Université de Toulouse

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 :
Myriam DESANLIS

le : vendredi 27 septembre 2013

Titre :
Analyse et modélisation des effets de la conduite de culture sur deux maladies cryptogamiques majeures du tournesol :
Phoma macdonaldii et Phomopsis helianthi

Ecole doctorale :
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :
UMR INRA-ENSAT 1248 AGIR

Directeur(s) de Thèse :
Philippe DEBAEKE
Jean-Noël AUBERTOT

Rapporteurs :

Didier ANDRIVON, Directeur de recherche, INRA
Jacques Wery, Professeur, SupAgro

Membre(s) du jury :
Agnès CALONNEC, Chargée de recherche, Examinatrice
Laurent HUBER, Directeur de recherche INRA, Examinateur
Xavier PINOCHET, Directeur scientifique, CETIOM, Examinateur
Philippe DEBAEKE, Directeur de recherche INRA, Directeur de thèse
Jean-Noël AUBERTOT, Chargé de recherche INRA, Co-directeur de thèse

All models are wrong, but some are useful (Box, 1979).

Remerciements

Et voici la phase des remerciements, phase qui marque la fin d'une aventure de 3 ans (avec une prolongation plus maternelle), qu'on a hâte d'écrire et qui parait tellement délicate une fois qu'on l'aborde enfin.

Avant de citer toutes les personnes (ou tout au moins de tenter d'oublier le moins de personnes possible), qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail de thèse, je tenais à remercier les financeurs de ce projet : le CETIOM et la région Midi-Pyrénées, ainsi qu'Agrimip Innovations pour son soutien à ma participation à la 18ème conférence internationale sur le tournesol en Argentine.

Je remercie également les rapporteurs et les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de lire, d'évaluer et de commenter ce travail ainsi que les membres de mon comité de pilotage de thèse pour leurs remarques et commentaires avisés.

Un énorme merci à Philippe Debaeke et Jean-Noël Aubertot pour avoir encadré cette thèse et m'avoir accordé votre confiance pour mener à bien ce projet. Merci JN pour ton optimisme (efficience de 0.5, c'est 50% de bon!), je ne regarderai plus jamais une équation sans me demander si elle est bien homogène. Merci Philippe pour ta disponibilité et pour m'avoir montré un verre à moitié plein quand j'avais tendance à le voir à moitié vide. Votre duo illustre bien la complémentarité entre l'agronomie et la modélisation, tout est question d'optimisation !
Je tiens tout autant à remercier Emmanuelle Mestries qui vient compléter ce duo. Merci pour ta disponibilité et ton aide à chaque instant de cette thèse. Ton entrain et ton dynamisme apportent le sourire en toute circonstance.

Cette thèse a également été un énorme travail de terrain. Merci à Laure Lagarrigue d'avoir supporté mes protocoles d'expérimentations, d'avoir compté et mesuré des taches en mode commando dans les tournesols sans perdre (ou presque) de ta bonne humeur, d'avoir participé au jeu, d'un concept un peu particulier, intitulé « c'est quoi cette tache ? », ou encore, « on est sur quelle feuille, tu n'aurais pas compté les cotylédons ? » et j'en passe ! J'ai énormément apprécié travailler avec toi.

Cette masse de données n'aurait également pu être récoltées sans les petites mains de l'INRA qui viennent chaque année gonfler les effectifs : merci à Claire, Tom, Léa et Audrey. C'était un vrai plaisir de vous encadrer !

Merci également aux personnes qui m'ont aidée entre deux expérimentations : Pierre Perrin, Michel Labarrère, Didier Rafaillac. Merci Pierre Casadebaig pour avoir pris le temps de fouiller dans les données SUNFLO, répondre à mes interrogations R et j'en passe. Merci Pierre Maury pour le temps que tu m'as consacré, la mesure de la photosynthèse du tournesol n'a plus de secret pour moi ! Merci Célia Seassau pour les discussions phoma et autres. Merci à Jacques Moinard, il aura fallu un peu de patience avant de découvrir les équations d'Asphodel. La liste est loin d'être exhaustive et je n'oublie pas toutes les autres personnes que j'ai côtoyées durant ces trois années et remercie tous les membres de mon équipe d'accueil VASCO et les membres du domaine expérimental.

Une thèse, c'est aussi des périodes de formations qui peuvent apporter plus que de simples connaissances et donner d'improbables amitiés !
Un grand merci à mes co-bureaux et particulièrement Marie-Hélène, Toky, Bochra, Hélène, André, Clément, Jérôme et Solenn. Chacun se retrouvera dans une ou plusieurs des catégories suivantes : pour les repas - découvertes gastronomiques, les sorties culturelles ou pas, les débugages R, le trafic de boutures, le troc de fromages-chocolat-pâtisseries, ... A Jérôme et Solenn, je souhaite que vos projets plus animaliers que recherche réussissent. Une pensée également aux bureaux plus éloignés : Julie, Magalie, du côté titulaire de la ligne, mais ça ne vous empêche pas d'entrer dans une des catégories précédentes !
Merci aux amis qui m'ont permis de décompresser et de changer d'air entre deux tournesols. Je ne les citerai pas tous ici mais je pense très fort à vous : pour les escapades montagnardes ou pas, pour les sessions danses endiablées, pour les bons repas, discussions et petits moments passés ensemble…

Merci à ma famille pour avoir toujours cru en moi. La distance est grande et les nouvelles ont parfois été rares dans le feu de l'action mais j'ai toujours une pensée pour vous.
Enfin, merci Nico pour ton soutien et ta compréhension, supporter une thésarde n'est pas toujours chose très facile surtout quand la fin approche mais comme l'a dit Clapié et al., 2012 : « 1+1 = mini-nous », à notre source de bonheur, à Yanaël.

Table des matières

Table des matières ..... **iii**

Table des illustrations ..... **vii**

Table des tableaux ..... **x**

Glossaire ..... **xi**

Chapitre I. Introduction **1**

1 Contexte 3
2 Positionnement du travail 7

Chapitre II. Synthèse bibliographique **11**

1 La plante de tournesol 13
1.1 Le cycle de développement du tournesol 13
1.2 Mise en place de la surface foliaire 15
1.3 Facteurs influençant le développement foliaire du tournesol 15
1.3.1 Surface foliaire et alimentation hydrique 15
1.3.2 Surface foliaire et nutrition azotée 16
1.3.3 Surface foliaire et rayonnement 17
1.3.4 Surface foliaire et densité de peuplement 17
1.4 SUNFLO, modèle de culture du tournesol 18
2 Le complexe parasitaire du tournesol 21
2.1 Caractéristiques des maladies 21
2.1.1 Principales maladies du tournesol en fréquence et sévérité 22
2.1.2 Maladies secondaires ou en émergence 23
2.2 Epidémiologie comparée du phoma et du phomopsis 25
2.2.1 Historique des champignons 25
2.2.2 Classification des champignons 27
2.2.3 Cycle biologique des champignons 29
2.2.4 Interaction entre les deux champignons 33
2.2.5 Symptômes et dommages 35
2.3 Les modèles épidémiologiques existants 39
2.3.1 Asphodel, modèle de prévision du risque phomopsis 39
2.3.2 SimMat, modèle du phoma du colza 41
3 Les pratiques culturales et leur influence sur les maladies du tournesol 41
3.1 Choix variétal 41
3.2 Implantation du tournesol : choix des rotations 42
3.3 Travail du sol et gestion des résidus 43
3.4 Date de semis 43
3.5 Densité de peuplement 45
3.6 Fertilisation azotée 45
3.7 Irrigation 46
3.8 Traitements phytosanitaires 47
3.9 Récolte 49
4 Schéma conceptuel du modèle et hypothèses de travail 53

4.1 Inoculum primaire 54
4.2 Pollution 55
4.3 Infection 56
4.4 Dégâts 57
4.5 Dommages 58

Chapitre III. Matériels et Méthodes 59

1 Démarche expérimentale 61
2 Choix du matériel biologique 61
2.1 Matériel végétal : choix des variétés de tournesol 61
2.1.1 Expérimentations au champ 61
2.1.2 Expérimentations en serre 62
2.2 Matériel fongique : choix des souches de *Phomopsis helianthi* et de *Phoma macdonaldii* 62
2.2.1 Choix d'une souche de *Phoma macdonaldii* 62
2.2.2 Isolement d'une souche de *Phomopsis helianthi* 62
3 Dispositif expérimental au champ 63
3.1 Choix du dispositif 65
3.2 Conduite de culture 65
3.2.1 Semis et démariage 65
3.2.2 Fertilisation azotée 66
3.2.3 Irrigation 66
3.3 Mode de contamination 66
3.4 Variables observées 67
3.4.1 Climat 67
3.4.2 Microclimat 67
3.4.3 Variables biologiques 68
3.4.4 Quantification de l'inoculum primaire 70
3.4.5 Suivi des maladies 70
4 Dispositif expérimental en conditions contrôlées 71
4.1 Présentation du dispositif 71
4.2 Conduite de culture 73
4.2.1 Substrat des plantes 73
4.2.2 Semis 73
4.2.3 Environnement climatique dans la serre 73
4.2.4 Régime hydrique 73
4.2.5 Fertilisation minérale 74
4.3 Mode de contamination 74
4.3.1 Méthode de contamination artificielle par des pycniospores de *Phoma macdonaldii* 74
4.3.2 Contamination artificielle par du mycélium de *Phomopsis helianthi* 75
4.4 Variables observées 76
4.4.1 Variables biologiques 76
4.4.2 Suivi des symptômes 77
5 Analyses statistiques 79

Chapitre IV. Acquisition de connaissances : mise en place et développement des infections (et dégâts) 81

1 Phomopsis 83
1.1 Analysis of the influence of a sunflower canopy on Phomopsis helianthi epidemics as a function of cropping practices 84
1.1.1 Introduction 84
1.1.2 Materials and methods 86
1.1.3 Results 91
1.1.4 Discussion 106
1.2 Influence du stade phénologique sur le développement du phomopsis 112
1.3 Conséquences pour le modèle « phomopsis » 113
2 Phoma 114
2.1 Influence of sunflower canopy on *Phoma macdonaldii* as a function of cropping practices: analysis and modelling 114
2.1.1 Introduction 114
2.1.2 Materials and methods 117
2.1.3 Results 124
2.1.4 Discussion 133
2.2 Expérimentations complémentaires en serre 136
2.2.1 Influence du statut azoté de la plante sur la vitesse de progression du phoma 136
2.2.2 Influence du génotype sur la vitesse de progression du phoma 137
2.2.3 Influence de l'âge de la feuille sur la vitesse de progression du phoma 137
2.3 Conséquences pour le modèle « phoma » 138

Chapitre V. Acquisition de connaissances : mécanismes de dommage 139

1 Photosynthetic consequences of Phomopsis helianthi in sunflower: analysis and modelling 141
1.1 Introduction 141
1.2 Materials and Methods 143
1.2.1 Plant material and growing conditions 143
1.2.2 Fungal isolate and plant inoculation treatment 144
1.2.3 Measurements of disease progression and gas exchange 144
1.2.4 Data analysis 145
1.2.5 Model analysis 145
1.3 Results 147
1.3.1 Photosynthesis dynamics in control plants 147
1.3.2 Effect of *Phomopsis helianthi* on net photosynthetic rate on the leaf scale . 147
1.3.3 Short distance impact of *Phomopsis helianthi* infection on net photosynthetic rate 148
1.3.4 Modelling the short distance impact 148
1.3.5 Modelling at the whole leaf scale 150
1.3.6 Modelling at the plant scale 151
1.4 Discussion 153
1.4.1 Disease progression in relation to genotypic susceptibility 153
1.4.2 Model evaluation 153

1.5 Conséquences pour le modèle « phomopsis » 155
2 Effets des infections de phoma sur la dynamique de sénescence du tournesol 155
2.1 Influence de la date de contamination par le phoma 155
2.2 Influence du génotype 155
2.3 Influence du statut azoté 156
2.4 Influence de l'âge de la feuille infectée 156
2.5 Conséquences pour le modèle « phoma » 156

Chapitre VI. Discussion et perspectives 159

1 Inoculum primaire 163
1.1 Phomopsis 163
1.1.1 Maturation des asques de *Phomopsis* 163
1.1.2 Projection des ascospores 164
1.2 Phoma 165
2 Pollution 169
3 Infection 172
3.1 Dynamiques des infections 172
3.1.1 Phomopsis 172
3.1.2 Phoma 175
3.2 Représentation du microclimat 176
3.3 Résistance variétale 178
3.3.1 Phomopsis 178
3.3.2 Phoma 178
3.4 Résistance ontogénique 178
3.4.1 Phomopsis 178
3.4.2 Phoma 179
3.5 Durée de vie des ascospores 179
4 Dégâts 180
4.1 Phomopsis 180
4.2 Phoma 181
4.3 Interactions phomopsis/phoma 181
5 Dommages 181
6 Conclusions et perspectives 182

Références bibliographiques 187

Annexes 199

Table des illustrations

Chapitre I. Introduction

Figure I. 1. Différentes méthodes de lutte ou de contrôle contre les bioagresseurs (Attoumani-Ronceux et al., 2011)..... 3
Figure I. 2. Evolutions du rendement en parcelles d'agriculteurs et en parcelles d'évaluation variétale et surfaces cultivées en France entre 1970 et 2011 (source Proléa). 6
Figure I. 3. Schéma général de fonctionnement du modèle SUNFLO. 8

Chapitre II. Synthèse bibliographique

Figure II. 1. Stades repères du tournesol (CETIOM)..... 14
Figure II. 2. Effets des pratiques agricoles (hors choix variétal) sur les principales caractéristiques de la plante..... 18
Figure II. 3. Schéma du modèle SUNFLO : modules (formalismes), variables d'entrée (conduite, climat, sol) et paramètres variétaux (production potentielle, architecture foliaire, phénologie, réponse à la contrainte hydrique), d'après Casadebaig et al. (2011) 19
Figure II. 4. Cycle simplifié du développement d'un bioagresseur, sur une plante ou au sein d'une culture, ou à l'échelle d'un paysage (Lucas, 2007)..... 21
Figure II. 5. Cycle biologique des deux champignons : *Phomopsis* et *Phoma* (d'après Chollet et al., 2002; Bordat et al., 2011)..... 28
Figure II. 6. Interaction possible entre *Phoma macdonaldii* et *Phomopsis helianthi* 34
Figure II. 7. Effet de la sévérité des attaques de phoma sur tige sur le nombre de taches de phomopsis sur tige sur des essais conduits à Auzeville en 2000 (a) et au CETIOM en 1996 et 1997 (b) 34
Figure II. 8. Schéma du modèle Asphodel..... 40
Figure II. 9. Répartition des dates de semis par grandes régions françaises (source : CETIOM) 44
Figure II. 10. Répartition du risque phomopsis en fonction des taux d'attaques observés depuis 20 ans (source : CETIOM)..... 48
Figure II. 11. Schéma du couplage entre le modèle épidémiologique et le modèle SUNFLO. Le modèle résultant de ce couplage se dénommera SUNFLO-Maladies..... 54

Chapitre III. Matériels et Méthodes

Figure III. 1. Isolement d'une souche monopycniospore de *Phomopsis helianthi* (A) à partir d'une culture issue d'un isolement réalisé sur des cannes de tournesol de 2009 (B)..... 63
Figure III. 2. Thermohygromètres placés dans le couvert 67
Figure III. 3. Mesure de l'indice foliaire avec un LAI-2000..... 69
Figure III. 4. Découpage de la plante en 5 strates..... 71
Figure III. 5. Contamination artificielle d'une feuille de tournesol avec un explant mycélien de *Phomopsis helianthi* 75
Figure III. 6. Zones de mesure de la photosynthèse sur le limbe 76
Figure III. 7. Echelle de notation de la progression du *Phoma* sur le pétiole d'après Roustaee (2003) 78
Figure III. 8. Quantification de la surface foliaire nécrosée par scanner sur fond bleu..... 79

Chapitre IV. Acquisition de connaissances : mise en place et développement des infections (et dégâts)

Figure IV. 1. Relationships between cropping practices, environment, sunflower crop and phomopsis at the field scale (even if primary inoculum is produced at the landscape level). . 85
Figure IV. 2. Weather data: rainfall (with irrigation) and maximum temperature. Growth stages are indicated according to the CETIOM scale (E1: star bud stage, F1: flowering; Merrien, 1992). (a) 2010 and (b) 2011. 90
Figure IV. 3. Atmospheric ascospore concentration, periods when ascospores were observed and mean number of new leaf infections per plant; dotted arrows indicate the main periods of ascospore release and bold arrows the successful leaf infection events according to Asphodel. (a) 2010 and (b) 2011. 90
Figure IV. 4. Leaf Area Index (LAI) dynamics. (a) 2010 (b) 2011. SD is given for combinations of agronomic factors tested in 2010 and 2011 (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1})..... 92
Figure IV. 5. Number of hours of relative humidity (RH) higher than 85% according to the maximum Leaf Area Index (LAImax) in 2010 and 2011. RH data corresponded to 18 June-9 July (2010) and 16 June-7 July (2011). RH was measured under the sunflower canopy at 40 cm above the ground. 94
Figure IV. 6. Number of contamination events simulated by Asphodel in 2011 using microclimatic data (RH40) for the four crop management systems (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha-1, N150 = 150 kg N ha-1). 96
Figure IV. 7. Dynamics of phomopsis leaf infections per stratum in 2011 for the four crop management systems (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N.ha^{-1}, N150 = 150 kg N.ha^{-1})..... 96
Figure IV. 8. Number of contamination events simulated by Asphodel with microclimatic data for various crop management systems (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}) and the sensor location (40 cm, 80 cm, 120 cm above ground). (a) 2010 (b) 2011. Open and dark symbols correspond to rainfed and irrigated treatments respectively..... 98
Figure IV. 9. Dynamics of senescence in 2011 for the four crop management systems (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}). 100
Figure IV. 10. Dynamics of leaf-to-stem passage in 2011 for the four crop management systems (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}). Percentages were calculated according to the final number of infected leaves. 102
Figure IV. 11. Duration for leaf-to-stem passage (days) as a function of the distance covered by the fungus from the point of infection until the stem (mm). D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}. 103
Figure IV. 12. Fate of leaf symptoms in 2011 for the four crop management systems expressed in percentage of infected leaves on August 22 (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}). 105
Figure IV. 13. Vitesse moyenne de progression des nécroses de phomopsis sur la nervure centrale du limbe pour deux variétés contrastées, Bollil (R) et Alhaja (S), en fonction du stade phénologique de la plante au moment de l'infection. 112
Figure IV. 14. Variables at plant or organ scale which determine phoma infection success 116
Figure IV. 15. Atmospheric ascospore concentration of *Leptosphaeria lindquistii* according to weather data. (a) 2010 and (b) 2011..... 125
Figure IV. 16. Dynamic of *L. lindquistii* leaf node infections 128
Figure IV. 17. Dynamic of *L. lindquistii* incidence on stem according to the crop management in 2010 (a) and 2011 (b) 129

Figure IV. 18. Vertical dynamic of *L. lindquistii* incidence on stem in 2010 (open symbols) for untreated (NT) and treated (T) treatments and 2011 (closed symbols) 130
Figure IV. 19. Dynamic of *L. lindquistii* incidence on stem base according to the crop management in 2011 132

Chapitre V. Acquisition de connaissances : mécanismes de dommage

Figure V. 1. Relationship between the NPR in control leaves and the number of days after inoculation. Solid symbols are for cv. Bollil and open symbols for cv. Alhaja. The three measured areas are represented as follows: proximal area (triangles), median area (circles), distal area (squares). Vertical bars represent the standard error of the mean. 146
Figure V. 2. Standardised relative NPR as a function of number of days post-inoculation (DPI). Vertical lines represent the standard error of the mean. Solid symbols are for cv. Bollil and open symbols are for cv. Alhaja. The three measured areas are represented as follows: proximal - close to the infection point - area (triangles), median area (circles), distal area (squares). 146
Figure V. 3. Standardised relative NPR related to the fraction of necrotic leaf area. Solid symbols are for cv. Bollil and open symbols are for cv. Alhaja. The three measured areas are represented as follows: proximal area (triangles), median area (circles), distal area (squares). The black and dotted lines represent the Alhaja model (γ = 13.9 mm) and the Bollil model (γ = 9.5 mm) respectively. The red line represents the theoretical model if *Phomopsis helianthi* had no impact on the photosynthetic efficiency of the remaining green leaf area. 146
Figure V. 4. Standardised relative NPR related to the distance of the necrosis from the measurement area. Solid symbols are for cv. Bollil and open symbols are for cv. Alhaja. The three measured areas are represented as follows: proximal area (triangles), median area (circles), distal area (squares). 149
Figure V. 5. Representation of a lesion caused by *Phomopsis helianthi* on a gas exchange measurement area. The black area represents the visible lesion. The grey area represents the asymptomatic area affected by the pathogen. γ is the width of this asymptomatic but impacted area. 149
Figure V. 6. Representation of a lesion caused by *Phomopsis helianthi* at the leaf tip. The black area represents the visible lesion. L represents the necrosis length on the main vein of the leaf. ω is the angle between the main vein and the leaf border at the leaf tip. Ψ is the angle between the main vein and the necrotic front. 151
Figure V. 7. Standardised relative NPR of the leaf below (a) and above (b) the infected one related to the proportion of stem girdling from the infected leaf for cv. Alhaja. Each line represents a plant. 152

Chapitre VI. Discussion et perspectives

Figure VI. 1. Schéma conceptuel du module épidémiologique 162
Figure VI. 2. Représentation graphique des indices hygrométrique (a) et thermique (b) 164
Figure VI. 3. Ascospores mues par un mouvement brownien à proximité d'un hydathode. 169
Figure VI. 4. Représentation graphique du modèle calculant la distance moyenne parcourue par le *Phomopsis* sur la feuille (de limbe de longueur L et de pétiole de longueur L_p) entre le point d'infection dans un hydathode et le point d'insertion du pétiole sur la tige. 173
Figure VI. 5. Schéma récapitulatif du mode de calcul de l'humidité relative sous couvert par STICS 177

Table des tableaux

Chapitre II. Synthèse bibliographique

Tableau II. 1. Caractéristiques des principales maladies du tournesol (Chollet et al., 2002). 20
Tableau II. 2. Classification systémique de *Phoma macdonaldii* et de *Phomopsis helianthi* d'après Blackwell et al. (2012)..... 26
Tableau II. 3. Conditions climatiques durant le cycle biologique du *Phoma* et du *Phomopsis* 29
Tableau II. 4. Les différents symptômes de phoma sur tournesol 36
Tableau II. 5. Les différents symptômes de phomopsis sur tournesol..... 37
Tableau II. 6. Stratégie de lutte fongicide selon le risque régional phomopsis, la variété choisie et le risque phoma (source : CETIOM)..... 48
Tableau II. 7. Effets de la conduite de culture sur les principales maladies du tournesol 50
Tableau II. 8. Récapitulatif de l'influence des caractéristiques de la plante sur les maladies en lien avec les pratiques culturales 52

Chapitre III. Matériels et Méthodes

Tableau III. 1. Tableau récapitulatif des expérimentations au champ..... 64
Tableau III. 2. Tableau récapitulatif des expérimentations en serre..... 72

Chapitre IV. Acquisition de connaissances : mise en place et développement des infections (et dégâts)

Table IV. 1. Agronomic and environmental variables assessed in the experiment and their contribution to the understanding of phomopsis epidemics under various crop management systems. 86
Table IV. 2. Leaf Area Index (LAI), Nitrogen Nutrition Index (NNI), Stem Base Diameter (SBD, mm) and Maximum Lamina Length (MLL, mm) at flowering for plants infected with *P.helianthi* (D1=3.5 plants m^{-2}, D2=7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}). Not all situations were tested in 2011. Standard deviation between brackets..... 93
Table IV. 3. Cultivar ranking for the three components of phomopsis injury in 2011 for the four crop management systems together. 96
Table IV. 4. Percentage of wilted plants according to crop management systems in 2010 and 2011 (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}). (-) combinations of factors not tested..... 106
Table IV. 5. Effects of crop management on the three components of phomopsis injury (+: factor promoting the disease; -: factor impeding the disease)..... 107
Table IV. 6. Mean LAI during vegetative stages (LAI1) and post-flowering stages (LAI2), plant height (H, mm), stem base diameter (SBD, mm) and leaf number for the five genotypes used in 2011. 127

Chapitre V. Acquisition de connaissances : mécanismes de dommage

Tableau V. 1. Nombre de jours d'écart entre la sénescence de la feuille témoin et celle de la feuille infectée pour les étages foliaires 6 et 9 sur les variétés Kill et Sikllos CL en fonction du stade de la série au moment de l'infection à Auzeville (a) et Grignon (b). 157

Chapitre VI. Discussion et perspectives

Tableau VI. 1. Résultats des simulations de la date à laquelle 50% des asques de phoma sont mûrs selon 3 modèles. 166

Glossaire

Allo-inoculum : inoculum à l'origine d'une épidémie mais provenant d'un autre lieu que celui où l'épidémie est observée.

AUDPC : Area Under the Disease Progression Curve. Surface comprise entre l'axe des abscisses qui correspond à un temps et la courbe qui retrace la progression de l'épidémie en portant en ordonnée l'évolution de la quantité de maladie.

BSV : Bulletin de Santé du Végétal

CETIOM : Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains et du chanvre

Endocyclique : fait référence à un organisme dont le cycle est fortement inféodé à la parcelle et dont le développement est très dépendant de l'endo-inoculum. Le niveau d'endocyclisme résulte de la combinaison de deux caractéristiques : la persistance de l'endo-inoculum dans la parcelle et sa capacité de dispersion (Aubertot et Robin, sous presse).

Endo-inoculum : inoculum à l'origine d'une épidémie qui provient du même espace que celui où l'épidémie est observée.

Esquive : résistance de type statique et constitutive qui s'exprime en permanence et qui réduit ou empêche la pollution et/ou l'infection.

Hydathode : type de tissus sécréteurs des feuilles, habituellement chez les Angiospermes, qui sécrète de l'eau via des pores de l'épiderme ou à l'extrémité des limbes, typiquement à l'extrémité de dents ou de dentelures.

Incubation : état de la maladie qui correspond au délai qui sépare l'infection de la première manifestation visuelle d'un syndrome de la maladie. Le délai s'exprime en temps réel (jours) ou en temps biologique (degrés.jours efficaces).

Infection : première séquence de la maladie qui traduit le fait que l'agent pathogène a pénétré dans l'hôte à partir de ses propres ressources.

IFT : Indicateur de Fréquence de Traitements phytosanitaires

IGEC : Interaction - Génotype - Environnement - Conduite de culture

INN : Indice de Nutrition azotée

Inoculum : terme générique qui caractérise tout élément du parasite capable de contaminer un hôte. L'inoculum primaire permet la maladie et initie l'épidémie.

LAI : Leaf Area Index ; correspond à la surface développée du peuplement végétal pour 1 m^2 de surface cultivée projetée sur un plan de 1 m^2, s'exprime en m^2 par m^2.

Libération : caractérise le fait qu'un inoculum se sépare passivement ou activement du support et de l'organe de fructification sur lequel il a été produit.

LPT : limite de passage du tracteur, dernier stade où le traitement avec du matériel conventionnel est possible avec une hauteur du tournesol entre 60 et 70 cm

OAD : Outils d'Aide à la Décision

Parasite biotrophe : parasite dont le cycle de développement y compris la différenciation d'un inoculum s'effectue au détriment de tissus hôtes vivants.

Parasite nécrotrophe : parasite dont une partie du cycle de développement, en particulier la différenciation d'un inoculum, s'effectue au détriment de tissus hôtes morts.

Périthèce – Pseudothèce : On parle souvent de périthèces pour *L. linquistii*. Les périthèces *sensus stricto* se développent après les gamètes femelles, qui leur donnent naissance en recrutant des hyphes alentour pour élaborer l'enveloppe de fructification. Dans le cas des pseudothèces, le gamète femelle apparaît après la formation de l'enveloppe de la fructification. Les dothideomycètes dont fait partie *Leptosphaeria linquistii* présentent ce développement.

PDA : Potato Dextrose Agar

Pollution : séquence en amont de la maladie qui correspond à la mise en contact d'un élément infectieux et d'un hôte.

Réceptivité : notion quantitative qui traduit le fait que les tissus de la plante hôte sont dans un état où un parasite peut les contaminer plus ou moins intensément, en dehors de tout aspect de résistance. La résistance par esquive peut correspondre à une réceptivité nulle.

Résistance partielle : résistance dont l'effet est de freiner le développement du parasite et la progression de l'épidémie.

Résistance totale : résistance dont l'effet est d'interdire l'infection ou le développement d'un inoculum secondaire.

Situation de production : une situation de production est définie par un ensemble de variables décrivant les composantes physique, chimique et biologique d'une parcelle ; l'environnement physique, chimique, biologique de cette même parcelle ; le contexte socio-économique associé (Aubertot et Robin, sous presse).

SPAD : Soil Plant Analysis Development

SRPV : Service Régional de la Protection des Végétaux, devenu DGAL, Direction Générale de l'Alimentation

Tolérance : forme particulière de résistance qui fait que le potentiel de rendement d'une plante n'est pas altéré par la maladie.

Pour faciliter la lecture, nous emploierons les termes « ascospores de *Phomopsis* » pour parler des ascospores de *Diaporthe helianthi* et « ascospores de *Phoma* » pour parler des ascospores de *Leptosphaeria linquistii*. Il en sera de même pour l'utilisation des termes d'infection et de progression des nécroses pour ces champignons. Les termes phomopsis et phoma sont en général utilisés pour désigner la maladie (ses dégâts notamment) ; les termes *Phomopsis* et *Phoma* désignent les agents pathogènes.

Note : le champignon responsable du phoma du tournesol, *Phoma macdonaldii* / *Leptosphaeria linquistii* a été récemment renommé *Plenodomus lindquistii* dans une étude sur la réorganisation du genre *Pleosporales* (De Gruyter et al., 2012). Cependant, cette réorganisation est peu connue et sujette à controverse. Par souci de compréhension dans la dénomination des pathogènes, nous avons choisi de conserver l'ancienne dénomination.

Chapitre I. Introduction

1 Contexte

L'augmentation générale de la production agricole durant la seconde moitié du vingtième siècle est liée non seulement à l'amélioration de la productivité des variétés et de la qualité des semences, aux progrès de la mécanisation, mais aussi à l'intensification des modes de production (engrais et produits phytosanitaires). Aujourd'hui, les conséquences néfastes pour l'environnement et la santé de cette intensification sont de plus en plus souvent pointées du doigt. Ainsi, la réduction souhaitable des applications de pesticides, dont les modalités avaient été analysées lors de l'ESCo Pesticides (Aubertot et al., 2006a), s'est aujourd'hui traduite par des décisions politiques au plan national (Grenelle de l'Environnement). Ceci s'est concrétisé par le plan d'action « Ecophyto 2018 » qui vise à réduire de 50 % les applications de pesticides (sur la base des Indices de Fréquence de Traitement) par rapport aux pratiques actuelles d'ici 2018, sous réserve de proposition par la recherche de méthodes de substitution non chimiques. Cette dernière mention suppose donc de disposer de solutions techniques applicables mais aussi de méthodes de raisonnement adaptées pour les mettre en œuvre de manière cohérente. Depuis plusieurs décennies, le concept de protection intégrée des cultures (PIC) met en avant la complémentarité des méthodes de lutte chimiques et non chimiques (Figure I. 1). Ainsi, pour de nombreux bioagresseurs, la connaissance et la mise en application de méthodes à effet partiel (comme l'utilisation de variétés multi-résistantes, le contrôle cultural, ou la lutte biologique) permettent de réduire le recours systématique aux pesticides (Meynard et al., 2003).

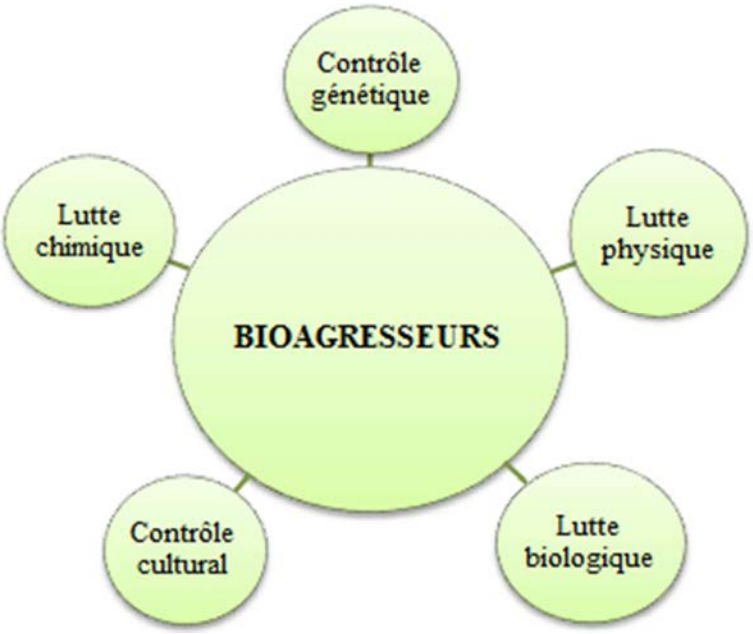


Figure I. 1. Différentes méthodes de lutte ou de contrôle contre les bioagresseurs (Attoumani-Ronceux et al., 2011).

Pour autant, la mise en œuvre de la PIC en grande culture se heurte à plusieurs difficultés d'ordre agronomique, technique et socio-économique. En effet, il est difficile de prévoir les conséquences d'un changement de pratique(s) culturale(s) sur le contrôle d'un bioagresseur et son impact sur la production (aussi bien en quantité qu'en qualité) mais aussi sur le reste de la biocénose et donc sur l'ensemble du profil de dégâts de la culture (Savary et al., 2006). Une connaissance approfondie des interactions entre peuplement, bioagresseurs, environnement physico-chimique et pratiques culturales est donc nécessaire. Or, l'étude analytique de ces interactions complexes nécessiterait des expérimentations lourdes et nombreuses. De ce fait, les modèles constituent des outils précieux pour synthétiser nos connaissances sur les bioagresseurs et quantifier les effets des systèmes de culture sur leur dynamique (De Wolf et Isard, 2007).

Du fait de la complexité et de la multiplicité des ennemis des cultures (plantes adventices, champignons phytopathogènes ou ravageurs), la modélisation, bien que souhaitable, est difficile à conduire. Aussi, la plupart des modèles de culture n'intègrent pas de module "bioagresseurs", qu'il s'agisse de la représentation des dynamiques des bioagresseurs ou des impacts de ces derniers sur la production. D'un autre côté, peu de travaux prennent en compte les effets des pratiques agricoles sur le développement des ennemis des cultures (Aubertot et al., 2005), la plupart des modèles épidémiologiques ayant été développés pour la prévision des risques dans le cadre d'outils d'aide à la décision pour les traitements phytosanitaires, basés principalement sur des variables d'entrée climatiques.

Parmi les approches récentes, on peut citer SIPPOM (Lo-Pelzer et al., 2010) qui combine à la fois des éléments de contrôle cultural (effets de la succession des cultures, du travail du sol, de la date et de la densité de semis, de la gestion de l'azote à l'échelle du système de culture), à des éléments de contrôle génétique (choix variétal, selon des profils de résistances spécifiques ou quantitatives), à de la lutte chimique (application de fongicides) pour la gestion durable du phoma du colza à l'échelle de la petite région. On peut citer également Alomysys (Colbach et al., 2007) et Florsys (Colbach et al., 2010) qui permettent de représenter les effets de la succession de cultures, du travail du sol et de l'application d'herbicides sur les populations de vulpin et les communautés adventices (combinaison d'éléments de contrôle cultural à de la lutte chimique).

Les travaux de modélisation prenant en compte plusieurs bioagresseurs sont également très rares. Le modèle EPIPRE (Zadoks, 1989) est un outil d'aide à la décision permettant de recommander un traitement fongicide en fonction de l'état sanitaire d'un champ à un temps t donné, mais il ne permet pas de tester des stratégies de contrôle sur les maladies. D'autres

modèles (RICEPEST, Willocquet et al., 2002 ; INFOCROP, Aggarwal et al., 2006 ; WHEATPEST, Willocquet et al., 2008) ont pour objectif d'analyser des pertes de rendement pour des bioagresseurs multiples, mais sans modéliser le lien entre conduite de culture et profil de dégâts. Enfin, des modèles ont été développés pour aider à la conception d'itinéraires techniques en blé d'hiver (BETHA, Loyce et al., 2002 ; DECIBLE, Chatelin et al., 2005), mais ils ne prennent en compte que l'effet du choix variétal et de la lutte chimique, de manière statistique et non mécaniste.

Ainsi, il n'existe quasiment aucun modèle permettant à la fois d'aider à la combinaison de méthodes de contrôle et à la gestion d'un profil de dégâts. Cependant, quelques initiatives existent sur le sujet. Le modèle OMEGA Sys (Morison et al, en cours de développement) permet de représenter les effets de la conduite du colza sur l'élaboration du rendement, le développement du phoma et des adventices. La plateforme de modélisation IPSIM (Injury Profile SIMulator ; Aubertot et Robin, sous presse) devrait permettre, d'ici quelques années, le développement de modèles représentant les effets des pratiques agricoles sur les profils de dégâts dans une situation de production donnée. Cependant, il n'existe pour l'instant que des modèles individuels de bioagresseurs (e.g. Robin et al., sous presse) qui, à terme, devront être intégrés dans un seul modèle.

La prise en compte des interactions entre au moins deux bioagresseurs d'une même culture est très rare. Il convient donc d'améliorer la prise en compte d'un ensemble d'ennemis des cultures en combinaison avec des méthodes de contrôle diversifiées dans les modèles de simulation du fonctionnement des cultures.

Beaucoup de travaux se sont focalisés sur le blé ou le colza, cultures d'hiver recevant de nombreux traitements phytosanitaires. La culture de tournesol, bien que sensible à un cortège de maladies (mildiou, phomopsis, phoma, sclérotinia, pour les plus nuisibles ; Gulya et al., 1997), doit rester peu traitée car elle joue un rôle important dans les systèmes de culture à bas niveaux d'intrants (notamment en raison de son caractère économe en eau, en azote et en pesticides). Des travaux menés à l'INRA Toulouse (UMR AGIR, UMT INRA-CETIOM) ont montré l'importance de la conduite de culture sur l'incidence et la gravité des principales maladies du tournesol (Debaeke et al., 2003 ; Seassau et al., 2010 ; Mestries et al., 2011). En effet, le tournesol est une plante très plastique dont le niveau de développement végétatif (surface foliaire en particulier) répond très fortement aux conditions environnementales subies par la plante. De ce fait, le tournesol représente un modèle de choix pour étudier les interactions entre conduite de culture – peuplement – bioagresseurs – environnement.

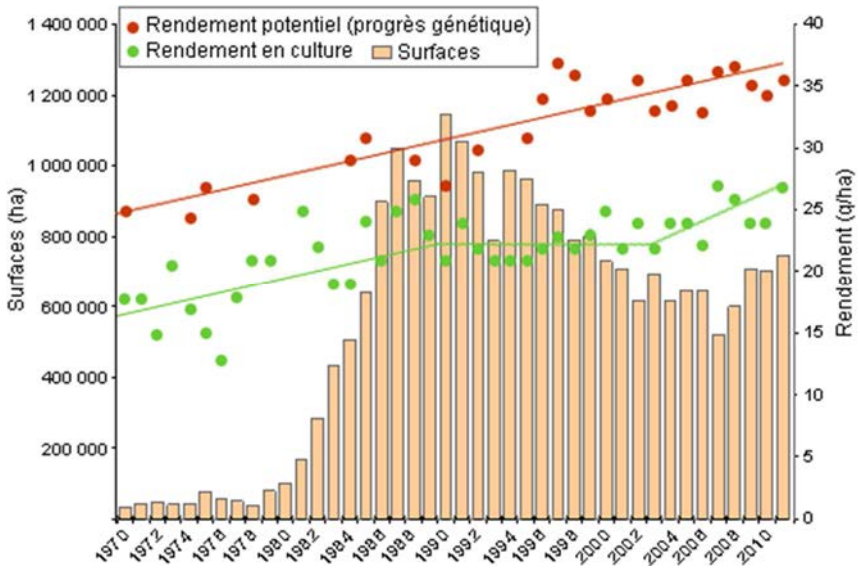


Figure I. 2. Evolutions du rendement en parcelles d'agriculteurs et en parcelles d'évaluation variétale et surfaces cultivées en France entre 1970 et 2011 (source Proléa).

Les surfaces mondiales de tournesol n'ont cessé de s'accroître depuis ces quinze dernières années atteignant les 24 millions d'hectares en 2010 dont les deux tiers sont répartis entre l'Europe des 27 (4 millions d'hectares) et la Russie et l'Ukraine (11.3 millions d'hectares au total ; source Oil World). En Argentine et à un degré moindre aux Etats-Unis, les surfaces ont fortement diminué depuis 15 ans du fait principalement de la concurrence du soja dans les situations les plus fertiles (Jouffret et al., 2011).

Malgré les performances agronomiques et environnementales du tournesol, les surfaces cultivées en France peinent à se maintenir voire régressent. En effet, malgré les progrès génétiques, les rendements du tournesol stagnent depuis une vingtaine d'années (Figure I. 2). Le rendement moyen français se situe à 24 q/ha, plaçant déjà la France au premier rang mondial en terme de productivité (Jouffret et al., 2011), alors que le potentiel des meilleures variétés avoisine 45 q/ha dans les milieux les plus favorables (Vear et al., 2003). Ce différentiel entre le rendement potentiel et le rendement réel contribue au manque de compétitivité du tournesol face à d'autres grandes cultures (maïs ou colza par exemple). Les causes semblent multiples. D'une part, la culture a tendance à être cantonnée aux situations pédoclimatiques contraignantes (sols superficiels en culture non irriguée), ce qui ne valorise pas le progrès génétique effectif (Salvi et Pouzet, 2010). Le rendement se trouve également impacté par l'évolution du climat, du fait de déficits hydriques estivaux de plus en plus fréquents et de plus en plus importants. Enfin, souvent inclus dans des rotations courtes (blé-tournesol), notamment dans la région Midi-Pyrénées, le tournesol est soumis à une pression biotique croissante. Face à un certain nombre d'impasses techniques ou génétiques en matière

de protection mais aussi afin de limiter les risques de contournement des résistances, mettre au point des conduites de culture limitant le développement des maladies est une nécessité. En outre, cela permettrait d'augmenter la productivité de la culture et de la rendre plus compétitive au sein de la sole agricole française. Le tournesol conserverait ainsi son rôle de culture de diversification dans les systèmes de culture du Sud et du Centre de la France.

2 Positionnement du travail

Un modèle dynamique (SUNFLO) a été développé pour simuler les effets du sol, du climat et de la conduite de culture (dont le choix variétal) sur l'élaboration du rendement et de la teneur en huile du tournesol (Casadebaig et al., 2011). Alors que ce modèle ne tient pas compte des pertes de récolte causées par les bioagresseurs, les premières évaluations ont montré la nécessité d'intégrer ces pressions biotiques, tant pour améliorer la qualité de la prévision que pour disposer d'un outil de réflexion vis-à-vis de la production intégrée des cultures. Prendre en compte les bioagresseurs dans ce modèle permettrait également d'améliorer la représentation de l'interaction génotype x environnement chez le tournesol puisqu'il est probable qu'une part importante de cette interaction soit attribuable à la variabilité de la sensibilité variétale aux pathogènes confrontées à des niveaux d'inoculum variés (en fonction du climat, du sol, et du système de culture).

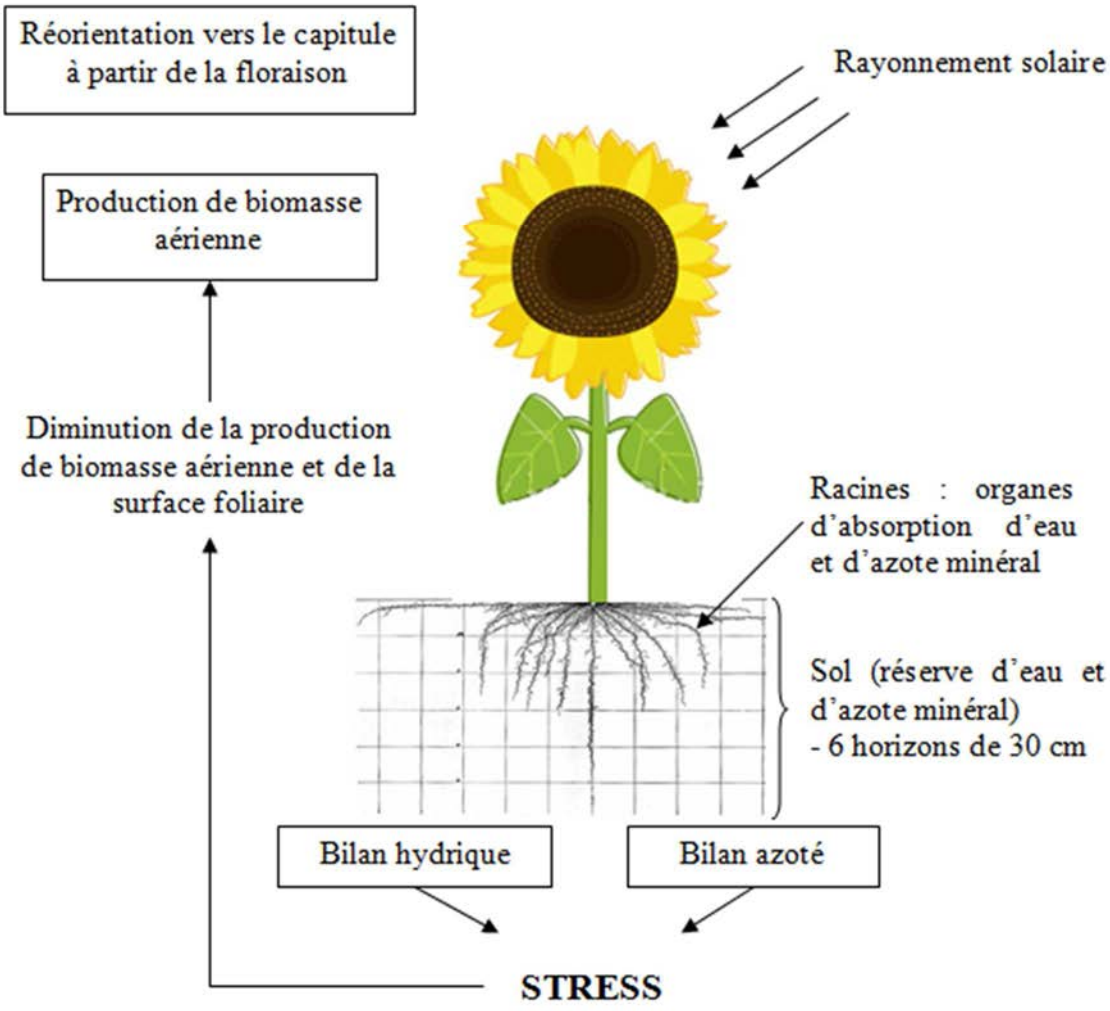
Les champignons pathogènes retenus dans cette étude sont : le phomopsis *(Phomopsis helianthi / Diaporthe helianthi*) et le phoma (*Phoma macdonaldii / Leptosphaeria linquistii*).

L'objectif de ce travail est de développer un modèle dynamique représentant les effets de la conduite (dont le choix variétal) sur l'élaboration du rendement, les dynamiques des principaux ennemis de la culture, et la nuisibilité de ces organismes. Au-delà de l'application au tournesol et à son complexe parasitaire limité ici à ces deux champignons, la démarche et le code informatique généré devront être aussi génériques que possible. Ce modèle devra permettre de comprendre et de prévoir le fonctionnement de ces deux maladies majeures en interaction selon l'itinéraire technique choisi.

Les échelles spatiale et temporelle du modèle sont respectivement la parcelle et l'itinéraire technique (ce qui ne signifie pas que des éléments du paysage, ou de la succession des cultures ne seront pas pris en compte indirectement au travers de variables d'entrée du modèle). La structure génétique des populations ne sera pas explicitement prise en compte et ne fera pas l'objet de développements spécifiques. Néanmoins, on tiendra compte du niveau

Variables d'entrée :

- Paramètres généraux (spécifiques au modèle)
- Paramètres du sol
- Paramètres de la plante (spécifiques à chaque variété)
- Itinéraire cultural
- Données météorologiques



Variables de sortie :

- Production (quantité et qualité)
- Caractéristiques du sol (bilans hydrique et azoté)
- Caractéristiques de la plante au cours du cycle (croissance racinaire, croissance aérienne, évolution de la surface foliaire, évolution de la biomasse, stades phénologiques, …)

Figure I. 3. Schéma général de fonctionnement du modèle SUNFLO.

de sensibilité des variétés et des effets de l'architecture de la plante sur la mise en place et le développement des agents pathogènes.

Nous avons dans un premier temps réalisé une analyse bibliographique à partir de laquelle nous avons construit un premier schéma conceptuel dans lequel nous avons identifié les principaux facteurs environnementaux et ceux liés aux pratiques culturales pilotant les processus sous-jacents à une épidémie. Une attention particulière a été portée au choix des variables pouvant être couplées au modèle de culture SUNFLO. En effet, SUNFLO simule une situation culturale pour une plante moyenne à l'échelle de la parcelle. Il est en mesure de fournir des variables relatives à la croissance et au développement de la plante en peuplement en tenant compte des spécificités liées à la variété choisie. Il intègre également l'effet des stress abiotiques (eau et azote) sur la croissance et le développement de la plante (Figure I. 3). Néanmoins, il ne dispose pas de variables relatives au microclimat. Une fois le schéma complété, nous avons identifié un certain nombre de connaissances manquantes pour réaliser la dissection de la réponse du champignon à la conduite de culture, et réalisé les expérimentations correspondantes. Ces expérimentations se composent de dispositifs intégratifs au champ visant à récolter l'ensemble des données décrivant la mise en place de l'agent pathogène et son développement dans la plante, ainsi que le suivi des variables clés identifiées dans la partie précédente (notamment les variables caractérisant le fonctionnement de la plante saine et malade). A côté de ces dispositifs complets, des expérimentations ciblées ont eu lieu en serre afin de répondre à des questions précises sur les interactions plante-agent pathogène.

Les données recueillies ont alors permis de relier les principales variables pertinentes qui décrivent les interactions plante-agent(s) pathogène(s)-environnement (dont microclimat)-conduite culturale.

Chapitre II. Synthèse bibliographique

1 La plante de tournesol

Le tournesol appartient à la famille des Astéracées. Il doit son nom botanique d'*Helianthus annuus* (du grec *helios* : soleil et *anthos* : fleur; *annuus* étant lié à sa durée de vie annuelle) à son héliotropisme spectaculaire. Natif d'Amérique du Nord, il a été cultivé par les Amérindiens dès le XVIème siècle. Importé en Europe par les Espagnols à la même époque, ce n'est qu'au XVIIIème siècle que l'intérêt alimentaire et oléagineux du tournesol s'est révélé, notamment avec la sélection de variétés à gros capitules et à grosses graines pour l'alimentation humaine, ainsi que la sélection massale de variétés à forte teneur en huile. Sa culture s'est particulièrement développée en Russie, permettant son essor en tant que plante de grande culture. A partir de 1960, avec l'exploitation de la vigueur hybride, la découverte de la stérilité mâle cytoplasmique (Leclerq, 1969) et des gènes de restauration de la fertilité, la culture du tournesol, et par là même, la production mondiale et l'industrie semencière, se sont fortement développées.

Aujourd'hui, c'est l'une des cultures oléagineuses les plus importantes dans le monde, avec le coton, le colza, le soja et l'arachide. En 2010, le tournesol représentait 7 % de la production mondiale de graines oléagineuses avec 33 Mt produites (contre 59 % pour le soja, 14 % pour le colza et 9 % pour le coton) et 9 % de la production mondiale d'huiles oléagineuses avec 12.6 Mt (contre 32 % : palme, 26 % : soja, 15 % : colza ; source : statistiques Proléa). Le tournesol est même considéré comme la première plante annuelle cultivée spécifiquement pour son huile.

1.1 Le cycle de développement du tournesol

C'est une plante à grand développement végétatif, aux larges feuilles, dont la hauteur varie de 1.5 à 2 mètres en peuplement dense. Le cycle complet du tournesol varie de 80 à plus de 170 jours selon les génotypes, les conditions climatiques et culturales. Sur la base d'un zéro de végétation théorique de 6°C, les exigences en sommes de températures varient de 1530 à 1800°C.jours (Merrien, 1992). La floraison débute généralement entre le 65ème et le 70ème jour après la levée, soit 850°C.jours (base 6°C). Les stades repères du développement du tournesol sont décrits dans la Figure II. 1. Un stade est atteint lorsque 50 % des plantes de la parcelle ont franchi ce stade.

Le développement foliaire du tournesol est la principale composante qui nous intéressera dans cette étude. Il dépend en particulier de la conduite de culture et influe fortement sur le microclimat développé au sein de la culture.

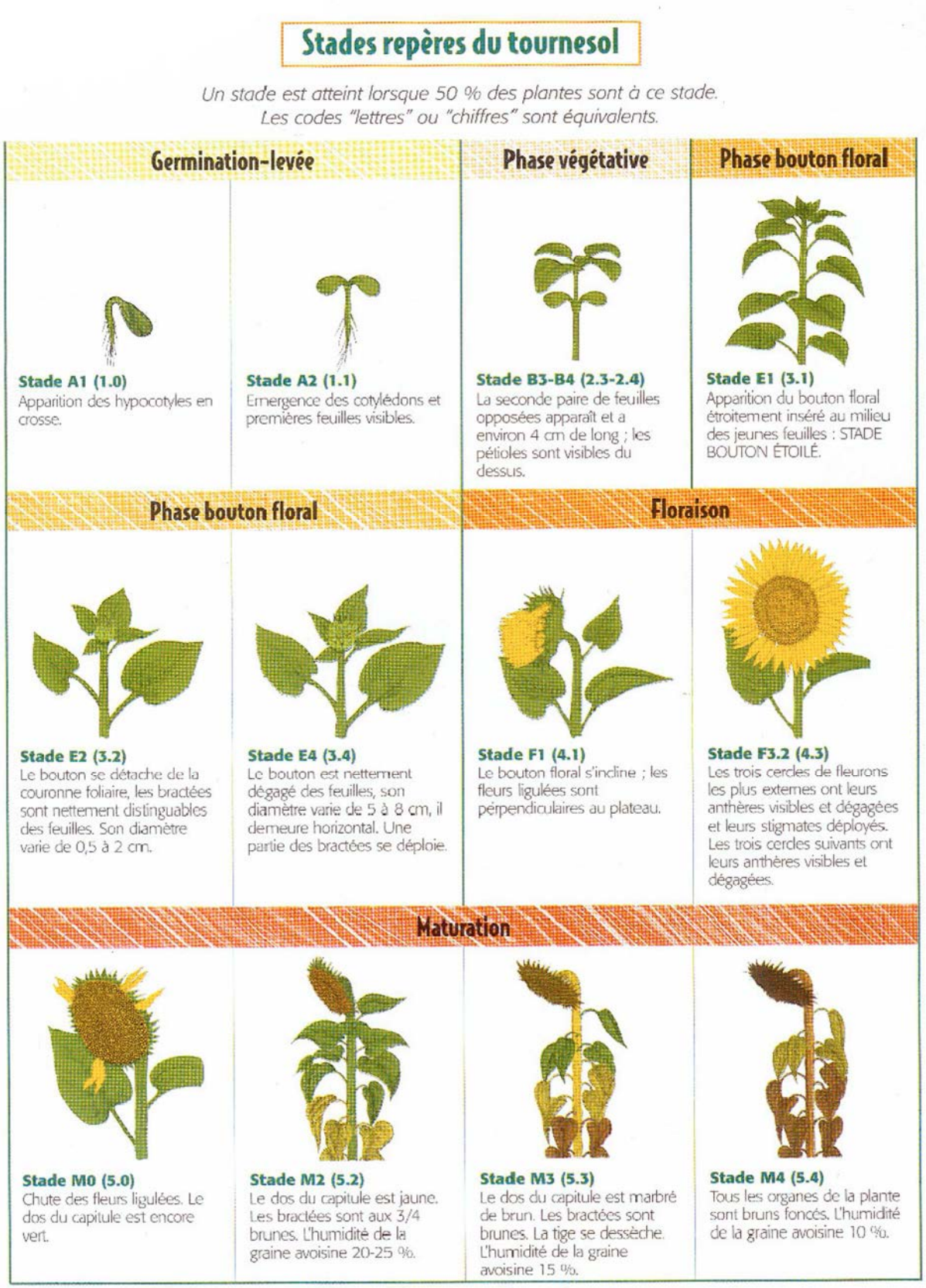


Figure II. 1. Stades repères du tournesol (CETIOM).

1.2 Mise en place de la surface foliaire

La surface foliaire joue un rôle essentiel dans le déterminisme du rendement de la culture et la teneur en huile des graines récoltées (Aguirrezabal et al., 2003). Elle possède également de l'importance en tant que surface de réception des spores aériennes.

La mise en place de la surface foliaire dure de 40 à 50 jours. Le nombre de feuilles d'une variété donnée est relativement constant (20 à 30 feuilles). Il est déterminé très tôt, dès le stade « 4 paires de feuilles » (Granier et Tardieu, 1997), et atteint son maximum environ 85 jours après la levée (Belloni et Vannozzi, 1990), soit au stade « début floraison ». On observe une surface foliaire de 4 000 à plus de 10 000 cm² par plante selon le peuplement, en l'absence de facteurs limitants.

Les feuilles d'une même plante ont des tailles différentes selon leur position sur la tige. Les feuilles situées aux 2/3 supérieurs de la tige peuvent représenter 60 à 80 % de la surface foliaire totale (Merrien, 1992). Cette distribution géométrique facilite l'estimation de la surface foliaire à partir de la mesure de quelques paramètres caractéristiques (Pouzet et Bugat, 1985).

La durée de vie de la surface foliaire post-florale varie de 30 à 90 jours en fonction de l'alimentation azotée et de l'état hydrique de la plante. Connaître la durée de vie des feuilles est important puisqu'une fois sénescentes, celles-ci ne peuvent plus servir de points d'entrée dans la plante à certains agents pathogènes (champignons biotrophes en particulier).

1.3 Facteurs influençant le développement foliaire du tournesol

1.3.1 Surface foliaire et alimentation hydrique

Le tournesol est l'une des cultures d'été les plus tolérantes à la sécheresse, grâce notamment à son système racinaire de type pivotant très profond. La plante se caractérise par sa forte consommation en eau en situation non limitante, ainsi que par sa capacité d'adaptation lorsqu'elle est soumise à un stress hydrique progressif. Il est inutile de satisfaire pleinement ses besoins en eau : le rendement maximal est assuré lorsque 70 % de ses besoins sont couverts soit une transpiration de 400 mm (Merrien et Grandin, 1990). Tout excès de croissance foliaire en préfloraison (indice foliaire supérieur à 2.5) entraîne une surconsommation d'eau préjudiciable au maintien de la surface foliaire pendant la floraison et le remplissage des graines (Champolivier et al., 2011).

Le tournesol a une grande faculté d'adaptation à un déficit hydrique, que ce soit par une régulation de la taille des feuilles (le nombre de feuilles étant constant) ou par une sénescence accélérée des feuilles en cas de stress persistant ou brutal (Merrien et al., 1981). Casadebaig et al. (2008) ont également montré une variabilité génétique au niveau de la régulation stomatique (mais aussi de l'expansion foliaire) face à un déficit hydrique du sol croissant, avec des comportements économes en eau ou au contraire privilégiant le maintien de la photosynthèse en présence d'une contrainte modérée. L'importance d'un stress hydrique dépend du stade végétatif auquel se trouve la plante lorsqu'elle le subit (Merrien et al., 1981; Merrien, 1992) :

- Un déficit hydrique précoce (environ 20 jours après la levée) réduit le nombre d'ébauches foliaires formées. Il est cependant assez rare en conditions réelles de production compte tenu des conditions climatiques françaises.
- Les 4 semaines autour du stade floraison constituent la période la plus sensible. Un déficit hydrique provoque une diminution de la surface foliaire post-floraison, perturbant ainsi l'élaboration du rendement allant jusqu'à 67 % de pertes dans les conditions les plus drastiques.
- En période de post-floraison, un déficit hydrique entraîne une diminution de la durée de vie du couvert foliaire et une réduction de son activité. Le poids de 1 000 grains et la teneur en huile s'en trouvent affectés.

1.3.2 Surface foliaire et nutrition azotée

Il existe une relation étroite entre l'établissement et le maintien de la surface foliaire et l'alimentation azotée des plantes. Le tournesol, grâce à son système racinaire efficace en profondeur, est capable de puiser dans le sol les reliquats d'azote des couches de sol les plus profondes. Les apports d'azote sont donc à moduler en fonction de chaque type de sol. En France, la dose optimale ne dépasse généralement pas 80 kg d'azote par ha (Lecomte et Nolot, 2011) afin d'éviter l'exubérance foliaire qui peut provoquer une accélération de la sénescence des feuilles à la base, par auto-ombrage, et causer une plus grande sensibilité en cas de sécheresse (Merrien, 1992 ; Aguera et al., 2010).

Les plantes bien alimentées en azote sont plus vigoureuses et présentent un diamètre de tige et une hauteur supérieurs aux plantes carencées en azote (Ozer et al., 2004). La taille des feuilles varie considérablement en fonction du niveau d'alimentation azotée, le nombre de feuilles par plante n'est cependant pas affecté. L'alimentation azotée doit à la fois être précoce pour permettre un bon démarrage (formation des ébauches florales) et progressive afin d'assurer

une activité photosynthétique satisfaisante pendant la période de remplissage des graines (Blanchet et al., 1987).

L'azote agit également sur la phase d'élaboration du poids de la graine : une teneur en azote des limbes élevée permet aux feuilles de mieux résister à la sénescence en retardant la déstructuration des protéines de carboxylation. Ainsi, l'assimilation tardive est maintenue, la teneur en huile augmente et le poids de 1 000 grains est amélioré (Merrien, 1992). Par contre, un excès d'azote, en particulier après la floraison et durant le remplissage des graines, peut conduire à une chute de la teneur en huile dans les graines (Steer et al., 1984).

1.3.3 Surface foliaire et rayonnement

Le rayonnement a un effet important sur la surface foliaire : il affecte le nombre de cellules des limbes mais non leur taille. Une réduction de l'éclairement provoque une diminution du nombre de cellules. En effet, les cellules se trouvent bloquées pendant la phase de division cellulaire (Granier et Tardieu, 1997). De plus, il existe une relation linéaire entre la longévité du feuillage et le rayonnement journalier : la durée de surface foliaire peut ainsi être considérablement réduite par un fort auto-ombrage (Connor et Hall, 1997).

1.3.4 Surface foliaire et densité de peuplement

La compétition intraspécifique provoque la réduction de la surface foliaire et du nombre d'akènes par plante ainsi que de leur masse moyenne (Merrien, 1992). L'augmentation de la densité de peuplement provoque l'élongation de la tige et la réduction de son diamètre, probablement du fait d'une compétition pour la lumière. Ces changements morphologiques entraînent une moindre résistance à la verse et à la casse et modifient les conditions microclimatiques.

Le tournesol est une plante très plastique dont le développement foliaire est très dépendant des choix culturaux effectués. L'indice foliaire de la culture peut varier de 1.5 à 5 à la floraison. Si le nombre de feuilles de la plante est fonction de la variété, la surface foliaire développée est fonction des ressources azotées et hydriques à la disposition de la plante et de la compétition intraspécifique (Figure II. 2). On observe cependant une variabilité génétique pour la surface foliaire (Debaeke et al., 2010) souvent en relation avec la tardivité de la variété.

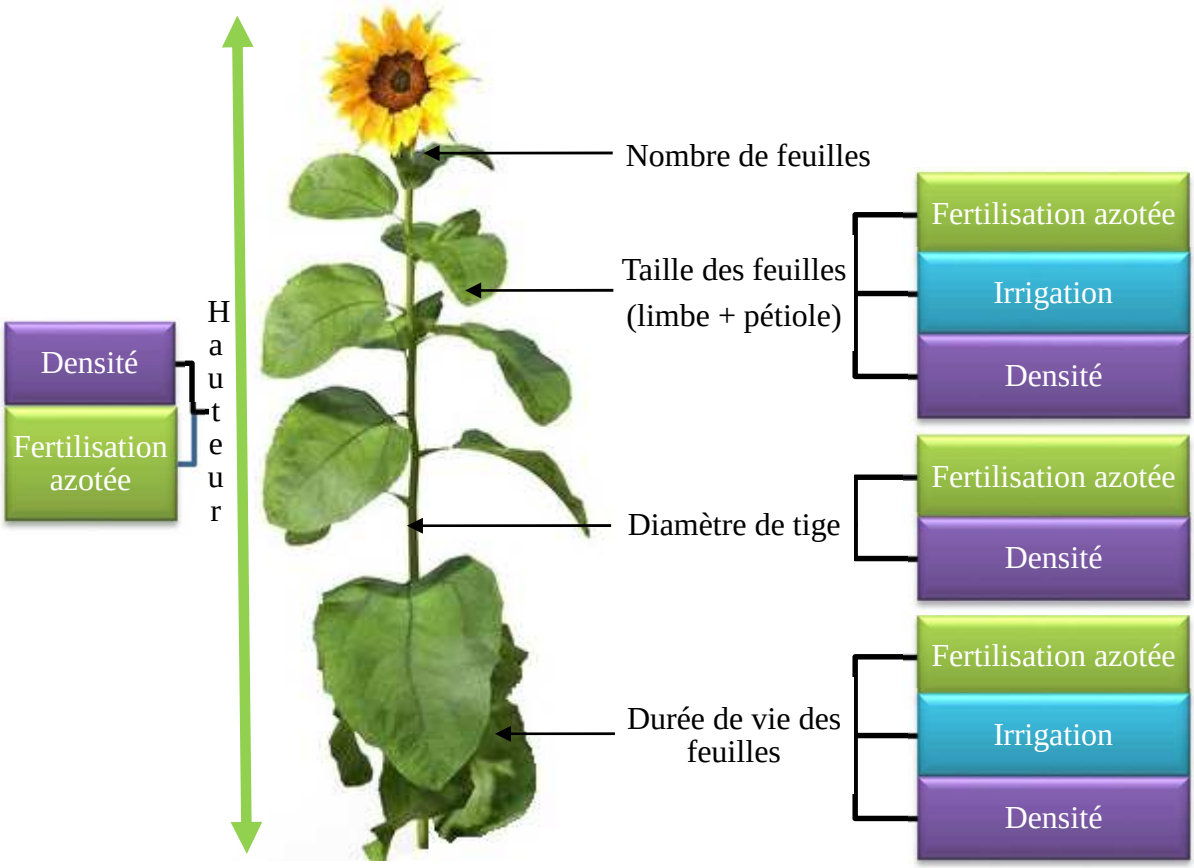


Figure II. 2. Effets des pratiques agricoles (hors choix variétal) sur les principales caractéristiques de la plante

1.4 SUNFLO, modèle de culture du tournesol

SUNFLO est un modèle de culture à pas de temps journalier (Figure II. 3). Il a pour objectif de simuler et de prédire de manière dynamique les réponses d'un couvert de tournesol variant par ses caractéristiques génotypiques, soumis à une gamme de conduites culturales, pour des conditions pédoclimatiques couvrant l'aire de production de l'espèce (Casadebaig et al., 2011).

Le couvert est vu comme un système capturant l'énergie lumineuse via sa surface foliaire. Il convertit cette énergie en biomasse pour ensuite orienter les assimilats vers les organes de récolte en fin de cycle. Le modèle se base sur une mise en place et une sénescence distribuée de la surface foliaire et non sur une approche « grande feuille ».

Il prend en compte les contraintes environnementales et notamment les effets de stress hydrique et azoté sur l'expansion foliaire et l'accumulation de biomasse. Il tient compte également des différences variétales par un module de paramétrage des caractéristiques génétiques de la plante (les douze paramètres variétaux sont détaillés en annexe 1), ce qui est le point le plus original par rapport aux modèles existants. La conduite culturale est également

prise en compte (date de semis, date de récolte, date de l'apport et dose d'azote, densité de levée, date de l'apport et dose d'irrigation).

Le cycle de développement du tournesol est divisé en 6 phases en utilisant le temps thermique (base 4.8°C) : (i) semis (A0)-levée (A2), (ii) A2-bouton étoilé (E1), (iii) E1-début floraison (F1), (iv) F1-début de remplissage des graines (M0), (v) M0-maturité physiologique (M3), (vi) M3-récolte (M4). Chaque changement de stade induit des processus physiologiques différenciés.

Le sol est décrit par la réserve utile (mm) sur la profondeur de sol accessible aux racines et par la vitesse de minéralisation potentielle de l'azote (kg N/j normalisé). Le climat journalier utilisé pour la simulation comprend 5 variables : températures minimales et maximales, précipitations, évapotranspiration potentielle et rayonnement global.

Les principales variables de sortie du modèle sont le rendement et la teneur en huile (en l'absence de maladies). Mais l'ensemble des variables d'état du modèle (par exemple, l'indice foliaire, la biomasse, l'eau transpirée, l'indice de nutrition azotée, la profondeur racinaire…) sont accessibles au pas de temps journalier et des cumuls peuvent être effectués s'ils sont pertinents.

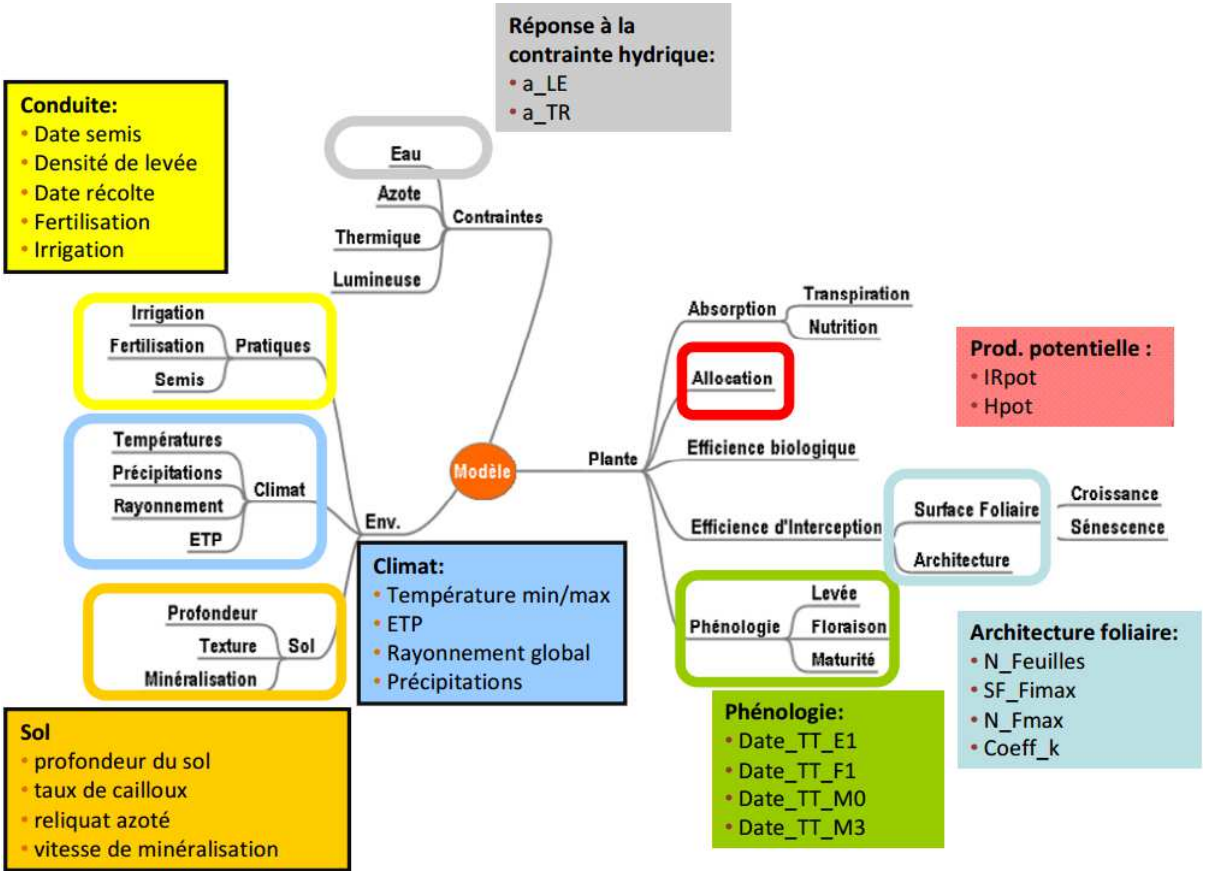
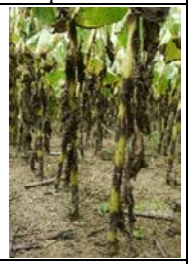


Figure II. 3. Schéma du modèle SUNFLO : modules (formalismes), variables d'entrée (conduite, climat, sol) et paramètres variétaux (production potentielle, architecture foliaire, phénologie, réponse à la contrainte hydrique), d'après Casadebaig et al. (2011)

Tableau II. 1. Caractéristiques des principales maladies du tournesol (Chollet et al., 2002)

		Mildiou *Plasmopara halstedii*	**Phomopsis** *P. helianthi / Diaporthe helianthi*	**Phoma** *P. macdonaldii / Leptosphaeria lindquistii*	**Sclérotinia** *S. sclerotiorum*	**Botrytis** *B. cinerea*	**Verticillium** *Verticillium dahliae*	**Albugo** *Pustula helianticola*	**Alternaria** *A. helianthi* et *A. helianthinficiens*	**Macrophomina** *M. phaseolina*
										
Type de champignon		Biotrophe à diffusion limitée	Nécrotrophe à diffusion large	Nécrotrophe à diffusion large	Nécrotrophe à diffusion large (sauf au collet)	Nécrotrophe à diffusion large	Nécrotrophe à diffusion limitée	Biotrophe	Nécrotrophe à diffusion large	Nécrotrophe à diffusion limitée
Conservation de l'inoculum	Forme	Oospores, mycélium	Mycélium	Mycélium	Sclérotes	Mycélium, Sclérotes	Microslérotes	Oospores, mycélium	Mycélium	Microslérotes
	Support	Résidus, sol, semences	Résidus	Résidus	Résidus, sol	Résidus, semences	Résidus, sol	Résidus	Résidus	Résidus, sol
	Durée de survie	10 ans	1 an	Au moins 3 ans	7 à 10 ans	1 an	14 ans	?	1 an	3-4 ans
Type d'inoculum		Zoospores	Ascospores	Ascospores, pycniospores	Mycélium, ascospores	Conidies, mycélium	Mycélium	Zoospores	Conidies	Mycélium
Polycyclisme		Oui	Non	?	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Hôtes		Tournesol, adventices (Bidens *sp*, Xanthium *sp*, centaurées)	Tournesol, adventices (Xanthium *sp*)	Tournesol	400	Nombreux	Nombreux (< 350)	Astéracées	Tournesol, adventices (Xanthium *sp*)	Tournesol, maïs, sorgho
Conditions favorables à l'installation du champignon		50 mm de pluie dans les 10 jours encadrant le semis (eau libre), température du sol > 10°C	HR > 90 % pendant 36h Optimum 25°C	Présence d'eau libre	42h d'eau libre à la surface des fleurons Optimum 18-25°C	15-20°C 90 % HR	20-27°C optimum 24°C	Optimum 15°C Croissance mycélium 20 à 25°C	Périodes chaudes (15-25°C) et pluvieuses	Faible précipitation, température > 20°C, optimum 28-30°C
Occurrence		Printemps pluvieux	Tous les ans	Tous les ans	Tous les ans	Etés pluvieux	Emergent	Faible	Faible	Faible
Nuisibilité potentielle		Forte	Forte	Forte	Forte	Parfois forte	Forte	Faible	Faible	Faible
Répartition (CETIOM)	Peu fréquente Moyennement fréquente Fréquente Très fréquente Départements avec moins de 200 ha de tournesol en 2010									

2 Le complexe parasitaire du tournesol

Le tournesol est une culture soumise à une forte pression biotique provoquant des pertes de rendement et de teneur en huile plus ou moins importantes selon les conditions climatiques de l'année, les conditions environnementales de la parcelle et les pratiques culturales (Gulya et al., 1997; Mestries et al., 2011). Les maladies du tournesol sont causées par des champignons, des bactéries, des virus, des mycoplasmes et des plantes parasites (orobanche) mais celles causées par les champignons sont les plus répandues et les plus nuisibles. Aujourd'hui, on comptabilise une douzaine de champignons phytopathogènes en France, les quatre principaux étant le mildiou, le sclérotinia, le phomopsis et le phoma.

2.1 Caractéristiques des maladies

L'apparition et le développement d'une maladie sont le résultat d'interactions entre un agent pathogène, une plante-hôte, leur environnement (sol, climat, microclimat, phytoclimat) et la conduite de culture. L'ensemble des maladies du tournesol répond au schéma général de la Figure II**.** 4 proposé par Lucas (2007) mais chacune possède des caractéristiques propres données dans le Tableau II**.** 1.

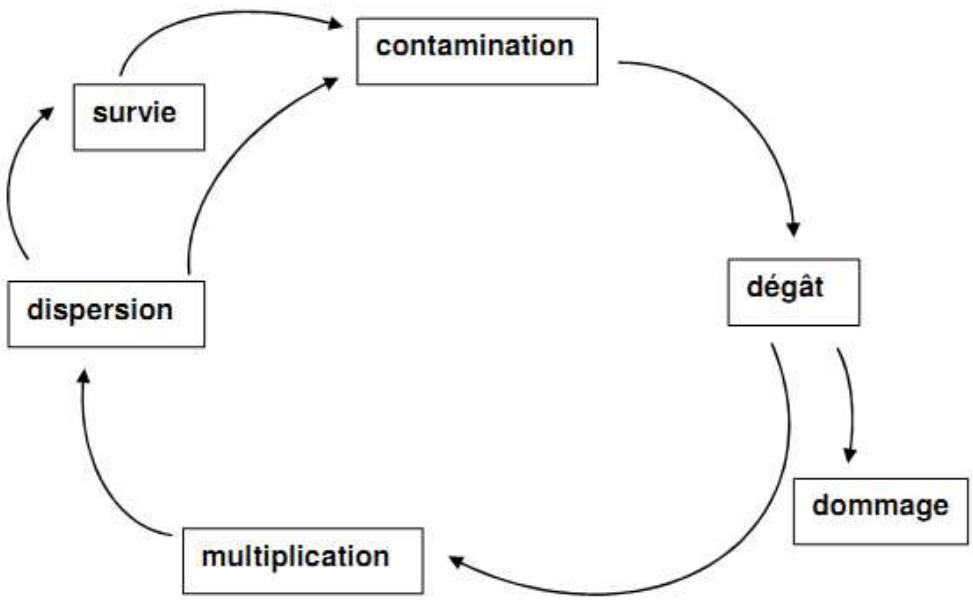


Figure II. 4. Cycle simplifié du développement d'un bioagresseur, sur une plante ou au sein d'une culture, ou à l'échelle d'un paysage (Lucas, 2007)

2.1.1 Principales maladies du tournesol en fréquence et sévérité

Le mildiou, causé par *Plasmopara halstedii*, a été décrit pour la première fois en France en 1966. La maladie touche l'ensemble des zones de production du tournesol. Elle se caractérise par un retard de croissance important (nanisme), des taches chlorotiques le long des nervures et un feutrage blanc sur la face inférieure des feuilles. Les taux d'attaques très variables peuvent entraîner de fortes chutes de rendement lorsque 80 % des plantes sont nanifiées ou détruites. Son évolution s'est manifestée par l'apparition de nouvelles races et l'arrivée de souches résistantes au métalaxyl (fongicide systémique utilisé dans le traitement des semences).

Classé comme « agent nuisible de quarantaine », la lutte contre le mildiou doit intégrer une combinaison de l'ensemble des moyens de gestion durable pour limiter son développement sur tournesol (génétique, agronomique, chimique) et assurer la durabilité des résistances (Tourvieille de Labrouhe et al., 2000).

Le phoma du tournesol (*Phoma macdonaldii/Leptosphaeria linquistii*) également dénommé la maladie des taches noires est présent chaque année en France depuis la fin des années 90. Tous les organes sont susceptibles d'être atteints. Les symptômes sur tige se présentent sous forme de taches noires au point d'insertion des pétioles. Ces taches peuvent confluer et former un manchon noir. La maladie peut provoquer des dessèchements précoces en cas d'attaque de bas de tige. La nuisibilité sur tige est limitée mais celle de bas de tige semble plus préoccupante.

La lutte fongicide en végétation n'est pas économiquement rentable et il n'existe aucune classification de résistance variétale (Bordat et al., 2011).

Le phomopsis (*Phomopsis/Diaporthe helianthi*) est présent sur l'ensemble de la zone de production du tournesol. L'infection débute sur le bord du limbe et la nécrose progresse sous forme d'un triangle le long des nervures. Une fois sur tige, la tache brun-rouge encercle la tige provoquant le dessèchement de la plante, pouvant mener à sa verse. Les attaques encerclantes sur tige sont responsables de pertes de rendement de 1-3 q/ha et de 1 point d'huile pour 10 % de plantes présentant ce type de symptômes.

Aujourd'hui considérée comme une maladie bien maîtrisée, la lutte repose sur l'utilisation de variétés résistantes, à compléter si besoin par des traitements chimiques préventifs. Cependant, en conditions climatiques particulièrement favorables, la maladie se manifeste encore dans les parcelles (Chollet et al., 2002).

Le sclérotinia, provoqué par *Sclerotinia sclerotiorum*, est une maladie majeure du tournesol. Le champignon polyphage se conserve de longues années dans les sols et représente un danger potentiel permanent pour la culture. Tous les organes de la plante sont susceptibles d'être touchés. Les attaques au collet liées à la germination des sclérotes dans le sol provoquent une pourriture humide et blanche en bas de tige et le dépérissement de la plante. Sur capitule, le mycélium envahit l'éponge provoquant son pourrissement. Les dommages les plus graves sont dus aux attaques sur capitule qui peuvent occasionner une chute de rendement de 50 %. Toute la zone de production du tournesol est concernée par les attaques lorsque les conditions climatiques sont favorables, mais les régions les plus touchées se situent dans la partie nord de la France (Poitou-Charentes, Centre).

En l'absence de lutte chimique efficace et économiquement viable, la lutte passe essentiellement par le choix de variétés résistantes et l'application de mesures agronomiques adaptées (Chollet et al., 2002).

2.1.2 Maladies secondaires ou en émergence

La verticilliose, causée par *Verticillium dalhiae*, est une maladie émergente en France. Elle se manifeste sous forme de chloroses internervaires qui finissent par dessécher la feuille. Le symptôme ultime est un flétrissement complet et brutal de la plante dont la tige prend une coloration noire. Observée sur tous les continents (notamment en Amérique du Sud), son incidence actuelle en France est considérée comme limitée mais elle peut provoquer des pertes de rendement importantes (entre 10 et 80 %).

Du fait de la longévité des microsclérotes dans le sol et de la large gamme d'hôtes du champignon, la génétique offre la meilleure perspective de lutte contre cet agent pathogène (Chollet et al., 2002).

Macrophomina phaseolina est un champignon du sol très répandu qui s'exprime essentiellement en fin de cycle dans les parties les plus séchantes des parcelles dont il accélère le dessèchement, la base des tiges prenant alors une coloration gris clair caractéristique. Si les dégâts peuvent être conséquents dans les pays chauds, dans nos régions, *Macrophomina* se comporte comme un parasite de faiblesse, la maladie est donc considérée comme mineure.

La lutte chimique n'est pas envisageable. Seule la limitation des stress (sécheresse essentiellement) minimise le risque d'attaque par le parasite (Chollet et al., 2002).

L'alternariose, provoquée par *Alternaria helianthi* et *A. helianthinficiens,* est actuellement une maladie secondaire en France avec des pertes de rendement très exceptionnelles. Ce champignon provoque cependant des dégâts importants dans les régions chaudes et humides dans le reste du monde. Les premières attaques ont lieu sur les feuilles basales sous forme de lésions grisâtres entourées d'un halo chlorotique. Par la suite, les taches s'étendent pour devenir coalescentes provoquant un dessèchement prématuré des feuilles. Sur tige, les taches elliptiques peuvent fusionner et entraîner des phénomènes de casse en cas d'attaques sévères.
En France, aucun traitement fongicide n'est préconisé, la résistance génétique offre la meilleure voie pour réduire l'impact de la maladie (Chollet et al., 2002).

La rouille blanche, causée par *Pustula helianticola*, est apparue significativement dans le Lauragais en 1994. Les attaques se manifestent sous forme de cloques vert pâle à jaune. Les tissus se nécrosent et les feuilles touchées se dessèchent rapidement. Dans les cas les plus extrêmes, des lésions sur tige peuvent provoquer la verse des plantes en fin de cycle. Très répandue dans le monde (Australie, Afrique du Sud, Argentine, Russie, …), elle est considérée comme peu nuisible même s'il semble que les dommages puissent être plus importants dans un contexte favorable aux maladies de fin de cycle.
La génétique serait la meilleure voie de lutte (Chollet et al., 2002).

Le botrytis, causé par *Botrytis cinerea*, est une maladie épisodique préjudiciable les étés pluvieux en cas de récolte tardive. Saprophyte, il s'installe sur des tissus lésés. Sur capitule, il se manifeste par des taches gris brunâtres, humides, qui conduisent à un pourrissement complet de l'éponge. Il entraîne des pertes importantes de rendement et une dévalorisation de la qualité de l'huile.
La lutte chimique contre cet agent pathogène est actuellement inopérante, seule une récolte précoce permet d'esquiver les périodes favorables à l'expression de la maladie (Chollet et al., 2002).

Parmi les 4 maladies majeures du tournesol, seuls deux champignons phytopathogènes ont été retenus dans cette étude (le *Phomopsis* et le *Phoma*) (i) parce qu'ils sont très sensibles aux pratiques culturales affectant le couvert végétal, (ii) parce qu'ils cohabitent et interagissent fortement, (iii) parce que les connaissances acquises depuis les années 90 (en

épidémiologie notamment) permettent d'envisager une modélisation couplée champignon-peuplement de tournesol.

En effet, les épidémies de mildiou dépendent essentiellement des conditions climatiques au moment des semis et hormis la date de semis et le choix variétal, les pratiques culturales ont peu d'impact sur le niveau d'attaque du champignon.

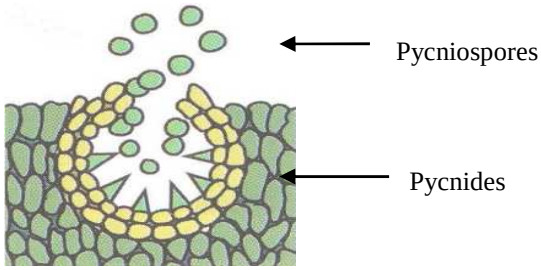
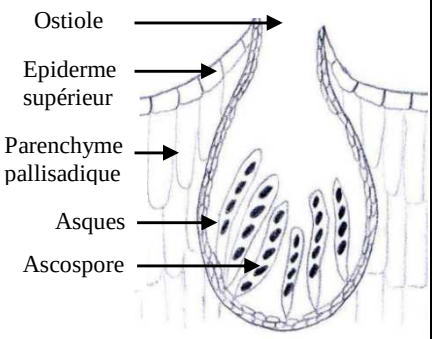
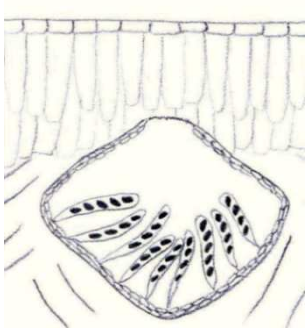
Le sclérotinia est sensible aux techniques culturales affectant le couvert (notamment la densité de peuplement, la fertilisation azotée et l'irrigation ; Pérès et al., 1992). La forme la plus répandue est l'attaque sur capitule qui dépend beaucoup des conditions climatiques à partir de la floraison. Les équations d'un modèle épidémiologique développé par Payen (1983) n'ont malheureusement pas été publiées et cette information n'est plus utilisable aujourd'hui. Par ailleurs, le *Sclerotinia* est un champignon peu présent dans le bassin de production du Sud-Ouest de la France, principale zone de culture du tournesol aujourd'hui. De ce fait, on ne dispose pas de données suffisantes pour envisager un travail d'intégration dans le cadre de la thèse. Par ailleurs, sur le plan expérimental, le niveau d'infection dépend de la disponibilité en sclérotes dans le sol, ce qui n'est accessible que sur certains sites dédiés.

2.2 Epidémiologie comparée du phoma et du phomopsis

2.2.1 Historique des champignons

Le *Phomopsis* du tournesol (agent responsable : *Diaporthe*/*Phomopsis helianthi*, Munt.-Cvet.) est un champignon phytopathogène capable d'entraîner d'importantes pertes de rendement sur tournesol. Observé pour la première fois en France en 1984 sur des parcelles du Lauragais, il est originaire de Yougoslavie et Roumanie, où il est apparu en 1980 (Moinard et Eychenne, 1998). Actuellement, toute la région Sud-Ouest est affectée par le champignon. Seules les conditions climatiques déterminent la présence et l'ampleur de la maladie (Perny, 1992). Les attaques de phomopsis ont été plus rares à la fin des années 2000 en raison du climat peu favorable à son développement. De plus, l'utilisation de variétés à bon niveau de résistance a permis de contrôler le phomopsis à partir des années 90. Cependant, des plantes adventices comme *Xanthium italicum* et *X. strumarium* (Vrandecic et al., 2010) ont été identifiées comme hôtes alternatifs au tournesol ce qui représente une source potentielle d'inoculum pour les plantes cultivées. Plus récemment, de nouvelles espèces de *Phomopsis* ont été identifiées sur tournesol en Australie et aux USA avec des

Tableau II. 2. Classification systémique de *Phoma macdonaldii* et de *Phomopsis helianthi* d'après Blackwell et al. (2012)

	PHOMOPSIS	**PHOMA**
FORME IMPARFAITE OU NON SEXUEE	***Phomopsis helianthi* Munt-Cvet. (1981)**	***Phoma macdonaldii* Boerema (1970)**
Embranchement	Ascomycota	
Sous-embranchement	Pezizomycotina	
Classe	Sordariomycetes	Dothideomycetes
Ordre	Diaporthales	Pleosporales
Famille	Diaporthaceae	Incertae sedis
Organe de fructification	Pycnides 	
FORME PARFAITE OU SEXUEE	***Diaporthe helianthi* Munt-Cvet. (1981)**	***Leptosphaeria lindquistii* Frezzi (1968)**
Embranchement	Ascomycota	
Sous-embranchement	Pezizomycotina	
Classe	Sordariomycetes	Dothideomycetes
Ordre	Diaporthales	Pleosporales
Famille	Diaporthaceae	Leptosphaeriaceae
Organe de fructification	 Périthèce	 Pseudothèce

niveaux d'agressivité plus ou moins importants (Thompson et al., 2011). L'inoculum reste présent dans le sol : les risques persistent en dépit d'années sèches successives (Jouffret, 2005b).

La maladie des taches noires du tournesol (agent responsable : *Phoma macdonaldii*/*Leptosphaeria linquistii*) a été identifiée pour la première fois par Mc Donald (1964) au Canada. Apparu en France dans les années 80, le phoma a pris de l'importance depuis les années 95, avec une augmentation des dommages causés au tournesol, devenant ainsi une des maladies les plus préoccupantes pour le tournesol (Vincourt et al., 2011).

2.2.2 Classification des champignons

Le *Phoma* et le *Phomopsis* appartiennent à la famille des Ascomycètes. Ils existent tous deux sous deux formes qui se succèdent tout au long de leurs cycles biologiques et sont caractérisées par des fructifications spécifiques (Tableau II**.** 2) :

- la forme parfaite ou forme sexuée (téléomorphe) qui produit des périthèces (pour le *Phomopsis*) ou des pseudothèces (pour le *Phoma*),
- la forme imparfaite ou forme non sexuée (anamorphe) qui produit des pycnides.

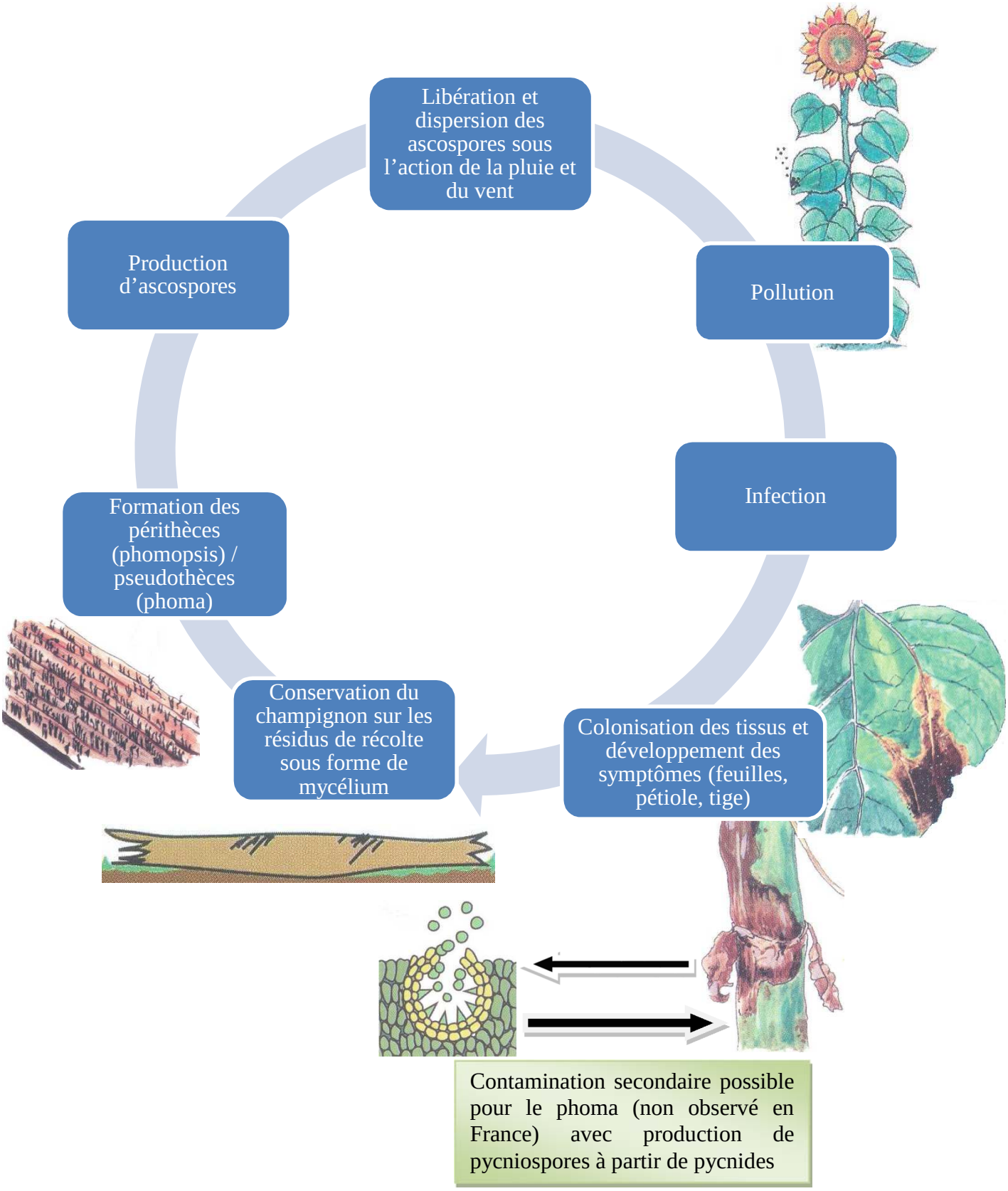


Figure II. 5. Cycle biologique des deux champignons : *Phomopsis* et *Phoma* (d'après Chollet et al., 2002; Bordat et al., 2011)

2.2.3 Cycle biologique des champignons

La forme asexuée de ces agents pathogènes se développe sur le tournesol sur pied et alterne avec la forme sexuée qui se développe sur des tissus morts : cannes de tournesol, débris (Masirevic et Gulya, 1992). La transition de la forme anamorphe (asexuée) à téléomorphe (sexuée) a lieu en automne. Durant la période hivernale, les champignons se conservent sous forme de mycélium sur les débris de tournesol qui, s'ils ne sont pas broyés ou enfouis après la récolte, jonchent la surface des parcelles (Figure II**.** 5). Les conditions de température et d'humidité relative optimales au bon déroulement de chaque phase du cycle épidémiologique des deux champignons sont récapitulées dans le Tableau II**.** 3.

Tableau II. 3. Conditions climatiques durant le cycle biologique du *Phoma* et du *Phomopsis*

	PHOMA MACDONALDII		***PHOMOPSIS HELIANTHI***	
	Température (T)	**Humidité Relative** (HR)	**Température** (T)	**Humidité Relative** (HR)
Maturation des asques	T > 6 °C	HR ≥ 85 %	T > 6 °C (T_{opt} de 18.5°C)	HR ≥ 85-90 %
Infection	5 °C < T < 30 °C (T_{opt} : 25 °C)	HR ≥ 90 % pendant 36 h	15 °C < T < 22 °C	HR ≥ 90 % pendant 36 heures + présence d'eau libre
Incubation	Non renseignée	Non renseignée	20 °C < T < 25 °C	HR > 90 % le temps de l'incubation
Apparition et progression des dégâts	T_{opt} > 20 °C	HR ≥ 90 %	15 °C < T < 33 °C. (T_{opt} : 25 °C)	HR ≥ 90 % pendant 10h/jours

2.2.3.1 Maturation des périthèces et des pseudothèces

Les protopérithèces de phomopsis se forment dès le mois de novembre. Les périthèces peuvent se former à l'obscurité mais leur morphogenèse est fortement stimulée par la lumière blanche. Leur développement est stoppé en hiver par le froid mais il ne nécessite pas de cryo-induction (Assemat et Fayret, 1987). La maturation reprend au printemps dès que la température atteint 10°C (T_{opt} = 20°C), à condition que l'hygrométrie soit supérieure à 85 % (Moinard et Eychenne, 1998). Les pluies, en humectant les débris de cannes et en maintenant une hygrométrie relative importante, favorisent ce processus.

Au sein d'un même périthèce, les asques ne mûrissent pas au même moment mais par vagues successives. Un périthèce peut donc produire des ascospores pendant 17 jours consécutifs en culture *in vitro* (Penaud et al., 1994). Le stock d'ascospores est donc libéré progressivement au cours de plusieurs phases de projection, à partir du mois de mai jusqu'au mois d'août.

L'apparition des fructifications du phoma est précoce (dès février-mars en France), les pycnides étant souvent les premières. Pendant tout le printemps et de manière continue, les deux formes de fructification du phoma sont présentes (Frei, 2010) avec une dominance de pycnides ou de pseudothèces selon les conditions climatiques (Pérès et Le Sourne, 2000). Tout comme pour le phomopsis, les pseudothèces mûrissent par vagues permettant une dissémination échelonnée des ascospores (Délos et al., 1998). La température minimale nécessaire à la maturation des asques de *Phoma* est comprise entre 6 et 13°C (Muhlberger, 1996)

L'inoculum de phomopsis ne reste infectieux qu'une année. La monoculture du tournesol étant interdite pour limiter le risque mildiou, l'origine de l'inoculum primaire est donc toujours exogène à la parcelle. L'inoculum de phoma, quant à lui, peut rester infectieux au moins 3 ans. Les résidus de l'année produisent à la fois des périthèces et des pycnides tandis que les résidus plus âgés (1 ou 2 ans) ne portent plus que des pycnides (Poisson-Bamme et Pérès, 2000).

2.2.3.2 Dispersion des ascospores

Pour les deux agents pathogènes, la projection des ascospores est favorisée par la pluie et le vent. On estime que si le pourcentage d'asques mûrs atteint ou dépasse 50 %, des précipitations de 0.5 mm suffisent à provoquer des contaminations significatives. De ce fait, lorsque le printemps est doux et pluvieux, les premières projections d'ascospores sont précoces, dès les mois de mai pour le phomopsis et avril pour le phoma (Délos et al., 1998; Moinard et Eychenne, 1998).

Les pycniospores comme les ascospores peuvent être à l'origine des contaminations primaires. Cependant, les ascospores, très légères, sont disséminées sur de longues distances par le vent (et par les insectes dans le cas du phoma ; Gaudet et Schulz, 1984). A l'inverse, au-delà de 1 m de la source d'inoculum, les pycniospores voient leurs chances d'infecter des plantes diminuer considérablement (Délos et al., 1997a).

2.2.3.3 Infection

Infection par le *Phomopsis*

Entre 15 et 22°C, la majorité des spores germent en 4 heures. La présence d'eau libre sur la feuille et 36 heures d'hygrométrie supérieure à 90 % sont nécessaires pour induire des contaminations notables. En conditions sèches, les spores gardent leur pouvoir germinatif pendant une dizaine de jours (Davet et al., 1991; Moinard et Eychenne, 1998).

Les filaments germinatifs pénètrent dans la plante par le bord du limbe, au niveau des nervures principales ou secondaires (Pérès, 1988) via les pores des hydathodes. Une infection est également possible par la paroi cellulaire grâce au développement d'un appressorium (Lesovoy et Marchenko, 1999). L'infection par le bord du limbe est la plus courante sans doute en raison des conditions d'humidité qui y règnent.

Les contaminations sont possibles dès la levée du tournesol. Le champignon pénètre dans la plante au niveau des cotylédons et peut entraîner sa mort si les conditions climatiques sont favorables à son développement. Ce type d'attaque est relativement rare ; il correspond à une coïncidence entre une projection importante et le stade cotylédonaire de la plante, conjonction de courte durée (Moinard et Eychenne, 1998). Par la suite, les contaminations se produisent sur les feuilles, quel que soit l'étage foliaire dès lors que les conditions sont favorables.

Infection par le *Phoma*

Pour que l'infection réussisse, l'atmosphère doit être saturée en humidité (humidité relative minimale de 95 %) pendant au moins 24h lorsque la température est optimale à 25°C (Roustaee et al., 2000b). La durée de saturation augmente avec la diminution de la température (Fayzalla et Maric, 1981). La contamination du tournesol par le *Phoma* peut s'effectuer entre 5 et 30°C, les spores de phoma germant à un optimum de température compris entre 15 et 30°C selon les souches (Roustaee et al., 2000b). Le champignon infecte le pétiole aussi bien en perforant mécaniquement la cuticule de la plante qu'en empruntant la voie des stomates (ou des blessures) sans formation d'appressorium (Roustaee et al., 2000c).

Les contaminations sont également possibles dès le stade cotylédonaire et entraînent un dessèchement prématuré des cotylédons (Penaud et Pérès, 1995). Le champignon progresse ensuite sur l'hypocotyle, conduisant à la formation d'un manchon noir encerclant la jeune tige.

2.2.3.4 Développement du champignon dans la plante

Développement du *Phomopsis*

Le champignon se développe de manière optimale pour des températures moyennes journalières de 20-22°C et une hygrométrie relative supérieure à 90 % pendant 10 à 12 heures par jour. Entre 10 et 15°C et au-dessus de 20-30°C, sa croissance est nettement ralentie (Moinard et Eychenne, 1998). Quatre expositions répétées de 8 heures à 33°C bloquent définitivement la croissance du champignon (Mouquot, 1997). Une humidité relative inférieure à 50 % limite également la progression du champignon (Penaud et al., 1994).

Après pénétration dans l'hôte, les hyphes d'infection progressent par les vaisseaux conducteurs et les espaces intercellulaires (Muntanola-Cvetkovic et al., 1991). Elles atteignent ensuite le pétiole et peuvent alors passer sur la tige, attaquer les vaisseaux et la moelle. Les cellules du phloème et les tissus parenchymatiques sont très affectés par le champignon : ils sont détruits en totalité. L'impact sur le xylème est minime (Heller et Gierth, 2001). La destruction des tissus végétaux serait due à la sécrétion de toxines comme la phomozine (Mazars et al., 1990).

Suite au passage sur tige, des masses d'hyphes se forment dans le cortex de l'hôte. Elles évoluent en pycnides qui finissent par rompre l'épiderme (Muntanola-Cvetkovic et al., 1989). Ces pycnides émettent des conidies β (stylospores) stériles. Chez certains isolats, on note la production de conidies α (pycniospores) susceptibles de germer mais qui ne semblent pas infectieuses, le tournesol étant de plus en sénescence (Mouquot et al., 1997). Le rôle des spores asexuées n'est pas connu.

En conditions optimales, on estime qu'il faut environ 40 jours au champignon pour atteindre la tige après une contamination, et environ 15 jours supplémentaires pour qu'il détruise tout ou partie du système vasculaire à l'intérieur de la tige. Il s'écoule donc environ deux mois entre la date de contamination et la destruction potentielle de la plante (Penaud et al., 1994).

Les ascospores produites sur les débris de cannes représentent la seule source d'inoculum capable de provoquer des contaminations tout au long de la campagne. L'absence de contaminations secondaires est l'une des caractéristiques importantes de cette maladie. L'épidémiologie est donc exclusivement liée à une succession de contaminations primaires (Délos et al., 1995 ; Moinard et Eychenne, 1998). Jusqu'à présent, aucune observation n'a

permis de démontrer que la maladie pouvait se transmettre par l'intermédiaire de semences contaminées lors d'attaques du capitule (Perny, 1994a; Délos et Moinard, 1995).
Après la récolte, le mycélium du champignon se conserve dans les cannes infestées laissées sur le sol. L'inoculum se prépare pour l'année suivante…

Développement du *Phoma*

La période d'incubation dure entre 8 et 15 jours entre la période d'infection et l'apparition des premiers symptômes, les attaques sur feuilles évoluant d'autant plus vite que les feuilles sont âgées au moment des contaminations (Penaud et Pérès, 1995). Le mycélium se développe dans la paroi des cellules puis dans le cytoplasme. 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 (Roustaee et al., 2000c). Tout comme le phomopsis, le phoma est un champignon nécrotrophe capable de produire une phytotoxine, le zinniol. Cette toxine non spécifique, identifiée pour la première fois chez *Alternaria zinniae* (White et Starrat, 1967), est susceptible de reproduire la quasi-totalité des symptômes de la maladie chez le tournesol. Contrairement au phomopsis, la température ne semble pas être un facteur limitant lors de la progression du phoma (Debaeke et Pérès, 2003).

En Midi-Pyrénées, la présence de pycnides de phoma au niveau des symptômes sur tige en parcelles agricoles n'a jamais été observée avant la récolte au cours de plusieurs années (1994-1996 ; 2006-2010 : CETIOM). Ces contaminations secondaires ne seraient donc pas systématiques, l'épidémie de phoma apparaissant alors de type monocyclique, avec pour origine les ascospores issues des pseudothèces, de manière analogue au phomopsis.

2.2.4 Interaction entre les deux champignons

Compte-tenu de la localisation des deux champignons dans la plante et de leur période de développement, il existe des possibilités d'interactions entre les deux agents pathogènes. En effet, pour que le phomopsis atteigne la tige, il doit se développer sur des tissus sains, non nécrosés en partant du limbe et en passant par le pétiole (Figure II**.** 6). Or, ce pétiole peut se trouver nécrosé par une attaque de phoma se développant en amont. Des essais conduits au CETIOM en 1996 et 1997 (Jouffret et Penaud, 2005) et à Auzeville en 2000 (Berault, 2000) ont montré que des interactions se produisent entre ces deux agents pathogènes : les parcelles traitées sélectivement contre le phoma présentent des taux d'attaque de phomopsis sur tige plus importants que les parcelles non traitées (Figure II. 7). Le phoma a donc

empêché le phomopsis de passer de la feuille à la tige. Les conséquences directes de cette interaction sur le rendement et la teneur en huile du tournesol sont favorables puisque la tache de phomopsis sur tige est beaucoup plus nuisible que la tache de phoma sur tige. A ce jour, nous ne savons pas sous quelles conditions se met en place l'interaction et comment le phoma empêche effectivement le phomopsis de passer sur la tige. En effet, il n'existe aucune publication sur ce sujet. Est-ce dû à une compétition pour les nutriments ? À une toxine libérée par le phoma qui agirait à distance? À une action mécanique (obstruction des vaisseaux par le phoma) ? À une activation d'éliciteurs lors de la contamination par le phoma ? Cette interaction a un intérêt dans le cadre d'une protection intégrée du tournesol : le phoma pourrait servir d'agent de lutte biologique contre le phomopsis.

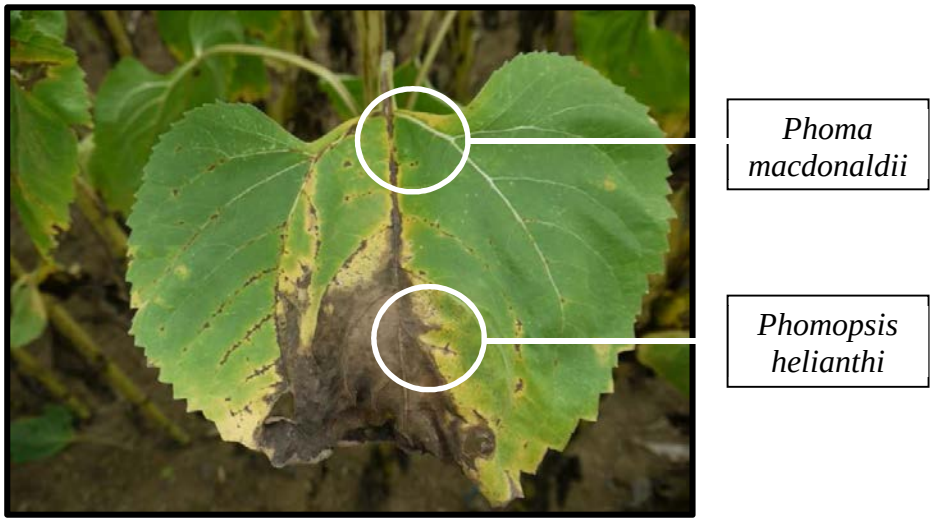


Figure II. 6. Interaction possible entre *Phoma macdonaldii* et *Phomopsis helianthi*

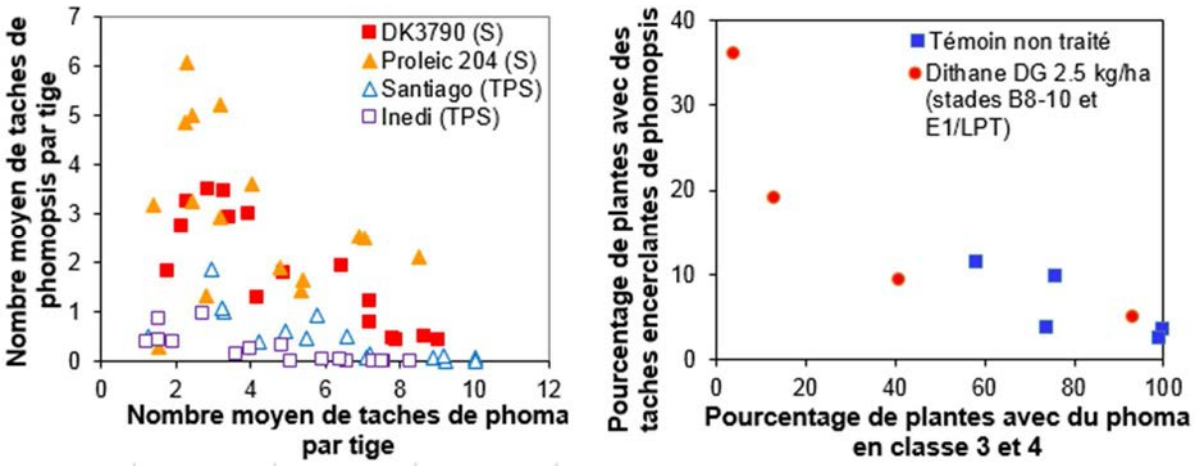


Figure II. 7. Effet de la sévérité des attaques de phoma sur tige sur le nombre de taches de phomopsis sur tige sur des essais conduits à Auzeville en 2000 (a) et au CETIOM en 1996 et 1997 (b)

2.2.5 Symptômes et dommages

2.2.5.1 Symptômes

Phoma macdonaldii

Le *Phoma* est responsable en particulier du syndrome de « dessèchement précoce » de la plante de tournesol. Le tournesol est réceptif durant tout son cycle de développement, avec une plus forte sensibilité entre les stades bouton floral et floraison. Toutes les parties aériennes de la plante sont susceptibles d'être touchées (Tableau II**.** 4).

Tableau II. 4. Les différents symptômes de phoma sur tournesol

Sur collet Suite à des contaminations très précoces, des macules noires peuvent apparaître sur le collet, quel que soit le stade de la plante. Ces symptômes provoquent parfois la formation de crevasses profondes. Sur les variétés sensibles, les nécroses ont une forme allongée, crevassée. Elles encerclent la tige et provoquent une sénescence prématurée de la plante. Ce syndrome de dessèchement précoce constitue la forme la plus nuisible de la maladie	
Sur tige Les symptômes de phoma sur tige se manifestent par des taches noires sur le nœud foliaire. Les nécroses peuvent se développer jusqu'à devenir coalescentes et former un manchon noir sur la tige.	
Sur feuille Le développement du champignon reste limité au niveau du limbe. Les symptômes débutent généralement sur les feuilles basales les plus âgées sous la forme de lésions noires discontinues et localisées le long des nervures. Lorsque ces taches se réunissent à l'embranchement des nervures principales et du pétiole, un faciès de « patte d'oie » se forme. La progression de la maladie le long du pétiole, très souvent sous forme de taches discontinues, entraîne alors le flétrissement et la chute prématurée de la feuille.	
Sur pétiole C'est l'organe de prédilection pour les contaminations par le phoma. La contamination a lieu soit dans la rainure qui se forme au centre du pétiole vers le stade « 10 feuilles », soit au point d'insertion du pétiole dans la tige. Ce point présente une forme d'auget très propice à la rétention d'eau ce qui favorise la germination des spores.	
Sur capitule Si le climat reste très humide après la formation du capitule, des symptômes de coloration noire peuvent apparaître tout d'abord sur les bractées puis au point d'insertion de la tige sur le capitule. Ces nécroses peuvent alors provoquer rapidement le dessèchement prématuré du capitule lorsqu'elles encerclent la crosse et la tige. Les semences pourront à leur tour être contaminées, permettant ainsi au champignon de se conserver sous forme de mycélium et/ou de pycnides.	

Phomopsis helianthi

L'évolution des symptômes sur la plante est étroitement liée aux conditions climatiques qui suivent la contamination, ainsi qu'au degré de sensibilité de la variété cultivée. Les premiers symptômes apparaissent en moyenne 20 jours après une phase de contamination, pour des températures comprises entre 20 et 24°C. Les symptômes de phomopsis sur tige sont parfois confondus avec des symptômes de phoma sur tige qui se manifestent par des taches sur le nœud foliaire, d'abord non encerclantes, puis encerclantes, de couleur noire, contrairement au phomopsis dont les taches sont brunes (Tableau II. 5).

Tableau II. 5. Les différents symptômes de phomopsis sur tournesol

Sur feuille Les premiers symptômes se manifestent toujours sur les feuilles (ou sur les cotylédons en cas d'attaque précoce). Une petite nécrose brune apparaît sur le bord du limbe à l'extrémité d'une nervure principale ou secondaire. Elle se développe en suivant la nervure touchée et forme une tache nécrotique triangulaire dont la pointe est dirigée vers le pétiole. Sur le front de progression du symptôme se forme une zone marginale jaune résultant de la production de toxines par le champignon. Lorsque le pétiole est atteint, la feuille se dessèche rapidement.	 
Sur tige Après avoir envahi le pétiole, le champignon peut « passer sur tige ». Une tache brun-rouge apparaît au point d'insertion du pétiole. A terme, la tache englobe la tige et bloque totalement la circulation de la sève formant le symptôme de tache encerclante. Sous la tache, les vaisseaux conducteurs prennent une teinte marron et la moelle se colore en rose-beige. Préalablement à sa destruction, la moelle se rétracte et forme un des aspects caractéristiques de la maladie : le symptôme « pile d'assiettes ». La tige se dessèche et devient entièrement brune. Fragile, elle peut se briser sous l'action du vent ou de la pluie. Ce dessèchement provoque l'échaudage des capitules qui deviennent chétifs.	 
Sur capitule Des nécroses marron sont parfois observables au dos du capitule. Elles sont issues de la contamination des bractées ou des feuilles sous capitulaires. Ces nécroses progressent ensuite vers la crosse. L'encerclement de la crosse provoque le dessèchement prématuré du capitule.	

Dans le cas d'une attaque précoce des cotylédons, une nécrose brune apparaît au niveau de leur point d'insertion et provoque un étranglement de la tige. On assiste alors soit à un dépérissement rapide de la plante, soit à l'apparition d'un bourrelet de cicatrisation selon la sensibilité de la variété (Perny, 1994b).

2.2.5.2 Dommages associés

Quel que soit le champignon, l'ampleur des dommages varie en fonction (i) du stade phénologique du tournesol au moment de la contamination, (ii) de la progression du champignon dans la plante, elle-même dépendante des conditions climatiques et du degré de sensibilité de la variété cultivée.

Les attaques de Phomopsis ont des conséquences à la fois sur le rendement et sur la qualité de la récolte (teneur en huile en particulier). Des attaques très précoces, au niveau de la première paire de feuilles peuvent se traduire par la mort d'un certain nombre de plantes mais elles restent rares. Les contaminations qui surviennent avant la floraison sont les plus à craindre. Les pertes à la récolte peuvent dépasser 50 % et même atteindre 100 % sur des variétés sensibles (parcelle entièrement versée ; Debaeke et al., 2003). Si l'attaque se produit au cours de la floraison, les baisses de rendement ne dépassent pas 30 %. A partir du stade « laiteux » des akènes, les contaminations ne représentent plus un danger pour les cultures compte-tenu du temps d'incubation de la maladie. L'effet du Phomopsis sur la récolte peut être estimée en observant le type de symptômes le plus fréquemment rencontré sur la parcelle (Moinard et Eychenne, 1998) :

- Si les symptômes sont sur feuilles, voire sur tiges, mais sans taches encerclantes, la taille des capitules n'est pas affectée et les grains mûrissent normalement ; les pertes de rendement sont négligeables.
- Si les tiges présentent des taches encerclantes ou entièrement brunes (symptômes plus fréquents sur variétés sensibles ou très sensibles), la circulation de la sève est perturbée, voire stoppée. Les capitules sont plus petits ou échaudés. Le poids de 1 000 grains et la teneur en huile peuvent être fortement diminués. Pour 10 % de plantes présentant des taches encerclantes sur tige, les pertes varient entre 1 à 3 q/ha et 1 point d'huile (CETIOM).
- Lorsque les symptômes sont plus avancés, les tiges les plus touchées sont fragilisées et peuvent casser sous l'action du vent ou de la pluie.

Les dommages causés par le phoma sont plus difficilement quantifiables en raison de la difficulté à obtenir un témoin totalement sain. Les taches indépendantes sur tiges n'apparaissent pas nuisibles, les nécroses étant alors superficielles. Seules les taches coalescentes sur tige encore verte ou les plantes avec une tige noire et desséchée entraînent des pertes de rendement de l'ordre de 0.5 q/ha pour 10 % de plantes atteintes. Ainsi, les pertes de rendement sont estimés entre 2 et 7 q/ha toutes formes d'attaques confondues (Penaud et Pérès, 1995). Le phoma du collet, souvent associé au syndrome de dessèchement précoce, est actuellement la forme la plus préjudiciable de la maladie. Elle entraîne des pertes de rendement de 10 à 30 % mais pouvant atteindre 70 % en cas de sénescence prématurée de la plante. Elle provoque également une diminution du poids de 1 000 grains (Carson, 1991) et du rendement en huile par plante (Velazquez et Formento, 2003).

2.3 Les modèles épidémiologiques existants

2.3.1 Asphodel, modèle de prévision du risque phomopsis

Asphodel est un logiciel mis au point par le SRPV Midi-Pyrénées entre 1992 et 1995, afin d'optimiser le positionnement des traitements fongicides (Délos et Moinard, 1997a). Construit selon un formalisme déterministe, ce modèle décrit l'effet du climat sur la dynamique du champignon (maturation des ascospores, projections et contaminations) et la réceptivité de la plante en fonction du stade et de la variété. Il simule l'évolution du phomopsis dans une parcelle témoin ainsi que la quantité de maladie résiduelle après traitement.

Asphodel a pour objectif de déterminer la précocité du risque phomopsis, de détecter les projections significatives induisant les contaminations, et de détecter les périodes favorables aux contaminations. Connaissant la sensibilité de la variété et le stade phénologique de la plante, il calcule le niveau de contaminations attendu et les risques de nuisibilité potentiels en cas de passage sur tige. Les données du modèle sont alors retranscrites aux agriculteurs sous forme de préconisations par le biais des Bulletins de Santé du Végétal diffusés par le CETIOM pour les oléagineux.

Il est composé de 3 modules :

- Le module « champignon » simule l'influence du climat sur la dynamique du champignon. Il comprend des compartiments « maturation des asques », « projection » et « contamination ».

- Le module « plante » pondère la gravité de la contamination par un indice de gravité sur feuille (fonction de la sensibilité variétale et du stade phénologique) et un indice de nuisibilité potentielle (fonction de la date de contamination) qui traduit le risque de passage du champignon sur la tige.
- Le module « fongicide » calcule la quantité de maladie résiduelle en fonction de la date du traitement et du type de produit appliqué (Figure II. 8).

Toutefois, ce modèle présente quelques limites, notamment dans son absence de prise en compte du contexte agronomique de la parcelle. Il utilise des données météorologiques provenant d'une station hors culture avec une hypothèse de couvert de densité moyenne et régulière. Or, la variation de couvert durant la période de forte sensibilité est à l'origine des différences de fréquence d'attaques d'une parcelle par le phomopsis. De plus, il ne tient pas compte de la phase asexuée du champignon. Enfin, il ignore les évolutions du champignon survenant après la phase initiale d'infection sur feuille : toute attaque sur feuille aboutit à un symptôme sur tige plus ou moins grave.

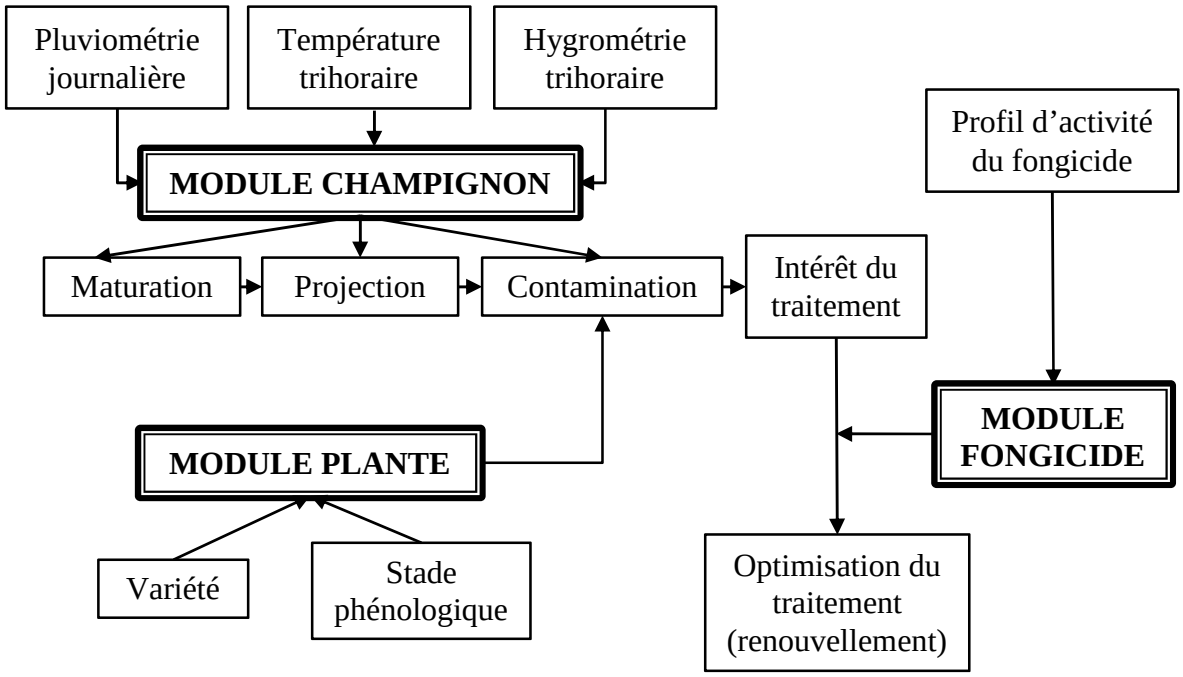


Figure II. 8. Schéma du modèle Asphodel

2.3.2 SimMat, modèle du phoma du colza

SimMat est un modèle dynamique de prédiction de la production de spores de *Leptosphaeria maculans / L. biglobosa*, agent du phoma du colza (Aubertot et al., 2006b). Il prédit la maturation des pseudothèces du champignon et les projections d'ascospores.

De manière à être facilement opérationnel, il fonctionne avec seulement trois variables d'entrée (date moyenne de récolte, température moyenne journalière, pluviométrie moyenne journalière). La maturation des pseudothèces dépend uniquement des jours cumulés favorables à la maturation après la récolte. Un jour est favorable à la maturation si la température moyenne journalière est inférieure à la valeur seuil θ_{max} et si la pluviométrie cumulée durant les derniers n_r jours est supérieure au seuil r_{min}. Le nombre de jours favorables cumulés requis pour la maturation suit une distribution gaussienne.

SimMat comporte cinq paramètres :

- N_{FD} : le nombre de jours favorables requis pour la maturation des pseudothèces ;
- σ_{FD} : la déviation standard du nombre de jours favorables requis pour la maturation des pseudothèces ;
- θ_{max}; n_r; et r_{min} (détaillés dans le paragraphe précédent).

Une proportion journalière d'asques mûrs éjecte ses ascospores en fonction des précipitations.

Compte-tenu de la proximité avec le phoma du tournesol, ce modèle peut être adapté pour décrire la maturation des pseudothèces et les projections d'ascospores de *L. lindquistii* en tournesol.

3 Les pratiques culturales et leur influence sur les maladies du tournesol

3.1 Choix variétal

Les variétés commercialisées sont des hybrides de deux types : soit des tournesols dits classiques, soit des tournesols dits oléiques (high-oleic) en raison de leur composition élevée en acide oléique (supérieure à 75 %). Ces dernières représentent actuellement plus de 50 % des surfaces totales en France (Jouffret et al., 2011).

Le choix de la variété est déterminant dans le contrôle de certaines maladies. Aujourd'hui, il existe de nombreuses variétés aussi bien oléiques que non oléiques ayant un bon comportement face aux différentes maladies. La plupart des résistances présentent un caractère quantitatif (Bert et al., 2002; Bert et al., 2004; Vear et al., 2008). Seules des résistances « gène pour gène » ont été utilisées dans la lutte contre le mildiou mais elles ont été progressivement contournées en France à partir de 1988 (Vincourt et al., 2011).

Le CETIOM considère 4 niveaux de sensibilité au phomopsis parmi les variétés actuelles : sensible (S), peu sensible (PS), très peu sensible (TPS), résistante (R). Actuellement, les variétés TPS et R possèdent un niveau de résistance au phomopsis qui permet aux agriculteurs de ne pas avoir recours aux traitements fongicides. Une incertitude subsiste toutefois, dans le cas où ces variétés seraient confrontées à un climat exceptionnellement favorable associé à un potentiel d'inoculum élevé. Concernant le phoma, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de classement officiel de sensibilité des variétés. Cependant, des résistances partielles au phoma ont été observées au champ (Pérès et Allard, 1994) et en conditions contrôlées (Roustaee et al., 2000a).

3.2 Implantation du tournesol : choix des rotations

Le tournesol est fréquemment cultivé avant une céréale à paille (souvent un blé tendre ou dur) laissant en général un sol bien structuré et propre.

Du fait de la conservation dans le sol des résidus de culture contaminés (mildiou, phomopsis, phoma) ou des formes de survie des champignons (sclérotes de sclérotinia, oospores de mildiou, microsclérotes de *Macrophomina* ou de *Verticillium*), les rotations diversifiées sont à privilégier pour allonger le délai de retour du tournesol et limiter le développement des maladies dans la parcelle. Un délai de retour minimum de 3 ans est le plus souvent préconisé (Masirevic et Gulya, 1992).

Pour les champignons dont l'inoculum est inféodé à la parcelle (mildiou, sclérotinia, verticillium, macrophomina), une faible fréquence de cultures sensibles dans la succession permet de diminuer le stock d'inoculum et donc de réduire le potentiel infectieux de la parcelle (Jinga et al., 1992). Pour le phoma et le phomopsis, la dissémination à longue distance des ascospores fait que l'impact de la rotation reste faible (Jouffret, 2005b). L'inoculum provenant des parcelles avoisinantes, il faut tenir compte de la gestion des

résidus contaminés à l'échelle du territoire. Dans le sud-ouest de la France, en système de culture non-irrigué, les rotations courtes (tournesol-blé) sont les plus fréquentes : l'inoculum n'est donc pas limitant d'autant plus que les cannes de tournesol restent partiellement en surface dans le blé celui-ci n'étant jamais implanté après labour.

3.3 Travail du sol et gestion des résidus

L'implantation du tournesol est généralement réalisée après un travail du sol profond pour favoriser un bon développement du pivot racinaire, la compaction du sol étant très dommageable pour le rendement (Mirleau-Thebaud, 2012).

Le broyage et l'enfouissement des résidus conditionnent la durée de survie de l'inoculum et sa capacité à poursuivre son cycle. En effet, le broyage des cannes accélère la décomposition des résidus et limite le support trophique pour les différents champignons s'y conservant (Délos et al., 2004). De même, l'enfouissement des résidus perturbe le cycle de ces champignons, la formation des fructifications étant déterminée par la lumière (Jinga et al., 1992).

Pour les champignons se conservant sous forme de sclérotes (sclérotinia), un travail profond permet d'enfouir les sclérotes, évitant la formation des apothécies mais favorisant les attaques racinaires. Un travail du sol superficiel maintient les sclérotes à moins de 5 cm de profondeur, favorisant la production d'apothécies mais exposant les sclérotes aux attaques de mycoparasites présents dans cet horizon (Kurle et al., 2001).

3.4 Date de semis

Le semis est réalisé en rangs avec un écartement allant de 45 à 60 cm entre les rangs ce qui est optimum pour la capture d'énergie lumineuse et l'exploration du sol par le système racinaire. Des écartements plus importants sont cependant pratiqués dans les régions à maïs (75-80 cm) : ils conduisent à des fermetures de rang plus tardives. Le semis précoce (début avril) permet, à la floraison, d'esquiver en partie la période de stress hydrique des mois de juillet et août. La culture présente en général des indices foliaires plus élevés du fait d'une durée de croissance plus longue et de stress hydrique moins marqué. En revanche, le semis tardif (début mai) facilite le démarrage de la culture et réduit le salissement.

La réussite et la gravité d'une contamination dépendent étroitement du stade phénologique des plantes au moment où elle se produit (Délos et Moinard, 1997b). Le raisonnement de la date de semis fait référence à la notion d'esquive : décaler les stades sensibles du tournesol par rapport aux évènements contaminants. Dans le cas du mildiou, le risque est élevé en cas de forts cumuls de précipitations (> 50 mm) dans les 10 jours encadrant le semis (Délos et al., 2000a). Le risque maladie pour le *Phomopsis* et le *Phoma* est plus élevé en semis précoce (Fayzalla et Maric, 1981 ; Debaeke et al., 2003) du fait de la concomitance entre réceptivité de la plante maximale (phase bouton floral) et évènements contaminants (stock d'asques mûrs, pluies). Cependant, l'effet n'est pas aussi tranché pour le phoma du fait de la très large période de réceptivité des plantes et d'émissions d'ascospores. De plus, si les semis précoces sont souvent plus exposés aux attaques sur tige, ils permettent d'esquiver davantage le stress hydrique en fin de cycle favorable au syndrome de dessèchement précoce. Un semis trop tardif quant à lui peut entraîner des difficultés de récolte du fait de l'occurrence grandissante de conditions humides qui sont à l'origine du développement de maladies du capitule comme le botrytis (pourriture grise). La date de semis joue également sur le développement végétatif du tournesol et donc sur les conditions microclimatiques responsables du développement du phomopsis. En ce sens, le semis précoce peut également favoriser le développement de cette maladie.

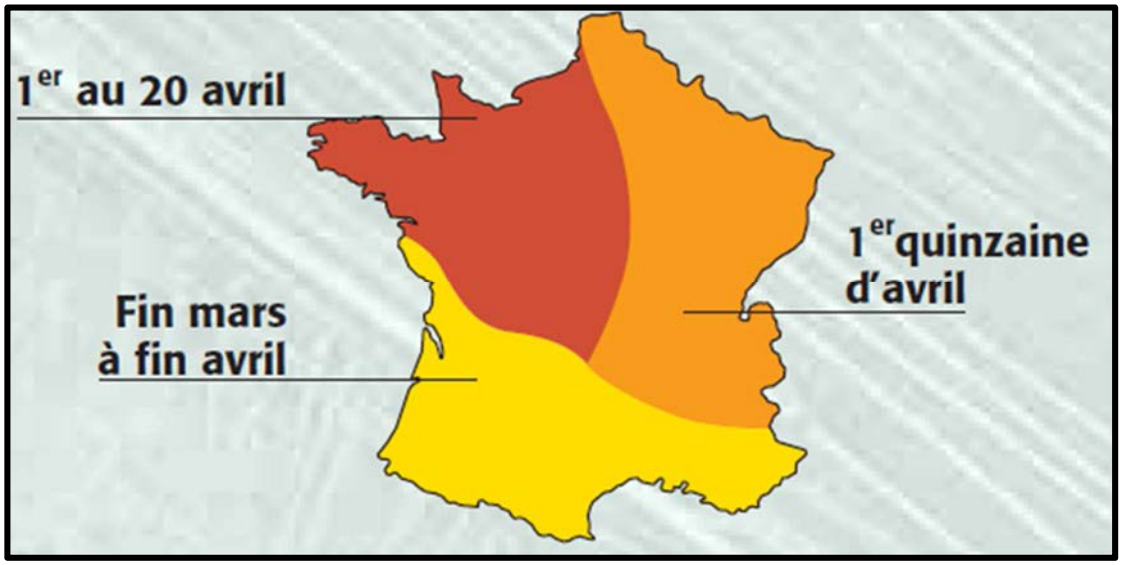


Figure II. 9. Répartition des dates de semis par grandes régions françaises (source : CETIOM)

3.5 Densité de peuplement

L'objectif de peuplement optimal se situe entre 50 000 et 60 000 plantes/ha. A cette densité, le rendement obtenu est optimal car le défaut de potentiel est compensé par la limitation du risque de maladies (Moinard et Eychenne, 1998). Si la densité de peuplement est trop élevée, les capitules sont petits et les tiges plus fragiles (verse, casse). Par contre, si la densité est faible, les capitules sont plus gros et restent humides plus longtemps.

En conditions de densité de peuplement élevée (> 60 000 plantes/ha), la fermeture du couvert est plus rapide créant des conditions microclimatiques propices à des infections précoces notamment par le *Phomopsis* et le *Phoma*. De plus, les plantes des peuplements denses se caractérisent par des feuilles plus petites et des tiges plus fines qui seraient plus rapidement détruites par les agents pathogènes (Debaeke et Moinard, 2010). Néanmoins, dans le cas du phoma sur tige, il semblerait que les effets de la densité de peuplement et de la fertilisation azotée soient en interaction (Debaeke et Pérès, 2003). En effet, en situation limitante en azote, les taux d'attaque augmentent avec la densité de peuplement. A l'inverse, en cas de forte fertilisation azotée, ce sont les cultures à faible densité qui subissent une plus forte attaque. Dans le cas des attaques de phoma en bas de tiges, le faible diamètre des tiges au collet des plantes augmente le risque de nécrose encerclante et donc accélère l'apparition du dessèchement pathologique (Seassau et al., 2012).

Pour les agents pathogènes à transmission souterraine comme le *Sclerotinia* (ou le *Verticillium*), les fortes densités de peuplement augmentent la probabilité de contact entre les racines et les sclérotes et les contaminations de plante à plante (Huang et Hoes, 1980).

Seul le risque de botrytis est plus élevé en faible densité de peuplement du fait de la grosseur des capitules qui favorisent le maintien d'une forte humidité des graines.

3.6 Fertilisation azotée

Le stade critique pour la fertilisation azotée du tournesol se situe entre le stade « 5 paires de feuilles » (B10) et le début floraison (F1). Les besoins de la plante sont de l'ordre de 4.5 à 5 kg d'azote par quintal de grain. Ayant un système racinaire bien développé, le tournesol mobilise très bien l'azote minéral du sol, et requiert une fertilisation modérée (optimum entre 0 et 80 unités selon le précédent cultural). La fertilisation azotée joue directement sur le développement de la surface foliaire. Un excès d'azote favorise le développement d'une

surface foliaire exubérante. La fermeture du couvert est plus rapide. Tout ceci contribue à la mise en place précoce d'un microclimat plus favorable avec des variations de températures plus limitées. L'excès d'azote peut également entraîner une diminution de la teneur en huile des grains récoltés (Merrien, 1992) et une augmentation du risque de verse.

Pour le phomopsis, l'effet de l'azote est indirect. Un excès d'azote (doses > 60-80 kg N/ha) provoque un fort taux de recouvrement qui maintient plus longtemps des conditions d'humidité relative favorables à la contamination, d'où une augmentation du taux de plantes infectées (Masirevic et Gulya, 1992). La végétation tamponne également les variations de températures ce qui diminue le risque d'atteindre des températures létales pour le champignon. De plus, une surface foliaire élevée augmente la surface de réception des spores. La quantité d'azote dans la plante influe directement le taux d'attaque du phoma. Des études ont mis en avant que le pourcentage de plantes atteintes par le phomopsis ou le phoma augmente de manière non négligeable avec l'augmentation des doses d'azote (+ 36 % si on double la fertilisation azotée en phomopsis et + 70 % pour le phoma ; Debaeke et al., 2003 ; Debaeke et Pérès, 2003). L'augmentation du taux d'attaques est également démontrée dans le cas du phoma du collet (Seassau et al., 2010).

3.7 Irrigation

Le tournesol a besoin de 230 mm d'eau disponible entre le début de la floraison et la fin du remplissage des graines pour atteindre 30 q/ha (CETIOM, 2003b). A ce jour, l'irrigation ne concerne que 5 % des surfaces de tournesol (Champolivier et al., 2011). Néanmoins, si l'indice foliaire est limitant par rapport à l'interception du rayonnement, il peut être intéressant d'irriguer avant floraison pour augmenter celui-ci. A l'inverse, si la végétation est exubérante à la floraison, l'irrigation en post-floraison aura pour objectif de maximiser la durée de surface foliaire en prévenant toute sénescence accélérée. La culture valorise très bien l'eau issue de l'irrigation puisqu'un seul tour de 40 mm en début de floraison permet de gagner en moyenne 4 q/ha en sol superficiel (RU ≤ 80 mm ; Laguionie, 2009).

L'irrigation entretient une humidité relative sous couvert élevée ce qui est propice au développement des agents pathogènes. Une irrigation en phase végétative favorise les infections précoces de phomopsis et de phoma par la présence d'eau libre. L'irrigation à la

floraison est un facteur de risque pour le sclérotinia du capitule puisqu'elle coïncide avec la période de réceptivité de la plante. De plus, une irrigation bien gérée limite la sénescence des feuilles, ce qui favorise le passage du *Phomopsis* sur la tige et le développement des taches encerclantes (Debaeke et al., 2003). En post-floraison, l'irrigation crée plutôt des conditions propices au développement des agents pathogènes en maintenant un microclimat humide et en limitant la montée de température au sein du couvert. Pour le phoma au collet, il a été établi qu'une conduite irriguée limite l'apparition du symptôme de dessèchement précoce (Debaeke et Pérès, 2003 ; Seassau et al., 2010).

3.8 Traitements phytosanitaires

Le tournesol possède un indice de fréquence de traitement (IFT) de 2.1 comme le maïs ou le soja, ce qui est relativement bas comparé à d'autres cultures (ex : 16.6 pour la pomme de terre ; Butault et al., 2010). Dans cet IFT tournesol, l'IFT herbicides est égal à 1.6 tandis que les insecticides représentent 0.2 et les fongicides seulement 0.3 (Lecomte et Nolot, 2011). La tolérance variétale et les pratiques culturales ne sont pas toujours suffisantes pour s'affranchir du risque maladies. Un traitement fongicide est parfois nécessaire, surtout dans les zones à forte pression de la maladie.

Quel que soit le produit utilisé contre les maladies aériennes, le traitement doit être positionné le plus près possible de la période de contamination, généralement avant l'apparition des premiers symptômes pour que le produit ne perde pas trop de son efficacité, les fongicides utilisés en tournesol étant non systémiques. Les possibilités de positionnement des traitements sont cependant limitées par la hauteur du couvert, le dernier traitement possible se faisant généralement au stade « limite passage de tracteur » (LPT, dernier stade où le traitement avec du matériel conventionnel est possible avec une hauteur du tournesol entre 60 et 70 cm).

La stratégie de lutte contre le phomopsis est fonction du risque régional (Figure II**.** 10), de la variété semée, du stade du tournesol lors des périodes favorables aux contaminations et des alertes diffusées via les Bulletins de Santé du Végétal. Si les conditions le permettent, la tendance actuelle est de se limiter à un seul traitement au stade LPT dans les régions à risque fort sur variétés peu sensibles (Tableau II. 6). Les fongicides actuellement homologués contre le phomopsis le sont également contre le phoma et possèdent donc une double action. Les matières actives de ces produits appartiennent à trois familles :

- Les strobilurines, anti-germinatifs à action préventive ;

- Les triazoles, qui inhibent la croissance mycélienne, à action préventive avec un léger effet curatif ;
- Les carboxamides, perturbateurs de la chaine respiratoire des champignons, pénétrants mais non systémiques, plus efficaces en préventif qu'en curatif.

Les fongicides utilisés sur tournesol sont donc à dominante préventive. Leur durée de rémanence est de 10 jours environ (Penaud, communication personnelle).

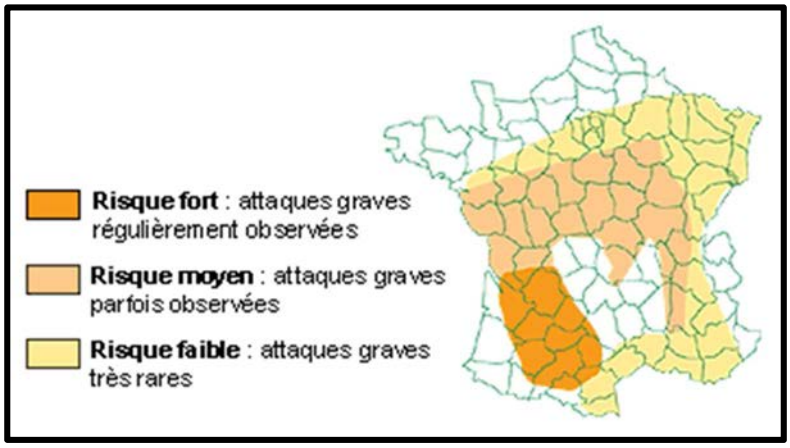


Figure II. 10. Répartition du risque phomopsis en fonction des taux d'attaques observés depuis 20 ans (source : CETIOM)

Tableau II. 6. Stratégie de lutte fongicide selon le risque régional phomopsis, la variété choisie et le risque phoma (source : CETIOM)

		Comportement de la variété au phomopsis		
		Résistante (R)	Très peu sensible (TPS)	Peu sensible (PS)
Phomopsis	Situations favorables au phomopsis[1]	Pas de traitement	0 ou 1 traitement selon BSV	1 traitement au stade LPT
	Autres situations			0 ou 1 traitement selon BSV
Phoma	Situations avec attaques marquées de phoma déjà observées, potentiel > 20-25 q/ha	1 traitement		

[1]Les situations correspondent à des parcelles avec des sols profonds (notamment des alluvions de vallées, des terreforts de bas de coteaux) ou des sols moyennement profonds avec au moins un des caractères suivants :

- Peuplement de plus de 60 000 plantes/ha ;
- Semis avant le 15 avril ;
- Reliquats azotés élevés avant semis, apport régulier de fertilisation organique.

Concernant le phoma, le gain de rendement lié à l'application d'un fongicide n'est pas toujours avéré. Néanmoins, en cas de risque simultané des deux champignons, il est possible d'utiliser un fongicide polyvalent phomopsis-phoma décrit dans le paragraphe précédent (CETIOM).

Le sclérotinia est la seule maladie pour laquelle il existe une spécialité biologique à base de spores de *Coniothyrium minitans*, champignon mycoparasite capable de détruire les hyphes et les sclérotes de *Sclerotinia sclerotiorum* (Huang et Kokko, 1987). Appliqué sur les cultures de la rotation, ce produit permet de réduire le stock d'inoculum de la parcelle par destruction des sclérotes (Penaud et Michi, 2009).

Le mildiou fait l'objet d'un traitement des semences à base de méfénoxam pour éviter la transmission de la maladie. Cependant, l'utilisation d'une matière active unique augmente les risques d'apparition de races résistantes à cette molécule rendant le traitement inefficace comme cela a pu être le cas avec le métalaxyl (Tourvieille de Labrouhe et al., 2000).

3.9 Récolte

Le tournesol se récolte de fin août à début octobre. La récolte du tournesol doit s'effectuer au bon stade de maturation des capitules pour optimiser le résultat économique et limiter les risques (casse, prédation, dépréciation de la qualité). En effet, une récolte trop précoce peut entraîner des taux d'impuretés élevés ou de l'acidité dans l'huile. Ceci diminue sa qualité et donc son prix. A l'inverse, une récolte trop tardive a pour conséquence une augmentation du risque de verse et donc une diminution des rendements. A 9 % d'humidité, humidité idéale pour la récolte, les graines contiennent 40 à 50 % d'huile (CETIOM).

Une récolte trop tardive en conditions humides va favoriser le développement de maladies de fin de cycle comme le botrytis. De plus, les dommages seront plus importants en cas de sclérotinia du capitule puisque la destruction totale des capitules favorisera la chute des graines au passage de la moissonneuse (ainsi que la dissémination des sclérotes). Si la parcelle est attaquée par le phomopsis, une récolte précoce prévient le risque de casse (vent, orage).

Tableau II. 7. Effets de la conduite de culture sur les principales maladies du tournesol

			Mildiou *Plasmopara halstedii*	**Phomopsis** *P. helianthi / Diaporthe helianthi*	**Phoma** *P. macdonaldii / Leptosphaeria lindquistii*	**Sclérotinia** *S. sclerotiorum*	**Botrytis** *B. cinerea*	**Verticilliose** *Verticillium dahliae*	**Albugo** *Pustula helianticola*	**Alternaria** *A. helianthi* et *A. helianthinficiens*	**Macrophomina** *M. phaseolina*
Contrôle culturale	Prévention	Gestion des résidus	0	++	++	0/+	0	0/+		++	
		Rotation	++	+	+	++	0	+		+	++
	Esquive	Date de semis	+	++	+	++		++		+	
	Atténuation	Azote	+	++	++	++	++			+	+
		Irrigation	+	++	++	++	++				+
		Densité de peuplement	+	++	+	+	++				+
Génétique			++	++	0	++	0	0	0	0	0/+
Biologique			0	0	0	++		+			0/+
Chimique			++	++	+	+	0/+		+	0	0/+ (fumigation)
Physique								+			

++ très efficace contre la maladie,
+ efficace contre la maladie,
0 pas d'effet

A l'issue de cette revue, on peut distinguer deux types de maladies : (i) celles qui sont fortement influencées par l'historique de la parcelle et peu par son voisinage du fait d'un rayon de dissémination et d'un taux de multiplication faibles, ce qui correspond aux maladies du pied et des racines (sclérotinia, macrophomina, mildiou, verticillium) ; (ii) celles qui dépendent essentiellement des conditions de voisinage et peu de l'historique cultural de la parcelle. On retrouve les parasites responsables des maladies des feuilles et du capitule (phomopsis, phoma, botrytis, alternaria). Ces champignons se disséminent sur de grandes distances, la plupart du temps grâce au vent. Ils sont plus influencés par la composition de l'assolement à l'échelle territoriale que par la succession culturale à l'échelle parcellaire.

Le broyage et l'enfouissement des résidus de récolte permettent de limiter de façon significative la pression de l'inoculum aérien : le mycélium du champignon est incapable de produire des périthèces ou des pseudothèces (Moinard et Eychenne, 1998). D'une manière générale, tout ce qui crée des conditions peu favorables au développement du champignon (en limitant la surface foliaire et le maintien d'une forte humidité sous couvert) réduit l'impact des attaques de champignons dans le couvert (Tableau II. 7). Ces conditions sont vérifiées les années où l'eau est le facteur limitant pour le développement de la maladie. Elles ne sont plus déterminantes si la période est excessivement pluvieuse (Moinard et Eychenne, 1998).

Dans le raisonnement de la lutte contre les agents pathogènes du tournesol, le développement foliaire du tournesol est l'un des aspects les plus importants à maîtriser. L'agriculteur doit trouver la combinaison optimale entre fertilisation azotée, alimentation hydrique et structure du couvert afin d'obtenir un couvert précoce et durable permettant une bonne assimilation photosynthétique et un bon remplissage des graines tout en évitant le maintien d'un microclimat sous couvert trop favorable au développement des maladies. Le raisonnement de la conduite culturale consiste à trouver le bon compromis entre rationnement végétatif pour réduire la pression parasitaire et maintien d'un objectif de rendement élevé qui nécessite, en l'absence de maladies, la satisfaction des besoins en eau et en nutriments.

Tableau II. 8. Récapitulatif de l'influence des caractéristiques de la plante sur les maladies en lien avec les pratiques culturales

Composante de l'hôte	**Variables SUNFLO**	**Effets sur la maladie**	**Pratiques culturales**				
			Choix variétal	**Date de semis**	**Densité de peuplement**	**Fertilisation azotée**	**Irrigation**
Nombre de feuilles	N_feuilles	Quantité de tissus Nombres de sites contaminables	**X**				
Taille des feuilles (pétiole + limbe) et des augets	SF_Fimax N_Fimax	Quantité de tissus Distance à parcourir	**X**		**X**	**X**	**X**
Durée de vie des feuilles	Sen	Quantité de tissus sensibles Progression	**X**		**X**	**X**	**X**
Âge des organes	Phénologie	Résistance ontogénique		**X**			
Statut nutritionnel	INN	Progression				**X**	
Hauteur de plante		Microclimat	**X**		**X**		
Diamètre de tige		Progression	**X**		**X**		
Porosité	LAI	Microclimat Dissémination de l'inoculum I			**X**		

4 Schéma conceptuel du modèle et hypothèses de travail

En référence au « triangle des maladies » (Stevens, 1960), une épidémie résulte des interactions entre une plante sensible, un agent pathogène virulent et un environnement favorable au développement de la maladie. Même si l'environnement influe directement sur certains aspects de l'épidémie de l'agent pathogène (la dispersion des propagules notamment), ce sont les interactions entre l'environnement et le couvert végétal qui influent sur les dynamiques des agents pathogènes via le microclimat du fait de leur localisation dans le couvert végétal. Les agents pathogènes peuvent à leur tour modifier l'architecture du couvert et le microclimat (Haile, 2001).

L'état du couvert végétal varie au cours de son cycle de développement. Le microclimat évolue également avec la croissance de la plante durant tout le cycle de développement du tournesol, sous l'influence directe du climat, générant des conditions favorables ou non au développement des agents pathogènes. Il est donc important de considérer simultanément les dynamiques de développement du couvert et des maladies tout au long du cycle de la culture. Le Tableau II**.** 8 résume l'influence de la conduite de culture sur les principales variables du fonctionnement du couvert de tournesol dont on pressent le rôle clé dans le contrôle des maladies. La correspondance est également établie avec les variables d'état du modèle SUNFLO.

Le schéma de la Figure II. 11 résulte d'une synthèse des informations issues de la bibliographie présentées dans ce chapitre. Il représente les relations réciproques entre le fonctionnement du peuplement de tournesol représenté par le modèle SUNFLO et le développement des champignons. Le modèle résultant de ce couplage entre le modèle de culture SUNFLO et le modèle épidémiologique s'appellera SUNFLO-Maladies.

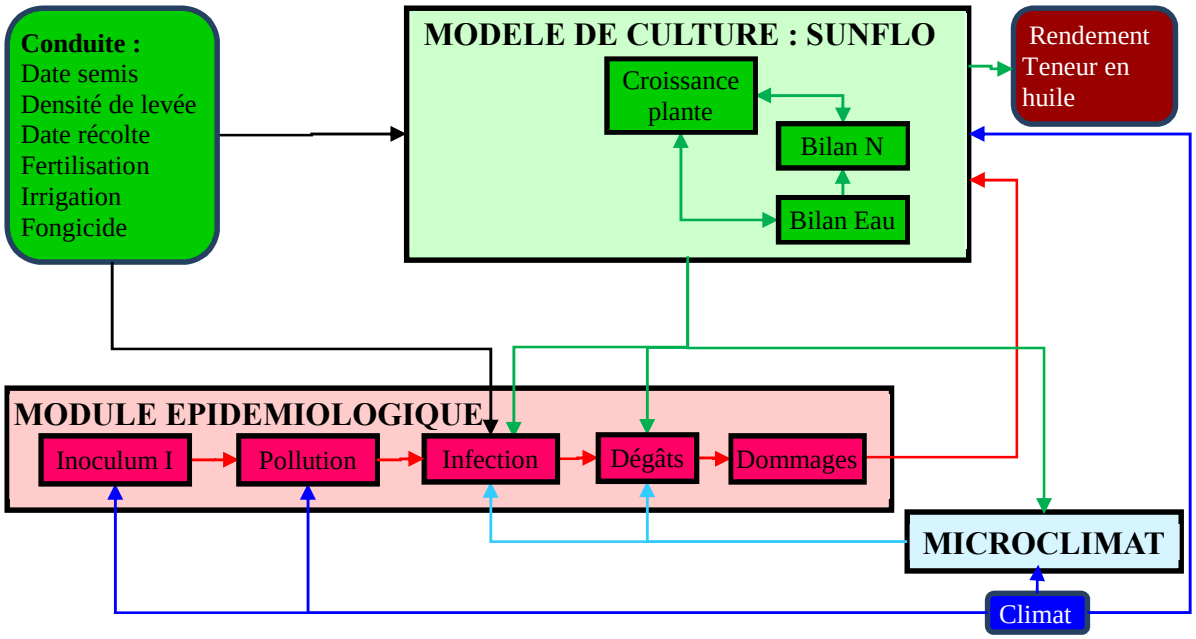


Figure II. 11. Schéma du couplage entre le modèle épidémiologique et le modèle SUNFLO. Le modèle résultant de ce couplage se dénommera SUNFLO-Maladies

Les deux agents pathogènes (phomopsis, phoma) étudiés sont monocycliques. L'intensité de la maladie est contrôlée par la quantité d'inoculum et son efficacité d'infection. Le modèle épidémiologique est composé de 5 modules, reprenant les principales étapes du cycle de développement des agents pathogènes : (i) maturation des organes de reproduction sexuée et libération/transport de l'inoculum primaire, (ii) pollution du couvert, (iii) infection des organes sensibles, (iv) expression des dégâts, (v) réalisation des dommages.

Les variables d'entrée sont liées au climat (pluie, température de l'air, humidité relative de l'air), à la plante (stade phénologique, surface foliaire, statut azoté de la plante, résistance variétale) ou au microclimat (humidité relative sous couvert, température sous couvert). Certaines variables sont simulables par SUNFLO, d'autres proviennent des bases de données climatiques.

4.1 Inoculum primaire

Pour les deux pathosystèmes, la source d'inoculum primaire est constituée d'ascospores (i) produites sur les débris de plantes laissés à la surface du sol dans les parcelles ayant porté du tournesol l'année précédente et (ii) dispersées sur de longues distances (Pérès, 1988). Pour le phoma, même si la présence de pycniospores issues de résidus présents dans la parcelle est possible, cette source de contamination est considérée comme mineure et ne sera pas prise en compte dans le modèle (Délos et al., 1997a). L'inoculum est donc considéré comme

totalement exogène à la parcelle (cf. § 2.2.3.2). Le cycle de développement des maladies de la pollution à l'expression des dégâts peut être étudié au sein de la parcelle agricole.

Compte tenu de la capacité de dispersion des ascospores (jusqu'à 10 km ; Savage et al., 2012), la quantité d'inoculum déposée sur une parcelle dépend de la production d'ascospores à l'échelle de la petite région. Cette variable est donc très difficile à prévoir car elle dépend du niveau de maladie de l'année précédente, des modalités de travail du sol sur les parcelles de la petite région considérée (des résidus enfouis ne peuvent produire de l'inoculum), de la dynamique de décomposition des résidus, du scénario climatique rencontré, et de la dispersion anémophile des ascospores. La part de variétés de tournesol sensibles aux pathogènes et de cultures suivantes implantées sans retournement dans l'assolement régional sont deux éléments modulant l'importance de l'inoculum primaire. C'est pourquoi, la prévision de l'inoculum polluant une parcelle est très difficile à réaliser car elle mobilise la quantification de nombreux processus et nécessite de considérer des niveaux supra-parcellaires (Lo-Pelzer et al., 2009).

Dans un premier temps, nous considèrerons l'inoculum primaire des deux champignons comme non limitant, mais avec des niveaux différenciés en fonction de la situation de production. En France, la généralisation des symptômes de taches noires sur tige liées au phoma depuis les années 90 rend plausible cette hypothèse. De même, la présence systématique de phomopsis dès que les conditions climatiques sont favorables à l'expression de la maladie tend à confirmer la pertinence de cette hypothèse.

4.2 Pollution

L'interception des spores par le couvert est un phénomène passif, puisque contrairement aux insectes, l'hôte n'est pas choisi. La quantité de spores déposées sur le couvert est fonction de leur vitesse de sédimentation (Ferrandino et Aylor, 1984). La quantité de spores interceptées dépend de la surface d'hôte réceptrice : plus la surface foliaire des plantes est développée, plus la quantité d'inoculum interceptée est importante.

La surface disponible varie en fonction de la dynamique de croissance de la plante (qui est fonction de la phénologie, de la variété et de facteurs abiotiques : disponibilité en eau, azote et lumière), de la sénescence naturelle et de la surface déjà occupée par d'autres lésions. Cette

surface est donc dépendante des choix des pratiques, principalement type de variété semée, date et densité de semis, niveau de fertilisation azotée, irrigation (cf. § 1.3).

La pollution de la plante hôte peut être contrôlée par les variables d'état fournies par le modèle de culture SUNFLO qui simule la présence (limbe, auget) et la taille (limbe) de l'organe cible en fonction du stade de développement de la plante et des pratiques culturales utilisées.

Dans un premier temps, nous n'étudierons pas le processus de dépôt des ascospores dans le couvert, en négligeant l'importance de la densité d'ascospores lors d'une phase de pollution sur la réussite de l'infection et l'expression de dégâts pour les deux pathogènes. Nous reviendrons sur ce point lors de la discussion finale.

4.3 Infection

L'infection correspond à la germination des spores et à la pénétration de l'agent pathogène dans les tissus de la plante hôte (De Wolf et Isard, 2007). Ce processus nécessite la concomitance de trois facteurs : la sensibilité de l'organe cible de la plante, la présence d'une quantité minimale d'inoculum virulent, et des conditions climatiques favorables. La température et la durée d'humectation (correspondant à la présence d'eau libre à la surface des feuilles sous forme de gouttes de rosée ou de pluie) ou de forte humidité relative à la surface des organes cibles sont critiques pour cette phase aussi bien pour le *Phomopsis* (Gulya et al., 1997) que pour le *Phoma* (Roustaee et al., 2000b). Or, le microclimat est affecté par le niveau de développement du couvert : plus le couvert est fermé, plus il maintient un niveau d'humidité relative élevé sauf si la rosée est la seule source d'humidité disponible (Richard et al., 2013). En raison des modèles existants basés sur des durées d'humidité relative supérieures à un seuil, c'est la variable humidité relative et non la durée d'humectation qui sera mobilisée et suivie.

La présence de l'organe cible dépend de la phénologie de la plante hôte. A ces éléments, s'ajoute la sensibilité de l'organe cible. Pour ces deux maladies, il n'existe pas de cultivar à résistance dite verticale (un gène de résistance majeur) mais uniquement des résistances dites horizontales ou quantitatives (plusieurs gènes de résistance mineurs ; cf. § 3.1). Ces résistances horizontales n'empêchent pas l'infection d'avoir lieu. Cependant, elles réduisent la probabilité d'expression de dégâts (symptômes visibles) sans la rendre nulle. De plus, des

variations de sensibilité peuvent avoir lieu au cours du cycle de développement de la culture correspondant à la résistance ontogénique. Cette résistance peut permettre d'esquiver les infections si toutes les conditions ne sont pas réunies.

Le modèle Asphodel comporte un module plante qui simule le stade phénologique des plantes en fonction du temps thermique calculé à partir du semis de la culture qu'il associe ensuite à des courbes de sensibilité. Cependant, ces courbes sont issues de résultats d'expérimentations au champ appelées « isorisques » dans lesquelles des semis ont été effectués à différentes dates afin d'obtenir des stades phénologiques de plantes échelonnés au moment des contaminations. Ce type de dispositif ne permet pas de trancher entre deux causes possibles : (i) les différences de sensibilité sont liées au microclimat dans le couvert jugé plus critique au stade « 2 paires de feuilles » du tournesol qu'au stade floraison, (ii) il y a une différence de réceptivité intrinsèque des plantes liée à l'âge des feuilles ou au stade de développement de la plante.

Aussi, nous centrerons notre étude sur la phase d'infection en vérifiant deux hypothèses :
(H1) : le microclimat (et en particulier le niveau d'humidité relative pour le phomopsis et la durée de permanence d'eau libre dans les augets pour le phoma) détermine la réussite de l'infection et sa localisation au sein de la plante ;
(H2) : la sensibilité de la plante varie en fonction de son stade phénologique, et ce indépendamment du microclimat.

4.4 Dégâts

Une fois la plante infectée, le mycélium se développe et provoque la nécrose de l'organe infecté (cf. § 2.2.5.1). Le climat influe sur la vitesse de progression du symptôme mais peut également provoquer sa disparition si les températures deviennent trop élevées dans le cas du phomopsis sur feuille (cf. § 2.2.3.4).

Plusieurs hypothèses méritent d'être vérifiées :
(H3) : la vitesse de progression des deux agents pathogènes dépend de la température et de l'humidité relative dans le couvert, du statut azoté de la plante et du niveau de résistance de la plante. Leur vitesse de progression pourrait également dépendre du stade phénologique de la plante.

(H4) : le Phomopsis ne progresse pas dans les tissus sénescents, la sénescence de la feuille entraîne la « disparition » du symptôme.
(H5) : lorsque le Phoma encercle le pétiole, il empêche le Phomopsis d'atteindre la tige.
(H6) : du fait de la sécrétion de toxines, les dégâts du Phomopsis sur le fonctionnement de la feuille pourraient s'étendre au-delà de la seule zone nécrosée.

4.5 Dommages

Enfin, les conséquences pour le rendement et la teneur en huile des dégâts provoqués par les attaques des champignons résultent de deux mécanismes de dommage : la réduction de la surface foliaire verte et la réduction des flux de sève dans les plantes.

Une hypothèse concernant le mécanisme de dommage lié au phomopsis est importante à vérifier expérimentalement :
(H7) : la tache encerclante de Phomopsis provoque la rupture des flux de sève vers les parties supérieures de la plante. Cette rupture n'est pas instantanée et sa mise en place est fonction de la vitesse d'encerclement de la tige.

Chapitre III. Matériels et Méthodes

1 Démarche expérimentale

Les expérimentations avaient pour but de valider les hypothèses développées dans le chapitre précédent et d'apporter les références nécessaires à la construction des modules du modèle SUNFLO-maladies.

Les objectifs des expérimentations au champ étaient (i) d'identifier les variables clés qui permettent de représenter les effets de la conduite de culture sur la mise en place et le développement du *Phomopsis* et du *Phoma* seuls et en interaction, (ii) de bénéficier d'un jeu de données qui aille de la quantité d'inoculum au dommage causé par les maladies et où l'ensemble des variables identifiées dans le schéma conceptuel du chapitre II seraient contrôlées et quantifiées.

Les expérimentations en serre avaient pour but de répondre à des questions plus ciblées en se plaçant en conditions contrôlées pour limiter les interactions entre les facteurs explicatifs potentiels identifiés préalablement. La première expérimentation (SAuz10) avait deux objectifs distincts : d'une part, vérifier si le stade phénologique du tournesol avait un impact sur la vitesse de progression de l'agent pathogène indépendamment du microclimat (H3), d'autre part, d'étudier l'impact du phomopsis sur la photosynthèse des tissus verts en amont de la nécrose (H6). La deuxième expérimentation en serre avait pour objectif de déterminer à quel moment le phoma bloque le phomopsis, en faisant varier la sensibilité variétale au phoma et la quantité d'azote apportée à la plante (H5). Cette expérimentation venait en complément des observations faites sur les interactions phoma/phomopsis dans les expérimentations de plein champ.

2 Choix du matériel biologique

2.1 Matériel végétal : choix des variétés de tournesol

2.1.1 Expérimentations au champ

En 2010, il a été choisi une variété (cv. Melody) dont l'expression phénotypique était bien connue, classée peu sensible au phoma « pied sec », et permettant un bon niveau d'expression du phomopsis et du phoma tige en conditions climatiques favorables aux agents pathogènes.

En 2011, le choix des variétés s'est basé sur plusieurs critères. La précocité des variétés devait être identique pour éviter un effet variétal lié à des différences de stade de développement des plantes. Les variétés devaient également être peu sensibles au verticillium

afin d'éviter les perturbations provoquées en 2010 par cet agent pathogène émergent. Les variétés devaient ensuite couvrir la gamme de sensibilité au phomopsis : sensible (S), peu sensible (PS) et très peu sensible (TPS) ; les variétés résistantes (R) n'ont pas été retenues du fait du nombre trop limité de symptômes potentiellement exprimés. Pour un même niveau de sensibilité, les variétés devaient présenter une architecture contrastée en termes de hauteur de plante, nombre de feuilles, longueur et rang de la plus grande feuille afin d'étudier l'influence de l'architecture de la plante sur le développement des agents pathogènes. Enfin, la préférence était donnée à des variétés préalablement phénotypées par le CETIOM c'est-à-dire dont les paramètres variétaux pour SUNFLO étaient déjà connus afin d'utiliser plus facilement ces données pour les simulations ultérieures du modèle.

2.1.2 Expérimentations en serre

En 2010, le choix s'est porté sur deux variétés de sensibilité contrastée vis-à-vis du phomopsis, utilisées comme témoins dans les essais variétaux CTPS de post-inscription : Bollil (R) et Alhaja (S).

Pour l'expérimentation interaction phomopsis-phoma, le critère principal était la forte sensibilité au phomopsis. Sur les 4 variétés disponibles (Sikllos CL, Fertina, Sambro RM, Kill), un test plantule a permis de sélectionner une variété plutôt sensible au phoma (Sikllos CL) et une autre plus résistante à la maladie (Kill).

2.2 Matériel fongique : choix des souches de *Phomopsis helianthi* et de *Phoma macdonaldii*

2.2.1 Choix d'une souche de *Phoma macdonaldii*

Afin de reproduire artificiellement et expérimentalement des symptômes de taches noires à la suite d'une attaque de Phoma au niveau de l'auget, une souche monopycniospore (MPH2 ; Seassau, 2010), connue pour son agressivité lors de contaminations artificielles sur plantes et plantules, a été utilisée.

2.2.2 Isolement d'une souche de *Phomopsis helianthi*

Afin d'éviter que le *Phomopsis* utilisé dans les expérimentations ne soit une source de variation dans les résultats observés, une souche monopycniospore a été isolée à partir de mycélium issu de cannes de tournesol des essais menés à Auzeville en 2009. Le principe est

de n'extraire qu'une seule mono-pycniospore (MP) des pycnides de phomopsis soit un seul individu de la population.

Une suspension mère de pycniospores est réalisée dans de l'eau distillée stérile, après photo-induction de la conidiogenèse (héméropériode de 12h). Par dilutions successives, la suspension est amenée à une concentration d'environ 1 pycniospore μl^{-1}. Des gouttes de 1µl 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 (Potato Dextrose Agar, Figure III. 1). Le milieu est ensuite mis à incuber à 25°C ± 1°C sous un régime photopériodique de 12 heures jour/nuit à une intensité lumineuse de 37 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

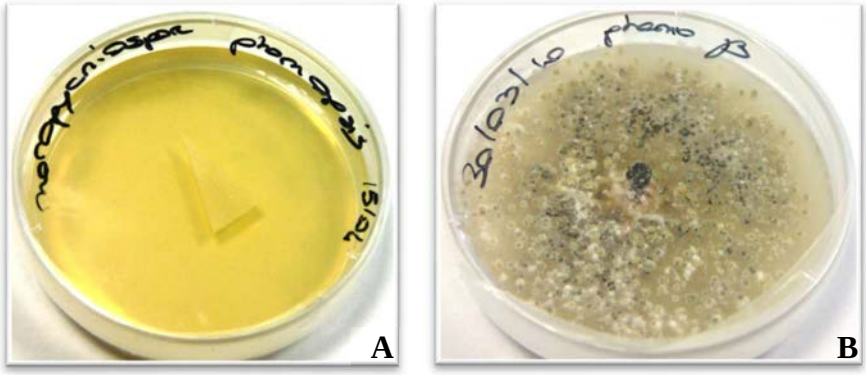


Figure III. 1. Isolement d'une souche monopycniospore de *Phomopsis helianthi* (A) à partir d'une culture issue d'un isolement réalisé sur des cannes de tournesol de 2009 (B)

3 Dispositif expérimental au champ

L'expérimentation de 2010 (CAuz10) visait à identifier les conduites de culture ayant le plus d'impact sur la mise en place et le développement des deux agents pathogènes. Les effets des principaux éléments de conduite ayant une influence sur les agents pathogènes (fertilisation azotée, densité de semis et irrigation) ont été étudiés indépendamment les uns des autres. Cette première expérimentation a permis d'identifier deux scénarios de conduite de culture très contrastés mis en place sur l'expérimentation 2011 (CAuz11). La première conduite visait à obtenir des plantes exubérantes avec des sites de contamination très favorables aux agents pathogènes, la seconde conduite avait pour but d'obtenir des plantes très élancées, avec un développement des parties végétatives plus réduit, pour créer des conditions moins favorables aux agents pathogènes.

Tableau III. 1. Tableau récapitulatif des expérimentations au champ

	CAuz10	CAuz11
Thème de recherche	Etudier l'impact des pratiques culturales sur l'apparition et le développement du phoma et du phomopsis en mettant l'accent sur les combinaisons de pratiques	Etudier l'impact des pratiques culturales sur l'apparition et le développement du phoma et du phomopsis en mettant l'accent sur le comportement variétal dans des conditions de pratiques contrastées
Leviers agronomiques étudiés	Régime hydrique Fertilisation azotée Densité de peuplement	Régime hydrique Fertilisation azotée / Densité de peuplement Variété
Précédent cultural	Maïs irrigué (irrigué) Sorgho (sec)	Maïs irrigué (irrigué) Sorgho (sec)
Date de semis	19 avril 2010	8 avril 2011
Variété	Melody	Kerbel (PS) NK Ferti (TPS) LG5451HO CL (PS/TPS) ES Paulina (TPS) Sikllos CL (S)
Densité de peuplement	3.5 plantes/m² (D1) 7 plantes/m² (D2)	3.5 plantes/m² (D1) 7 plantes/m² (D2)
Fertilisation azotée	0 kg N/ha (N0) 150 kg N/ha (N150) : 75 kg N/ha le 29 avril + 75 kg N/ha le 21 juin	0 kg N/ha (N0) 150 kg N/ha (N150) : 75 kg N/ha le 19 mai + 75 kg N/ha le 6 juin
Irrigation	Irrigation levée : 22 mm le 25 avril Irrigation projection : 23 mm le 1 juillet Sec (IRR0) : 45 mm Irrigué (IRR1) : 45 mm + 21 mm le 8 juillet + 28 mm le 21 juillet	Irrigation levée : 28 mm le 13 avril Irrigation assimilation N : 43 mm le 26 mai Sec (IRR0) : 71 mm Irrigué (IRR1) : 71 mm + 33 mm le 7 juillet
Méthode de contamination	Naturelle renforcée (Phomopsis) Naturelle renforcée (Phoma)	Naturelle renforcée (Phomopsis) Naturelle (Phoma)
Date d'apport des cannes	16 juin 2010 (Phomopsis) 2 juillet 2010 (Phoma) retrait 30 juillet	20 mai 2011
Nombre de plantes suivies	10 plantes x 3 rép x 2 (eau) x 2 (N) x 2 (densité) x 3 (traitements) = 720	10 plantes x 3 rép x 2 (eau) x 2 (N) x 5 (variété) = 600
Date de récolte	20 septembre 2010	30 août 2011

Ces expérimentations ont permis d'établir le lien entre la conduite de culture appliquée sur la parcelle et la mise en place et le développement des symptômes sur les plantes sous l'influence du microclimat créé sous le couvert. Une gamme de sensibilité variétale aux maladies, couplée à une gamme de précocité et d'architecture a été explorée. Les détails sont donnés dans le Tableau III**.** 1.

3.1 Choix du dispositif

Le dispositif expérimental retenu est un dispositif en *split-split-splot* à 4 facteurs et 3 répétitions. En raison des contraintes d'irrigation (utilisation d'une rampe frontale), le régime hydrique a été placé en « main plot ». Pour faciliter la gestion des reliquats azotés, la fertilisation azotée a été placée en bande pour constituer les sous-parcelles (« sub-plots »). Au sein de chaque traitement azoté, un sous-traitement densité (CAuz10) ou variété (CAuz11) a été appliqué (cf. Annexe 2). Chaque parcelle élémentaire d'une superficie de 33 m² (CAuz10) ou 30 m² (CAuz11) était composée de 6 rangs de tournesol avec un inter-rang de 50 cm. En 2010, les répétitions ont été placées dans des parcelles adjacentes pour optimiser l'effet microclimat.

3.2 Conduite de culture

Au sein de chaque parcelle expérimentale, le programme de travail du sol a été constitué classiquement d'un labour à l'automne, puis d'un passage de herse rotative dans la semaine précédant le semis.

3.2.1 Semis et démariage

Le semis a été réalisé précocement pour favoriser la coïncidence des stades de sensibilité maximale du tournesol (E1 à E5) avec les phases de projections d'ascospores en mai. Les essais ont été semés à 9.3 graines/m² (2010) et 14 graines/m² (2011) pour prévenir les conséquences des dégâts d'oiseaux (pigeons) puis démariés à 3.5 plantes/m² (D1) et 7 plantes/m² (D2). Ces valeurs de densité de peuplement encadrent les pratiques des agriculteurs (5 à 6 plantes/m²) et permettent d'obtenir des situations contrastées.

3.2.2 Fertilisation azotée

Deux niveaux de fertilisation azotée ont été testés : 0 et 150 kg N/ha. L'apport d'azote a été fractionné en deux avec un premier apport au semis et un second au stade bouton floral pour favoriser sa bonne assimilation et éviter un risque de lessivage.

En 2011, en raison du couplage entre fertilisation et densité, seules les parcelles présentant la plus faible densité de plantes (D1) ont été fertilisées. Ce choix résulte des observations réalisées en 2010 à la suite desquelles il a été retenu les combinaisons de techniques qui présentaient le plus fort contraste en terme d'architecture des plantes tout en restant propices aux contaminations (forte densité *vs*. forte dose d'azote).

3.2.3 Irrigation

La mise en place de deux régimes hydriques à partir de la floraison avait pour objectif de créer des conditions différentes pour l'apparition et l'évolution des symptômes en post-floraison. Cependant, pour la réussite des expérimentations, il était nécessaire d'assurer au moins une vague de contamination après dépôt des cannes au printemps. Ainsi, si les conditions climatiques étaient trop sèches, une irrigation pouvait être déclenchée sur l'ensemble de l'essai afin de provoquer l'émission d'ascospores et la contamination des plantes. De plus, en raison de printemps sec, un apport d'eau a été réalisé pour favoriser la levée de la culture mais aussi l'assimilation de l'azote apporté en végétation. L'été 2011 a été très pluvieux ne permettant qu'une différenciation limitée entre les modalités sèches et irriguées : un seul tour d'eau de 33 mm a été apporté le 7 juillet. Cette différenciation devait maintenir active la surface foliaire plus longtemps et instaurer un microclimat plus favorable au développement des maladies dans la partie irriguée.

3.3 Mode de contamination

La contamination des plantes par le *Phomopsis* s'est faite de manière naturelle mais renforcée. Des cannes de tournesols infectées issues de la campagne agricole précédente (2009 pour CAuz10 et 2010 pour CAuz11) et conservées à l'extérieur durant l'hiver ont été placées dans l'inter-rang du tournesol selon la méthode de Viguié et al. (2000). Avant leur mise en place, les cannes ont été régulièrement humidifiées pour permettre un développement optimal des périthèces. Elles ont ensuite été réparties de manière homogène à raison de 2 tronçons par inter-rang sur les 3 rangs centraux au stade bouton floral (E1) des tournesols.

En 2010, un apport de cannes portant des pseudothèces de *Phoma* a été effectué deux semaines après la mise en place des cannes de *Phomopsis* pour provoquer une interaction entre les deux agents pathogènes. Ces cannes ont été retirées deux semaines plus tard devant l'explosion de symptômes dans le champ. En 2011, les contaminations par le phoma se sont donc déroulées de manière naturelle compte tenu du niveau d'inoculum ambiant particulièrement élevé en 2010 et de manière générale dans le Lauragais.

3.4 Variables observées

3.4.1 Climat

Afin de caractériser les contraintes climatiques subies par la culture, une station météorologique (CE-180, Cimel, France) placée à 2 m de hauteur en bordure des essais a fourni quotidiennement les valeurs de précipitations (mm), de températures minimales et maximales de l'air (°C), sur l'ensemble du cycle de culture. De plus, la température moyenne (°C) et l'humidité relative de l'air (%) ont été enregistrées toutes les heures.

3.4.2 Microclimat

Le microclimat sous couvert a été appréhendé par des mesures horaires de la température et de l'humidité relative via des thermohygromètres (Rotronic MP100-A, Campbell, France) localisés dans 8 micro-parcelles. Ces thermohygromètres ont permis de mesurer à 3 hauteurs (0.4 m du sol, 0.8 m du sol et 1.2 m du sol ; Figure III. 2) dans le couvert le microclimat perçu par la plante : en position basse (strates 1 et 2), en position moyenne (strate 3) et en position haute (strates 4 et 5). De plus, quatre thermocouples ont mesuré la température à la surface des feuilles à fréquence horaire. Les données microclimatiques permettent de faire le lien entre le taux de contamination des plantes et les conditions rencontrées par le champignon dans le couvert. Température et



Figure III. 2. Thermohygromètres placés dans le couvert

humidité relative tri-horaires sont également des variables d'entrée du modèle Asphodel.

3.4.3 Variables biologiques

3.4.3.1 Phénologie des plantes

Les étapes clés du cycle de développement du tournesol ont été notées suivant l'échelle phénologique établie par le CETIOM (Merrien, 1992). Un stade est considéré comme atteint lorsque 50 % des individus l'ont franchi. Les principaux stades observés sont ceux retenus par SUNFLO : levée des plantes, apparition du bouton floral (E1), floraison (F1) et maturité physiologique (M3). Ce dernier a peu de sens lorsqu'on s'intéresse à des peuplements malades soumis à un dessèchement précoce (phoma « pied sec », verticillium notamment).

3.4.3.2 Architecture des plantes

Surface foliaire

La surface individuelle du limbe i (SF_i) est calculée à partir du produit longueur (L_i, cm) × largeur (l_i, cm) et de paramètres de forme qui varient selon le rapport L x l (Casadebaig et al., 2011) :

Si $L_i \times l_i < \frac{c}{a-b}$ alors, $SF_i = a\ (L_i \times l_i)$ sinon, $SF_i = b\ (L \times l) + c$

Avec a = 0.684 ; b = 0.736 ; c = -8.860 cm^2.

Indice foliaire

L'indice foliaire (*Leaf Area Index*, LAI) correspond au ratio de la surface totale des feuilles par unité de surface du sol. A la floraison, des valeurs de 1.5 à 5 peuvent être observées chez le tournesol, en raison de sa grande plasticité. Le LAI est un indicateur intégratif du développement du couvert. La mesure du LAI a été réalisée soit directement à l'aide d'un LAI-2000 (LICOR Biosciences, Inc., Lincoln, NE) soit à partir des estimations de surface foliaire par plante (méthode simplifiée de Pouzet et Bugat (1985) ou mesure d'une feuille sur deux) et de la densité de peuplement comptée après levée (Figure III. 3). Les valeurs de LAI entre les stades bouton étoilé (E1) et fin floraison sont les plus pertinentes pour notre étude car elles encadrent la période de forte croissance foliaire et la période de sensibilité maximale au phomopsis.



Figure III. 3. Mesure de l'indice foliaire avec un LAI-2000

Sénescence foliaire

Une feuille est considérée comme sénescente lorsque 50 % de sa surface est soit chlorosée soit nécrosée. La surface des feuilles sénescentes est ensuite déduite de la surface foliaire totale de la plante établie à la floraison pour obtenir la surface verte considérée comme active.

3.4.3.3 Caractérisation des plantes

La hauteur moyenne des plantes a été mesurée au stade bouton étoilé et à la floraison. Le nombre de feuilles par plante a été compté à la floraison afin de connaître le nombre de sites potentiellement disponibles pour les infections. Le diamètre au collet a été mesuré en fin de floraison.

Le volume des augets a été quantifié en introduisant un volume d'eau dans l'auget avec une micropipette jusqu'à atteindre le point de débordement.

3.4.3.4 Indice de Nutrition Azoté (INN)

Le statut azoté des plantes a été quantifié au moyen de l'indice de nutrition azotée (INN) suivant l'équation de Lemaire et Gastal (1997) :

INN = Nm/Nc

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 ; Nc : la teneur en azote critique calculée pour la valeur de MSA à partir de la loi de dilution générale paramétrée pour le tournesol par Debaeke et al. (2012) :

$Nc = 4.53 \times MSA^{-0.42}$

Nc correspond à la concentration minimum 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 1 indique une carence en azote.

3.4.4 Quantification de l'inoculum primaire

Quatre pièges à spores (Burkard Scientific Ltd, UK), positionnés aux quatre extrémités du champ, ont permis de quantifier l'inoculum primaire de phomopsis et de phoma. Le piégeage des ascospores a été effectué du 29 mai au 27 août 2010 et du 1er juin au 9 août 2011. L'objectif de ce piégeage était de faire le lien entre l'intensité des contaminations (limbes, noeuds) et l'intensité des projections d'ascospores.

3.4.5 Suivi des maladies

Sur chaque micro-parcelle, 10 plantes consécutives réparties sur les deux rangs centraux et représentatives de la micro-parcelle ont été suivies. L'apparition des symptômes, leur localisation et leur évolution ont été suivies deux fois par semaine afin d'établir une dynamique d'expression des dégâts.

La plante a été découpée en 5 strates (Figure III. 4) pour faciliter la mise en relation de l'apparition des dégâts avec les conditions microclimatiques dont le gradient est vertical.



Figure III. 4. Découpage de la plante en 5 strates

4 Dispositif expérimental en conditions contrôlées

4.1 Présentation du dispositif

Deux expérimentations ont été mises en place en serre (Tableau III. 2). La première (SAuz10) avait pour objectif d'évaluer l'effet du stade phénologique de la plante sur la vitesse de propagation du phomopsis (SAuz10_pheno) et de quantifier les dommages causés par le phomopsis sur les feuilles de tournesol (SAuz10_photo). Une seconde expérimentation (SAuz11), répétée en 2012 (SGri12) visait à préciser les conditions dans lesquelles se déroule une interaction entre phomopsis et phoma, en contrôlant les dates de contamination de la plante.

Tableau III. 2. Tableau récapitulatif des expérimentations en serre

	SAuz10		SAuz11	SGri12
	SAuz10_pheno	**SAuz10_photo**		
Question de recherche	Le stade phénologique de la plante a-t-il un impact sur la mise en place et la progression de l'agent pathogène ?	La photosynthèse de la feuille est-elle impactée en amont de la zone nécrosée alors que les tissus sont visuellement sains ?	A quelle date de contamination le Phoma empêche-t-il le Phomopsis de passer sur la tige ?	Cf. SAuz11
Leviers agronomiques étudiés	Variété Date de semis	Variété	Variété Fertilisation azotée	Cf. SAuz11
Date de plantation	2 avril / 15 avril / 21 avril / 26 avril / 3 mai / 6 mai	21 avril	9 septembre 2011	18 juillet 2012
Variété	Alhaja Bollil	Alhaja Bollil	Kill Sikllos CL	Cf. SAuz11
Fertilisation azotée	Fertilisation pléthorique	Fertilisation pléthorique	23 septembre 14 octobre 21 octobre	13 août 20 août
Irrigation	Absence de stress hydrique	Absence de stress hydrique	Absence de stress hydrique	Cf. SAuz11
Méthode de contamination	Mycélium Phomopsis	Mycélium Phomopsis	Mycélium Phomopsis Pycniospores Phoma : 10^6 spores/ml	Cf. SAuz11
Date et stade de contamination	31 mai 2010 : F2 E3 E2 E1 B20 B14 B13	31 mai 2010 : E1	14 octobre 19 octobre (E1) 28 octobre (E3) 8 novembre (E5) 10 novembre (phomopsis) 23 novembre (F4) 24 novembre (rattrapage phomopsis)	28 août (E1) 31 août (E2) 6 septembre (E3-E4) 7 septembre (phomopsis) 13 septembre (E5) 21 septembre (F1) 22 octobre (rattrapage phomopsis)
Nombre de plantes suivies	14 plantes x 2 (variété) x 7 (stades) = 720	14 plantes x 2 (variété) = 28	3 plantes x 2 rép x 2 (variété) x 2 (N) x 6 (phoma) = 144	3 plantes x 2 rép x 2 (variété) x 2 (N) x 6 (phoma) = 144

4.2 Conduite de culture

4.2.1 Substrat des plantes

A Auzeville, les pots utilisés, d'une contenance de 10 l, ont été remplis uniquement avec du terreau et tarés à 3.9 kg. A Grignon, les pots de 15 l ont été remplis avec 12 kg d'un mélange constitué de 50 % de terre (issue d'une parcelle n'ayant jamais porté de tournesol), 40 % de terreau et 10 % de sable pour permettre une différenciation des conditions de nutrition azotée.

4.2.2 Semis

Les graines ont été mises à germer dans des boites de Pétri pendant 48h, puis semées à raison de 2 à 3 graines par pot dès l'apparition de la radicule. Le démariage a eu lieu dès l'apparition de la première paire de feuilles pour ne laisser qu'une seule plante par pot, en sélectionnant les plantules les plus homogènes possibles.

4.2.3 Environnement climatique dans la serre

La régulation thermique dans la serre a été fixée à 17°C la nuit et 20°C le jour. En cas de forte chaleur, la température a été régulée par un système de refroidissement : le « cooling » permettant de maintenir une température inférieure de 6°C à la température extérieure. Une photopériode de 16h a été appliquée en début de cycle par l'utilisation de lampes à sodium de 400 W (SON-T AGRO, Philips) lorsque le rayonnement global dans la serre était inférieur à 250 W/m².

Une brumisation a été déclenchée immédiatement après la contamination des plantes pour favoriser leur infection et éviter le dessèchement de la gélose ou l'évaporation trop rapide de la solution de pycniospores. L'humidité relative a été maintenue à 90 % la nuit et 70 % au minimum le jour pendant les 48h suivant la contamination puis à un minimum de 60 % jusque la fin des mesures.

4.2.4 Régime hydrique

L'irrigation a été effectuée par un système de goutte à goutte relié à une pompe électrovanne où chaque goutteur permettait un débit de 2 litres/h. Les besoins en eau de la plante ont été pilotés par un boitier relié aux électrovannes et la quantité d'eau apportée a été identique pour l'ensemble des plantes. L'irrigation n'a pas été limitante permettant un développement optimal des plantes.

4.2.5 Fertilisation minérale

Les plantes ne devaient pas souffrir de carence minérale. Pour les essais SAuz10_pheno et SAuz10_photo, l'engrais utilisé était un engrais soluble NPK 20.20.20 (Peters® Professional) préparé à raison de 2 g/l. Chaque plante a reçu 200 ml de solution par fertilisation. La fertilisation a été réalisée 14, 21 et 46 jours après la plantation pour SAuz10_photo. D'autres modalités ont été choisies pour SAuz10_pheno assurant également une fertilisation pléthorique. Des mesures au chlorophyllmeter (Minolta SPAD) ont permis de contrôler si une fertilisation supplémentaire était nécessaire. Pour l'essai SAuz11, les pots de la modalité N0 ont reçu trois apports de 20 unités d'une solution de P/K (Phosphate 29, Potasse 38) et oligo-éléments à raison de 20 mL par pot. Pour la modalité N150, 50 unités de N (Ammonitrate 33.5) ont été ajoutées à la solution précédente pour chacun des apports à raison de 20 ml par pot. Pour l'essai SGri12, toutes les modalités ont reçu un apport de 55 unités de P/K (15/15) le 19 juillet 2012 à raison de 40 mL par pot. La modalité N150 a reçu un premier apport de 50 unités d'azote au stade B6 (20 mL d'Ammonitrate 33.5) et un second apport de 100 unités d'azote au stade B12 (40 mL d'Ammonitrate 33.5).

4.3 Mode de contamination

4.3.1 Méthode de contamination artificielle par des pycniospores de *Phoma macdonaldii*

Les contaminations par des pycniospores de *Phoma macdonaldii* ont été réalisées à partir d'une goutte de la souche MPH2 conservée à -80°C dans le glycérol remise en culture sur milieu PDA à 25°C avec alternance de 12h jour/nuit pendant une dizaine de jours pour induire l'émission de pycnides. Un morceau de gélose contenant des pycnides a ensuite été prélevé, placé dans une boite de Pétri et arrosé avec de l'eau stérile contenant 1 % de glucose pour permettre la libération des pycniospores. La concentration de la suspension obtenue a ensuite été déterminée à l'aide d'une cellule de Fuchs-Rosenthal et ajustée à 10^6 pycniospores/ml.

Une solution de pycniospores a été déposée dans l'auget et entourée d'une bande de film étirable type « Cellofrais » pour éviter le dessèchement prématuré de la goutte d'eau. Sept jours plus tard, le film plastique a été retiré.

4.3.2 Contamination artificielle par du mycélium de *Phomopsis helianthi*

Une souche monopycniospore issue d'un isolement de phomopsis sur cannes de tournesol (provenant d'un essai conduit en 2009 à Auzeville) a été mise en culture sur milieu PDA dans des boîtes de Petri de 90 mm. Après 10 jours de croissance dans une étuve à 24°C, les mycéliums de *Phomopsis* suffisamment développés ont été utilisés pour infecter les plantes de tournesol.

L'explant mycélien de 6 mm de diamètre a été prélevé sur la zone de croissance (2/3 mycélium, 1/3 gélose) dans la boîte de Pétri. Il a été déposé à l'extrémité de la nervure principale sur la face supérieure de la feuille, de manière à ce que le mycélium soit en contact direct avec le limbe. L'explant a ensuite été couvert d'un papier d'aluminium (Albal®) qui permet un maintien optimum limbe/mycélium ainsi que des conditions favorables au développement du bioagresseur (

Figure III. **5**).

Pour SAuz10_pheno, l'infection a été réalisée sur 4 feuilles dont le rang a été choisi en fonction des stades phénologiques de façon à obtenir des rangs de feuilles communs entre plantes de différents stades.

Pour SAuz10_photo, l'infection a été réalisée sur la plus jeune feuille en fin de croissance (repérée par des mesures de longueur de limbe effectuées au préalable). En effet, les feuilles trop jeunes poursuivent leur expansion et rendent la lecture difficile. Les plantes témoins ont également reçu une pastille de PDA indemne de mycélium, maintenue par de l'aluminium pour les placer dans les mêmes conditions que les plantes infectées.



Figure III. 5. Contamination artificielle d'une feuille de tournesol avec un explant mycélien de *Phomopsis helianthi*

4.4 Variables observées

4.4.1 Variables biologiques

4.4.1.1 Phénologie des plantes

Les étapes clés du cycle de développement du tournesol ont été notées suivant l'échelle établie par le CETIOM (Merrien, 1992). Un suivi précis 2 fois par semaine a été réalisé sur l'expérimentation SAuz10 pour placer au mieux les différentes dates de semis les unes par rapport aux autres et obtenir les stades phénologiques sélectionnés au moment de la date de contamination unique des plantes.

4.4.1.2 Indicateurs du statut azoté de la plante : teneur en chlorophylle des tissus (SPAD)

Une mesure SPAD a été effectuée sur toutes les séries pour veiller à l'absence de carence nutritionnelle (notamment azotée). La valeur SPAD est obtenue à l'aide d'un Chlorophyllmeter SPAD 502 MINOLTA, par contact direct des limbes des étages foliaires étudiés, sains ou infectés. Trois points de mesures ont été réalisés par limbe puis moyennés. La teneur en azote foliaire peut être approchée par cette mesure non destructive de la concentration en chlorophylle des limbes, ces deux variables étant fortement corrélées jusqu'à la floraison du tournesol (Debaeke et Raffaillac, 2006).

Cette mesure de contrôle est hebdomaire sur les feuilles contaminées de toutes les séries pour caractériser le statut azoté de la feuille.

4.4.1.3 Mesure de photosynthèse

Le ratio de photosynthèse nette a été mesuré à l'aide d'un appareil d'analyse à chambre portative (Licor 6400, Lincoln, Nebraska USA). La photosynthèse a été mesurée à saturation lumineuse (1500 µmol.m^{-2}.s^{-1}) pour un flux de CO_2 à 400ppm. Pour chaque feuille, trois zones fixes de mesures ont été repérées au marqueur à eau correspondant à chaque tiers du limbe (Figure III. 6). Les mesures ont été effectuées par couple de plante témoin / plante contaminée afin de limiter les effets des variations d'environnement au sein de la serre sur la valeur des mesures.

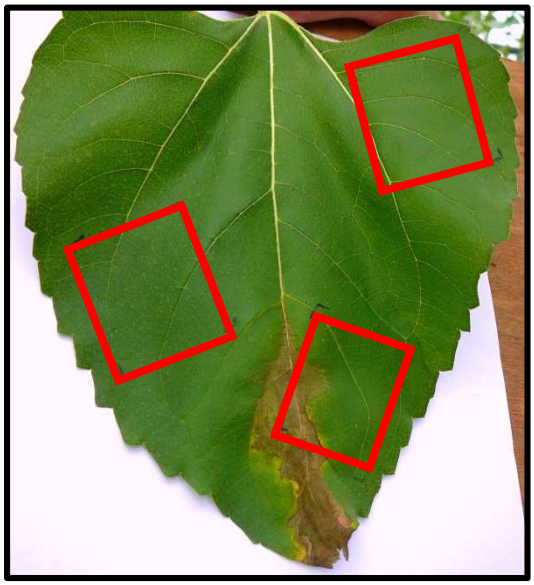


Figure III. 6. Zones de mesure de la photosynthèse sur le limbe

4.4.2 Suivi des symptômes

4.4.2.1 Notation phoma sur pétiole

Une semaine après la contamination artificielle, un suivi de la progression de l'infection sur pétiole a été réalisé sur chacune des plantes contaminées. La notation de la maladie s'est faite suivant une grille de notation constituée de 10 classes de symptômes sur pétiole (Figure III. 7). La date de sénescence de la feuille a également été notée.

4.4.2.2 Notation phomopsis sur feuille

Les nécroses dues au *Phomopsis* ont la particularité d'attaquer en premier lieu la nervure principale avant de détruire le reste du limbe. Une fois nécrosé, le limbe devient très friable. De ce fait, la longueur totale des limbes a été mesurée avant contamination. Puis, à chaque date de notation, seule la longueur de nervure centrale toujours verte a été mesurée en se plaçant sur la face inférieure des feuilles. Les mesures de vitesse de progression ont été réalisées deux fois par semaine. La date de passage du champignon sur le pétiole puis sur la tige a été notée. Un suivi de la vitesse de progression du phomopsis sur la tige a également été effectué (longueur de la tache à partir de l'insertion du pétiole et progression en circonférence).

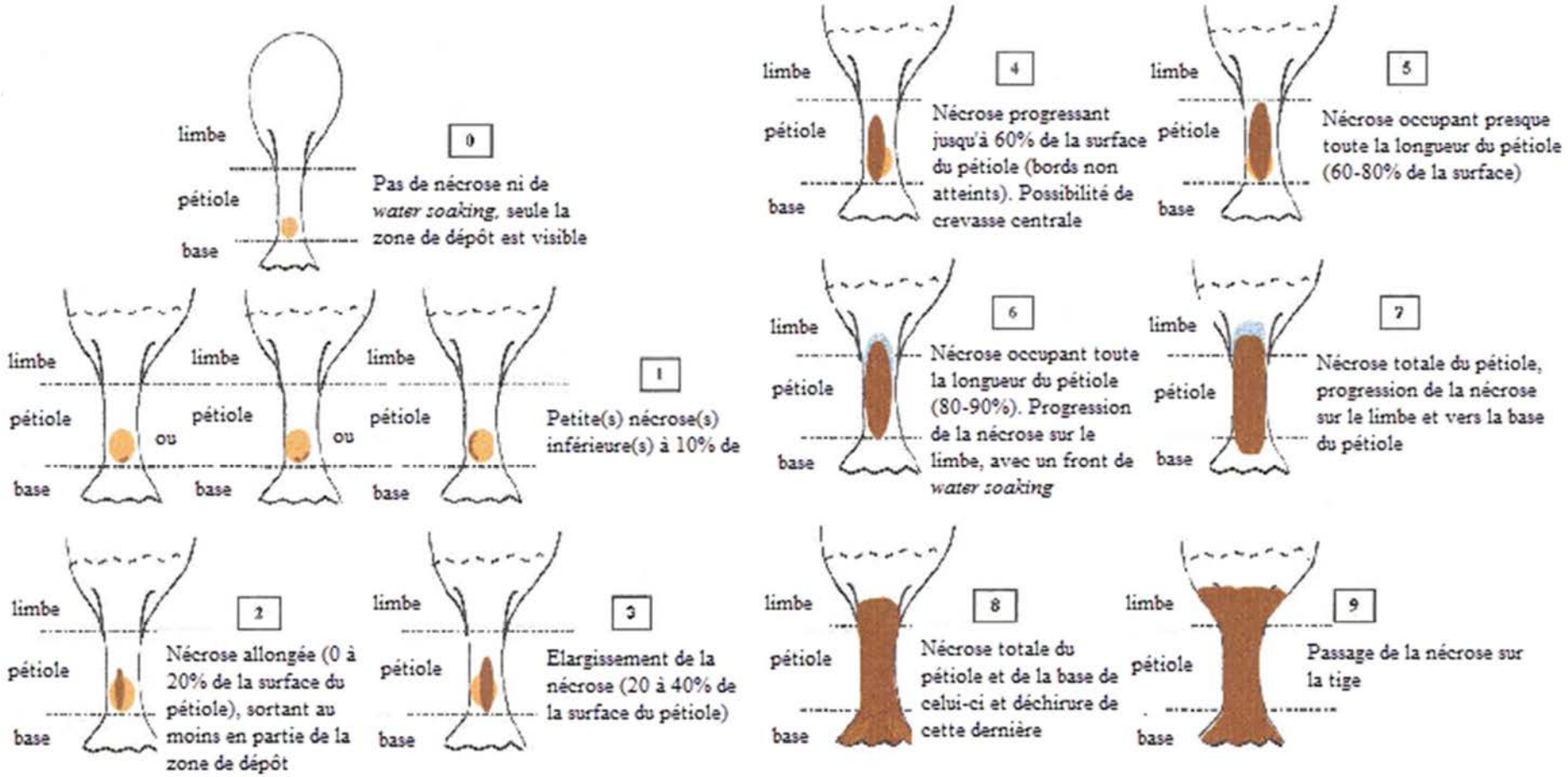


Figure III. 7. Echelle de notation de la progression du *Phoma* sur le pétiole d'après Roustaee (2003)

4.4.2.3 Quantification de la surface nécrosée

Afin de relier les mesures de photosynthèse à la surface de tissus nécrosés dans la zone de mesure, les limbes ont été scannés à 300 dpi après chaque mesure de photosynthèse avec un scanner portatif (Vistaquest Scanner HS500 ; Figure III. 8). Les images obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Winfolia (Regent Instruments Inc., Ottawa, Canada) afin de déterminer les pourcentages de tissus nécrosés (marron ou jaune) et sains (verts).



Figure III. 8. Quantification de la surface foliaire nécrosée par scanner sur fond bleu

5 Analyses statistiques

L'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit a été analysé à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XV (Rockville, MA, USA) avec les méthodes suivantes. Une analyse de variance à effets imbriqués a été utilisée pour traiter les variables d'intérêt issues des expérimentations au champ afin de tenir compte des dispositifs en *split-split-splot*. La normalité des résidus a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk (avec un intervalle de confiance de 0.95). L'homoscédasticité des variances a été vérifiée par le test de Levene (avec un intervalle de confiance de 0.95). Lorsque l'un des postulats de l'ANOVA n'était pas vérifié (absence de normalité des résidus ou d'homoscédasticité des variances), les résultats ont été analysés par une analyse de variance de Kruskal et Wallis. Les variables d'intérêt issues des expérimentations en serre ont été analysées à l'aide d'un modèle linéaire généralisé. Lorsque la normalité des résidus ou l'homoscédascité des variances n'était pas

vérifiée, un test non paramétrique de Wilcoxon a été réalisé avec un intervalle de confiance de 0.95.
La corrélation entre deux variables a été analysée par régression linéaire simple.

L'optimisation des paramètres des modèles présentés dans ce manuscrit a été réalisé avec la procédure « nlminb » sous le logiciel R (R Development Core Team, Vienna, Austria). La qualité prédictive des modèles a été caractérisée à l'aide de trois critères statistiques : le biais, la racine de l'erreur de prédiction quadratique moyenne (RMSEp) et l'efficience du modèle (EF).

$$Biais = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\left(Y_i - \hat{Y}_i\right);\ RMSEp = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\left(Y_i - \hat{Y}_i\right)^2};\ EF = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{N}\left(Y_i - \hat{Y}_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{N}(Y_i - \bar{Y})^2}$$

Où Y_i sont les valeurs mesurées, $\hat{Y}_i$ sont les valeurs simulées, $\bar{Y}$ est la moyenne des valeurs mesurées et N le nombre total de situations.

Chapitre IV. Acquisition de connaissances : mise en place et développement des infections (et dégâts)

Le schéma conceptuel du modèle montre qu'une infection est la résultante de la concomitance de la présence de l'organe sensible, d'une sensibilité de cet organe cible, de la présence de l'agent pathogène et des conditions microclimatiques favorables à sa mise en place et son développement. Elle résulte donc d'interactions complexes entre l'environnement, la plante, le microclimat et l'agent pathogène dont les déterminants ne sont pas toujours bien identifiés. De ce fait, deux expérimentations au champ ont été menées en 2010 et 2011 (CAuz10 et CAuz11) pour disséquer ces interactions.

1 Phomopsis

La partie 1.1 a fait l'objet d'une publication récente :

M. Desanlis, J.N. Aubertot, E. Mestries, P. Debaeke, 2013. Analysis of the influence of a sunflower canopy on *Phomopsis helianthi* epidemics as a function of cropping practices. *Field Crops Research* **149**, 63-75.

Les hypothèses testées sont les suivantes.

H1 : le microclimat (et en particulier le niveau d'humidité relative pour le phomopsis et la durée de permanence d'eau libre dans les augets pour le phoma) détermine la réussite de l'infection et sa localisation au sein de la plante.

H3 : la vitesse de progression des agents pathogènes dépend de la température et de l'humidité relative dans le couvert, du statut azoté de la plante et du niveau de résistance de la plante. La vitesse de progression pourrait également dépendre du stade phénologique de la plante. Cette dernière partie ne pourra être vérifiée dans ce dispositif compte-tenu de la date unique de semis mais dans la partie 1.2.

H4 : le Phomopsis ne progresse pas dans les tissus sénescents, la sénescence de la feuille entraîne la « disparition » du symptôme.

H5 : lorsque le Phoma encercle le pétiole, il empêche le Phomopsis d'atteindre la tige.

H7 : la tache encerclante de Phomopsis provoque la rupture des flux de sèves vers les parties supérieures de la plante. Cette rupture n'est pas instantanée et sa mise en place est fonction de la vitesse d'encerclement de la tige.

Les hypothèses H3 et H7 ont également été testées en complément dans la partie 1.2 qui est essentiellement centrée sur l'hypothèse suivante.

(H2) : la sensibilité de la plante varie en fonction de son stade phénologique, et ce indépendamment du microclimat.

1.1 Analysis of the influence of a sunflower canopy on Phomopsis helianthi epidemics as a function of cropping practices

1.1.1 Introduction

Phomopsis stem canker is caused by the fungus *Diaporthe helianthi* (anamorph: *Phomopsis helianthi*; (Muntanola-Cvetkovic et al., 1981). It appeared in south-western France in 1984 and then spread over the entire French sunflower cropping area until 1992-1993 (Délos and Moinard, 1995). This fungus has also been reported in many regions of sunflower production worldwide, such as Argentina, Australia, China, Eastern Europe and USA. Ascospores are actively released from perithecia maturing on the sunflower debris and are rain splashed and wind dispersed throughout the growing season. Leaves are infected at the margin via guttation drops (Gulya et al., 1997). The pathogen reduces yield by up to 1.5 t ha^{-1} and oil content by up to 25% due to premature leaf senescence, plant wilting and lodging (Masirevic and Gulya, 1992).

In France, disease control is currently based on the use of disease-tolerant genotypes and to a lesser extent on fungicides. An erosion of tolerance in the case of heavy infections was observed in regions where the disease has been endemic for 30 years, such as Serbia (Masirevic and Forgic, 2000). Moreover, with the European incentives for the reduction of pesticides in agriculture, cultural control is required to limit yield loss. Debaeke *et al*. (2003) reported that high N fertilisation and high plant density generally increase the proportion of stems with necrotic lesions, although magnitude of response depends on inoculum pressure and timing of spore release, both governed by weather conditions. To our knowledge, the effect of crop management system on epidemics of an airborne pathogen through modifications of soil and plant status, including canopy development and microclimate, has not been extensively explored (Caubel et al., 2012). However, this information is required to represent biotic factors in crop simulation models.

The severity of phomopsis stem canker is often scored by the final number of girdling spots per plant (Pinochet, 1995). The value of this indicator is obtained by combining three variables: (i) the number of leaf spots per plant, (ii) the proportion of spots that produce a stem lesion and (iii) the proportion of stem lesions turning into girdling lesions. These three variables depend on environmental and crop variables. Among climatic variables, relative humidity (and precipitation) are known to influence ascospore germination and leaf infection (Délos and Moinard, 1997a). A relative humidity of 90% must be maintained for at least 10-

12h for leaf infection to be successful (Gulya et al., 1997). The effect of crop management on disease infection could be better represented by taking into account crop microclimate (Debaeke and Moinard, 2010). Relative humidity within the sunflower canopy is governed by the development of leaf area, which is a function of plant density, nitrogen rate and genotype (Stanojevic, 1985; Connor and Hall, 1997). LAI (Leaf Area Index) and $fPAR_i$ (fraction of Photosynthetically Active Radiation intercepted) are frequently used to characterise sunflower canopy development in epidemiological studies (Debaeke and Estragnat, 2003).

As typical infection starts at the leaf margins then spreads along the main vein of the leaf, lamina length could be a factor influencing the probability that a leaf spot turns into a stem lesion. Similarly, stem diameter could modify the time taken for a necrotic lesion to girdle the whole stem, hence affecting the final proportion of girdling lesions. These variables both depend on some crop management options (plant density, N fertilisation) and especially the genotype (Degener et al., 1999; Seassau et al., 2012). The rate of fungal growth in plant tissues may depend on genotype susceptibility (Vear et al., 1997), plant N content and leaf temperature (Agrios, 2005). Leaf length and speed of fungal growth were assumed to determine the time needed to produce a stem lesion from initial infection. However, before reaching the stem, fungal growth may be stopped by leaf or petiole physiological senescence, but also by *Phoma macdonaldii* which develops on leaf axils and provokes premature leaf senescence (Debaeke and Pérès, 2003). Therefore, the respective influence of phoma black stem and the natural senescence rate should be assessed by a diagnostic approach.

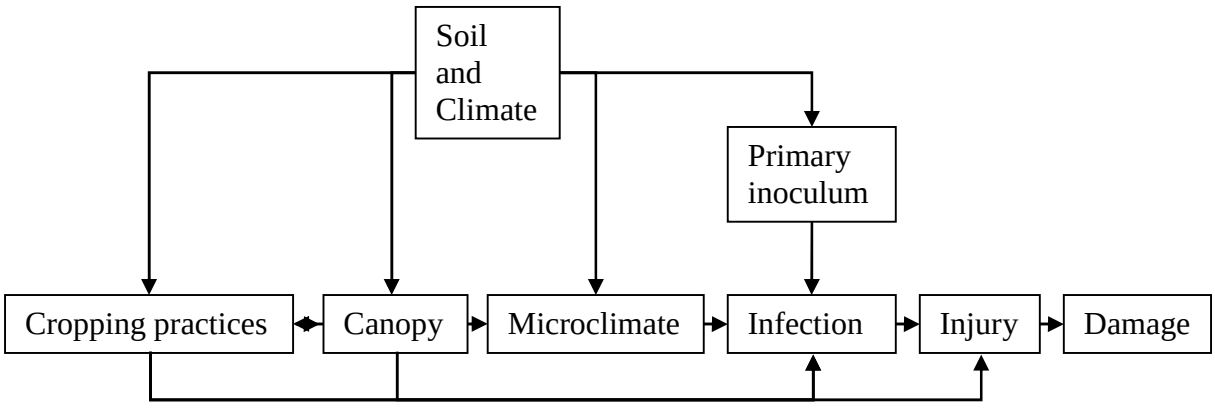


Figure IV. 1. Relationships between cropping practices, environment, sunflower crop and phomopsis at the field scale (even if primary inoculum is produced at the landscape level).

Table IV. 1. Agronomic and environmental variables assessed in the experiment and their contribution to the understanding of phomopsis epidemics under various crop management systems.

	Leaf symptoms (incidence)	**Leaf symptom progression (rate)**	**Leaf-to-stem passage (% leaf symptoms)**	**Girdling symptoms (% stem symptoms)**
Climatic variables	Relative humidity Precipitation Temperature			
Crop microclimate	Relative humidity Temperature	Temperature		
Plant characteristics	Green leaf area Senescence rate	Nitrogen Nutrition Index	Lamina length Senescence rate	Stem diameter
Other pathogens			Incidence of phoma black stem	

A detailed study was conducted to analyse *P. helianthi* infection processes in contrasting sunflower canopies differing in genotypic susceptibility, plant density, nitrogen status, and water availability following the conceptual scheme of figure IV. 1. Data on inoculum, plant injury, microclimate and canopy development were assessed together and related (Table IV. 1). The objective was to determine step-by-step by experimentation and simulation: (i) how weather conditions influence primary inoculum production (measurement and assessment of the predictive quality of a model), (ii) how cropping practices influence crop N status, plant architecture and canopy development, (iii) how weather conditions and canopy development both affect crop microclimate (measurement and modelling) and (iv) how these environmental and agronomic conditions can affect phomopsis leaf infection and its fate from leaf to stem.

1.1.2 Materials and methods

1.1.2.1 Experimental design and crop management systems

In 2010 and 2011, a sunflower crop was grown under semi-natural infection at INRA experimental station in Auzeville, near Toulouse (Haute-Garonne, SW France, 43°36 N, 1°26 E) on a deep silty-clay soil (24-34% clay in the 0-30 cm layer).

In the semi-natural protocol of infection, fragments of sunflower stalks from infected fields were placed between the crop rows according to the method described by Viguié et al. (2000) in order to reinforce the natural inoculum. In 2010, two stalks per crop row were laid down on 16 June. In 2011, two stalk fragments per row were introduced on 20 May within each of the central crop rows.

In 2010, the experiment was set up as a three-factor split-split-plot design with three replicates in blocks of 90 m² each, with water regime (irrigated or not) applied to the main plots, which were split into two sub-plots with two levels of nitrogen fertilisation, which in turn were split into two levels of plant density. Cultivar Melody (moderately susceptible to *P. helianthi*) was sown on 19 April and thinned to two plant densities (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}) with nitrogen fertilisation (N150 = 150 kg N ha^{-1}: 75 N at sowing + 75 N on 21 June) or without (N0 = 0 kg N ha^{-1}). Two irrigation regimes were applied (IRR0: no irrigation except to promote plant growth and leaf infection; IRR1: 21 mm on 8 July + 28 mm on 21 July; Figure IV. 2a).

In 2011, the number of modalities was reduced. The field experiment was set up as a three-factor split-split-plot design with three replicates, with irrigation or not as the main plots, each split into two plots with confounded treatments (D1-N150: 150 kg N ha^{-1}, 3.5 plants m^{-2}; D2-N0: no N-fertilisation, 7 plants m^{-2}). These sub-plots were again split into five cultivars (varying in their susceptibility to *P. helianthi*), with reinforced inoculum. The five cultivars, of the same earliness (cv. Sikllos CL, susceptible; cv. Kerbel, moderately susceptible; cv. LG5451HO CL, moderately susceptible to tolerant; cv. NK Ferti, tolerant; cv. ES Paulina, tolerant) were sown on 8 April. Plants were thinned to two densities and fertilised with nitrogen (150 kg N ha^{-1}: 75 N on 19 May + 75 N on 6 June) on the D1-N150 plots. Two irrigation regimes were applied (IRR0: no irrigation except for promoting plant growth and leaf infection; IRR1: 33 mm on 7 July; Figure IV. 2b).

Prior to sowing, soil core samples were collected to 120 cm depth for analysis of mineral nitrogen. The rainfed sunflower was sown after a moderately irrigated sorghum with residual soil NO_3.N content of 46 kg ha^{-1} (2010) and 51 kg ha^{-1} (2011); the irrigated sunflower was sown after a fully irrigated maize with residual soil NO_3.N content of 70 kg ha^{-1} (2010) and 33 kg ha^{-1} (2011). In addition, soil was more compacted after irrigated maize. This resulted in slight differences in early crop growth between rainfed and irrigated treatments before the application of irrigation.

1.1.2.2 Environment, microclimate and canopy measurements

A weather station (CE-180, Cimel, France) was located at about 200 m from the experiments. Mean air temperature (Tair, °C) and air relative humidity (RHair, %) at 2 m height were recorded hourly from February 1st to the end of the sunflower growing season. Minimum (Tmin, °C) and maximum (Tmax, °C) air temperature, and precipitation (P, mm) were recorded daily.

Relative humidity (RH) and temperature (T) within the canopy were recorded from 18 June (2010) and 16 June (2011) to the end of August using Rotronic MP100A thermohygrometers (Campbell Scientific Ltd., Les Ulis, France). The sensors were placed in the middle of the inter-row (row width = 0.50 m) at 0.4 m (RH40, % and T40, °C), 0.8 m (RH80, % and T80, °C) and 1.2 m (RH120, % and T120, °C) above the ground. The sensor accuracy was 1.5% over the RH range 5-95%. Microclimatic variables were recorded every 15 min, compiled hourly and stored on Campbell CA10 data loggers. Only selected crop management treatments (8 in each year), resulting in a wide range of sunflower canopies, were equipped with sensors (one complete replicate of all sub-sub-plots in 2010 and of all sub-sub-plots of cv. LG5451HO CL and cv. Kerbel only in 2011).

In 2010 and 2011, LAI was measured regularly from star bud to the end of flowering using a LAI-2000 Plant Canopy Analyser (LI-COR Biosciences, Inc., Lincoln, NE). In 2010, Plant Leaf Area (PLA) was also determined on 12 plants per plot at the flowering stage (Merrien, 1992) using the Pouzet and Bugat (1985) method based on the measurement of lamina length and width on two typical leaves per plant. In 2011, PLA was determined by measuring lamina length and width on all the green leaves of 5 plants per plot at flowering.

1.1.2.3 Plant measurements

For each treatment, the nitrogen nutrition status of the crop was quantified using the Nitrogen Nutrition Index (NNI) with NNI = Nm/(4.53 x $DM^{-0.42}$), according to Debaeke *et al*. (2012) for sunflower, where Nm is the total N concentration (%) measured for all the aerial parts and DM (t ha^{-1}) is the weight of aerial dry matter from 5 plants cut at the soil surface at early anthesis. A value of NNI ≥ 1 indicates a crop with non-limiting N supply; NNI = 1 is optimal N nutrition; below 1, the crop is N-deficient.

On each tagged plant, total leaf number was counted at flowering and the stem base diameter (mm) was measured at the end of flowering, when stem growth in diameter was complete, with a 150 mm Stainless Steel Digital Caliper.

1.1.2.4 Primary inoculum assessment

A spore sampler (Burkard Scientific Ltd, UK) was used within the field experiment to capture spores continuously for periods of 7 days from May 29 to August 27 and from June 1 to August 9 in 2010 and 2011 respectively. In 2010, only the presence or the absence of ascospores was scored, whereas in 2011 the atmospheric ascospore concentration (ascospores m^{-3}) was assessed daily.

1.1.2.5 Asphodel model

Asphodel is a deterministic model that describes the effect of weather (temperature, precipitation, and relative humidity) on epidemic development (ascus maturation, spore ejection, and leaf infection) of *P. helianthi* (Délos and Moinard, 1997a). To predict ascus maturation, the model was run with three-hourly weather data (RHair, Tair, Tmin, Tmax, P) from 1 February for each year. To predict spore release and leaf infection, both air and within-canopy relative humidity (RHair: from 1 February to 18 June and 16 June in 2010 and 2011 respectively; RH40: from 18 June and 16 June in 2010 and 2011 respectively to the end of August) and temperature (Tair and T40) were used as input data to simulate the effects of crop management on microclimate and leaf infection.

The measurements of atmospheric ascospore concentration were used to assess the predictive quality of Asphodel regarding spore ejection. In order to evaluate the model, daily measurements were transformed into binary variables using a threshold of 15 ascospores m^{-3} (0, no significant; 1, significant atmospheric concentration in ascospores; Moinard, pers. com.). A McNemar test was used to test the null hypothesis that observed and simulated daily values were similar. In addition, this test was performed on the same data aggregated in a non-overlapping 3-day time range.

1.1.2.6 Disease assessment

In 2010, the lack of rain resulted in a very small number of infection events as the conditions for a successful inoculation were not present (Figure IV. 2a). Therefore disease assessment (date of appearance, necrosis size and symptom localisation) was performed on every plant (248 plants in D1 and 528 plants in D2) from 29 June to 27 August.

In 2011, the appearance of visible leaf and stem symptoms and their vertical distribution were scored on 30 tagged plants twice a week from 16 June to 22 August. At each assessment date, necrosis length was measured. If the progression towards the stem stopped, the causes were identified: physiological senescence, *P. macdonaldii* attack at leaf axil or plant wilting from phomopsis at another node or from phoma at stem base.

Vertical distribution of symptoms was described by five layers: 1: leaves 1-6 (bottom); 2: leaves 7-12; 3: leaves 13-18; 4: leaves 19-24; 5: leaves 25-last expanded leaf (top). The position and fate of leaf symptoms were related to canopy development, microclimatic conditions and the timing of leaf infections.

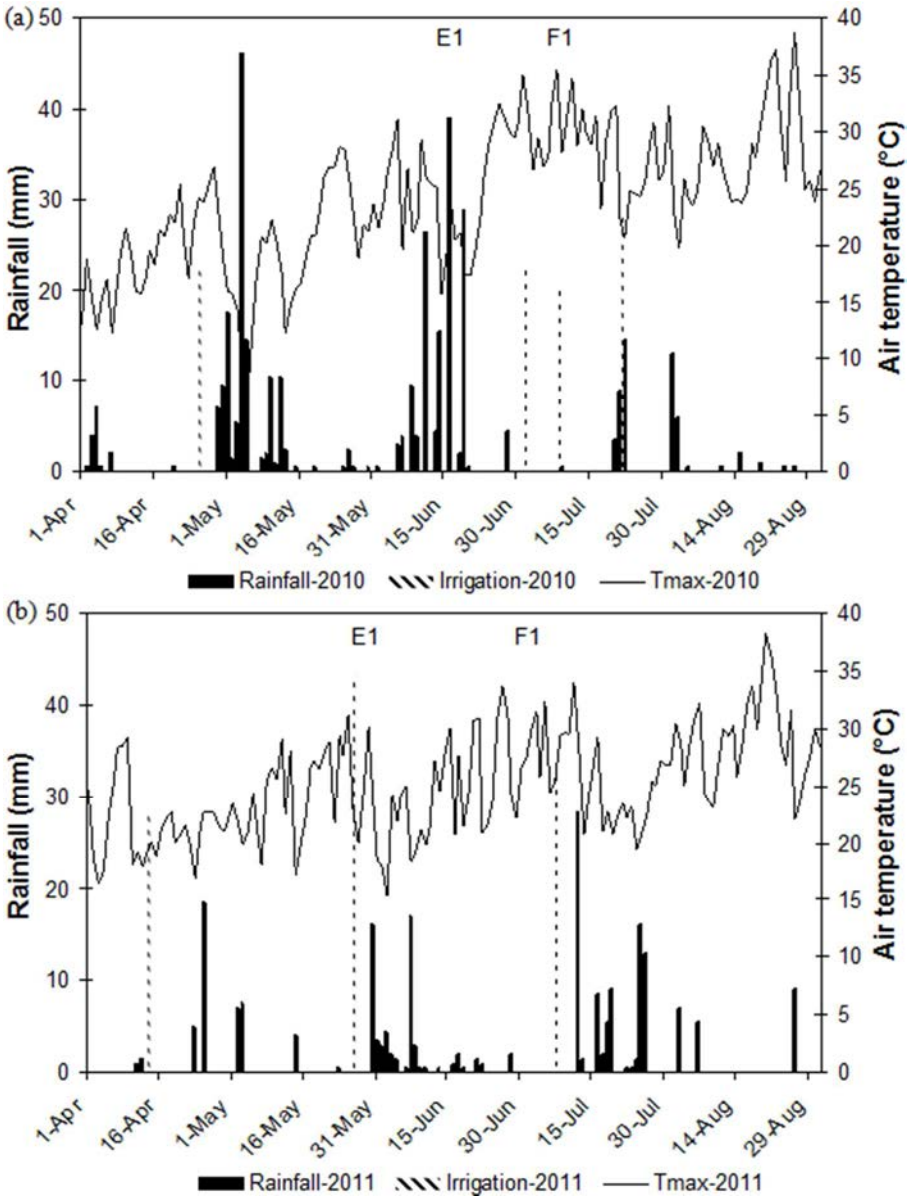


Figure IV. 2. Weather data: rainfall (with irrigation) and maximum temperature. Growth stages are indicated according to the CETIOM scale (E1: star bud stage, F1: flowering; Merrien, 1992). (a) 2010 and (b) 2011.

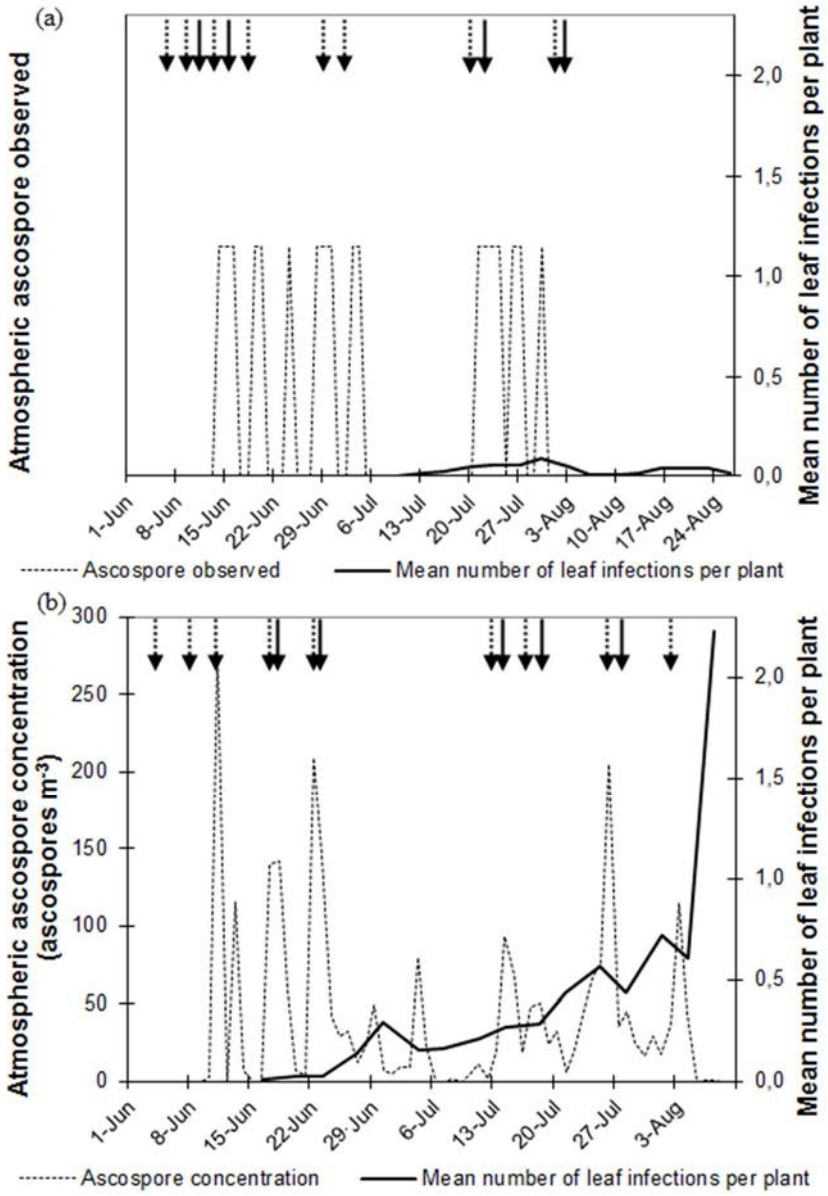


Figure IV. 3. Atmospheric ascospore concentration, periods when ascospores were observed and mean number of new leaf infections per plant; dotted arrows indicate the main periods of ascospore release and bold arrows the successful leaf infection events according to Asphodel. (a) 2010 and (b) 2011.

1.1.2.7 Statistical analyses

The data were analysed statistically using the Statgraphics Centurion XV software (Rockville, MA, USA). Data statistical analysis was done using Kruskal-Wallis analysis of variance due to non-homoscedasticity or non-normality of the data. The correlation between the number of hours of RH > 85% and the maximum LAI at anthesis was computed using the simple regression procedure.

1.1.3 Results

1.1.3.1 Effects of weather conditions on primary inoculum

According to Asphodel, asci were mature on 6 June in 2010 and on 24 April in 2011. In 2010, low relative humidity in April and from mid-May to the beginning of June hampered ascus maturation (Figure IV. 2).

In 2010, most of the ascospore releases were predicted in June, and few events were predicted in July and August due to rainfall shortage (Figures IV. 2a and 3a). Irrigation at anthesis caused additional spore release in early July. Accordingly, the results of spore traps confirmed the presence of numerous ascospores from 14 June to 30 July.

In 2011, numerous spore release events were predicted from 2 June to 7 August in relation with heavy summer precipitation. This was in close agreement with the spore trapping (Figures IV. 2b and 3b).

No significant difference was found between observed and simulated values for both years over a 3-day time range (P = 0.68 for 2010 and P = 0.07 for 2011). Therefore, we considered that the Asphodel model could be used to predict ascospore release with good precision provided that microclimatic data were supplied as input when running the model.

1.1.3.2 Effect of cropping practices and environment on crop status and canopy development

NNI

For both years, NNI was significantly ($P < 0.001$) different between N fertilisation treatments, being almost twice as high in N150 as in N0 (Table IV. 2). Differences in NNI at anthesis due to plant density or water regime were not significant.

Mean vegetative LAI

In 2010, LAI during vegetative stages was not significantly different between the two water regimes or between the two levels of plant density (Table IV. 2). It was significantly ($P < 0.001$) higher in N150 treatments than in N-deficient treatments, so canopy closure was faster with high N fertilisation (Figure IV. 4a). In 2011, LAI was significantly higher ($P < 0.001$) and canopy closure occurred earlier in the rainfed plots (Figure IV. 4b). Low density coupled with high N-fertilisation resulted in significantly ($P < 0.001$) higher LAI.

Mean LAI after flowering

In 2010 and 2011, LAI was not significantly different between the two water regimes. In 2010, it decreased more quickly in the irrigated plots due to unexpected *Verticillium dalhiae* (verticillium wilt) infections limiting the differentiation due to water regime. In 2011, LAI decayed faster in the non-irrigated plots (Figure IV. 4b). Senescence rate was reduced in the irrigated plots due to water applied on 7 July. Plant density had no significant effect on LAI in 2010. LAI was significantly higher ($P < 0.001$) with high N fertilisation in 2010. High N fertilisation coupled with low density resulted in significantly higher ($P < 0.001$) LAI but the difference was not so clear-cut in the rainfed plots due to a high rate of senescence in both treatments.

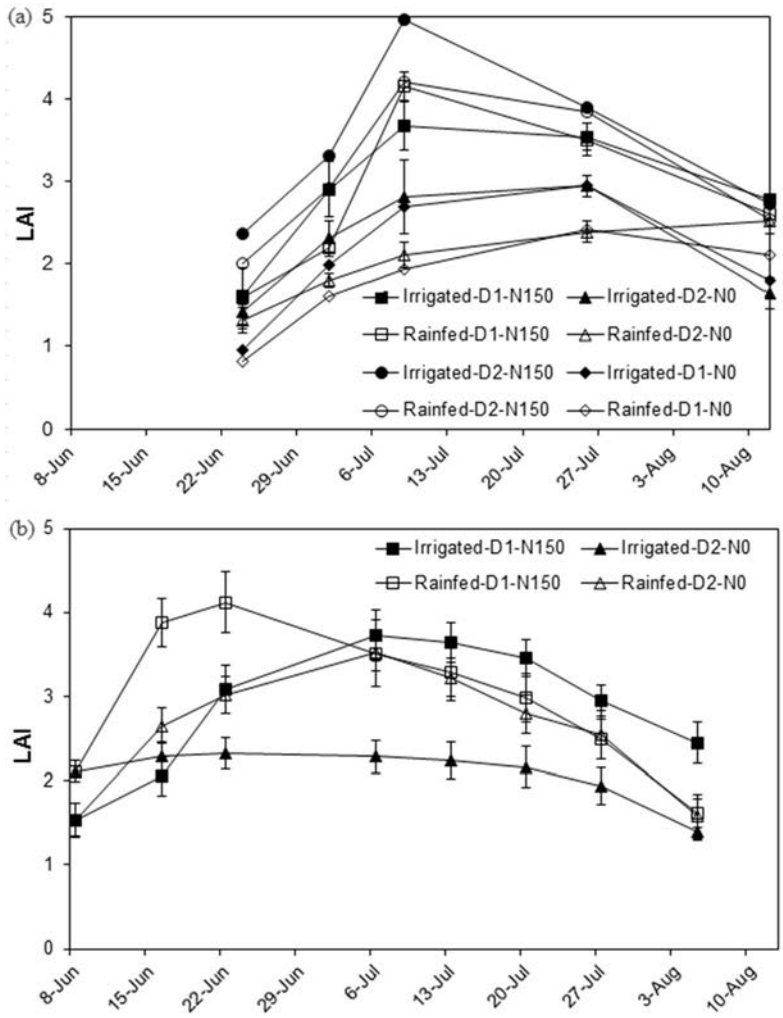


Figure IV. 4. Leaf Area Index (LAI) dynamics. (a) 2010 (b) 2011. SD is given for combinations of agronomic factors tested in 2010 and 2011 (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}).

Table IV. 2. Leaf Area Index (LAI), Nitrogen Nutrition Index (NNI), Stem Base Diameter (SBD, mm) and Maximum Lamina Length (MLL, mm) at flowering for plants infected with *P.helianthi* (D1=3.5 plants m^{-2}, D2=7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}). Not all situations were tested in 2011. Standard deviation between brackets.

		2010				2011			
		Irrigated		Rainfed		Irrigated		Rainfed	
		N0	N150	N0	N150	N0	N150	N0	N150
LAI	D1	2.69 (0.33)	3.66 (0.30)	1.94 (0.52)	4.15 (0.17)		3.72 (0.60)		3.51 (0.77)
	D2	2.81 (0.44)	4.95 (0.52)	2.10 (0.15)	4.20 (0.04)	2.28 (0.39)		3.52 (0.44)	
NNI	D1	0.67 (0.02)	0.83 (0.04)	0.51 (0.06)	0.68 (0.04)		0.97 (0.10)		0.95 (0.06)
	D2	0.66 (0.07)	1.01 (0.16)	0.55 (0.03)	0.96 (0.03)	0.51 (0.04)		0.37 (0.04)	
SBD (mm)	D1	20.9 (2.8)	24.6 (2.8)	19.5 (2.6)	23.3 (3.3)		25.1 (4.3)		26.7 (4.0)
	D2	18.1 (3.1)	20.7 (3.5)	16.8 (3.2)	20.9 (4.6)	17.2 (2.7)		18.8 (3.4)	
MLL (mm)	D1	233 (29)	280 (29)	228 (23)	270 (20)		276 (19)		287 (28)
	D2	210 (24)	237 (23)	207 (16)	241 (25)	186 (24)		195 (25)	

Stem base diameter

Crops grown at high density had significantly ($P < 0.001$) lower stem base diameter than those at low density (Table IV. 2). Crops with NNI close to 1 were more vigorous than those with NNI around 0.5 and had significantly ($P < 0.001$) thicker stems. In 2011, rainfed plants were thicker ($P < 0.01$) because of more active growth in this treatment, as observed for LAI.

Lamina length

Lamina length was significantly less ($P < 0.0001$) for crops grown at high density and without nitrogen in both years (Table IV. 2).

1.1.3.3 Effect of canopy development and weather conditions on crop microclimate

From the measurements of temperature and relative humidity, there was evidence for drier conditions within the canopy in 2010 than in 2011. In IRR0-D1-N150, from June to July 2010, the temperature was above 25°C for 288 hours and RH40 was above 85% for 490 hours, as compared to 174 and 661 hours respectively in 2011.

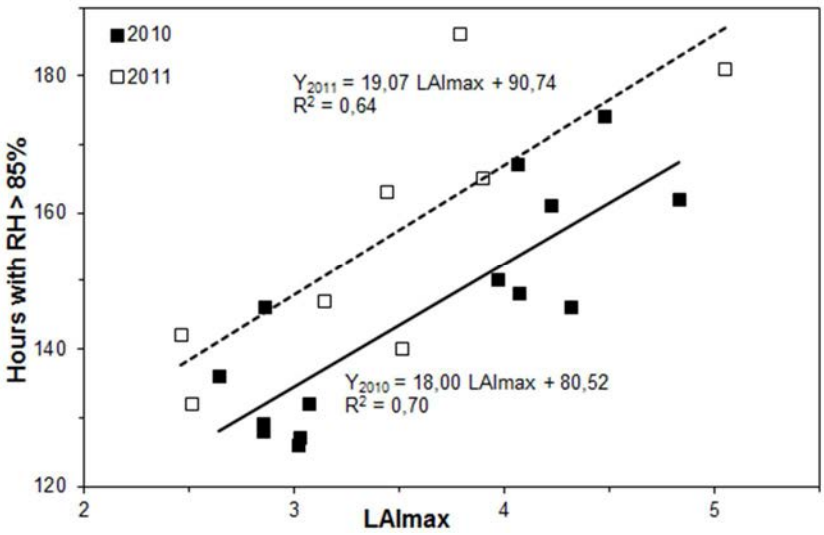


Figure IV. 5. Number of hours of relative humidity (RH) higher than 85% according to the maximum Leaf Area Index (LAImax) in 2010 and 2011. RH data corresponded to 18 June-9 July (2010) and 16 June-7 July (2011). RH was measured under the sunflower canopy at 40 cm above the ground.

In 2010, during vegetative growth (from 18 June to 9 July), RH40 did not differ significantly among water regimes and plant densities. However it was significantly higher with N fertilisation ($P = 0.002$) as compared to N0 plots. In closed canopies (LAI > 3), RH was significantly higher in the lower part of the canopy ($P < 0.05$ to $P < 0.001$), whereas in open canopies (LAI < 3), no significant difference in RH was observed between sensor levels.

In 2010, during the grain-filling period, RH40 was significantly higher ($P < 0.0001$) in rainfed plots due to premature senescence caused by unexpected verticillium wilt attacks when irrigated. After flowering, there was no significant difference between N levels or between plant densities.

Over the whole measurement period, daily RH did not differ significantly between canopies in 2011. However, significant differences appeared when data were compared by growth periods. During vegetative stages (from 16 June to 7 July), relative humidity was significantly higher in rainfed plots ($P < 0.01$). Mean RH40 was 72.0% for rainfed plots and 69.1% for irrigated plots. No significant difference in RH40 was recorded between the two crop management systems (D2_N0 *vs.* D1_N150), although relative humidity was slightly higher in the latter. No significant difference in mean RH was recorded due to sensor level within the canopy. However, the differences in relative humidity between treatments tended to decrease during grain filling when canopy development was at its maximum. No significant difference was detected between water regimes, N fertilisation levels, cultivars and sensor levels.

For both years, the number of hours of high RH (>85%) within the canopy during vegetative growth (from 18 June to 9 July and 16 June to 7 July in 2010 and 2011 respectively), which are supposed to promote spore release and leaf infection (Délos and Moinard, 1997a), was positively related to maximum LAI at anthesis (Figure IV. 5).

High rates and levels of canopy closure resulted in higher levels of relative humidity within the canopy. This was observed during the pre-flowering period because no differences in RH were evident after flowering. For that reason we should consider two periods for studying the effect of canopy development on leaf infection: (i) the pre-flowering period, when LAI steadily increases and changes the microclimatic conditions, with marked effects of N fertilisation and plant density and (ii) the post-flowering period, where plant height is at its maximum, and during which active LAI is decreasing more or less rapidly according to N, water management and unexpected *Verticillium* when it occurred.

1.1.3.4 Effects of sunflower canopy on disease incidence as affected by environmental conditions and primary inoculum

Effect of weather and irrigation on the dynamics of leaf infection

In 2010, despite irrigation, the dry weather strongly limited the incidence of phomopsis on leaves. None of the ascospore release events in June resulted in successful leaf infection. First infections were observed on 9 July but fewer than 2% of the plants had leaf symptoms at flowering (Figure IV. 3a). The peak of infection was mainly observed from the end of July (mostly in IRR1) to early August, when the plants were in the grain-filling phase. This corresponded to ascospore release events occurring on 9 July (only for IRR1) and at the end of July (20, 22). No corresponding leaf infection event was simulated by Asphodel around 9 July. However, only 5-6% of plants expressed leaf symptoms in the experiment which denotes limiting conditions.

In 2011, two main waves of infection were observed: from mid-June to the beginning of July, and from the end of July to the beginning of August. For the first wave, the plants were still in the bud growth stage. Flowering occurred around 7 July. For the second wave, plants were in the early grain-filling phase. Conditions were favourable to infection at the beginning of June and from mid-July to the end of July (Figure IV. 2b). Ascospore release events occurring at the same time resulted in early symptom appearance on leaves (16 June), 21 days before anthesis. No correlation was found between the amount of ascospores released (traps) and the number of leaf symptoms scored per plant (Figure IV. 3b). A smaller number of leaf infections was observed in June, when sunflower was at a very susceptible

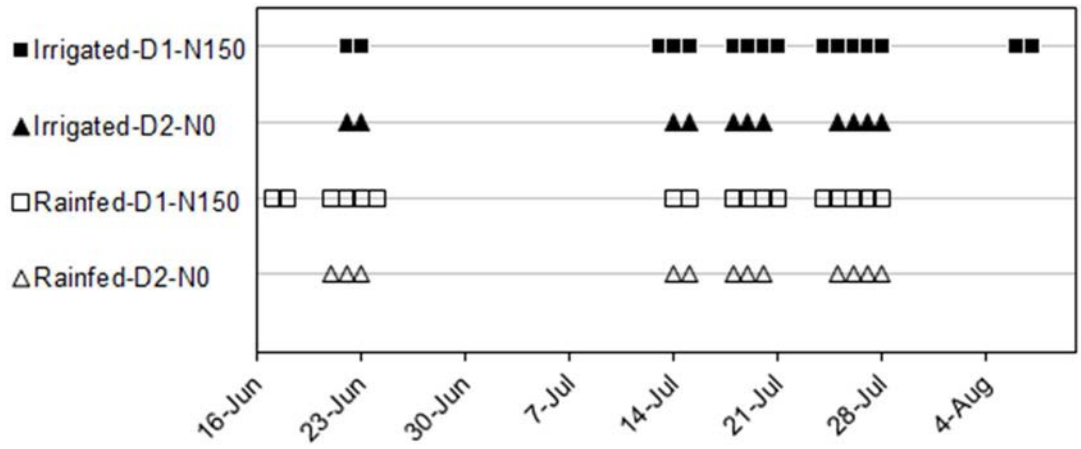


Figure IV. 6. Number of contamination events simulated by Asphodel in 2011 using microclimatic data (RH40) for the four crop management systems (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha-1, N150 = 150 kg N ha-1).

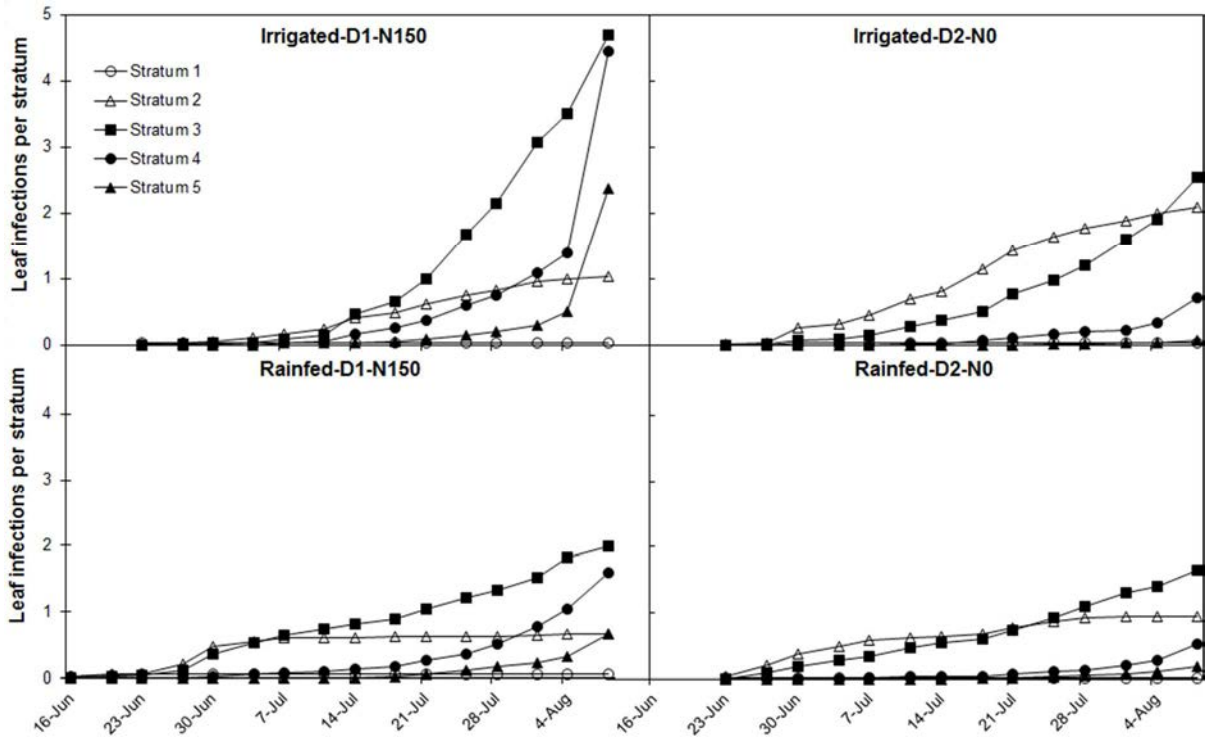


Figure IV. 7. Dynamics of phomopsis leaf infections per stratum in 2011 for the four crop management systems (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N.ha^{-1}, N150 = 150 kg N.ha^{-1}).

Table IV. 3. Cultivar ranking for the three components of phomopsis injury in 2011 for the four crop management systems together.

	Leaf symptoms (nb per plant)			Leaf-to-Stem passage	Girdling symptoms
	First wave	Second wave	General	(% leaf symptoms)	(% plants)
ES Paulina	0.3 b	2.3 c	2.6 c	12 b	3 b
Kerbel	0.7 b	3.2 c	3.9 bc	9 b	10 b
LG5451HO CL	0.5 b	4.7 b	5.2 b	20 ab	24 ab
NK Ferti	1.0 b	9.6 a	10.6 a	22 a	40 a
Sikllos CL	1.5 a	9.0 a	10.5 a	23 a	44 a

Within each column, mean values followed by different letters are significantly different from one another based on Kruskal-Wallis All-Pairwise comparisons $_{0.05}$

stage, than at the end of July. This suggests that the number of infections on leaves did not only depend on the availability and amount of primary inoculum, but also on microclimatic conditions after spore deposition.

Effect of crop canopy management on the dynamics of leaf infection

In 2010, according to Asphodel, no differences in leaf infections occurred among the simulated crops under various crop management systems. This was in agreement with the low number of leaf symptoms observed in the different treatments. For late infections (in August), more symptoms appeared in rainfed plots (0.3 symptom per plant *vs.* 0.2 symptom per plant) where the senescence rate was lower (as described in Section 3.2). With no added nitrogen, more leaf infections occurred in the high density plots whereas with high N fertilisation, more leaf infections occurred in the low density plots (0.3 symptom per plant *vs.* 0.2 symptom per plant).

In 2011, during vegetative growth, two leaf infection events (17 June: 2 days, 21 June: 4 days) were simulated with Asphodel in IRR0-D1-N150 (Figure IV.6), but only one for IRR0-D2-N0 (21 June: 3 days), IRR1-D1-N150 and IRR1-D2-N0 (22 June: 2 days). In 2011, more symptoms were observed on leaves in the non-irrigated plots ($P < 0.0001$) and symptoms appeared earlier than in the irrigated plots (16 June *vs.* 23 June; Figure IV.7). One has to keep in mind that differential irrigation was applied only on 7 July. No significant differences were observed between N-fertilisation levels. The number of leaf symptoms differed significantly among genotypes ($P < 0.0001$) with cv. Sikllos CL and cv. NK Ferti having the largest number of leaf symptoms (1.5 and 1 symptom per plant respectively) and cv. ES Paulina the lowest (0.3 symptom per plant; Table IV.3). The non-senescent plant leaf area available for successful spore germination was slightly higher in rainfed plots than in irrigated ones, due to differences in pre-flowering crop growth: 8286 cm^2 *vs.* 8068 cm^2 for D1-N150, and 3312 cm^2 *vs.* 3038 cm^2 for D2-N0. The larger green leaf area could have contributed to higher number of leaf infections by creating a more favourable microclimate but also by increasing the probability of ascospore interception by the canopy.

In 2011, the rainy conditions from mid-July to the end of July limited the difference in microclimatic conditions between the treatments (Figure IV.2b). However, more leaf infection events were simulated with Asphodel in situations IRR1-D1-N150 (14 days) and IRR1-D2-N0 (11 days) than in situations IRR0-D1-N150 and IRR0-D2-N0 (both 9 days;

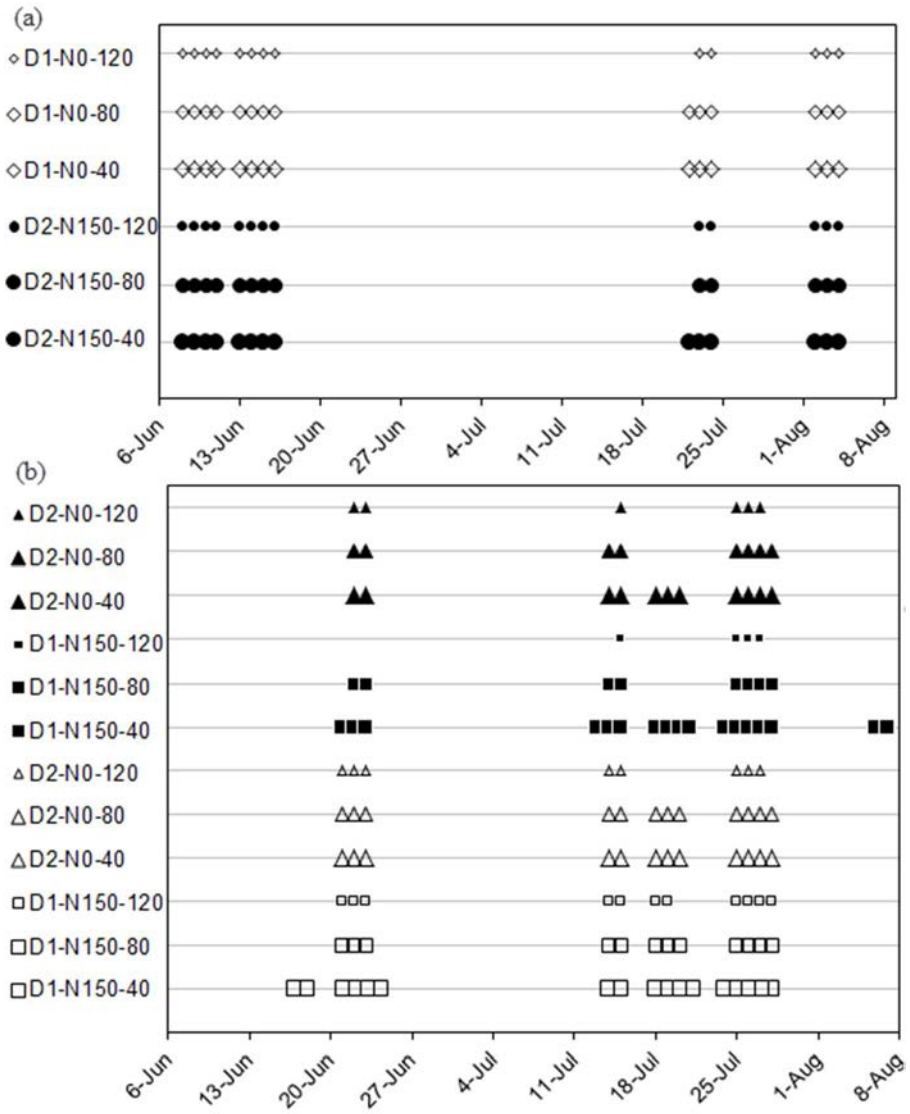


Figure IV. 8. Number of contamination events simulated by Asphodel with microclimatic data for various crop management systems (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}) and the sensor location (40 cm, 80 cm, 120 cm above ground). (a) 2010 (b) 2011. Open and dark symbols correspond to rainfed and irrigated treatments respectively.

Figure IV.6). In 2011, significantly ($P < 0.0001$) more leaf symptoms appeared in the irrigated plots after flowering (Figure IV.7). In irrigated plots, more leaf symptoms ($P < 0.0001$) were observed at low density coupled with high N-fertilisation, the difference from high density/low N being not significant in rainfed conditions. The number of leaf symptoms differed significantly among genotypes ($P < 0.0001$) with cv. Sikllos CL and cv. NK Ferti having the highest numbers of leaf symptoms (9 and 9.6 symptoms per plant respectively) and cv. Kerbel and cv. ES Paulina the lowest (3.2 and 2.3 symptoms per plant respectively; Table IV.3).

Vertical distribution of leaf symptoms as related to microclimate and leaf senescence pattern

In 2010, the gradient in relative humidity recorded by the sensors resulted in different patterns of potential leaf infection when using Asphodel. Two days favourable to leaf infection were simulated when using data from the middle and upper sensors in the irrigated plots and from the upper sensor in the rainfed plots, whereas 3 days were simulated with RH data from the lowest sensor (Figure IV.8a). This was in accordance with leaf symptom distribution as more symptoms were observed in strata 2 and 3 (from leaf 7 to leaf 21) than in strata 4 and 5.

In 2011, during vegetative growth, relative humidity within the canopy also varied with the sensor position within the canopy: RH was higher for sensors placed in the lower part of the canopy than for sensors placed in the upper canopy. In treatment IRR0-D1-N150 (Figure IV.8b), two leaf infection events were simulated with Asphodel using microclimatic data from the lower sensor (17 June: 2 days, 21 June: 4 days) and only one event when using data from the middle and the upper sensors (21 June: 3 days). As in 2010, this was in accordance with symptom distribution on the plant as strata 2 and 3 were the most infected ($P < 0.0001$). Phomopsis leaf symptoms resulting from the first wave of infection (16 June-7 July) were localised at the bottom of the plant (stratum 1-3 corresponding to leaf 1-18) with most of the symptoms in stratum 2 (leaf 7-12; Figure IV.7).

In 2011, after flowering, relative humidity in the upper part of the plant remained lower than for the other sensors. This resulted in 4-8 days of leaf infection events *vs.* 6-9 days in the middle part of the plant and 9-14 days in the lower part of the plant, as predicted by Asphodel (Figure IV.8b). This was not totally in agreement with symptom distribution ($P < 0.0001$): stratum 3 > stratum 4 > stratum 2 = stratum 5 > stratum 1, from maximal to minimal leaf infection number.

Indeed, after flowering, leaf senescence progresses from the bottom to the top of the plant, either caused by physiological processes (self-shading, N deficiency, leaf ageing) or by attacks of *P. macdonaldii* from leaf axils. This ascending senescence can disturb the establishment of phomopsis which does not infect senescent tissues.

In 2011, all the leaves from stratum 1 became senescent a few days after flowering in all treatments (Figure IV.9). Half of the leaves from stratum 2 became senescent at flowering

except for IRR1-D2-N0 that only had a third of these leaves senescent. All leaves from stratum 2 became senescent at the beginning of August. Senescence of leaves from stratum 3 began at flowering except for IRR1-D2-N0 where senescence began at the end of July. All leaves from stratum 3 became senescent on *ca*. August 20 on all treatments. At this time, senescence rate of strata 4 and 5 was around 85% and 70% in irrigated conditions *vs*. 100% and 95% in rainfed conditions.

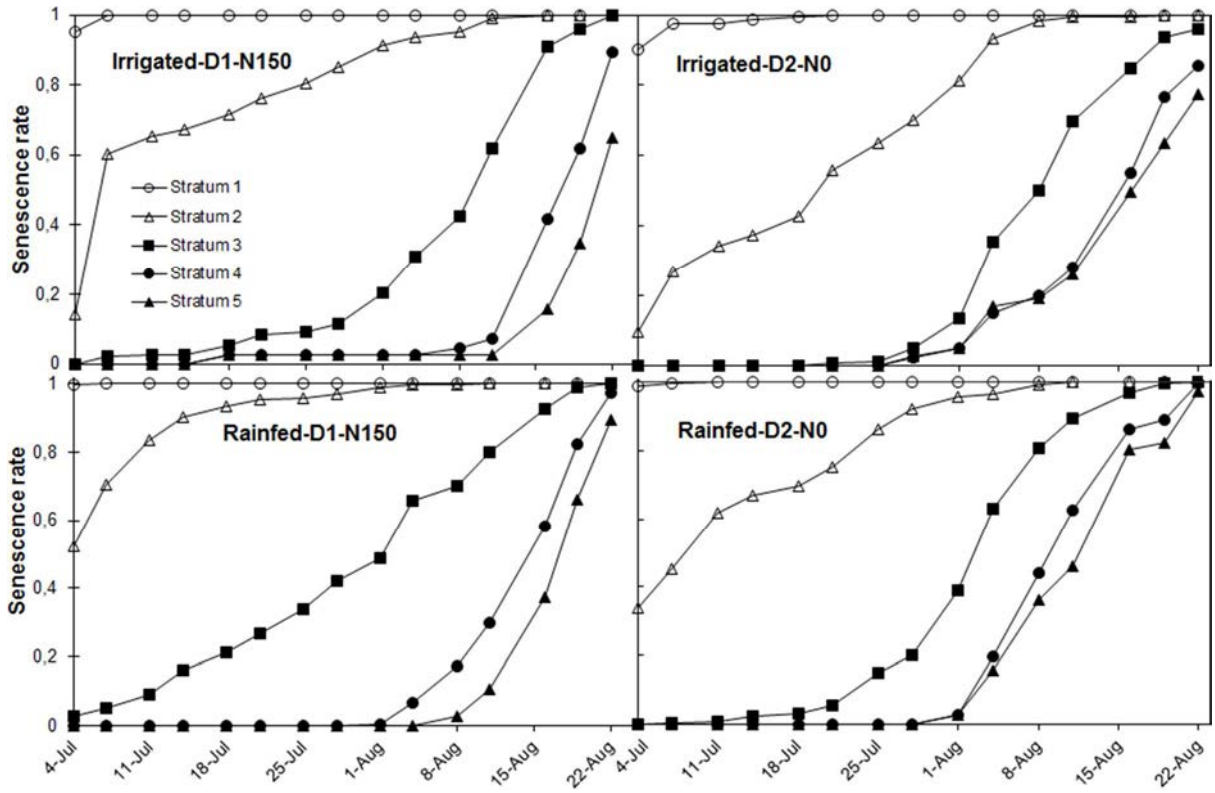


Figure IV. 9. Dynamics of senescence in 2011 for the four crop management systems (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}).

As phomopsis did not infect senescent tissues, symptoms located in strata 1 and 2 mostly corresponded to the first wave of infection (89% and 40%, respectively) when leaf tissues were still green. As senescence in stratum 2 for IRR1-D2-N0 occurred later, it may have contributed to the larger number of leaf infections than in the other treatments.

Leaves with phomopsis symptoms in the upper strata (3, 4 and 5) mostly corresponded to the second wave of infection (87%, 98% and 99% respectively). Higher senescence rate in rainfed plots limited the number of late leaf infections. Moreover, on 8 August, the residual green PLA in D2-N0 was half the value than in D1-N150. For both water regimes, the number of leaf infections occurring in strata 4 and 5 was higher in the D1-N150 treatment, possibly due to more residual PLA being available for infection.

Phomopsis leaf symptoms resulting from the second wave (11 July-8 August) were generally located between the medium and upper strata of the plant. However, the location of these symptoms differed among crop management systems. Leaf symptoms on plants grown at high density (coupled with no N-fertilisation) were mainly located in strata 2 and 3, suggesting that attacks had occurred early. Few new leaf symptoms appeared in stratum 2 for plants with low density coupled with high N-fertilisation. In those situations, leaf symptoms appeared mainly in strata 3-5, suggesting later or prolonged successful attacks.

1.1.3.5 Effect of crop management on the fate of leaf injuries

Variability in the leaf-to-stem passage with crop management and cultivar

In 2010 and 2011, 52% and 15% of infected leaves (i.e. bearing at least one spot) resulted in leaf axil lesions respectively. However, only 12% of plants had at least one stem spot in 2010 whereas this percentage reached 43 in 2011. In 2011, more leaf symptoms reached the stem from the first wave of infection than from the second (39% *vs.* 11%, $P < 0.001$).

The proportion of infected leaves resulting in a stem necrotic lesion was significantly higher (Figure IV.10, $P < 0.0001$) with irrigation in both 2010 and 2011 ($P < 0.005$). N fertilisation levels had no significant effect on the proportion of infected leaves resulting in a stem lesion in 2010. A higher proportion of leaf-to-stem passage occurred at high plant density (56% *vs.* 45%, $P < 0.005$) in 2010. In 2011, a greater number of leaf symptoms reached the stem on dense (and unfertilised) plants ($P < 0.0001$).

In 2011, the genotypic effect was significant ($P < 0.0001$) with the following leaf-to-stem ranking: Sikllos CL = NK Ferti ≥ LG5451HO CL ≥ Kerbel = ES Paulina (Table IV.3).

In 2010, more symptoms from lower and medium strata (1-3) reached the stem ($P < 0.0001$). In 2011, the proportion of leaf-to-stem passage was significantly ($P < 0.0001$) higher in strata 2 and 3 as compared with strata 1, 4 and 5. For each stratum, the proportion of leaf-to-stem passage was significantly higher in situations with high density for both years. The difference between densities in the proportion of leaf-to-stem passage was particularly pronounced for stratum 5 in 2011.

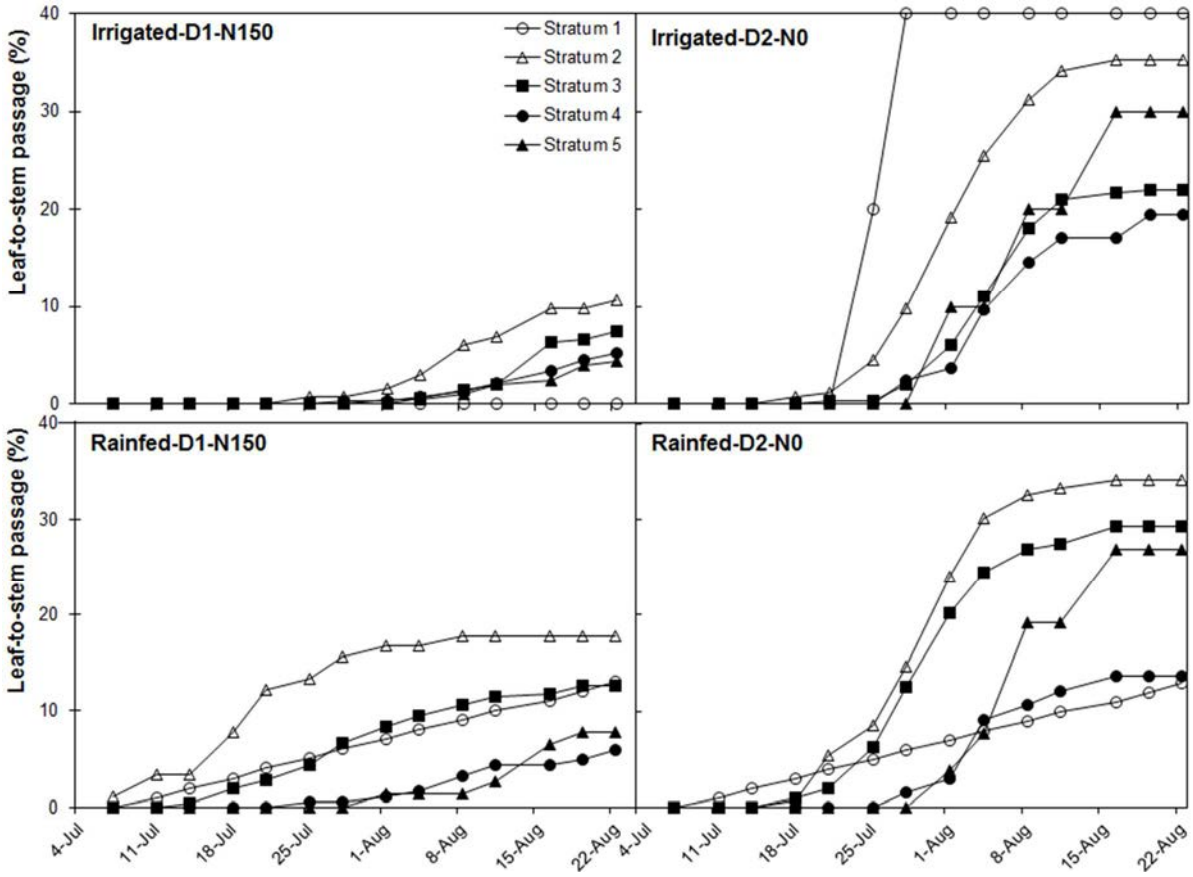


Figure IV. 10. Dynamics of leaf-to-stem passage in 2011 for the four crop management systems (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}). Percentages were calculated according to the final number of infected leaves.

Factors affecting leaf-to-stem passage

The number of leaf symptoms monitored in 2010 was not sufficient to conduct a detailed analysis of disease progress. This analysis was only performed on 2011 data.

In order to compare disease progress rates from leaf margin to the petiole among the crop management systems, two cohorts of leaf infection symptoms were selected and analysed separately in 2011. The first one corresponded to leaf symptoms detected on 7 July, the second one to symptoms detected on 28 July. For the first cohort, the crop N status did not significantly change the progression rate but mycelium tended to grow faster on plants with high NNI: 8 mm day^{-1} *vs.* 6 mm day^{-1}. The rate of necrosis progress of the second cohort was significantly affected by plant N status ($P < 0.01$). The mycelium grew faster on high-NNI plants: 11 mm day^{-1} *vs.* 9 mm day^{-1}. Because of the small number of symptoms (in the same conditions), the effects of cultivars could not be tested statistically.

In 2011, plant architecture differed between the two crop management systems. Indeed, when high density was coupled with no N-fertilisation, lamina were significantly ($P <$

0.0001) smaller and petioles were shorter than in the other situation. The difference in lamina length increased with leaf node and was particularly obvious in stratum 5: 91 mm in D2-N0 *vs*. 191 mm in D1-N150. Lamina length was significantly smaller in high density ($P < 0.0001$) and without N fertilisation ($P < 0.0001$) in 2010 too. A positive correlation was observed between the distance covered by the fungus from the point of infection, which is close to lamina + petiole length, and the duration for leaf-to-stem passage: when the distance is 300 mm, it takes about 25 days for the fungus to reach the stem (Figure IV.11).

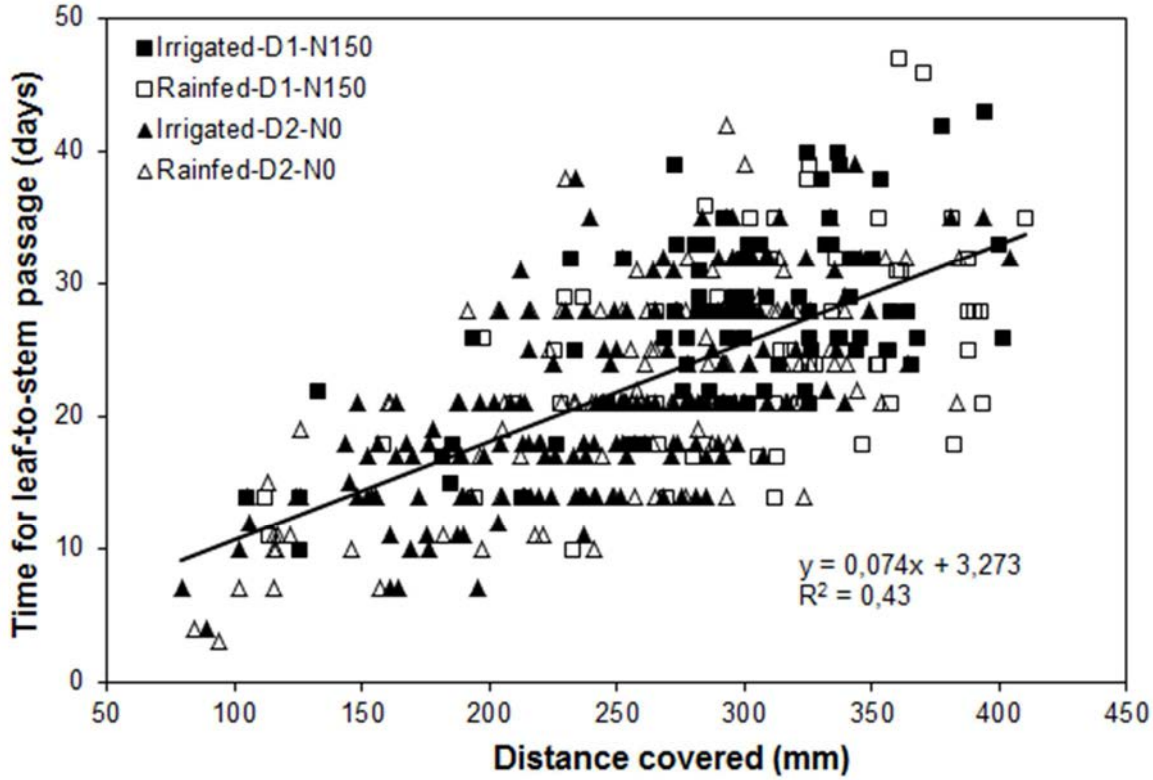


Figure IV. 11. Duration for leaf-to-stem passage (days) as a function of the distance covered by the fungus from the point of infection until the stem (mm). D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}.

In 2010 and 2011, direct interactions between *P. helianthi* and *P. macdonaldii* were observed in the field. It corresponds to 3% and 8% of the infected leaves in 2010 and 2011 respectively. In 2010, water regimes had no significant effect on the proportion of leaf symptoms blocked by phoma. In 2011, during vegetative growth, more phomopsis leaf symptoms were blocked by phoma before reaching the stem in the rainfed plots ($P < 0.05$). After flowering, more symptoms were blocked by phoma in irrigated plots ($P < 0.0001$). For both years, more symptoms were blocked in plants having the highest NNI values ($P < 0.0001$). In those situations, phoma black stem infections appeared early (around 16 and 29

June in 2011 and 2010, respectively) and symptoms had time to develop before the phomopsis reached the stem, leading to a lower proportion of leaf-to-stem passage. Interactions occurred mainly in strata 1-3 to due to the large number of infections of both fungi.
In 2011, cultivars with a higher proportion of phomopsis stem spots (NK Ferti, Sikllos CL and LG5451HO CL) were infected early (during vegetative stages), with many infections located in strata 2 and 3. Moreover, cv. ES Paulina and cv. Kerbel had larger numbers of phoma symptoms appearing early (99% of infected leaf nodes in strata 1 and 2), which could have impeded the leaf-to-stem passage of phomopsis, especially in lower strata.

In 2011, senescence could have limited the leaf-to-stem passage for the first wave of infection, as leaves infected by this cohort were mostly located in strata 1 and 2 which first became senescent (cf. Section 3.4.3). At flowering, senescence rate was significantly higher in rainfed plots ($P < 0.05$). The difference in senescence rates between the two water regimes increased with time ($P < 0.0001$ at the beginning of August). Senescence rate reached 65% in irrigated plots and 90% in rainfed ones at the end of August (Figure IV.9).
At flowering, senescence rate was significantly higher in low density coupled with high N fertilisation ($P < 0.0001$), no doubt due to phoma attacks accelerating senescence. The difference remained the same until the end of July, but at the beginning of August, no more differences appeared between N fertilisation levels. As the delay between leaf infection and stem symptom appearance was around 20 days in D2-N0 and 30 days in D1-N150, in relation with leaf size, senescence could have limited the leaf-to-stem passage in D1-N150, especially for the first wave of infections, as a significantly higher proportion of leaf symptoms did not reach the stem owing to senescence in strata 1 ($P < 0.005$) and 2 ($P < 0.0005$).

Considering all crop management systems in 2011, almost half of infected leaves did not lead to stem symptoms, due to leaf senescence (Figure IV.12). In D1-N150, interactions with *P. macdonaldii* blocked twice as many phomopsis symptoms as in D2-N0. Moreover, more symptoms were still on leaves in D1-N150 than in D2-N0 due to the greater distance to cover to reach the stem. These two phenomena led to a higher percentage of leaf-to-stem passage (30% of infected leaves) observed in D2-N0 for both water regimes.

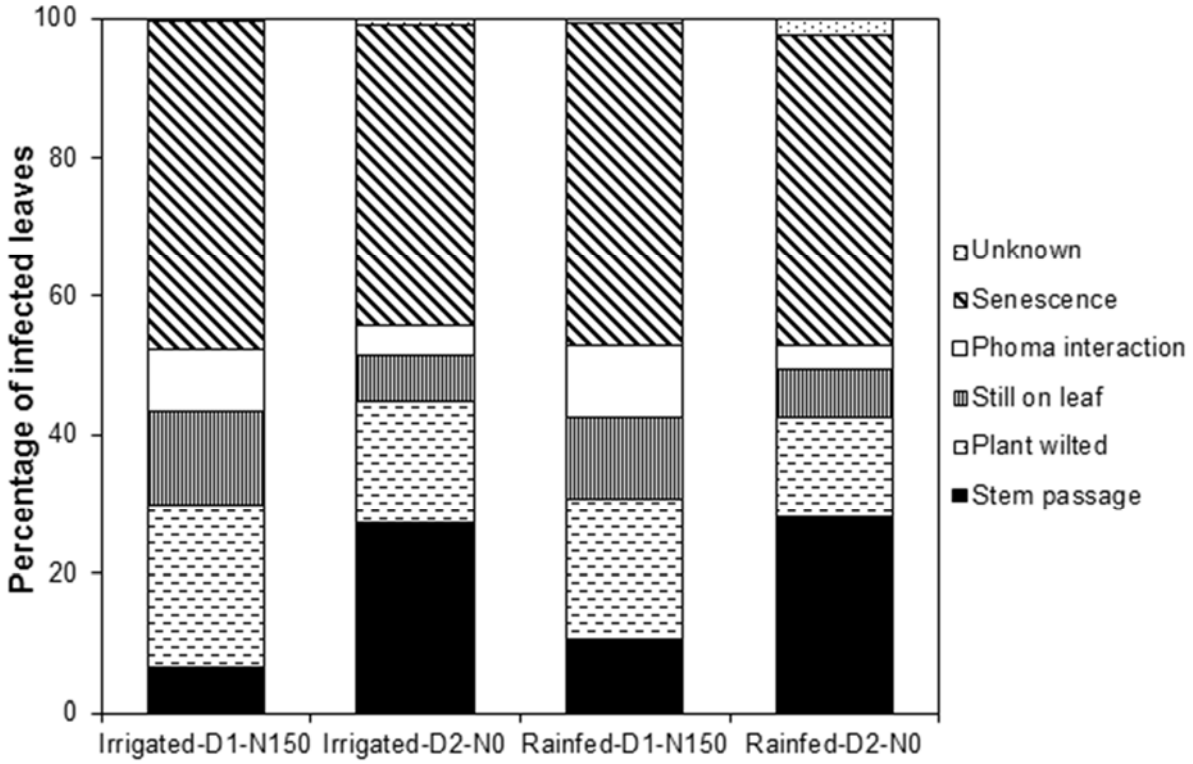


Figure IV. 12. Fate of leaf symptoms in 2011 for the four crop management systems expressed in percentage of infected leaves on August 22 (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}).

Final proportion of wilted plants

In 2010, 6% of plants developed girdling stem spots and finally wilted before 27 August. This fraction ranged from 0.4 to 11% among crop management systems (Table IV.4). In 2011, 23% of plants developed girdling stem spots and finally wilted before 20 August. This fraction ranged from 5 to 43% among crop management systems and from 3 to 42% among cultivars. Last observations showed that higher proportions of wilted plants due to phomopsis infection occurred in irrigated plots for both years ($P < 0.001$) and on crops with high density ($P < 0.005$ and $P < 0.0001$ in 2010 and 2011, respectively). For the same genotype, the number of days between the leaf-to-stem passage and the development of a girdling stem spot tended to decrease with increasing plant density due to thinner stem diameter (22 days *vs.* 14 days for cv. Sikllos CL in rainfed plots). In 2010, N fertilisation level had no significant effect, but the fraction of plants with a girdling stem spot tended to be higher in N deficient conditions. In 2011, cultivar ranking ($P < 0.0001$) was the same as for total stem symptoms with cv. Sikllos CL and cv. NK Ferti being the most damaged.

The economic injury threshold used for spraying against phomopsis has been estimated at 10% of plants with girdling stem spots (0.1-0.3 t ha-1 of grain loss depending on fungicide cost and grain-selling price; Jouffret, 2005c). Using this threshold, fungicide use would not

have been cost-effective in 2010 whatever the crop management option, due to the low disease pressure. In 2011, under high inoculum pressure, fungicide use was not profitable for the most tolerant cultivar (cv. ES Paulina). For the other cultivars, treatments would have been profitable only with high plant density. Using a susceptible cultivar such as cv. Sikllos CL, fungicide would also have been recommended in IRR0-D1-N150 because of the early canopy closure in this situation.

Table IV. 4. Percentage of wilted plants according to crop management systems in 2010 and 2011 (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}; N0 = 0 kg N ha^{-1}, N150 = 150 kg N ha^{-1}). (-) combinations of factors not tested.

	Irrigated				Rainfed			
	N0		N150		N0		N150	
	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
cv. Melody (year 2010)	6	11	5	6	0	7	2	3
Mean 2011	-	43	5	-	-	31	12	-
cv. ES Paulina (year 2011)	-	7	3	-	-	0	0	-
cv. Kerbel (year 2011)	-	13	0	-	-	17	3	-
cv. LG5451HO CL (year 2011)	-	57	0	-	-	27	7	-
cv. NK Ferti (year 2011)	-	83	13	-	-	53	3	-
cv. Sikllos CL (year 2011)	-	57	7	-	-	57	47	-

1.1.4 Discussion

This detailed study provided useful information about the complex effects of crop management on phomopsis injury as affected by weather conditions. The results provided information not only about the disease incidence on stems, as other studies did previously (e.g. Debaeke et al., 2003) but also on leaf infections and their dynamics throughout the season.

The breakdown realised for each infection cohort simplified the characterisation of the impact of crop management on the components of severity, which were elaborated successively during the growing season. Table IV.5 gives an overview of the effects of irrigation, N fertilisation, plant density and variety on these three disease components. The effects of agronomic and genetic factors on processes leading to girdling symptoms per plant will now be discussed according to this breakdown.

Table IV. 5. Effects of crop management on the three components of phomopsis injury (+: factor promoting the disease; -: factor impeding the disease).

	Leaf symptoms (number)	Leaf-to-Stem passage (% leaf symptoms)	Girdling symptoms (% stem symptoms)
High plant density	early symptoms → + microclimate late symptoms → green - Leaf Area (LA)	small leaves + early senescence -	thin stems +
High Nitrogen	microclimate + green LA +	big leaves - more phoma - high N tissue content +	thick stems -
Irrigation	microclimate + green LA +	delayed senescence +	
Susceptible genotype	low tissue resistance + (leaf)	low tissue resistance + (stem)	low tissue + resistance (stem)

In this study, water regime (irrigation) had a limited direct impact on disease incidence. When water deficit is pronounced in spring, as in 2010, irrigation does not provide sufficient humidity long enough to substantially increase the number of leaf infections. Irrigation of 25-30 mm during a warm day (Tmax = 35°C) or a cool day (Tmax = 22°C) increased RH40 from 42% to 67% (warm) and from 86% to 95% (cool) with no differences between rainfed and irrigated plots after 12 h. The number of hours with RH ≥ 85% during 36 h following irrigation increased by 2 h (warm) and 4 h (cool). In addition, in the absence of sunflower stalk residues within the field, as it is the case in commercial fields where sunflower-wheat is the most common rotation, ascospores are carried by rain and wind from adjacent fields and by long-distance transport. Therefore, irrigation has no direct influence on spore splashing from stalk residues in farmers' fields. However, when infected stalks are placed between the rows in reinforced infection protocols, irrigation may be responsible for some splashing and additional infection events. The importance of direct effect from irrigation finally depends on the presence of inoculum within the field and on the amount and timing of irrigation.

However, as irrigation in summer crops increases soil water moisture, plant transpiration, LAI and leaf area duration, it also indirectly favours the maintenance of high relative humidity in the bottom of the canopy several days after application. This makes leaf infection possible when wet sequences are encountered (Debaeke et al., 2000; Debaeke and Moinard, 2010). In addition, increasing plant green leaf area results in more microsites available for spore deposition and leaf infection. Moreover, the lower rate of senescence in irrigated plots favours the success of leaf-to-petiole passage, hence increasing the fraction of girdling stems (Figure IV.9).

The effect of N fertilisation on the incidence of leaves and stems attacked by *D. helianthi* was not always so clear-cut in previous studies (Debaeke et al., 2003; Debaeke and Moinard, 2010). N deficiency during early stages (low soil mineral N, low N fertilisation rate, or low soil water content) may be critical in terms of LAI and the resulting microclimate within the canopy. Our results clearly indicate that slow canopy closure occurring with the lowest amounts of N resulted in RH40 close to RHair values. Hence, under dry conditions, the canopy does not act as a buffer to limit soil evaporation and maintain sufficient humidity within the canopy. On the other hand, high N availability favoured high RH values in the bottom of the canopy hence increasing the infection rate before anthesis.

However, under wet conditions and semi-natural infection, the presence of infected stalks between the rows is a permanent source of inoculum. Since ascospores are splash dispersed by rain or irrigation, the spore dispersal can be assumed to be more efficient in more open canopies resulting from N deficiency, leading to more leaf infections.

High plant N availability has also a direct effect on phomopsis development: plants with big lamina increased the probability of contact with spores deposited aerially. However, big leaves mean greater distances to cover for the necrosis to reach the stem and a lower probability of forming a stem spot (Figure IV.11).

For these reasons the effect of N fertilisation on the proportion of stems attacked by the fungus may vary with weather conditions and inoculum pressure.

In addition, increasing N rate generally results in a higher proportion of sunflower plants infected by *P. macdonaldii* (Debaeke and Pérès, 2003; Seassau et al., 2010). *Phoma* and *Phomopsis* are competing for axil infection: a lower proportion of stems with phomopsis lesions can occur when phoma black stem is not controlled (Pinochet and Pérès, 1998). As *Phoma* infection predominantly starts from the petiole groove (Délos et al., 2000b), this pathogen may hinder the progression of *Phomopsis* towards the axil through rapid petiole and leaf senescence. Quantifying this phenomenon is quite complex due to the difficulty in obtaining healthy plants to compare the senescence rate in the absence of phoma black stem infections. Moreover, *Phoma* infection can directly halt the progression of *Phomopsis*. The importance of this regulation was quantified for the first time in this study at 3% and 8% of the infected leaves in 2010 and 2011 respectively. No study has been made until now to explain the cause of this direct interaction between the two fungi: vessel obstruction by *Phoma* or competition for nutrients are possible explanations but other pathways should be

explored. As *Phoma* is clearly stimulated by nitrogen, lower proportions of stems infected by *Phomopsis* are expected in highly N fertilised crops.
As phoma black stem is less detrimental to yield accumulation than phomopsis stem canker, the use of *Phoma* as a biological agent to control phomopsis injury in sunflower could be explored. However, *Phoma* can also develop at the stem base, often leading to premature ripening, which is almost as damaging as phomopsis girdling spots (Seassau et al., 2010).

In the absence of severe water deficit, high plant density has an indirect effect on disease development. Canopy closure is more rapid in dense stands, creating conditions of higher relative humidity as early as the bud appearance stage (Stanojevic, 1985), which makes leaf infection more likely as already observed in other studies, and similarly to high N availability (Debaeke et al., 2003; Debaeke and Moinard, 2010). High relative humidity early in the season results in early infections that lead to a higher proportion of stems infected and finally a higher proportion of stems with girdling lesions. The degree of canopy closure resulting from plant density can lead to contrasted situations according to weather conditions and inoculum pressure as already observed previously (Debaeke et al., 2003). If the season is wet and the inoculum pressure high, more leaf infections are observed in open canopies, probably due to higher spore dispersal among leaves. Crop density has a smaller influence during later attacks because the differences in LAI and microclimatic conditions between high and low densities decrease with time (Stanojevic, 1985; Debaeke et al., 2000). High plant density has also a direct effect on the canopy structure. Dense crops have small leaves and thin stems which are more rapidly destroyed by *Phomopsis*, causing plant wilting and stem breakage as suggested in Debaeke *et al.* (2003). In addition, leaf senescence is accelerated in dense stands because light penetration is reduced deep into the canopy and because soil water depletion is faster under rainfed management. Leaf senescence hinders the progression of the mycelium as observed in this study, limiting the proportion of stems with girdling lesions.

In this study, the effect of genotype was predominant over crop management, given the wide range of resistance levels among commercial hybrids. But among the genotypes, the slight differences in crop architecture were not responsible for the difference in phomopsis attacks (data not shown), crop management having a more determinant effect on crop canopy and microclimate. A susceptible genotype has more leaves infected, earlier in the season (if weather conditions are favourable). This results in more stem-to-petiole passage and gives a

higher proportion of girdling symptoms (Table IV.3). Necrosis progression tends to be faster for susceptible cultivars, leading to a larger number of stem girdling symptoms. *Phomopsis* resistance mechanisms have been discussed by several authors: (i) a very early resistance mechanism through preventing the ascospores from penetrating the leaves (Bertrand and Tourvieille de Labrouhe, 1987); (ii) an additional resistance through differences in the progression rate of the parasite through the leaves (Vear et al., 1997) and (iii) a mechanism at the petiole-stem passage where the pathogen may be blocked by external piles of the cortex (Bertrand and Tourvieille de Labrouhe, 1987). In this study, the fungal growth rate varied between 8 and 11 mm day^{-1} with the cultivar susceptibility. This was in accordance with growth rates reported by Degener et al. (1999).

The time span required by *Phomopsis* to reach the petiole is influenced by the growth rate, the infection location and the leaf length. For the latter trait, we found highly significant genetic variation among the five cultivars (data not shown) but no correlation was found between the proportion of leaf-to-stem passage and the distance covered by the fungus between cultivars having the same susceptibility score. This suggests that interactions exist with other cultivar characteristics such as fungus progression rate and leaf senescence rate. Even if leaf length is not a resistance factor *per se*, it can influence the cultivar susceptibility to phomopsis because the longer the leaf, the longer it takes the fungus to grow through the petiole (Figure IV.11) and the more it exposes it to the risk of lethal high temperatures (Délos et al., 1995).

Longer leaves are most certainly an asset to contain the disease when the infection hyphae penetrate through hydathodes at the leaf margin. However, this trait is less important when hyphae penetrate directly through cell walls into lamina tissue thanks to appressoria, as was observed under conditions highly favourable to leaf infection, as in 2011.

This study confirmed the reliability of Asphodel for predicting the main periods of leaf infection when inoculum is non-limiting. The periods of spore release simulated by the model were satisfactorily related to the observations from the dynamic volumetric trap system. Leaf disease assessments were quite well correlated to the predictions of Asphodel. The absence of leaf infection despite the favourable conditions, indicated by Asphodel at the beginning of June 2010, could be due to the late placement of the sunflower stalk fragments from infected fields (June, 16). Without reinforced inoculum, the concentration of spores in the air could have been limiting.

This study shows that severity of phomopsis stem canker could not be explained purely in terms of crop management options but that interactions with environmental variables also need to be considered. Two periods should be considered to study the effect of crop management on phomopsis incidence and severity. During the vegetative stage, when canopy closure is incomplete, weather conditions are often too restrictive for numerous leaf infection events. Therefore high relative humidity in the lower part of the canopy, associated with early canopy closure, is responsible for more leaves being attacked and more spots per leaf in the lower layers of plants with high N fertilisation and high plant density. During grain filling, crop microclimate is no longer the main limiting factor for leaf infection. The area of green leaf tissue available for infection explains better the higher number of leaf spots in the middle layers of the canopy.

The effects of crop management were analysed using variables characterising N crop status, canopy development and microclimate. The elaboration of final stem injury was broken down into three components to which crop and microclimate variables were related. This approach, derived from agronomic diagnosis, had not been applied to the understanding of disease epidemics till now. Using this approach we concluded that: (i) the number of leaf symptoms depends on microclimate, especially during vegetative growth, but after flowering, green leaf tissues potentially available for leaf infections could be an additional restricting variable; (ii) the leaf-to-stem passage is determined by leaf length, senescence rate and *Phoma macdonaldii* incidence; (iii) the proportion of girdling symptoms on stems is related to stem diameter. These findings are the basis for the development of a model that will predict the severity of phomopsis stem canker as a function of soil, weather and cropping practices. The model will help us to design crop management systems for crops less susceptible to the disease.

1.2 Influence du stade phénologique sur le développement du phomopsis

Afin de déterminer l'influence du stade phénologique sur la vitesse de progression du phomopsis dans la plante et la mise en place de la tache encerclante indépendamment du microclimat (vérification de l'hypothèse H2), une expérimentation complémentaire a été conduite à la serre d'Auzeville (SAuz10_pheno, Tableau III. 2) en 2010 sur deux génotypes contrastés : Bollil (résistant au phomopsis) et Alhaja (sensible au phomopsis). On se reportera à la section M & M (pages 71-80) pour les détails expérimentaux.

Cette expérimentation permet également de compléter les connaissances liées à l'hypothèse H3 sur la vitesse de progression du phomopsis en lien avec le niveau de résistance de la plante et son stade phénologique.

La vitesse moyenne de progression de la nécrose sur feuille est calculée en degré-jours base 12 °C (Kovics et Zsombik, 2001). Les nécroses progressent significativement plus vite ($P < 0.001$) sur la variété sensible Alhaja (1.07 mm $°Cj^{-1}$) que chez la variété résistante Bollil (0.88 mm $°Cj^{-1}$), confirmant les différences de vitesse de progression liée à la sensibilité intrinsèque de la variété.

Le stade phénologique de la plante ne semble pas avoir d'influence sur la vitesse de développement de l'agent pathogène et ce indépendamment du microclimat (Figure IV**.** 13). A hauteur de feuille équivalente, l'effet stade phénologique n'est pas significatif.

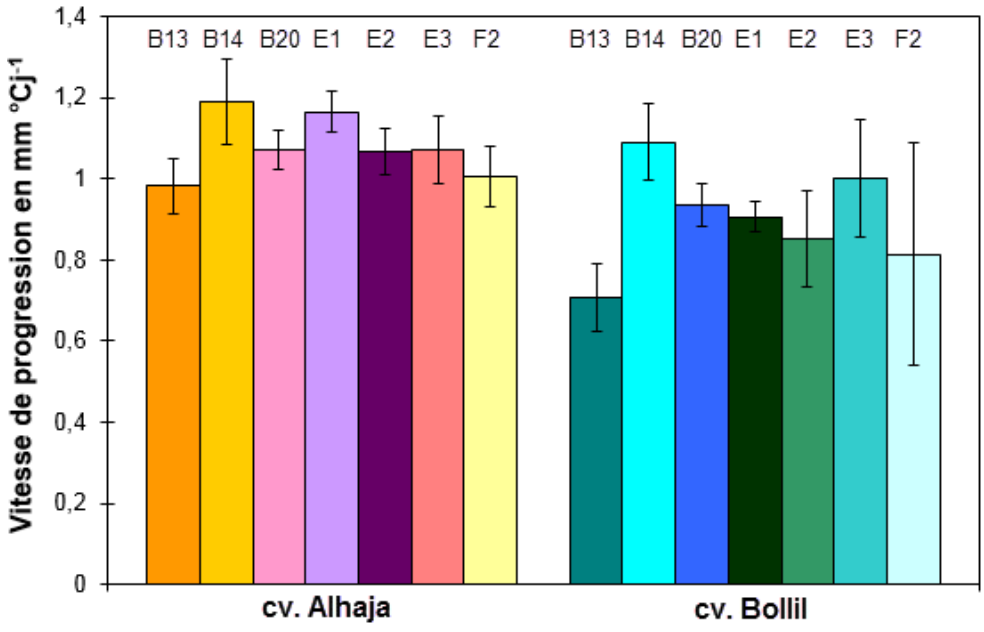


Figure IV. 13. Vitesse moyenne de progression des nécroses de phomopsis sur la nervure centrale du limbe pour deux variétés contrastées, Bollil (R) et Alhaja (S), en fonction du stade phénologique de la plante au moment de l'infection.

Des mesures SPAD ont été réalisées 2 jours après l'infection pour mettre en relation les différences de vitesse de progression de la nécrose avec d'éventuelles différences de teneur en chlorophylle. Or, les teneurs en chlorophylle des feuilles des deux variétés ne sont pas significativement différentes. Neuf jours après l'infection, la teneur en chlorophylle des feuilles reste identique entre les deux variétés. Il apparait des différences significatives entre les stades phénologiques à variété identique et strates comparables. Cependant, il n'existe pas de corrélation entre ces différences de teneur en chlorophylle des feuilles et la vitesse de progression des nécroses mesurées sur ces limbes suggérant l'absence d'effet de la teneur en azote sur la vitesse de progression du phomopsis dans la plante.

1.3 Conséquences pour le modèle « phomopsis »

- En situations climatiques limitantes, le microclimat (essentiellement l'humidité relative) détermine l'occurrence et la localisation de l'infection. Il interagit avec la surface foliaire verte lorsque la sénescence débute.
- Le nombre de feuilles infectées dépend avant tout de la sensibilité du génotype : le nombre de feuilles infectées diminuant d'un facteur 4 entre une variété sensible au phomopsis et une variété classée TPS.
- La vitesse de progression du phomopsis est fonction du génotype : 1.07 mm $°Cj^{-1}$ pour un génotype sensible contre 0.88 mm $°Cj^{-1}$ pour un génotype résistant. Ces vitesses sont liées à un effet résistance variétale intrinsèque à la plante. La vitesse de progression est indépendante du stade phénologique de la plante. Au champ, elle varie de 0.99 mm $°Cj^{-1}$ sur les plantes carencées en azote à 1.26 mm $°Cj^{-1}$ sur les plantes bien alimentées en azote. Or, en serre, le statut azoté de la feuille (approximé par la teneur en chlorophylle) n'influe pas sur la vitesse de progression du champignon dans la plante, ce qui laisse à penser qu'au champ, cet effet est lié au microclimat créé dans ces conditions de conduite de culture. On retrouve les mêmes ordres de grandeur en serre que dans l'expérimentation au champ.
- Le passage sur tige ne dépend que de la distance à parcourir par le symptôme et des évènements venant interférer :
  - Température létale alors que le champignon n'a pas atteint le pétiole ;
  - Sénescence de la feuille alors que le champignon n'a pas atteint le pétiole ;
  - Présence de phoma implanté depuis 10 jours.

- La vitesse d'encerclement de la tige est fonction du génotype : 0.90 mm j^{-1} pour un génotype résistant contre 1.56 mm j^{-1} pour un génotype sensible. Le diamètre de tige détermine le temps que le symptôme mettra à encercler la tige : ainsi, 8 mm de diamètre de tige supplémentaire augmente la durée d'encerclement de 3 à 6 jours.

2 Phoma

Le phoma a été étudié dans les mêmes conditions que le phomopsis (expérimentation commune au champ ; Desanlis et al., 2013). Les hypothèses testées dans cette partie sont :

H1 : le microclimat (et en particulier le niveau d'humidité relative pour le phomopsis et la durée de permanence d'eau libre dans les augets pour le phoma) détermine la réussite de l'infection et sa localisation au sein de la plante;

H3 : la vitesse de progression des agents pathogènes dépend de la température et de l'humidité relative dans le couvert, du statut azoté de la plante et du niveau de résistance de la plante. La vitesse de progression pourrait également dépendre du stade phénologique de la plante (Cette dernière partie ne pourra être vérifiée dans ce dispositif compte-tenu de la date unique de semis).

H5 : lorsque le Phoma encercle le pétiole, il empêche le Phomopsis d'atteindre la tige.

Les résultats sur le phoma ont été rédigés sous la forme d'une publication qui sera soumise prochainement.

2.1 Influence of sunflower canopy on *Phoma macdonaldii* as a function of cropping practices: analysis and modelling

2.1.1 Introduction

Black stem disease and premature ripening of sunflower (*Helianthus annuus* L.) are caused by the fungus *Phoma macdonaldii* Boerema (teleomorph *Leptosphaeria lindquistii*) (McDonald, 1964). Since 1990, the disease has been expanding steadily and is now recognized as one of the most serious and widespread diseases of sunflower in France (Penaud and Pérès, 1995). This worldwide fungus has also been reported in many regions of sunflower production such as Western and Eastern Europe (Maric and Schneider, 1979; Penaud and Pérès, 1995), China (Bai et al., 2012), Southern Asia (Weeraratne and Priyantha,

2003), Argentina (Velazquez and Formento, 2000), USA (Donald et al., 1987) and Australia (Miric et al., 1999) among others.

Generally, *Phoma* infects the lower leaves of sunflower, either as wind or rain-splashed spores (Maric and Schneider, 1979; Penaud and Pérès, 1995). The disease is mainly characterized by the appearance of black spots on the stem around the petiole insertion point. At the insertion point, the petiole expands and widens forming a depression called petiole trough, which acts as a receptacle for free water. With a severe attack, the spots girdle the stem and through coalescence of several lesions, the whole stem becomes black. Lesions at the foliar nodes are not particularly damaging in terms of yield loss as compared with infection at the stem base that can lead to early plant death (Bordat et al., 2011). In France, the impact of premature ripening on yield has not been clearly assessed, but yield losses up to 1.3 t ha^{-1} have been reported (Pérès et al., 2000). It is generally admitted that phoma black stem cause 10–30% yield loss (Larfeil et al., 2002) as it is difficult to separate the stem and the stem base attacks.

In France, the use of short rotations (mainly sunflower-wheat) and reduced tillage on wheat crops could have increased the inoculum by leaving infected sunflower stalk residues on the soil surface (Poisson-Bamme and Pérès, 2000). Disease control mainly relies on crop management through a limitation of N-fertilisation (Velazquez and Formento, 2000; Debaeke and Pérès, 2003; Seassau et al., 2010). Although several fungicides are registered against the disease (difenoconazole + azoxystrobine, boscalid + dimoxystrobine as the main active ingredients), their control and economic efficiencies are uncertain under French conditions. Currently, there is no systematic screening nor official scoring among cultivars for genetic resistance to *Phoma macdonaldii*.

Using literature reviewed on pages 25-39 (cf. section II. 2.2), we could propose a simple conceptual model of plant infection by *Phoma* (Penaud and Pérès, 1995; Debaeke and Pérès, 2003). The actual number of spots infected by *Phoma* on a given plant should depend on: (i) the number of potential infection sites, (ii) the pollution occurrence of these sites by ascospores of phoma and (iii) the infection rate which depends on microclimate and plant growth (Figure IV. 14).

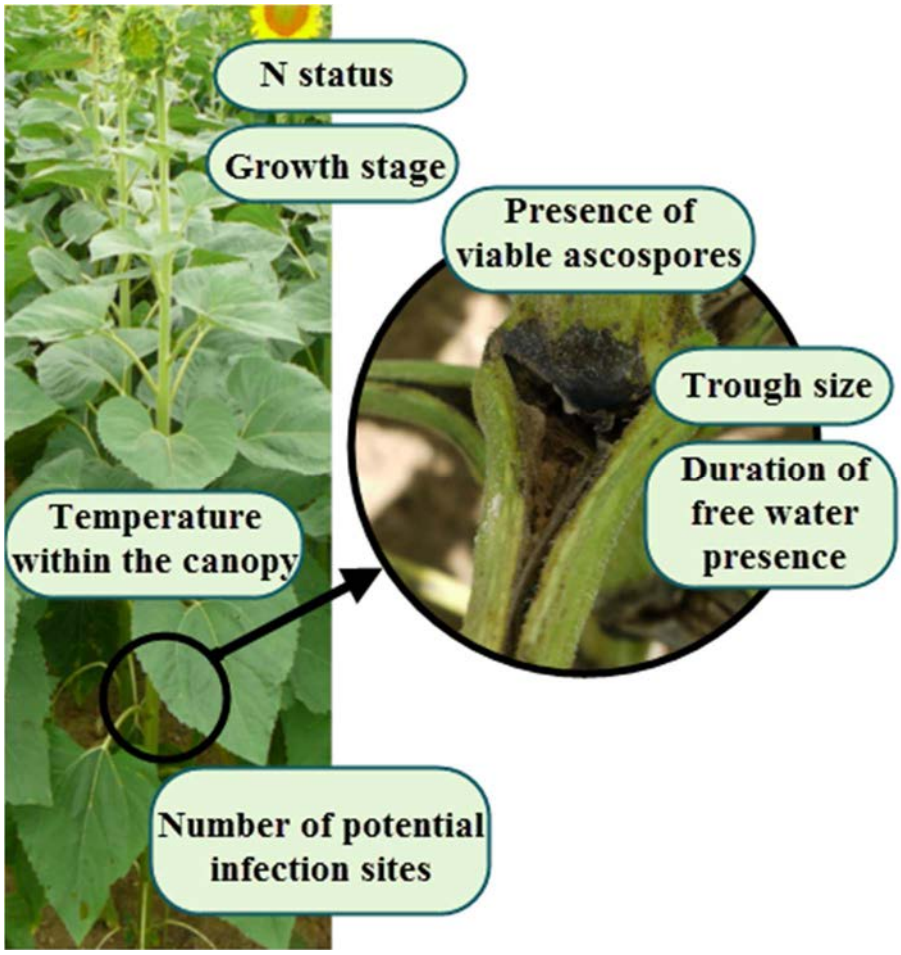


Figure IV. 14. Variables at plant or organ scale which determine phoma infection success

Stem infection defined as the number of spots per plant depends on the number of petiole troughs available for infection. The maximal number of petiole troughs corresponds to the maximal number of leaves per plant. An infection occurs only if viable ascospores are in contact with a petiole trough. The infection rate depends on the duration of free water presence in the petiole trough; free water duration increases with higher quantity of stored water in trough and higher relative humidity in the canopy. The trough size depends on individual plant growth: it is maximal for plants grown at low density with plentiful N. The degree of canopy development was summarised by an integrative variable: LAI at flowering. The infection success also depends on phenological stage (crop receptivity), temperature (fungus activity), crop N status (fungus growth) and the use of fungicide.

Therefore, a detailed study was conducted to analyse *Phoma macdonaldii* infection process in contrasting sunflower canopies differing in genotypic susceptibility, plant density, nitrogen status, and water availability. Data on inoculum, plant injury, microclimate and canopy development were assessed together and related. The objective was to determine

step-by-step by experimentation and simulation: (i) how weather conditions influence primary inoculum production, (ii) how these environmental and agronomic conditions can affect phoma infection and its progression. In this study, the objectives of modelling phoma epidemics were twofolds: first, modelling the effect of cropping practices on the sunflower status and the associated microclimate to help design integrated crop management systems limiting the risk of phoma injuries; second, capturing through modelling the knowledge produced by the experiments.

2.1.2 Materials and methods

2.1.2.1 Experimental design and crop management systems

In 2010 and 2011, a sunflower crop was grown under semi-natural infection at INRA experimental station in Auzeville, near Toulouse (Haute-Garonne, SW France, 43°36N, 1°26E) on a deep silty-clay soil (24 to 34% clay in the 0-30 cm layer). This experimentation was also used to analyse the plant infection by *Phomopsis helianthi* and common experimental details have yet been reported in a companion paper (Desanlis et al., 2013).

In order to ensure sufficient inoculum for infections in 2010, fragments of sunflower stalks from infected fields were placed between the crop rows according to the method described by Viguié et al. (2000) in order to reinforce the natural phoma inoculum. In the semi-natural protocol of infection, two stalks per crop row were introduced on 2 July 2010 and removed on 30 July. In 2011, no stalk fragments were introduced; infections were solely from natural phoma inoculum which was assumed to be sufficiently abundant in this region.

In 2010, the experiment was set up as a three-factor split-split-plot design with three replicates in blocks of 90 m² each, with water regime (irrigated or not) applied to the main plots, which were split into two sub-plots with two levels of nitrogen fertilisation, which in turn were split into two levels of plant density. Cultivar Melody (known as susceptible to *Phoma macdonaldii* attacks on stem, Mestries, pers. com) was sown on 19 April and thinned to two plant densities (D1 = 3.5 plants m^{-2}, D2 = 7 plants m^{-2}) with nitrogen fertilisation (N150 = 150 kg N ha^{-1}: 75 N at sowing + 75 N on 21 June) or without (N0 = 0 kg N ha^{-1}). Two irrigation regimes were applied (IRR0: no irrigation except to promote plant growth and leaf infection; IRR1: 21 mm on 8 July + 28 mm on 21 July; Figure IV. 15a). A parallel experiment was conducted without the deposit of infected stalks as control. A complete fungicide protection against phoma black stem (*Phoma macdonaldii*) and phomopsis stem

canker (*Phomopsis helianthi*) was applied on 16 June and 22 June with Dithane Neotec (mancozeb) at 2 kg/ha and Corbel (fenpropimorphe) at 0.8 l/ha.

In 2011, the number of experimental modalities was reduced. The field experiment was set up as a three-factor split-split-plot design with three replicates, with irrigation or not as the main plots, each split into two plots with confounded treatments (D1-N150: 150 kg N ha^{-1}, 3.5 plants m^{-2}; D2-N0: no N-fertilisation, 7 plants m^{-2}). These sub-plots were again split into five cultivars, with reinforced inoculum. The five cultivars, of the same earliness (cv. Sikllos CL; cv. Kerbel; cv. LG5451HO CL; cv. NK Ferti; cv. ES Paulina) were sown on 8 April. Plants were thinned to two densities and fertilised with nitrogen (150 kg N ha^{-1}: 75 N on 19 May + 75 N on 6 June) on the D1-N150 plots. Two irrigation regimes were applied (IRR0: no irrigation except for promoting plant growth and leaf infection; IRR1: 33 mm on 7 July; Figure IV. 15b).

Prior to sowing, soil core samples were collected to 120 cm depth for analysis of mineral nitrogen. The rainfed sunflower was sown after a moderately irrigated sorghum with residual soil NO_3.N content of 46 kg ha^{-1} (2010) and 51 kg ha^{-1} (2011); the irrigated sunflower was sown after a fully irrigated maize with residual soil NO_3.N content of 70 kg ha^{-1} (2010) and 33 kg ha^{-1} (2011). In addition, soil was more compacted after irrigated maize. This resulted in slight differences in early crop growth between rainfed and irrigated treatments before the application of irrigation.

2.1.2.2 Environment, microclimate and canopy measurements

A weather station (CE-180, Cimel, France) was located at about 200 m from the experiments. Mean air temperature (Tair, °C) and air relative humidity (RHair, %) at 2 m high were recorded hourly from February, 1 to the end of the sunflower growing season. Minimum (Tmin,°C) and maximum air temperature (Tmax,°C), and precipitation (P, mm) were recorded daily.

Relative humidity (RH) and temperature (T) within the canopy were recorded from 18 June (2010) and 16 June (2011) to the end of August using Rotronic MP100A thermohygrometers (Campbell Scientific Ltd., Les Ulis, France). The sensors were placed in the middle of the inter-row (row width = 0.50 m) at 0.4 m (RH40, % and T40, °C), 0.8 m (RH80, % and T80, °C) and 1.2 m (RH120, % and T120, °C) above the ground. The sensor accuracy was 1.5% over the RH range 5-95%. Microclimatic variables were recorded every 15 min, compiled hourly and stored on Campbell CA10 data loggers. Only selected crop management treatments (8 in each year), resulting in a wide range of sunflower canopies, were equipped

with sensors (one complete replicate of all sub-sub-plots in 2010 and of all sub-sub-plots of cv. LG5451HO CL and cv. Kerbel only in 2011).

In 2010 and 2011, leaf area index (LAI) was measured regularly from star bud to the end of flowering using a LAI-2000 Plant Canopy Analyser (LI-COR Biosciences, Inc., Lincoln, NE). In 2010, Plant Leaf Area (PLA) was also determined on 12 plants per plot at flowering stage (Merrien, 1992) using the Pouzet and Bugat (1985) method based on the measurement of lamina length and width on two typical leaves per plant. In 2011, PLA was determined by measuring lamina length and width on all the green leaves of 5 plants per plot at flowering.

2.1.2.3 Plant measurement

For each treatment, the nitrogen nutrition status of the crop was quantified using the Nitrogen Nutrition Index (NNI) with NNI = Nm/(4.53 x $DM^{-0.42}$), according to Debaeke *et al*. (2012) for sunflower, where Nm is the total N concentration (%) measured for all the aerial parts and DM (t ha^{-1}) is the weight of aerial dry matter from 5 plants cut at the soil surface at early anthesis. A value of NNI ≥ 1 indicates a crop with non-limiting N supply; NNI = 1 is optimal N nutrition; below 1, the crop is N-deficient.

On each tagged plant, total leaf number was counted at flowering and the stem base diameter (mm) was measured at the end of flowering, when stem growth in diameter was complete, with a 150 mm Stainless Steel Digital Caliper. Plant height was measured at star bud stage and at flowering stage on each unit plot.

In 2011, the capacity of water retention of petiole trough was calculated by filling it with water though a micropipette until it overflows on 30 tagged plants per modality for all modalities from cv. Kerbel and cv. LG5451.

2.1.2.4 Primary inoculum assessment

Up to four spore samplers (Burkard Scientific Ltd, UK) were used within the field experiment to capture spores continuously for periods of seven days from May 29 to August 27 and from June 1 to August 9 in 2010 and 2011, respectively. *Leptosphaeria lindquistii* ascospores were counted on the tapes for each day under a light microscope (x 400) to estimate the daily atmospheric ascospore concentration (ascospores m^{-3}).

2.1.2.5 Disease assessment

The appearance of visible stem symptoms and their vertical distribution were scored on 30 tagged plants twice a week from 29 June to 27 August in 2010, and from 16 June to 8 August in 2011.

From June to July 2010, vertical stem necrosis length was measured at each assessment date. In August 2010 and in 2011, it was measured only once a week due to the low rate of disease progression.

Vertical distribution of symptoms was described by five layers: 1: leaf nodes 1-6 (bottom); 2: nodes 7-12; 3: nodes 13-18; 4: nodes 19-24; 5: nodes ≥ 25 (top). The position and fate of leaf node symptoms were related to canopy development, microclimatic conditions and the timing of leaf node infections.

Disease development was assessed by the area under disease progress curve (AUDPC) calculated according to the equation of Campbell and Madden (1990) from 29 June to 27 August and 16 June to 8 August in 2010 and 2011 respectively.

The AUDPC, integrating the percentage of infected leaf nodes per plant ($AUDPC_{ln}$), was:

$$AUDPC_{ln} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} \ (t_{i+1} - t_i) \quad (1)$$

where *n* is the number of disease scoring events, *y* the percentage of infected leaf nodes, and *t* the date of each scoring.

The AUDPC, integrating the percentage of plants with a stem base infection ($AUDPC_{sb}$), was:

$$AUDPC_{sb} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(z_i + z_{i+1})}{2} \ (t_{i+1} - t_i) \quad (2)$$

where *n* is the number of scoring events, z the percentage of plants with a stem base symptom, and *t* the date of each scoring.

Black stem incidence (0-1) was calculated as the number of infected nodes divided by the total number of leaf nodes per plant, in order to normalize this variable between genotypes.

2.1.2.6 Additional data set

An additional data set was used to evaluate the predictive quality of the model developed in this study. This additional experiment was set up at Montesquieu-Lauragais as a two-factor split-plot design with two replicates of 60 m² each, with water regime (irrigated (30 mm on 26 June) or not) applied to the main plots, which were split into two sub-plots with two levels of nitrogen fertilisation (N = 60 kg N ha^{-1} on 15 May; N0 = 0 kg N ha^{-1}). Cv. Sikllos CL was sown on 26 April and thinned to 6.7 plants/m². Infected stalks were introduced on

16 May. LAI and plant height were measured at star bud stage and flowering as described in sections 2.1.2.2 and 2.1.2.3. Stem symptoms were scored on 2 July, 26 July and 8 August on 30 plants per modality.

2.1.2.7 Data analysis

Statistical analyses were computed under the Statgraphics Centurion XV software (Rockville, MA, USA). Analysis of variance was performed using Kruskal-Wallis procedure due to non-homoscedasticity and/or non-normality of the data. Parameter optimisation and cross-validation were performed using the nlminb procedure of the R software (R Development Core Team, Vienna, Austria).

A cross-validation was performed using three data sets: 2010, 2011 and 2012. The basic principle of cross-validation consist in estimating parameters of the model on a given subset of a data set and evaluating the predictive quality of this model on the remaining data of the data set. In this study, parameter optimisation was performed three times on two of the three data sets. The predictive quality of the model was characterised on the remaining data set using three statistical criteria: bias, Root Mean Square Error of prediction (RMSEp), and model efficiency (EF). The criteria were calculated as:

$$Bias = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(Y_i - \hat{Y}_i);\ RMSEp = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(Y_i - \hat{Y}_i)^2};\ EF = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{N}(Y_i-\hat{Y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{N}(Y_i-\bar{Y})^2}$$

where Y_i is the measured value for situation *i*; $\hat{Y}_i$ is the corresponding value calculated by the model; N is the total number of situations; $\bar{Y}$ is the average of the Y_i values.

2.1.2.8 Modelling phoma leaf spot upward progression

The potential infection rate was reduced by several reduction factors (RF): microclimate (HR, T), plant growth (LAI) and fungicide treatment, to account for climatic and agronomic limitations to fungus development.

Infection function

$$Inf_{i+1} = Inf_i + \Delta_i$$

$$\Delta_i = \partial_{jk} r_0 RF_{HR_{i-inc_i}} RF_{T_{i-inc_i}} RF_{LAI} RF_{fungi_{i-inc_i}} \left\{ \frac{N_{i-inc_i} - N_{max} Inf_{i-inc_i}}{N_{max}} \right\}$$

with Inf_i: proportion of infections per plant at day *i*; ∂_{jk} : the Kronecker symbol with j=k if $\sum_{m=i-8}^{m=i} proj_m \geq 1$, else k ≠ j; r_0: maximum daily rate of infection; N_i: number of petiole

troughs at day *i*; Δ_i: proportion of new infections between day *i-1* and day *i;* RFreduction factor, all the reduction factors are described in the following section.

Leaf appearance

Leaf appearance was modelled as in Casadebaig et al. (2011) where the rate of leaf appearance depends on air temperature and two phyllochrons (PHY1, PHY2) as preformed lower leaves appear at a lower rate:

$$N_{i+1} = Teff_{i+1} \times \text{PHY1} + N_i \text{ with } N_1 = 0 \text{ if N} \leq 6;$$

$$\text{else } N_{i+1} = Teff_{i+1} \times \text{PHY2} + N_i$$

where N_i number of leaves at day *i*; PHY1 = 0.014 leaves °Cd^{-1} and PHY2 = 0.035 leaves °Cd^{-1} (Rey, 2003); $Teff_i$ daily mean air temperature using a base temperature of 4.8°C (Granier and Tardieu, 1998); day 1 correspond to plant emergence.

Ascospore projection

Significant ascospore projections occur when ascus maturation is higher than 50% and rainfall is higher than 0.5 mm (Délos et al., 1998). Similarly to the Asphodel model (for phomopsis), ascospore survival after projection was fixed at 9 days.

$$\text{proj}_i = \partial_{\text{jk}}$$

with j=k if Rainfall$_i$ > 0.5 and Ascus maturation > 50%, else k ≠ j.

Incubation

According to Fayzalla and Maric (1981), incubation time is 9 days at 25°C and 15 days at 20°C (in thermal time: 180°Cd and 225°Cd, 5°C temperature base, respectively). Penaud and Pérès (1995) and Maric et al. (1988) found longer incubation time for early phenological stage than later development stage (35 days at stage B2; 16-21 days at star bud stage and 10 days at flowering). So we represented the effect of the phenological stage on incubation duration using a linear function from emergence to flowering stage.

$Inc_i = \frac{I_{F1}-I_0}{TT_{F1}} TT_i + I_0$ if $TT_i \leq TT_{F1}$, I_{F1} otherwise

with I_0 initial incubation duration (360°Cd); I_{F1} incubation duration at flowering (180°Cd); TT_{F1} thermal date for floral initiation (900°Cd); TT_i cumulative thermal time since emergence (°Cd), calculated using mean air temperature since emergence with 5°C temperature base.

Temperature reduction factor

Spore germination is possible over a wide range of temperatures but optimum temperature depends on isolates. Spore germination and radial growth in Petri dishes are very low at 5°C (Roustaee et al., 2000b). A threshold of 5°C was therefore chosen for all thermal time calculations.

The temperature reduction factor function used was derived from the one proposed by Yin *et al.* (1995) as a nonlinear model for crop development:

$$RF_{T_i} = K\left(\frac{T_i - T_{min}}{T_0}\right)^{\alpha}\left(\frac{T_{max} - T_i}{T_0}\right)^{\beta} \text{ if } T_{min} \leq T_i \leq T_{max}, \quad (1)$$

0 otherwise,

where T_i is the mean temperature (°C) at day i, T_{min} the minimum, T_{max} the maximum temperature for infection, T_0 the temperature unit (1°C), α, β and K are dimensionless parameters.

Temperature parameters were derived from Acimovic (1965) and Roustaee *et al.* (2000b): T_{min}= 5°C, T_{max}= 35°C, T_{opt}=25°C (optimum temperature). For the function to reach its maximum at T_{opt}, the first order derivative of Eq. 1 must be zero at T_{opt}, which leads to:

$$T_{opt} = \frac{\alpha T_{max} + \beta T_{min}}{\alpha + \beta}$$

Hence, $\alpha = 2\beta$.

For the function to reach 1 as a maximum, substituting T_{opt} and α in Eq. 1 results in:

$K = \left(\frac{T_0}{T_{opt} - T_{min}}\right)^{2\beta}\left(\frac{T_0}{T_{mzx} - T_{opt}}\right)^{\beta}$ and $\beta = 0.33$ (the exact β value will be kept in the model).

Relative humidity reduction factor

The relative humidity reduction factor was defined as a function of the number of hours of relative humidity in the canopy higher than 90%:

$RF_{HR_i} = \frac{N_{RH_i} - N_{RH_0}}{N_{RH_{max}} - N_{RH_0}}$ if $N_{RH_i} > N_{RH_0}$, 0 otherwise;

with N_{RH_i}, the number of hours of relative humidity under the canopy upper than 90% at day i; N_{RH_0}, the minimal number of hours of relative humidity upper than 90% necessary for infection to be successful; $N_{RH_{max}}$, the maximal number of hours of relative humidity upper than 90% possible in a day (24).

LAI reduction factor

The LAI reduction factor was defined as:

$RF_{LAI} = \frac{LAI}{LAI_{min}}$ if $LAI \leq LAI_{min}$, 1 otherwise;

with LAI: the LAI value measured at flowering; LAI_{min}: the minimum LAI necessary to constitute an apparent 'full cover' canopy. The upper limit of 2.7 for LAI was reported by Ritchie (1972) to be an apparent threshold.

Fungicide reduction factor

The fungicide reduction factor was derived from the fungicide efficiency equation used in the SIPPOM model (Lo-Pelzer et al., 2010):

$RF_{fungi_i} = \left(\frac{i}{r_{fung}}\right)^2$ if $i_{fung} \leq i \leq i + r_{fung}$, 1 otherwise

with r_{fung}: the fungicide remanence (12 days); i_{fung}, the day of fungicide application.

2.1.3 Results

2.1.3.1 Effects of weather conditions on primary inoculum production

In 2010, pseudothecia were matured at the beginning of ascospore capture (29 May). In 2011, more than 80% of pseudothecia were matured on 23 May which means that significant ascospore projection could occur and provoke early plant contaminations.

In 2010, ascospore capture began in early June, with low emission despite regular and high rainfall (Figure IV. 15a). In July, eight periods with high ascospore concentration were recorded with a maximum of 107 ascospores m^{-3} day^{-1}. Mean ascospore concentration during this period was 13 ascospores m^{-3} day^{-1}. The ascospore capture occurred mostly one or two days after rainfall. During August, rainfall and ascospore projections were less intense.

In 2011, from 11 June to 4 August, 33 days with high ascospore concentration were recorded (> 10 ascospores m^{-3} day^{-1}) with a maximum of 125 ascospores m^{-3} on 23 June (Figure IV. 15b). Mean ascospore concentration was 27 ascospores m^{-3} day^{-1}. Low rainfall (≥ 0.5 mm) was sufficient to provoke significant ascospore emissions. Ascospore projections observed on 4 and 5 July were due to local precipitation on 3 July (1.5 mm) registered at SRPV meteorological station in Auzeville located at less than 1 km from the traps.

During sunflower growing, the crop was submitted to a permanent ascospore flow. At least one peak of high ascospore concentration was recorded each week from June to August.

Spores discharges were thus generally triggered by rain but not necessarily. Emissions kept occurring until five days after various successive rainy days but most of the time ascospore

emissions followed a rainy day. Periods of ascospore projections were correlated to rain events but the magnitude of inoculum did not depend on precipitation amount.

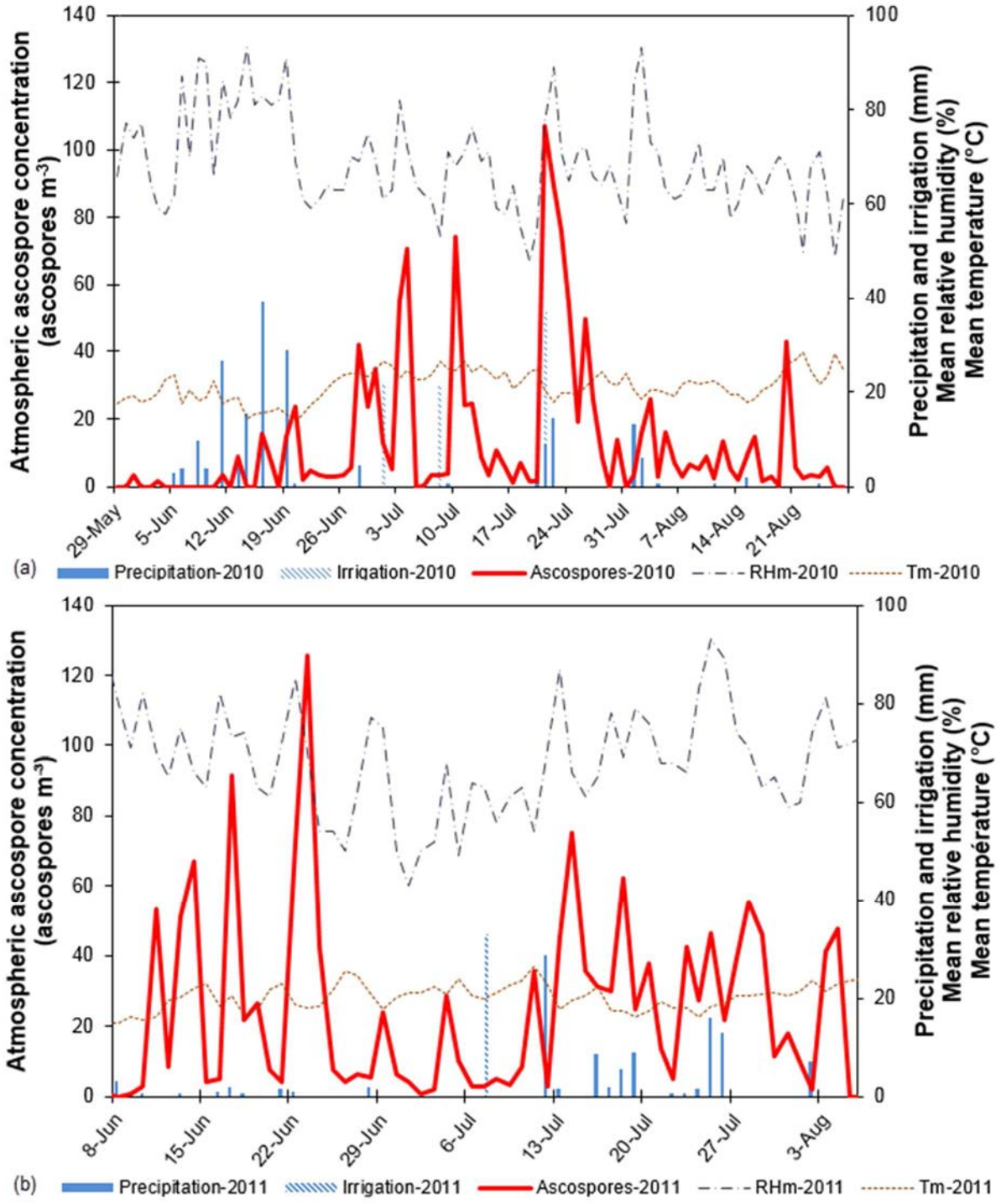


Figure IV. 15. Atmospheric ascospore concentration of *Leptosphaeria lindquistii* according to weather data. (a) 2010 and (b) 2011

2.1.3.2 Effect of cropping practices and environment on crop status and canopy development

As this experiment was conducted in the same field conditions as the one for phomopsis, the results of the effects of cropping practices and environment on crop status and canopy development were the same as presented in section 1.1.3.2, pp 91-93 for NNI, LAI and stem base diameter.

Additional analysis useful for the understanding of phoma and cropping practices interactions are presented in the following paragraph.

Plant architecture

Plants were significantly higher ($P < 0.001$) in rainfed plot in 2011 but no difference was significant in 2010 (data not shown), showing that this difference was not due to irrigation but to early growth as a result of different previous crops between irrigated and rainfed plots. Higher plant density resulted in higher plant height in 2010 ($P < 0.05$) and 2011 ($P < 0.001$) due to competition for light. In 2011, plant height differed significantly ($P < 0.0001$) among cultivars, cv. NK Ferti being the smaller (Table IV. 6).

In 2011, stem base diameter was significantly different ($P < 0.001$) among genotypes (Table IV. 6). Higher genotypes seemed to have thicker stem base diameter.

In 2010, the contrasted crop management (N fertilisation, plant density and water regime) did not result in significantly different number of leaves per plant. In 2011, leaf number varied significantly ($P < 0.01$) among water regimes and N fertilisation but the difference was lower than two leaves. As expected, leaf number was significantly different ($P < 0.0001$) between cultivars: there were almost seven leaves more for cv. Sikllos CL than for cv. LG5451HO CL.

In 2011, petiole trough at anthesis was significantly ($P < 0.0005$) deeper in situations with vigorous plants: the volume of stored water in petiole was greater in rainfed *vs.* irrigated plots (218µl *vs.* 166µl) and with N fertilisation (225µl *vs.* 158µl without N fertilisation).

Leaf Area Index

During vegetative stages, canopy development significantly differed ($P < 0.01$) among genotypes: cv. Sikllos CL had higher canopy development than cv. LG5451HO CL and cv. NK Ferti, other genotypes being intermediate (Table IV. 6).

After flowering, mean LAI did not discriminate the genotypes which means that senescence rate was different among genotypes as LAI was different at anthesis (Table IV. 6).

Table IV. 6. Mean LAI during vegetative stages (LAI1) and post-flowering stages (LAI2), plant height (H, mm), stem base diameter (SBD, mm) and leaf number for the five genotypes used in 2011.

	LAI 1	LAI 2	H (mm)	SBD (mm)	Leaf number
ES Paulina	2.85 (0.98) ab	2.90 (0.80) [ns]	1624 (195) b	22.5 (4.5) abc	30.8 (2.2) b
Kerbel	2.69 (0.91) ab	2.53 (0.83) [ns]	1668 (179) a	23.2 (5.5) a	29.5 (2.0) c
LG5451HO CL	2.52 (0.69) b	2.21 (0.65) [ns]	1644 (157) ab	21.0 (4.6) bc	26.9 (1.7) e
NK Ferti	2.37 (0.79) b	2.37 (0.77) [ns]	1550 (141) c	20.8 (5.4) c	28.4 (2.0) d
Sikllos CL	3.23 (1.03) a	2.70 (0.84) [ns]	1671 (115) a	23.1 (6.2) ab	33.8 (2.3) a

[a] Standard deviation between brackets.
[b] Within each column, mean values followed by different letters are significantly different from one another based on Kruskal-Wallis All-Pairwise comparisons $_{0.05}$.

2.1.3.3 Effect of canopy development and weather conditions on crop microclimate

The results of the effects of canopy development and weather conditions on crop microclimate were the same as presented in section 1.3.3.3, pp 93-95.

2.1.3.4 Development of phoma leaf epidemic as affected by environmental conditions and primary inoculum and sunflower canopy

Effect of sunflower canopy on the dynamics of leaf node infection

Stem infections began at the end of June in 2010 and at mid-June in 2011, both dates corresponding to a sum of growing degree days of about 770°C after sowing. No correlation was found before the amount of ascospores released and the number of leaf node symptoms scored (Figure IV. 16). However, symptoms appeared around 10 days after ascospore discharge events as observed by Penaud and Pérès (1995). First stem infections were due to ascospore projections occurring mid-June in 2010 and probably at the beginning of June in 2011. Leaf node infections occurred during the whole sunflower growing period from star bud stage to maturity.

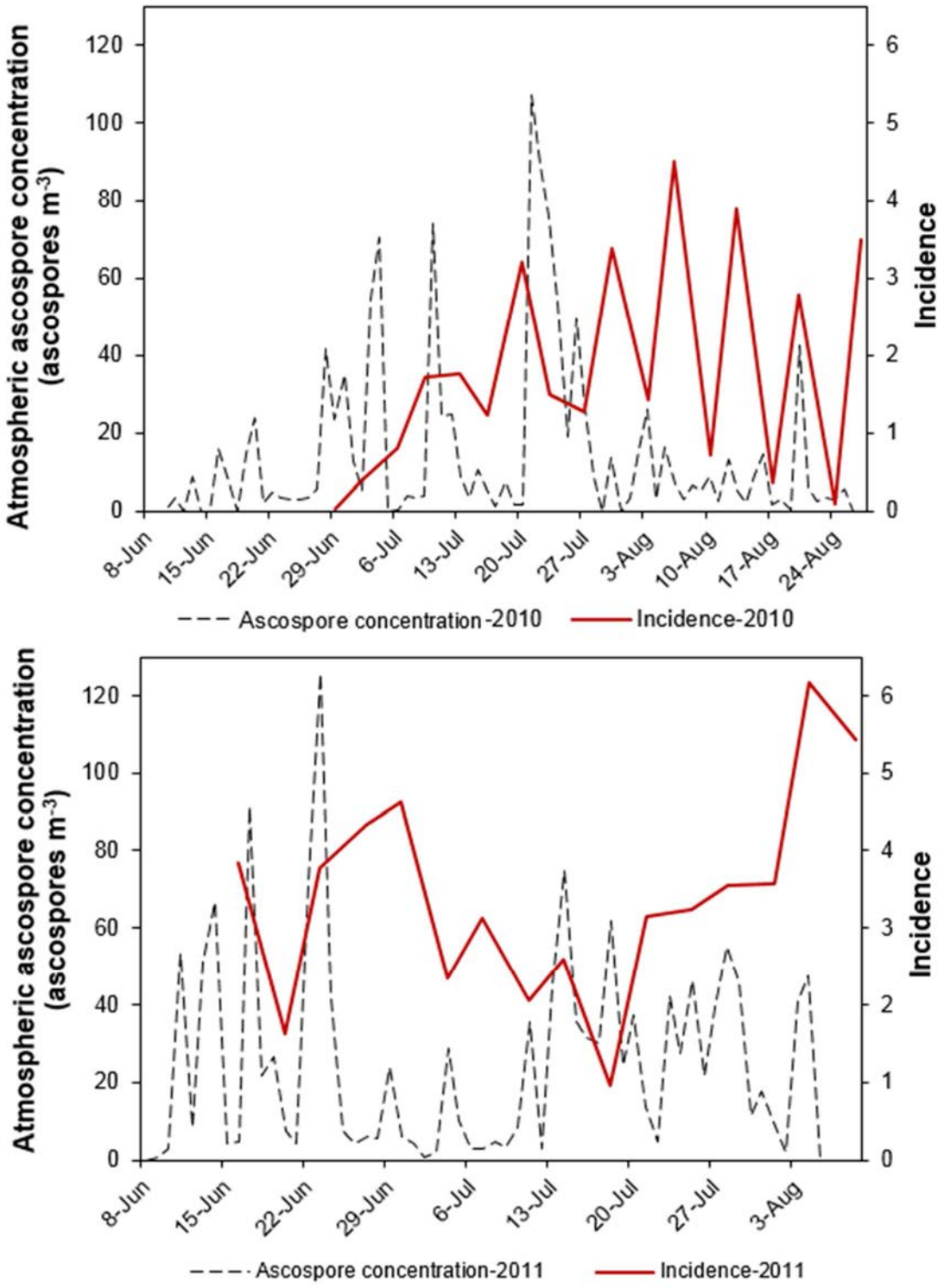


Figure IV. 16. Dynamic of *L. lindquistii* leaf node infections

Disease severity was significantly ($P < 0.0001$) higher in 2011 compared with 2010. The amount of rainfall in June 2011 was lower than in 2010 (41 mm *vs*. 143 mm) but quite well distributed throughout the month. July 2011 was more rainy than in 2010 (87 mm *vs*. 28 mm) with lower temperatures (20°C *vs*. 23°C). In 2010, the first major ascospore discharge

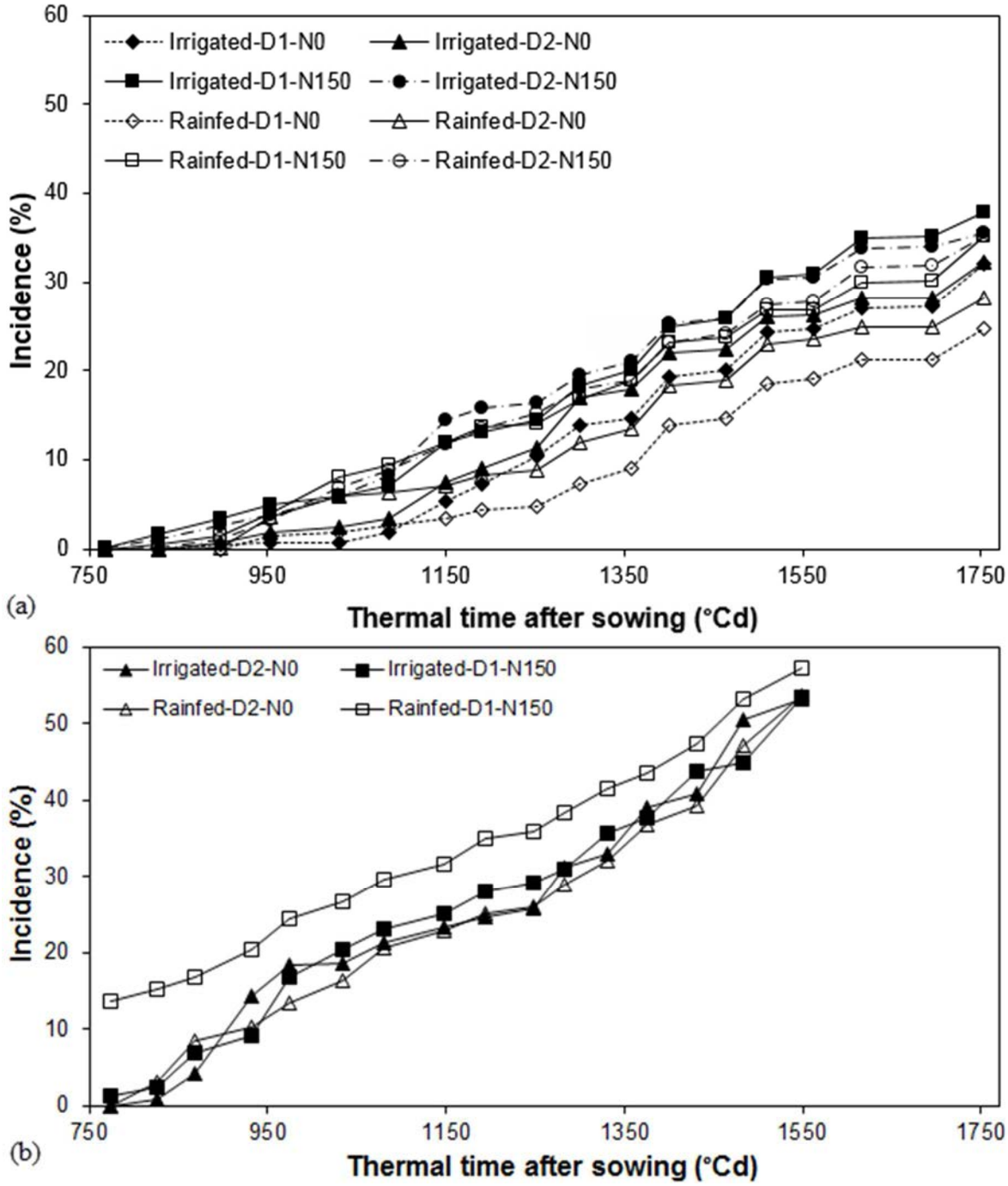


Figure IV. 17. Dynamic of *L. lindquistii* incidence on stem according to the crop management in 2010 (a) and 2011 (b)

event was recorded on 16 June that could explain the absence of leaf node symptoms before the end of June.

The disease severity index ($AUDPC_{ln}$) integrating the progression of black lesions on the stem, differed significantly ($P < 0.0001$) for the two N-fertilisation treatments, disease severity being higher on plants with high NNI values except in 2011 in irrigated plot (Figure IV. 17).

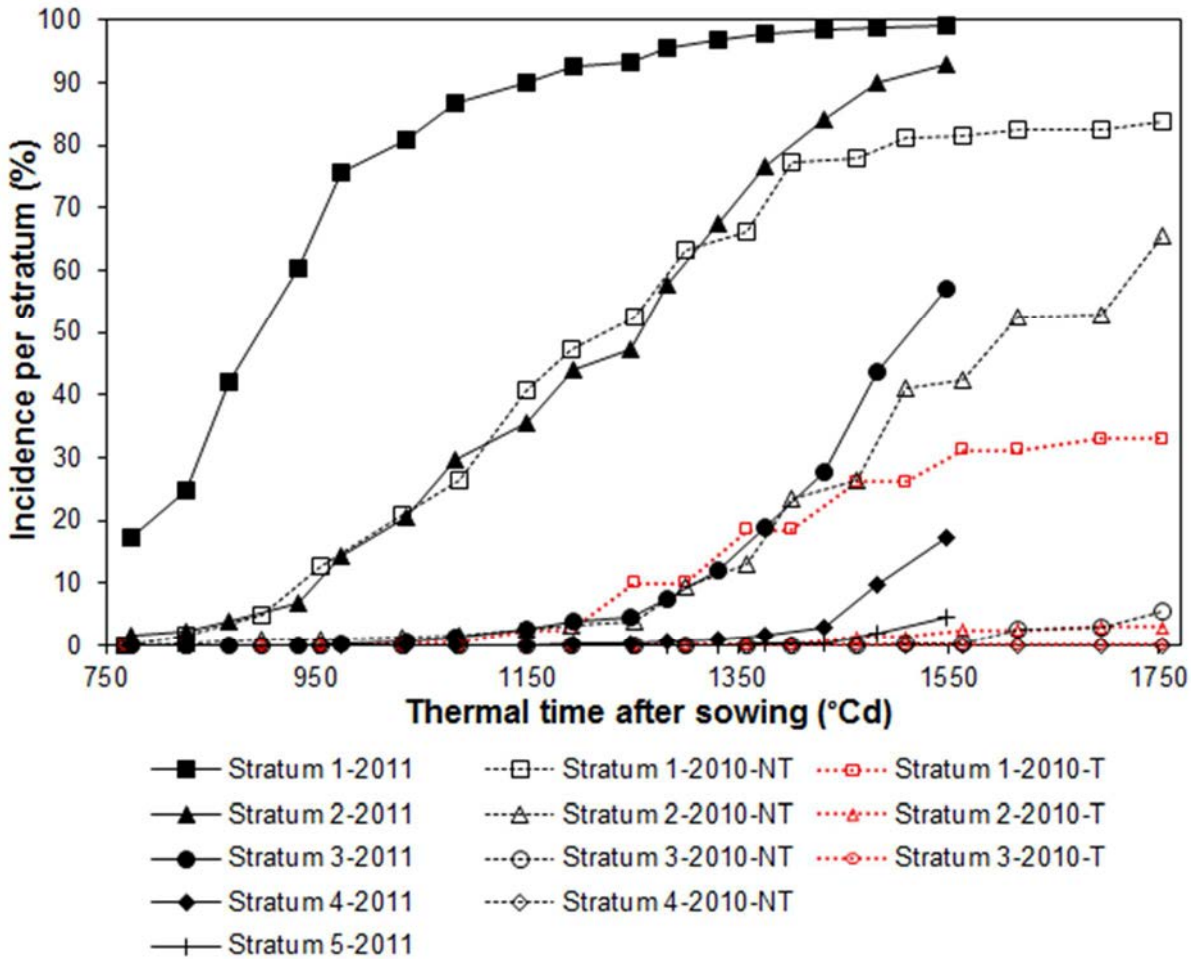


Figure IV. 18. Vertical dynamic of *L. lindquistii* incidence on stem in 2010 (open symbols) for untreated (NT) and treated (T) treatments and 2011 (closed symbols)

Water regimes influenced disease severity: irrigation increased significantly ($P < 0.001$) disease severity in 2010. Results were inverted in 2011 as water differentiation was low and numerous symptoms appeared earlier in rainfed plot due to earlier plant growth leading to significantly ($P < 0.0001$) higher disease severity in rainfed plot in 2011.

Plant density seemed to have low impact on disease severity. However, in situations with open canopies (LAI lower than 2.5 at anthesis) and plants with low NNI values (around 0.5), disease severity was significantly ($P < 0.001$) higher in high plant density situations.

Disease severity was significantly ($P < 0.0001$) different among cultivars in 2011: cv. Kerbel and cv. LG5451HO CL being the most susceptible, and cv. NK Ferti and cv. Sikllos CL being the less susceptible, cv. ES Paulina was intermediate. No obvious correlation was found between cultivar susceptibility and cultivar architecture characteristics (plant height, number of leaf nodes).

In 2010, fungicide application delayed by 14 days the appearance date of the first stem lesion. Disease severity was significantly ($P < 0.0001$) decreased as the number of stem lesions was divided by four compared with no-fungicide application treatments.

Stem symptoms always began at the lower part of the plant then the infection of leaf nodes was acropete (Figure IV. 18). For both years, disease severity as indicated by $AUDPC_{ln}$ index was significantly ($P < 0.0001$) higher in stratum 1 then 2, 3, 4 and finally 5 (only in 2011 as symptoms did not reach this stratum in 2010). In 2010, the lower disease pressure resulted in later symptoms appearance for all strata and lower incidence per stratum compared with 2011.

Effect of crop management on the necrosis progression

To make relevant the comparison of the rate of vertical disease progress on stem among crop management conditions, two cohorts of stem symptoms were selected and analysed separately in 2010 and 2011: the first one during the pre-anthesis period and the second one during grain-filling period.

From 898°Cd to 1150°Cd (2010) and 827°Cd to 1149°Cd (2011), the rate of necrosis progress was significantly higher ($P < 0.05$ and $P < 0.0005$) on plants with plentiful nitrogen content (high NNI): 0.05 and 0.04 mm $°Cd^{-1}$ *vs.* 0.03 and 0.02 mm $°Cd^{-1}$. Water regime and plant density alone had no significant effect on necrosis progress. In 2011, the cultivar effect was significant ($P < 0.0001$) only on N deficient plants (low NNI): mycelium tended to grow faster on cv. LG5451HO CL, cv. Kerbel and cv. NK Ferti (0.03 mm $°Cd^{-1}$) and slower on cv. ES Paulina (0.01 mm $°Cd^{-1}$), cv. Sikllos CL being intermediate (0.02 mm $°Cd^{-1}$).

From 1359°Cd to 1563°Cd (2010) and 1247°Cd to 1432°Cd (2011), crop conditions did not significantly change the rate of necrosis progress. In 2011, the cultivar effect was significant ($P < 0.0001$): mycelium tended to grow faster on cv. NK Ferti (0.13 mm $°Cd^{-1}$) and slower on cv. ES Paulina (0.05 mm $°Cd^{-1}$) and cv. Sikllos CL (0.04 mm $°Cd^{-1}$), cv. Kerbel (0.09 mm $°Cd^{-1}$) and cv. LG5451HO CL (0.08 mm $°Cd^{-1}$) being intermediate.

2.1.3.5 Modelling phoma stem epidemics

Optimised parameter values were: 0.17 for r_0, the maximum daily rate of infection, and 6 for N_{HR0}, the minimal number of hours of relative humidity upper than 90% necessary for infection to be successful. The global model bias was -0.01 (with N = 8338 values), RMSEp was 0.17 and model efficiency was 0.30. The predictive quality of the model strongly

depended on the three data sets used for cross-validation. When 2010 was used for model evaluation, bias was -0.15, RMSEp was 0.19 and the model efficiency was -0.80 (N = 3780). When 2011 was used for model evaluation, bias was 0.12, RMSEp was 0.16 and the model efficiency was 0.21 (N = 3840). When 2012 was used for model evaluation, bias was 0.11, RMSEp was 0.16 and the model efficiency was 0.49 (N = 718). This underlines the need for additional data. The prediction quality appeared to be low when the data sets used for parameter estimation did not cover a wide range of climate scenarios.

2.1.3.6 Development of phoma stem base epidemic

Stem base attacks were very severe in 2011 (more than 99% of plants attacked) compared with 2010 (around 50% of plants attacked). First stem base symptoms appeared at 827°Cd in 2010 and 774°Cd in 2011.

In 2010, crop conditions had no influence on stem base lesion severity. In 2011, stem base lesions appeared earlier ($P < 0.005$) in rainfed plots. N fertilisation favoured earlier stem base lesion appearance in rainfed plot only ($P < 0.001$). No significant difference appeared among cultivars in 2011 (Figure IV. 19).

In 2010, the fungicide application significantly reduced stem base lesion severity ($P < 0.005$): the number of plants with a stem base lesion was divided by two.

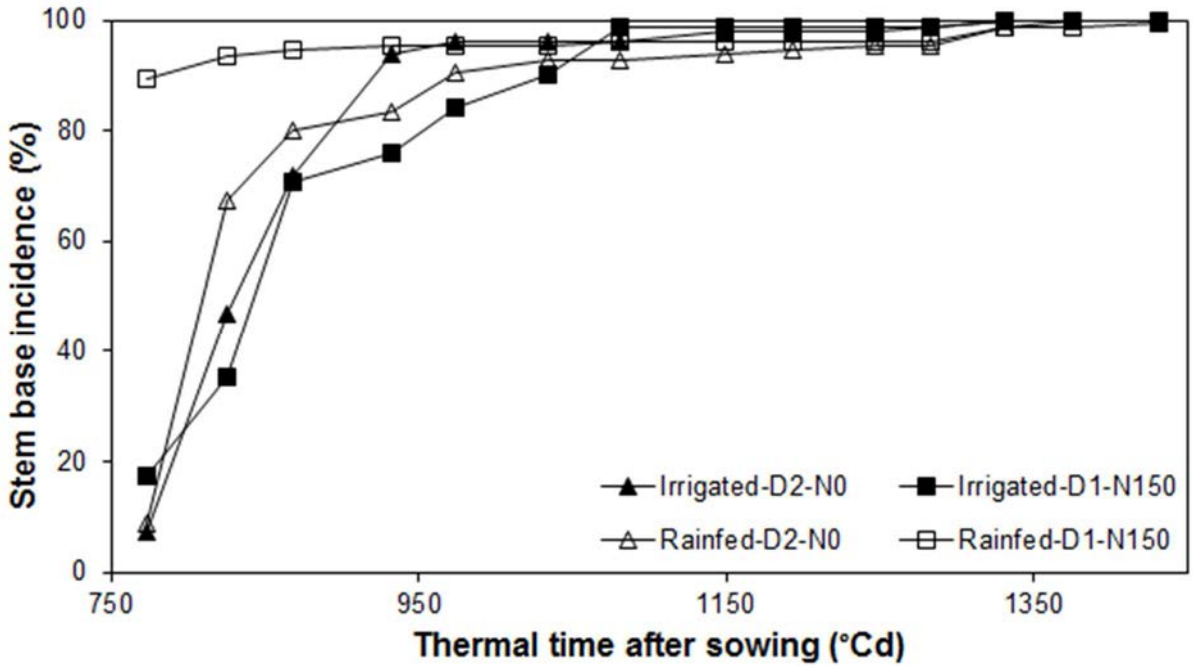


Figure IV. 19. Dynamic of *L. lindquistii* incidence on stem base according to the crop management in 2011

In 2010, 49% of stem base symptoms turned into girdling necrosis in unsprayed treatment and 33% with fungicide. In 2011, the percentage was 83% (no treatment).

For both years, the progression of the disease did not differ significantly among crop conditions for symptoms appearing at the same time. However, the earlier the stem base symptoms appeared, the later the girdling black necrosis at the stem base occurred ($P < 0.0001$). In 2010, the time to girdle the stem from symptom occurrence was 740°Cd for early contaminations (827°Cd after sowing) and 337°Cd for late symptoms (1359°Cd after sowing). Similarly, in 2011, 1025°Cd were required to girdle the stem for symptoms occurring 774°Cd after sowing, 764°Cd for symptoms occurring 1035°Cd after sowing and only 467°Cd for symptoms occurring 1331°Cd after sowing. The time necessary to get a girdling necrosis tended to increase with stem base diameter. Fungicide treatment had no significant effect on the time of appearance of girdling black necrosis at the stem base.

2.1.4 Discussion

The amount of natural inoculum was sufficient to ensure a high number of contaminations. Ascospore discharges were detected during the whole trapping period in this study. Several authors mentioned the detection of ascospore discharges during the entire sunflower cycle (Frei, 2010; Descorps et al., 2012). Dynamics of projection are not so easy to predict compared with Phomopsis. For Phomopsis, Asphodel model allowed to predict ascospore projection events according to perithecia maturation and rainfall (Délos and Moinard, 1997a). When perithecia are matured, a rainfall of 0.5 mm is sufficient to provoke significant projections of ascospores for that fungus. For *Phoma macdonaldii*, ascospore release may occur if daily rainfall is higher than 0.5 mm (Délos et al., 1998) but also in absence of rainfall with high relative humidity (Descorps et al., 2012). Detailed conditions for ascospore projection are under study. As ascospore emission occurred during the entire sunflower cycle, fungicide protection was not cost-effective unlike phomopsis.

Nitrogen fertilisation had no impact on the number of phoma stem base symptoms from natural contamination. Ascospore germination and infection incidence at stem base level did not depend on nitrogen tissue content. Other study on premature ripening (Seassau et al., 2010) suggested that the severity of premature ripening could be determined by physiological and anatomical changes affecting host susceptibility to the pathogen. Thus, plant susceptibility may vary without changing the facility with which it can be colonized by *Phoma macdonaldii*. This could explain why no difference in stem base infection rate and

girdling symptoms appearance were found in this study whereas N supply was shown to enhance disease severity in previous studies (Debaeke and Pérès, 2003; Seassau et al., 2010). Leaf node infections were enhanced by nitrogen fertilisation as observed by Debaeke and Pérès (2003). High nitrogen fertilisation could lead to greater petiole trough size. Petiole trough appeared when sunflower plants have between ten and twelve leaves and it acts as a receptacle for free water. The water-holding capacity of these leaf structures is greater and appears earlier at low plant densities especially when N nutrition is plentiful. Phoma ascospores polluting petiole trough and groove encounter favourable conditions for germination and penetration in the plant even when contaminating rain was followed by dry period. Leaf pathogen such as *Phomopsis helianthi* is more dependent on microclimatic conditions due to infection point at leaf margin (hydathodes) that makes the fungus more sensitive to relative humidity: humidity saturation is needed for 36 h to result in plant contamination (Desanlis et al., 2013). Petiole susceptibility increases with growth stage as petiole trough deepens with plant growth being thus more prone to water storage (Délos et al., 1997b). In addition, high nitrogen availability favours the bursting of very turgid petiole tissues that facilitates fungus penetration in the plant. Indeed, *Phoma macdonaldii* penetrates into plants either directly by mechanical pressure or via enzymatic degradation of the cell wall, or indirectly through wounds and natural openings such as lenticels and stomata (Roustaee et al., 2000c).

Increasing plant density, in conditions where canopy development (LAI) and nitrogen supply were limiting, resulted in higher level of leaf node infections as already observed by Debaeke and Pérès (2003). The favourable microclimate resulting from high plant density (increasing relative humidity) facilitates infection and growth of the fungus delaying water evaporation in the petiole trough. In non-limiting conditions for N nutrition, Debaeke and Pérès (2003) showed that the heaviest attacks were observed at the lowest plant densities due to greater water-holding capacity of the petiole trough in this situation.

By delaying leaf senescence and reducing leaf temperature, irrigation could improve the success of stem infection as observed in a previous study (Debaeke and Pérès, 2003) but also through water filling of the petiole trough providing favourable conditions for spore infections.

Differences in genotype susceptibility to *Phoma* were observed. As these genotypes had a similar date of anthesis, the contrasted expression of symptoms was not due to differences in crop phenology and receptivity. Moreover, no correlation was found between genotypic differences in plant architecture (number of leaf nodes, plant height) and the resulting disease incidence suggesting the prevalence of intrinsic resistance. To date, sunflower genotypes with partial resistance to *Phoma macdonaldii* have been described, but no fully resistant genotypes are available. The inherence of partial resistance was reported to be quantitative under additive and dominant effects (Roustaee et al., 2000a). Another study suggested the presence of tissue-specific resistances genes explaining the differences in resistance level between leaf node infections and stem base infections for the observed genotypes (Abou Al Fadil, 2006).
Cultivar ranking for disease incidence on stem and disease progression was not the same. No relation was found between phoma and phomopsis susceptibility.

Spores always started infecting bottom leaves. Pycnidia on sunflower stems were never observed in French conditions thereby the hypothesis of polycyclic disease with an infection that evolves from bottom to upper leaves due to rain splashing of conidia from neighbouring leaves could be rejected. Microclimatic conditions at the bottom of the plant are more favourable to spore germination with higher relative humidity that limits water evaporation. Moreover, the size of petiole trough is maximum between leaf 10 and leaf 15 (Rey, 2003) providing water for spore germination. The bursting of very turgid petiole tissues occurs more frequently in lower part of the plant facilitating fungus penetration. Those three gradients of favourable conditions could explain the acropete dynamics of phoma infection.

Parameter estimation of the model proved to be sensitive to climatic scenarios used here. This is caused by the very limited range of available data. This underlines the need for additional data collection with regards to parameter estimation and/or the evaluation of the model predictive quality.
Study to find a good indicator of petiole trough size should be useful. Two proxies of trough size could be leaf size or stem diameter. Moreover, a detailed study is needed to measure the dynamics of nitrogen tissue content at leaf scale. That could explain the discrepancies in necrosis growth before anthesis and during post-filling stages.

2.2 Expérimentations complémentaires en serre

En 2011 (SAuz11 ; Tableau III**. 2**) et 2012 (SGri12), deux expérimentations en serre ont été réalisées sur deux variétés *a priori* contrastées vis-à-vis de leur sensibilité au phoma en lien avec l'hypothèse suivante :

- *H3 : la vitesse de progression des deux agents pathogènes dépend de la température et de l'humidité relative dans le couvert, du statut azoté de la plante et du niveau de résistance de la plante. Leur vitesse de progression pourrait également dépendre du stade phénologique de la plante.*

2.2.1 Influence du statut azoté de la plante sur la vitesse de progression du phoma

Le statut azoté des plantes a été mesuré indirectement via la teneur en chlorophylle des feuilles (mesures SPAD) ou l'indice de nutrition azoté (mesures INN). Ce statut azoté a ensuite été mis en parallèle avec la vitesse de développement des symptômes de phoma.

A Auzeville, les valeurs SPAD indiquent un niveau d'azote significativement plus important en N150 (mesure SPAD = 36.3) qu'en N0 (33.8). Cependant, les AUDPC ne diffèrent pas significativement entre les deux modalités d'azote (1118 % de pétiole nécrosé.jour en N0 et 1288 % de pétiole nécrosé.jour en N150), en dépit d'une tendance à la plus forte progression du phoma lorsque la plante est plus riche en azote. A Grignon, la vitesse de développement du phoma (AUDPC) sur les modalités N0 et N150 est significativement ($P < 0.05$) différente avec une vitesse supérieure lorsque l'alimentation des plantes était pléthorique (965 % de pétiole nécrosé.jour contre 748 % de pétiole nécrosé.jour en N0).

En conclusion, les expérimentations en pot sous serre confirment l'existence d'un effet de l'azote sur la vitesse de progression des symptômes de phoma comme cela a pu être observé au champ même si le contraste entre les plantes n'étaient suffisamment marqué du fait de la difficulté à créer une carence avec les substrats testés (l'hydroponie ou la culture sur sable aurait peut-être donné des réponses plus tranchées). De plus la méthode de mesure du statut azoté de la plante ne permet pas forcément de rendre compte des conditions auxquelles est soumis le champignon au niveau de l'organe infecté.

2.2.2 Influence du génotype sur la vitesse de progression du phoma

Même s'il n'existe pas de classement référençant la sensibilité des variétés au phoma, deux variétés de comportement contrasté face aux infections de phoma ont été testées pour observer l'influence du génotype sur la dynamique de progression du phoma.

A Auzeville, il n'existe pas d'effet variétal significatif sur les AUDPC (1311 % de pétiole nécrosé.jour pour Kill, 1094 % de pétiole nécrosé.jour pour Sikllos CL). A Grignon, contrairement à ce qui était attendu suite au test plantules, Kill se révèle plus sensible que Sikllos CL. Les valeurs d'AUDPC sont significativement plus élevées ($P < 0.0001$) pour Kill (1167 % de pétiole nécrosé.jour) que pour Sikllos CL (546 % de pétiole nécrosé.jour).

En conclusion, ces deux expérimentations confirment le caractère quantitatif de la résistance au phoma. La mise en place des mécanismes de résistance ne semble pas identique selon le stade de la plante. Des effets variétaux tranchés sur plantes adultes et sur plantules ont été observés mais ils sont contradictoires. On confirme néanmoins la tendance d'une moindre sensibilité de la variété Sikllos CL observée dans l'expérimentation au champ (CAuz11) par rapport au panel variétal testé dans ce dispositif.

2.2.3 Influence de l'âge de la feuille sur la vitesse de progression du phoma

L'influence du stade phénologique sur la vitesse de progression du phoma n'a pas pu être testée en raison des interactions possibles avec les conditions microclimatiques dans la serre du fait du décalage des dates d'infection des plantes. Par contre, un effet de l'âge de la feuille en lien avec sa date d'apparition et donc de sa position sur la plante a pu être testé.

L'âge de la feuille (stades E1 à E3-E4 à Grignon et stades pré-E1 à E3 à Auzeville) influe significativement sur la vitesse de progression du champignon, les feuilles basses, plus âgées ayant une valeur d'AUDPC significativement plus élevée que les feuilles de rang supérieur : entre 1691 et 1483 % de pétiole nécrosé.jour pour la feuille 6 contre 743 à 585 % de pétiole nécrosé.jour pour la feuille 9 et seulement 457 % de pétiole nécrosé.jour pour la feuille 10.

En conclusion, on peut considérer qu'indépendamment de différences microclimatiques, les tissus à l'insertion des feuilles basses sont plus rapidement colonisés par le phoma.

2.3 Conséquences pour le modèle « phoma »

- Une pluie supérieure à 0.5 mm est nécessaire pour libérer des ascospores dans l'atmosphère. La fenêtre de contamination possible suite à une pluie est fixée à 10 jours en lien avec le comportement du phomopsis (durée de vie des ascospores).
- Le délai d'incubation dépend du stade phénologique de la plante et est exprimé en °Cj: 360°Cj en début de cycle à 180°Cj à F1.
- Les contaminations débutent toujours en bas de la tige et sont ascendantes.
- Le nombre de nœuds atteints varie selon la conduite de culture : plus la conduite est favorable, plus ce nombre de nœuds est élevé.
- La sévérité des attaques dépend :
  - du microclimat (température et humidité relative)
  - de l'état de développement du couvert (LAI)
- La vitesse de progression du symptôme dépend du statut azoté de la plante (mais cela n'est plus vrai en phase de remplissage) ; par contre, modéliser une taille de nécrose du phoma n'est pas accessible contrairement au phomopsis.

Chapitre V. Acquisition de connaissances : mécanismes de dommage

La nécrose provoquée par la progression du phomopsis est la résultante de l'action de toxines. Une expérimentation en serre a été menée en 2010 (SAuz10_photo ; Tableau III**.** 2) sur deux variétés contrastées afin de quantifier la zone d'influence du champignon et déterminer si la perturbation causée par la nécrose du phomopsis se résumaient à la zone visible nécrosée ou si des effets à distance étaient observables et modélisables (H6).

Cette première partie a fait l'objet d'une publication qui sera prochainement soumise à *Plant Pathology* (auteurs : M. Desanlis, P. Maury, E. Mestries, J.N. Aubertot, P. Debaeke) après validation en cours des résultats de 2010.

Les nécroses de phoma au point d'insertion du pétiole sur la tige entraînent une sénescence accélérée de la feuille du fait de l'obstruction des vaisseaux conducteurs. Deux expérimentations en serre ont été menées à Auzeville en 2011 (SAuz11) et Grignon en 2012 (SGri12 ; Tableau III**.** 2) sur deux variétés *a priori* contrastées soumises à deux niveaux de fertilisation azotée afin de caractériser l'effet du phoma sur la vitesse de sénescence des feuilles infectées. Les résultats sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre.

1 Photosynthetic consequences of Phomopsis helianthi in sunflower: analysis and modelling

1.1 Introduction

Phomopsis stem canker, a worldwide fungal disease which has been reported in many regions of sunflower production, is caused by the hemibiotrophic fungus *Diaporthe/Phomopsis helianthi* Muntañola-Cvetković *et al.* (1981). The disease is initiated by foliar infection by ascospores. After infection, the fungus spreads along the main veins of the leaves and grows down the petiole to the stem. It causes premature leaf senescence, plant wilting and lodging (Masirevic and Gulya, 1992). Losses may reach up to 1.5 t ha^{-1} in yield and up to 25% in oil content (Acimovic, 1986; Masirevic and Gulya, 1992).

The fungus produces toxic metabolites, including phomozin which is responsible for necrotic lesions on sunflower leaves (Mazars et al., 1990), and mellein derivates (Avantaggiato et al., 1999) which seem to have a direct inhibitory effect on the Calvin cycle or on reactions linked to it (Bethenod et al., 1982). Cytological observations of the infection progress by transmission electron microscopy showed that the first symptoms were visible on the chloroplasts (Heller and Gierth, 2001).

Foliar pathogens generally reduce the photosynthetic activity in infected leaves by reducing green leaf area. However, Goto (1965) showed that the yield loss due to leaf blast on rice exceeded that caused by cutting off the same percentage of leaf area as the one covered by the fungus. This extra reduction means that a disease may influence the host plant to an extent larger than the visible lesion would do. It has been reported that other pathogens affect photosynthesis in asymptomatic areas of diseased leaves, e.g. *Mycosphaerella pinodes* on field pea (Garry et al., 1998), *Puccinia triticina* and *Mycosphaerella graminicola* on wheat (Robert et al., 2004), and *Alternaria helianthi* on sunflower (Calvet et al., 2005). However, pathosystems in which the pathogen does not impair photosynthesis of remaining green leaf tissue have also been reported, e.g. *Phytophthora infestans* on potato (Van Oijen, 1990), *Puccinia recondita* on wheat (Spitters et al., 1990), *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* on common bean (Goodwin, 1992). To our knowledge, the effect of *Phomopsis helianthi* on the photosynthesis of asymptomatic leaf areas has not yet been studied in sunflower.

Bastiaans (1991) introduced the concept of a virtual lesion, which corresponds to the leaf area in which photosynthesis is negligible (including the visible lesion). Developed on *Pyricularia oryzae*, his model $P_x/P_0 = (1 - x)^{\beta}$ (Equation 1) relates the net photosynthetic rate of a diseased leaf area (P_x) relative to the net photosynthetic rate of the same area on a healthy leaf (P_0) and the fraction of leaf area visually affected by the disease (x). The parameter β quantifies the constant ratio between virtual and visible lesion. It indicates whether the effect of disease on photosynthesis is higher ($\beta > 1$), lower ($\beta < 1$) or equal ($\beta = 1$) than that explained by the observed diseased area. This model was elaborated for randomly distributed small lesions and it requires that these lesions occupy less than 20% of the total leaf area because equation 1 was obtained using Taylor series expansion. A different approach is obviously required for diseases with single, expanding lesions such as *Phomopsis helianthi*. An example was reported at the whole-leaf level for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* on rice (Elings et al., 1999) but parameterisation of the model requires to have all the green leaf area impacted by the pathogen in the measurement chamber, which is not possible with sunflower leaves and most of the current portable photosynthetic system leaf chambers.

In some plant-pathogen interactions, the host genotype may play a significant role in the disease's impact on host photosynthesis. β-values found by Erickson *et al.* (2004) varied greatly across poplar lines indicating that *Marssonina brunnea* has different consequences on photosynthesis for different host genotypes. However, β was found to be invariant for

three rice cultivars for *Magnaporthe grisea* (Bastiaans and Roumen, 1993), six pea cultivars for *Mycosphaerella pinodes* (Le May et al., 2005), two recombinant inbred lines and one soybean cultivar for *Phakospora pachyrhizi* (Kumudini et al., 2010), and two peanut cultivars for *Cercosporidium personatum* (Singh et al., 2011).

The aims of the present study were (i) to determine whether the Net Photosynthetic Rate (NPR) of the green leaf area near the visible lesion was reduced by *Phomopsis helianthi*, (ii) to model the relationship between the proportion of visibly diseased area and net photosynthesis in sunflower leaves, (iii) to analyse if this model was genotype-dependent. In order to achieve this last objective, measurements were performed on a resistant and a susceptible genotype. The effect of the pathogen on photosynthesis was studied first on the scale of the gas exchange measurement area, then on the leaf scale and finally on the plant scale.

1.2 Materials and Methods

1.2.1 Plant material and growing conditions

A greenhouse experiment was conducted over a 4-month period. Two contrasting commercial hybrids, usually grown as control cultivars in experiments to assess cultivar resistance, were studied: cv. Alhaja, susceptible to *Phomopsis helianthi*, and cv. Bollil, resistant. Seeds were kept in moist Petri dishes in an incubator at 20°C for two days before sowing to promote seed germination. On April 21st 2010, two seeds were sown in 10 l pots filled with peat in a greenhouse at the Auzeville INRA station (Haute-Garonne, France). One plant per pot, at the 4-leaf stage, was kept.

Day/night temperature in the greenhouse was maintained at 23°C/17°C ± 2°C. Air relative humidity was maintained at 90% ± 5% at night and a minimum of 60% ± 5% during daytime (except for the 48 h after infection when it was maintained close to 100%). A 16 h photoperiod was applied from plant emergence to star bud stage with 400 W High Pressure Sodium vapour lamps (SON-T AGRO, Philips). Supplemental lighting was turned off when global radiation was above 250 W m^{-2}. Plants were irrigated daily by a 2 l h^{-1} emitter to maintain adequate soil moisture during the experiment (volume between 0.17 and 0.67 l d^{-1} according to growth stage). Plants were fertilized weekly with 20.20.20 NPK solution (Peters® Professional, 200 ml at 2 g l^{-1}), beginning two weeks after sowing. Plants were

sprayed with micronised sulfur at 7 g l^{-1} (Thiovit®jardin, Syngenta) after *Phomopsis helianthi* inoculation to control Powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*).

1.2.2 Fungal isolate and plant inoculation treatment

A monopycniospore culture of *Phomopsis helianthi* was isolated from naturally infected sunflower stem residues collected in March 2010 on the experimental site at the Auzeville INRA station (Haute-Garonne, France). The fungus was grown in the dark at 24 ± 1°C on potato dextrose agar (PDA, Difco) amended with 150 mg l^{-1} of streptomycin (pH 6).

Inoculation followed the protocol of Bertrand and Tourvieille de Labrouhe (1987): a 6-mm-diameter disk of PDA colonized with *P. helianthi* was placed on the leaf tip and then covered with aluminium foil (Albal®) to hold the mycelial explant in place and stop drying. Plants were infected at the star bud stage (Merrien, 1992) choosing the youngest fully expanded leaf. On control plants, sterile PDA disks were used instead of mycelial explants. Disks and aluminium foil were removed 11 days after inoculation.

For each cultivar, seven plants were inoculated and seven others were used as controls. Pots were randomly arranged in the greenhouse.

As one leaf of cv. Alhaja was broken at the beginning of the experiment and infection failed on one leaf of cv. Bollil, six inoculated plants and seven control plants for each cultivar were finally kept for the measurements.

1.2.3 Measurements of disease progression and gas exchange

Plants were monitored twice a week from star bud stage to the end of the flowering, until the necrosis reached the stem. From then, measurements were made weekly until plant death.

Lesion lengths were characterised by the difference between the total leaf length (measured the day before inoculation) and the length of the main vein remaining green, taken on the underside of the leaf. Lesion length measurements (L) were used to calculate the rate of necrosis progression (V) in degree days (°Cd) from inoculation. The girdling percentages of the stem and the stem diameter were measured to calculate the rate of girdling progression (girdling).

On each leaf, three measurement areas were defined and tagged with a marker: proximal (close to the infection point), median (at the middle of the leaf), and distal (at the opposite of the infection point). Gas exchange was measured *in situ* on those three areas using the 6 cm^2 clamp-on chamber of the LI-COR 6400 portable photosynthesis system (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) between 10 am and 3 pm. Measurements of NPR were made at light-

saturation of 1500 µmol m^{-2} s^{-1} photosynthetic photon flux density, ambient CO_2 concentration of 400 µmol mol^{-1}, leaf temperature controlled at 25°C and a relative humidity of 60 ± 5%.

After gas exchange measurements, leaves were scanned *in situ* at 300 dpi (VISTAQUEST Scanner HS500) to quantify total leaf area and visibly diseased area. The proportion of visibly diseased area (necrotic tissue and the surrounding chlorotic area) was estimated using Winfolia software (2005, Regent Instruments Inc., Ottawa, Canada). Green leaf area was considered asymptomatic. Scan analysis was made both at the whole leaf scale to quantify necrotic leaf area (NLA) and at the rectangular measurement area to calculate the fraction of visible necrosis area within the measurement area (x).

1.2.4 Data analysis

The data were analysed using R software (R Development Core Team, 2006, Vienna, Austria). Observed variables were analysed by analysis of variance (ANOVA) via the general linear model procedure. Homogeneity of variance was checked by Bartlett's test (confidence level of 0.95) and the normality of the residuals by the Shapiro-Wilks test (confidence level of 0.95). For non-normal or non homoscedastic data, the non-parametric Wilcoxon test was used with a significance threshold of $P < 0.05$.

1.2.5 Model analysis

The goodness of fit of the models was characterised using three criteria: bias, root mean squared error (RMSE) and efficiency EF, calculated as 1-SSE/SST, where SSE is the sum of squared errors and SST, the total sum of squares, is the sum of squared deviations of individual measurements from the mean (Wallach et al., 2006). All models were developed under R software (R Development Core Team, 2006, Vienna, Austria) and their codes were validated using equivalent versions under Mathematica 5.2 (Wolfram Research, 2005, Champaign, Illinois).

The predictive quality of a model was evaluate using the root mean squared error of prediction (RMSEP), the model efficiency criterion EF and the bias (Wallach et al., 2006). RMSEP quantifies the prediction error when the model parameters have not been estimated using the observations used in the calculation of this criterion.

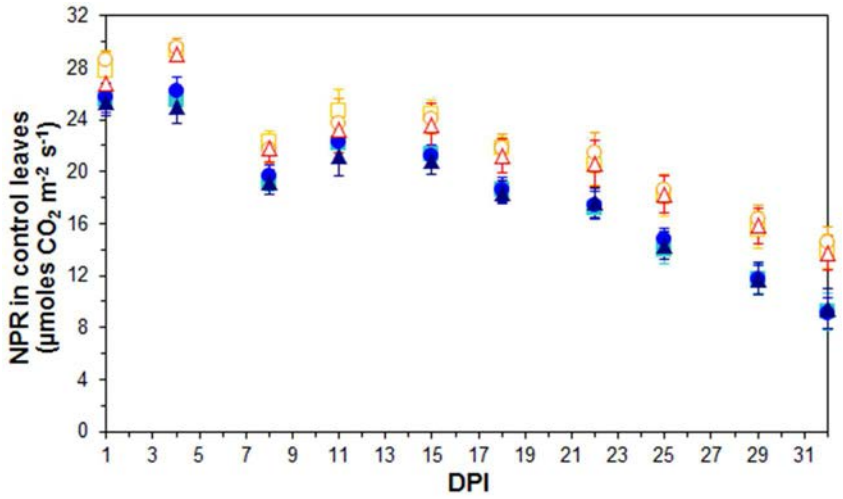


Figure V. 1. Relationship between the NPR in control leaves and the number of days after inoculation. Solid symbols are for cv. Bollil and open symbols for cv. Alhaja. The three measured areas are represented as follows: proximal area (triangles), median area (circles), distal area (squares). Vertical bars represent the standard error of the mean.

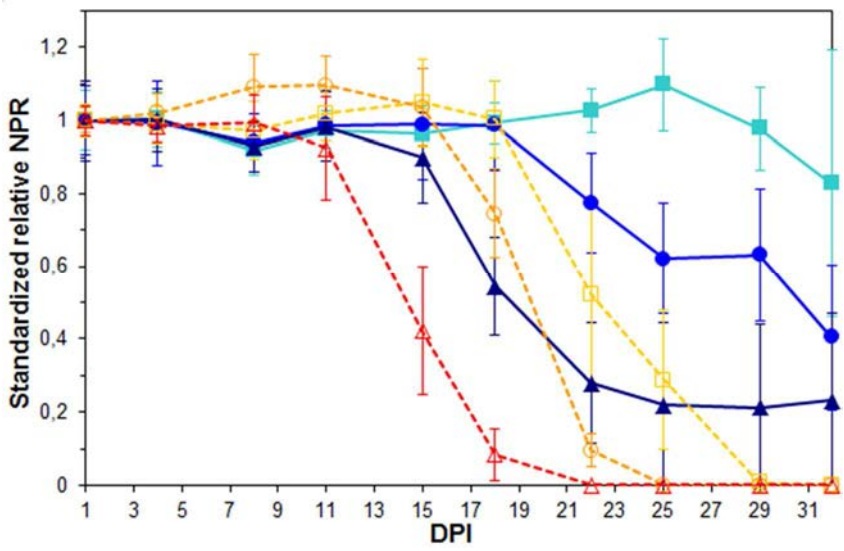


Figure V. 2. Standardised relative NPR as a function of number of days post-inoculation (DPI). Vertical lines represent the standard error of the mean. Solid symbols are for cv. Bollil and open symbols are for cv. Alhaja. The three measured areas are represented as follows: proximal - close to the infection point - area (triangles), median area (circles), distal area (squares).

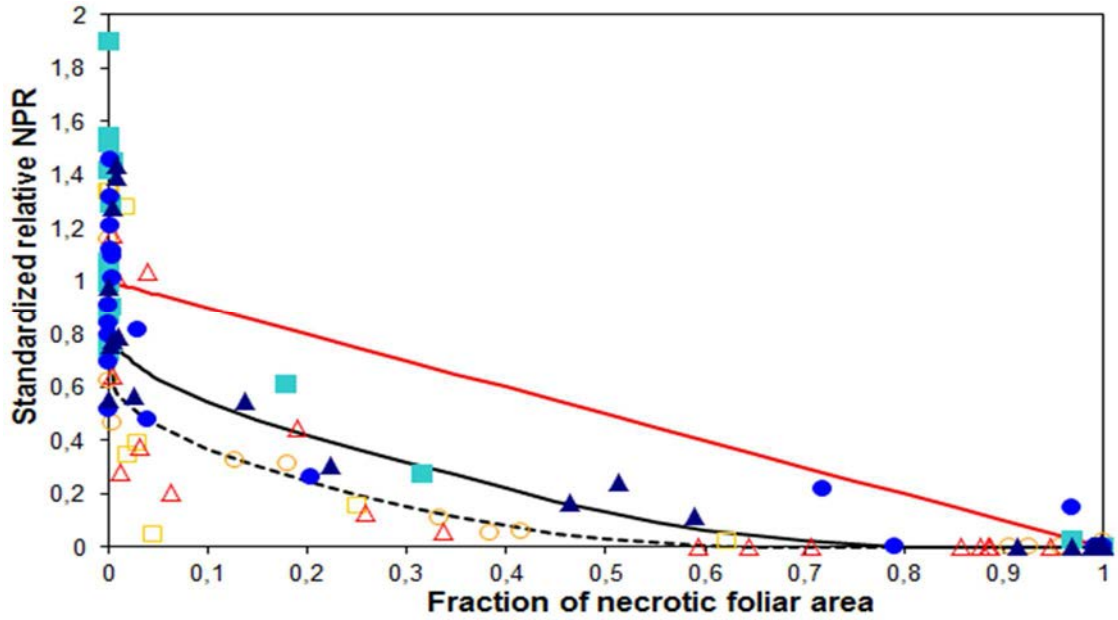


Figure V. 3. Standardised relative NPR related to the fraction of necrotic leaf area. Solid symbols are for cv. Bollil and open symbols are for cv. Alhaja. The three measured areas are represented as follows: proximal area (triangles), median area (circles), distal area (squares). The black and dotted lines represent the Alhaja model (γ = 13.9 mm) and the Bollil model (γ = 9.5 mm) respectively. The red line represents the theoretical model if *Phomopsis helianthi* had no impact on the photosynthetic efficiency of the remaining green leaf area.

1.3 Results

1.3.1 Photosynthesis dynamics in control plants

In control plants, the NPR was homogeneous within the leaf ($P = 0.62$) and decreased with time since infection (Figure V. 1). It was significantly higher for cv. Alhaja than for cv. Bollil ($P < 0.001$). No significant interaction was found between cultivar and measurement area ($P = 0.93$). During the post-elongation leaf phase, a 50% decrease in NPR was observed after 30 days (from fully leaf expansion) without any visible signs of leaf senescence. Chlorosis and necrotic spots were only visible 32 days post-inoculation (DPI) on control plants at the end of flowering i.e. F4 stage (Merrien, 1992). The variability of net photosynthetic rate, especially at 8 DPI, was certainly caused by the natural variation of global radiation in spite of supplemental lighting, temperature and air humidity remaining stable during all the measurement period. To minimize the environmental influence on NPR variability, the impact of *Phomopsis helianthi* was studied in comparison with a paired control plant.

1.3.2 Effect of *Phomopsis helianthi* on net photosynthetic rate on the leaf scale

For both cultivars, the area first impacted by the disease was that closest to the necrosis and the area last impacted was that farthest from the necrosis (i.e. proximal and distal area respectively; Figure V. 2). The standardised relative NPR decreased more rapidly for cv. Alhaja (S) than for cv. Bollil (R). The impact of *Phomopsis helianthi* on leaf photosynthesis occurred sooner and was more detrimental for cv. Alhaja than for cv. Bollil.

For median and distal areas, values of standardised relative NPR were above 1 for both cultivars. However, this phenomenon was transient and did not appear with proximal area values.

However, leaf size did not differ significantly between the two cultivars ($P = 0.81$, Wilcoxon test). The rate of necrosis progression was significantly cultivar-dependent ($P < 0.01$, Wilcoxon test): for cv. Alhaja, this rate was 1.4 ± 0.1 mm $°Cd^{-1}$ *vs.* 1.0 ± 0.1 mm $°Cd^{-1}$ for cv. Bollil (± standard error of the mean, 12°C base; (Kovics and Zsombik, 2001).

1.3.3 Short distance impact of *Phomopsis helianthi* infection on net photosynthetic rate

The relationship between the fraction of necrotic leaf area and the standardised relative NPR of gas exchange measurement areas was not linear (Figure V. 3). The decrease in the standardised relative NPR was greater than expected from the fraction of necrotic leaf area ($P < 0.001$, Wilcoxon test) and was genotype-dependent ($P < 0.001$, Wilcoxon test). For cv. Alhaja, a fraction of necrotic leaf area of 0.1 reduced the standardised relative NPR to 0.12. Fractions above 0.25 completely inhibited the leaf photosynthetic activity. On the other hand, for cv. Bollil, a fraction of necrotic leaf area of 0.1 only reduced the standardised NPR to 0.67, and fractions between 0.78 and 1 completely inhibited photosynthetic activity.

1.3.4 Modelling the short distance impact

The necrosis caused by *Phomopsis helianthi* is characteristic of this fungus: it always spreads as roughly triangular necrotic spots from the point of infection, with the tip of the triangle on the infected leaf vein (Lesovoy and Marchenko, 1999).

The short distance impact of *Phomopsis helianthi* did not differ between the various measurement areas (Figure V. 3). The relationship between the standardised relative NPR and the fraction of necrotic leaf area in the measured area differed distinctly between the two cultivars. The distance between the visible and the virtual necrosis fronts was assumed to remain constant for a given cultivar but differed between cultivars having different susceptibility levels.

No long distance impact of *Phomopsis helianthi* was found: the standardised relative NPR did not decrease when the necrosis spread towards the measurement area (Figure V. 4).

Considering those three elements, a geometrical leaf scale model was developed to represent NPR reduction caused by pathogenic lesions. This model relies on the assumption that the effect of phomopsis infection may extend beyond the lesion into green leaf areas. Using the concept of a virtual lesion (Bastiaans, 1991), where NPR is assumed to be nil, a parameter named γ is proposed to represent the distance between the visible necrotic front and the impacted area front. On the contrary to the β model proposed by Bastiaans (1991), the γ model does not rely on firm hypotheses about the size and shape of both leaves and lesions.

Since the measurement areas of the portable photosynthetic system leaf chamber are parallel to the blade margin and the necrosis can be represented by a triangle on the leaf (Figure V. 5), the necrosis front was assumed to be perpendicular to the diagonal of the measurement area.

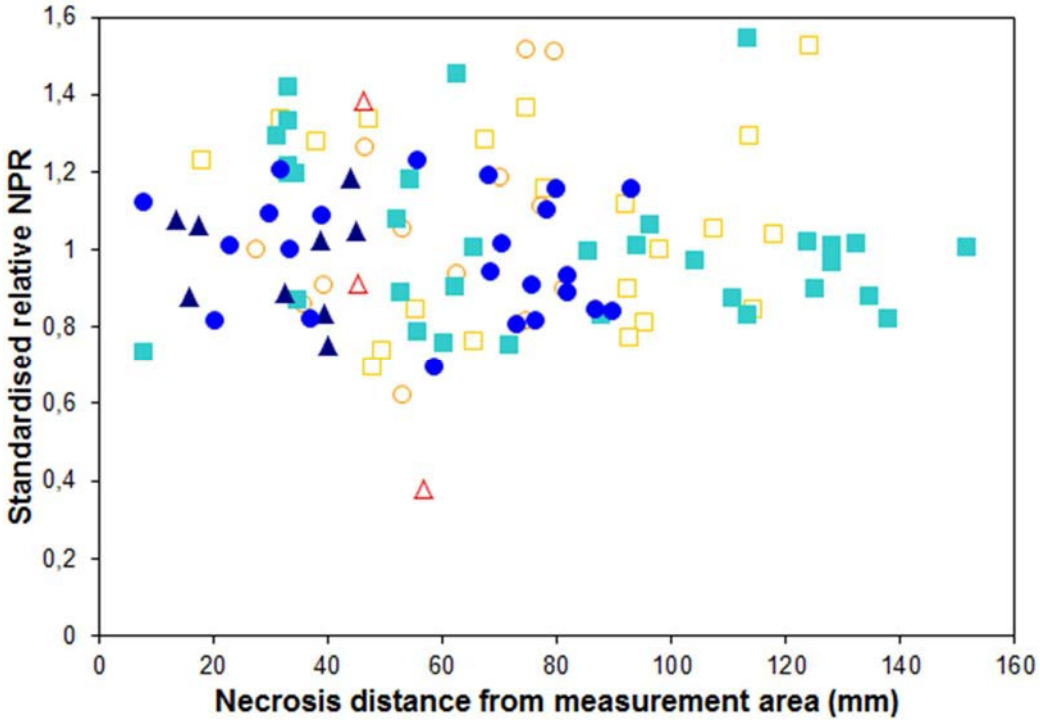


Figure V. 4. Standardised relative NPR related to the distance of the necrosis from the measurement area. Solid symbols are for cv. Bollil and open symbols are for cv. Alhaja. The three measured areas are represented as follows: proximal area (triangles), median area (circles), distal area (squares).

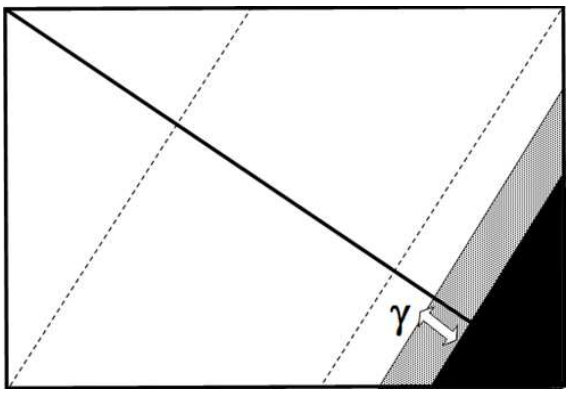


Figure V. 5. Representation of a lesion caused by *Phomopsis helianthi* on a gas exchange measurement area. The black area represents the visible lesion. The grey area represents the asymptomatic area affected by the pathogen. γ is the width of this asymptomatic but impacted area.

Seven cases were considered according to the position of the necrosis on the diagonal of the measured area (Figure V. 5). This equation can be written as (see appendix 3 for the detailed equation):

$$xvirt = f(l,w,x, \gamma) \quad \text{Equation 2}$$

with xvirt: fraction of impacted area within the measurement area; l: length of the measurement area (30 mm); w: width of the measurement area (20 mm); γ: distance between the visible necrosis front and the virtual necrosis front (mm); x: fraction of visible necrosis area within the measurement area. Equation 2, fully developed in appendix, is specific to the geometry of measurement chamber used in this experiment but is an application of the generic γ concept.

Equation 2 was used to minimize the RMSE on xvirt by adjusting the only parameter of this equation: γ. One specific value was obtained for each cultivar: 13.9 mm for Alhaja (RMSE = 0.219, bias = -0.007, EF = 0.57) and 9.5 mm for Bollil (RMSE = 0.161, bias = 0.002, EF = 0.64).

A cross-validation of the model was performed using the γ parameter estimated for the cultivar Bollil to predict leaf lesion on cultivar Alhaja and conversely. Results gave RMSEP = 0.334. The bias value (bias = -0.264) indicates that the model overestimates the variable. Efficiency value (EF = -0.03) indicates that the mean of observed values is better predictor than the simulated values which indicates a poor predictive quality of the model if parameter γ is not genotype-specific.

1.3.5 Modelling at the whole leaf scale

Parameter γ was used to model the leaf area impacted by *Phomopsis helianthi* at the whole leaf scale.

The necrosis length on the main leaf vein can be predicted using the rate of necrosis progression as a function of thermal time (12°C base; Kovics and Zsombik, 2001).

$$L_i = V_i \sum_{t_0}^{t} \Delta t - l_{0i} \quad \text{Equation 3}$$

with L_i: necrosis length on the main vein for cultivar i; V_i: rate of necrosis progression for cultivar i, Alhaja: 1.4 ± 0.1 mm °Cd^{-1}, Bollil: 1.0 ± 0.1 mm °Cd^{-1} ; l_{0i}: lag for cultivar i, Alhaja: 50.5 mm, Bollil: 54.4 mm.

For cv. Alhaja, the model efficiency was 0.81, RMSE = 27.7 mm, and bias = 0.0 mm. For cv. Bollil, the model efficiency was 0.79, RMSE = 26.4 mm, and bias = 0.0 mm.

Necrotic leaf areas (NLA) were calculated as follows (Figure V. 6):

$$NLA_i = \frac{2\tan(\omega)\times\tan(\psi)\times L_i^{\,2}}{\tan(\omega)+\tan(\psi)} \quad \text{Equation 4}$$

with L_i: necrosis length on the main vein of the leaf for cultivar i; ω: angle between the main vein and the leaf margin at the leaf tip (π/6 for leaf number 8 to leaf number 10); ψ: angle between the main vein and the necrotic front.

ψ was assessed minimizing Equation 4 with observed necrotic leaf area and observed necrosis length on the main vein of the leaf. The result gave ψ = 0.128 for cv. Alhaja (EF =

0.82, RMSE = 1208.8 mm², bias = -260.0 mm²) and ψ = 0.188 for cv. Bollil (EF = 0.82, RMSE = 1332.1 mm², bias = -132.1 mm²).

For cv. Alhaja, the model efficiency of Equation 4 was 0.81 with a bias of -746.4 mm² and a RMSE of 1233.0 mm². For cv. Bollil, the model efficiency of the previous equation was 0.75 with a bias of -336.2 mm² and a RMSE of 1583.0 mm².

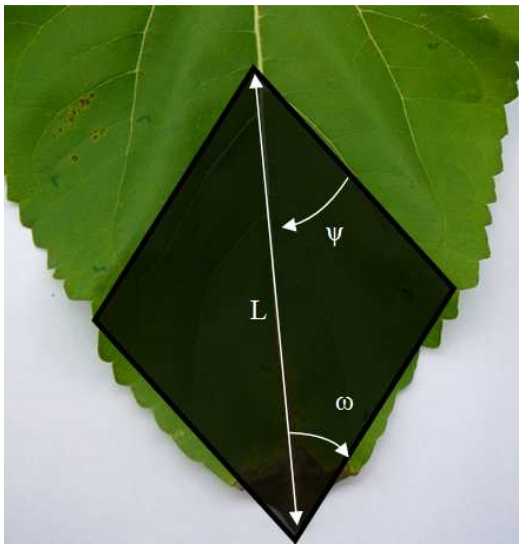


Figure V. 6. Representation of a lesion caused by *Phomopsis helianthi* at the leaf tip. The black area represents the visible lesion. L represents the necrosis length on the main vein of the leaf. ω is the angle between the main vein and the leaf border at the leaf tip. Ψ is the angle between the main vein and the necrotic front.

Taking into account the distance between the visible necrosis front and the virtual necrosis front, the total impacted leaf area (ILA) can be represented by the following equation, where γ is derived from the fitting exercise done using Equation 2:

$$ILA_i = \frac{2\tan(\omega)\times\tan(\psi)\times(L_i+\gamma)^2}{\tan(\omega)+\tan(\psi)} \quad \text{Equation 5}$$

1.3.6 Modelling at the plant scale

Chlorosis and necrosis were limited to leaves and portions of leaf blades directly in line with a spot of stem canker, indicating vertical symptoms were limited to vascular bundles specifically affected, with little or no lateral effect as observed by Herr *et al.* (1983). Net photosynthesis of the leaf immediately below the infected leaf did not seem to be affected by the injury whereas the photosynthesis of leaves above it decreased (Figure V. 7). This is in keeping with the fact that the favourite tissue for the pathogen to grow in is the phloem (Heller and Gierth, 2001). Sunflower phyllotaxy is opposite-decussate for the first six leaves and the rest arise from a spiral at intervals of 2/5 of a circle (Seiler, 1997).

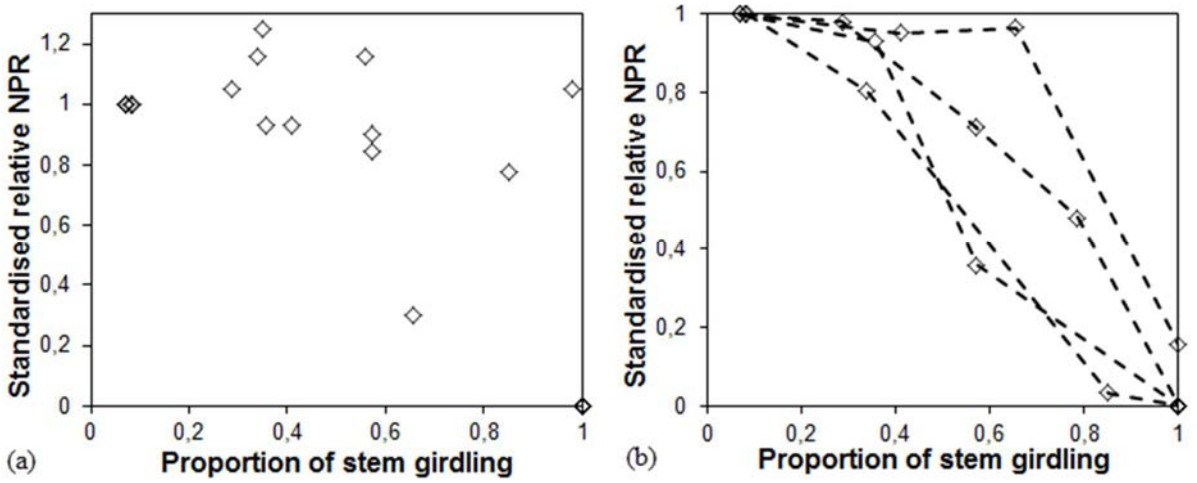


Figure V. 7. Standardised relative NPR of the leaf below (a) and above (b) the infected one related to the proportion of stem girdling from the infected leaf for cv. Alhaja. Each line represents a plant.

First, the position of the upper leaf compared with the contaminated leaf, expressed in terms of the trigonometric angle, can be calculated as follows when the infected leaf is above the 6th:

$$\theta_{\text{upper leaf n}} = \left| Integerpart\left(\frac{Mod\left(n-n_k,5\right)}{2}\right) - \frac{2}{5} Mod\left(n-n_k,5\right)\right| \times \Pi \quad \text{Equation 6}$$

With n: rank of the considered upper leaf; n_k: rank of the infected leaf from the stem base; $\theta_{\text{upper leaf n}}$: trigonometric angle between the infected leaf and the uppermost leaf considered; Integerpart: the integer part of the argument; Mod: the modulo of the arguments.

The horizontal distance between the uppermost leaf considered and the vertical projection of the necrosis D as a function of thermal time (12°C base) can be calculated as follows:

$$D(t) = \theta_{\text{upper leaf n}} \times r - girdling \times t \times 0.5 \quad \text{Equation 7}$$

With r: radius of the sunflower stem; girdling: 0.36 ± 0.01 mm °Cd^{-1} for cv. Alhaja (no value was calculated for cv. Bollil due to the absence of girdling stem symptoms).

One leaf became photosynthetically inactive when it was located over a spot of stem canker i.e. when the common vascular bundles supplying both the leaf and the spot of leaf canker became necrotic.

The following equations describe the net relative photosynthesis decrease in a leaf located above a contaminated leaf:

If D(t) > 0, *ratio* = 1;

If D(t) ≤ 0, and if $\frac{(a-1)2\Pi \times r}{a \times girdling} \leq t$, *ratio* = 1 else $ratio = -a\frac{girdling \times t}{2\Pi \times r} + a$ Equation 8

If *girdling* x $t \geq 2\Pi \times r$, *ratio* = 0

with a = 1.45 (dimensionless), the value found with a model efficiency of 0.87, RMSE = 0.144 and bias = 0.015.

1.4 Discussion

1.4.1 Disease progression in relation to genotypic susceptibility

The proximal area (close to the infection point) was quickly affected by the pathogen for both cultivars. However, the distal area was affected later on the resistant cultivar than on the susceptible one. As the two cultivars have similar leaf sizes, this can be explained only by the difference in necrosis progression, which was slower for the resistant cultivar. Consequently, fungal growth had significantly different rates for the two cultivars, ranging between 4 and 8 mm day^{-1}. Degener *et al.* (1999) observed similar rates for a range of inbred lines of sunflower injured by *Phomopsis helianthi*.

The transient NPR increase on median and distal areas could result from a compensation of photosynthesis in healthy areas as observed by Philip and Devadath (1981) on rice infected by bacterial blight.

The cultivar difference in parameter γ clearly showed that photosynthetic impairment at a given disease severity was greater in cv. Alhaja (S) than in cv. Bollil (R). The causes for the disproportionately large metabolic effects of *Phomopsis helianthi* are unclear, but contrasts in γ values imply that underlying mechanisms, associated either with the pathogen or host response, differed between cultivars. The underlying mechanisms of leaf resistance remain largely unknown. This resistance may be influenced by the structure of the cells (Duletic-Lausevic and Mihaljcevic, 1997) as well as phenolic components (Bertrand and Tourvieille de Labrouhe, 1987).

1.4.2 Model evaluation

The geometrical model gave a good representation of the effects of *Phomopsis helianthi* with simple hypotheses. Parameters used were genotype-dependent. If the generic parameters were used, the model efficiency of Equation 6 would fall to 0.46, RMSE = 2225.5 mm^2 and bias = -1109.5 mm^2. A better representation would have been obtained without fixing the necrosis angle but it would have increased the number of parameters in the model.

The values of parameter γ we found are in agreement with the size of the seal of the chamber of the LI-COR 6400 (8 mm) and explain why no long distance impact was found.

Another model could be built to represent a decrease in the impact of the toxin from the necrosis front to the remaining green tissue. The reduction in leaf photosynthesis would be complete at the front of the visible necrotic lesion and nil at the front of the virtual lesion. A linear, polynomial, or exponentially decreasing function could be used to represent the NPR reduction as a function of the distance to the front of the visible lesion. This model would maybe rely on more realistic assumptions, but the goodness of fit of the proposed model was already good and this would have led to a higher level of complexity in the modelling of the considered damage mechanism. The all-or-none model proposed therefore appeared to be more relevant.

Our results can be compared with other studies using the β concept since the γ concept is not pathosystem-specific and γ values can be derived from published β values for diseases that cause spots:

$$\beta = \frac{\Pi(r+\gamma)^2}{\Pi r^2} \quad \text{Equation 9}$$

$$\gamma = r\left(\sqrt{\beta} - 1\right) \quad \text{Equation 10}$$

γ value can be calculated as for *Puccinia triticina* on wheat: β_{rust} is close to 2 (Robert et al., 2004) and maximal lesion size is around 4 mm² at a very low lesion density (Robert et al., 2002) which corresponds to a radius of r_{rust} = 1.1 mm. The resulting γ value is γ_{rust} = 0.5 mm.

Bassanezi *et al.* (2001) suggested that pathogens might be classified according to their impact on the host functions via their β values (Bastiaans, 1991). Plant pathogens were divided into three groups: a first group, the rusts, with β values around 1-2, suggesting a limited effect of the disease beyond the lesions; a second group, composed of some necrotrophic and hemibiotrophic pathogens with β values around 3-4, producing toxic compounds that diffuse locally and disintegrate plant cells within the lesions, which prevents local water flow; and lastly, a group including pathogens with very high β values, which affect the vascular system of the host and hinder water flow.

Comparing γ values obtained for *Puccinia triticina* and *Phomopsis helianthi*, the same classification could be made according to the γ values. The advantage of γ compared with β is that the proposed formalism has a biological meaning: γ gives the orthogonal distance from the necrotic lesion front to the front of the area where the pathogen still prevents photosynthesis.

Until now, damage caused by Phomopsis stem canker has been only related to the proportion of plants with a girdling spot on the stem. The impact of leaf injuries had never been studied.

The present study quantified the relationship between the severity of foliar Phomopsis symptoms and the reduction of photosynthetically active leaf area. Our results on short distance effect are consistent with chlorotic halo generally observed down the mycelium front at leaf level. After validation, the damage mechanism model could be integrated into sunflower crop models such as SUNFLO (Casadebaig et al., 2011). This study thus improves our understanding of an important damage mechanism and will help predict yield loss caused by Phomopsis stem canker.

1.5 Conséquences pour le modèle « phomopsis »

La vitesse de progression a été calculée en fonction de l'avancement de la nécrose sur la nervure centrale. A partir de cette longueur de nécrose est calculée une surface de limbe impactée prenant en compte à la fois la surface foliaire nécrosée et la surface foliaire verte dont le niveau de photosynthèse est nul.

2 Effets des infections de phoma sur la dynamique de sénescence du tournesol

L'impact du phoma sur la dynamique de sénescence des feuilles a été évalué en serre en comparant la date de sénescence des feuilles contaminées avec celle du témoin sain sur deux variétés *a priori* contrastées (SAuz11 et SGri12; Tableau III. 2).

2.1 Influence de la date de contamination par le phoma

La sénescence des séries contaminées précocement est significativement plus rapide pour les deux expérimentations que les séries contaminées tardivement et que le témoin. Pour la feuille 6, la sénescence de la feuille est avancée d'environ 9 jours par rapport aux témoins pour la première date de contamination alors qu'il n'existe plus de différence par rapport au témoin à partir de la 4ème date.

2.2 Influence du génotype

Pour Grignon, la sénescence des feuilles suite à leur contamination est significativement plus rapide pour Kill que pour Sikllos CL, la différence pouvant atteindre 10 jours sur les contaminations de la 1ère série au niveau de la feuille 6. Cependant, la sénescence arrive

également plus rapidement pour Kill que Sikllos CL sur les témoins (en l'absence de phoma) alors que les variétés sont de même précocité. Pour Auzeville, il n'existe pas d'effet variétal significatif sur la vitesse de sénescence des feuilles.
Ces résultats sont en adéquation avec la dynamique de progression du champignon.

2.3 Influence du statut azoté

Il n'existe pas de différence de vitesse de sénescence entre les deux modalités d'azote pour les deux expérimentations.

2.4 Influence de l'âge de la feuille infectée

Pour les deux expérimentations, la position de la feuille infectée sur la plante influe de manière significative sur sa vitesse de sénescence.
Pour Kill, la sénescence de la feuille 6 est avancée de 12 à 13 jours par rapport au témoin alors qu'il n'existe pas de différence pour la feuille 9 et une différence de 1 jour pour la feuille 10. Même si la tendance est la même pour Sikllos CL, la différence de vitesse de sénescence est moins marquée : entre 5 et 6 jours pour la feuille 6 et pas de différence à 1 jour d'écart pour la feuille 9 pour la première date de contamination (Tableau V. 1).

2.5 Conséquences pour le modèle « phoma »

- Il existe un gradient de vitesse de sénescence de la feuille infectée. La sénescence de la feuille est d'autant plus prématurée que la feuille est âgée. La vitesse de sénescence des feuilles de la strate 1 est accélérée de 12 jours en présence de *Phoma*, ce qui correspond à une vingtaine de jours après l'infection.

Tableau V. 1. Nombre de jours d'écart entre la sénescence de la feuille témoin et celle de la feuille infectée pour les étages foliaires 6 et 9 sur les variétés Kill et Sikllos CL en fonction du stade de la série au moment de l'infection à Auzeville (a) et Grignon (b).

(a)

Stade de la série lors de l'infection	Etage foliaire	cv. Kill		Moyenne cv. Kill	cv. Sikllos CL		Moyenne cv. Sikllos CL	Moyenne totale
		N0	N150		N0	N150		
pré-E1	6	8.9	15.0	11.9	4.8	5.4	5.1	8.5
	9	-0.3	-0.2	-0.2	0.1	1.0	0.5	0.2
E1	6	3.7	2.5	3.2	6.1	7.1	6.6	4.9
	9	-0.3	-0.2	-0.2	0.9	0.0	0.5	0.1
E3	6	0.3	7.0	3.6	2.3	5.4	3.8	3.7
	9	0.3	-0.2	0.0	1.8	1.8	1.8	0.9
E5	6	-4.0	-0.3	-2.1	-2.1	-1.3	-1.7	-1.9
	9	-0.3	-0.2	-0.2	-0.4	0.0	-0.2	-0.2

(b)

Stade de la série lors de l'infection	Etage foliaire	cv. Kill		Moyenne cv. Kill	cv. Sikllos CL		Moyenne cv. Sikllos CL	Moyenne totale
		N0	N150		N0	N150		
E1	6	14.7	10.8	12.8	6.3	5.7	6.0	9.4
	9	0.8	0.5	0.7	-2.0	5.7	1.8	1.3
E2	6	18.3	8.2	13.6	7.5	-2.2	2.7	7.7
	9	4.8	6.9	5.9	1.7	6.7	4.2	4.8
E3-E4	6	16.2	9.2	12.9	7.3	2.8	5.1	8.6
	9	2.5	-0.1	1.4	1.2	-0.2	0.5	0.8
E5	6	-1.0	-4.7	-2.8	-2.3	-0.8	-1.5	-1.8
	9	-4.0	-7.8	-5.9	-3.0	-6.3	-4.6	-5.2

Chapitre VI. Discussion et perspectives

Les résultats des expérimentations en serre et au champ ont permis de préciser les variables clés dans la représentation des interactions entre la conduite, le développement de la plante et le développement des maladies.

Le schéma conceptuel du module épidémiologique pour le phomopsis et le phoma du tournesol figurant ces interactions est représenté à la Figure VI. 1. Ce schéma est composé des 5 modules reprenant les principales étapes du cycle de développement des agents pathogènes : (i) maturation des organes de reproduction sexuée et libération/transport de l'inoculum primaire (« Inoculum primaire »), (ii) pollution du couvert (« Pollution »), (iii) infection des organes sensibles (« Infection »), (iv) expression des dégâts (« Dégâts »), (v) mécanismes de dommage (« Dommages »).

Chacun de ces modules permet la simulation de processus (représentés en violet) alimentés soit par des variables d'entrée liées au climat (Pluie, T : température de l'air, HR : humidité relative de l'air), soit par des variables d'état simulées par SUNFLO (stade phénologique, surface foliaire) ou liées au microclimat (HRc : humidité relative sous couvert, Tc : température sous couvert).

Le module « inoculum primaire » permet de prévoir la concentration atmosphérique en ascospores à partir du niveau de risque des maladies à l'échelle du territoire, et de variables climatiques : la pluie, la température et l'humidité relative. Cette variable permet de renseigner le module « pollution », qui, à partir d'une description des organes récepteurs, permet de simuler la quantité d'ascospores interceptée. En fonction d'un sous-module « mortalité », dépendant de l'application ou non de fongicides et de la durée de survie d'une ascospore, la quantité d'ascospores viables sur le couvert est calculée par le module « infection ». En fonction de la réceptivité des tissus, d'une variable climatique (la pluie) et de variables microclimatiques (l'humidité relative et la température dans le couvert), l'incidence de la maladie est calculée par le module « infection ». La dynamique des dégâts est calculée en fonction de la sensibilité variétale et de la température sous couvert,. Cette dynamique permet de représenter les dommages engendrés (réduction de la surface photosynthétiquement active et de l'efficience de conversion) par le pourcentage de surface foliaire nécrosée et le pourcentage d'encerclement des tiges (module « dommage »).

Ce schéma conceptuel pourra servir de base à la formalisation d'un modèle numérique permettant de simuler les effets de la conduite et de l'environnement sur la mise en place des épidémies puis les relations dégâts-dommages résultantes.

On se propose dans ce chapitre final de dresser les grandes lignes de ce modèle couplé.

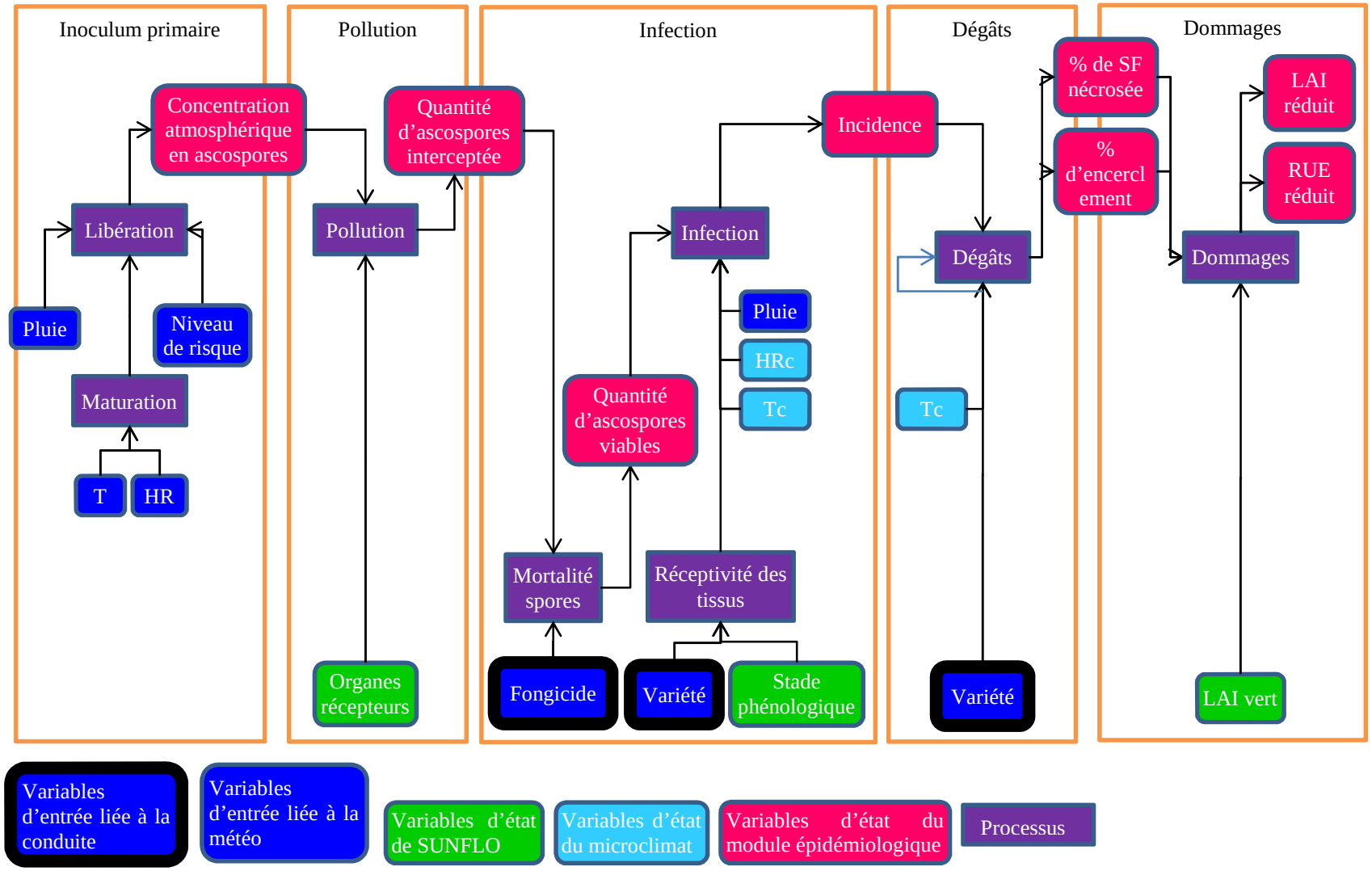


Figure VI. 1. Schéma conceptuel du module épidémiologique

1 Inoculum primaire

1.1 Phomopsis

La qualité prédictive des équations du module « Champignon » d'Asphodel (Délos et Moinard, 1997a) pour simuler le niveau de maturation des asques et les dates de projection des ascospores de *Phomopsis* a été confirmée par les piégeages réalisés au cours des deux années d'expérimentation. La robustesse de ce module a également été confirmée par une utilisation opérationnelle depuis la fin des années 90.

Le modèle fonctionne avec des données météorologiques trihoraires (i.e. enregistrées toutes les 3 heures : 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h) et journalières. Les variables d'entrée d'Asphodel sont : la pluviométrie journalière ($Pluie_i$), la température moyenne journalière (Tm_i), la température trihoraire (Tx_{ij}) et l'humidité relative trihoraire (Hx_{ij}).

1.1.1 Maturation des asques de *Phomopsis*

Les équations de ce sous-module permettent de simuler l'évolution de la proportion d'asques mûrs sous la forme d'un indice de maturation.

Le nombre journalier de périodes de 3h consécutives favorables à la maturation au cours du jour *i*, et utilisé dans le calcul de la maturation des asques (Nhf_i), est déterminé par l'algorithme suivant :

$$Nhf_i = \sum_{j=1}^{j=8} 3\,\partial_{jk}$$

Où ∂_{jk} est le symbole de Kronecker avec k = j si $Hx_{ij} \geq Hx_0$ et $Tx_{ij} > Tx_0$, avec Hx_0 = 85% et Tx_0 = 10°C ; k ≠ j sinon ; Hx_0 et Tx_0 sont des paramètres qui ont été estimés par ajustement par le SRPV Midi-Pyrénées ; j est l'indice ordonné du nombre de périodes de 3 heures contenues dans une journée, à partir de minuit (exclu) ; Hx_{ij} est l'humidité relative mesurée au jour i, à la fin de la période j ; Tx_{ij} est la température mesurée au jour i, à la fin de la période j ; Nhf_i est initialisée à 0 à chaque début de journée.

A partir de ce cumul, un indice hygrométrique journalier est calculé de la façon suivante :

Si $Nhf_i > Nhf_0$ alors $ih_i = \frac{Nhf_i - Nhf_0}{Nh - Nhf_0}$;

sinon $ih_i = 0$;

avec Nhf_0 = 6 : nombre d'heures seuil ; Nh=24 : nombre d'heures dans une journée.

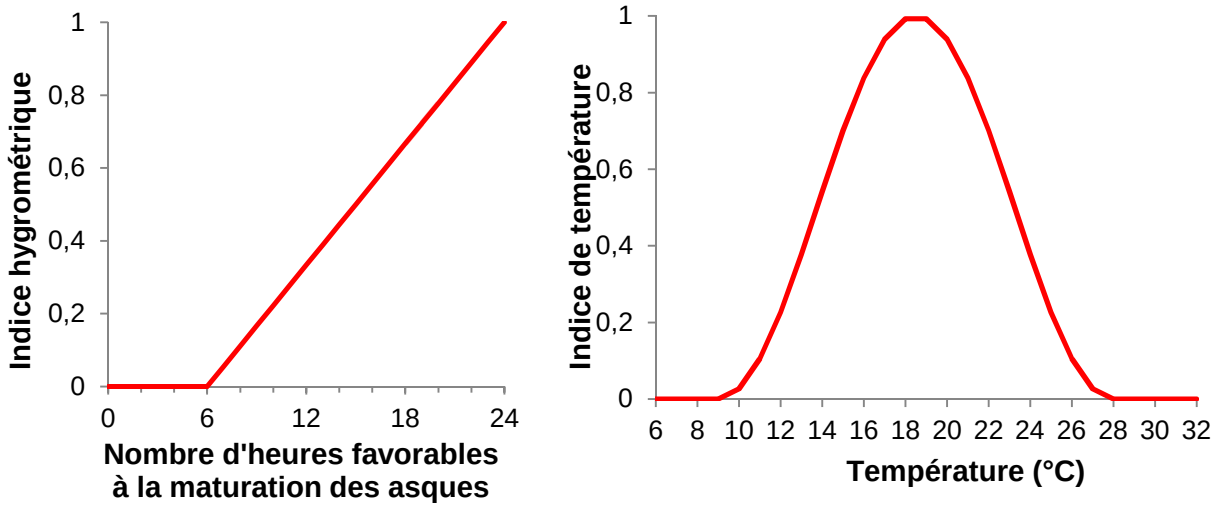


Figure VI. 2. Représentation graphique des indices hygrométrique (a) et thermique (b)

Un indice de température journalier (it_i) est calculé en fonction de la température moyenne (Tm_i) du jour i (Figure VI. 2):

Si Tmin < Tm_i < Tmax alors $it_i = \frac{1}{2}\left[1 + \cos\left[\frac{2\pi(Tm_i - Topt)}{Tmax - Tmin}\right]\right]$, sinon $it_i = 0$

Avec *Topt* = 18.5°C : température optimale pour la maturation des asques ; *Tmin* =9°C: température minimale pour la maturation des asques ; et *Tmax* = 28°C : température maximale pour la maturation des asques.

Le produit de ces deux indices donne l'indice de maturation journalier (im_i) :

$$\mathrm{im}_i = \mathrm{it}_i \times \mathrm{ih}_i$$

Le seuil de maturation est simulé à partir du cumul des indices de maturation journalier :

$$\mathrm{imcum}_i = \sum_{n=1}^{n=i} \mathrm{im}_n$$

Lorsque le cumul des indices de maturation journalier dépasse 3.7, le seuil de 50% d'asques mûrs est déclaré atteint par le modèle. Cet état est caractérisé par la variable binaire « mat ».

$$\mathrm{mat} = \partial_{\mathrm{jk}}$$

avec j = k si $\mathrm{imcum}_i > 3.7$ et k ≠ j sinon.

1.1.2 Projection des ascospores

Ce sous-module prédit les dates de projection d'ascospores de *Phomopsis*. Pour qu'une première projection ait lieu, il faut que le seuil de 50% d'asques mûrs soit atteint et qu'une pluie supérieure à 0.5 mm ait lieu au jour considéré.

Les projections suivantes sont possibles si les périthèces sont rechargés en asques mûrs.
La variable « recharge », qui représente la proportion de périthèces mûrs, est initialisée à 0.5 en début de simulation (le 1er février de l'année considérée). Ce choix est justifié par le fait que la variable « recharge » n'est mobilisée qu'après la première projection d'ascospores. Le fait qu'une émission d'ascospores ait lieu au jour i, est caractérisé par la variable binaire « $proj_i$ ».

$$proj_i = \partial_{jk}$$

avec j = k si ($imcum_i > 0.4$ ou $recharge_i > 0.4$) et ($Pluie_i > 0.5$ mm et mat = 1), et k ≠ j sinon.

Si $proj_i = 1$, alors $recharge_i = 0$, sinon $recharge_i = 0.5 + \partial_{jk}\left(\sum_{n=n_0^i}^{n=i} im_n - 0.5\right)$

Où n_0^i est l'indice correspondant au jour suivant la dernière projection simulée ; ∂_{jk} est le symbole de Kronecker avec j ≠ k si la première projection n'a pas encore eu lieu et j = k sinon.

1.2 Phoma

Les facteurs impactant la dynamique d'émission des ascospores de *Phoma* n'ont pas un effet aussi tranché que pour le phomopsis du tournesol ou le phoma du colza. Certes, les pluies favorisent les émissions d'ascospores mais des émissions significatives sont également observées après des jours sans pluie.

Un modèle basé sur des cumuls de température développé en Suisse (Frei, 2010) montre ses limites pour une utilisation dans les conditions climatiques de Midi-Pyrénées. Les dates du premier vol important d'ascospores prédites par le modèle varieraient à Toulouse entre fin novembre et début janvier selon les années (Tableau VI. 1), période durant laquelle le taux de 50% d'asques mûrs est loin d'être atteint dans nos conditions. Ce modèle simple, trop dépendant des conditions dans lesquelles il a été établi, n'est donc pas valide pour le Sud-Ouest de la France.

Du fait de la proximité entre les 2 champignons, nous avons utilisé le formalisme d'Asphodel paramétré pour le phomopsis pour prédire les émissions d'ascospores pour le phoma du tournesol. L'efficience d'Asphodel à prédire la dynamique de maturation des asques de phoma jusqu'au seuil de 50% est de 0.51 avec un biais de -1.77 et une RMSEp de 14.66%. Cependant, le décalage de prédiction du seuil de 50% d'asques mûrs est souvent

inférieur à une semaine (Tableau VI. 1). L'efficience du modèle à prédire la date à laquelle 50% des asques seront mûrs est de 0.66 avec un biais nul et une RMSEp de 7.38 jours. Le modèle est capable de reproduire la variabilité interannuelle avec des années où le seuil est obtenu tardivement (1998) et d'autres où il est obtenu précocement (2011). De ce fait, ce modèle, conçu pour le phomopsis du tournesol, pourrait être paramétré pour le phoma du tournesol une fois que les conditions permettant de renseigner les paramètres seront connus (notamment la température minimale inhibant la maturation des pseudothèces et la température optimale).

Tableau VI. 1. Résultats des simulations de la date à laquelle 50% des asques de phoma sont mûrs selon 3 modèles.

	1996	1998	1999	2000	2011
Observé	30/04/96	14/05/98	27/04/99	04/05/00	Autour du 06/04/11
Temps thermique (modèle Frei)	17/10/95 23/11/95	18/10/97 26/11/97	3/11/98 8/01/99	28/10/99 25/12/99	02/11/10 08/01/11
Asphodel	07/05/96	01/05/98	03/05/99	07/05/00	03/04/11
SimMat	20/04/96	06/04/98	29/03/99	04/04/00	27/03/11

Le modèle SimMat (Aubertot et al., 2006b) a été testé après une adaptation de ses paramètres au cas du phoma du tournesol. La qualité prédictive du modèle après optimisation de ses paramètres a été évaluée sur le même jeu de données qu'Asphodel afin de pouvoir comparer les performances des deux modèles. L'efficience de SimMat pour prédire la dynamique de maturation des asques de *Phoma* jusqu'au seuil de 50% est négative avec un biais de -40.12 et une RMSEp de 42.0%. Le décalage de prédiction du seuil de 50% d'asques mûrs varie entre 10 jours et plus d'un mois, ce qui montre que le formalisme de ce modèle ne semble pas adapté à la modélisation de la dynamique de maturation des asques de *Phoma*.

Le modèle SimMat a été initialement conçu pour prévoir la maturation des pseudothèces de *Phoma* du colza en Australie, où les données météorologiques ne sont pas disponibles avec une résolution spatiale élevée. Les données météorologiques nécessaires à son fonctionnement sont faciles d'accès, contrairement à la variable humidité relative mobilisée dans Asphodel, qui n'est pas toujours mesurée dans les stations météorologiques. Les

variables d'entrée des deux modèles sont donc différentes en ce qui concerne la prise en compte du facteur hydrique. Asphodel nécessite une variable décrivant de manière plus précise les conditions hydriques (i.e. l'humidité relative), mais plus difficile d'accès. SimMat mobilise la pluie journalière, qui est plus facile d'accès mais est certainement moins intégrative que l'humidité relative et représente donc moins précisément les conditions environnementales dans lesquelles l'agent pathogène se développe. Contrairement à Asphodel, SimMat ne considère que deux valeurs possibles par jour (favorable ou non à la maturation). Ceci pourrait également expliquer la différence de performances observée entre les deux modèles.

L'acquisition d'information complémentaire sur l'impact de la température et de l'humidité relative sur la vitesse de maturation des pseudothèces de *Phoma* est nécessaire pour calibrer le modèle Asphodel pour le phoma et améliorer la qualité prédictive du seuil de 50% d'asques mûrs. Une étude menée par Mühlberger (1996) a montré que la température minimale nécessaire à la maturation des asques de phoma est comprise entre 6°C et 13°C. La vitesse de maturation des asques dépend de la température et est plus rapide à 18°C qu'à 13°C, ce qu'Asphodel peut prendre en compte, contrairement à SimMat compte tenu de sa discrétisation journalière. Il reste à déterminer précisément les trois températures cardinales pour la maturation des asques de *Phoma*.

Que ce soit pour le phomopsis ou le phoma, les modèles cités précédemment ne permettent que de prédire à partir de quelle période on aura des projections d'ascospores significatives et les jours concernés par ces projections. Ils font l'hypothèse que l'inoculum n'est pas limitant, ce qui est certainement le cas pour les parcelles du Sud-Ouest de la France, compte tenu des systèmes de culture, avec un fréquent retour du tournesol et la présence de pailles de tournesol en surface sur le blé suivant. Cependant, suite à des évènements climatiques comme la sécheresse de 2003, le niveau d'inoculum peut chuter brusquement et se retrouver limitant les années suivantes. De plus, l'utilisation de variétés dites résistantes (ou très peu sensibles), engendrant un nombre de lésions sur tige moins importants et donc limitant le nombre de résidus porteurs d'inoculum pour l'année suivante, tend à épuiser progressivement le stock d'inoculum disponible au niveau régional. Ceci est moins critique pour le phoma dont l'inoculum reste bien présent chaque année car les attaques sont moins dépendantes du climat et de la variété (Jouffret, 2005a). Une prise en compte de la

concentration atmosphérique en ascospores est donc nécessaire pour rendre compte au mieux de la pression en inoculum qui s'exerce dans la parcelle considérée. Or, cette variable est difficile et chronophage à mesurer. De plus, sa modélisation est également difficile compte tenu du nombre élevé de facteurs dont elle dépend.

A ce stade, le niveau d'allo-inoculum serait une variable d'entrée du modèle et pourrait, à terme, être prévu par un assemblage de modules, à l'instar du modèle SIPPOM développé sur colza (Lo-Pelzer et al., 2010). Afin de faciliter l'utilisation du modèle, trois niveaux d'inoculum arrivant sur la parcelle, caractérisés par la concentration atmosphérique en ascospores, pourraient être proposés. L'utilisateur pourrait donc utiliser en variable d'entrée soit une dynamique de concentration atmosphérique en ascospores, soit un des trois niveaux maximum correspondant à des niveaux de risque faible, moyen et fort. La dynamique de la concentration en ascospores sera donc directement renseignée par l'utilisateur du modèle (des progrès sont attendus dans le piégeage et la détermination de la concentration en spores par qPCR, travaux en cours au CETIOM), soit prédite par le modèle Asphodel (Délos et Moinard, 1997a) couplé à un niveau de concentration maximum associé à un niveau de risque dépendant de la situation de production considérée. Pour le phoma, ces trois niveaux sont de 1000, 200 et 10 ascospores m^{-3} pour les niveaux de risque fort, moyen et faible, respectivement (source : CETIOM/DGAL). Pour le phomopsis, ces trois niveaux sont de 4000, 300 et 15 ascospores m^{-3} pour les niveaux de risque fort, moyen et faible, respectivement (source : CETIOM/DGAL). Les valeurs numériques de ces 3 variables (x 2 maladies) ont été déterminées en considérant la valeur maximale mesurée sur plusieurs années (niveau de risque fort) ; le seuil à partir duquel on considère qu'il s'agit d'une projection significative (niveau de risque faible) ; les niveaux moyens généralement observés (niveau de risque moyen, CETIOM, communication personnelle).

Dans le cas du phomopsis, si l'utilisateur ne disposait pas de données sur la concentration atmosphérique en ascospores, les jours d'émission seraient prédits par le modèle Asphodel (Délos et Moinard, 1997a), associé aux niveaux précisés précédemment. Une fois le seuil de 50 % d'asques mûrs atteint, toute pluie supérieure à 0.5 mm entraînerait des projections d'ascospores significatives (Délos et al., 1998; Moinard et Eychenne, 1998). Une fois la projection déclenchée, une équation de recharge permettrait de simuler l'épuisement des périthèces matures suite à la libération d'ascospores.

De manière similaire, dans le cas du phoma, si l'utilisateur ne disposait pas de données sur la concentration atmosphérique en ascospores, les jours d'émission seraient prédits par le modèle Asphodel (Délos et Moinard, 1997a) avec des paramètres adaptés cette maladie.

Ainsi, en sortie du module « Inoculum primaire », une concentration atmosphérique journalière en ascospores serait prévue pour les deux champignons.

2 Pollution

Le mécanisme de pollution des feuilles et/ou augets de la plante par les ascospores n'a pas été étudié dans ce travail. Cependant, nous proposons un formalisme préliminaire pour le représenter.

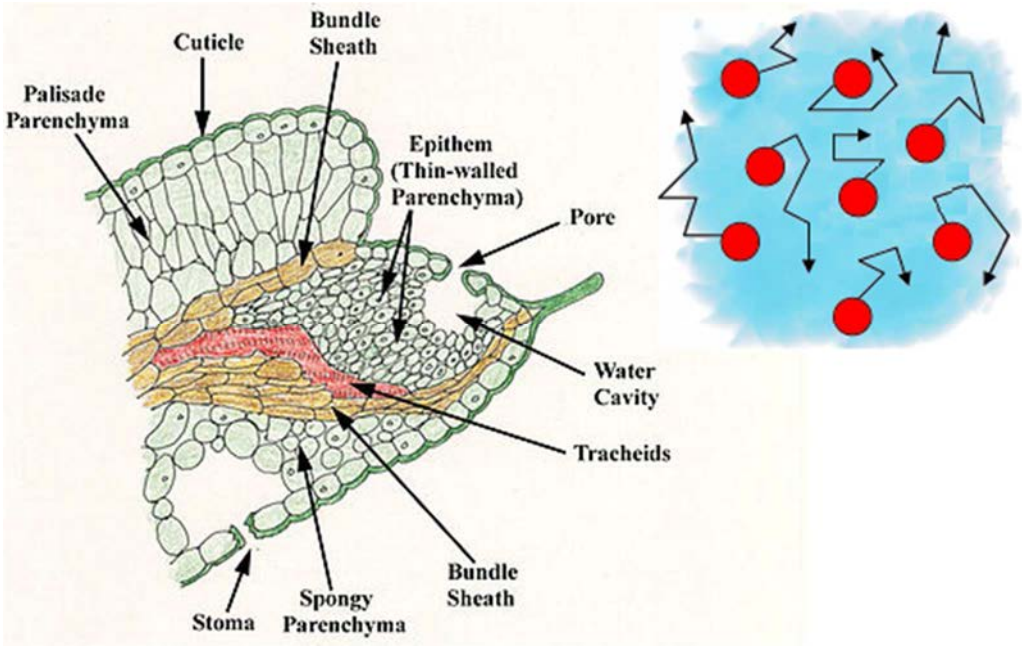


Figure VI. 3. Ascospores mues par un mouvement brownien à proximité d'un hydathode

Dans le cas du phomopsis, les infections se font essentiellement par le biais des hydathodes, situés sur la bordure des limbes. En faisant l'hypothèse que les ascospores de *Phomopsis* se déplacent selon un mouvement brownien, à vitesse constante dans l'atmosphère, on peut calculer le taux d'ascospores interceptées par les bordures de limbe sur une unité de surface de sol en un jour. Dans ce cas, la probabilité d'interception des ascospores par les bordures de limbe est directement proportionnelle à la surface totale de ces bordures par unité de surface de sol et à la vitesse moyenne correspondant au flux engendré par le mouvement brownien sur ces surfaces (Figure VI. 3). La surface totale des bordures de limbe est

accessible à la mesure (somme des produits du périmètre des limbes par leur épaisseur) et dépend des états de croissance du couvert. La vitesse moyenne du flux des ascospores mues par un mouvement brownien impactant les bordures de limbe peut être déterminée par ajustement à l'aide de jeux de données décrivant des taux d'infection foliaires, associés à des mesures de concentration atmosphérique en ascospores, connaissant la probabilité d'infection d'une ascospore (mesurable en conditions contrôlées). Il est entendu que cette dernière variable est théorique puisque le mouvement brownien supposé est peu réaliste : les mouvements individuels des ascospores sont en fait déterminés par les conditions microclimatiques (intensité et orientation du vent, mouvements convectifs de l'atmosphère, turbulence). Néanmoins, l'équation 1 permet de proposer une formalisation d'une relation entre la concentration atmosphérique en ascospores et la pollution du couvert.

$$n^{j}_{AscoHydat} = C^{j}_{AscoPhomo} dv_f eS\Delta t \sum_{i=1}^{i=n^{j}_{f}} p^{j}_{i} \quad \text{Eq. 1}$$

avec $n^{j}_{AscoHydat}$: nombre total d'ascospores en contact avec les hydathodes pendant la journée j (pollution) ; $C^{j}_{AscoPhomo}$: concentration atmosphérique en ascospores de *Phomopsis* au jour j ; *d* : densité de plantes par unité de surface de sol ; v_f : vitesse moyenne du flux équivalent associé au mouvement brownien des ascospores de *Phomopsis* impactant les bordures de feuille ; e : épaisseur des feuilles, supposée constante ; *S* : surface unitaire de sol ; *i* : indice pour désigner la feuille i ; n^{j}_{f} : nombre de feuilles par plante au jour *j* ; p^{j}_{i} : périmètre moyen de la feuille *i* au jour *j*.

Ce modèle repose sur les 3 hypothèses suivantes : (i) le mouvement des ascospores peut être assimilé à un mouvement brownien ; (ii) une fois en contact avec un hydathode, les ascospores ne peuvent plus quitter la surface impactée ; (iii) la concentration atmosphérique en ascospores moyenne journalière n'est pas modifiée par ce dépôt compte tenu des échanges atmosphériques à une plus large échelle.

Les variables de l'équation 1 sont toutes accessibles à la mesure, sauf v_f, la vitesse moyenne du flux équivalent associé au mouvement brownien des ascospores de phomopsis impactant les bordures de feuille. Ceci permettra d'en déterminer la valeur par ajustement.

Dans le cas du phoma, les ascospores pouvant contaminer la tige au niveau du point d'insertion du pétiole à partir d'un auget contenant de l'eau libre ont été majoritairement interceptées par le pétiole et/ou une fraction de limbe. Comme pour le phomopsis, on suppose que les ascospores se déplacent selon un mouvement brownien dans le couvert. Le

taux d'ascospores captées dans les augets en une journée est donc proportionnel à la concentration atmosphérique en ascospores et à la surface des organes de rang supérieur à l'auget considéré, dont le lessivage conduit les gouttes d'eau aux augets par gravité. Ces surfaces peuvent être déterminées à l'aide d'un modèle architecturé (*e.g.* Rey, 2003). La vitesse moyenne du flux des ascospores de phoma mues par un mouvement brownien impactant la partie du couvert conduisant les ascospores aux augets peut être déterminée par ajustement à partir de données décrivant des taux d'infection de tige, associés à des mesures de concentration atmosphérique en ascospores, connaissant la probabilité d'infection d'une ascospore (mesurable en conditions contrôlées). L'équation 2 permet de proposer une formalisation d'une relation entre la concentration atmosphérique en ascospores et la pollution du couvert :

$$n^{j}_{AscoAuget} = C^{j}_{AscoPhoma} d v_f S \Delta t \sum_{i=1}^{i=n^{j}_{f}} Sauget^{j}_{i} \quad \text{Eq. 2}$$

avec $n^{j}_{AscoAuget}$: nombre total d'ascospores en contact avec les augets pendant la journée j (pollution) ; $C^{j}_{AscoPhoma}$: concentration atmosphérique en ascospores de *Phoma* au jour j ; d : densité de plantes par unité de surface de sol ; v_f : vitesse moyenne du flux équivalent associé au mouvement brownien des ascospores de *Phoma* impactant la partie du couvert conduisant les ascospores aux augets ; S : surface unitaire de sol ; i : indice pour désigner la feuille i ; n^{j}_{f} : nombre de feuilles par plante au jour j ; $Sauget^{j}_{i}$: surface supérieure des organes de l'étage foliaire i dont le lessivage conduit les gouttes d'eau dans l'auget i par gravité au jour j.

Ce modèle repose sur les 3 hypothèses formulées précédemment pour le phomopsis.

Les variables de l'équation 2 sont toutes accessibles à la mesure, sauf v_f, la vitesse moyenne du flux équivalent associé au mouvement brownien des ascospores de phoma impactant les structures pétiolaires. Comme pour le phomopsis, ceci permettra d'en déterminer la valeur par ajustement. Compte tenu des hypothèses, v_f possèderait la même valeur pour les deux pathogènes.

Ainsi, le module « pollution » prévoirait le nombre journalier d'ascospores de phomopsis en contact avec les bordures de limbe par strate de peuplement et par unité de surface de sol. Pour le phoma, ce module prévoirait le nombre d'ascospores arrivant dans chaque auget en une journée.

3 Infection

3.1 Dynamiques des infections

3.1.1 Phomopsis

Une fois la bordure de limbe polluée par les ascospores, le nombre d'infections va dépendre des conditions microclimatiques (et notamment de l'humidité relative) de la strate dans laquelle se trouve la feuille, de l'application ou non d'un produit fongicide et du niveau de résistance de la variété.

Une fois le mycélium entré dans les vaisseaux conducteurs du limbe, le champignon progresse à une vitesse fonction de la température et du niveau de résistance de la variété. La distance que le champignon a à parcourir pour atteindre la tige est fonction de la conduite de culture (choix variétal, densité de peuplement, fertilisation azotée, irrigation) et de l'étage foliaire infecté.

Avant d'atteindre la tige, la progression du champignon sur limbe et pétiole peut être stoppée par (i) la présence de *Phoma* développé sur pétiole, (ii) la sénescence de la feuille (accélérée par le *Phoma* sur tige ou d'origine physiologique, qu'elle soit liée ou non à un facteur environnemental accélérateur) ou (iii) un mécanisme de résistance variétale qui limite la réussite du passage sur tige de l'infection (cf. Chap. IV § 1.1.3.5, pp. 101-106).

La représentation de l'ensemble des processus décrit précédemment nécessite un niveau de caractérisation qu'il n'est pas possible d'atteindre avec les données disponibles. De ce fait, nous avons choisi de proposer un formalisme simplifié en considérant une vitesse moyenne de progression du mycélium, dépendante de la température, dans les tissus végétaux. Ceci permet d'avoir une estimation de la durée nécessaire pour que le mycélium issu de la germination d'une ascospore atteigne la tige.

Afin de calculer la distance moyenne entre le point d'infection dans un hydathode et l'insertion du pétiole sur la tige, nous avons considéré un modèle géométrique simple de la feuille (Figure VI. 4). Ce modèle suppose que le limbe a une forme de triangle isocèle dont l'axe de symétrie est défini par la nervure centrale ; ce triangle étant défini par les longueurs L et l, ainsi que par l'angle α (Figure VI. 4). Par ailleurs, une fois qu'il a infecté un hydathode, le champignon progresse à l'intérieur des vaisseaux conducteurs. Nous faisons l'hypothèse qu'il progresse via les nervures principales qui relient la pointe des dentelures à la nervure centrale. Nous faisons également l'hypothèse que l'écartement entre les i_{max}

nervures principales sur la bordure du limbe est constant et que les angles entre la bordure du limbe et les nervures principales sont des angles droits tant qu'elles rejoignent la nervure centrale. Les nervures principales pour lesquelles l'hypothèse d'un angle droit ne conduirait pas directement à une intersection avec la nervure centrale sont directement connectées avec le point d'insertion du limbe sur le pétiole (Figure VI. 4). Sous ces hypothèses, et en considérant que chaque infection peut avoir lieu de manière équiprobable sur chaque nervure principale, nous allons calculer la distance moyenne que doit parcourir le champignon entre le point d'infection de la nervure principale i et la tige. Nous raisonnerons sur une demi-feuille de surface 0.5 SF compte tenu de la symétrie axiale de l'organe.

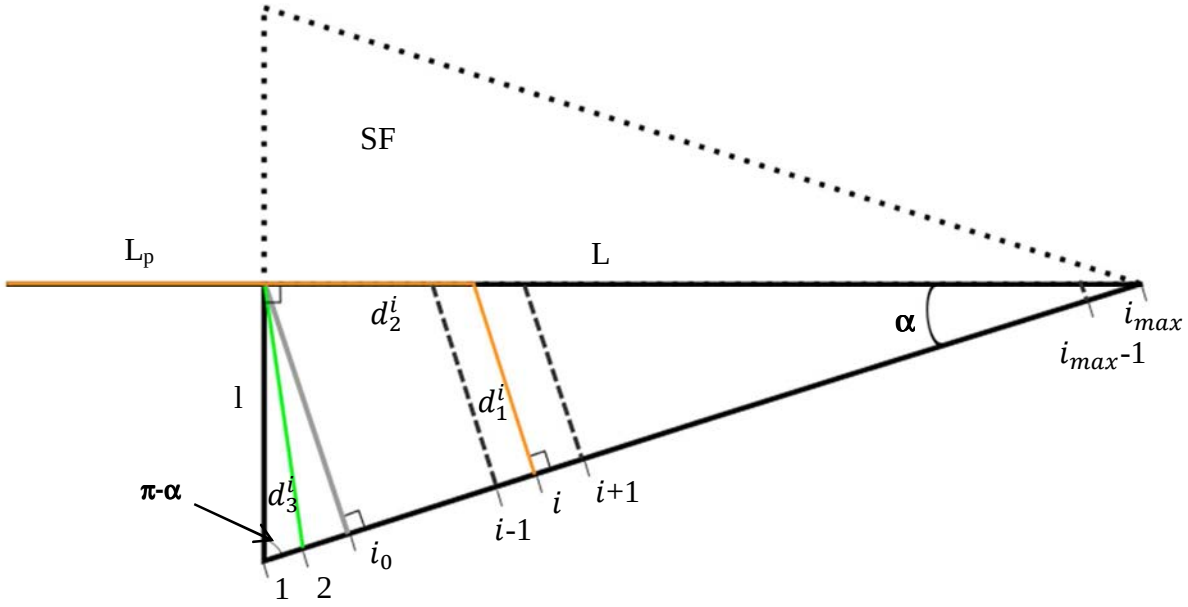


Figure VI. 4. Représentation graphique du modèle calculant la distance moyenne parcourue par le *Phomopsis* sur la feuille (de limbe de longueur L et de pétiole de longueur L_p) entre le point d'infection dans un hydathode et le point d'insertion du pétiole sur la tige.

Dans le cas où l'infection a lieu sur une nervure principale i rejoignant la nervure centrale avec un angle droit, la distance à parcourir s'écrit (Figure VI. 4) :

$$x_i = d_1^i + d_2^i + L_p$$

A l'aide des formules trigonométriques, on peut facilement montrer que :

$$d_1^i = \sqrt{\frac{SF}{\tan \propto}} \frac{(i_{max} - i) \sin \propto}{(i_{max} - 1) \cos^2 \propto}$$

$$d_2^i = \sqrt{\frac{SF}{\tan \propto}} \left[1 - \frac{(i_{max} - i)}{(i_{max} - 1) \cos^2 \propto}\right]$$

Dans le cas où l'infection a lieu sur une nervure principale i directement connectée au point d'insertion du limbe sur le pétiole (Figure VI. 4), la distance à parcourir s'écrit :

$$x_i = d_3^i + L_p$$

On peut facilement montrer que :

$$d_3^i = \sqrt{SF\left[\frac{(i-1)^2}{\cos\propto \sin\propto (i_{max}-1)^2} + \tan\propto + \frac{2(i-1)}{(i_{max}-1)}\right]}$$

On peut dès lors calculer la distance moyenne que le champignon doit parcourir depuis l'hydathode infecté jusqu'à la tige :

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{i=i_{max}} p_i\, x_i$$

où p_i représente la probabilité d'infection de la nervure principale i. Comme les ascospores sont supposées se déplacer de manière équivalente à un mouvement brownien, en moyenne, les infections sur les nervures principales sont équiprobables et l'on a :

$$p_i = \frac{1}{i_{max}}$$

On note i_0 la valeur de l'indice associé à la nervure principale à partir de laquelle les nervures ne sont plus directement connectées au point d'insertion du limbe sur le pétiole, c'est-à-dire l'indice associé à la première nervure principale qui forme un angle droit avec la bordure du limbe. Cette valeur s'écrit :

$$i_0 = 1 + \mathrm{ENT}[1 + \sin^2\propto (i_{max}-1)]$$

avec ENT : fonction permettant d'obtenir la partie entière.

La distance moyenne à parcourir s'écrit donc :

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{i=i_0-1} p_i\, x_i + \sum_{i=i_0}^{i=i_{max}} p_i\, x_i$$

$$\bar{x} = Lp + \frac{1}{i_{max}}\left[\sum_{i=1}^{i=i_0-1} d_3^i + \sum_{i=i_0}^{i=i_{max}} \left(d_1^i + d_2^i\right)\right]$$

Connaissant la vitesse de progressions du phomopsis sur limbe v_{phomo} , le temps moyen nécessaire au phomopsis pour atteindre la tige depuis le moment de l'infection de l'hydathode s'écrit :

$$\bar{\tau} = \frac{\bar{x}}{v_{phomo}}$$

avec v_{phomo} = 1.07 mm °Cj^{-1} pour un génotype sensible et 0.88 mm °Cj^{-1} pour un génotype résistant (cf. Chapitre IV. § 1.2).

3.1.2 Phoma

3.1.2.1 Phoma collet

Les résultats des expérimentations menées ne permettent pas de compléter les connaissances acquises sur cette forme d'infection durant la thèse de C. Seassau (2010). Les facteurs conditionnant l'infection du collet par le phoma ne sont pas suffisamment caractérisés pour nous permettre de représenter l'effet des conditions météorologiques de l'année et de la conduite sur la mise en place des infections. L'expérimentation au champ de 2010 apparaît comme atypique avec un faible nombre de collets infectés alors que les conditions printanières semblaient suffisamment pluvieuses. De même, en 2011, l'effet de l'azote n'apparaît pas aussi tranché que dans les expérimentations sur le dessèchement précoce conduites dans le cadre de la thèse de C. Seassau. Il semblerait que le niveau de développement du couvert et donc le microclimat puisse avoir un poids plus important qu'estimé initialement. De ce fait, une représentation possible du niveau de pieds secs est disponible via le modèle statistique simple proposé par Seassau et al. (2010; 2012) reliant le taux de pieds secs à la satisfaction du besoin hydrique (-), à l'indice de nutrition azotée à la floraison (+) et à la densité de peuplement (+). On pourrait considérer dans ce cas que seuls les pieds non concernés par le dessèchement précoce sont affectés par le phoma sur tige, car les dommages liés à ce syndrome sont plus élevés.

3.1.2.2 Phoma tige : une dynamique acropète

Les équations permettant de représenter la dynamique des infections causées par le phoma sur tige sont présentées dans le chapitre IV § 2.1.2.8, pp. 121-124.

Les contaminations par les ascospores de phoma dépendent de l'architecture de la plante en interaction avec le microclimat. Le statut azoté de la plante n'influe pas sur les dynamiques de contaminations. La taille des augets, qui constituent les réservoirs d'eau dans lesquels germent les spores, suit une distribution verticale comme pour les limbes avec un maximum situé entre les feuilles 10 et 15 (Rey, 2003). De plus, des blessures par éclatement des tissus peuvent apparaître dans les étages inférieurs (jusqu'à la feuille 6 en général) au niveau de l'insertion des pétioles sur la tige en cas de forte turgescence des tissus, constituant des

points d'entrée très favorables au phoma. Parallèlement, le microclimat forme un autre gradient avec des situations plus favorables en bas de couvert qu'au sommet de la plante. Il en résulte un gradient de conditions plus ou moins favorables aux contaminations acropètes comme cela est observé dans les dynamiques d'infection du champignon, pouvant expliquer pourquoi l'infection est stoppée à des nœuds variables selon les conduites de culture notamment.

Afin de tester l'influence de la taille de l'auget sur la durée de permanence de l'eau libre, les équations du modèle SWEB (Surface Wetness Energy Balance ; Magarey et al., 2006) pourraient être remobilisées pour calculer la durée nécessaire à l'évaporation du volume d'eau contenu dans un auget donné.

3.2 Représentation du microclimat

Le microclimat sera représenté avec les formalismes du modèle STICS (Simulateur mulTIdisciplinaire pour les Cultures Standard). STICS est un modèle de simulation du fonctionnement des cultures dans le système sol – plante – atmosphère, développé par l'INRA (Brisson et al., 2008). Il fonctionne à pas de temps journalier. Ses variables d'entrée sont relatives au climat, au sol et au système de culture. Ses variables de sortie sont relatives à la production (quantité et qualité), à l'environnement et à l'évolution des caractéristiques du sol sous l'effet de la culture. Son principal objectif est de simuler la production d'une parcelle agricole en fonction des variations du milieu et du système de culture. L'intérêt de STICS réside dans son caractère générique (adaptation à des cultures variées), robuste (capacité à simuler des conditions pédoclimatiques diverses sans générer de biais importants) et modulaire (possibilité d'ajouter de nouveaux modules). Il équivaut à une structure d'accueil de modules, représentant chacun un processus ou un ensemble de processus se déroulant au sein de la culture. Les grands processus simulés sont la croissance et le développement de la culture ainsi que les bilans hydrique et azoté.

La partie qui nous intéresse ici est sa capacité à simuler le microclimat sous couvert et notamment la température de culture et l'humidité relative sous le couvert (Figure VI. 5).

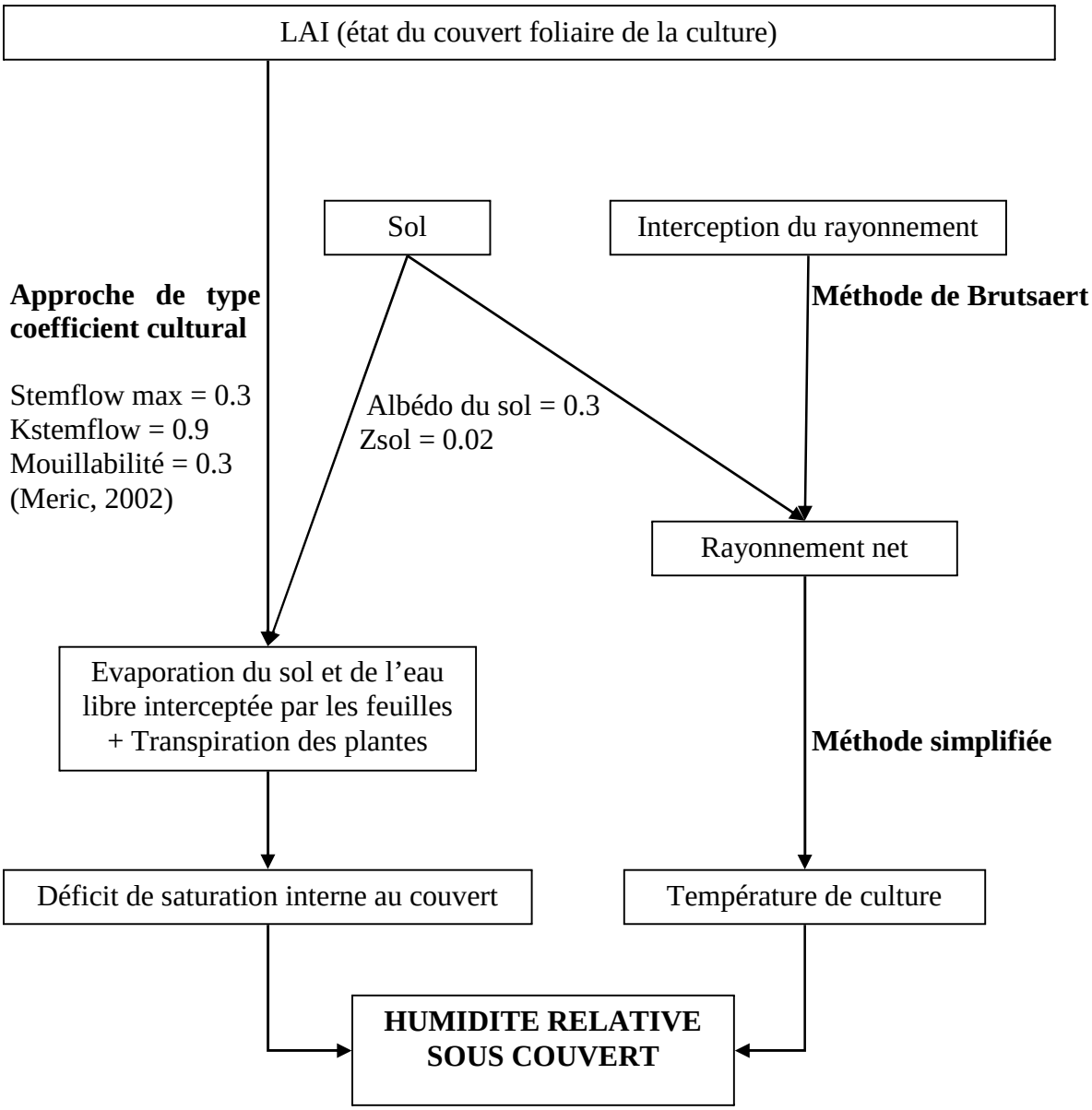


Figure VI. 5. Schéma récapitulatif du mode de calcul de l'humidité relative sous couvert par STICS

3.3 Résistance variétale

3.3.1 Phomopsis

La résistance variétale sera prise en compte via un paramètre variétal, compris entre 0 et 1 (1 correspondant à une variété très sensible). Ce paramètre retranscrira l'échelle de sensibilité utilisée pour classer les variétés selon leur sensibilité au phomopsis (de sensible à résistante). Il agira comme un facteur de réduction sur le taux d'infection potentiel.

3.3.2 Phoma

L'absence de classement des variétés vis-à-vis de leur sensibilité au phoma ne permet pas de prendre en compte des différences de comportement qui influent sur le nombre de nœuds foliaires touchés par la maladie. En l'absence de référence, il n'est pas possible de dire si la gamme de variétés testées au champ est représentative en termes de gamme de symptômes observés ou si ces variétés ont toutes un comportement médian malgré les différences observées.

L'effet résistance variétale ne sera pas pris en compte dans le modèle à ce stade. Lorsqu'un classement variétal pour la sensibilité des plantes au phoma sera défini, ce niveau de résistance pourra être pris en compte via un paramètre de résistance variétale au phoma dont la valeur sera fonction du classement du génotype étudié. Le formalisme utilisé sera identique à celui utilisé pour le phomopsis et décrit dans le paragraphe précédent. Ce facteur de réduction viendra s'ajouter à ceux déjà pris en compte dans le modèle présenté dans le chapitre IV § 2.1.2.8, pp. 121-124.

3.4 Résistance ontogénique

3.4.1 Phomopsis

Pour le phomopsis, l'effet stade phénologique n'a été testé que sur la progression du mycélium dans la plante puisque les contaminations ont été réalisées par pastille de mycélium du champignon (SAuzphéno10, Tableau III. 2). Les essais isorisques du SRPV Midi-Pyrénées comportaient des interactions d'effets ne permettant pas d'isoler l'effet propre du stade phénologique (celui-ci pouvant être confondu avec les effets microclimatiques dépendant du taux de couverture).

De ce fait, une expérimentation en conditions contrôlées (absence d'interactions avec le microclimat) contrôlant la quantité d'inoculum apportée (identique pour tous les stades)

permettrait de mettre en évidence la présence ou non d'une résistance ontogénique à l'infection chez le tournesol.

Dans un premier temps, le modèle ne prendrait pas en compte d'effet du stade phénologique de la plante sur la probabilité d'infection de la feuille ni sur la vitesse de progression de la nécrose.

3.4.2 Phoma

Les contaminations en serre sur des plantes de différents stades phénologiques ont été réalisées de manière décalée puisque les pots ont été semés à la même date (SAuz11 et SGri12, Tableau III. 2). L'effet stade phénologique a donc pu se trouver en interaction avec les conditions climatiques puisque, même si les conditions en serre sont contrôlées, il subsiste des variations liées aux conditions climatiques extérieures du jour (notamment l'ensoleillement) que les systèmes de régulation tamponnent mais ne gomment pas entièrement. Cet effet n'a donc pas été étudié.

Dans les études mettant en évidence un effet stade phénologique sur l'incidence du phoma (Penaud et Pérès, 1995), la variable observée « nombre de nœuds touchés » dépend du nombre de nœuds contaminables au moment de la pulvérisation de la solution contaminante. Or, ce dernier n'est pas fixe entre les différents stades phénologiques ce qui ne permet pas de conclure à un effet phénologie sur l'occurrence des infections.

Cependant, la durée de latence observée dans cet essai, variable selon le stade de développement, est un paramètre retenu dans le modèle qui pourrait expliquer le faible nombre de symptômes observés au champ avant le stade E1 et l'explosion des contaminations à la floraison alors que les piégeages montrent la présence d'ascospores en nombre significatif dès la mi-mai.

Afin de de trancher sur la présence ou non d'une résistance ontogénique pour le phoma, le même type de dispositif que celui proposé dans le paragraphe précédent pour le phomopsis est à mettre en place pour le phoma.

3.5 Durée de vie des ascospores

Le module « infection » calcule un taux de mortalité des ascospores qui rend compte de leur durée de vie au sein du couvert si elles ne trouvent pas les conditions favorables à leur germination durant un certain laps de temps. La durée de vie des ascospores est considérée

comme constante du fait du manque de données, notamment sur les effets de la température et de l'humidité relative sur leur conservation. De plus, ce sous-module intègre les effets de molécules fongicides appliquées sur le couvert. Les fongicides à action préventive réduisent généralement la probabilité d'infection des spores déposées soit au début de l'épidémie soit tout au long de l'épidémie, selon la date d'application du produit chimique. Le formalisme retenu pour représenter les effets des fongicides a été présenté dans le chapitre IV § 2.1.2.8.

Chaque cohorte d'ascospores donne ainsi lieu à un taux de contamination des plantes exprimé en nombre de lésions par m² dans une des strates du peuplement et en augets contaminés par plante. Le module « infection » permettrait ensuite de calculer un pourcentage de feuilles atteintes par le phomopsis suivant les strates du peuplement en fonction des conditions microclimatiques et de la réceptivité de la culture ainsi que les taux d'infection des augets par le phoma.

4 Dégâts

4.1 Phomopsis

La vitesse de progression des nécroses de phomopsis ne dépend pas du statut azoté de la feuille dans l'expérimentation en conditions contrôlées alors qu'elle varie dans l'expérimentation au champ. Cette variation est donc certainement liée à l'effet microclimat avec des températures maximales moins élevées et des conditions d'humidité relative plus favorables à la progression des nécroses.

La surface foliaire nécrosée par le phomopsis sera calculée à l'aide des équations du § 3.1.1 qui permettent de déterminer la longueur de nécrose L_n sur la nervure attaquée. Tant que la nervure centrale n'est pas touchée, nous faisons l'hypothèse que la surface nécrosée par le phomopsis forme un triangle de hauteur L_n et d'angle ψ (Chap. V § 1.3.5). En tenant compte de la zone impactée par le champignon mais visuellement verte, la surface totale impactée par le phomopsis est :

$$SF_n = \tan\psi\,(L_n + \gamma)^2$$

Lorsque le phomopsis atteint la nervure centrale, nous faisons l'hypothèse que la surface nécrosée par le phomopsis forme un losange (cf. Chapitre V § 1.3.5). La longueur de nécrose sur la nervure centrale peut alors être calculée à partir des équations de la section 3.1.1 en

soustrayant la longueur totale du limbe L à la distance parcourue par la nécrose sur cette nervure. Une fois cette distance connue, l'équation 5 du chapitre V § 1.3.5 peut être réutilisée pour calculer la surface totale impactée.

4.2 Phoma

Pour le phoma, les mesures de longueur de nécrose basées sur la longueur verticale du symptôme sur tige ont montré que cette variable n'était pas la plus explicite pour rendre compte de la vitesse de progression du champignon du fait d'un changement d'aspect du symptôme en fin de cycle avec l'apparition de longs filaments sur les extrémités de la nécrose. La variable la plus judicieuse à modéliser est la date de sénescence de la feuille provoquée par le phoma qui contribue à diminuer la surface foliaire verte réceptrice et à bloquer le passage du phomopsis sur la tige. Pour les étages foliaires de la strate 1 (feuilles 1 à 6), la date de sénescence des feuilles est avancée de 12 jours en cas d'infection par le champignon.

4.3 Interactions phomopsis/phoma

Les dynamiques épidémiques du phoma et du phomopsis peuvent être simulées en parallèle. L'interaction entre les deux champignons ne se manifestera que si :

- Une feuille est sénescente (< 50 % verte) du fait du phoma ou entre en sénescence (phoma) avant que le phomopsis n'ait atteint la tige : dans ce cas le phomopsis est stoppé.
- Une plante est sénescente du fait d'une tache de phomopsis ayant encerclé la tige.

Ainsi, en sortie, le module « dégâts » devrait prévoir un pourcentage de surface foliaire nécrosée (phomopsis) ou sénescente (phoma) et un pourcentage d'encerclement de la tige (phomopsis).

5 Dommages

Au fur et à mesure de la progression acropète du phoma, des limbes deviennent sénescents et sont soustraits à la surface foliaire active, s'ajoutant à ou accélérant la sénescence naturelle.

Il en résultera une diminution de l'indice foliaire actif et donc de l'interception du rayonnement après floraison.
Pour le phomopsis, le premier symptôme de tache encerclante stoppera toute activité de remplissage du grain.

6 Conclusions et perspectives

Le travail présenté dans ce manuscrit synthétise un ensemble de résultats expérimentaux sur les interactions entre le tournesol et deux maladies majeures sous l'effet de la conduite de culture et de la situation de production (notamment le climat et le niveau d'inoculum primaire). Ces résultats ont non seulement permis des avancées en termes de compréhension de processus épidémiologiques, mais sont déjà mobilisables pour le conseil agricole. La principale originalité du travail conduit est d'avoir analysé conjointement les effets des états de peuplement du tournesol, sous l'influence de la conduite de culture et du climat, sur deux agents pathogènes en interaction. Ces avancées ont permis de proposer des formalismes de modélisation qui pourront être utilisés dans des travaux de conception d'itinéraires techniques par simulation. Il est important de souligner que le travail de modélisation s'inscrit dans une complémentarité avec le modèle de culture SUNFLO (Casadebaig et al., 2011). Ceci permettra d'analyser *in silico* les effets de différentes conduites dans différentes situations de production sur un ensemble de variables biotiques et abiotiques déterminant l'élaboration du rendement du tournesol. Outre ce modèle de culture, ce travail s'est largement appuyé sur des travaux existants de modélisation en épidémiologie végétale sur le phomopsis en proposant de nouveaux formalismes.
Le travail rapporté dans ce manuscrit, même s'il constitue une avancée significative dans la compréhension des dynamiques épidémiques et des processus sous-jacents aux mécanismes de dommage, comporte néanmoins certaines limites. Tout d'abord, le travail se limite à l'échelle de la parcelle alors que les processus épidémiques impliqués sont faiblement endocycliques. L'échelle temporelle abordée est restreinte au cycle de culture alors que pour certaines successions culturales, telles que des rotations blé-tournesol, où la fréquence de retour du tournesol est élevée, l'endo-inoculum pourrait jouer un rôle significatif dans les épidémies de phoma (le phomopsis ne survivant qu'une année sur les résidus de culture). De plus, le travail de modélisation de la pollution et de la probabilité d'infection par les ascospores repose sur un faisceau d'hypothèses qu'il conviendrait de conforter par des approches expérimentales. Par ailleurs, la résistance ontogénique n'a pas été considérée alors

qu'elle pourrait expliquer l'apparition tardive des symptômes de phoma. En outre, la structure génétique des populations des agents pathogènes n'a pas été prise en compte, faute d'éléments de caractérisation suffisants de l'interaction génétique hôte-agent pathogène. Enfin, le domaine de validité des modèles développés n'est pas suffisamment caractérisé. On ne connaît pas assez le comportement global de ces modèles pour des conditions pédoclimatiques différentes de celles dans lesquelles ils ont été développés.
Malgré ces limites, le travail accompli a permis de hiérarchiser les lacunes en termes de connaissances disponibles. Tout d'abord, il apparaît nécessaire de formaliser de manière mécaniste la représentation des effets de la conduite du tournesol sur les infections de phoma au collet. De plus, il est nécessaire de caractériser l'effet du stade phénologique sur la probabilité d'infection des deux agents pathogènes. Enfin, il serait utile de quantifier la distribution verticale des inocula afin de pouvoir la prendre en compte au cas où elle ne soit pas homogène.

Les résultats présentés dans ce travail de thèse ont été obtenus par des interactions fortes entre des approches expérimentales au champ ou sous serre et des approches de modélisation. Il est important de souligner le rôle structurant joué par la modélisation conceptuelle qui a permis d'organiser ces interactions. Les travaux ont été conduits de manière dynamique et réflexive, la modélisation mobilisant les données expérimentales acquises et le modèle permettant de représenter le système étudié et d'émettre un ensemble d'hypothèses qui ont été testées expérimentalement.

La démarche de modélisation présentée dans ce manuscrit permet d'envisager 4 grands types d'usage. (i) Tout d'abord, les modèles développés représentent de manière synoptique les connaissances disponibles sur les pathosystèmes étudiés. Ils permettent ainsi d'améliorer la compréhension des processus, notamment des interactions multiples « plante-agent pathogène-environnement-conduite ». (ii) Les modules épidémiologiques fournissent une représentation de la production d'inocula primaires de *Phoma* et de *Phomopsis*. Ils peuvent être associés à une prévision (ou à une observation) de l'indice foliaire afin d'être utilisés comme outils d'aide à la décision d'application (ou non) de traitements fongicides au stade « limite passage tracteur » (Debaeke et Estragnat, 2009). (iii) Le modèle SUNFLO-Maladies permettra de contribuer à la conception d'itinéraires techniques intégrés du tournesol en minimisant les facteurs de réduction du rendement biotiques et abiotiques. Le développement du couvert sera simulé de façon dynamique en fonction des éléments de la

conduite et de la situation de production. (iv) Enfin, un autre usage du modèle « SUNFLO-Maladies » sera de contribuer à la définition d'idéotypes. Il s'agira de simuler la distribution des infections dans le couvert en prenant en compte la variabilité verticale du microclimat en fonction de la strate considérée. La représentation de l'architecture du couvert du modèle SUNFLO sera ainsi complétée de manière à caractériser des idéotypes non seulement performants en termes d'interception du rayonnement et de durée de vie de la surface foliaire active, mais aussi en termes de sensibilité phénotypique, au-delà de résistances spécifiques et/ou quantitatives.

Au-delà de la gestion durable des deux maladies étudiés ici, SUNFLO-Maladies pourra être étendu à d'autres agents pathogènes du tournesol. Les deux maladies étudiées sont monocycliques. La prise en compte de maladies polycycliques nécessiterait l'ajout d'un module de sporulation. Le *Phoma* et le *Phomopsis* proviennent d'un inoculum primaire d'origine aérienne. L'ajout de maladies telluriques (verticillium, sclérotinia) nécessiterait la prise en compte de nouveaux processus : (i) la distribution verticale de l'inoculum dans le sol en fonction de l'interaction entre le travail du sol et la succession des cultures, (ii) la probabilité de contact entre les racines de la plante et l'endo-inoculum.
La transposition des formalismes du modèle à d'autres pathosystèmes est limitée du fait des caractéristiques atypiques des maladies étudiées. En effet, à notre connaissance, le phomopsis est le seul champignon à pénétrer dans une plante par les bordures du limbe. Seule la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agent causal de la pourriture noire, emprunte la même voie de pénétration pour infecter les crucifères (Gay et Tuzun, 2000). De même, les symptômes de taches noires sur tige apparaissent suite à des infections nécessitant la présence d'eau libre dans les augets. Ce mode d'infection est spécifique du phoma.

Les modèles évoqués ci-dessus, pourront, à terme, contribuer à la conception d'itinéraires techniques intégrés du tournesol limitant les principales pressions fongiques, à l'échelle de la parcelle ou du territoire. Pour ce faire, il sera nécessaire de disposer de modules représentant la production des inocula primaires. Ce point fait actuellement l'objet de recherches au sein de l'UMT Tournesol. De plus, la dispersion des spores à l'échelle du territoire devra être représentée. Pour ce faire, il sera possible de s'appuyer sur des travaux en cours, notamment, dans l'UMR AGIR, l'UR MIA de Toulouse, et l'UMR d'Agronomie de Grignon. La structure informatique du modèle SIPPOM (Lô-Pelzer et al, 2010), implémentée sur la

plateforme RECORD (Bergez et al., 2013) dans le cadre de l'adaptation de ce modèle au cas de la gestion du mildiou de la pomme de terre (Rakotonindraina, 2012) pourra être réutilisée. Ces approches supra-parcellaires permettront de concevoir des stratégies collectives de maîtrise des deux maladies considérées en adaptant la gestion des résidus de tournesol, la répartition spatiale des parcelles, et la conduite du tournesol. Même si le tournesol est l'une des cultures ayant le plus faible IFT en France, ces travaux permettront de limiter les dommages engendrés par les principaux bioagresseurs du tournesol et contribueront ainsi à améliorer la compétitivité de la culture vis-à-vis des autres productions. Les travaux présentés dans ce document sont donc une contribution indirecte à la réduction de l'utilisation des pesticides. De plus, certaines avancées ont une portée générique et pourront contribuer à l'amélioration de la robustesse des systèmes de culture aux pressions biotiques.

Références bibliographiques

Abou Al Fadil, T., 2006. Déterminisme de la tolérance du tournesol à *Phoma macdonaldii* au collet et sur racines : approches génétiques et histologiques. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse, 185 p.
Acimovic, M., 1965. Phoma sp. un nouveau parasite du tournesol en Yougoslavie. Zbor. radova Inst. za polj. istraz, Novi Sad 3, 151-170.
Acimovic, M., 1986. The effect of Phomopsis sp. infection of grain yield and oil content on sunflower plants. Hélia 9, 73-76.
Aggarwal, P.K., Kalra, N., Chander, S., Pathak, H., 2006. InfoCrop: A dynamic simulation model for the assessment of crop yields, losses due to pests, and environmental impact of agro-ecosystems in tropical environments. I. Model description. Agricultural Systems 89, 1-25.
Agrios, G.N., 2005. Plant pathology. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, 922 p.
Aguera, E., Cabello, P., de la Haba, P., 2010. Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (Helianthus annuus) plants. Physiologia Plantarum 138, 256-267.
Aguirrezabal, L.A.N., Lavaud, Y., Dosio, G.A.A., Izquierdo, N.G., Andrade, F.H., Gonzalez, L.M., 2003. Intercepted solar radiation during seed filling determines sunflower weight per seed and oil concentration. Crop Science 43, 152-161.
Assemat, P., Fayret, J., 1987. Differentiation of the perithecia of *Diaporthe helianthi*, parasite of sunflower, grown in vitro - effects of some environmental-factors. Comptes rendus de l'Academie des Sciences Série III-Sciences de la Vie-Life Sciences 305, 221-224.
Attoumani-Ronceux, A., Aubertot, J.N., Guichard, L., Jouy, L., Mischler, P., Omon, B., Petit, M.S., Pleyber, E., Reau, R., Seiler, A., 2011. Guide pour la conception de systèmes de culture plus économes en produits phytosanitaires - application aux systèmes de polyculture. Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire, 116 p.
Aubertot, J.N., Barbier, J., Carpentier, A., Gril, J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., Voltz, M., 2006a. Pesticides, Agriculture et Environnement, Expertise Scientifique Collective, INRA-Cemagref.
Aubertot, J.N., Doré, D., Ennaifar, S., Ferré, F., Fourbet, J.F., Schneider, O., 2005. Integrated Crop Management requires to better take into account cropping systems in epidemiological models. Proceedings of 9th International Workshop on Plant Disease Epidemiology, Landerneau, France.
Aubertot, J.N., Robin, M.H., sous presse. Injury Profile SIMulator, a qualitative aggregative modelling framework to predict crop injury profile as a function of cropping practices, soil, climate and field environment. I. Conceptual bases. Plos One.
Aubertot, J.N., Salam, M.U., Diggle, A.J., Dakowska, S., Jedryczka, M., 2006b. SimMat, a new dynamic module of Blackleg Sporacle for the prediction of pseudothecial maturation of L. maculans/L. biglobosa species complex. Parameterisation and evaluation under Polish conditions. Bulletin OILB/SROP 29, 277-285.
Avantaggiato, G., Solfrizzo, M., Tosi, L., Zazzerini, A., Fanizzi, F.P., Visconti, A., 1999. Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by Phomopsis helianthi. Natural Toxins 7, 119-127.
Bai, J.Y., Xu, B.A., Duan, C.X., Guo, Q.Y., Wang, X.M., 2012. Identification of *Phoma macdonaldii* Boerema causing black stem of sunflower in China. Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie 34, 459-462.
Bassanezi, R.B., Amorim, L., Bergamin, A., Hau, B., Berger, R.D., 2001. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. Plant Pathology 50, 443-452.
Bastiaans, L., 1991. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. Phytopathology 81, 611-615.

Bastiaans, L., Roumen, E.C., 1993. Effect on leaf photosynthetic rate by leaf blast for rice cultivars with different types and levels of resistance. Euphytica 66, 81-87.
Belloni, P., Vannozzi, G.P., 1990. Leaf area and leaf number development in Helianthus annuus L. Agricoltura Mediterranea 120, 275-280.
Berault, S., 2000. Caractérisation et prévision des effets de la conduite de culture du tournesol sur la dynamique épidémique du phomopis (*Diaporthe helianthi*). Mémoire d'Ingénieur, ENITA de Bordeaux, 55 p.
Bergez, J.E., Chabrier, P., Gary, C., Jeuffroy, M.H., Makowski, D., Quesnel, G., Ramat, E., Raynal, H., Rousse, N., Wallach, D., Debaeke, P., Durand, P., Duru, M., Dury, J., Faverdin, P., Gascuel-Odoux, C., Garcia, F., 2013. An open platform to build, evaluate and simulate integrated models of farming and agro-ecosystems. Environmental Modelling & Software 39, 39-49.
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.
Bert, P.F., Jouan, I., Tourvieille de Labrouhe, D., Serre, F., Nicolas, P., Vear, F., 2002. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (Helianthus annus L.) 1. QTL involved in resistance to Sclerotinia sclerotiorum and Diaporthe helianthi. Theoretical and Applied Genetics in press.
Bertrand, F., Tourvieille de Labrouhe, D., 1987. Phomopsis on sunflower: selection tests. Informations Techniques, Centre Technique Interprofessionel des Oleagineux Metropolitains, France, 98, 12-18.
Bethenod, O., Bousquet, J.F., Laffray, D., Louguet, P., 1982. Reassessment of the mode of action of ochracin on the stomatal conductance of wheat seedling leaves, *Triticum aestivum* L., cv. Etoile de Choisy. Agronomie 2, 99-102.
Blackwell, M., Vilgalys, R., James, T.Y., Taylor, J.W., 2012. Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc...Version 30 January 2012. http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30 in The Tree of Life Web Project, http://tolweb.org.
Blanchet, R., Gelfi, N., Puech, J., 1987. Nitrogen nutrition, leaf-area and production in the sunflower (*Helianthus-annuus* L). Agrochimica 31, 233-244.
Boerema, G.H., 1970. Additional notes on *Phoma herbarum*. Persoonia 1, 15-48.
Bordat, A., Debaeke, P., Dechamp-Guillaume, G., Mestries, E., Seassau, C., Vincourt, P., 2011. Phoma et dessèchement précoce du tournesol. Point Technique CETIOM, 86 p.
Brisson, N., Launay, M., Mary, B., Beaudoin, N., 2008. Conceptual basis, formalisations and parameterization of the STICS crop model. 297 p.
Butault, J.P., Dedryver, C.A., Gary, C., Guichard, L., Jacquet, F., Meynard, J.M., Nicot, P., Pitrat, M., Reau, R., Sauphanor, B., Savini, I., Volay, T., 2010. *Ecophyto R&D. Quelles voies pour réduire l'usage des pesticid*es ? Synthèse du rapport d'étude, 90 p.
Calvet, N.P., Ungaro, M.R.G., Oliveira, R.F., 2005. Virtual lesion of Alternaria blight on sunflower. Helia 28, 89-99.
Campbell, C.L., Madden, L.V., 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, New York, 532 p.
Carson, M.L., 1991. Relationship between Phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. Plant Disease 75, 1150-1153.
Casadebaig, P., Debaeke, P., Lecoeur, J., 2008. Thresholds for leaf expansion and transpiration response to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. European Journal of Agronomy 28, 646-654.

Casadebaig, P., Guilioni, L., Lecoeur, J., Christophe, A., Champolivier, L., Debaeke, P., 2011. SUNFLO, a model to simulate genotype-specific performance of the sunflower crop in contrasting environments. Agricultural and Forest Meteorology 151, 163-178.
Caubel, J., Launay, M., Lannou, C., Brisson, N., 2012. Generic response functions to simulate climate-based processes in models for the development of airborne fungal crop pathogens. Ecological Modelling 242, 92-104.
Champolivier, L., Debaeke, P., Merrien, A., 2011. Pourquoi irriguer le tournesol, une culture réputée tolérante à la sécheresse ? Innovations Agronomiques 14, 151-164.
Chatelin, M.H., Aubry, C., Poussin, J.C., Meynard, J.M., Masse, J., Verjux, N., Gate, P., Le Bris, X., 2005. DeciBle, a software package for wheat crop management simulation. Agricultural Systems 83, 77-99.
Chollet, D., Estragnat, A., Jouffret, P., Lagarde, F., Mestries, E., Penaud, A., Pinochet, X., 2002. Les maladies du tournesol. CETIOM, Paris, 72p.
Colbach, N., Chauvel, B., Gauvrit, C., Munier-Jolain, N.M., 2007. Construction and evaluation of ALOMYSYS modelling the effects of cropping systems on the blackgrass life-cycle: From seedling to seed production. Ecological Modelling 201, 283-300.
Colbach, N., Gardarin, A., Munier-Jolain, N.M., 2010. FLORSYS: a mechanistic model of cropping system effects on weed flora based on functional relationships with species traits. 15th International EWRS Symposium, Kaposvár, Hungary, pp. 157-158.
Connor, D.J., Hall, A.J., 1997. Sunflower physiology. In: Schneiter, A.A. (Ed.), Sunflower technology and production. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp. 113-182.
Davet, P., Pérès, A., Regnault, Y., Tourvieille, D., Penaud, A., 1991. Sunflower diseases. Les maladies du tournesol., 72 p.
De Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C., Aveskamp, M.M., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2012. Redisposition of *Phoma*-like anamorphs in *Pleosporales*. Studies in Mycology 75, 1-36.
De Wolf, E.D., Isard, S.A., 2007. Disease cycle approach to plant disease prediction. Annual Review of Phytopathology. Annual Reviews, Palo Alto,45, pp. 203-220.
Debaeke, P., Casadebaig, P., Haquin, B., Mestries, E., Palleau, J.P., Salvi, F., 2010. Simulation of the varietal response of sunflower to the environment with the aid of the SUNFLO model. OCL - Oleagineux, Corps Gras, Lipides 17, 143-151.
Debaeke, P., Délos, M., Moinard, J., Berault, S., Lambert, R., 2000. Prise en compte du couvert de tournesol dans la simulation des épidémies de *Diaporthe helianthi* par le modèle ASPHODEL. 6ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours (France), pp. 251-258.
Debaeke, P., Estragnat, A., 2003. A simple model to interpret the effects of sunflower crop management on the occurrence and severity of a major fungal disease: Phomopsis stem canker. Field Crops Research 83, 139-155.
Debaeke, P., Estragnat, A., 2009. Crop canopy indicators for the early prediction of Phomopsis stem canker (*Diaporthe helianthi*) in sunflower. Crop Protection 28, 792-801.
Debaeke, P., Estragnat, A., Reau, R., 2003. Influence of crop management on sunflower stem canker (*Diaporthe helianthi*). Agronomie 23, 581-592.
Debaeke, P., Moinard, J., 2010. Effect of crop management on epidemics of phomopsis stem canker (*Diaporthe helianthi*) for susceptible and tolerant sunflower cultivars. Field Crops Research 115, 50-60.
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., Van Oosterom, E., Justes, E., Champolivier, L., Merrien, A., Aguirrezabal, L.A.N., Gonzalez-Dugo, V., Massignam, A.M., Montemurro, F., 2012. A species-specific

critical nitrogen dilution curve for sunflower *(Helianthus annuus L.)*. Field Crops Research 136, 76-84.
Degener, J., Melchinger, A.E., Hahn, V., 1999. Resistance in the leaf and stem of sunflower after infection with two isolates of Phomopsis. Plant Breeding 118, 405-410.
Délos, M., Eychenne, N., Birba, I., Fabry, C., 2000a. Etude des facteurs expliquant les fluctuations des attaques de *Plamospara halstedii* en France. 15th International Sunflower Conference, Toulouse (France), pp. I-43 - I-48.
Délos, M., Eychenne, N., Folcher, L., Debaeke, P., Laporte, F., Raulic, I., Maumene, C., Naibo, B., Pinochet, X., 2004. Alternative methods to control plant diseases in main crops. Phytoma 567, 14-18.
Délos, M., Moinard, J., 1995. Development of Phomopsis on sunflower in France. A brief history. Phytoma 473, 22-24.
Délos, M., Moinard, J., 1997a. Asphodel : modèle de simulation des épidémies de Phomopsis du tournesol (Diaporthe helianthi). ANPP-Cinquième Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours (France), pp. 413-420.
Délos, M., Moinard, J., 1997b. Phomopsis on sunflower. Recent progress in disease forecasting. Phytoma 492, 17-21.
Délos, M., Moinard, J., Eychenne, N., 2000b. Etude de l'épidémiologie de *Leptosphaeria lindquistii*, agent de la maladie des taches noires du tournesol en France. Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, pp. I-32-37.
Délos, M., Moinard, J., Guerin, O., 1997a. Epidemiology dynamics of Phoma in sunflower. Conidia or ascospores, which ones should be most controlled ? Phytoma 500, 60-62.
Délos, M., Moinard, J., Jacquin, D., 1995. Study and monitoring of Phomopsis. From ascospore traps to a model. Phytoma 473 , 25-27.
Délos, M., Moinard, J., Muhlberger, E., 1998. Phoma of sunflower: perfecting a method for evaluating the risk of contamination by ascospores. Phytoma 504, 26-29.
Délos, M., Moinard, J., Mülhberger, E., 1997b. Mise au point d'une méthode d'évaluation des risques de contaminations de *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi, champignon parasite du tournesol. ANPP-Cinquième Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours (France), pp. 429-436.
Desanlis, M., Aubertot, J.N., Mestries, E., Debaeke, P., 2013. Analysis of the influence of a sunflower canopy on Phomopsis helianthi epidemics as a function of cropping practices. Field Crops Research 149, 63-75.
Descorps, C., Hebrard, C., Rakotonindraina, T., Dechamp-Guillaume, G., Mestries, E., Aubertot, J.N., 2012. Advances in *Phoma macdonaldii* (*Leptosphaeria linquistii*) epidemiology. 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata & Balcarce, Argentina, pp. 199-204.
Donald, P.A., Venette, J.R., Gulya, T.J., 1987. Relationship between Phoma macdonaldii and premature death of sunflower in North Dakota. Plant Disease 71, 466-468.
Doorenbos, J., Kassam, A.H., 1980. Réponse des rendements à l'eau. Bulletin FAO d'irrigation et drainage 30, 31p.
Duletic-Lausevic, S., Mihaljcevic, M., 1997. A comparison of the anatomical structure of susceptible Helianthus annuus L., resistant H. Argophyllus L. and their progeny. Hélia 20, 17-28.
Elings, A., Rossing, W.A.H., van der Werf, W., 1999. Virtual lesion extension: A measure to quantify the effects of bacterial blight on rice leaf CO2 exchange. Phytopathology 89, 789-795.
Erickson, J.E., Stanosz, G.R., Kruger, E.L., 2004. Photosynthetic consequences of Marssonina leaf spot differ between two poplar hybrids. New Phytologist 161, 577-583.

Fayzalla, S., Maric, A., 1981. Contribution à l'étude de la biologie et de l'épidémiologie de P*homa macdonaldii B*oerema provoquant la maladie des taches noires du tournesol. Zastita Bilja 32, 13-27.
Ferrandino, F.J., Aylor, D.E., 1984. SETTLING SPEED OF CLUSTERS OF SPORES. Phytopathology 74, 969-972.
Frei, P., 2010. Phoma sunflower: Can Treat the temperature thresholds? Agrarforschung Schweiz 1, 346-349.
Frezzi, M.J., 1968. *Leptosphaeria lindquistii* n.sp., forma sexual de *Phoma oleracea* var. helianthi-tuberosi Sacc., hongo causal de la 'mancha negra del tallo' del girasol (*Helianthus annuus* L.). Revista de Investigaciones Agropecuarias 5, 77-80.
Garry, G., Jeuffroy, M.H., Ney, B., Tivoli, B., 1998. Effects of Ascochyta blight (Mycosphaerella pinodes) on the photosynthesizing leaf area and the photosynthetic efficiency of the green leaf area of dried-pea (Pisum sativum). Plant Pathology 47, 473-479.
Gaudet, M.D., Schulz, J.T., 1984. Association between a sunflower fungal pathogen, Phoma macdonaldii, and a stem weevil, Apion occidentale (Coleoptera: Curculionidae). Canadian Entomologist 116, 1267-1273.
Gay, P.A., Tuzun, S., 2000. Involvement of a novel peroxidase isozyme and lignification in hydathodes in resistance to black rot disease in cabbage. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique 78, 1144-1149.
Goodwin, P.H., 1992. Effect of common bacterial blight on leaf photosynthesis of bean. Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie 14, 203-206.
Goto, K., 1965. Estimating losses from rice blast in Japan. The Rice blast disease. Proceedings of a Symposium at IRRI, July 1963. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 195-202.
Granier, C., Tardieu, F., 1997. Prediction of leaf area in sunflowers. Oléoscope 41, 30-32.
Granier, C., Tardieu, F., 1998. Is thermal time adequate for expressing the effects of temperature on sunflower leaf development? Plant Cell and Environment 21, 695-703.
Gulya, T., Rashid, K.Y., Masirevic, S.M., 1997. Sunflower diseases. In: Schneiter, A.A. (Ed.), Sunflower Technology and Production. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA, pp. 263-379.
Haile, 2001. The influence of cultivar and plant architecture on yield loss. In: Peterson, R.K.D., Higley, L.G. (Eds.), Biotic stress and yield loss, CRC Press LLC, pp. 99-116.
Heller, A., Gierth, K., 2001. Cytological observations of the infection process by Phomopsis helianthi (Munt.-Cvet) in leaves of sunflower. Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift 149, 347-357.
Herr, L.J., Lipps, P.E., Watters, B., 1983. Diaporthe stem canker of sunflower. Plant Disease 67, 911-913.
Huang, H.C., Hoes, J.A., 1980. Importance of plant spacing and sclerotial position to development of sclerotinia wilt of sunflower. Plant Disease 64, 81-84.
Huang, H.C., Kokko, E.G., 1987. Ultrastructure of hyperparasitism of *Coniothyrium minitans* on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Botany 65, 2483-2489.
Jinga, V., Iliescu, H., Ionita, A., Csép, N., Iordache, E., 1992. Technological factors in the integrated control of sunflower diseases. 13th International Sunflower Conference, Pisa, Italy, pp. 761-765.
Jouffret, P., 2005a. Phomopsis et phoma : une histoire bien différente. Oléoscope 80, 10-11.
Jouffret, P., 2005b. Stratégie de lutte durable contre phomopsis et phoma. Oléoscope 80, 28-30.
Jouffret, P., 2005c. Une nouvelle grille de traitement contre le phomopsis dans le Sud-Ouest. Oléoscope 80, 26-27.

Jouffret, P., Labalette, F., Thibierge, J., 2011. Atouts et besoins en innovations du tournesol pour une agriculture durable. Innovations agronomiques 14, 1-17.
Jouffret, P., Penaud, A., 2005. La forte nuisibilité des taches encerclantes de phomopsis. Oléoscope 80, 12-13.
Kovics, G.J., Zsombik, L., 2001. Relationship between the main ecological factors and infection with *Diaporthe helianthi* in sunflower. Novenytermeles 50, 395-405.
Kumudini, S., Godoy, C.V., Kennedy, B., Prior, E., Omielan, J., Boerma, H.R., Hershman, D., 2010. Role of Host-plant Resistance and Disease Development Stage on Leaf Photosynthetic Competence of Soybean Rust Infected Leaves. Crop Science 50, 2533-2542.
Kurle, J.E., Gran, C.R., Oplinger, E.S., Mengistu, A., 2001. Tillage, crop sequence, and cultivar effects on Sclerotinia stem rot incidence and yield in soybean. Agronomy Journal 93, 973-982.
Laguionie, N., 2009. Formalisation et évaluation des pratiques d'irrigation du tournesol en Midi-Pyrénées et en Poitou-Charentes. Mémoire de fin d'études ENITA Clermont, 44 p.
Larfeil, C., Dechamp-Guillaume, G., Barrault, G., 2002. *Phoma macdonaldii* Boerema/*Helianthus annuus* L. interaction. Helia 25, 153-160.
Le May, C., Schoeny, A., Tivoli, B., Ney, B., 2005. Improvement and validation of a pea crop growth model to simulate the growth of cultivars infected with Ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*). European Journal of Plant Pathology 112, 1-12.
Leclerq, P., 1969. Une stérilité mâle cytoplasmique chez le tournesol. Annales de l'Amélioration des Plantes 19, 99-106.
Lecomte, V., Nolot, J.-M., 2011. Place du tournesol dans le système de culture. Innovations agronomiques 14, 59-76.
Lemaire, G., Gastal, F., 1997. N uptake and distribution in plant canopies. In: Lemaire, G. (Ed.), Diagnostic of the Nitrogen Status in Crops. Springer–Verlag, Berlin, pp. 3-43.
Lesovoy, M.P., Marchenko, O.A., 1999. Mechanisms of penetration and defeat of plants of sunflower by a fungus PhomopsisDiaporthe helianthi/ Munt.-Cvet. et al. Archives of Phytopathology and Plant Protection 32, 223-228.
Lo-Pelzer, E., Aubertot, J.N., David, O., Jeuffroy, M.H., Bousset, L., 2009. Relationship between severity of blackleg (Leptosphaeria maculans/L-biglobosa species complex) and subsequent primary inoculum production on oilseed rape stubble. Plant Pathology 58, 61-70.
Lo-Pelzer, E., Bousset, L., Jeuffroy, M.H., Salam, M.U., Pinochet, X., Boillot, M., Aubertot, J.N., 2010. SIPPOM-WOSR: A Simulator for Integrated Pathogen POpulation Management of phoma stem canker on Winter OilSeed Rape I. Description of the model. Field Crops Research 118, 73-81.
Loyce, C., Rellier, J.P., Meynard, J.M., 2002. Management planning for winter wheat with multiple objectives (1): The BETHA system. Agricultural Systems 72, 9-31.
Lucas, P., 2007. Le concept de la production intégrée des cultures. Innovations Agronomiques 1, 15-21.
Magarey, R.D., Russo, J.M., Seem, R.C., 2006. Simulation of surface wetness with a water budget and energy balance approach. Agricultural and Forest Meteorology 139, 373-381.
Maric, A., Camprag, D., Masirevic, S., 1988. Diseases and pests of sunflower and their control. Bolesti i stetocine suncokreta i njihovo suzbijanje, Nolit, Beograd, pp. 37-45.
Maric, A., Schneider, R., 1979. Black spot of sunflowers in yugoslavia caused *by Phoma macdonaldii* Boerema. Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology 94, 226-233.
Masirevic, S., Forgic, G., 2000. Sunflower diseases - limiting factor in sunflower production. Revija Agronomska saznanja 10, 46-50.
Masirevic, S., Gulya, T.J., 1992. Sclerotinia and Phomopsis - two devastating sunflower pathogens. Field Crops Research 30, 271-300.

Mazars, C., Rossignol, M., Auriol, P., Klaebe, A., 1990. Phomozin, a phytotoxin from *Phomopsis helianthi*, the causal agent of stem canker of sunflower. Phytochemistry 29, 3441-3444.
McDonald, W.C., 1964. Phoma black stem of sunflower. Phytopathology 54, 492-493.
Meric, M., 2002. Amélioration de la prévision du risque phomopsis du tournesol pour la modélisation. Mémoire d'Ingénieur de Purpan, 96 p.
Merrien, A., 1992. Physiologie du tournesol. CETIOM (Ed.), Point Technique du CETIOM, 65 p.
Merrien, A., Blanchet, R., Gelfi, N., 1981. Relationships between water-supply, leaf-area development and survival, and production in sunflower (*Helianthus annuus* L). Agronomie 1, 917-922.
Merrien, A., Grandin, L., 1990. Comportement hydrique du tournesol. In: CETIOM (Ed.), Le tournesol et l'eau. Les points techniques du CETIOM, Paris, pp. 78-90.
Mestries, E., Desanlis, M., Seassau, C., Moinard, J., Debaeke, P., Dechamp-Guillaume, G., 2011. Impact de la conduite de culture sur les maladies du tournesol. Innovations agronomiques 14, 91-108.
Meynard, J.M., Dore, T., Lucas, P., 2003. Agronomic approach: cropping systems and plant diseases. Comptes Rendus Biologies 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.
Mirleau-Thebaud, V., 2012. Effets des contraintes mécaniques du sol sur la limitation des rendements du tournesol. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 262 p.
Moinard, J., Eychenne, N., 1998. Le Phomopsis. Guide « Grandes Cultures ». Dossier support des Avertissements Agricoles routés et télécopiés.
Mouquot, P., 1997. Phomopsis du tournesol : contribution à la connaissance de la biologie et de l'épidémiologie. Mémoire d'Ingénieur de l'ENITA Bordeaux, 45 p.
Mouquot, P., Délos, M., Clerjeau, M., 1997. Etude du rôle des pycniospores alpha de Phomopsis helianthi dans la contamination des cultures de tournesol au printemps. ANPP-Cinquième Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, 3-4-5 Décembre.
Muhlberger, E., 1996. Phoma et phomopsis du tournesol : synthèse des connaissances acquises. Contribution à l'étude biologique et épidémiologique. Rapport de fin d'études. 47 p.
Muntanola-Cvetkovic, M., Mihaljcevic, M., Petrov, M., 1981. On the identity of the causative agent of a serious Phomopsis-Diaporthe disease in sunflower plants. Nova Hedwigia 34, 417-435.
Muntanola-Cvetkovic, M., Vukojevic, J., Mihaljcevic, M., 1989. Pathohistology of sunflower stems attacked by Diaporthe helianthi. Canadian Journal of Botany 67, 1119-1125.
Muntanola-Cvetkovic, M., Vukojevic, J., Mihaljcevic, M., 1991. The systemic nature of the sunflower disease caused by Diaporthe helianthi. Canadian Journal of Botany 69, 1552-1556.
Ozer, H., Polat, T., Ozturk, E., 2004. Response of irrigated sunflower Helianthus annuus L. hybrids to nitrogen fertilization: growth, yield and yield components. Plant Soil and Environment 50, 205-211.
Payen, D., 1983. Modelling the epidemiology of Sclerotinia sclerotiorum on sunflower. EPPO Bulletin 13, 277-281.
Penaud, A., Michi, H., 2009. Coniothyrium minitans, a biological agent for integrated protection. OCL - Oleagineux, Corps Gras, Lipides 16, 158-163.
Penaud, A., Pérès, A., Regnault, Y., 1994. Rappels sur la maladie. Oléoscope 14, 15-26.

Penaud, A., Pérès, A., 1995. Phoma du tournesol. CETIOM, Paris, 37 p.
Pérès, A., 1988. Lutte fongicide préventive et curative contre Diaporthe helianthi Munt. Cvet. (Phomopsis helianthi). 12th International Sunflower Conference, Novi Sad (Yougoslavia), pp. 191-196.
Pérès, A., Allard, L.M., 1994. Phoma on sunflower: hopes in the field of control. Oléoscope 19, 19-20.
Perny, A., 1992. L'évolution du Phomopsis en France. Oléoscope 8, 7.
Perny, A., 1994a. Campagnes 93/94 : vers une extension de la maladie. Oléoscope 14, 7-13.
Perny, A., 1994b. Comment établir le diagnostic visuel des maladies du tournesol. Oléoscope 20, 21-22.
Philip, R., Devadath, S., 1981. Studies on the Physiology of Bacterial Blight Infected Tolerant and Susceptible Rice Cultivars. Journal of Phytopathology 101, 65-71.
Pinochet, X., 1995. Phomopsis et évaluation variétale de la sensibilité. In: Le Page, R. (Ed.), Le Phomopsis du tournesol. Cetiom, Paris, pp. 27-36.
Pinochet, X., Pérès, A., 1998. Evaluation des variétés de tournesol et Phomopsis. La présence du phoma est-elle gênante ? Oléoscope 46, 35-37.
Poisson-Bamme, B., Pérès, A., 2000. Survie du phoma du tournesol (Leptosphaeria lindquistii) sur les résidus de récolte. 6ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours (France), pp. 331-338.
Pouzet, A., Bugat, A., 1985. Description d'une méthode simple et rapide pour l'estimation de la surface foliaire par plante chez le tournesol. Proceedings of the 11th International Sunflower Conference, ISA, Mar del Plata, Argentina, pp. 21-26.
Pérès, A., 1988. Diaporthe helianthi Munt. Cvet. et al. : éléments de biologie et d'épidémiologie appliqués aux essais de lutte. 12e Conférence Internationale Tournesol, Novi Sad (YUGOSLAVIA), pp. 1-6.
Pérès, A., Allard, L.M., Penaud, A., Regnault, Y., 1992. Control of *Sclerotinia sclerotiorum* on sunflower. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases - 1992. Volume 3, 931-938.
Pérès, A., Le Sourne, V., 2000. Le phoma du tournesol (*Phoma macdonaldii* forme imparfaite de *Leptosphaeria lindquistii*) : étude des périthèces et des pycnides dans le processus de la contamination. 15e Conférence Internationale sur le Tournesol, Toulouse (France), pp. I-22 - I-27.
Pérès, A., Poisson-Bamme, B., Drolon, G., 2000. Le syndrome "pieds secs" du tournesol : étude des causes et approche de la nuisibilité. 6ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours (France), pp. 489-495.
Rakotonindraina, T., 2012. Analyse et modélisation des effets des pratiques culturales sur les épidémies de mildiou de la pomme de terre. Adaptation du modèle SIPPOM (Simulator for Integrated Pathogen POpulation Management) au pathosystème. Thèse de l'Université de Toulouse, 147 p.
Rey, H., 2003. Utilisation de la modélisation 3D pour l'analyse et la simulation du développement et de la croissance végétative d'une plante de tournesol en conditions environnementales fluctuantes (température et rayonnement). Thèse de l'ENSA Montpellier.
Richard, B., Bussiere, F., Langrume, C., Rouault, F., Jumel, S., Faivre, R., Tivoli, B., 2013. Effect of pea canopy architecture on microclimate and consequences on ascochyta blight infection under field conditions. European Journal of Plant Pathology 135, 509-524.
Ritchie, J., 1972. Model for predicting evaporation from a row crop with incomplete cover. Water Resources Research 8, 1204-1213.
Robert, C., Bancal, M.O., Lannou, C., 2002. Wheat leaf rust uredospore production and carbon and nitrogen export in relation to lesion size and density. Phytopathology 92, 762-768.

Robert, C., Bancal, M.O., Nicolas, P., Lannou, C., Ney, B., 2004. Analysis and modelling of effects of leaf rust and Septoria tritici blotch on wheat growth. Journal of Experimental Botany 55, 1079-1094.
Robin, M.H., Colbach, N., Lucas, P., Monfort, F., Cholez, C., Debaeke, P., Aubertot, J.N., sous presse. Injury Profile SIMulator, a qualitative aggregative modelling framework to predict injury profile as a function of cropping practices, soil, climate and field environment. II. Proof of concept: design and evaluation of IPSIM-Wheat-Eyespot, a model that predicts eyespot injuries on winter wheat. Plos One.
Roustaee, 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.
Roustaee, 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.
Roustaee, A., Dechamp-Guillaume, G., Gelie, B., Savy, C., Dargent, R., Barrault, G., 2000c. Ultrastructural studies of the mode of penetration by Phoma macdonaldii in sunflower seedlings. Phytopathology 90, 915-920.
Salvi, F., Pouzet, A., 2010. Etude sur les causes possibles du ralentissement du progrès agronomique en tournesol et en colza d'hiver. C.R. Académie d'Agriculture de France 96, 24-32.
Savage, D., Barbetti, M.J., MacLeod, W.J., Salam, M.U., Renton, M., 2012. Seasonal and Diurnal Patterns of Spore Release Can Significantly Affect the Proportion of Spores Expected to Undergo Long-Distance Dispersal. Microbial Ecology 63, 578-585.
Savary, S., Teng, P.S., Willocquet, L., Nutter, F.W., 2006. Quantification and modeling of crop losses: A review of purposes. Annual Review of Phytopathology. Annual Reviews, Palo Alto, 44, pp. 89-112.
Seassau, C., Dechamp-Guillaume, G., Mestries, E., Debaeke, P., 2010. Nitrogen and water management can limit premature ripening of sunflower induced by Phoma macdonaldii. Field Crops Research 115, 99-106.
Seassau, C., Dechamp-Guillaume, G., Mestries, E., Debaeke, P., 2012. Low plant density can reduce sunflower premature ripening caused by *Phoma macdonaldii*. European Journal of Agronomy 43, 185-193.
Seiler, G.J., 1997. Anatomy and morphology of sunflower. In: Schneiter, A.A. (Ed.), Sunflower technology and production. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin, pp. 67-111.
Singh, M.P., Erickson, J.E., Boote, K.J., Tillman, B.L., van Bruggen, A.H.C., Jones, J.W., 2011. Photosynthetic Consequences of Late Leaf Spot Differ between Two Peanut Cultivars with Variable Levels of Resistance. Crop Science 51, 2741-2748.
Spitters, C.J.T., Vanroermund, H.J.W., Vannassau, H., Schepers, J., Mesdag, J., 1990. Genetic variation in partial resistance to leaf rust in winter wheat: disease progress, foliage senescence and yield reduction. Netherlands Journal of Plant Pathology 96, 3-15.
Stanojevic, D., 1985. Relationship between stand density and microclimate and their effect on some characters of sunflower. Proceedings of the 11th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina, pp. 301-306.
Steer, B.T., Hocking, P.J., Kortt, A.A., Roxburgh, C.M., 1984. Nitrogen nutrition of sunflower (Helianthus annuus L.): Yield components, the timing of their establishment and seed characteristics in response to nitrogen supply. Field Crops Research 9, 219-236.
Stevens, R.B., 1960. In: Horsfall, J.G., Dimonds, A.E. (Eds.), Plant Pathology, an Advanced Treatise. Academic Press, New York, pp. 357-429.

Thompson, S.M., Tan, Y.P., Young, A.J., Neate, S.M., Aitken, E.A.B., Shivas, R.G., 2011. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic Diaporthe (Phomopsis) species. Persoonia 27, 80-89.
Tourvieille de Labrouhe, D., Pilorgé, E., Nicolas, P., Vear, F., 2000. Le mildiou du tournesol. INRA-CETIOM, Paris, 176 p.
Van Oijen, M., 1990. Photosynthesis is not impaired in healthy tissue of blighted potato plants. European Journal of Plant Pathology 96, 55-63.
Vear, F., Bony, H., Joubert, G., de Labrouhe, D.T., Pauchet, I., Pinochet, X., 2003. 30 years of sunflower breeding in France. Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides 10, 66-73.
Vear, F., Garreyn, M., Tourvieille de Labrouhe, D., 1997. Inheritance of resistance to phomopsis (Diaporthe helianthi) in sunflower. Plant Breeding 116, 277-281.
Vear, F., Serre, F., Jouan, I., Bert, P.F., Roche, S., Walser, P., Tourvieille de Labrouhe, D., Vincourt, P., 2008. Inheritance of quantitative resistance to downy mildew (Plasmopara halstedii) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Euphytica 164, 561-570.
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.
Velazquez, P.D., Formento, N., 2003. Effect of natural infection by Phoma oleracea var. helianthi-tuberosi Sacc. on some agronomic characters and oil yield of four sunflower (Helianthus annuus L.) genotypes with two levels of nitrogen fertilization. AgriScientia 20, 29-34.
Viguié, A., Serre, F., Walser, P., Vear, F., Tourvieille de Labrouhe, D., 2000. The use of natural infections under controlled conditions and of artificial infections to estimate phomopsis resistance of sunflower hybrids : conclusion after ten years of trials. 15e Conférence Internationale sur le Tournesol, Toulouse (France), pp. K-78 - K-83.
Vincourt, P., As Sadi, F., Vear, F., Bordat, A., Tourvieille, D., Godiard, L., 2011. La tolérance du tournesol aux maladies. Innovations agronomiques 14, 109-122.
Vrandecic, K., Jurkovic, D., Riccioni, L., Cosic, J., Duvnjak, T., 2010. *Xanthium italicum*, *Xanthium strumarium* and *Arctium lappa* as new hosts for *Diaporthe helianthi*. Mycopathologia 170, 51-60.
Wallach, D., Makowski, D., Jones, J.W., 2006. Working with dynamic crop models: evaluation, analysis, parameterization, and applications. Elsevier (Eds), 447 p.
Weeraratne, W.A.P.G., Priyantha, M.G.D.L., 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.
White, G.A., Starrat, A.N., 1967. The production of a phytotoxic substance by *Alternaria zinniae*. Canadian Journal of Botany 45, 2087-2090.
Willocquet, L., Aubertot, J.N., Lebard, S., Robert, C., Lannou, C., Savary, S., 2008. Simulating multiple pest damage in varying winter wheat production situations. Field Crops Research 107, 12-28.
Willocquet, L., Savary, S., Fernandez, L., Elazegui, F.A., Castilla, N., Zhu, D., Tang, Q., Huang, S., Lin, X., Singh, H.M., Srivastava, R.K., 2002. Structure and validation of RICEPEST, a production situation-driven, crop growth model simulating rice yield response to multiple pest injuries for tropical Asia. Ecological Modelling 153, 247-268.
Yin, X.Y., Kropff, M.J., McLaren, G., Visperas, R.M., 1995. A nonlinear model for crop development as a function of temperature. Agricultural and Forest Meteorology 77, 1-16.
Zadoks, J.C., 1989. EPIPRE, a computer-based decision support system for pest and disease control in wheat: its development and implementation in Europe. In: Leonard, K.J., Fry, W.E. (Eds.), Plant Disease Epidemiology, MacMillan, New York, pp. 3-29.

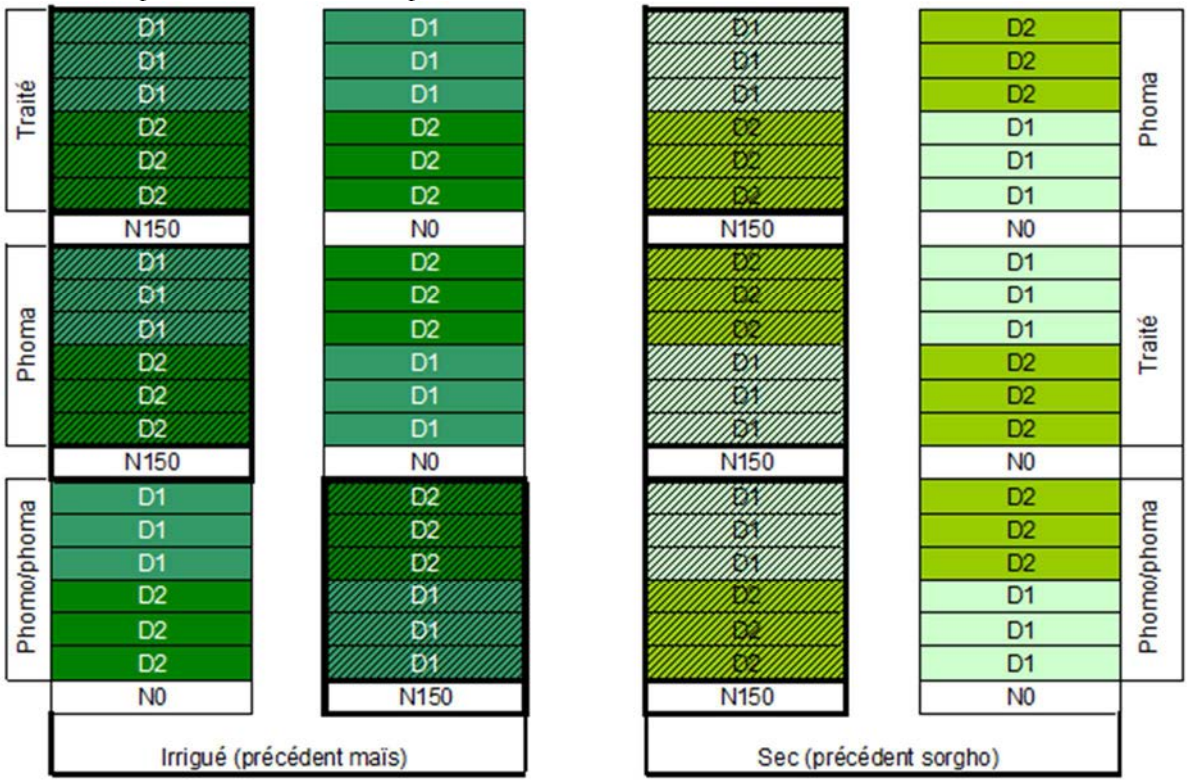
Annexes

Annexe 1 : Paramètres variétaux de SUNFLO

Processus	Nom	Signification	Unités	Valeur moyenne
Phénologie	TT_E1	Durée A2-E1	°C.jours	532
	TT_F1	Durée A2-F1	°C.jours	923
	TT_M0	Durée A2-M0	°C.jours	1170
	TT_M3	Durée A2-M3	°C.jours	1737
Architecture	NFT	Nombre de Feuilles Totales	s.u.	26.7
	n_SFimax	Rang de la plus grande feuille	s.u.	17.6
	SFimax	Surface Foliaire de la plus grande feuille	cm²	462
	k	Coefficient d'extinction du rayonnement	s.u.	0.84
Réponse à la contrainte hydrique	a_LE	Seuil de réduction de l'expansion foliaire	s.u.	-3.45
	a_TR	Seuil de réduction de la transpiration	s.u.	-9.77
Allocation de la biomasse	IRpot	Indice de Récolte potentiel	s.u.	0.41
	THpot	Teneur en Huile potentielle	%	55.5

Annexe 2 : Dispositifs expérimentaux au champ

Plan de l'expérimentation au champ menée à Auzeville en 2010



taille des microparcelles : 30m²
6 rangs, (inter-rang 50 cm) x 10 m

Modalités :

D1 : 3.5 plantes / m²
D2 : 7 plantes / m²

N0 : 0 kg N / ha
N150 : 150 kg d'N / ha

Phomo/phoma : parcelles non traitées
Phoma : parcelles traitées contre le phomopsis
Traité : parcelles témoins traitées contre le phoma et le phomopsis

variété semée : cv. Melody

Plan de l'expérimentation au champ menée à Auzeville en 2011



taille des microparcelles : 30m²
6 rangs, (inter-rang 50 cm) x 10 m

Modalités :

D1 : 3.5 plantes / m²
D2 : 7 plantes / m²

N0 : 0 kg N / ha
N150 : 150 kg d'N / ha

cv. Sikllos CL
cv. Kerbel
cv. LG5451 HO CL
cv. ES Paulina
cv. NK Ferti

Annexe 3 : Détails des équations du modèle géométrique représentant la lésion virtuelle provoquée par le *Phomopsis* dans la zone de mesure de la photosynthèse.

If $0 > x$

$xvirt = 0$

If $\dfrac{\left[\sqrt{l^2+w^2} - l\times\cos\left[\tan^{-1}\left(\dfrac{w}{l}\right)\right]\right]^2 \times\left(l^2+w^2\right)}{2\times l^2\times w^2} \geq x \geq 0$

$d = \dfrac{l^2+w^2-\left(\sqrt{2x}\times l\times w\right)}{\sqrt{l^2+w^2}}$

If $\sqrt{l^2+w^2}+\gamma \geq d \geq l\times\cos\left[\tan^{-1}\left(\dfrac{w}{l}\right)\right]+\gamma$

$xvirt = x + \dfrac{\gamma\left(2\sqrt{l^2+w^2}-2d+\gamma\right)\left(l^2+w^2\right)}{2l^2w^2}$

Else if $d \geq l\times\cos\left[\tan^{-1}\left(\dfrac{w}{l}\right)\right]$

$xvirt = x + a_1 + [a_2][a_3]$

With $a_1 = \dfrac{\left(2\sqrt{l^2+w^2}-d-l\times\cos\left[\tan^{-1}\left(\dfrac{w}{l}\right)\right]\right)\left(d-l\times\cos\left[\tan^{-1}\left(\dfrac{w}{l}\right)\right]\right)\left(l^2+w^2\right)}{2l^2w^2}$

$a_2 = \dfrac{\left(\sqrt{l^2+w^2}-l\times\cos\left[\tan^{-1}\left(\dfrac{w}{l}\right)\right]\right)\left(l^2+w^2\right)}{lw} + \dfrac{\sqrt{l^2+w^2}\times w}{l}$

$a_3 = \dfrac{l\times\cos\left[\tan^{-1}\left(\dfrac{w}{l}\right)\right]-d+\gamma}{2lw}$

If $1-\dfrac{\left(l^2+w^2\right)\left[w\times\cos\left[\tan^{-1}\left(\dfrac{l}{w}\right)\right]\right]^2}{2\times l^2\times w^2} \geq x > \dfrac{\left[\sqrt{l^2+w^2}-l\times\cos\left[\tan^{-1}\left(\dfrac{w}{l}\right)\right]\right]^2\times\left(l^2+w^2\right)}{2\times l^2\times w^2}$

$d = \dfrac{l^2}{2\sqrt{l^2+w^2}} + \dfrac{\sqrt{l^2+w^2}}{2} - \dfrac{l^2\times x}{\sqrt{l^2+w^2}}$

If $d \geq w\times\cos\left[\tan^{-1}\left(\dfrac{l}{w}\right)\right]+\gamma$

$$xvirt = x + \frac{\left(\gamma\sqrt{l^2 + w^2}\right)}{l^2}$$

Else if $\gamma \geq d$

$$xvirt = 1$$

Else if $d \geq w \times \cos\left[\tan^{-1}\left(\frac{l}{w}\right)\right]$

$$xvirt = x + b_1 + b_2$$

With $b_1 = \frac{\left(\sqrt{l^2 + w^2}\,\frac{w}{l} + w \times \cos\left[\tan^{-1}\left(\frac{l}{w}\right)\right]\frac{l^2 + w^2}{lw}\right)\left(d - w \times \cos\left[\tan^{-1}\left(\frac{l}{w}\right)\right]\right)}{2lw}$

$$b_2 = \frac{\left[\left(w \times \cos\left[\tan^{-1}\left(\frac{l}{w}\right)\right]\right)^2 - (d-\gamma)^2\right]\left(l^2 + w^2\right)}{2l^2w^2}$$

If $1 - \frac{\left(l^2 + w^2\right)\gamma^2}{2 \times l^2 \times w^2} \geq x > 1 - \frac{\left(l^2 + w^2\right)\left[w \times \cos\left[\tan^{-1}\left(\frac{l}{w}\right)\right]\right]^2}{2 \times l^2 \times w^2}$

$$d = \frac{lw\sqrt{2(1-x)}}{\sqrt{l^2 + w^2}}$$

$$xvirt = x + \frac{(2d - \gamma)\left(l^2 + w^2\right)\gamma}{2l^2w^2}$$

If $x > 1 - \frac{\left(l^2 + w^2\right)\gamma^2}{2 \times l^2 \times w^2}$

$$xvirt = 1$$

with xvirt: fraction of impacted area within the measurement area; x: fraction of visible necrotic area within the measurement area; l: length of the measurement area (30 mm); w: width of the measurement area (20 mm); γ: distance between the visible necrosis front and the virtual necrosis front.

d: distance between the necrosis and the farthest point on the diagonal of the measurement area

Analysis and modelling of the effects of cropping practices on two major sunflower fungal diseases caused by *Phoma macdonaldii* and *Phomopsis helianthi*

Phoma (*Phoma macdonaldii* / *Leptosphaeria linquistii*) and phomopsis (*Phomopsis* / *Diaporthe helianthi*) are two major sunflower fungal diseases. In a context of reduction of pesticides, a better understanding of the interactions between crop canopy, pathogens, environment and cropping practices is needed.

Field and greenhouse experiments set up at Auzeville in 2010 and 2011 allowed to dissect the impact of sunflower crop management on disease appearance and development. Key variables of plant architecture and microclimate, modified by cropping practices (variety choice, sowing density, nitrogen fertilization, irrigation) were described and related to disease components.

Thereby, for phomopsis, the key role of microclimate resulting from the level of development of leaf area during the initial stages of infection was confirmed. Leaf length and stem diameter are key characters for necrosis progression on leaf and stem. The impact of phomopsis leaf infection in term of damage mechanism was analysed and modelled. For phoma, the effect of nitrogen nutrition status on necrosis progression on stem and stem base was confirmed. The regulatory function of phoma towards phomopsis leaf infection was quantified.

In terms of modelling, several approaches were developed:

(i) evaluation of the predictive quality of Asphodel, an epidemiological model predicting *Phomopsis* ascospore release; application to different cropping practices and extension to phoma for primary inoculum;

(ii) development of a predictive model for phoma incidence taking into account the climatic, microclimatic and agronomic effects;

(iii) proposal of a conceptual model of the interactions between crop canopy, pathogens, environment and cropping practices

This study could contribute to the design of integrated management strategies for the main sunflower diseases, at field or at territory scale.

Key words: Sunflower, *Phomopsis helianthi* / *Diaporthe helianthi*, *Phoma macdonaldii* / *Leptosphaeria linquistii*, cropping practices, modelling

Analyse et modélisation des effets de la conduite de culture sur deux maladies cryptogamiques majeures du tournesol causées par *Phoma macdonaldii* et *Phomopsis helianthi*

Le phoma (*Phoma macdonaldii* / *Leptosphaeria linquistii*) et le phomopsis (*Phomopsis* / *Diaporthe helianthi*) sont deux champignons pathogènes majeurs du tournesol. Dans un contexte d'objectif de réduction de la lutte chimique, une meilleure compréhension des interactions peuplement-agents pathogènes-environnement-conduite de culture est nécessaire.

Des essais menés au champ et en serre à Auzeville en 2010 et 2011 ont permis de décomposer les effets de la conduite de culture du tournesol sur l'apparition et le développement des deux maladies. Les variables clés de l'architecture des plantes en peuplement et du microclimat, modifiées par la conduite de culture (choix variétal, densité de semis, fertilisation azoté, irrigation) ont été décrites et mises en relation avec les composantes de la maladie.

Ainsi, pour le phomopsis, le rôle déterminant du microclimat résultant du niveau de développement de la couverture foliaire lors des phases initiales d'infection a été confirmé. La taille des feuilles et le diamètre des tiges sont des caractères déterminants de la progression des dégâts sur feuille et tige. Les conséquences des attaques de phomopsis sur feuille en termes de mécanismes de nuisibilité ont été analysées finement et modélisées. Pour le phoma, le rôle du statut nutritionnel azoté dans la progression des attaques sur tige et collet a été confirmé. La fonction régulatrice du phoma vis-à-vis des attaques de phomopsis sur feuille a été quantifiée.

Sur le plan de la modélisation, plusieurs approches ont été menées :

(i) Evaluation de la qualité prédictive d'Asphodel, modèle épidémiologique prévoyant les émissions de ascospores de *Phomopsis* ; application à différentes conduites de culture et extension au phoma pour la partie inoculum primaire ;

(ii) développement d'un modèle prédictif de l'incidence du phoma prenant en compte les effets climatiques, microclimatiques et agronomiques ;

(iii) proposition d'une modélisation conceptuelle des interactions plante-agent(s) pathogène(s)-environnement-conduite de culture.

Ce travail pourra, à terme, contribuer à la conception de stratégies de gestion des principales maladies du tournesol, à l'échelle de la parcelle ou du territoire.

Mot clés : Tournesol, *Phomopsis helianthi* / *Diaporthe helianthi*, *Phoma macdonaldii* / *Leptosphaeria linquistii*, conduite de culture, modélisation

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier du CETIOM et de la région Midi-Pyrénées.