

Production d'apothécies chez *Sclerotinia* spp.

E.H. Achbani¹, D. Tourvieille² et M. Lenormand³

¹ Centre régional de la recherche agronomique, Laboratoire de pathologie végétale, BP 578, Meknès, Maroc

² Centre régional de la recherche agronomique, Unité de mycologie, 12, Avenue du Brézat, 63039 Clermont-Ferrand, France

³ École nationale supérieure agronomique, Laboratoire de pathologie végétale, 65 Rue Saint-Brieuc, 35042 Rennes, France

Résumé

Cette étude bibliographique apporte des informations générales et passe en revue les différentes méthodes de production d'apothécies et les étapes de ce processus chez les trois espèces de *Sclerotinia* les plus étudiées : *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum* et *S. minor*. L'induction des sclérotés se produit dans une large gamme de températures allant de 0 à 30 °C. La température influe surtout sur la grosseur des sclérotés au moment de leur formation. L'humidité est le facteur le plus déterminant. La carpogénèse est favorisée par des humidités moyennes et s'arrête lorsque le taux d'humidité est de 100 %. La lumière n'est pas nécessaire à l'induction mais a un rôle important dans la différenciation des disques apothéciaux. La photopériode adéquate est d'au moins 8 heures de lumière par 24 heures. Le milieu de production de sclérotés influe également sur la formation carpogénique et ceci indépendamment de l'espèce étudiée et du protocole expérimental adopté. L'utilisation d'un substrat à base de sable est le meilleur support pour induire les sclérotés. L'âge de l'isolat, l'aération, la taille des sclérotés et la flore microbienne ont une influence directe sur la germination des sclérotés.

Mots-clés : *Sclerotinia* spp., production d'apothécies, température, humidité, lumière, milieu de culture, substrat d'induction

Abstract

Apothecia production in *Sclerotinia* spp.

This bibliographical study gives general information and reviews the different methods used for producing apothecia and the different steps involved in this process for the three most studied species of the genus *Sclerotinia* : *S. sclerotiorum*, *S. trifolium* and *S. minor*. Sclerotia induction occurs at temperatures between 0 and 30 °C. Temperature mainly affects the size of sclerotia when they are formed. Relative humidity is particularly important. Carpogenesis is favoured at intermediate relative humidity and is impossible at 100 % relative humidity. Light is not needed for induction but plays an important role in the differentiation of the apothecia stipes. A minimum of 8 hours light every 24 hours are required for the differentiation of the apothecia stipes. Medium culture for the production of sclerotia affects their carpogenic

activity, regardless of isolate and experimental protocol. Sand substrate is the best support to initiate sclerotia. Age of isolate, aeration, size of sclerotia and microorganisms flora have an effect on the germination of the sclerotia.

Key words : *Sclerotinia* spp., apothecia production, temperature, relative humidity, light, medium culture, induction substrate

ملخص

إنتاج أوعية الزق لدى سكليروتينيا (*Sclerotinia* spp.)

ح. أشباني¹، د. تورفياني²، م. لونرمند³

1: المركز الجهوي للبحث الزراعي، مختبر أمراض النبات، ص.ب. 578 مكناس

2: المركز الجهوي للبحث الزراعي، وحدة الفطريات، 12 شارع بريزي، 6309، كليرمنفيرون،

فرنسا

3: المدرسة الوطنية العليا للفلاحة، مختبر أمراض النبات، شارع سان بريوك، 35042، رين،

فرنسا

تعطي هذه الدراسة المرجعية معلومات عامة وتتطرق إلى المراحل التي يمر منها الفطر للوصول إلى تكوين أوعية الزق لدى ثلاثة أنواع من فطر سكليروتينيا : س. سكليروتيروم (*Sclerotinia sclerotiorum*)، س. تريفوليورم (*Sclerotinia trifoliorum*) و س. مينور (*Sclerotinia minor*). يتم تحريض الجسيمات الحجرية للدخول في الإنتاش الجنسي على مدى حراري يتراوح بين 0 و 30 درجة مئوية، وتؤثر الحرارة خصوصا على حجم الجسيمات الحجرية أثناء التكوين، وتعد الرطوبة العامل الأساسي في هذا التحريض. فالإنتاش الجنسي يتقوى حينما تكون نسبة الرطوبة معتدلة ويفشل عندما تصل نسبة الرطوبة إلى 100٪. أما الضوء، فهو عنصر غير ضروري في المرحلة الأولى للإنتاش، لكنه يلعب دورا هاما في تكوين أوعية الزق، بحيث أنه لا بد من 8 ساعات من الضوء على الأقل في كل 24 ساعة حتى يتم الحصول عليها. ويؤثر الوسط المغذي أيضا في هذا الإنتاج بغض النظر عن نوع الفطر المدروس والبروتكول المطبق. وأحسن وسط لتحريض الجسيمات الحجرية للدخول في الإنتاش الجنسي هو المكون أساسا من الرمل. ولعناصر أخرى كعمر السلالة الفطرية، التهوية، حجم الجسيمات الحجرية والمتعضيات الدقيقة تأثير مباشر على الإنتاش الجنسي للجسيمات الحجرية

الكلمات المفتاحية : سكليروتينيا، إنتاج أوعية الزق، الحرارة، الرطوبة، الضوء، الوسط المغذي، جوهر التحريض

Introduction

Les maladies causées par les espèces du genre *Sclerotinia* constituent un handicap majeur pour de nombreuses cultures d'importance économique à travers le monde. En France par exemple, la pourriture blanche induite par *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary est l'une des affections cryptogamiques les plus dommageables sur le tournesol (Achbani et Tourvieille 1993a; 1993b).

Devant l'ampleur de ces maladies, de nombreux laboratoires de recherche étudient les moyens pour en limiter les dégâts. Les travaux portent sur la sélection de matériel végétal tolérant, sur le développement de méthodes de lutte chimique et sur la mise au point de techniques culturales permettant de réduire la densité de la maladie.

Dans le cadre de ces recherches, des efforts ont été déployés pour la mise au point de méthodes fiables, rapides et économiques permettant de ravitailler les laboratoires, tout au long de l'année, en quantité importante d'ascospores. Des améliorations sur de nombreux facteurs physiques, biologiques, chimiques et nutritifs ou autres qui influencent ou même déclenchent le processus de la germination sexuée des sclérotés, ont permis de réduire les délais d'obtention des résultats.

Cette étude rappelle quelques informations générales concernant le genre *Sclerotinia* et synthétise les différents travaux sur la production de la forme sexuée chez trois espèces de *Sclerotinia* : *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum* et *S. minor*.

Le genre *Sclerotinia*

Systématique

Le genre *Sclerotinia* fait partie de la classe des ascomycètes, champignons parfaits caractérisés par des ascospores contenues dans les asques et possédant des formes de fructification imparfaite et des organes de propagation très variés et très développés.

Ce genre appartient à la sous-classe des euascomycètes, en raison des filaments ascogènes qui sont dans une apothécie; au groupe des discomycètes car le carpophore est discoïde; à l'ordre des pezizales à asques inoperculés, à cause de leur mode de déhiscence relativement simple, de leur petite taille, et parce que les spores sont simples; enfin, à la famille des *Sclerotiniaceae*, avec deux autres genres, les *Monilia* et les *Stromatinia*.

Sexualité

La vraie fécondation et le cycle sexuel complet, avec les deux phases haploïde et diploïde, sont rares chez les champignons. Cependant, on distingue chez eux trois processus primordiaux.

- 1 - La transformation des cellules qui accomplissent l'acte sexuel.
- 2 - La division de l'acte sexuel en deux phases : plasmogamie, ou fusion des cytoplasmes et caryogamie, ou fusion des noyaux, ces deux phénomènes se déroulant séparément dans le temps et dans l'espace.

3 - La séparation de l'acte sexuel et de la production dans le temps et dans l'espace, faisant suite à la division de l'acte sexuel en deux phases.

Berthet (1964) rapporte que c'est à Dangeard (1894) que nous devons la découverte du mécanisme de la formation de l'asque. Dangeard découvre, en étudiant l'espèce *Peziza (Galactinia) vesicula*, que l'extrémité de l'hyphé ascogène se courbe en crochet. L'article terminal, le bec du crochet, est uninucléé; l'avant dernier article, binucléé, va se développer en un asque, dans lequel s'uniront les deux noyaux.

Ce travail fut suivi par les recherches de Harper (1900), de Maire (1903a et 1903b), de Guilliermond (1904 et 1905), de Faull (1905) et de Moreau et Moreau (1922; 1925).

Une synthèse des investigations sur les hyphes ascogènes a été élaborée par Chadefaud (1943), qui a lui-même poursuivi de nombreux travaux. Il a été amené à définir trois types fondamentaux d'éléments dangeardiens ascogènes : les types acrorhynque, pleurorhynque et aporhynque.

Le type acrorhynque est constitué d'un article terminal uninucléé et d'un autre subterminal binucléé, lequel va donner naissance à l'asque.

Le type pleurorhynque comporte un article subterminal binucléé du premier modèle (acrorhynque) qui subit une flexion de 180 °C. L'article terminal uninucléé peut soit rester libre, soit s'unir à la cellule antépénultième uninucléée. Un nouvel article binucléé se forme ainsi, et pourra donner naissance à un autre asque par bourgeonnement latéral.

Le type aporhynque présente deux mitoses conjuguées qui se font parallèlement, mais le bec latéral n'existe plus. Il est d'emblée fusionné avec la branche principale.

Homothallisme ou hétérothallisme

Le thalle des champignons parfaits, sexués, peut se présenter sous deux formes :

- monoïque, par conséquent hermaphrodite ou neutre (+-). Il comporte alors deux gamètes femelle et mâle ou leur équivalents. Dans ce cas, le champignon est homothallique.
- dioïque ne comportant qu'un des deux gamètes, mâle ou femelle, dans le cas d'hétérogamie (dimorphisme sexuel), ou + et -, s'il s'agit d'isogamie (le sexe n'est pas apparent). Dans le cas où la confrontation de deux thalles différents est une condition *sine qua non* pour réussir une fécondation, le champignon est dit hétérothallique.

L'hétérothallisme est dû à la ségrégation des facteurs sexuels qui se produit dans l'organe de reproduction sexuée, l'asque chez les ascomycètes. Cette ségrégation peut s'opérer au cours de l'une des trois divisions successives du noyau diploïde de l'asque. Si elle se produit durant la première, il en découle quatre ascospores (+) et quatre ascospores (-). Si elle se produit pendant la deuxième, les ascospores alternent par paires de sexes différents (++--++-- ou --++--++). Si, enfin, la ségrégation intervient au moment de la troisième division, les ascospores de sexes différents alternent une par une.

Chez *Sclerotinia* sp., le caractère homothallisme ou hétérothallisme n'a pas encore été clairement établi. Mais on admet généralement que ce genre est homothallique.

Critères de différenciation des trois espèces importantes de *Sclerotinia*

On peut différencier à coup sûr *S. minor* en se référant seulement à la taille des sclérototes qui est très petite. Mais on ne dispose d'aucun critère morphologique macroscopique nous permettant de faire une distinction entre *S. sclerotiorum* et *S. trifoliorum*. La différence apparaît par d'autres critères, entre autres celui de l'hôte et celui des conditions climatiques. Les auteurs admettent, en général, que *S. trifoliorum* est un champignon spécialisé dans les cultures fourragères, alors que *S. sclerotiorum* est réputé pour sa grande polyphagie. Raynal (1987) dit à ce sujet : « Le fait que *S. trifoliorum* différencie ses apothécies exclusivement en automne le rend par ailleurs pratiquement inapte à attaquer les autres cultures sur lesquelles sévit *S. sclerotiorum*. A l'inverse, il est fort peu probable que *S. sclerotiorum* aboutisse aux pourritures que l'on constate au printemps sur les légumineuses fourragères, étant donné ses exigences en température et sa période de carpogénèse, différente de celles de *S. trifoliorum* ».

Pour lever toute équivoque et établir une distinction claire entre les trois espèces de *Sclerotinia*, les études se sont orientées vers des critères cytologiques et biochimiques. Le nombre de noyaux et le nombre de chromosomes au niveau des ascospores ont été utilisés pour séparer les trois espèces de *Sclerotinia* (Wong et Willetts 1975 et 1979). Ces auteurs ont montré que les petits sclérototes de *S. minor* se distinguent cytologiquement par le nombre de chromosomes de leurs noyaux qui est de $4n$, contre $8n$ pour les deux autres espèces. De même, Frandsen (1946) rapporte que *S. trifoliorum* en possède huit. Pour différencier *S. sclerotiorum* et *S. trifoliorum*, similaires du point de vue nombre de chromosomes, Wong et Willetts (1979) proposent de recourir au nombre de noyaux, sachant que *S. trifoliorum* se caractérise par 4 noyaux contre 2 pour *S. sclerotiorum*. Ces résultats rejoignent ceux déjà publiés par Björling en 1942. En revanche, le nombre de chromosomes est, pour ce dernier, 6 au lieu de 8 pour *S. trifoliorum* et *S. sclerotiorum*.

En sérologie, les techniques de la double diffusion montrent que les trois espèces de *Sclerotinia* possèdent des antigènes communs formant des précipitations avec toutes les combinaisons possibles d'antisérums (Scott 1981). Mais *S. sclerotiorum* présente un nombre plus important de bandes de précipitations formées.

L'analyse électrophorétique des protéines totales et des enzymes plaide pour une distinction plus claire entre les espèces (Scott 1981; Wong et Willetts 1975 et 1979). Cruickshank (1983) constate, en travaillant sur les polygalacturonases (PG), les pectinases (Pe) et les pectinolyases (PL), une activité accrue de PG chez *S. sclerotiorum* et *S. minor* par rapport à *S. trifoliorum*. Cette dernière espèce se distingue par la présence d'une bande de PL. Cette similarité entre *S. trifoliorum* et *S. minor* a été aussi démontrée par Scott (1981), qui a utilisé les méthodes sérologiques et électrophorétiques.

Willetts et Wong (1973) ont essayé, en plus des protéines solubles, d'autres enzymes tels que l'estérase aromatique (RE), l'acide phosphatase (PA), le glucose-6-phosphate déshydrogénase (NADP), le NADPH déshydrogénase et malate déshydrogénase (NAD). Avec ces enzymes, ils ont pu distinguer clairement trois groupes sur l'ensemble des isolats analysés :

- groupe d'isolats présentant des sclérotés de petite taille, considérés auparavant comme des *S. minor*;
- groupe d'isolats issus des plantes fourragères avec des sclérotés de grande taille;
- groupe d'isolats considérés comme *S. sclerotiorum* avec deux autres isolats de *S. trifoliorum*. Depuis lors, ces auteurs suggèrent d'appeler *S. trifoliorum* tout isolat provenant des cultures fourragères, *S. sclerotiorum*, ceux des cultures légumières et *S. minor*, les isolats donnant des sclérotés de petite taille.

D'après Jayachandran *et al.* (1987), aucun élément de différenciation n'est observé pendant la formation d'apothécies chez les trois espèces de *Sclerotinia*. Mais cette constatation s'oppose à celle de Jones (1974) qui indique que la structure de l'ectalécipulum permet de distinguer les trois *Sclerotinia*.

Les différentes formes de *Sclerotinia*

Le thalle de *Sclerotinia* sp. est coenocytique et présente une partie végétative et une partie reproductrice.

La portion végétative assure le développement du thalle en puisant dans le milieu extérieur les aliments indispensables à la vie du champignon et à l'édification de la partie reproductrice, qui se traduit par des sclérotés.

Les sclérotés sont issus d'une transformation partielle, ou pseudomorphose, du mycélium (et non totale comme dans le cas de l'ergot du seigle et des graminées en général). En certains points, l'initiation se fait à partir de segments intercalaires d'un groupe d'hyphes ramifiés; elle est suivie d'une phase de croissance hyphale et de maturation, avec différenciation de la zone corticale mélanisée (Butler 1966). Ce processus de formation est qualifié déjà de "type ramifié" par Townsend et Willetts (1954), qui le distinguent du "type terminal" présent chez *Botrytis*, avec ramification d'un seul apex hyphal.

Les sclérotés sont constitués par deux couches : une couche servant de protection, l'écorce, et une autre dont le rôle est d'accumuler les matériaux de réserve, la moelle. L'écorce, ou plectenchyme, est formée de plusieurs couches de cellules à paroi épaisse, fortement cutinisée et imprégnée de mélanine, qui donne au sclérote une teinte noire. La moelle (ou prosenchyme) est constituée d'hyphes séparables ayant conservé leur aspect filamenteux et incolore.

L'accumulation des matériaux de réserve peut se dérouler de deux façons différentes; les glucides et les lipides se concentrent soit dans l'hyphe, soit sur la membrane qui présente de forts épaisissements gélatineux comme dans le cas de *Sclerotinia fuckeliana* (Langeron et Vanbreuseghem 1962). Les deux formes peuvent être combinées comme dans le cas de *Typhula graminum* (Langeron et Vanbreuseghem 1952). La germination du sclérote se produit, en général, aux dépens de la moelle, partie vivante du sclérote. L'écorce semble simplement traversée par les stipes.

L'apothécie, siège de la reproduction sexuée, est constituée d'un stroma en forme de coupe plus ou moins profonde ou de disque. Le stroma donne naissance à l'hyménium constitué d'hyphes ascogènes fertiles qui, à leur tour, forment les asques, et d'hyphes ascogènes stériles qu'on nomme les paraphyses.

Dans chaque asque ou cellule pénultième, électivement différenciée, se déroule une série de processus majeurs (caryogamie, méiose et cytokinèse) conduisant à la différenciation structurale des cellules spécialisées qui sont les ascospores ordonnées en rangées de huit.

Ontogenèse de l'appareil fructifère

Depuis déjà longtemps, on a étudié la germination sexuée ou végétative de *Sclerotinia* sp. Mais on s'intéressait, surtout dans le cas de la germination sexuée, à l'exégèse des facteurs externes qui interviennent dans la formation des stipes et des apothécies. Ce n'est qu'à partir de 1964 que les investigations se sont orientées vers les changements internes, par exemple les recherches d'Obreiter et Sproston (1964) et Cooke (1969) sur les échanges en hydrates de carbonés et en acides aminés au cours de la germination des sclérotés.

En effet, les premières informations sur l'ontogenèse de l'appareil fructifère ont été fournies grâce au travail de Saito (1973). En réalisant des observations anatomiques durant l'incubation et la germination des sclérotés de *S. sclerotiorum*, cet auteur s'est aperçu que les sclérotés, avant de germer, passent par une période qui correspond au temps nécessaire au démarrage du processus morphogénétique. Au nombre de quatre, les stades observés ont été précisés.

Stade I : Il y a formation de primordium dans la medulla. Il est constitué de cellules larges et étroites, à paroi mince et cytoplasme dense. Par suite de prolifération cellulaire, cet ensemble de cellules prend une allure de méristème.

Stade II : Le primordium est entouré de cellules sombres, pigmentées, à paroi épaisse et irrégulière. Celles-ci se développent aussi à l'intérieur du primordium.

Stade III : Une masse hyphale à paroi mince et à cytoplasme dense provenant du primordium (stade II) se développe pour donner naissance à un tissu à structure clairement distincte de la medulla.

Stade IV : Le primordium disloque l'écorce et émet de jeunes stipes apothéciaux. Ce phénomène n'est visible que sous le microscope.

Le stade I commence après 2 jours d'incubation et le nombre de primordiums augmente jusqu'au 5e jour. Le stade II apparaît le 4e jour et la quantité de primordiums parvenus à ce stade progresse jusqu'au 13e jour. Le stade III débute le 5e jour après l'incubation, mais la quantité de structures correspondantes reste faible et relativement constante durant l'essai. Quant au stade IV, il est exprimé, non en nombre de primordiums formés, mais en pourcentage de sclérotés qui entrent en germination.

L'émergence des premiers stipes commence à partir du 5e jour, mais n'est perceptible qu'à partir du 8e jour. Les observations recueillies après cette date représentent une bonne corrélation avec celles faites au microscope.

Sur *S. minor*, Bullock, Welletts et Ashford (1983) ont discerné quatre stades de développement chez l'apothécie et leur ont alloué des numéros de la série de Saito (1973). Le développement se parachève comme suit :

Stade V : Les initiaux apothéciaux présentent des longueurs variables de 0,5 à 1 mm.

Stade VI : La longueur de ces initiaux ne portant pas encore de disque est approximativement de 2 à 4 mm.

Stade VII : Apparition de jeunes apothécies avec des disques partiellement étendus.

Stade VIII : Apothécies mûres avec des disques complètement étendus portant des asques également mûrs.

Une étude assez récente élaborée par Jayachandran *et al.* (1987) a permis de mettre en évidence ce qui se passe lors de ces derniers stades de développement de l'apothécie. Au stade V débute la différenciation de l'excipulum externe et de l'excipulum médullaire. Les débris de l'écorce restent tout au tour de la base.

Au stade suivant, le sommet des initiaux apothéciaux est arrondi et la longueur de l'excipulum externe est constante, alors que les hyphes de l'excipulum médullaire s'allongent. Ensuite, le sommet s'enfle et une dépression se forme au centre pour donner la jeune apothécie à disque partiellement formé. Au cours de ce stade, il y a début de formation des asques et développement des paraphyses au dessous desquelles surgit le subhyménium. Ces paraphyses jouent un rôle primordial dans l'épanouissement du disque apothécial. Dans le dernier stade, l'excipulum externe se rétrécit vers les bords et la base du disque apothécial, l'excipulum médullaire s'allonge parallèlement à la longueur du stipe.

De petits asques s'observent précocement entre les paraphyses dès le stade VII au centre de l'hyménium. Ils s'étendent jusqu'à ce que leur sommet atteigne la surface du disque apothécial.

Méthodes de production d'inoculum d'ascospores

Le sclérote passe, pour donner des apothécies, par deux étapes essentielles : l'induction, ou initiation, et la différenciation. L'induction est l'acquisition par les sclérotés de l'aptitude à germer; elle se situe entre la fin de la formation des sclérotés et le début de l'apparition des stipes. La différenciation s'exprime par la formation d'apothécies au sommet des stipes. Les auteurs séparent les deux phases et cherchent les stimuli favorables pour chacune d'elles. Dans ce qui suit, nous abordons les différents stimuli de production d'inoculum d'ascospores chez *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum* et *S. minor*.

Température

Les sclérotés formés dans la nature demeurent pendant quelques mois inactifs avant d'acquérir la capacité de donner des stipes et par la suite des apothécies. Cette période qualifiée de phase de repos (ou dormance) débute d'août-octobre au printemps pour *S. sclerotiorum*, et de février-avril à l'automne pour *S. trifoliorum* (Raynal 1983 et 1985; Williams et Western 1965b).

Cette dormance peut être levée par des traitements thermiques (Dijkstra 1966; Mcgimpsey et Malone 1979; Raynal 1983; Smith et Boland 1989).

Raynal (1983) a montré que la production d'apothécies est considérablement améliorée par l'exposition des sclérotés de *S. trifoliorum*, produits sur milieu PDA ou sur carottes, à la température ambiante du laboratoire pendant une durée d'un à six mois (temps de dessiccation) suivie de 24 heures de congélation. Après avoir expérimenté une gamme de températures et différentes durées d'exposition, l'auteur a finalement opté pour l'adoption d'une température constante de dessiccation de 30 °C et d'une durée d'incubation d'un mois. Cette température lui a permis de lever la dormance du maximum de sclérotés possible sur la vermiculite. Récemment, pour l'espèce *Sclerotinia sclerotiorum*, Mylchreest et Wheeler (1987) et Smith et Boland (1989) ont préconisé 4 °C pendant des durées de quatre à six semaines comme température permettant l'entrée des sclérotés en début du processus carpogénique.

Un conditionnement à 0 °C pendant quatre semaines a été aussi mentionné chez les trois espèces de *Sclerotinia* : *S. sclerotiorum*, *S. minor* et *S. trifoliorum* (Kohn 1979). Si les traitements ou pré-traitements évoqués jusqu'alors s'appliquent directement sur les sclérotés nus, d'autres, par contre, se pratiquent sur les sclérotés adhérant à un support. Ce support peut être du sable stérilisé ou non, du compost, du coton hydrophile, du milieu gélosé (1,5 %) ou de la perlite. Ici encore, les conditions thermiques adoptées diffèrent d'un auteur à l'autre et concernent surtout les sclérotés de *S. sclerotiorum*. Mylchreest et Wheeler (1987) traitent les sclérotés de *S. sclerotiorum* enfouis dans un compost avec une température de 10 °C pendant six semaines; Tourvieille *et al.* (1978) préconisent les températures hivernales sur les sclérotés déposés entre deux couches de perlite pendant trois mois; Schwart et Steasman (1978) les enterrent dans un sol en serre pendant environ 14 semaines. Sur le sable stérilisé et humidifié, les températures de 18-20 °C pendant trois à quatre semaines (Latorse 1986) ou de 5 °C durant quatre semaines (Garrabrandt *et al.* 1983) ont été utilisées. Enfin, le conditionnement à 15 °C en milieu gélosé pendant un à deux mois est aussi rapporté (Fedon et Brown 1987).

D'autres auteurs se sont intéressés aux effets dus à l'alternance des différentes températures nocturnes et diurnes sur la levée de cette dormance. Hawthorne (1973) rapporte qu'une production abondante de stipes a été enregistrée chez les sclérotés de *S. minor* soumis à un régime de températures diurne et nocturne respectivement de 15 °C pendant huit heures et de 10 °C pendant seize heures. Cependant, cette formation est quasiment absente sous les régimes de 25/20 °C; la même durée d'exposition précédemment citée étant maintenue.

Par ailleurs, Gimpsey et Malone (1979) font état d'un régime impliquant des températures plus froides, c'est à dire 8 °C le jour et 2 °C la nuit, et ceci après avoir congelé les sclérotés de *S. trifoliorum* pendant 48 heures à 18 °C. Ces mêmes auteurs proposent aussi l'application d'une seule température de 10 °C aux sclérotés (en boîte de Petri) pendant deux mois.

Hawthorne (1976), en soumettant pendant huit semaines les sclérotés de *S. minor* trempés dans de l'eau courante (en boîte de Petri) à un régime constant de températures s'étalant de 5 à 25 °C, a pu obtenir un nombre moyen important de 25 stipes par mg de sclérotés à 15 °C. Ce nombre n'est en moyenne que de 3,5 et 4,5 par mg à 10 et à 19 °C respectivement.

En outre, dans la nature, il est probable que la formation des stipes soit aussi stimulée par la même température, car l'auteur a noté que leur formation a été bien marquée dans des périodes où la température oscille entre 11 et 17 °C. Cette production de stipes peut être inhibée en exposant les sclérotés chaque jour à 19-20 °C durant quelques heures comme c'est le cas dans la nature jusqu'à fin avril; et cette inhibition ne peut être évitée même si les températures du reste du jour sont favorables (Hawthorne 1973).

Comme on peut le constater dans ce qui précède, d'amples informations touchent à l'influence des températures froides sur les sclérotés lors de certaines phases du processus de germination sexuée de *Sclerotinia* sp. Cependant, on ne dispose que de notes évoquant le traitement par le froid seul durant presque tout le processus carpogénique. Smith et Boland (1989) sont parvenus à obtenir l'émergence des stipes sur des sclérotés de *S. sclerotiorum* ayant subi un pré traitement à +4 °C pendant six semaines avant d'être transférés dans des sacs hermétiques stérilisés et exposés à la même température pendant 4 à 40 mois selon les isolats.

En guise de conclusion de ce chapitre, on remarque que l'induction des sclérotés se fait sous une large gamme de températures allant de 0 à 30 °C en passant par 4, 5, 8, 10, 14, 15, 18, 20, 25 °C. Il semble, en outre, que la température de 15 °C qui a retenu l'attention des trois travaux traités dans ce chapitre pourrait être, à notre sens, admise comme une valeur confirmée et pourrait être utilisée dans des travaux pour la recherche de facteurs autres que thermiques favorables à une telle induction. De notre part, nous avons utilisé cette valeur de 15 °C pour la production des sclérotés *in vitro* sur carottes et elle nous a permis d'avoir des sclérotés plus volumineux et plus pesants par rapport à ceux produits à 20 °C. De même, cette température a été utilisée pour induire avec satisfaction certains isolats de *S. sclerotiorum* originaires de pays différents (Achbani et Tourvieille 1994).

Humidité

Presque tous les auteurs qui ont étudié l'effet de l'humidité sur le processus carpogénique chez les *Sclerotinia* sp. aboutissent à la même conclusion : l'humidité est le facteur le plus déterminant dans la carpogénèse.

Au champ, Schwartz et Steadman (1978) affirment que plus de 96 % des apothécies ont été observées à proximité des plantes ou à côté du réseau d'irrigation. Ils ont conclu, en outre, que l'application d'une irrigation tous les

cinq jours conduit à une forte productivité en apothécies par rapport à celle appliquée avec une fréquence de dix jours.

Dans une étude qui a duré deux années, Teo et al. (1989) ont trouvé qu'à une humidité du sol élevée, le pourcentage moyen de sclérotés germés a varié entre 5,9 et 26,2 % alors que ce pourcentage n'a pas dépassé 1,7 % en cas d'une humidité faible. Teo et Morral (1985a), et par la suite Boland et Hall (1988a et 1988b), ont montré que les sclérotés produisent les apothécies à partir de -0,4 à -0,5 mPa, et une hausse de ces niveaux amène une augmentation du nombre de sclérotés germés.

Aux environs de 100 % de saturation (omPa), les sclérotés de *S. sclerotiorum* germent très peu ou pas du tout à cause du manque d'aération. Dans ces conditions, tous les sclérotés pourrissent après neuf semaines dans le sol (Moral 1977; Teo et Morral 1985b). En revanche, dans un sol sec, 95 % des sclérotés restent viables après un séjour de deux mois (Williams et Western 1965 b). Ceci laisse penser à une éventuelle lutte culturale contre cette forme de conservation de *S. sclerotiorum* par des irrigations appropriées permettant de réduire le taux d'inoculum dans le sol (Red et al. 1989).

Les travaux de Teo et al. (1989) ont montré que toutes les techniques utilisées pour étudier l'influence du potentiel matriciel du sol sur la germination carpogénique des sclérotés de *S. sclerotiorum* ont favorisé la formation des apothécies à un potentiel matriciel du sol voisin de 0 bar. Avec cette valeur, ces deux auteurs ont remarqué qu'à -0,06 et -0,12 bar, la germination s'accomplit aussi bien à la surface que dans le substrat et est toujours plus intense à la surface. Avec les sclérotés de *S. minor*, la germination sexuée se fait sous un potentiel hydrique du sol allant de -0,33 bar à -15 bars. Le maximum de germination est obtenu avec -0,33 bar à 18 °C (Imolehin et al. 1980).

Singh et Singh (1983) ont étudié l'effet de l'humidité de différents substrats sur la carpogénèse et ont constaté que le taux maximum d'apothécies mûres a été obtenu à 30 % d'humidité. La germination est faible avec une humidité de 10 % alors qu'avec une humidité supérieure ou égale à 50 % la germination est impossible. Ces faits ont poussé les auteurs (1984) à exclure le support "substrat" en mettant en contact direct les sclérotés avec de l'eau stérile et non stérile. Il en résulte un taux de germination élevé soit environ 91 %. Ils ont confirmé le fort pourcentage au contact direct des sclérotés avec de l'eau libre car les sclérotés placés dans d'autres substrats où ce genre de contact n'est pas établi n'ont suscité que de faibles pourcentages de germination. Cette eau libre, comme le suggère Bedi (1962), est nécessaire pour dissoudre certaines substances de l'écorce du sclérote et permettre la sortie de stipes.

A l'INRA de Clermont-Ferrand (France), c'est surtout sur la base de cette dernière supposition que l'induction des sclérotés se pratique. Celle-ci consiste à arroser copieusement des sclérotés placés entre deux couches de perlite chaque semaine pendant trois mois pour "nettoyer" ou "débarrasser" la surface des sclérotés de ces substances "nocives" à la formation des stipes.

De notre part, nous pensons que l'emploi de support est apparemment utile pour permettre l'induction des sclérotés. Les quelques essais que nous avons réalisés cette année (1991) pour faire germer les sclérotés dans l'eau libre ont tous

échoué; aucun sclérote n'a pu germer, ce qui va à l'encontre de la thèse de Singh et Singh (1984). Cependant, on est arrivé à les faire fructifier avec ou sans cette phase dite d'induction qui se fait normalement dans différents substrats selon les auteurs, en procédant à une pré-incubation à 4 °C ou à 30 °C pendant trois semaines (Achbani et Tourvieille 1993c).

Grow et Hall (1980) rapportent que la germination des sclérotés est plus influencée par le potentiel hydrique qui reflète la disponibilité en eau d'un sol pour les microorganismes que par la quantité d'eau contenue dans un substrat. Les besoins relatifs à ce potentiel hydrique varient beaucoup d'un isolat à un autre (Abawi et al. 1979; Morral 1977; Singh et al. 1983; Tores et Moreno 1986). Peut être que ce constat serait l'un des éléments expliquant le mystère qui entoure certains isolats qui, placés sous les mêmes conditions que d'autres, ne germent pas. Sur les cinq isolats de *S. sclerotiorum* d'origines différentes de nos essais, quatre seulement entrent en germination. Ce refus à la germination a été observé aussi par d'autres auteurs (Smith et Boland 1989).

Lumière

La lumière n'est pas un facteur nécessaire à l'émergence des stipes. Mais elle a un rôle important dans l'épanouissement de l'extrémité des stipes en apothécies, siège de la reproduction sexuée. Cette thèse est tellement évidente aux yeux des auteurs qu'elle n'a suscité que peu d'investigations.

Raynal (1987) a étudié l'influence de la quantité et de la qualité de la lumière sur la production d'apothécies chez *S. trifoliorum*. Il a pu faire une seule remarque : en exposant des sclérotés présentant des stipes à une gamme d'intensités lumineuses, il observe que sous un fort éclairage (400-800 uwcm⁻²), les stipes évoluent plus rapidement, mais que les apothécies qui en résultent s'affaissent, alors qu'elles restent turgescentes durant 15 jours si elles sont moins éclairées. De même, il n'a pas noté de différence d'effets entre un éclairage continu et une photopériode de 12 h/24 h, pour une même intensité lumineuse. En revanche, chez *S. sclerotiorum*, la lumière continue inhibe le développement des apothécies (Bedi 1962). Pour ce dernier, la photopériode adéquate est de 12 h/24 h; celle de 4 à 6 h aboutit à la formation d'apothécies rudimentaires ou stériles.

La différenciation des stipes exige la totalité du spectre lumineux (Ikegami 1959; Raynal 1987). L'évolution des apothécies se réalise à 100 % avec une lumière blanche (380-750 nm) et à 30 % seulement avec les lumières colorées (Raynal 1987). Ikegami (1959) obtient 78 à 100 % de production d'apothécies avec 600-1400 lux; au dessous de 100 lux, toute formation est impossible.

La lumière bleue, dont l'action inductrice des fructifications est connue chez de nombreux champignons (Durand 1976; Delmas et Mamoun 1982), est la plus préjudiciable à la production d'apothécies chez *S. trifoliorum*. Ceci est en désaccord avec les données de Ikegami (1959) qui rapporte que la formation des apothécies chez les sclérotés de cette espèce se fait sous la lumière du jour et aussi à la lumière colorée, telle que la jaune, la bleue, la verte et la couleur violette, mais pas sous la lumière rouge.

Pour *S. sclerotiorum*, la différenciation en apothécies des stipes formés à l'obscurité ou à la lumière orange exige la présence de la lumière pendant au moins 8 heures par jour (Bedi 1962; Mc Lean 1958).

Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour produire les sclérotés semble avoir une influence sur le pouvoir des sclérotés à entrer en induction. Les sclérotés obtenus sur milieu à base de carotte, bien qu'ils soient d'une taille assez volumineuse, sont moins productifs en stipes fertiles (apothécies) que les petits sclérotés produits sur milieu à base de pomme de terre. Raynal (1987) a comparé quatre types de milieux stériles : PDA en boîtes de Petri (20 ml/boîte), carottes en tranches en Erlenmeyer, carottes en purée en Erlenmeyer et tranches de pomme de terre (cultivar Bintje) en boîtes de Roux (200g/boîte). Le poids sec moyen de 100g de sclérotés a varié entre 5,24 et 5,33 g selon qu'il s'agit de carottes en purée ou en tranches; celui des sclérotés produits sur milieu pomme de terre n'a été que de 2,54 g. Malgré le faible poids des sclérotés produits sur milieu pomme de terre, le nombre moyen d'ascospores recueillies par apothécie a atteint 10^6 contre seulement $5,3 \cdot 10^4$ pour celles issues de sclérotés formés sur tranches de carottes.

Les sclérotés produits sur certains autres milieux comme le milieu à base de semence de soja ou d'haricot blanc sont inaptes à la production carpogénique (Smith et Boland 1989). Ces deux auteurs rapportent qu'un des 16 isolats de *S. sclerotiorum* étudiés initie la formation de stipes si les sclérotés ont été produits sur le milieu "blé" ou "PDA" et n'en forme absolument pas si ceux-ci ont été issus du milieu "soja" ou "haricot blanc". Peut-on établir une relation entre cette donnée et celle de Budge et Whipps (1991) selon laquelle la germination carpogénique de *S. sclerotiorum* dépend de la concentration du milieu en sucrose? D'après eux, plus celle-ci est élevée, plus la formation est inhibée. Les sclérotés produits sur le milieu Czapek-Dox salts à partir de 30 % de sucrose sont plus volumineux mais incapables de germer.

Les données de ces auteurs sont concordantes et débouchent sur la capacité supérieure des sclérotés produits sur milieu à base de pomme de terre à induire la forme sexuée du champignon par rapport à ceux formés sur les autres milieux envisagés. Ils notent, par conséquent, l'influence du milieu de production de sclérotés sur la formation carpogénique et ceci indépendamment de l'espèce étudiée et du protocole expérimental adopté.

En revanche, une étude réalisée par Jones et Gray (1973) montre l'impuissance des sclérotés produits à partir d'une culture pure sur milieu gélosé, de germer dans le sol à 20 °C, contrairement à ce qui se passe lorsqu'ils sont incubés dans de l'eau distillée à 14-16 °C. Les sclérotés récoltés dans le champ germent rapidement dans ce sol dans ces mêmes conditions.

Substrats d'induction

Pour induire les sclérotés de *Sclerotinia* sp., les auteurs utilisent différents substrats tels que le terreau argileux (Merriman 1976; Morral 1977; Singh et Singh 1983; Teo et Morral 1985b), le sol sablonneux (Merriman 1976; Singh et

Singh 1983; Teo et Morral 1985b), le sol limoneux (Morral 1977; Raynal 1987; Singh et Singh 1983), le sable (Raynal 1987; Singh et Singh 1983; Tores et Moreno 1986), l'argile et le terreau argilo-limoneux (Singh et Singh 1983), la terre calcaire de jardin bien équilibrée (Raynal 1987), la perlite, la vermiculite (Raynal 1987; Achbani et Tourville 1993c), le papier filtre, l'eau gélosée, l'eau courante ou distillée stérile (Singh et Singh 1983), la tourbe et le papier buvard (Tores et Moreno 1986).

Les notes sont contradictoires, le substrat préféré par l'un est contesté par l'autre. Pour Singh et Singh (1983), la meilleure production d'apothécies est obtenue par l'utilisation de sable stérilisé ou non. Ce substrat leur a permis d'avoir un taux de germination élevé (environ 84 %) et une période de maturation des apothécies la plus courte (23 jours). En revanche, pour Raynal (1987), le sable est défavorable à la production d'apothécies; celles-ci demeurent, en sus, plus petites. Bien que, pour cet auteur, la terre calcaire du jardin constitue le substrat le plus performant, particulièrement lorsqu'elle n'est pas stérilisée, il préconise, pour une production continue d'apothécies, l'emploi de la vermiculite. Tores et Moreno (1986) observent, en comparant la production d'apothécies sur différents substrats (tourbe, terre, sable, papier filtre), que le papier filtre représente le substrat le plus favorable.

En outre, il a été rapporté que la germination carpogénique est généralement plus abondante dans les sols légers (sable, terreau limoneux et terreau argilo-limoneux) que dans les sols lourds à 60 % d'argile (Merriman 1976; Morral 1977). En effet, venant à l'appui de cette thèse, Singh et Singh (1983) ont étudié l'effet des substrats formés d'un mélange "sable + argile" en proportions différentes sur la germination carpogénique des sclérotés de *S. sclerotiorum*. Dans leur essai, les taux de germination maximum et minimum ont été obtenus respectivement avec du sable stérilisé (90 %) et l'argile seule non stérilisée (12 %). Le pourcentage de sclérotés germés est proportionnel au taux de sable présent dans le substrat. Ils concluent que, plus le taux d'argile est grand, plus le pourcentage de germination est réduit et plus la période de maturation des apothécies est longue. Ils attribuent ce fait aux différents degrés d'aération dans les divers substrats et aussi à la quantité d'eau variable qui se fixe aux particules de ces substrats.

Cette liaison faite entre la part de l'argile dans un substrat et la production d'apothécies paraît absurde pour Teo et Morral (1985b) qui parlent d'une différence statistiquement non significative entre les pourcentages de germination des sclérotés obtenus à partir de 2 substrats : terreau sablonneux et argile lourde.

A notre avis, le substrat constitue d'abord un support qui fixe le sclérote afin que celui-ci puisse fructifier normalement (stipes vigoureux) sans anomalies. Il permet aussi de mettre à sa disposition de l'eau suffisante au processus de germination. Sans support, nos essais sont sans résultats, les quelques stipes émis sont fins et dans certains cas très longs, sans fructification et s'affaissent rapidement.

Autres facteurs

L'influence de l'âge des sclérotés de *S. Sclerotiorum* sur la durée de l'incubation a été étudiée par Phillips (1986). Plus les sclérotés sont âgés (sous les conditions naturelles), plus courte est leur période d'induction. Phillips détermine ainsi la relation entre l'âge des sclérotés ($x = \text{jour} + 1$) et le temps nécessaire pour le démarrage de la germination ($y = \text{jour}$) sous forme de l'équation polynomiale suivante :

$$Y = 56,40 - 17,82 \text{ Lnx} + 1,60 (\text{Ln } x)^2$$

Les résultats obtenus par cet auteur montrent que l'âge qui permet d'avoir la plus courte durée d'incubation se situe aux environs de 5 jours, que les sclérotés âgés de plus de 3 ans peuvent aussi rentrer en germination après une période d'incubation donnée et qu'une grande variation dans la durée d'incubation est obtenue avec les sclérotés fraîchement récoltés (entre 35 et 65 jours). Cette variation, comme le suggère l'auteur, peut être due à la difficulté de déterminer avec précision l'âge de "0 jour".

D'autres facteurs tels que l'aération du substrat, la taille et l'isolat peuvent agir sur la germination carpogénique. En effet, à une certaine profondeur dans le sol, le sclérote de *S. sclerotiorum*, en absence d'aération, peut former des stipes qui ne se différencient pas en apothécies (Bedi 1962; Singh et Singh 1983). Le même phénomène a été observé chez *S. trifoliorum* (Raynal 1987; Williams et Western 1965). Raynal (1987) a étudié le rôle de la profondeur de l'enfouissement de sclérotés dont la dormance a été préalablement levée, sur le reste du processus carpogénique. Les résultats montrent la nécessité de l'aération : aucune apothécie n'émerge à partir de sclérotés placés à plus de 3 cm pendant deux mois et, au fur et à mesure qu'on monte vers la surface, le nombre d'apothécies augmente. L'auteur a noté que, plus les sclérotés sont profondément enterrés, plus les stipes sont sujets à des nécroses (conditions asphyxiantes) et que leur chance de former des apothécies est, dans ce dernier cas, pratiquement nulle. De même, Singh et Singh (1983) ont noté, en plus des faits précédemment cités, que les sclérotés profondément enterrés (> 4 cm) ne germent pratiquement pas dans les différents substrats utilisés excepté le sable.

La taille des sclérotés a un certain effet sur la production d'apothécies. Raynal (1987) a noté une influence de la grosseur des sclérotés de *S. trifoliorum* sur la production carpogénique. Dans cette étude, c'est avec des petits (< 3 cm) et moyens (3-6 cm) sclérotés que le nombre d'apothécies par gramme de sclérotés est plus important par rapport aux sclérotés volumineux (> 6 cm). Une relation similaire a été aussi rapportée pour *S. sclerotiorum* (Bedi 1963).

Enfin, tous les auteurs ayant travaillé sur plus d'un isolat de *Sclerotinia* sp., constatent que la germination carpogénique dépend de l'isolat utilisé, sans pourtant en dévoiler la cause. En général, trois types d'isolats se présentent : les isolats plus productifs, les isolats moins productifs et les isolats stériles ne germant absolument pas. Pour cette raison, les auteurs accordent beaucoup d'importance au choix de l'isolat à utiliser pour la production d'ascospores en grande quantité et d'une façon régulière. D'autres part, la variabilité des isolats peut expliquer les nombreuses contradictions observées dans la littérature.

Dans la nature, la flore microbienne a une influence directe sur la germination des sclérotés. La littérature fait état d'une panoplie de microorganismes parasites ou antagonistes qui envahissent, détruisent les sclérotés et les empêchent, par conséquent, de germer (compétition trophique, lyse antibiotique ou invasion parasitaire).

Physiologie de la carpogénèse

Les travaux qui touchent à la physiologie de la germination carpogénique sont rares. Les études réalisées ont porté essentiellement sur la germination mycélienne, ainsi que sur celle du mycélium engendré. Saito (1974) et Kosasih et Willetts (1975) parlent d'une activité enzymatique accrue durant le processus carpogénique. Saito cite la bêtaglucanase comme seule enzyme entrant en jeu. Les techniques d'électrophorèse ont permis de mieux appréhender les facteurs mis en cause dans cette germination sexuée des sclérotés.

Actuellement, il est admis qu'une protéine d'environ 36 Kda est présente en grande quantité dans les cellules médullaires du sclérote de *Sclerotinia* sp. (Russo et Van Etten 1982; Russo et Van Etten 1985; Lucas *et al.* 1991) et représente 35 à 45 % des protéines totales du sclérote (Russo et Van Etten 1982). Cette protéine associée à une autre moins lourde (17,5 Kda) sont entreposées sous forme de corps protéiques perceptibles en microscopie photonique après coloration à l'amido black 10B (Lucas *et al.* 1991).

Avec la microscopie électronique à balayage, Lucas *et al.* (1991) ont constaté que ces protéines ressemblent à celles rencontrées dans les corps protéiques des graines de plantes supérieures. Les travaux sont poursuivis par ces mêmes auteurs pour étudier l'évolution de cette protéine (36 Kda) durant la germination sexuée et végétative des sclérotés et pour voir si ces organites assurent les réserves d'azotes que leurs homologues présentent dans les graines des plantes supérieures, en participant ainsi à l'élaboration de l'appareil fructifère pendant le processus carpogénique.

Références Bibliographiques

- Abawi S.G., Duniway J.M. et Grogan R.G. (1976). Influence of water potential on the survival of sclerotia of *Whetzellinia sclerotiorum* in soil. (abstract) *Proc. am. phytopathol. Soc.* **3** : 275-276.
- Achbani E.H. et Tourvieille D. (1993a). Le tournesol au Maroc : Les problèmes phytosanitaires. *La défense des végétaux* **448** : 30-32.
- Achbani E.H. et Tourvieille D. (1993b). Le tournesol, revue de ses maladies cryptogamiques. Partie I : La pourriture blanche. *Al Awamia* **75** : 129-154.
- Achbani E.H. et Tourvieille D. (1994). Methods of determining the reaction of sunflower genotypes to terminal bud attack by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Agronomie* **2** : 195-203.

- Bedi K.S. (1962). Light, air and moisture in relation to the formation of apothecia of *Sclerotium* (Lib) de Bary. *Proc. Ind. Acad. Sci. Sec. B.* **55** : 213-223.
- Bedi K.S. (1963). The age and the size of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary in relation to the formation of apothecia. *J. Ind. Bot. Soc.* **42** : 204-207.
- Berthet P. (1964). Essai biotaxonomique sur les discomycètes. Thèse de Doctorat Es-sciences naturelles de l'université de Lyon. 157 p.
- Björling K. (1942). Studier av utvecklingshistoria och variation hos *Sclerotinia trifoliorum*. Statens Växtskyddsantal. Stockholm Medd. **37**. 154 p.
- Boland G.J. et Hall R. (1988a). Numbers and distribution of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* in relation to white mold of white bean (*Phaseolus vulgaris*). *Can. J. Bot.* **66(2)** : 247-252.
- Boland G.J. et Hall R. (1988b). Relationships between the spatial pattern and numbers of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and stem rot of soybean. *Plant Pathology* **37(3)** : 329-336.
- Budge S.P. et Whipps J.M. (1991). Effect of sucrose concentration on sclerotia production and subsequent apothecial formation by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycol. res.* **95(2)** : 195-198.
- Bullock S., Willetts H.J. et Ashford A.E. (1983). The structure and histochemistry of Sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger. III. Changes in ultrastructure and loss of reserve materials during carpogenic germination. *Protoplasma* **117** : 214-225.
- Butler G. (1966). The multicellular condition. 3. Vegetative structure. In "The fungi". II. 83-112. ed. Ainsworth, G.C., Sussman, A.S. (Academic, New York). 805 p.
- Chadefaud M. (1943). Divers types d'éléments dangeardiens des Ascomycètes et formation des asques chez la pezize *Pustularia catinus*. *La revue scientifique* **81** : 77-80.
- Cooke R.C. (1969). Changes in soluble carbohydrates during sclerotium formation by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **53**, 77-86.
- Cruickshank R.H. (1983). Distinction between *Sclerotinia* species by their pectic zygograms. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **80 (1)** : 117-119
- Dangeard P.A. (1894). La reproduction sexuelle chez les Ascomycètes. *C.R. Acad. Sci.* **118**, 1065-1066.
- Delmas J. et Mamoun M. (1982). Influence de la lumière sur la fructification *in vitro* du pleurote d'abondance, *Pleurotus cornuipiae* Fr. ex. *P. Agronomie* **2** : 379-388.
- Dijkstra J. (1964). Acceleration of apothecial development of *Sclerotinia trifoliorum*. *Neth. J. Pl. Path.* **72** : 203.
- Durand R. (1976). Influence des radiations lumineuses sur le processus de reproduction des champignons; hypothèses sur l'identité des photorécepteurs. *Revue bibliographique. Mycopathologia* **60** : 3-16.

- Faull G.H. (1905). Development of ascus and spore-formation in Ascomycetes. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.* **32** : 77-112.
- Garrabrandt L.E., Johnston S.A. et Peterson J.L. (1983). Tan sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce. *Mycologia* **75** (3) : 451-456.
- Guilliermond A. (1904). Contribution à l'étude de la formation des asques et de l'épipleme des Ascomycètes. *Rev. Gén. Bot.* **16** : 49-65.
- Guilliermond A. (1905). Remarques sur la caryokinèse des ascomycètes. *Ann. Myc.* **3** : 343-361.
- Harper R.A. (1900). Sexual reproduction in *Pyronema confluens* and the morphology of ascocarp. *Ann. Bot.* **14** : 321-400.
- Hawthorne B.T. (1976). Observation on the development of apothecia of *Sclerotinia minor* Jagg. in the field. *N.Z. of Agric. Res.* **19** : 383-386.
- Ikegami H. (1959). Effect of light on maturation of apothecia of *Sclerotinia trifoliorum*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jappan* **24** : 273-280.
- Imolehin E.D., Grogan R.G et duniway J.M. (1980). Effect of temperature and moisture tension on growth, sclerotial production, germination, and infection by *Sclerotinia minor*. *Phytopathology* **70** : 1153-1157.
- Jayachandran M., Willetts H.J. et Bullock S. (1987). Light and scanning electron microscope observations on apothecial development of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **89** (2) : 167-178.
- Jones D. (1974). Ultrastructure of the stipes and apothecium of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **63** : 386-389.
- Jones D. et Gray E.G. (1973). Factors affecting germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* from peas. *Trans. Br. myco. Soc.* **60** (3) : 495-500.
- Khon L.M. (1979). A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon* **9** (2) : 365-444.
- Kosasih B.D. et Willetts H.J. (1975). Ontogenetic and histochemical studies of the apothecium of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Ann. Bot.* **39** : 185-191.
- Langeron M. et Vanbreuseghen R. (1952). Précis de mycologie, mycologie générale, mycologie humaine et animale, techniques. Collection de précis médicaux. Edit. Masson et Cie. 689 p.
- Latrose M.P. (1986). Les maladies du tournesol (*helianthus annuus* l.). Mémoire *E.N.S.H.V.*, 126p.
- Lucas M., Citharel L. et Citharel J. (1991). Étude microscopique et électronique des corps protéiques de sclérotites de *Sclerotinia sclerotiorum*. ANPP, III Conf. Inter. sur les maladies des plantes, Bordeaux, 3-5 Dec. 1991. p. 511-517.
- Maire R. (1903a). La formation des asques chez les pézizes et l'évolution nucléaire des Ascomycètes. *C.R. Soc. Biol.* **55** : 1401-1402.
- Maire R. (1903b). Recherches cytologiques sur le *Galactinia succosa*. *C.R. Acad. Sci.* **136** : 769-771.

- Mc Lean M.C. (1958). Some experiments concerned with the formation and inhibition of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis. Rep.* **42** : 409-412.
- McGimpsey E.Y. et Malone J.P. (1979). Production of apothecia of *Sclerotinia /Trifolium* in the Laboratory. *Bull. Br. MyCOL. Soc.* **13** : 104 .
- Merriman P.R. (1976). Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biol.. Biochem.* **8** : 385-389.
- Moreau F. et Moreau B. (1922). Le mycélium à boucles chez les Ascomycètes. *C.R. Acad. Sci.* **174** : 1072-1074.
- Moreau F. et Moreau B. (1925). Recherches sur quelques lichens des genres *Parmelia*, *Physcia* et *Anaptychia*. *Rev. Gén. Bot.* **37** : 385-417.
- Morrall R.A.A. (1977). A preliminary study of the Influence of water potential on sclerotium germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Bot.* **55** : 8-11.
- Mylchreest S.J. et Wheeler B.E.J. (1987). A method for inducing apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant pathol.* **36** : 16-20.
- Obreiter J.B. et Sproston T. (1964). Amino acids in relation to thermoperiod-cycling in *Sclerotinia trifoliorum*. *Phytopathology* **54** : 1395-1397.
- Phillips A.J.L. (1986). Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* after periods of conditioning in soil. *J. Phytopathology* **116** : 247-258.
- Raynal G. (1983). Production au laboratoire d'apothécies de *Sclerotinia trifolium* Eriks. pour l'évaluation de la résistance du trèfle violet à la sclérotiniose. *Agronomie* **3 (4)** : 369-373.
- Raynal G. (1987). Facteurs agissant sur la formation des apothécies de *Sclerotinia trifolium* Eriks. en conditions contrôlées. *Agronomie* **7** : 715-725.
- Russo G. M. et Van Etten J. L. (1985). Synthesis and localization of a development specific protein in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Bacteriology* **163** : 696-703.
- Russo G.M. et Van Etten J.L. (1982). Identification of a development specific protein in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*..*Experimental Mycology* **6** : 259-267.
- Saito I. (1973). Initiation and development of apothecial stipe primordia in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* **14** : 343-351.
- Saito I. (1974a), Ultrastructural aspects of the maturation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary., *Trans. mycol. Soc. Japan* **15** : 384-400.
- Saito I. (1974b). Utilisation of β -glucans in germinating sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. *Ann. phytopatholo. Soc. Japan.* **40** : 372-374.
- Schwartz H. et Steadman J.R. (1978) Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* **68** : 383-388.
- Scott S.W. (1981). Separation of *Sclerotinia* isolates collected from three herbage legume hosts. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **76 (2)** : 321-323.

- Singh U.P. et Singh R.B. (1984). Effect of different substrata on the production of apothecia in *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Pl. Dis. Prot.* **91** (3) : 236-238.
- Singh U.P. et Singh R.H. (1983). The effect of soil texture, soil moisture and depth of soil on carpogenic gemination of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* **90** : 662-669.
- Smith E.A. et Boland G.J. (1989). A reliable method for the production and maintenance of germinated sclerotia Separation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **76** (2) : 321-323.
- Teo B.K et Morral R.A.A. (1985a). Influence of matric potentials on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. I. Development of an inclined box technique to observe apothecium production. *Can. J. Plant Pathol.* **7** (4) : 359-364.
- Teo B.K. et Morral R.A.A. (1985b). Influence of matric potentials on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. II. A comparison of results obtained with different techniques. *Can. J. Plant Pathol.* **11** (4) : 393-399.
- Teo B.K., Morral R.A.A. et Verma P.R. (1989). Influence of matric potentials on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* **7** : 365-369.
- Tores J.A et Moreno R. (1986). Factors affecting carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Parasitica* **42** (2) : 45-53.
- Tounsand B.B. et Willetts H.J. (1954). The development of sclerotia of certain fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **37** : 213-221.
- Tourvieille de Labrouhe D., Guillaumin J.J., Vear F. et Lamarque C. (1978). Inoculation of sunflowers with ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. *Ann. Phtopathol.* **10** (4) : 417-431.
- Williams H. et Western J. H. (1965a). The biology of *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. and other species of sclerotium forming fungi I. Apothecium formation from sclerotia. *Ann. appl. Biol.* **56** : 253-260.
- Williams H. et Western J.H. (1965b). The biology of *Sclerotinia trifolium* Eriks. and other species of sclerotium forming fungi. II. The survival of sclerotia in soil. *Ann. appl. biol.* **56** : 261-268.
- Wong A.L. et Willetts H.J. (1975). A taxonomic study of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species : mycelial interactions. *J. Gen. Microbiol.* **88** : 339-344.
- Wong A.L. et Willetts H.J. (1979). Cytology of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species : mycelial interactions. *J. Gen. Microbiol.* **112** : 29-34.