Fertilisation azotée				
N0	19,60 a	21,62 ab	77,96 b	73,69 b
N75 (2008) – N50 (2009)	19,76 a	20,95 b	79,22 ab	75,08 ab
N150	19,78 a	21,67 a	79,56 a	76,16 a

Cependant, l'analyse de variance ne montre pas d'effet significatif de l'azote sur le microclimat (à $P < 0,05$) pour la période considérée en 2008 et 2009 (Tableau VI. 4.).

Tableau VI. 4. Analyse de variance de l'effet de la fertilisation azotée (N0, N75/N50, N150) sur la température et l'humidité relative moyenne journalière entre la contamination artificielle au collet et l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009.

Source de variation	Température (°C)			Humidité relative (%)		
	df	F/t value	P > F	df	F/t value	P > F
Fertilisation azotée en 2008	2	0,23	0,7974	2	2,40	0,0923
Fertilisation azotée en 2009	2	2,53	0,0818	2	2,57	0,0786

S'il n'existe pas de variations intra-annuelles du microclimat, la variation inter-annuelle entre 2008 et 2009 montre des différences significatives de température ($P < 0,0001$) et d'humidité relative ($P < 0,0368$) sous le couvert végétal. Cette différence s'explique par un nombre de jours plus important où la température était supérieure à 25 °C en 2009 et l'humidité relative supérieur à 80 % en 2008 (Tableau VI. 5).

Tableau VI. 5. Nombre de jours où la température moyenne journalière est supérieure à 25 °C et l'humidité relative moyenne journalière supérieure à 80 % pour les différents niveaux de fertilisation azotée en D3 en juillet et août 2008 et 2009.

Régime hydrique	Températures supérieures à 25 °C (jours)		Humidité relative supérieures à 80 % (jours)	
	2008	2009	2008	2009
N0				
Juillet	0	1	9	7
Aout	1	8	9	3
N75 (2008) – N50 (2009)				
Juillet	1	1	12	8
Aout	1	9	12	3
N150				
Juillet	0	1	15	9
Aout	0	8	11	4

I. C. 1. c. *Progression des nécroses au collet et proportion finale de pieds secs*

La proportion de plantes contaminées artificiellement et naturellement est sensiblement différente jusqu'à 40 DPI (Figure VI. 2). Après contamination artificielle, 100 % des plantes présentaient des nécroses dès 30 DPI au cours des deux années d'expérimentation. A l'inverse, la proportion de plantes infectées suite à une contamination naturelle, plus précoce en 2008 qu'en 2009, était très faible jusqu'à 40 DPI. En 2008, 100 % des plantes présentaient une nécrose au collet en condition naturelle dès 50 DPI, contre 63 DPI en 2009. Si la proportion de plantes infectées varie sensiblement entre la méthode de contamination, une fois la plante infectée, la progression des nécroses autour du collet (AUDPC_{DS}) ne varie pas en fonction de la fertilisation azotée pour une densité de peuplement de 9 plantes/m² en 2008 et 2009 (Tableau VI. 6). A l'inverse, la fertilisation azotée favorise significativement ($P < 0,0001$) l'expression des pieds secs.

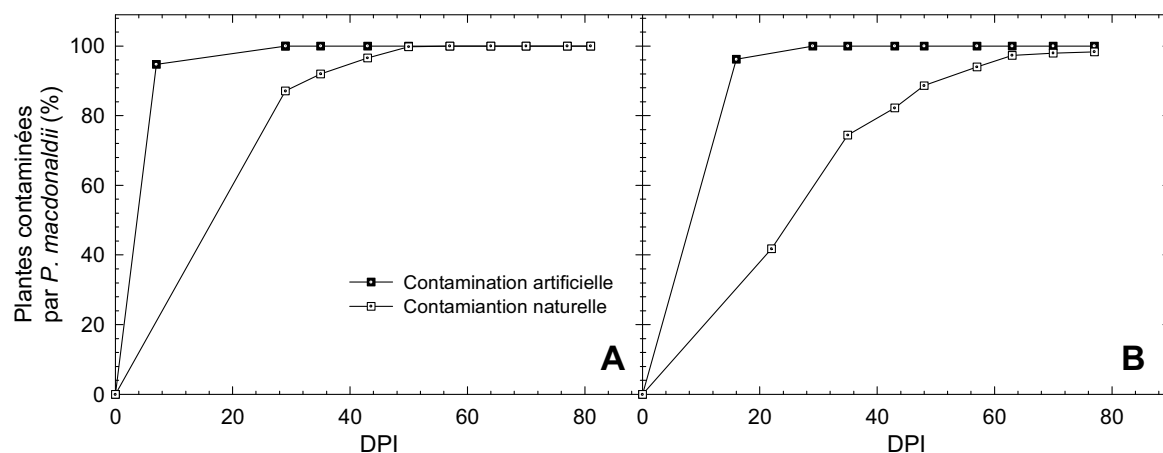


Figure VI. 2. Evolution du pourcentage de plantes infectées après contamination artificielle et naturelle par *P. macdonaldii* pour la densité de peuplement D2 (6,5 plantes/m²) quelque soit la fertilisations azotées (N0, N75/50, N150) et le régime hydrique (irrigué, non irrigué) en 2008 (A) et 2009 (B).

Tableau VI. 6. Analyse de variance de l'effet de la fertilisation azotée en D3 sur l'AUDPC_{DS} de la contamination artificielle à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009, et de la proportion finale de pieds secs à 81 DPI en 2008 et 77 DPI en 2009.

Source de variation	AUDPC _{DS}			Pieds secs (%)		
	df	F/t value	P > F	df	F/t value	P > F
Fertilisation azotée 2008	2	1,35	0,2694	2	130,21	< 0,0001
Fertilisation azotée 2009	2	1,02	0,3853	2	69,38	< 0,0001

I. C. 2. Effet de la densité de peuplement sur le microclimat sous le couvert de tournesol

I. C. 2. a. Teneur en azote des plantes

La teneur en chlorophylle des limbes, ainsi que la teneur en azote de la plante ne diffèrent pas significativement entre les densités de peuplement D1 et D3, en 2008 et 2009 (Tableau VI. 7).

Tableau VI. 7. Teneur en chlorophylle des limbes (unités SPAD) et teneur en azote des tissus (%) à la floraison (21 DPI en 2008 et 14 DPI en 2009) pour caractériser les densités de peuplement D1 et D3 en N75/N50.

	SPAD		Teneur en azote des plantes	
	2008	2009	2008	2009
Fertilisation azotée				
D1 (4 plantes/m ²)	37,30	36,17	1,69	1,52
D3 (9 plantes/m ²)	36,67	34,38	1,48	1,44
F/t value	0,40	26,16	0,43	0,20
P > F	0,6392	0,1229	0,6304	0,8220

I. C. 2. b. *Caractérisation de l'efficacité d'interception du rayonnement en fonction de la densité de peuplement*

Les mesures de Picqhélios réalisées sur les parcelles D1 et D3 soumises à un régime hydrique contrasté (irrigué vs non irrigué) et à trois niveaux de fertilisation (N0, N75/N50 et N150) mettent en évidence un effet significatif ($P < 0,0001$) de la densité de peuplement sur l'efficacité d'interception du rayonnement par le couvert de tournesol. Celle-ci est maximale aux plus fortes densités (9 plantes/m²) (Tableau VI. 8). En 2008, les mesures tardives (fin floraison) pourraient se traduire par un début de sénescence du feuillage basal et expliquer des valeurs inférieures à celles de 2009.

Tableau VI. 8. Mesures de l'efficacité d'interception par le couvert de tournesol réalisées au stade F35⁺/F4 en 2008 et F1⁻/F4⁻ en 2009 pour deux densités de peuplement contrastées (4 et 9 plantes/m²).

	Efficacité d'interception du PAR (%)	
	2008	2009
Densité de peuplement		
D1 (4 plantes/m ²)	82,4 b	87,8 b
D3 (9 plantes/m ²)	85,2 a	92,9 a

I. C. 2. c. Caractérisation du microclimat sous le couvert de tournesol pour des densités de peuplement contrastées

Les mesures de température et d'humidité relative sous le couvert sont représentées sur la Figure VI. 3 de la contamination artificielle jusqu'à l'apparition des premiers pieds secs pour les densités de peuplement D1 et D3 en 2008 et 2009.

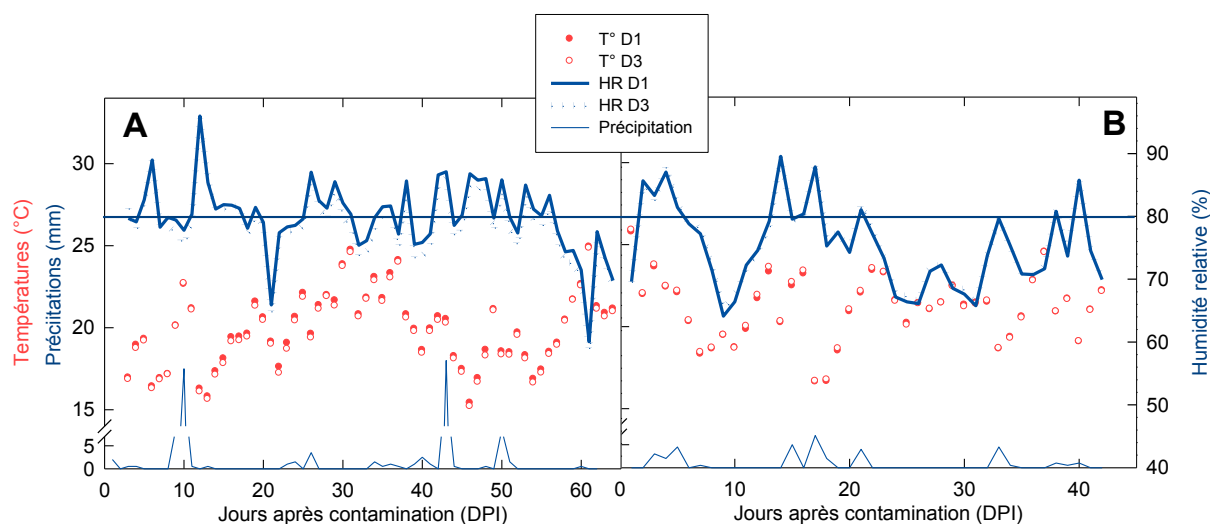


Figure VI. 3. Evolution de la température, de l'humidité relative moyenne journalière sous le couvert et des précipitations entre la contamination et l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI en 2008 (A) et 42 DPI en 2009 (B) en D1 (4 plantes/m²) et D3 (9 plantes/m²).

La variabilité des mesures de microclimat au sein d'une même année est très faible entre les densités de peuplement D1 et D3. En 2008, les températures mesurées sous le couvert pour les deux densités sont légèrement supérieures en D1 qu'en D3, mais ne sont pas significatives pour les deux années d'expérimentation (Tableau VI. 9). A l'inverse, les mesures d'humidité relative réalisées en 2008 sont significativement ($P = 0,0031$) supérieures en D1 par rapport à D3 ; cette différence n'est pas observée en 2009. Il existe cependant une variabilité interannuelle. L'année 2009, plus sèche que 2008, se caractérise par un nombre de jours plus important où la température était supérieure à 25 °C (Tableau VI. 10). En 2008, le nombre de jours où l'humidité relative était supérieure à 80 % était sensiblement plus important en D1 qu'en D3. Cette différence est nettement plus prononcée qu'en 2009.

Tableau VI. 9. Température et humidité relative moyennes sous le couvert pour des densités de peuplement contrastées à 4 et 9 plantes/m² entre la contamination artificielle et l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009.

	Température (°C)		Humidité relative (%)	
	2008	2009	2008	2009
Fertilisation azotée				
D1 (4 plantes/m ²)	19.88 a	21.41 a	80,15 a	74.78 a
D3 (9 plantes/m ²)	19.72 a	21.35 a	78.91 b	74.98 a

Tableau VI. 10, Nombre de jours où la température moyenne journalière est supérieure à 25°C et l'humidité relative moyenne journalière supérieure à 80 % pour les densités de semis de 4 (D1) et 9 (D3) plantes/m² en juillet et en août 2008 et 2009.

Régime hydrique	Températures supérieures à 25 °C (jours)		Humidité relative supérieures à 80 % (jours)	
	2008	2009	2008	2009
D1				
Juillet	0	0	16	8
Aout	0	8	15	3
D3				
Juillet	0	1	13	8
Aout	0	8	11	3

I. C. 2. d. *Progression des nécroses au collet et proportion de pieds secs*

Les valeurs d'AUDPC_{DS} ne sont pas significativement différentes pour des densités de peuplement très contrastées (D1 et D3) (Tableau VI. 11). Seul le pourcentage de pieds secs est significativement ($P < 0,0005$) différent pour le facteur densité en 2008 et 2009. Une densité de peuplement plus élevée conduit à une plus grande proportion de pieds secs.

Tableau VI. 11. Analyse de variance de l'effet de la densité de peuplement en N75/N50 sur l'AUDPC (nécrose encerclante) de la contamination artificielle aux premiers pieds secs, et proportion finale de pieds secs à 81 DPI en 2008 et 77 DPI en 2009.

Source de variation	AUDPC _{DS}			Pieds secs (%)		
	df	F/t value	P > F	df	F/t value	P > F
Densité de peuplement 2008	1	1,67	0,2237	1	39,01	< 0,0001
Densité de peuplement 2009	1	1,06	0,3272	1	15,54	0,0004

I. D. Discussion

La température et l'humidité relative ont été mesurées afin d'évaluer si la progression du pathogène et le dessèchement précoce du tournesol pouvaient être modifiés par le microclimat sous le couvert, pour des fertilisations azotées et des densités contrastées. Les mesures de la teneur en chlorophylle des limbes et de la teneur en azote des tissus montrent une différenciation significative ($P < 0,005$) du statut nutritionnel pour les trois niveaux de fertilisation. Les plantes en N150, mieux alimentées qu'en N75 et N0, ont développé une surface foliaire plus importante, et cela a pu être approché par des mesures d'efficacité d'interception du rayonnement supérieures en N150 et N75/50 par rapport aux situations carencées (N0). Cependant, la comparaison des mesures microclimatiques entre les différents niveaux de fertilisation azotée n'a pas montré de différences significatives de la température et de l'humidité relative moyenne sous le couvert contrairement à d'autres études comparant des traitements extrêmes (Debaeke et al., 2000b). Les mêmes conclusions ont été tirées pour les variations de microclimat relatives aux densités de peuplement contrastées. En dépit d'une efficacité d'interception du rayonnement ($P < 0,0001$) significativement supérieure en D3 (pour le même niveau d'azote qu'en D1), la température sous le couvert n'a pas été modifiée par la densité de peuplement, contrairement à ce qui pu être observé par Stanojevic (1985). Seule l'humidité relative en 2008 était significativement ($P = 0,0031$) supérieure sous un couvert végétal plus dense. Cependant, cela ne semble pas directement corrélé à un taux de pieds secs plus important. Si les conditions étaient apparemment plus favorables à la progression du pathogène dans la plante et par conséquent au dessèchement précoce, la proportion de pieds secs en N75-D3 était de 36 % en 2008, contre 85 % en 2009. Le microclimat sous le couvert végétal, ne semble donc pas, dans le cas présent, avoir favorisé l'expression de la maladie.

Le microclimat pourrait avoir un effet beaucoup plus important pour la réussite de l'infection dans les premiers jours suivant une contamination artificielle et pour les infections en conditions naturelles. Cependant, son influence sur la progression du pathogène dans les tissus de la plante semble peu déterminante. Un couvert végétal très développé, favorisant une humidité relative constante, peut favoriser la production d'inoculum, le transfert de spores et l'infection de pathogènes par comparaison à un couvert épars (Walters et Bingham, 2007). L'effet de l'azote et de la densité de peuplement sur le développement de la surface foliaire et l'établissement de conditions favorables aux pathogènes a été majoritairement évoqué pour

les pathogènes aériens des céréales comme l'oïdium, les septorioses (Olesen et al., 2003), les rouilles et la fusariose des épis (Lemmens et al., 2004). Dans le cas présent, l'humidité relative supérieure en D3 en 2008 a pu être à l'origine d'une infection naturelle plus précoce. A l'inverse, les températures plus élevées en 2009 peuvent avoir limité les infections naturelles (Annexe 7). La réussite des infections semble plus dépendante des conditions climatiques que microclimatiques, le couvert jouant un rôle de tampon. Cependant, une conduite de culture en N150-D3, qui conduit à un peuplement dense, à forte surface foliaire, permettrait de maintenir plus longtemps un microclimat propice aux infections. Dans le cadre de peuplements végétaux très épars, comparables à des plantes isolées, où les conditions microclimatiques sont peu favorables à l'infection, la proportion de plantes infectées naturellement est très faible. Cela a pu être mis en évidence sur des essais conduits par le Cetiom à Surgères (17) en 2006 (année sèche) où 60 % d'attaques au collet ont été observées après contamination artificielle par du mycélium de *P. macdonaldii*. Dans ces essais, en contamination naturelle, 7 % des plantes non irriguées et 20 % des plantes irriguées présentaient une attaque de *P. macdonaldii* au stade M0/M1. Au stade M1.2, seules 3 % des plantes présentaient une nécrose encerclante au collet (classe 2) quelque soit le régime hydrique. Les attaques naturelles de bas de tige par *P. macdonaldii* semblent donc dépendantes des conditions thermiques (conditions favorables : 20 à 25 °C) et hygrométriques (HR favorable supérieure à 80 %), mais moins dépendantes des conditions microclimatiques que les attaques de Phoma à l'insertion du pétiole sur la tige (Weeraratne et Priyantha. 2003) ou de Phomopsis sur limbe (Debaeke et al., 2000a). Les variations de microclimat au sein du couvert pourraient être plus critiques pour les attaques sur feuilles qu'au niveau du bas de tige ; l'humidité du sol au voisinage du collet assurant en général des conditions plus stables pour l'infection. Ceci pourrait expliquer la forte incidence des attaques au collet en conditions naturelles dans les régions où l'inoculum est abondant.

I. E. Conclusion

Les mesures de température et d'humidité relative dans le bas du couvert de tournesol pour différentes conduites de culture n'ont pas permis de mettre en évidence des variations microclimatiques suffisamment larges pour expliquer les proportions de pieds secs très contrastées au sein des traitements « azote » et « densité de peuplement ». La progression du pathogène dans les tissus ainsi que le dessèchement précoce qui en résulte, ne semblent donc

pas étroitement corrélés aux conditions microclimatiques régnant dans le couvert. Cependant, des conditions climatiques plutôt humides, associées à une couverture suffisante du sol, sont nécessaires à l'infection généralisée des collets en conditions naturelles. Le microclimat pourrait ainsi avoir un effet en amont sur l'infection, et non en aval sur la progression du pathogène et le dessèchement précoce. Par ailleurs, concernant la contrainte hydrique, on peut considérer qu'une sécheresse précoce (manque de précipitations, faible croissance du couvert, carence azotée, microclimat peu favorable) est de nature à limiter l'infection par *Phoma macdonaldii*, davantage au niveau des feuilles que du collet (Debaeke et Pérès, 2003). Une contrainte qui se manifeste après floraison précipite le dessèchement des plantes infectées par *P. macdonaldii*.

II. Effet de l'azote et de la densité de peuplement sur la morphologie de la tige au collet

II. A. Objectif de l'expérimentation

Des mesures du diamètre de bas de tige ont été réalisées sur des plantes contaminées artificiellement au collet par *P. macdonaldii* en fin de floraison afin de mettre en évidence un effet de l'azote et de la densité de peuplement sur la morphologie du bas de tige pouvant sensibiliser la plante au dessèchement précoce. Ces deux effets de la conduite ont été traités indépendamment. Les variations de diamètre du collet, relatives aux niveaux de fertilisation azotée (N0, N75/N50 et N150), ont été mesurées pour les trois densités de peuplement (D1, D2, D3) au champ en 2008 (CAuz08) et 2009 (CAuz09). L'objectif était ainsi d'étudier les répercussions d'une variation d'une épaisseur de la tige sur la progression du pathogène et le dessèchement précoce du tournesol (incidence, date d'apparition).

Hypothèse1 : Un apport non limitant en azote et/ou une faible densité de peuplement augmentent le diamètre de la tige freinant ainsi l'apparition du dessèchement précoce.

II. B. Variables mesurées et traitement statistique

II. B. 1. Mesure du diamètre au collet de la plante

Le diamètre de la tige au collet a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse digital électronique 150 mm Stainless sur un échantillon de 10 plantes pour chaque répétition des 18 modalités « régime hydrique x azote x densité ». Les mesures ont été réalisées au stade F35/F4⁺ le 25 juillet 2008 (25 DPI) et au stade F4/M0 le 22 juillet 2009 (22 DPI), considérant que le diamètre n'évolue plus lorsque la hauteur maximale de la plante est atteinte.

II. B. 2. Suivi d'apparition des symptômes

L'AUDPC_{DS} a été calculée pour les différents traitements « azote » et « densité » en 2008 et 2009 depuis la contamination artificielle jusqu'à l'apparition des premiers pieds secs observés à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009 (*Ch. II § IV. F*). La proportion finale de pieds secs a été calculée à 81 DPI en 2008 et 77 DPI en 2009.

II. B. 3. Traitement statistique

Les variables d'intérêt ont été analysées par un modèle linéaire généralisé. Les différences significatives entre traitements, pour les différentes variables d'intérêt, ont été comparées par le test de Fisher ($LSD_{0,05}$). Une transformation racine carrée a été appliquée à la variable diamètre au collet. L'effet du « régime hydrique » n'étant pas significatif sur cette variable, les mesures de diamètre des conduites « irriguée » et « non irriguée » ont été regroupées pour analyser uniquement l'effet de la fertilisation azotée et de la densité de peuplement sur la morphologie du bas de tige.

II. C. Résultats

II. C. 1. Effet de l'azote sur la morphologie de la tige au collet, et conséquences sur la progression du pathogène et le dessèchement précoce

II. C. 1. a. Variation du diamètre au collet sous l'effet de l'azote

L'azote modifie sensiblement la morphologie de bas de tige du tournesol. Ceci a pu être mis en évidence en 2008 et 2009 pour des doses d'azote \geq à 50-75 kg N/ha. Le diamètre au collet augmente significativement ($P < 0,0001$) avec la disponibilité en azote pour la plante (Tableau VI. 12). Cette relation entre l'azote et le diamètre est exacerbée aux faibles densités de peuplement. En 2008, le diamètre au collet est significativement ($P < 0,0001$) supérieur à celui mesuré en 2009.

Tableau VI. 12. Moyennes du diamètre (mm) au collet en fonction de la fertilisation azotée (N0, N75/N50 et N150) et de la densité de peuplement (D1, D2 et D3), mesurées au stade F35-F4⁺ (27 DPI) en 2008 et F4-M0 (22 DPI) en 2009.

	Diamètre au collet (mm)					
	2008			2009		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
Fertilisation azotée						
N0	23,29 c	20,30 b	18,10 b	19,36 c	17,58 b	15,67 b
N75 (2008) – N50 (2009)	25,02 b	21,99 a	19,65 a	21,60 b	17,85 b	16,97 a
N150	26,18 a	22,24 a	20,22 a	22,46 a	18,82 a	17,66 a
F/t value	15,86	10,49	12,5	15,15	5,50	29,82
P > F	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0048	< 0,0001

II. C. 1. b. *Effet de l'azote sur la progression des nécroses encerclantes au collet après contamination artificielle par P. macdonaldii.*

Les moyennes d'AUDPC_{DS} ne varient pas significativement entre les différents niveaux de fertilisation, quelque soit la densité de peuplement (Tableau VI. 13). L'AUDPC_{DS}, plus importante en 2008 qu'en 2009, s'explique par un suivi plus long de la progression du pathogène autour du collet, les premiers pieds secs étant observés 22 jours plus tard en 2008 qu'en 2009.

Tableau VI. 13. Moyennes d'AUDPC_{DS} pour chaque niveau de fertilisation azotée en fonction de la densité de peuplement entre la contamination artificielle et l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009

	AUDPC _{DS}					
	2008			2009		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
Fertilisation azotée						
N0	45,17	44,30	45,52	14,92	15,95	15,65
N75/N50	45,65	44,67	43,98	12,74	13,46	15,42
N150	44,32	45,77	44,00	12,96	15,80	12,67
F/t value	0,66	1,53	1,44	0,54	1,50	1,02
P > F	0,5308	0,2508	0,2694	0,5954	0,2572	0,3853

II. C. 1. c. *Relation entre diamètre au collet et dessèchement précoce*

Les valeurs de diamètre au collet et de la proportion finale de pieds secs sont relativement bien corrélées ($r^2 = 0,708$) en 2008 et ($r^2 = 0,804$) en 2009 (Figure VI. 4.). Un diamètre de bas de tige plus important en N150 et N50 se traduit par un taux de pieds secs plus important. Cependant cette observation ne se vérifie qu'au sein d'une même année expérimentale et ne peut être généralisée. Pour un diamètre au collet entre 17 et 18 mm, la proportion de pieds secs peut passer de 21 % en 2009 à 90 % en 2008.

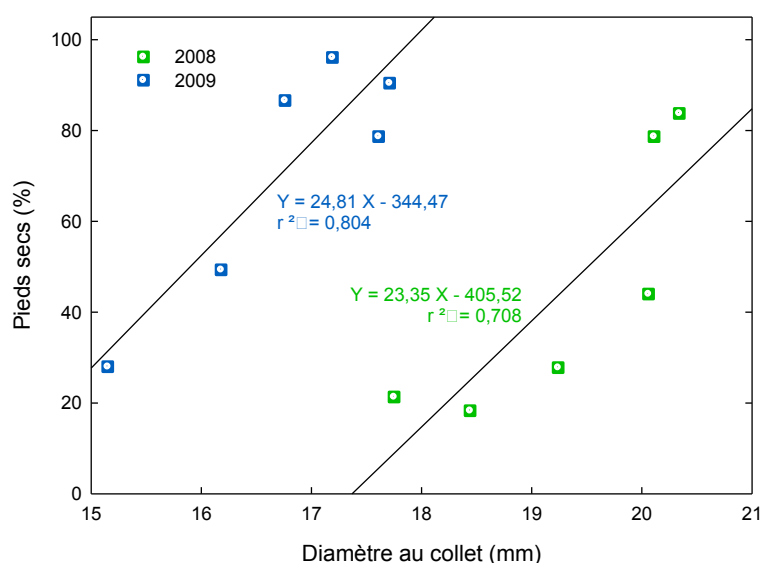


Figure VI. 4. Corrélation entre le diamètre au collet (mm) mesurée à la floraison et la proportion de pieds secs à 81 DPI en 2008 et 77 DPI en 2009 en D3 quelque soit le régime azoté et hydrique.

II. C. 2. Effet de la densité de peuplement sur la morphologie du collet, et conséquences sur la progression du pathogène et le dessèchement précoce

II. C. 2. a. Variation du diamètre au collet sous l'effet de la densité de peuplement

Le diamètre au collet varie significativement ($P < 0,0001$) en fonction de la densité de peuplement pour les trois niveaux de fertilisation azotée en 2008 et 2009 (Tableau VI. 14). Les faibles densités de peuplement induisent des diamètres au collet plus importants qu'aux fortes densités.

Tableau VI. 14. Moyennes des diamètres au collet, pour trois densités de peuplement (4, 6,5 et 9 plantes/m²) en fonction des différents niveaux de fertilisation azotée, mesurés au stade F35-F4⁺ (27 DPI) en 2008 et F4-M0 (22 DPI) en 2009.

	Diamètre au collet (mm)					
	2008			2009		
	N0	N75	N150	N0	N50	N150
Densité de peuplement						
D1 (4 plantes/m ²)	23,29 a	25,02 a	26,18 a	19,36 a	21,60 a	22,46 a
D2 (6,5 plantes/m ²)	20,30 b	21,99 b	22,24 b	17,58 b	17,85 b	18,82 b
D3 (9 plantes/m ²)	18,10 c	19,65 c	20,22 c	15,67 c	16,97 c	17,66 c
F/t value	50,85	63,71	90,91	41,58	84,01	86,50
P > F	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

II. C. 2. b. Effet de la densité de peuplement sur la progression des nécroses encerclantes au collet après contamination artificielle par *P. macdonaldii*

Les moyennes d'AUDPC_{DS} en D1, D2 et D3 pour les trois niveaux de fertilisation en 2008 et 2009 sont représentées dans le Tableau VI. 15. Les variations d'AUDPC_{DS} entre les trois densités de peuplement ne sont pas significativement différentes en 2008 et 2009.

Tableau VI. 15. Moyennes d'AUDPC_{DS} pour chaque densité de peuplement en fonction des différents niveaux de fertilisation azotée entre la contamination artificielle et l'apparition des premiers pieds secs à 64 DPI en 2008 et 42 DPI en 2009

	AUDPC _{DS}					
	2008			2009		
	N0	N75	N150	N0	N75	N150
Densité de peuplement						
D1 (4 plantes/m ²)	45,17	45,65	44,32	14,92	12,74	12,96
D2 (6,5 plantes/m ²)	44,30	44,67	45,77	15,95	13,46	15,80
D3 (9 plantes/m ²)	45,52	43,98	44,00	15,65	15,42	12,67
F/t value	2,88	1,68	1,18	0,08	1,06	1,98
P > F	0,0895	0,2237	0,3351	0,9205	0,3722	0,1756

II. C. 2. c. Relation entre le diamètre au collet et le dessèchement précoce

Les valeurs de diamètre au collet et de proportion finale de pieds secs pour les trois densités de peuplement en N150 sont mieux corrélées en 2008 ($r^2 = 0,735$) qu'en 2009 ($r^2 = 0,564$) (Figure VI. 5). Les faibles diamètres induisent les plus fortes proportions de pieds secs. Ces conclusions sont particulièrement vérifiées en 2008, avec des diamètres significativement ($P < 0,0001$) plus élevés qu'en 2009.

2D Graph 1

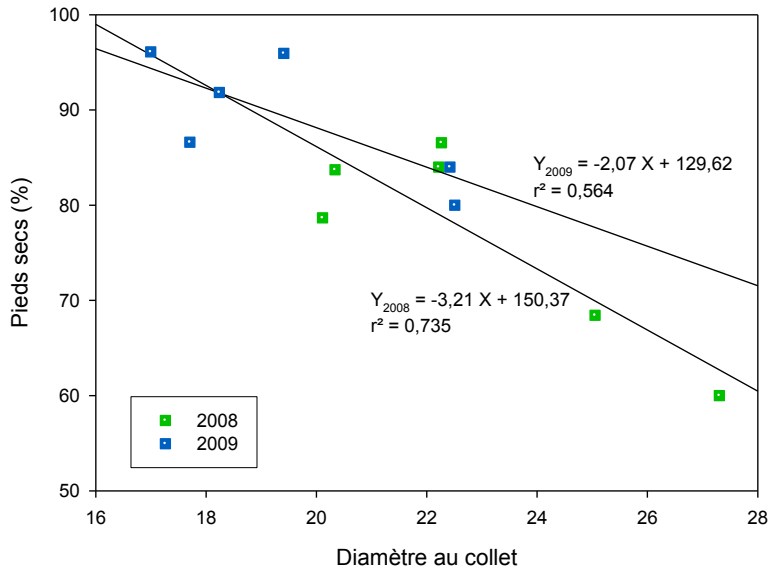


Figure VI. 5. Relation entre le diamètre au collet et la proportion relative de pieds secs pour les trois densités de peuplement en N150 en régime hydrique « non irrigué » et irrigué » en 2008 et 2009.

II. D. Discussion

Les mesures de diamètre au collet à la floraison pour les différents traitements « azote » et « densité » en 2008 et 2009 ont mis en évidence un effet de la conduite de culture sur la morphologie de bas de tige. La fertilisation azotée augmente significativement ($P < 0,005$) le diamètre au collet ; il en va de même pour l'augmentation de la densité de peuplement ($P < 0,0001$). Ceci a pu être vérifié dans la littérature par Massey (1971) et Sedghi et al. (2008). Ces variations du diamètre, de plus de 8 mm entre modalités, ne semblent pas être un frein à la progression de *P. macdonaldii* ; les valeurs d'AUDPC_{DS} n'étant pas significativement différentes entre conduites de culture contrastées. Cependant, une des limites de l'indicateur AUDPC_{DS} est qu'il ne rend compte que d'une progression externe des symptômes, et non d'une colonisation interne des tissus par le champignon. Il est donc difficile de savoir si la progression du pathogène dans les tissus est corrélée ou non à la progression superficielle observée au collet. Seules des observations en microscopie permettraient d'apporter des éléments de réponse.

Si le diamètre de bas de tige n'a pas d'effets directs sur la progression externe du pathogène au collet, il a un effet sur la proportion de pieds secs. Deux effets contradictoires ont pu être mis en évidence sous l'effet de l'azote et de la densité de peuplement. Les plantes présentant un petit diamètre de bas de tige aux fortes densités sont plus sensibles au dessèchement précoce, et inversement. A l'inverse, les plantes présentant de gros diamètres, sous l'effet de la fertilisation azotée, apparaissent plus sensibles. Dans le cas présent, il pourrait s'agir d'un effet dominant de l'azote. La prédisposition des plantes à la maladie serait

indépendante du diamètre au collet, mais plus liée à un effet trophique de l'azote, favorable au développement du champignon (Walters et Bingham, 2007). Le précédent chapitre (*Chapitre V*), abordant l'effet de la conduite de culture sur le dessèchement précoce, a permis d'avancer l'hypothèse que ce syndrome pourrait être principalement lié à une rupture d'alimentation hydrique (puis nutritionnelle) de la plante suite à l'obstruction des vaisseaux par les hyphes du pathogène (Beckman, 1964; Robb et al., 1981 ; Put et Clerkx, 1988). Si on se conforme à cette hypothèse, les plantes à faible diamètre au collet (forte densité) pourraient être sensibilisées par un nombre de vaisseaux moins important, et un diamètre des vaisseaux réduit après contamination par un agent pathogène (Pennypacker et Leath, 1986 ; Mepsted et al., 1995b). La progression du pathogène dans une plante à petit diamètre conduirait ainsi à obstruer plus rapidement les vaisseaux conducteurs d'où une proportion de pieds secs significativement ($P < 0,005$) plus importante en D3 qu'en D1. A l'inverse, l'épaississement de la tige au cours de la croissance par la multiplication des vaisseaux dans la tige (Raven et al., 2003), rendrait moins sensible les plantes cultivées aux faibles densités. La présence d'éléments du xylème (plus nombreux et/ou plus gros), peu ou pas infectés par les hyphes du champignon, maintiendrait une alimentation en eau et en nutriments.

II. E. Conclusion

Les mesures de diamètre au collet de plantes soumises à des niveaux de fertilisation azotée et à des densités de peuplement contrastées ont mis en évidence un effet de la conduite de culture sur la morphologie de bas de tige. Aux faibles densités, le diamètre au collet augmente significativement et conduit à limiter la proportion de pieds secs. La morphologie de bas de tige s'apparente à une barrière physique permettant de contrecarrer la progression du pathogène dans les tissus conducteurs de la plante, limitant ainsi le dessèchement précoce du tournesol. Dans le cas de forts niveaux d'azote, le phénomène inverse est observé. Le plus fort taux de pieds secs, accompagnant l'augmentation du diamètre au collet, ne serait pas lié à la morphologie de bas de tige sensu stricto, mais à un potentiel effet trophique de l'azote pour le champignon. Dans le cas d'une alimentation azotée raisonnée, le diamètre au collet peut s'avérer être un bon indicateur de sensibilité au dessèchement précoce, les plantes à petit diamètre étant alors plus sujettes à ce syndrome.

III. Effet du statut azoté sur le développement du pathogène dans les tissus de la plante

III. A. Objectif de l'expérimentation

Une expérimentation a été conduite en serre à Auzeville au printemps 2009 (SAuz09) pour étudier l'effet de l'azote sur le dessèchement précoce du tournesol à l'échelle de la plante isolée. Un suivi de la progression du pathogène au collet a été réalisé à la suite d'une contamination artificielle au collet par *P. macdonaldii* sur des plantes ayant reçu trois niveaux de fertilisation azotée (équivalents à 0, 50 et 150 kg N/ha) et un stress hydrique post floraison. Un suivi de la mortalité des plantes contaminées ou non a également été réalisé. Le dispositif expérimental a été présenté au *Chapitre II § II* et au *Chapitre V § II*. L'objectif était de mettre en évidence l'effet trophique supposé de l'azote sur le développement du pathogène dans la plante.

Hypothèse : L'augmentation de la teneur en azote des tissus par la fertilisation azotée favorise la progression du pathogène après contamination au collet par *P. macdonaldii* et par conséquent le dessèchement précoce du tournesol.

III. B. Variables mesurées et traitement statistique

III. B. 1. Mesures SPAD

Sept mesures SPAD ont été réalisées entre la 2^{ème} et la 3^{ème} fertilisation, entre 8 jours avant la contamination (-8 DPI) et 43 DPI. Aux quatre premières dates, l'ensemble des plantes de l'essai a été mesuré, puis aux trois dernières, seul un sous-échantillon de 15 plantes a été retenu pour les six modalités « inoculum » (contaminés vs témoins) x « azote » (N0, N50, N150) (*Ch. II § IV. D. 3*).

III. B. 2. Suivi de l'évolution des nécroses au collet

III. B. 2. a. Progression horizontale du pathogène

L'évaluation a été réalisée sur les plantes contaminées artificiellement pour chaque modalité du traitement « azote » avec une échelle de notation plus détaillée que celle présentée au *Ch. I. § I. B. 2. b*. Les 4 classes de notations sont : (i) nécrose inférieure à la

moitié de la circonférence de la tige au collet, (ii) nécrose comprise entre la moitié et les $\frac{3}{4}$ de la circonférence, (iii) nécrose supérieure aux $\frac{3}{4}$ de la circonférence et (iv) nécrose encerclant totalement la tige au niveau du collet.

III. B. 2. b. *Progression verticale du pathogène*

L'évaluation a été réalisée pour chaque modalité du traitement « azote » selon 2 classes de notations : (i) la nécrose atteint le nœud cotylédonaire de la plante et (ii) la nécrose progresse au-delà du nœud cotylédonaire (en direction du 1^{er} nœud foliaire).

III. B. 3. **Suivi de l'apparition des pieds secs et de la sénescence**

Un suivi de la mortalité des plantes a été effectué pour les plantes contaminées et les plantes témoins pour chaque modalité « inoculum x azote » jusqu'à 70 DPI. L'AUDPC_{PR} intègre la proportion de pieds secs depuis la contamination artificielle jusqu'à 57, 62 et 70 DPI (*Ch. II § IV. F*).

III. B. 4. **Traitement statistique**

Les variables d'intérêt ont été analysées par un modèle linéaire généralisé. Les différences entre traitements, pour les variables d'intérêt, ont été comparées par le test de Fisher (LSD_{0,05}). Une transformation arcsinus a permis de normaliser la variable « proportion de pieds secs » avant ANOVA (Gomez and Gomez, 1984). Les mesures SPAD entre les témoins et les plantes contaminées n'étant pas significativement différentes pour les trois traitements « azote » (N0, N50, N150) jusqu'à 27 DPI, les deux traitements « inoculum » ont été regroupés pour tester la variable « azote ». Les mesures SPAD à partir de 43 DPI étant significativement différentes entre les témoins et les plantes contaminées, l'analyse a été menée indépendamment pour chaque traitement « inoculum ».

III. C. **Résultats**

III. C. 1. **Caractérisation des différents niveaux de fertilisation**

La première mesure SPAD, réalisée 4 jours après la deuxième fertilisation (-8 DPI), ne montre pas de différences significatives du traitement « azote » (Tableau VI. 16). Au-delà de cette mesure, des différences significatives ($P = 0,0014$) sont observées entre N150, N50 et N0. La teneur en chlorophylle des limbes du traitement N150 est toujours supérieure à celle

mesurée en N0, le traitement N50 étant souvent classé comme un intermédiaire entre ces deux traitements. La forte discrimination ($P < 0,005$) de la teneur en chlorophylle à 27 DPI entre les traitements N0, N50 et N150 s'explique par la dernière fertilisation apportée.

Tableau VI. 16. Moyennes des mesures SPAD réalisées sur l'ensemble des plantes témoins et contaminées pour le traitement « azote » en N0, N50, N150 jusqu'à 13 DPI, puis sur un sous-échantillon de 15 plantes à partir de 21 DPI.

Fertilisation (kg N/ha)	Valeurs SPAD (Jour après contamination)					
	-8 DPI	-1 DPI	6 DPI	13 DPI	21 DPI	27 DPI
150	40,45 a	40,92 a	40,82 a	41,25 a	35,42 a	37,39 a
50	39,88 a	39,84 b	40,11 ab	39,89 ab	33,29 b	34,69 b
0	39,97 a	38,67 c	40,82 b	38,41 b	32,63 b	32,41 c

A partir de 43 DPI, des différences significatives ($P < 0,05$) des valeurs SPAD sont observées entre les traitements « inoculum » et « azote ». Les valeurs de SPAD des témoins sont supérieures à celles des plantes contaminées (Tableau VI. 17).

Tableau VI. 17. Moyennes des mesures SPAD réalisées à 43 DPI sur un échantillon de plantes témoins et contaminées pour le traitement « azote » en N150, N50 et N0,

Traitement	Fertilisation (kg N/ha)	Nombre de Plantes	SPAD à 43 DPI
Mycelium	150	12	32,10 a
	50	12	29,18 b
	0	11	26,65 c
Témoin	150	3	36,75 a
	50	3	29,50 b
	0	2	28,23 c

III. C. 2. Evolution des nécroses au collet

III. C. 2. a. Progression horizontale du pathogène

Après contamination artificielle, l'ensemble des plantes présentaient une attaque de *Phoma* au collet. Des différences de vitesse de progression des nécroses externes ont pu être mises en évidence rapidement entre les trois traitements « azote ». A 21 DPI, seules les

plantes en N150 et N50 présentait des nécroses au collet supérieures à $\frac{3}{4}$ de la circonférence alors qu'en N0, les nécroses étaient toujours comprises entre $\frac{1}{2}$ et $\frac{3}{4}$. Dès 28 DPI, la proportion de plantes présentant des nécroses encerclantes au collet était la plus élevée en N150, suivie des plantes en N50 puis en N0 (Figure VI. 6). Cette différenciation entre traitements azotés s'observait jusqu'à 42 DPI. A 57 DPI, 100 % des plantes présentaient une

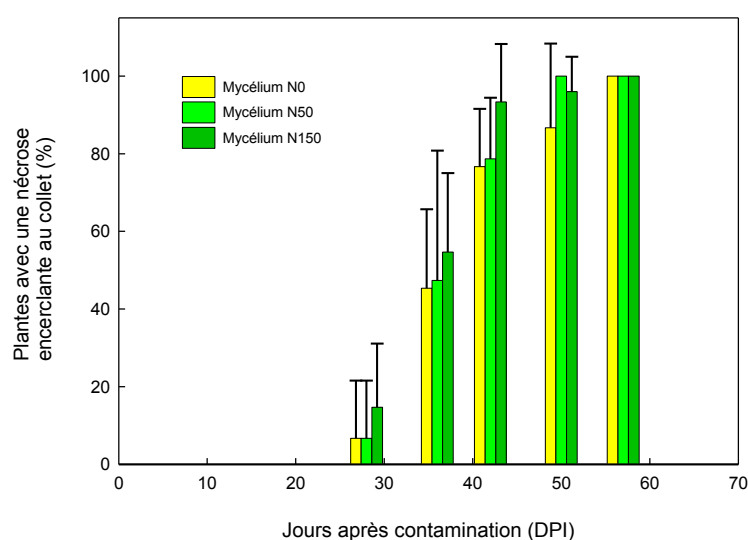


Figure VI. 6. Progression horizontale du pathogène. Evolution du pourcentage de plantes présentant une nécrose encerclante au collet en fonction du traitement azoté (N0, N50, N150), après la contamination au collet par du mycélium de *P. macdonaldii*.

III. C. 2. b. Progression verticale du pathogène

Lorsque la nécrose est encerclante au niveau du collet, celle-ci progresse verticalement le long de la tige et atteint le nœud cotylédonnaire dès 21 DPI en N150 et N50 contre 28 DPI en N0 (Figure VI. 7. A). L'augmentation de la proportion de plantes avec une nécrose au collet atteignant le nœud cotylédonnaire est ensuite exponentielle jusqu'à 42 DPI, quelque soit le traitement azoté. Mais le retard observé en N0 n'est jamais compensé et la proportion de plantes avec une tache au nœud cotylédonnaire reste toujours inférieure à celles observées en N150 et N50, Le même schéma est observé sur la Figure VI. 7. B, représentant la vitesse de progression des nécroses au-delà du nœud cotylédonnaire. Les nécroses ont dépassé le nœud cotylédonnaire en N150 dès 42 DPI, puis en N50 dès 50 DPI, et seulement à partir de 57 DPI en N0,

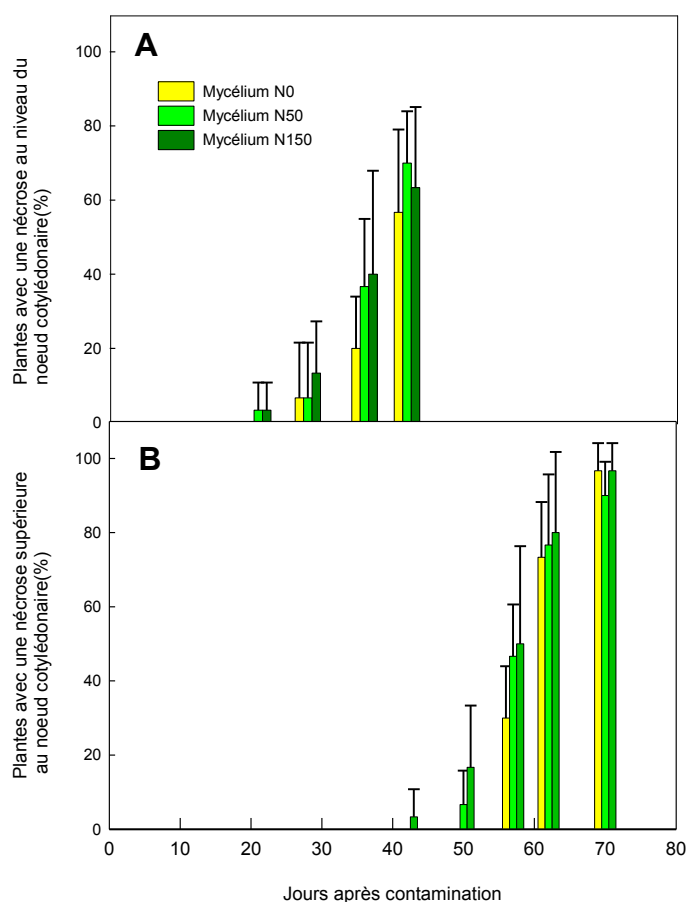


Figure VI. 7. Progression verticale du pathogène. Evolution du pourcentage de plantes présentant des nécroses au niveau du noeud cotylédonaire (A) et au-dessus du noeud cotylédonaire (B) après contamination au collet par du mycélium de *P. macdonaldii* en fonction du traitement azoté (N0, N50, N150).

III. C. 3. Suivi de la sénescence et de l'apparition des pieds secs

Les premières plantes mortes ont été observées dès 42 DPI en N150 et N50, soit 25 jours avant la maturité des premiers témoins (Figure VI. 8). Le nombre de pieds secs en N150 a progressé très rapidement jusqu'à 57 DPI, alors qu'en N0, le nombre de plantes mortes était significativement ($P < 0,05$) plus faible. Le traitement N50 se positionne comme intermédiaire entre N150 et N0, A partir de 62 DPI, le nombre de plantes mortes en N0 progresse très fortement et dépasse le nombre de pieds secs en N50 et N150, A 77 DPI, l'ensemble des plantes en N0 était desséché (79 DPI en N50 et N150). Les premiers témoins morts ont été observés à 77 DPI en N0 et N50, puis à 90 DPI en N150, la maturité des témoins étant tout aussi dépendante du traitement azoté.

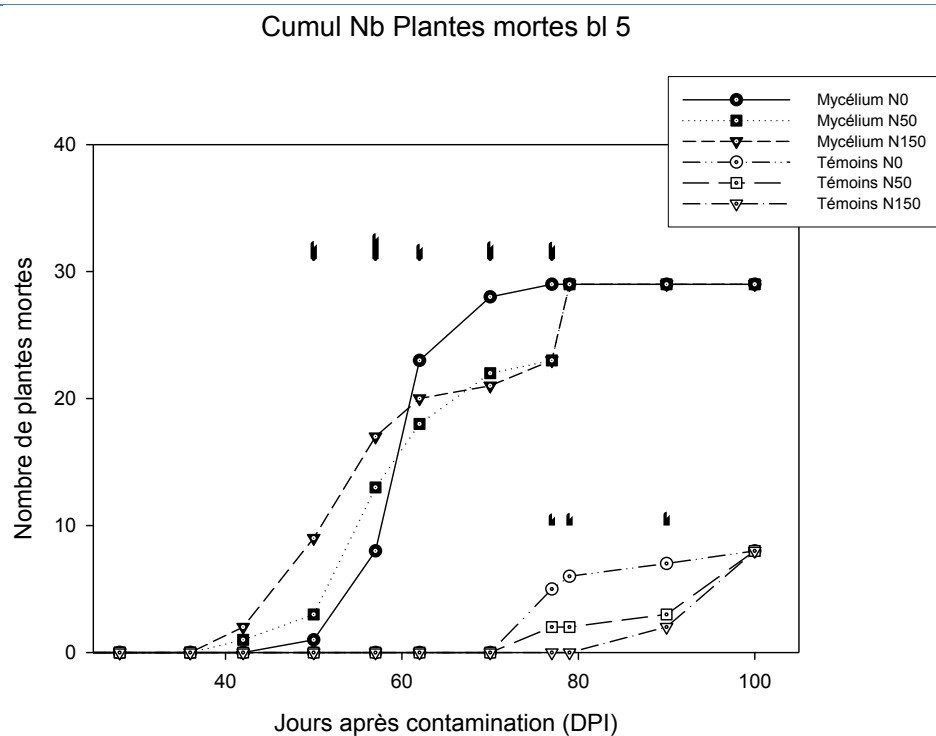


Figure VI. 8. Evolution du nombre de plantes mortes pour les trois niveaux de fertilisation azotée (N0, N50 et N150) en fonction des jours après contamination (DPI) : plantes contaminées au collet par du mycélium de *P. macdonaldii* et plantes témoins. Les barres verticales indiquent la valeur du $LSD_{0,05}$.

La comparaison de l'AUDPC_{PR} entre les trois traitements azotés montre des différences significatives ($P = 0,014$) entre N150 et N0 à 57 et 62 DPI. A 70 DPI, l'AUDPC_{PR} reste la plus élevée en N150, et ce même si la proportion de plantes mortes en N0 est supérieure à celle observée en N150 dès 62 DPI (Tableau VI. 18). Le taux de pieds secs en N150 à 57 DPI, significativement ($P < 0,0001$) supérieur à celui observé en N50 et N0, a progressé lentement en comparaison de N0. A 70 DPI, 96 % des plantes étaient mortes en N0, alors que moins de 75 % des plantes étaient desséchées en N50 et N150.

Tableau VI. 18. AUDPC_{PR} et proportion de pieds secs après contamination par du mycélium de *P. macdonaldii* au collet à 50, 62 et 70 jours après contamination (DPI).

Traitement azoté	AUDPC _{PR}			Pieds secs (%)		
	57 DPI	62 DPI	70 DPI	57 DPI	62 DPI	70 DPI
N150	1,72 a	8,01 a	13,83 a	58,00 a	68,67 ab	72,67 b
N50	0,66 ab	4,96 ab	10,35 b	41,33 b	61,33 b	74,67 b
N0	0,13 b	3,93 b	11,20 ab	28,00 b	80,00 a	96,67 a

III. D. Discussion

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence un effet trophique possible de l'azote sur la progression du pathogène au niveau du collet et sur la proportion de pieds secs après une contamination de bas de tige avec du mycélium de *P. macdonaldii*. Il était donc essentiel de pouvoir caractériser le traitement « azote » et de montrer que les différents niveaux de fertilisation N0, N50 et N150 étaient bien contrastés. Les mesures de SPAD, effectuées avant et après contamination, ont montré qu'il n'y avait pas de différences significatives du traitement azote entre les plantes contaminées et les témoins jusqu'à 27 DPI. La teneur en chlorophylle des feuilles a été significativement différente ($P < 0,05$) entre les traitements N0, N50, N150 tout au long de l'expérimentation. Les différences entre N0 et les deux traitements fertilisés auraient cependant pu être davantage contrastées si on avait utilisé du sable au lieu d'un mélange comprenant du terreau et du sol de jachère travaillée apportant davantage d'éléments nutritifs à la plante. La valeur SPAD en N0 reste élevée (39) pour un traitement non fertilisé, comparée à la valeur observée au champ pour la même variété (30) (Ch. VI. § I. C. I. a. i).

Le suivi de la progression horizontale et verticale du pathogène autour du collet a permis de montrer des différences significatives entre les traitements azotés. Les plantes contaminées en N150 présentent des nécroses qui progressent plus rapidement autour du collet qu'en N50, En N0, la progression horizontale et verticale du *Phoma* est sensiblement retardée. L'azote jouerait un rôle important sur le développement et la progression du pathogène dans la plante (Hubert et Tompson, 2007). Les modifications physiologiques et anatomiques dans la plante dues à l'azote peuvent influencer sur la sensibilité de l'hôte vis-à-vis de l'agent pathogène. L'altération des constituants de la paroi cellulaire comme les lignines, la réduction de l'épaisseur de la paroi cellulaire et la diminution en composés phénoliques phytotoxiques ou la réduction de leur toxicité pourraient être à l'origine de cette plus grande sensibilité de la plante, sans pour autant modifier la capacité du pathogène à coloniser la plante (Jensen et Munk, 1997).

L'azote inorganique, essentiellement absorbé à partir de la solution du sol sous forme de nitrates, est en partie assimilé directement par les racines et transporté dans les feuilles où il est réduit et assimilé. Les acides aminés produits, dans les deux cas, sont ensuite utilisés sur place ou exportés vers les tissus conducteurs : xylème et phloème (Morot-Gaudry, 1997). La pénétration des tissus par le champignon est donc une étape clé dans l'interaction plante-

pathogène, et le succès de la colonisation dépend de la capacité du pathogène à remobiliser les nutriments de la plante hôte. Les molécules azotées exportées dans le xylème, peuvent ainsi être assimilées par le pathogène. Les capacités de *P. macdonaldii* à coloniser les vaisseaux conducteurs (Seassau et al., soumis) et à décomposer les éléments de la cellule végétale (Abou Al Fadil et al., 2009) fourniraient ainsi au champignon de nouvelles sources azotées assimilables telles que nitrates, ammonium, acides aminés, amides et protéines, (Walters et Bingham, 2007). Une quantité d'azote abondante ou limitée pourrait alors influencer sur le métabolisme du champignon (Hubert et Watson, 1974). L'apport d'une fertilisation azotée couvrant largement les besoins de la croissance du tournesol (N150) favoriserait ainsi le développement du champignon dans la plante. Les éléments nutritifs apportés par le substrat en N0 pourraient expliquer le taux de pieds secs plus important que celui observé lors des essais au champ en l'absence de fertilisation azotée (Seassau et al., 2010). Ces essais menés après un précédent cultural maïs ou sorgho, restituent au sol de grandes quantités de pailles susceptibles d'immobiliser de l'azote minéral, et conduisent à de faibles valeurs de reliquats azotés (Nolot et Debaeke, 2003). La quantité d'azote, disponible pour la plante et le pathogène au champ, serait ainsi fortement limitée contrairement aux essais en serre, ce qu'indiquent les valeurs SPAD.

En N150, la progression plus rapide du pathogène jusqu'à 52 DPI a été propice au dessèchement précoce des plantes. En N50, un léger temps de latence a été observé par rapport à N150, puis les plantes contaminées en N0 ont évolué plus lentement vers le dessèchement. Cependant, à partir de 62 DPI, le nombre de plantes mortes en N0 a très fortement augmenté, dépassant les traitements N50 et N150. Cette augmentation brutale du nombre de pieds secs en N0 pourrait cependant confondre deux processus : (i) un dessèchement dû au *Phoma*, et (ii) une sénescence naturelle plus rapide des plantes carencées en azote. Les valeurs de SPAD, significativement ($P < 0,05$) inférieures en N0 à celles observées en N50 et N150, attestent de cette sénescence précoce liée à une carence azotée. Pour être plus rigoureux dans la détermination des pieds secs avérés, il conviendrait de réaliser cette estimation pour chaque traitement « azote » sans se référer à une date unique de maturité des témoins quelque soit le niveau de fertilisation. Avec cette convention, le taux final de pieds secs en N150 serait alors de 100 %, et serait inférieur à 70 % en N0.

Si l'origine du dessèchement précoce semble principalement liée à la présence de *Phoma* dans les tissus conducteurs de la plante, d'autres mécanismes physiologiques peuvent également être impliqués. La différence de vitesse de sénescence des plantes contaminées et

des témoins pourrait s'expliquer par des variations de la teneur en chlorophylle des feuilles. Cet indicateur, est fréquemment utilisé comme biomarqueur de sénescence. L'attaque d'un champignon modifie la teneur en azote des plantes, considéré comme un puit supplémentaire pour la plante (Tavernier et al., 2007) et active d'importants changements métaboliques dans la plante. Des études ont montré que le métabolisme de la plante au cours d'un stress abiotique et de l'infection par des pathogènes est semblable à celui observé pendant le processus de sénescence (Buchanan-Wollaston et al., 2003; Pageau et al., 2006). La remobilisation des nutriments par le champignon conduit ainsi à des changements drastiques dans la relation source / puits analogue au processus de remobilisation observé lors de la sénescence des feuilles (Masclaux et al., 2000). De plus, les stress biotiques peuvent augmenter l'expression de plusieurs gènes de la plante impliqués dans la remobilisation de l'azote lors de la sénescence (AbuQamar et al., 2006).

III. E. Conclusion

Une concentration élevée de la plante (tiges, feuilles) en azote tend à accroître la vitesse de progression de *P. macdonaldii* et s'accompagne de modifications physiologiques et anatomiques qui influent sur la sensibilité de l'hôte vis-à-vis de l'agent pathogène. L'interaction azote x pathogène pourrait être de deux ordres : (i) trophique, par l'assimilation de ressources azotées dans le xylème permettant le développement du champignon dans la plante, et (ii) physiologique, par la remobilisation des nutriments par le champignon et la dégradation des composés cellulaires, conduisant à une sénescence accélérée des plantes contaminées.

Chapitre 7. Conclusions perspectives

Au démarrage de ces travaux de recherche, les connaissances produites sur l'étiologie du dessèchement précoce du tournesol étaient particulièrement lacunaires. La compréhension de ce syndrome, qui résulte d'une attaque de *Phoma macdonaldii* de bas de tige, a donc nécessité un important travail expérimental pour tester et valider des hypothèses de base sur l'origine des attaques et leur action sur la plante. Par une complémentarité d'essais menés au champ et en serre, nous avons appréhendé la connaissance des interactions complexes entre l'agent pathogène et son hôte, sous l'action de la conduite de culture et du climat. L'originalité de ce travail était donc de se situer à l'interface entre l'agronomie systémique, l'écophysiologie et la phytopathologie en vue de proposer des pistes pour le contrôle cultural du tournesol, en l'absence de variétés résistantes et de traitements fongicides efficaces contre le phoma du collet. Les résultats de ces recherches ont ainsi permis de proposer un schéma conceptuel du dessèchement précoce (Figure VII. 1). Celui-ci décrit les modifications phénotypiques de la plante, observées à la suite d'une infection de bas de tige par *Phoma macdonaldii*, qui conduisent au dessèchement précoce de la plante sous l'effet de la conduite de culture, du milieu et des conditions climatiques. Ces facteurs peuvent avoir un effet direct sur la progression du champignon dans les tissus : sensibilité variétale, disponibilité en azote et en eau du sol, densité de peuplement et développement du couvert végétal favorable à l'infection. Et indirect, où ces facteurs vont induire des modifications physiologiques et anatomiques dans la plante qui accentuent la sensibilité de la plante à *P. macdonaldii* : réduction du diamètre des vaisseaux, de la teneur en azote des tissus qui peuvent induire une rupture de l'alimentation hydrique dans la plante et une sénescence précoce du feuillage. Tous ces mécanismes peuvent ainsi interagir, exacerbant les dégâts sur le tournesol et la nuisibilité de ce syndrome complexe.

Cette partie s'articulera autour d'un bilan conclusif des résultats majeurs mis en évidence au cours de ce travail de thèse. Des conséquences opérationnelles, pouvant être mises en place pour diagnostiquer un pied sec au champ et limiter la progression du dessèchement précoce par le contrôle cultural, seront proposées. Des perspectives de recherches seront également abordées, principalement pour intégrer l'effet de l'interaction bioagresseurs x conduite de culture à un modèle de simulation dynamique de la culture du tournesol (SUNFLO) permettant de décrire le fonctionnement des variétés de tournesol et la production accessible (rendement, huile).

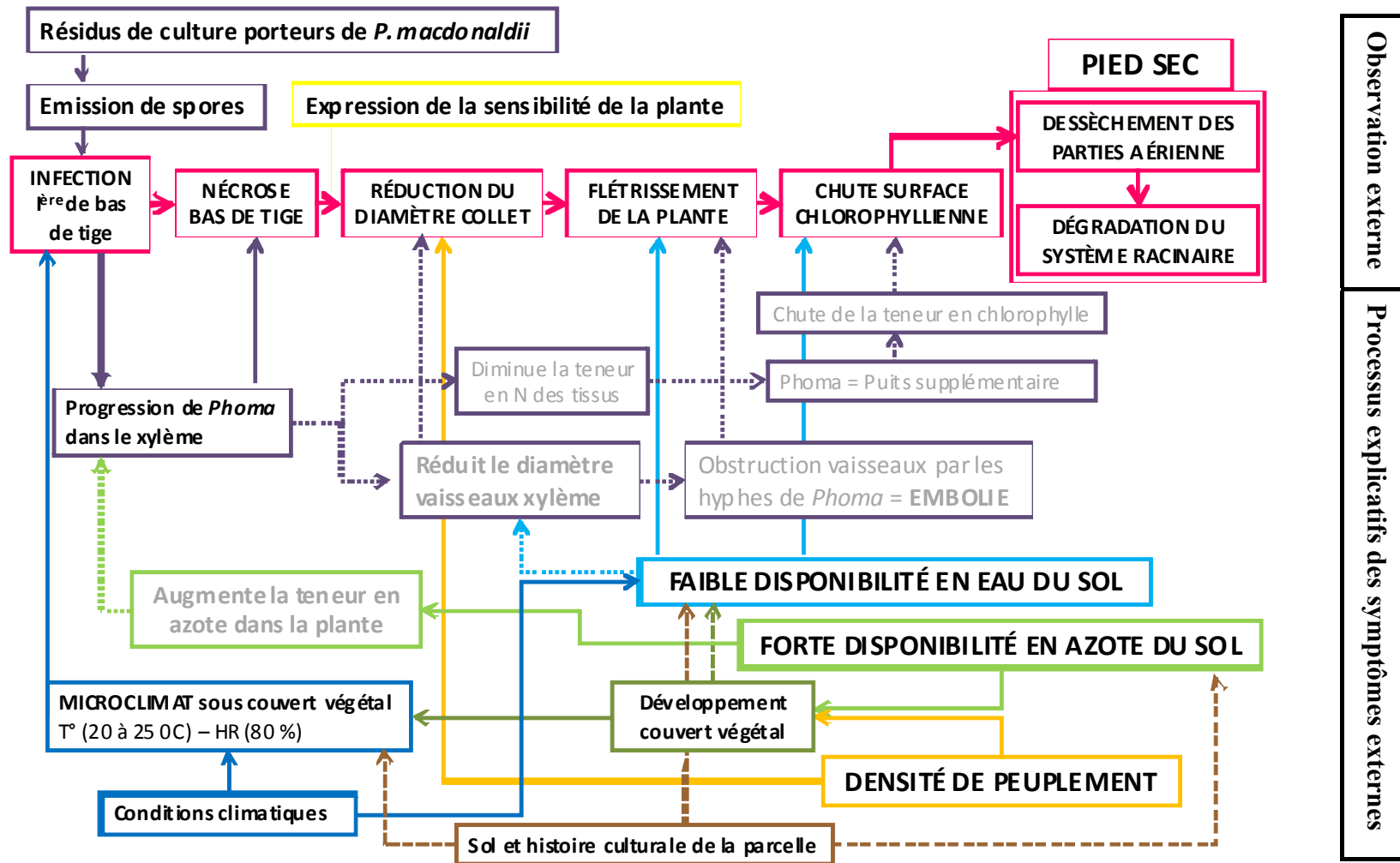


Figure VII. 1. Schéma conceptuel présentant les symptômes externes observés lors du dessèchement précoce d'une plante après inoculation par des spores de *P. macdonaldii* et les mécanismes physiologiques internes impliqués dans ce syndrome dépendant de la conduite de culture du tournesol, du milieu, et des conditions climatiques. Les facteurs en noir ont été étudiés, ceux en gris sont issus de la littérature. Les flèches pleines mettent en évidence des relations établies expérimentalement entre les facteurs au champ et en serre, les flèches tiretées et pointillées indiquent les conséquences indirectes et issues de la littérature respectivement.

***P. macdonaldii* est l'agent causal du syndrome de dessèchement précoce du tournesol résultant d'attaques de bas de tige**

Des analyses pathologiques réalisées sur des plantes desséchées précocement à la suite d'une attaque au collet par *P. macdonaldii* ont mis en évidence la présence d'un cortège de champignons, composé pour l'essentiel de *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina* et de *Fusarium* spp. (Chapitre III-I). Ces observations confortent des travaux antérieurs réalisés par Pérès et Poisson (1999) et Pérès et al., (2000) notifiant la présence d'un complexe parasitaire, composé pour l'essentiel de *P. macdonaldii* et *M. phaseolina* dans la zone collet-racine, associé au syndrome de dessèchement précoce. Le caractère obligatoire de cette association dans la désorganisation et la réduction du système racinaire des pieds secs n'a pas été démontré dans nos essais. Les contaminations artificielles par *P. macdonaldii* ont permis de reproduire des pieds secs en serre, contrairement aux inoculations par *M. phaseolina*, et qui n'ont pas aggravé les dégâts occasionnés par une double contamination avec *P. macdonaldii* (Chapitre III-II). La notion de complexe parasitaire, associée au dessèchement précoce, ne peut être directement remise en cause, compte tenu des divers champignons isolés sur des plantes issues de parcelles agricoles. Elle suggère cependant une hiérarchie dans l'intervention des différents pathogènes. *P. macdonaldii* apparaît clairement comme l'agent causal principal de ce syndrome tel qu'il se manifeste de manière généralisé dans les zones de production du tournesol (Donald et al., 1987 ; Carson, 1991). *Macrophomina* joue un rôle secondaire dans la manifestation du syndrome et colonise des plantes en voie de sénescence (Saumon et al., 1984).

Le dessèchement précoce est occasionné par une attaque de bas de tige qui induit un arrêt de la transpiration des plantes et une sénescence accélérée.

Les connaissances sur l'étiologie du dessèchement précoce ont jusqu'à présent été limitées à des observations succinctes de symptômes externes, qui se traduisent par une sénescence prématurée, accompagnée d'une nécrose étendue de la tige et des racines, pour des plantes attaquées au collet par *P. macdonaldii* (Sackston, 1949 ; Donald et al., 1987 ; Carson, 1991). Les différents essais réalisés en serre et au champ entre 2006 et 2009 nous ont permis de conforter ces modifications phénotypiques observées lors du dessèchement de la plante, et nous ont amené à comprendre les relations entre les dégâts occasionnés par l'infection et

l'étiologie de la maladie. Les isollements réalisés sur des pieds secs de tournesol, issus de parcelles agricoles ou d'essais en station, ont montré la capacité de *P. macdonaldii* à coloniser les tissus aériens et racinaires de la plante, externes et internes (Abou al Fadil et al., 2009 ; Seassau et al., soumis) (Chapitre III et IV). La présence importante de *P. macdonaldii* dans les tissus de bas de tige, en comparaison des racines, désigne les contaminations aériennes comme point de départ de la maladie. Cette voie d'entrée privilégiée du champignon devient préjudiciable pour la plante dès lors que la prolifération du champignon se fait dans des tissus conducteurs de la plante et que la morphologie de bas de tige se caractérise par un rétrécissement important du diamètre au collet (Chapitre IV-I et IV-II). La nécrose des tissus secondaires, associée à la progression du pathogène conduirait à l'obstruction progressive des vaisseaux du xylème par les hyphes du champignon (Beckman, 1964; Robb et al., 1981), réduisant ainsi fortement le flux transpiratoire (Chapitre IV-I). La sénescence précoce, mise en évidence par une chute de la surface foliaire active, serait la conséquence directe d'une diminution puis d'un arrêt de l'alimentation en eau de la plante. Le système racinaire des pieds secs, très dégradé en fin de cycle, a jusqu'à présent été considéré comme un indicateur permettant de reconnaître avec certitude les plantes atteintes du syndrome étudié. Cependant, le système racinaire de pieds secs arrachés 2 à 3 jours la mort de la plante ne présente pas de détériorations majeures. Les pieds arrachés après 2 à 3 semaines présentent par contre un système racinaire fortement à totalement dégradé (Chapitre IV-II). Nous avons pu ainsi infirmer l'hypothèse longtemps avancée d'une origine racinaire du dessèchement précoce (Donald et al., 1987). La dégradation du système racinaire est donc une conséquence et non une cause des attaques au collet.

Vers un diagnostic du pied sec au champ

Dans le cadre de cette étude, nous avons procédé à des observations hebdomadaires de la progression des attaques de bas de tige par *P. macdonaldii* et un suivi d'apparition des pieds secs. Une forte corrélation ($r^2 = 0,941$) entre la proportion de plantes présentant une nécrose encercleante au collet et le pourcentage final de pieds secs a pu être mise en évidence 78 jours après contamination et plus précocement dès 50 DPI ($r^2 = 0,871$) (Chapitre IV-1). La présence d'une infection de bas de tige par *P. macdonaldii* conduisant à un manchon noir, de diamètre réduit, serait un bon indicateur pour estimer la proportion de plantes pouvant se dessécher précocement avant la fin de la maturité physiologique (Tableau VII. 1). Un suivi

très régulier des symptômes n'apparaît cependant pas nécessaire, et 4 passages dans la parcelle pourraient être suffisants : les deux premiers concerneraient des observations de bas de tige et les deux derniers des observations de plantes entières. Le premier passage pourrait se situer avant la floraison (stade E4/E5) pour estimer la précocité des infections et la progression du champignon au collet sur les parcelles. Dans le cas d'une attaque plus tardive, de conditions climatiques moins propices au développement du champignon, ou tout simplement pour estimer la pression de la maladie, un second passage fin floraison pourrait être fait. Le passage déterminant se situe au stade M1.2/M1.3, mi-remplissage, avant la sénescence naturelle (Tableau VII. 1). Celui-ci aurait lieu la première semaine d'août pour un semis conventionnel et une variété mi-précoce, correspondant à des inoculations par *P. macdonaldii* depuis 50 à 60 jours dans le Sud-Ouest de la France. A ce stade, les premiers pieds secs se sont généralement exprimés. Ce passage pourrait aider l'expérimentateur (ou l'agriculteur) à évaluer la précocité des dégâts et à estimer les dommages potentiels sur la culture. En sélection ou en évaluation variétale de post-inscription, ce passage permettrait une discrimination suffisante de la sensibilité des variétés vis-à-vis du dessèchement précoce, à condition de se situer au bon stade pour chaque variété. Un dernier passage vers la mi-août, au stade M2/M3 (maturité physiologique), permettrait d'estimer l'ampleur du syndrome ou, à l'inverse, de mettre en avant la résistance de certaines variétés et/ou l'efficacité de traitements fongicides par effet de contraste.

A la suite des différents essais réalisés en serre et au champ, nous avons décidé de considérer comme pieds secs les plantes desséchées au moins une semaine avant la maturité physiologique des plantes saines. L'arrachage de plantes présentant une nécrose encerclante de *P. macdonaldii* au collet, un feuillage totalement sénescant, une tige desséchée et une importante dégradation du système racinaire attestent de pieds secs avérés (Tableau VII. 1). Mais comme nous avons pu le voir dans le paragraphe précédent, l'observation du système racinaire est un bon indicateur dès lors qu'il s'agit de pieds secs « précoces » et non de pieds secs « tardifs ». Dans le cas d'un seul passage sur la parcelle, en fin de campagne, et en l'absence d'un suivi régulier des plantes, comme nous avons pu le faire, cet indicateur présente des limites.

Tableau VII. 1. Caractéristiques morphologiques et physiologiques pour reconnaître un tournesol desséché précocement au champ, après infection par *P. macdonaldii*, en relation avec le cycle de développement de la plante et la zone de culture.

Diagnostiquer un syndrome de dessèchement précoce attribué à <i>Phoma macdonaldii</i>
Présence d'une nécrose caractéristique au collet (manchon noir encerclant, peu ou pas fissuré, retréssissement du diamètre au collet en comparaison d'une plante non infectée) souvent associée à des attaques sur tige.
Premières attaques observées au stade M1.2/M1.3 (mi-remplissage des akènes) entre la 3 ^{ème} décennie de juillet et 1ère décennie d'août pour les dates de semis conventionnelles
Flétrissement brutal du feuillage puis de la tige de la plante (sans pourriture du bas de tige)
Sénescence du couvert 15 jours à 1 mois avant la maturité physiologique des plantes saines
Répartition des pieds secs isolée (bas-fond) ou en zones concentriques (coteaux)
Dégradation du système racinaire possible mais pas systématique, selon la date d'arrachage et d'observation des pieds secs

Une solution alternative aux passages réguliers dans la parcelle et à l'arrachage des pieds, serait de pouvoir modéliser le comportement d'une plante saine dans les conditions de la parcelle. Le modèle SUNFLO (Casadebaig, 2008) pourrait être retenu pour décrire le fonctionnement de la culture de tournesol en l'absence de bioagresseurs. Connaissant la date théorique de la maturité physiologique, telle que simulée par le modèle, une visite anticipée de 7 à 10 jours permettrait d'évaluer la pression de la maladie dans la parcelle. Mais pour réaliser cette simulation, il convient de disposer du climat journalier, des caractéristiques hydriques du sol, ainsi que des principaux éléments de la conduite de culture (variété, date et densité de semis, fertilisation azotée, irrigation).

La modélisation pourrait également être mobilisée pour évaluer la nuisibilité du dessèchement précoce. En l'absence de plantes saines dans les essais (*Phoma* généralisé, pas de fongicides efficaces contre les attaques au collet), la prévision du rendement accessible sans bioagresseurs fournirait une référence 'culture saine' pour évaluer les pertes de récolte occasionnées par le dessèchement précoce. L'estimation du rendement par SUNFLO tient compte de la production potentielle de biomasse et de son allocation vers le capitule. Mais également des contraintes hydriques et azotées subies au cours du cycle, en considérant la variété, la conduite et du milieu (Casadebaig, 2008). Parallèlement, il serait intéressant d'évaluer si le dessèchement précoce peut affecter la teneur en huile des akènes et/ou la

qualité de l'huile. Cet aspect très peu développé dans la littérature pourrait être fortement affecté, car l'accumulation d'huile s'opère pendant la phase de maturation (Merrien, 1992). Compte tenu que la durée de vie des feuilles après la floraison est un bon prédicteur de la teneur en huile, il est probable qu'une sénescence précoce de la plante modifie la teneur en huile des graines.

Reproduire le syndrome de dessèchement précoce pour l'évaluation variétale et la préconisation culturale : intérêts et limites des méthodes de contamination artificielle.

L'utilisation des résidus de cultures

La présence de résidus de tournesols infectés à la surface du sol est considérée comme la principale source d'inoculum primaire à l'origine des épidémies de *P. macdonaldii* (Donald et al., 1987 ; Gulya et al., 1984 ; Pérès and Poisson, 2000 ; Pérès et al., 2000). Les essais réalisés en serre (SAuz07, SEC07 et SGri08), testant l'implication des résidus infectés dans les attaques au collet, ont permis de montrer que l'inoculum présent pouvait infecter le bas de tige et conduire au dessèchement précoce de plantes. Ceci a été mis en évidence lors de contaminations par des résidus infectés présents à la surface du sol. Les contaminations par des résidus de culture enfouis n'ont induit que des nécroses racinaires superficielles, sans conséquences sur la partie aérienne de la plante (Chapitre IV-I). Cette méthode de contamination conforte l'implication des résidus infectés comme vecteur potentiel de la maladie, et il serait dès lors envisageable d'utiliser cette méthode de contamination lors d'essais au champ. Des résidus infectés pourraient ainsi être placés dans l'interrang des parcelles expérimentales à la base des plantes au stade bouton floral, conformément à ce qui a pu être réalisé dans l'essai SGri08. La quantité d'inoculum à apporter reste cependant à déterminer, et des essais complémentaires seraient utiles pour déterminer la quantité optimale de résidus pour une contamination massive des bas de tiges par *P. macdonaldii*. Cette méthode, utilisée pour la contamination artificielle par le Phomopsis au champ, a fait ses preuves (Viguié et al., 2000). Cependant, il est nécessaire de maintenir un microclimat favorable aux infections par une couverture végétale suffisante, et une à plusieurs irrigations par aspersion. Dans le cas du Phoma, cette méthode permettrait d'alléger considérablement la contrainte des contaminations artificielles au collet par du mycélium ou des spores de *P. macdonaldii* au champ.

Au-delà de cet aspect méthodologique, ces essais confortent l'importance de la gestion des résidus de tournesol en post-récolte. Selon une étude du ministère de l'Agriculture (Labreuche et al., 2007), la pratique du non labour se répand de plus en plus en France. En 2006, environ 34% des grandes cultures semées l'ont été sans labour préalable alors qu'en 2001, 21% des terres étaient concernées. Les raisons de ces changements sont surtout d'ordre économique et environnemental : gain d'énergie et de temps de travail, limitation de l'érosion des sols. Des conséquences sur la prolifération des adventices et des maladies telluriques sont beaucoup moins favorables. Les pratiques simplifiées de travail du sol pour l'implantation du blé associées aux rotations courtes (tournesol-blé) contribuent au maintien de l'inoculum de *Phoma* au niveau régional (Pinochet, 2003 ; Jouffret, 2005 ; Taverne, 2005). L'enfouissement profond des résidus de récolte après tournesol reste à l'heure actuelle le moyen le plus efficace pour limiter la pression de la maladie dans les années à venir (comme cela est recommandé pour le *Phomopsis*) (Cetiom). En non labour, un broyage des résidus en fragments de petite taille et la pratique des couverts végétaux en interculture pourraient atténuer l'effet négatif du maintien en surface des cannes de tournesol. En effet, on peut s'attendre dans ce cas à une dégradation plus efficace des résidus infectés par les microorganismes du sol pendant l'hiver. Le semis direct est très minoritaire en tournesol. Le travail superficiel avant l'implantation du tournesol facilite l'enfouissement des fragments de résidus restés à l'affleurement pendant la culture de blé. Il faut bien invoquer un allo-inoculum (parcelles de blé) plutôt qu'un endo-inoculum pour expliquer les attaques de *Phoma* au collet.

La contamination artificielle par des spores de P. macdonaldii

L'inoculation de plantes de tournesol par une application directe au collet d'une pastille de mycélium ou d'un disque contenant une suspension de spores d'une souche monopycniospore de *P. macdonaldii* s'est avérée particulièrement efficace pour reproduire artificiellement des pieds secs. Cette avancée méthodologique, qui a longtemps été un frein à l'étude de la maladie, a permis d'appréhender les causes du dessèchement précoce. Les méthodes de contamination par des spores de *Phoma* (SAuz08) sont apparues particulièrement efficaces dès lors que les plantes étaient inoculées à des concentrations \geq à 1×10^5 et 1×10^6 spores/ml (Chapitre IV-I). Si les effets de cette méthode sont comparables à ceux observés par du mycélium, une contamination par des spores offre de nombreux

avantages. La faible quantité d'inoculum à produire et la rapidité des inoculations en font une méthode efficace pour l'évaluation de la résistance variétale, l'étude du déterminisme génétique de la plante, et le test de l'efficacité des fongicides.

Par la contamination artificielle, il est possible d'étudier les mécanismes de défense mis en place par la plante, tels que nous les avons observés à la suite de contaminations avec des concentrations variables en spores. Nous avons pu mettre en évidence des différences significatives du taux d'attaque par *P. macdonaldii* et de la proportion de plantes desséchées précocement pour différentes concentrations en spores lors de la contamination (Chapitre IV-I). Les contaminations par de faibles quantités d'inoculum permettraient d'étudier plus finement les réactions de défense mises en place par la plante. Des observations en microscopie pourrait être réalisées pour comparer la colonisation des tissus secondaires (densité des hyphes du champignon) pour différent(e)s (i) morphologies de bas de tige, (ii) diamètres au collet, et (iii) apports d'inoculum. Cette approche permettrait de démontrer plus finement la relation entre la présence du pathogène dans certains tissus et l'apparition du pied sec.

Si la contamination par des spores présente des perspectives intéressantes, l'utilisation de cette méthode doit être validée au champ. Testé lors des essais en serre, le maintien du disque par du Parafilm®M peut présenter certaines limites. En conditions relativement sèches, ou sous l'action du soleil, le film peut se déchirer et entraîner un dessèchement du disque. Au champ, l'humidité sous le couvert devrait potentiellement éviter cette dessiccation du film. Dans le cas d'essais non concluants, il pourrait être intéressant de tester une méthode de contamination alternative au disque de spores et à la pastille de mycélium. Un coton pourrait ainsi être imbibé d'une suspension de spores, puis appliqué au collet et maintenu par de l'aluminium. Une pulvérisation de spores au collet pourrait également être réalisée. Des essais menés par le Cetiom en 2008 et 2009 ont été diversement concluants. Outre la quantité d'inoculum, les conditions climatiques (humidité dans les heures suivant la pulvérisation) peuvent être un frein majeur à la réussite de cette méthode. Une contamination le soir serait à privilégier pour bénéficier de la fraîcheur nocturne et de l'humidité du matin, mais cela constitue une contrainte supplémentaire pour les expérimentateurs.

La conduite de culture est un levier permettant de contrecarrer l'évolution du dessèchement précoce du tournesol

Les premiers essais réalisés au champ en 2006 et 2007 ont permis de mettre en évidence un effet appréciable de la conduite de culture sur le dessèchement précoce du tournesol. Le choix de la variété est apparu comme l'élément le plus simple à manipuler et en moyenne le plus efficace. S'il n'existe à l'heure actuelle aucune variété résistante à ce syndrome, le comportement de la variété cv. Melody, partiellement résistante, a permis de limiter la proportion de pieds secs, en comparaison de la variété sensible cv. Heliasol RM. Une caractérisation de la sensibilité variétale au Phoma et au dessèchement précoce fait actuellement défaut tant au niveau de la sélection que de la post-inscription.

Une alimentation azotée abondante favorise la progression du pathogène dans la plante et rend possible l'expression généralisée du syndrome

Sous la pression de *P. macdonaldii*, en contamination naturelle ou artificielle, l'augmentation de la fertilisation azotée, associée ou non à un régime hydrique limitant après floraison, augmente la sensibilité du tournesol au dessèchement précoce (Chapitre V). Si 100 % des plantes peuvent être affectées après avoir reçu 150 kg N/ha, sans irrigation de complément, une conduite non fertilisée et bien irriguée permet de maintenir ce taux d'attaque autour de 10 % lors d'années propices à l'expression du syndrome. L'azote apparaît donc comme le facteur clé de la progression du champignon dans la plante. Cet effet s'est vérifié chaque année de manière très nette comme cela avait été montré également pour le Phoma sur tige (Debaeke et Pérès, 2003). L'abondance en ressources azotées disponibles pour la croissance de *P. macdonaldii* après un apport fractionné de 150 kg N/ha, par contraste avec un traitement non fertilisé (sur précédent sorgho), fournirait un environnement nutritif plus favorable à la progression et à l'extension du champignon dans la plante. La progression plus rapide et plus étendue des nécroses autour du collet et en direction du nœud cotylédonaire confortent cet effet trophique de l'azote pour le champignon et les conséquences directes de cette colonisation sur la proportion de pieds secs (Chapitre VI-III). Afin de valider cette hypothèse d'un effet trophique de l'azote pour le champignon, il serait intéressant de mettre en place un protocole simple testant la croissance du champignon sur un milieu de culture nutritif, en comparaison d'un milieu pauvre en nutriments azotés. La croissance et la densité

mycélienne varient en fonction de la forme minérale utilisée (organique ou inorganique) (Attrassi et al., 2007).

Une densité de peuplement élevée accélère et amplifie le syndrome de dessèchement précoce

Une densité de peuplement élevée accélère la précocité et l'incidence du dessèchement précoce (Chapitre V-II). Ceci passerait par une modification de la morphologie du bas de tige, et notamment un plus faible diamètre de la tige au collet, en accord avec la littérature (Massey, (1971) ; Sedghi et al. (2008)) (Chapitre VI-I). Si le faible diamètre externe semble favorable à l'encerclement rapide de la tige par *P. macdonaldii*, il peut s'agir également d'un nombre de vaisseaux moins important pour les plantes cultivées en peuplement dense (Raven et al., 2000), et par un diamètre des vaisseaux du xylème de plantes infectées réduit encore par la présence du champignon (Pennypacker and Leath, 1986 ; Mepsted et al., 1995). Cette hypothèse pourrait être validée également par des observations en microscopie.

Un régime hydrique limitant après floraison précipite le dessèchement des plantes par une rupture assez brutale de la transpiration.

La contrainte hydrique mise en place lors des essais au champ et en serre nous a permis de mettre en évidence un effet significatif de ce facteur sur le dessèchement précoce du tournesol et ce, quelque soit la fertilisation azotée et la densité de peuplement (Chapitre V). Les plantes irriguées au champ présentaient à l'inverse une plus faible sensibilité à la maladie. Dans le cas des essais au champ, la fertilisation azotée abondante et la densité de peuplement élevée ont pu significativement accélérer l'apparition du stress hydrique en l'absence d'irrigation et donc l'apparition du syndrome (Haeefele et al., 2008). Le plus fort développement de l'indice foliaire sous l'effet de l'azote et de la densité de peuplement a pu contribuer à augmenter la transpiration des plantes et donc l'épuisement de la réserve en eau du sol (Chapitre V-I) (Debaeke, 2002). Ce stress abiotique peut être responsable à lui seul du déclin rapide de la surface foliaire chlorophyllienne (Sionit and Kramer, 1977 ; de Souza et al., 1997) (Chapitre IV). La conjonction de trois facteurs : (i) réduction du diamètre au collet (densités de peuplement élevées), (ii) réduction du diamètre des vaisseaux (présence du champignon), et (iii) prolifération massive du champignon (apport azoté), précipitent un arrêt brutal de l'alimentation de la plante qui se traduit par un flétrissement (Chapitre IV, V et VI). En présence du champignon, la réduction de la conductance hydraulique, liée à l'obstruction

des vaisseaux et à l'embolie des éléments du xylème, serait ainsi la cause majeure du flétrissement soudain. Une forte demande climatique, associée à une faible disponibilité en eau du sol, ne permet pas d'assurer la demande instantanée de la plante malade, d'où la survenue des symptômes décrits plus haut.

Peut-on décaler l'apparition du syndrome par l'irrigation du tournesol ? Cela mérite d'être testé. Un dispositif au champ comparant différentes dates d'irrigation dans le cas de plantes infectées permettrait d'y répondre. Ceci va dans le sens d'une meilleure connaissance des interactions entre stress biotiques et abiotiques.

Quelles implications opérationnelles pour la conduite de culture du tournesol ?

Trop souvent négligé, le contrôle cultural est le plus souvent préventif ou prophylactique. Mais dans le cas présent, la gestion des résidus, le choix de la variété, de la densité de peuplement, de la fertilisation azotée et de l'irrigation impactent sur l'expression de la maladie, avec des gammes de variation appréciables entre modalités. Il convient donc d'analyser quelles sont les marges de manœuvre disponibles par la conduite de culture pour contenir la pression généralisée du dessèchement précoce dans les parcelles agricoles afin de limiter les pertes de rendements occasionnées par *P. macdonaldii*.

- **La pratique de rotations de culture** plus longues réduirait la quantité d'inoculum, sa distribution spatiale et la fréquence de retour des cultures hôtes. La concentration du tournesol dans certaines régions répond cependant à d'autres préoccupations (marges, marchés, diversification). Allonger les rotations dans certains secteurs et introduire le tournesol dans d'autres régions serait certainement une meilleure pratique sur le plan agronomique et environnemental (Pinochet, 2003 ; Jouffret, 2005).

- **Travail du sol et gestion des résidus.** Idéalement, l'enfouissement profond des résidus de tournesol contaminés permettrait de limiter l'inoculum de *P. macdonaldii* se conservant sur les cannes restées en surface (Poisson-Bammé et Pérès, 2000 ; Pinochet, 2003). Ce moyen de lutte serait le plus efficace pour limiter la dissémination des spores vers les parcelles avoisinantes (Jouffret, 2005). Cependant, pour implanter la céréale suivante, le travail superficiel est la règle dans le Sud-Ouest. On ne peut recommander qu'un broyage préalable au déchaumage ou l'utilisation d'un déchaumeur 'agressif' pour les cannes de tournesol afin de faciliter la fragmentation des résidus, leur enfouissement ultérieur et leur décomposition

dans le sol. L'objectif comme précédemment est de réduire les parcelles avec des résidus de tournesol affleurants ou laissés en surface.

- **Le semis de variétés partiellement résistantes.** Avec les réserves émises plus haut (pas d'évaluation de la résistance), le choix de variétés à bon comportement doit être privilégié (Jouffret, 2005). Il peut s'agir de variétés plus économes en eau qui vont décaler l'apparition du stress de fin de cycle. On peut penser que les variétés récentes, qui ont rencontré le syndrome en phase de sélection seront plus résistantes que précédemment.

- **La date de semis.** Le choix de la date de semis optimale est un compromis toujours difficile à arbitrer entre production potentielle et esquivage des stress biotiques et abiotiques. Les semis précoces (début avril) sont souvent plus exposés aux attaques de Phoma sur tige (Taverne, 2005) mais ils permettent d'esquiver davantage le stress hydrique de fin de cycle, sauf si la croissance initiale est trop exubérante (Jouffret, 2005). Il y a donc un compromis à évaluer entre incidence supérieure des attaques en semis précoces et gravité plus forte de la maladie en semis tardifs, à priori plus exposés à la contrainte hydrique. L'évaluation de la pression maladie devrait ainsi toujours être pratiquée sur des comparaisons expérimentales de date de semis.

- **La densité de peuplement.** Une culture trop dense entretient une humidité au niveau du bas de tige, liée à une mauvaise circulation de l'air dans le couvert, ce qui est en général favorable à l'infection des plantes par des agents pathogènes (Huber et Gillespies, 1992 ; Debaeche et al., 2000). Pour cela, il faut éviter les densités de peuplement supérieures à 6-7 plantes/m² qui peuvent avoir un effet négatif sur le microclimat et le phytoclimat, la morphologie de bas de tige (sensibilité au dessèchement précoce), et favorise des champignons comme le Phomopsis ou le Sclerotinia (Jouffret, 2005 ; Taverne, 2005). A l'inverse les densités trop faibles, favorisant le salissement par les adventices, pourraient s'avérer néfastes pour la culture en raison de la compétition pour l'eau, la compétition pour l'azote limitant à l'inverse la progression du Phoma.

- **Le raisonnement de la fertilisation azotée.** Etant donné la variabilité du reliquat azoté au semis du tournesol (30-180 kg N/ha selon les parcelles agricoles et les années), l'apport d'azote au semis doit être raisonné, en tenant compte des besoins de la culture (potentiel de rendement) et des ressources du milieu (Jouffret, 2005). Une méthode prévisionnelle du bilan

azoté et/ou l'utilisation de l'outil de pilotage Heliotest (Cetiom) permettraient de calculer une dose optimale d'azote à apporter à la parcelle. Or dans la pratique, il a été estimé que le nombre d'agriculteurs apportant plus de 20 unités d'azote en excès était de l'ordre de 40 % dans le Sud-Ouest (Debaeke, communication personnelle). Un ajustement de l'apport d'azote aux fournitures du sol et aux besoins de la culture devrait permettre d'améliorer la marge brute de la culture, notamment par le maintien de la teneur en huile et la prévention des attaques de *P. macdonaldii* (et autres maladies), en particulier dans les zones les plus sèches.

- **Le raisonnement de la protection fongicide.** Aucune intervention fongicide spécifique contre le phoma du collet n'est économiquement justifiée à ce jour (Pinochet, 2003). Par ailleurs, la panoplie de solutions est très limitée. La protection fongicide ne peut s'envisager que dans le cadre d'une protection contre le phomopsis, toujours bien présent dans les zones de production (Jouffret, 2005). Sur une variété résistante (R) au phomopsis, un traitement contre le phoma tige ne doit être envisagé qu'en cas de nécessité d'une application de bore ; les deux produits seront alors à associer dans une même application au stade limite de passage du tracteur (LPT). Sur une variété très peu sensible (TPS) au phomopsis, un traitement contre le phoma au stade LPT sera envisagé en association soit avec le traitement contre le phomopsis soit avec un apport de bore si ceux-ci sont recommandés. Sur une variété peu sensible (PS) au phomopsis, il ne convient de traiter contre le phoma qu'en association avec le traitement contre le phomopsis si ce dernier est recommandé au stade LPT. En l'absence de recommandation de traitement contre le phomopsis, le traitement contre le phoma peut s'envisager en association avec l'apport de bore. Mais il faut alors utiliser un traitement ayant une efficacité à la fois contre le phoma et le phomopsis pour éviter de favoriser le phomopsis avec une protection ciblée uniquement contre le phoma (Mestries, communication personnelle).

- **Irrigation.** Si le tournesol est une des cultures les plus tolérantes aux conditions sèches grâce à son système racinaire qui lui permet d'extraire l'eau du sol en profondeur, la plante répond pourtant bien à l'irrigation autour de la floraison à condition que sa croissance végétative soit modérée (mais non limitante) (Merrien et Milan, 1992). Ainsi, en année sèche et en sol peu profond, 2 apports d'eau de 35 à 40 mm à partir de la floraison, permettent un gain de 8 à 10 q/ha (Cetiom). Dans les zones où le risque de phoma est important, on peut

penser qu'une irrigation fin floraison pourrait limiter le dessèchement précoce, en maintenant un flux transpiratoire pendant le remplissage des akènes.

Vers un outil d'évaluation intégré de l'itinéraire technique tenant compte du complexe parasitaire du tournesol

Le modèle de simulation dynamique SUNFLO (Casadebaig, 2008) permet de décrire le fonctionnement des variétés de tournesol et la production accessible (rendement, huile). Alors que ce modèle ne tient pas compte des pertes de récolte causées par les bioagresseurs, les travaux menés dans cette thèse, rejoignant ceux menés sur le Phomopsis (Debaeke et al., 2001 ; Debaeke et al., 2003), ont montré la nécessité d'intégrer les pressions biotiques pour améliorer la qualité de la prévision (réseau variétal, bassin de collecte d'une coopérative) et disposer d'un outil de réflexion vis-à-vis de la production intégrée des cultures. Un modèle est à l'étude et représentera les effets de la conduite de culture (dont le choix variétal) sur l'élaboration du rendement, les dynamiques des principaux bioagresseurs et la nuisibilité de ces organismes, et intégrera les résultats obtenus sur Phoma dans cette thèse (Desanlis, 2009). La prise en compte de plusieurs agents pathogènes en interaction permettra ainsi (i) la représentation d'une combinaison de méthodes de lutte (chacun des éléments de la conduite pouvant contribuer au contrôle cultural associé à des méthodes de lutte chimique, voire biologique), et (ii) la prise en compte des pertes quantitatives, mais également qualitatives. L'objectif finalisé étant d'appliquer une démarche de production intégrée (Heitefuss, 1989) à la culture de tournesol et à son complexe parasitaire formé principalement par trois maladies responsables de dépérissements précoces: le phomopsis, le phoma et le sclerotinia, toutes très sensibles à la gestion du couvert végétal.

Les connaissances produites ont permis de proposer des implications opérationnelles pour un meilleur pilotage de la culture du tournesol, et de contribuer à l'amélioration de processus décisionnels pour limiter la pression du dessèchement précoce. Cependant certaines connaissances sur le Phoma restent encore à produire en épidémiologie pour la formalisation de ce modèle. Elles portent notamment sur la prédiction de : (i) la quantité d'inoculum initial (endo- et allo-inoculum), permettant de situer le risque initial en fonction de la région, du type de sol et de l'histoire culturale, (ii) la date de libération des spores, et (iii) la perte de rendement et de teneur en huile en fonction de la gravité des dégâts. L'articulation entre la

théorie et la pratique doit alors permettre de proposer une approche structurée et un programme de gestion de la culture selon une approche multicritère (agronomie, protection, production, bioagresseurs) en vue d'évaluer la nuisibilité de ce syndrome.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abou Al Fadil, T. Déterminisme de la tolérance du tournesol à *Phoma macdonaldii* au collet et sur racines: approches génétiques et histologiques. 2006. Thèse Université de Toulouse 185 p.
- Abou Al Fadil, T., Jauneau, A., Martinez, Y., Rickauer, M., Dechamp-Guillaume, G., 2009. Characterisation of sunflower root colonisation by *Phoma macdonaldii*. European Journal of Plant Pathology 124, 93-103.
- Abou Al Fadil, T., Kiani, S.P., Dechamp-Guillaume, G., Gentzbittel, L., Sarrafi, A., 2007a. QTL mapping of partial resistance to Phoma basal stem and root necrosis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Science 172, 815-823.
- Abou Al Fadil, T., Poormohammad, K., Dechamp-Guillaume, G., Gentzbittel, L., Sarrafi, A., 2007b. Genetic control of partial resistance to 'collar' and 'root' isolates of *Phoma macdonaldii* in sunflower. European Journal of Plant Pathology 117, 341-346.
- Aboudrare, A., Debaeke, P., Bouaziz, A., Chekli, H., 2006. Effect of tillage and fallow management on soil water storage and sunflower production in a semi-arid Mediterranean climate. Agric. Water Manage. 83, 183-196.
- AbuQamar, S., Chen, X., Dhawan, R., Bluhm, B., Salmeron, J., Lam, S., Dietrich, R., Mengiste, T., 2006. Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to Botrytis infection. Plant Journal 48, 28-44.
- Al Chaarani, G., Roustae, A., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Barrault, G., Dechamp-Guillaume, G., Sarrafi, A., 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). Theoretical and Applied Genetics 104, 490-496.
- Alabouvette, C., Bremeersch, P., 1975. Deux maladie nouvelles en France dans les cultures de tournesol. Compte rendu des séances de l'académie d'agriculture 61, 626-636.
- Alexandrov, V., 2000. Evaluation of methods for artificial inoculation of sunflower with charcoal rot fungus (*Sclerotium bataticola* taub). Bulg. J. Agric. Sci. 5, 529-532.
- Alignan, M., Hewezi, T., Petitprez, M., Dechamp-Guillaume, G., Gentzbittel, L., 2006. A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus*) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. New Phytologist 170, 523-536.
- Aparicotejo, P.M., Boyer, J.S., 1983. Significance of Accelerated Leaf Senescence at Low Water Potentials for Water-Loss and Grain-Yield in Maize. Crop Science 23, 1198-1202.
- Attrassi, K., Benkirane R., Attarassi B., Badoc, A., Douira, A., 2007. Effet de la source de carbone et d'azote sur la croissance et la sporulation de moisissures des pommes en conservation. Soc. Pharm. Bordeaux, 2007, 146, 211-224.
- Aubertot, J.N., Barbier, J.M., carpentier, A., Gril, J.J., Guichard, L.L.P., Savary, S., Savini, I.V.M., 2006. Chapitre 4: stratégies de protection des cultures. In: Réduire l'utilisation des

pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective " Pesticide, agriculture et environnement

Beckman, C.H., 1964. Host response to vascular infection. Annual Review of Phytopathology 2, 231-252.

Béghin, N., 2008. Déterminisme des prix en regard des productions en France, Europe, Monde. In : Rencontre Technique Regionale CETIOM.

Bert, P.F., Dechamp-Guillaume, G., Serre, F., Jouan, I., de Labrouhe, D.T., Nicolas, P., Vear, F., 2004. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) - 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldi*. Theoretical and Applied Genetics 109, 865-874.

Boerema, G.H., 1970. Additional notes on *Phoma herbarum*. Persoonia 6, 15-45.

Boyer, J.S., 1995. Biochemical and biophysical aspects of water deficits and the predisposition to disease. Ann. Rev. Phytopathol. 33, 251-274.

Brevedan, R.E., Egli, D.B., 2003. Short periods of water stress during seed filling, leaf senescence, and yield of soybean. Crop Science 43, 2083-2088.

Brunet, N., Debaeke, P., Delos, M., Guerin, O., Guichard, L., Guinde, L., Mischler, P., Munier-Jolain, N., Omon, B., Rolland, B., Viaux, P., Villard, A., 2009. Ecophyto R&D – vers des systèmes de culture économes en produits phytosanitaires. Tome II: analyses comparative de différents systèmes en grandes cultures.

Buchanan-Wollaston, V. Earl S. Harrison E. Mathas E. Navabpour S. Page T. Pink D., 2003. The molecular analyses of leaf senescence. Plant Biotechnology Journal 1[1], 3-22.

Campbell, C., Madden, L.V., 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley, New York.

Carson, M., 1991. Relationship between *Phoma* black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. Plant Disease 75, 1150-1153.

Casadebaig, P. Analyse et modélisation de l'interaction Génotype - Environnement - Conduite de culture : application au tournesol (*Helianthus annuus* L.). 2008. Thèse Université de Toulouse 196 p.

Cetiom, 2001a. Tournesol et environnement (1ère partie). Oléoscope 60, 9-23.

Cetiom, 2001b. Tournesol et environnement (2ème partie). Oléoscope 63, 9-21.

Cetiom, 2004. Stades-repères du tournesol. In : CETIOM (Ed.), Guide de l'expérimentateur tournesol 13-15.

Chollet, D., Estragnat, A., Jouffret, P., Lagarde, F., Mestries, E., Penaud, A., Pinochet, X., 2002. Les maladies du tournesol. In: CETIOM (Ed.), Les points techniques du Cetiom 27-63.

Connor, D., Hall, A., 1997. Sunflower physiology. Sunflower Technology and Production. Agronomy Monograph 35, 67-113.

- Darvishzadeh, R., Dechamp-Guillaume, G., Hewezi, T., Sarrafi, A., 2007. Genotype-isolate interaction for resistance to black stem in sunflower (*Helianthus annuus*). Plant Pathology 56, 654-660.
- Darvishzadeh, R., Sarrafi, A., 2007. Genetic analysis of partial resistance to black stem (*P. macdonaldii*) in sunflower. Plant Breed. 126, 334-336.
- Davet, P., 1976. Comportement sur divers substrats des champignons associés à la maladie des racines ligneuses de la tomate au Liban. Ann. Phytopathol. 8, 159-169.
- Davet, P., 1996, Vie microbienne du sol et production végétale. Editions Quae. 383 p.
- Davet, P., Serieys, H., 1987. Relation entre la teneur en sucres réducteurs ds tissus du tournesol (*Helianthus annuus* L.) et leur invasion par *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Phytopathology 118, 212-219.
- Davies, S.L., Turner, N.C., Siddique, K.H.M., Plummer, J.A., Leport, L., 1999. Seed growth of desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) in a short-season Mediterranean-type environment. Australian Journal of Experimental Agriculture 39, 181-188.
- Debaeke, P., 2002. Des pistes pour prévoir les effets de la conduite du tournesol sur les maladies. Oléoscope 67, 23-25.
- Debaeke, P., Aboudrare, A., 2004. Adaptation of crop management to water-limited environments. Eur. J. Agron. 21, 433-446.
- Debaeke, P., Delos, M., Moinard, J., Berault, S., Lambert, R., 2000a. Prise en compte du couvert de tournesol dans la simulation des épidémies de *Diaporthe helianthi* par le modèle ASPHODEL. Annales 6ème Conf. Int. Maladies des Plantes, AFPP, Tours, France, 6-8 Déc. 2000, 251-258
- Debaeke, P., Estragnat, A., Peres, A., Piasentin, S., 2000b. Recherche d'indicateurs du couvert pour la précision précoce du risque phomopsis. Annales 15ème Conf. Int. du Tournesol, ISA, Toulouse, France, 12-15 June 2000, Vol. 1, 38-43.
- Debaeke, P., Estragnat, A., Reau, R., 2003. Influence of crop management on sunflower stem canker (*Diaporthe helianthi*). Agronomie 23, 581-592.
- Debaeke, P., Pérès A, Estragnat, A., 2001. Caractérisation et prévision de l'impact des conduites culturales du tournesol sur la fréquence et la gravité des attaques de phomopsis, phoma et sclerotinia. Rapport final ONIOL 1998-2000, 49 p
- Debaeke, P., Pérès, A., 2003. Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on Phoma black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). Crop Protection 22, 741-752.
- Debaeke, P., Rafaillac, D., 2006. Normalized SPAD index and Nitrogen Nutrition Index(NNI): two indicators of plant N status for sunflower crop. Annales 9ème Congrès ESA, Varsovie, Pologne, 4-7 September 2006, 83-84.

- Delforio, G., Franz, E., Fink, S., Schwarze, F., 2009. Host responses in the xylem of trees after inoculation with six wood decay fungi differing in invasiveness. *Botany* 87, 26-35.
- Delos, M., Caron, D., Penaud, A., Naibo, B., Faure, A., 2002. La lutte prophylactique, approche transversale des moyens de lutte permettant de réduire ou d'éviter le recours à la lutte chimique contre les ravageurs et les maladies des grandes cultures : un nouveau regard sur des méthodes anciennes. *Annales 2ème Conf. Int. sur les moyens alternatifs de lutte contre les organismes nuisibles aux végétaux*, Lille, France, 4-7 mars 2008, 14-22.
- Delos, M., Moinard, J., 1996. Asphodel: Modèle de simulation des épidémies de *Phomopsis* du tournesol (*Diaporthe helianthi*). *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 61, 555-565.
- Desanlis M., 2009. Représentation des pertes de récolte engendrées par une maladie dans un modèle de culture du tournesol. *Mémoire Ingénieur, INP-ENSAT*, 65 p.
- DeSouza, P.I., Egli, D.B., Bruening, W.P., 1997. Water stress during seed filling and leaf senescence in soybean. *Agronomy Journal* 89, 807-812.
- Donald, P., Hartman, C., Venette, J., Secor, G., 1987. Response of sunflowers to culture filtrates from *Phoma macdonaldii*. *Phytopathology* 75, 466-468.
- Edmunds, L.K., 1964. Combined relation of plant maturity, temperature and soil moisture to charcoal stalk rot development in grain sorghum. *Phytopathology* 54, 514-517.
- Flint, M.L., Gouveia, P., 2001. IPM in practice : principles and methods of integrated pest management. University of California, Davis, USA. 344 p
- Frezzi, M.J., 1964. Especie del genero *Phoma* parasita de *Helianthus annuus* L. en Manfredi (Cordoba), Republica Argentina. *Idia* 37-40.
- Frezzi, M.J., 1968. *Leptosphaeria lindquisti* n.sp., forma sexual de *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc., hongo causal de la "mancha negra del tello" del girasol (*Helianthus annuus* L.) (en Argentin). *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 5, 77-80.
- Gan, S.S., Amasino, R.M., 1997. Making sense of senescence - Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* 113, 313-319.
- Gomez, K.A. and A.A. Gomez, 1984, *Statistical procedures for agricultural research* (Wiley Ed., New, York), 680 p.
- Gubbels, G.H., Dedio, W., 1988. Response of sunflower Hybrids to row spacing. *Can. J. Plant Sci.* 68, 1125-1127.
- Guillaumin, J.J., Pierson, J., 1976. Le tournesol, une culture en expansion, et ses maladies cryptogamiques. Les maladies de dessèchement et de rabougrissement. *Phytoma* 8-13.
- Gulya, T., Charlet, L., Donald, P., Venette, J., 1984. What do we know about premature ripening? *The sunflower (USA)* 10, 20-21.

- Gulya, T., Rashid, K.Y., Masirevic, S.M., 1997. Sunflower diseases: Phoma black stem. In: Schneiter, A. A. (Ed.), Sunflower Technology and Production. Agronomy Monograph no. 35. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, USA, 319-322.
- Haefele, S.M., Jabbar, S.M.A., Siopongco, J.D.L.C., Tirol-Padre, A., Amarante, S.T., Cruz, P.C.S., Cosico, W.C., 2008. Nitrogen use efficiency in selected rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under different water regimes and nitrogen levels. *Field Crops Research* 107, 137-146.
- Heitefuss, R., 1989. Crop and plant protection: The practical foundations. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England, 1989. 261 pp. The practical foundations. 261 p.
- Hoes, J.A., Huang, H.C., 1975. Importance of disease to sunflower in Manitoba in 1975. *Canadian Plant Disease Survey* 56, 75-76.
- Huber, D.M., Gillespie, T.J., 1992. Modelling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. *Ann. Rev. Phytopathol* 30, 553-577.
- Huber, D.M. and Thompson, L.A., 2007. Mineral nutrition and plant disease. St. Paul, Minnesota, pp. 31-43.
- Huber, D.M., Watson, R.D., 1974. Nitrogen form and plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 12, 139-165.
- Human, J.J., Dutoit, D., Bezuidenhout, H.D., Debruyne, L.P., 1990. The Influence of Plant Water-Stress on Net Photosynthesis and Yield of Sunflower (*Helianthus Annuus* L). *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift fur Acker und Pflanzenbau* 164, 231-241.
- Jensen, B., Munk, L., 1997. Nitrogen-induced changes in colony density and spore production of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* on seedlings of six spring barley cultivars. *Plant Pathology* 46, 191-202.
- Jimenez-Diaz, R.M., Blanco-Lopez, M.A., Sackston, W.E., 1983. Incidence and distribution of charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* in Spain. *Plant Disease* 67, 1033-1036.
- Jouffret, P., 2005. Stratégie de lutte durable contre le phomopsis et le phoma. *Oléoscope* 80, 28-30.
- Labreuche J., Le Souder c., Castillon P., Ouvry J.F., Real B., Germon J.C., De Tourdonnet S. (coordinateurs), 2007. Evaluation des impacts environnementaux des techniques culturales sans labour en France. ADEME-ARVALIS Institut du végétal-INRA-APCA-AREAS-ITB-CETIOMIFVV. 400 p
- Larfeil, C. La maladie des taches noires du tournesol causée par *Phoma macdonaldii* Boerema: Variabilité phénotypique et moléculaire – Evaluation de la sensibilité des génotypes à la maladie – Modalités de l'infection. 2003. Thèse INP Toulouse 102 p.
- Lemaire, G., Gastal, F., 1997. N uptake and distribution in plant canopies. Diagnostic of the Nitrogen Status in Crops. Springer-Verlag, Berlin, pp. 3-43.

- Lemmens, M., Buerstmayr, H., Krska, R., Schuhmacher, R., Grausgruber, H., Ruckenbauer, P., 2004. The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on Fusarium head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. *European Journal of Plant Pathology* 110, 299-308.
- Lepoivre, P., 2003, *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte biologique végétale*.
- Lucas, J.A., Dickinson C.H., 1998, *Plant pathology and plant pathogens* (Wiley-Blackwell Ed., Nex York). 274 p.
- Manici, L.M., Capute, F., Cerato, C., 1995. Temperature responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climatic regions of sunflower production in Italy. *Plant Disease* 79, 834-838.
- Maric, A., Camprag, D., Masirevic, S.M., 1987. La tacheture noire du tournesol (*Phoma macdonaldii* Boerema ; synonymes : *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc. Stade terminal : *Leptosphaeria lindquisti* Frezzi). (En Serbo-Croitian). *Bolesti istetocine suncokretai njihovo suzbijanje* 37-45.
- Maric, A., Crampag, G., Masirevic, S.M., 1983. *Bolesti i stetocine suncokreta i njihovo suzbijanje*. Nolit, Belgrade, 1983 37-45.
- Maric, A., Masirevic, S., Fayzalla, S., 1981. Presence of *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi, last stage of *Phoma macdonaldii* Boerema, causal agent of Black spot of sunflowers in Yugoslavia. (in Serbo-Croitian). *Zastija bilja* 32, 329-344.
- Maric, A., Schneider, R., 1979. Black spot of sunflowers in Yugoslavia and its causal agent *Phoma macdonaldii* Boerema. *Phytopathologische Zeitschrift* 94, 226-233.
- Masclaux, C., Valadier, M., Brugiere, N., Morot-Gaudry, J., Hirel, B., 2000. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211, 510-518.
- Masirevic, S., Gulya, T.J., 1992. Sclerotinia and Phomopsis - 2 Devastating Sunflower Pathogens. *Field Crops Research* 30, 271-300.
- Massey, J.H., 1971. Effects of Nitrogen Rates and Plant Spacing on Sunflower-D Seed Yields and Other Characteristics. *Agronomy Journal* 63, 137-138.
- McDonald, W.C., 1964. Phoma Black stem of suflower. *Phytopathology* 54, 492-493.
- Mepsted, R., Flood, J., Cooper, R.M., 1995a. Fusarium-Wilt of Oil Palm .1. Possible Causes of Stunting. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46, 361-372.
- Mepsted, R., Flood, J., Cooper, R.M., 1995b. Fusarium-Wilt of Oil Palm .2. Stunting As A Mechanism to Reduce Water-Stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46, 373-387.
- Merrien, A. and M.J.Milan, 1992, *Physiologie du tournesol*, Ed Cetiom. Paris, 65 p.

- Meynard, J.M., Doré, T., Lucas, P., 2003. Agronomic approach : cropping systems and plant diseases. CR Biol 326, 37-46.
- Miric, E., Aitken, E.A.B., Goulter, K.C., 1999. Identification in Australia of the quarantine pathogen of sunflower *Phoma macdonaldii* (Teleomorph : *Leptosphaeria lindquistii*). Australian Journal of Agricultural Research 50, 325-332.
- Morot-Gaudry, J.F., 1997, aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Morot-Gaudry Ed., 422 p.
- Nardini, A., Salleo, S., 2005. Water stress-induced modifications of leaf hydraulic architecture in sunflower: co-ordination with gas exchange. Journal of Experimental Botany 56, 3093-3101.
- Nolot, J. M. and Debaeke, P. Principes et outils de conception, conduite et évaluation de systèmes de culture. Cahiers agricultures 12[6], 387-400. 2003.
- Olesen, J.E., Jorgensen, L.N., Petersen, J., Mortensen, J.V., 2003. Effects of rate and timing of nitrogen fertilizer on disease control by fungicides in winter wheat. 1. Grain yield and foliar disease control. Journal of Agricultural Science 140, 1-13.
- Pageau, K., Reisdorf-Cren, M., Morot-Gaudry, J., Masclaux-Daubresse, C., 2006. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. Journal of Experimental Botany 57[3], 547-557.
- Palti, J., 1981. Cultural practices and infection crop diseases. Springer-Verlag. ; Berlin, German Federal Republic. 243 p.
- Penaud, A., 1996. Phoma du tournesol: recherche des !epoques de contamination et mise au point de la protection fongicide. Annales 14ème Conf. Int. du Tournesol ISA, Beijing, China, 1996, 694-699.
- Penaud, A., 1997. Phomopsis et tournesol, vers une stratégie de lutte commune. Oléoscope 38, 16-17.
- Penaud, A., Pérès, A., 1994. Numéro spécial: Phoma du tournesol, n°15, CETIOM. Oléoscope, 37 p.
- Pennypacker, B.W., Leath, K.T., 1986. Anatomical Response of A Susceptible Alfalfa Clone Infected with *Verticillium Albo Atrum*. Phytopathology 76, 522-527.
- Pérès A, Le Sourne, 2000. le Phoma du tournesol (*Leptosphaeria lidquistii*) : étude des périthèces et des pycnides dans le processus de la contamination. Annales 6ème Conf. Int. Maladies des Plantes, AFPP, Tours, France, 6-8 Déc. 2000, 314-321.
- Pérès A, Poisson, B., 1998. Dessèchement prématuré du tournesol : premières approches explicatives. Rencontres annuelles du Cetiom-Tournesol 40-42.

- Pérès A, Poisson-Bammé, B., 1999. Pied sec du tournesol: les connaissances progressent. *Oléoscope* 52, 27-30.
- Pérès A, Poisson-Bammé, B., 2000. The early withering of sunflower ("dry plant"): the part played by *Phoma* and study of the contamination (in French). *Annales 6ème Conf. Int. Maladies des Plantes, AFPP, Tours, France, 6-8 Déc. 2000*, 323-329.
- Pérès, A., Allard, A.M., Deverchère, J., Penaud, A., 1994. *Phoma* du tournesol: étude de la protection fongicide au champ. *Annales 4ème Conf. Int. Maladies des maladies des plantes, Bordeaux, France 1994*, 179-185.
- Pérès, A., Letof, C., 1996. *Phoma macdonaldii* Boerema: éléments de biologie et mise au point d'une méthode de contamination artificielle en conditions contrôlées. *Annales 14ème Conf. Int. du Tournesol ISA, Beijing, China, 1996*, 687-693.
- Pérès, A., Poisson, B., Drolon, G., 2000. Le syndrome "pieds secs" du tournesol: étude des causes et approche de la nuisibilité. *Annales 15ème Conf. Int. du Tournesol ISA, Toulouse, France, 12-15 Juin 2000, Vol. 2(I)*, 17-21.
- Pilorgué, E., 1997. Tournesol: Phomopsis et *Phoma* - Une histoire très différente. *Oléoscope* 38, 10-11.
- Pinochet, X., 1997. Tournesol: Phomopsis et *Phoma* - Repérer les variétés "tolérantes". *Oléoscope* 38, 19-21.
- Pinochet, X., 2003. *Phoma* du tournesol. *Rencontres techniques régionales du Cetiom-Tournesol*, 30-40.
- Poisson-Bammé, B., Pérès, A., 2000. Survie du *phoma* du tournesol (*Leptosphaeria lindquistii*) sur les résidus de récolte. *Annales 6ème Conf. Int. Maladies des Plantes, AFPP, Tours, France, 6-8 Déc. 2000*, 331-338.
- Put, H.M.C., Clerkx, A.C.M., 1988. The infiltration ability of microorganisms *Bacillus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces* and *Pseudomonas* spp Into Xylem Vessels of *Gerbera* cv. "Fleur" and *Rosa* cv. "Sonia" cut flowers: a scanning electron microscope study. *Journal of Applied Bacteriology* 64, 515-530.
- Rachid Al-Chaarani, G., Roustae, A., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Barrault, G., Dechamp-Guillaume, G., Sarrafi, A., 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theoretical and Applied Genetics* 104, 490-496.
- Raven, P.H., R.F. Evert, Eichhorn S.E., and Bouharmont J., 2003, *Biologie végétale*. De Boeck Université (Ed.), 968 p.
- Robb, J., Smith, A., Busch, L., 1981. Wilts caused by *Verticillium* species. A cytological survey of vascular alterations in leaves. *Canadian Journal of Botany* 60, 825-837.
- Roustae, A., Barrault, G., Dechamp-Guillaume, G., Lesigne, P., Sarrafi, A., 2000a. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. *Plant Pathology* 49, 396-401.

- Roustae, A., Costes, S., Dechamp-Guillaume, G., Barrault, G., 2000b. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (anamorph: *Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathology* 49, 227-234.
- Sackston, W.E., 1950. Sunflower diseases in Manitoba in 1949. *Annu. Rep. Can. Plant Dis. Surv.* 29th I. L. Conner and D. B. O. Savile, compilers. Can. Dep. Agric. Sci. Serv. Div. Bot. Plant Pathol. 35, 31-35.
- Saumon, E., Herbach, M., Goore, B.K., Davet, P., 1984. Le dessèchement précoce des tournesols. Dynamique de la colonisation des plantes par les champignons du sol et envahissement tardif par *Macrophomina phaseolina*. *Agronomie* 4, 805-812.
- Schneider, O., Roger-Estrade, J., Aubertot, J.N., Dore, T., 2006. Effect of seeders and tillage equipment on vertical distribution of oilseed rape stubble. *Soil & Tillage Research* 85, 115-122.
- Schneiter, A.A., Miller, J.F., 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* 21, 901-903.
- 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 Crop Res.* 115, 99-106.
- Sedghi, M., Sharifi, R., Namvar, A., Khandan-e-Bejandi, Molaei, P., 2008. Responses of sunflower yield and grain filling period to plant density and weed interference. *Research Journal of Biological Sciences* 3,
- Shigo, A.L., 1982. Tree decay. in: *Proc. Forest disease and insect pests Korea-USA Joint Seminar*, Seoul, Korea [1] 88-203.
- Sionit, N., Kramer, P.J., 1977. Effect of Water Stress During Different Stages of Growth of Soybean. *Agronomy Journal* 69, 274-278.
- Stanojevic, D., 1985. Relationship between stand density and microclimate and their effect on some characters of sunflower. *Annales 11ème Conf. Int. du Tournesol ISA*, Mar del Plata, Argentine, 1985, 301-306.
- Taverne, M., 2005. Effet du milieu sur le phomopsis et le phoma. *Oléoscope* 80, 16-18.
- Tavernier, V., Cadiou, S., Pageau, K., Lauge, R., Reisdorf-Cren, M., Langin, T., Masclaux-Daubresse, C., 2007. The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of Experimental Botany* 58 [12], 3351-3360.
- Taylor, A., 1965. Wheat crop surveys in southern New South Wales. 2. Haying-off in commercial wheat crops. *Aust. J. Exp. Agric.* 5, 491-494.
- Thomas, H., Stoddart, J.L., 1980. Leaf Senescence. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 31, 83-111.

- Thuault, M.C., Tourvielle, D., 1988. Etudes du pouvoir pathogène de huit isolats de *Sclerotinia* appartenant aux espèces *S. sclerotiorum*, *S. minor* et *S. trifoliorum* sur le tournesol. Int. Tech. CETIOM 103, 21-27.
- Tourvielle de Labrouhe, D., Pilorgué, E., Nicolas, P., Vear, F., 2000. Le mildiou du tournesol. In: CETIOM (Ed.), Points techniques.
- Vear, F., Bony, H., Joubert, G., Tourvielle de Labrouhe, D., Pauchet, I., Pinochet, X., 2003. 30 years of sunflower breeding in France. OCL. Oleagineux, corps gras, lipides 10, 66-73.
- Velazquez, P.D., Formento, N., 2000. Effect of nitrogen fertilization on stem black spot (*Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc.) in four genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). AgriScientia 17, 41-47.
- Viguié, A., Serre, F., Walser, P., Vear, F., Tourvielle de Labrouhe, D., 2000. The use of natural infections under controlled conditions and of artificial infections to estimate Phomopsis resistance of sunflower hybrids: conclusions after ten years of trials. In: Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, 12–15 June 2000, Toulouse, France, vol. 2, 78–83.
- Walters, D.R., Bingham, I.J., 2007. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. Annals of Applied Biology 151, 307-324.
- Weeraratne, W., Priyantha, M., 2003. First report of Phoma black stem of sunflower in Sri Lanka and its management. Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture 5, 263-270.
- Whitfield, D.M., Connor, D.J., Hall, A.J., 1989. Carbon-Dioxide Balance of Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) Subjected to Water-Stress During Grainfilling. Field Crops Research 20, 65-80.
- Yegappan, T.M., Paton, D.M., Gates, C.T., Muller, W.J., 1982. Water-Stress in Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) .3. Responses of Cypsela Size. Annals of Botany 49, 69-75.
- Young, H.C., 1943. The Toothpick Method of Inoculating Corn for Ear and Stalk Rots. Phytopathology 33, pp. 16
- Zadocks, J.C., 1993. Cultural methods. In Modern crop protection : development and perspectives. Zadocks Ed. Wageningen press. Wageningen. The Netherland 167-170.

Annexes

Annexe 1 : Stades de développement du tournesol

Un stade est atteint lorsque 50% des plantes sont à ce stade

Germination – levée



Stade A1 (1.0) : apparition des hypocotyles en crosse



Stade A2 (1.1) : émergence des cotylédons et premières feuilles visibles

Phase végétative



Stade B3/B4 (2.3/2.4) : La seconde paire de feuilles opposées apparaît et mesure environ 4 cm de long ; les pétioles sont visibles du dessus.

Phase bouton floral



Stade E1 (3.1) : apparition du bouton floral étroitement inséré au milieu des jeunes feuilles : stade bouton étoilé.



Stade E2 (3.2) : 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 (3.4) : 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 (4.1) : le bouton floral s'incline ; les fleurs ligulées sont perpendiculaires au plateau.



Stade F3.2 (4.3) : 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.

Maturation



Stade M0 (5.0) : chute des fleurs ligulées. Le dos du capitule est encore vert.



Stade M2 (5.2) : le dos du capitule est jaune. Les bractées sont au 3/4 brunes. L'humidité de la graine avoisine 20–25%.



Stade M3 (5.3) : le dos du capitule est marbré de brun. Les bractées sont brunes. La tige se dessèche. L'humidité de la graine avoisine 15%.



Stade M4 (5.4) : tous les organes de la plante sont brun foncé. L'humidité de la graine avoisine 10%.

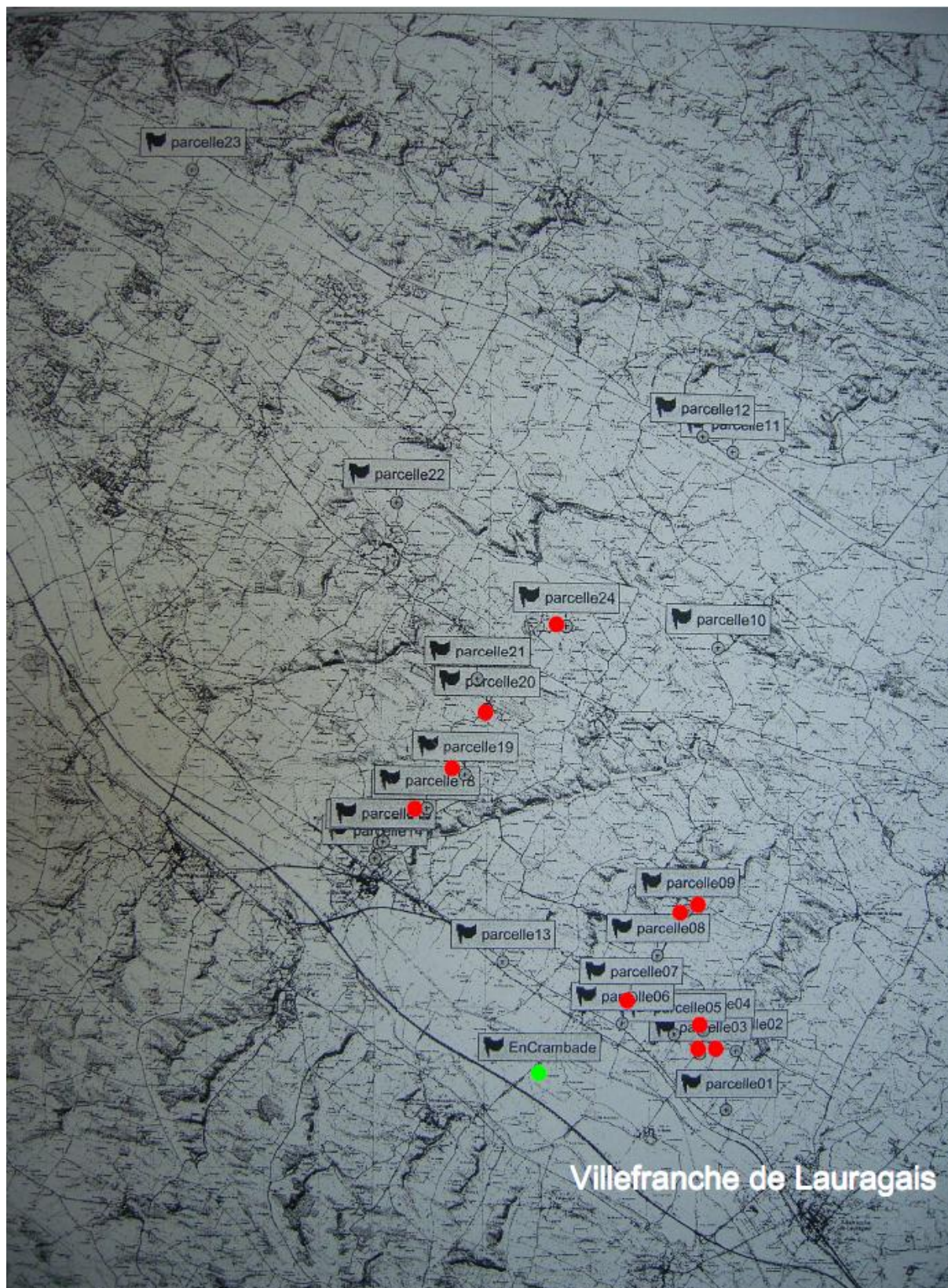
Annexe 2 : Stades de développement du bouton floral, de la floraison et de la maturation du tournesol
(Photos de Didier Raffailac)



Annexe 3 : Caractéristiques des variétés cv. Héliasol RM et cv. Melody et de leur sensibilité aux maladies : Assez Sensible (AS), Moyenne (M) ou Peu Sensible (PS). (Source : Oléovar).

Critère	Héliasol RM	Mélody
Profil d'acides gras	Classique	Classique
Précocité à maturité	mi-précoce	mi-tardive
Année d'inscription	2000	1996
Pays d'inscription	France	France
Représentant en France	Semences de France	Syngenta seeds
Code obtenteur	AK9314	X12244
Hauteur	Courte	Haute
Teneur en huile	Elevée	Faible
Taille des graines	Moyenne	Moyenne
Statut mildiou	M	M
Sensibilité aux maladies		
Phomopsis	PS	PS
Sclerotinia collet	AS	PS
Sclerotinia bouton	PS	PS
Sclerotinia capitule	PS	PS

Annexe 4 : Parcelles agricoles suivies par le Cetiom dans le Lauragais (31). Les points rouges correspondent aux parcelles où des prélèvements de plantes ont été effectués pour les analyses pathologiques en fin de cycle de la culture de tournesol. Les souches de *Phoma macdonaldii* et de *Macrophomina phaseolina* sont issues des parcelles 4 et 9 respectivement.



Annexe 5 : Pourcentage de plantes en voie de dessèchement et desséchées (note 3-4), uniquement pied sec (note 4), et description de la répartition des pieds secs dans les 14 zones des 8 parcelles du Lauragais (31) en fin de cycle de la culture du tournesol.

Parcelle	Date d'observation	% plantes note 3-4	% de pieds secs (note 4)	Description de la répartition des pieds secs dans la parcelle
3 A1	29/08/06	84	19	2 grosses zones de pieds secs dans la parcelle, dont une couvrant environ 50% de la surface, l'autre 5%
3 A2	29/08/06	86	16	
3 B1	04/09/06	72	17	plusieurs zones coalescentes dans le haut du coteau, autres zones plus définies dans la pente et le bas du coteau
4 A1	22/08/06	98	49	une zone de pieds secs très dense dans tout le haut de la parcelle (50%) et 3 zones en train de se dessiner dans le fond
4 A2	22/08/06	32	2	
7 A1	17/08/2006	10	2	bande de pieds secs en descendant le long de la bordure gauche de la parcelle (vue l'entrée de la parcelle) et grosse zone de pieds secs dans le creux
7 A2	17/08/2006	66	23	
9 A1	22/08/06	40	7	Pieds secs disséminés, pas de zones.
9 B1	22/08/06	90	41	larges zones de dessèchement sur le haut du coteau et dans la pente
9 B2	22/08/06	98	48	
9 B3	22/08/06	58	12	
17_18	06/09/2006	68	23	une zone de pieds secs dans le fond de la parcelle
19	22/08/06	86	22	Zone de pieds secs visibles depuis longtemps sur le haut de la parcelle. Ailleurs, quelques taches de quelques mètres de diamètre.
20	29/08/06	70	15	Grosse zone de pieds secs centrale. Seul le bas-fond de la parcelle est préservé
24	22/08/06	100	46	Dessèchement généralisé - très peu de pieds encore verts

Annexe 6 : Dispositif expérimental mis en place au champ à Auzeville en 2008 et qui représente la répartition des parcelles non irriguées (gauche) et irriguée (droite), La fertilisation azotée appliquée en bandes à 0, 75, 150 kg/ha, la densité de peuplement (4, 6.5 et 9 plantes/m²), le traitement contamination (artificiel, naturel par *P. macdonaldii*, ou traité) pour la variété cv. Heliasol RM.

en sec (précédent maïs)												en irrigué (précédent sorgho)																			
passage tracteur				passage d'irrigation				passage tracteur				passage tracteur																			
HORS ESSAI				HORS ESSAI				HORS ESSAI				HORS ESSAI																			
1	D2 - 1	13	D3 - 1	25	D1 - 3	37	D3 - 1	49	D2 - 3	61	D1 - 2	73	D2 - 1	85	D3 - 1	97	D1 - 3	109	D3 - 1	121	D2 - 3	133	D1 - 2								
2	D1 - 1	14	D2 - 1	26	D2 - 3	38	D1 - 1	50	D1 - 2	62	D2 - 2	74	D1 - 1	86	D2 - 1	98	D2 - 3	110	D1 - 1	122	D3 - 2	134	D2 - 2								
3	D3 - 1	15	D1 - 1	H.E D2		39	D2 - 1	51	D3 - 2	63	D3 - 2	75	D3 - 1	87	D1 - 1	99	D3 - 3	111	D2 - 1	123	D1 - 2	135	D3 - 2								
4	D2 - 1	16	D2 - 1	tampon		40	D3 - 2	52	D2 - 2	64	D2 - 3	76	D2 - 1	88	D2 - 1	tampon		112	D3 - 2	124	D2 - 2	136	D2 - 3								
5	D3 - 2	17	prélèv	28	D1 - 2	41	D2 - 2	53	prélèv	65	D3 - 3	77	D3 - 2	89	prélèv	100	D1 - 2	113	D2 - 2	125	prélèv	137	D3 - 3								
6	D1 - 2	18	D2 - 2	29	D2 - 2	42	D1 - 2	54	D1	66	D1 - 3	78	D1 - 2	90	D2 - 2	101	D2 - 2	114	D1 - 2	126	D1	138	D1 - 3								
7	D2 - 2	tampon		30	D3 - 2	tampon		55	D1 - 3	tampon		79	D2 - 2	tampon		102	D3 - 2	tampon		127	D1 - 3	tampon									
8	D1	19	D1 - 1	31	D2 - 3	43	prélèv	56	D2 - 3	67	D2 - 2	80	D1	91	D1 - 1	103	D2 - 3	115	prélèv	128	D2 - 3	139	prélèv								
9	prélèv	20	D3 - 1	32	D2 - 3	44	D2 - 1	57	D3 - 3	68	prélèv	81	prélèv	92	D3 - 1	104	D2 - 3	116	D2 - 1	129	D3 - 3	140	D2 - 2								
tampon		21	D2 - 1	33	D1 - 3	45	D2 - 1	tampon		69	D2 - 3	tampon		93	D2 - 1	105	D1 - 3	117	D2 - 1	tampon		141	D2 - 3								
10	D3 - 1	22	D2 - 2	34	D3 - 3	46	D3 - 1	58	D3 - 3	70	D1 - 3	82	D3 - 1	94	D2 - 2	106	D3 - 3	118	D3 - 1	130	D3 - 3	142	D1 - 3								
11	D1 - 1	23	D1 - 2	35	D1	47	D1 - 1	59	D1 - 3	71	D2 - 3	83	D1 - 1	95	D1 - 2	107	D1	119	D1 - 1	131	D1 - 3	143	D2 - 3								
12	D2 - 1	24	D3 - 2	36	prélèv	48	D2 - 2	60	D2 - 3	72	D3 - 3	84	D2 - 1	96	D3 - 2	108	prélèv	120	D2 - 2	132	D2 - 3	144	D3 - 3								
N0				N75				N150				N0				N0				N75				N150				N0			

6 m

Parcelle élémentaire: 4.6 m x 3.0 m

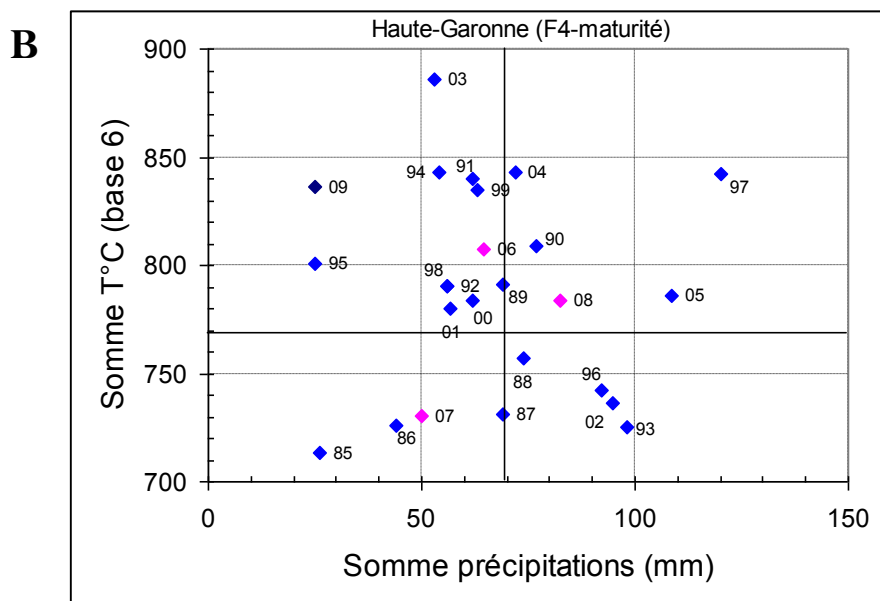
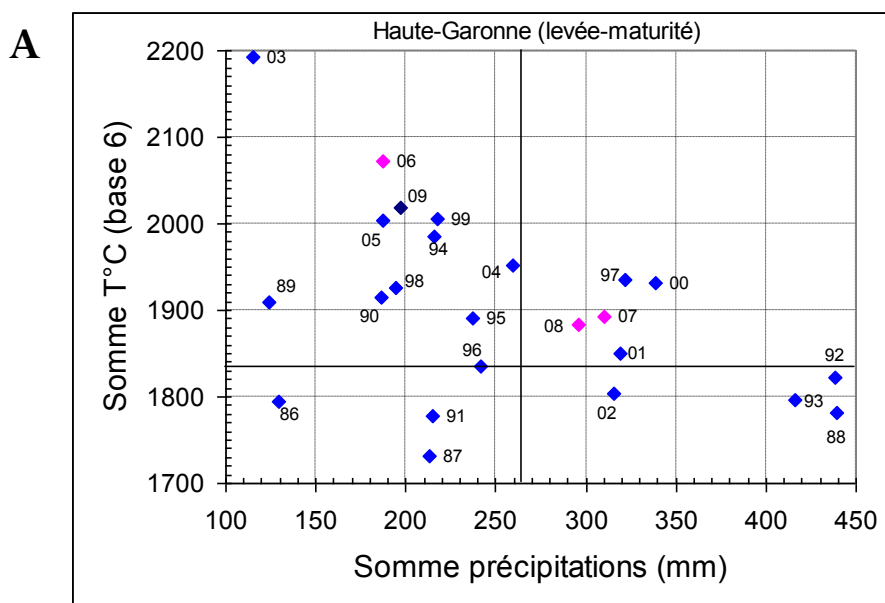
TR	parcelle traitée fongicide
PA	parcelle non traitée fongicide - phoma contamination artificielle: pastille de Phoma macdonaldii
PN	parcelle non traitée fongicide - phoma contamination naturelle

1	D2 - 1	n° parcelle	densité - n° répétition
---	--------	-------------	-------------------------

D1	3.9 plantes/m ²	9 plantes /ligne (4.60 m)	36 plantes /parcelle (4 rangs centraux)
D2	6.5 plantes/m ²	15 plantes /ligne (4.60m)	60 plantes /parcelle (4 rangs centraux)
D3	9.1 plantes/m ²	21 plantes /ligne (4.60m)	84 plantes /parcelle (4 rangs centraux)

N0	0 u
N75	75 u/ha semis
N150	75 u/ha semis + 75 u/ha stade bouton floral

Annexe : 7. Conditions climatiques (somme de température, précipitations) sur la période levée-maturité (A) et F4-maturité (B) en Haute-Garonne (1) de 1985 à 2009 (CETIOM).



Étiologie du syndrome de dessèchement précoce du tournesol : implication de *Phoma macdonaldii* et interaction avec la conduite de culture

Le dessèchement précoce du tournesol résulte d'une infection de bas de tige par *Phoma macdonaldii* qui provoque une nécrose encercleante et un rétrécissement du diamètre du collet. Cette attaque entraîne une sénescence foliaire brutale occasionnant des pertes dommageables pour la culture. Des contaminations artificielles par des spores ou du mycélium de *P. macdonaldii* ont permis de reproduire artificiellement des pieds secs et confortent l'implication de ce champignon dans ce syndrome. Dans un contexte où la protection chimique et la résistance variétale sont limitées, la maîtrise de *P. macdonaldii* par le contrôle cultural pourrait constituer une alternative efficace. Des essais au champ et en serre menés de 2006 à 2009 à l'INRA et au Cetiom ont permis de mettre en évidence l'importance de la conduite de culture du tournesol sur la fréquence et la gravité du dessèchement précoce et de mieux comprendre l'étiologie de ce syndrome. Une alimentation azotée importante, un peuplement dense et à un régime hydrique limitant en post-floraison forment trois facteurs particulièrement favorables au développement du syndrome de dessèchement précoce attribué à *P. macdonaldii*. L'alimentation azotée, au travers de la fertilisation, est le principal facteur favorisant la maladie ; le régime hydrique limitant et la densité de peuplement amplifient la maladie. Le faible diamètre de bas de tige (sous de fortes densités) associé à la prolifération du champignon dans le xylème (azote), occasionnerait une réduction de la conductance hydraulique par obstruction des vaisseaux. Amplifiée lorsque la disponibilité en eau du sol est limitante, cet arrêt de la transpiration se traduit par une sénescence anticipée de 40 jours par rapport à la maturité physiologique de peuplement sains.

Mot clés : tournesol, *Leptosphaeria lindquistii*, *Phoma macdonaldii*, dessèchement précoce, étiologie, conduite de culture, fertilisation azotée, évaluation de la maladie.

Etiology of sunflower premature ripening: involvement of *Phoma macdonaldii* and interaction with crop management

Sunflower premature ripening results from an infection by *Phoma macdonaldii* causing lesions girdling the stem base and narrowing the diameter of the collar. This attack induces a sudden leaf senescence damaging for the culture. Artificial inoculations with spores or mycelium of *P. macdonaldii* aimed to reproduce the disease and confirm the involvement of this fungus in this syndrome. In a context where chemical protection and plant resistance are limited, control of *P. macdonaldii* by cultural control could be an effective alternative. Field and greenhouse trials conducted from 2006 to 2009 at INRA and Cetiom showed the importance of sunflower crop management on the frequency and severity of early drying, and better understand the etiology of this syndrome. A significant nitrogen supply, a dense population and a limited water regime post-flowering are particularly conducive to premature ripening. Nitrogen supply is the main factor favoring the disease; limited water regime and density amplify the disease. The small stem base diameter (under high densities) associated with the proliferation of the fungus in the xylem (nitrogen), may reduce hydraulic conductance by vessel blockage. Amplified when soil water availability is limiting, this stop of the transpiration leads to early senescence 40 days before physiological maturity of healthy plants.

Keywords : sunflower, *Leptosphaeria lindquistii*, *Phoma macdonaldii*, premature ripening, etiology, crop management, nitrogen fertilisation, disease assessment.

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Centre INRA Toulouse le 2 février 2010

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Agronomie, écosystèmes et environnement

AUTEUR : Célia Seassau

DIRECTEURS DE THESE : Grégory Dechamp-Guillaume et Philippe Debaeke

LABORATOIRES D'ACCUEIL : UMR INRA/INPT-ENSAT 1248 AGIR (AGrosystèmes et Développement territorial)