



STEPP Bretagne
52 rue de Saint Ilan
22 360 Langueux
tel : 02.96.52.47.13
fax : 02.96.52.07.16
e-mail : stepp.bretagne@astredhor.asso.fr



ASTREDHOR
44 rue d'Alésia
75 682 Paris cedex 14
tel : 01.53.91.45.05
fax : 01.45.38.56.72

Compte-rendu[§] du Programme National

Efficacité des phytostimulants contre les maladies et ravageurs en cultures ornementales: développement d'une nouvelle stratégie phytosanitaire.

Année 2005

Une photothèque est disponible sur demande

[§] L'application des méthodes, résultats et conclusions aux conditions de chaque exploitation horticole se fait sous l'entière responsabilité des entreprises

SOMMAIRE

	Page
I INTRODUCTION.....	3
II. LE PROJET : AVANTAGES ATTENDUS ET OBJECTIFS	4
II.1 Intérêts scientifiques.....	4
II.2 Intérêts socio-économiques.....	4
II.3 Objectifs du projet.....	4
III. BILAN 2003 - 2004.....	6
III.2 Bilan de résultats acquis sur le sujet en 2004.....	6
III.1 Bilan de résultats acquis sur le sujet en 2003.....	6
IV. MATERIELS ET METHODES.....	8
IV.1 Les partenaires dans le projet.....	8
IV.2 Les phytostimulants.....	8
IV.3 Matériel et méthodologie (laboratoire).....	8
IV.3.1 Travail sur le couple cyclamen/fusariose.....	9
IV.3.1.1 Dispositif des essais.....	9
IV.3.1.2 Inoculation.....	10
IV.3.1.3 Traitements des produits.....	10
IV.3.1.4 Observation des symptômes et évaluation efficacité.....	10
IV.3.1.5 Echantillonnage et prélèvements.....	11
IV.3.1.6 Dosages enzymatiques.....	11
IV.3.2 Travail sur le couple Chrysanthème/ Rouille Brune.....	11
IV.3.2.1 Production d'inoculum.....	12
IV.3.2.2 Validation du modèle.....	13
IV.3.2.3 Mise en évidence du mode d'action du produit.....	14
IV.4 Matériel et méthodologie (station).....	15
V. RESULTATS.....	18
V.1 Résultats model cyclamen/fusariose (laboratoire).....	18
V.1.1 Effet direct fongicide.....	18
V.1.2 Efficacité de protection des produits vis-à-vis de FOC.....	18
V.1.3 Recherche marqueurs biochimiques.....	21
V.2 Résultats model chrysanthème/rouille (laboratoire).....	21
V.2.1 Reproduction des symptômes.....	21
V.2.2 Obtention de la dose d'inoculum.....	22
V.2.3 Effet direct fongicide.....	23
V.2.4 Validation du test et premier criblage phytosanitaire.....	24
V.2.5 Recherche marqueurs biochimiques.....	25
V.3 Résultats (station).....	25
V.3.1 Efficacité des produits sur cyclamen.....	25
V.3.2 Efficacité des produits sur chrysanthème.....	26
VI. CONCLUSIONS.....	27
VII. BILAN ET PERSPECTIVES.....	28

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

I. INTRODUCTION

Les horticulteurs sont aujourd'hui confrontés à une disparition des produits chimiques utilisables contre les maladies et ravageurs dans les cultures ornementales. Dans certaines cultures, l'application de la protection biologique intégrée (utilisation prioritaire de produits naturels ex. auxiliaires, répulsifs etc.) et l'utilisation de techniques culturales qui défavorisent l'installation des ravageurs dans les cultures (ex. variétés résistantes, climat et conduite de culture adaptés) sont des stratégies qui permettent de diminuer l'utilisation des produits chimiques. Une nouvelle voie complémentaire, prometteuse et probablement plus durable est de renforcer la plante contre les ravageurs avec des phytostimulants parmi lesquels se trouvent une nouvelle classe de produits phytosanitaires, celle des Stimulateurs des Défenses Naturelles (SDN).

Certaines molécules issues de l'interaction plante-pathogène (éliciteurs endogènes et exogènes) sont reconnues par la plante et induisent une réaction de défense contre ces pathogènes. Depuis une dizaine d'années, des expérimentations ont montré que les éliciteurs qui induisent les défenses naturelles des plantes peuvent être appliqués artificiellement et ainsi offrir une protection contre certaines maladies et ravageurs. Ce sont des molécules de faible poids moléculaire, soit d'origine naturelle (oligosaccharides, protéines ou lipides, extraits des algues, des plantes ou des micro-organismes), soit de synthèse. Les formulations SDN disponibles sur le marché sont encore peu nombreuses et leur application reste limitée aux cultures majeures. Cependant, aujourd'hui, les horticulteurs trouvent sur le marché une large gamme de produits dits "biostimulants" ou « phytostimulants ». Il s'agit de produits naturels ayant un effet stimulant sur le développement et la croissance de la plante (racines ou organes aériens) et qui sont susceptibles de provoquer une réaction de défense dans la plante. Ces produits pourraient ainsi protéger les cultures. Cependant, la preuve de leur efficacité reste souvent à faire. Etant donné la diminution des moyens de lutte contre les maladies et ravageurs en horticulture, l'exploration des effets SDN de ces produits pour protéger les plantes contre les attaques des pathogènes et ravageurs est devenue importante.

Suite à la demande de la profession, un projet de recherche appliquée, financé en partie par l'ASTREDHOR, a débuté à la STEPP Bretagne en 2003. Ce projet porte sur les produits SDN et leur efficacité en culture de plantes en pot. Deux modèles plante/maladie ont été choisis pour cette étude : cyclamen / fusariose (pathogène : *Fusarium oxysporum cf cyclaminis*) et chrysanthème / rouille blanche (pathogène : *Puccinia horiana*). Le choix de ces modèles est lié à l'importance des deux cultures pour la filière plantes en pot et à l'impasse de la lutte contre ces deux maladies. L'intérêt scientifique du projet est l'évaluation de la protection des produits contre deux maladies très différentes : une maladie du sol et une maladie des feuilles. L'objectif du projet est de trouver des produits avec une bonne efficacité contre ces maladies et parallèlement de chercher des marqueurs biochimiques spécifiques à l'induction des défenses du cyclamen et du chrysanthème. Une corrélation entre le niveau d'efficacité des produits et le niveau de certains bio-marqueurs trouvés dans la plante permettra d'identifier les produits SDN efficaces. Pour les tests préparatoires et la partie biochimique du projet, le BBV (Bretagne Biotechnologie Végétale) s'est engagé avec sa compétence dans les domaines de la phytopathologie et de la stimulation des défenses naturelles des plantes. Le choix des produits à tester est lié à la motivation du fabricant pour participer techniquement mais également financièrement à ce projet. Pour des raisons de confidentialité, le nom commercial du produit et sa matière active sont à ce stade du projet codés pour entièrement occulter son identité. Cela pourra aussi éviter une utilisation non autorisée du produit en horticulture ornementale. La divulgation de l'identité d'un produit prometteur reste donc la responsabilité du fabricant.

II. LE PROJET : AVANTAGES ATTENDUS ET OBJECTIFS

II.1 Intérêts scientifiques

Si les mécanismes de défense des plantes aux bio-agresseurs commencent à être relativement bien connus, l'action spécifique de produits simulant l'attaque de ces bio-agresseurs l'est beaucoup moins. Les travaux scientifiques qui pourront être réalisés au cours de ce programme de recherche permettront de mieux identifier les voies de défenses stimulées par les produits SDN.

De fait, les mécanismes de défense qui permettront aux plantes de se protéger le mieux des attaques de ravageurs et pathogènes pourront être identifiés et retenus comme voies à stimuler lors d'autres études avec d'autres produits ou dans le cadre de recherches fondamentales.

II.2 Intérêts socio-économiques

Conscients de la diminution de produits chimiques homologués en horticulture contre les ravageurs des cultures, des efforts à engager pour le respect de l'environnement, et soucieux de la qualité des conditions de travail du personnel ainsi que de l'image de l'horticulture en général, les professionnels en horticulture s'investissent dans la recherche de nouvelles techniques. La stratégie préventive de protection des cultures, possible avec les produits SDN, s'inscrit parfaitement dans ce contexte. Autre que les professionnels en horticulture, les organismes suivantes sont susceptibles d'être intéressées par le projet :

- Les fabricants des phyto-stimulants sont directement intéressés par les résultats, plusieurs d'entre eux étant directement impliqués dans ce projet.
- Les laboratoires d'analyse publics et privés seront intéressés par les méthodologies d'analyse qui pourront être développées.
- Les ingénieurs et techniciens des réseaux d'expérimentation des ICTA et ICTIA seront directement intéressés par les résultats de ces travaux pour ensuite vérifier l'efficacité des produits testés dans d'autres cultures.
- Les conseillers agricoles pourront appliquer sur le terrain les références acquises dans ce projet.

Plusieurs aspects des produits SDN sont favorables à leur développement :

- Les produits SDN testés sont souvent, dans l'état actuel des connaissances, peu phytotoxiques. Les doses utilisées sont souvent très basses.
- La toxicité est également faible pour les utilisateurs.
- La stratégie de la stimulation des défenses naturelles est complémentaire à d'autres stratégies de protection de végétaux comme la PBI.
- Un produit SDN peut être efficace contre plusieurs pathogènes, y compris contre les pathogènes contre lesquels il n'existe pas des moyens de lutte efficaces ou homologués (comme les virus et les bactéries).

II.3 Objectifs du projet

Ce projet, qui a été confié à la STEPP depuis 2003 par le Bureau de l'ASTREDHOR suite à l'avis favorable de la Commission Scientifique, a des objectifs suivants.

Pour la période 2003-2005 :

- Trouver des produits avec un effet SDN sur cyclamen (contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*) et sur chrysanthème (contre *Puccinia horiana*)
- Détermination des doses optimales d'inoculum (*Fusarium*/*Puccinia*)

- Recherche de marqueurs biochimiques des réactions de défenses induites chez le cyclamen et le chrysanthème, afin de développer des tests de détection fiables des molécules qui sont liées à la de défense contre les maladies chez ces espèces
- Criblage des produits avec un effet éliciteur de défense sur cyclamen et chrysanthème
- Etudier l'efficacité des produits criblés après inoculation des pathogènes.
- Déterminer l'évolution et la durée de cette réaction par produit SDN et les rythmes d'apport

Pour 2005 les objectives suivantes ont été définies.

Sur le couple Cyclamen/Fusariose :

- poursuite screening efficacité des produits éliciteurs de défense
- poursuite recherche des marqueurs biochimiques liés aux réactions de défense de la plante contre la fusariose

Sur le couple Chrysanthème/Rouille brune :

- développement d'un test de pathogénie avec développement d'une échelle de notation, maîtrise de l'inoculation et de la conservation des spores (rouille brune)
- étude des effets des produits SDN sur la croissance et le développement du chrysanthème avec tests de phyto-toxicité et d'adaptation des doses, tests d'activité anti-fongique SDN et tests d'efficacité SDN.
- recherche des marqueurs biochimiques liés aux réactions de défense de la plante contre la rouille.

III BILAN 2003 - 2004

III.1 Bilan de résultats acquis sur le sujet en 2003

Aux printemps 2003 nous avons commencé à travailler sur le couple cyclamen/fusariose avec deux variétés de cyclamen : une variété sensible et une variété dite « plus résistante » à la fusariose. Les tests au laboratoire ont montré que les deux variétés étaient sensibles. Une échelle de notation a été établie permettant de définir un indice de maladie du couple cyclamen/fusariose. 7 stades de la maladie ont été définis. Une dose optimale de l'inoculum de fusarium sur un milieu ? de millet a été déterminée à 2.107 CFU/l de terreau ce qui correspond à 1 gr/l. La dose établie permet un criblage efficace in vivo des matières actives testées. Selon la littérature scientifique, la méthode d'inoculation en mélangeant *F. oxysporum* dans le terreau est préférable que l'application des spores en pulvérisation pour une telle maladie du sol.

Après un premier screening de 6 produits, 2 produits ont révélé un certain niveau de protection du cyclamen contre la fusariose. Ce sont des produits à base d'acides humiques et fulviques et à base d'une souche de *Trichoderma harzianum*. Des tests supplémentaires ont montré que tous les produits testés n'ont pas eu d'activité anti-fongique, sauf le produit à base du *T. harzianum*. Dans d'autres tests pour vérifier l'action du produit sur le développement de la plante nous avons constaté une augmentation de la densité du chevelu racinaire avec le produit à base d'acides humiques et fulviques. mais un effet négatif a été observé sur le nombre de feuilles naissantes. Malgré des doses très faibles certains produits ont provoqué des symptômes de phyto-toxicité et les doses ont du être adaptées. Les mécanismes de protection du cyclamen contre la fusariose mis en jeu ne sont pas encore connus. Les analyses biochimiques (PR2) n'ont pas donné de résultats positifs.

Au cours d'une deuxième étape en juin 2003, nous avons mis en place à plus grande échelle des cultures de cyclamen et chrysanthèmes à la station STEPP Bretagne. Les plantes ont été traitées à intervalles de 15 jours avec des produits. Onze périodes de prélèvements des échantillons de feuilles ont été programmées pendant la durée des cultures. 18 jours après la première application des SDN, nous avons inoculé les cyclamen avec la fusariose. Les premières notations montrent qu'un des trois produits testés ralentit significativement le développement de la fusariose en cyclamen. L'efficacité des autres produits est moins prononcée et les données doivent encore être analysées. L'inoculation du chrysanthème avec de la rouille brune n'a pas encore été effectuée car le programme a été trop chargé. Les nombreux prélèvements effectués dans les 2 cultures pendant toute la durée de la culture cette année nous permettent de continuer à rechercher d'autres bio-marqueurs que le PR2 sur cyclamen et sur chrysanthèmes.

III.2 Bilan de résultats acquis sur le sujet en 2004

D'après les analyses agronomiques réalisées sur le cyclamen face à la fusariose vasculaire, nous avons observé une protection partielle avec les phytostimulants jusqu'à une certaine pression parasitaire. Parmi les produits testés, le produit B semble avoir une durée d'efficacité plus limitée que les produits A (Ferticament, Florendi Pro) et C. Il est regrettable de constater que toutes les plantes sont finalement atteintes de la fusariose et que les phytostimulants semblent simplement ralentir l'apparition des symptômes. On peut cependant espérer que ces produits soient plus efficaces en condition de pression parasitaire plus faible, c'est à dire en conditions de production. Les conditions climatiques semblent jouer un rôle important dans l'évolution de la pression parasitaire et donc dans l'efficacité des produits. Au cours de l'année de la canicule (2003), l'apparition et l'évolution des symptômes de la fusariose a été plus rapide dans les parcelles et le produit C n'a pas été aussi efficace qu'en 2004. La recherche d'une corrélation entre l'efficacité des phytostimulants et le niveau

d'induction de certains marqueurs biochimiques révélant une réaction de défense dans la plante, se poursuit.

L'efficacité des phytostimulants testés contre la rouille blanche du chrysanthème n'est pas encore démontrée après une infestation naturelle en 2004. Au laboratoire, seul le produit C induisait une réaction de défense chez le chrysanthème et l'activité des enzymes peroxydase et glucanase a été élevée. Mais ce résultat a été obtenu sans pression parasitaire de la rouille. La reproduction des symptômes de la rouille et la corrélation entre efficacité du produit et le niveau des peroxydases et des glucanases chez le chrysanthème reste à vérifier.

En conclusion, cette étude semble indiquer que les produits avec des effets SDN ne pourront pas véritablement remplacer les produits phytosanitaires classiques utilisés en traitement curatif contre les maladies. Cependant, les résultats que nous avons obtenus montrent que les applications préventives des produits classiques pourront être diminuées ou même supprimées.

IV. MATERIELS ET METHODES

IV.1 Les partenaires dans le projet

Les organismes et personnes suivantes ont participé au projet depuis 2003.

- La Station Technique d'Expérimentation des Plantes en Pots (STEPP BRETAGNE). 52, rue de St Ilan, 22360 Languieux. Tél. 0296524713. Fax. 0296520716. – moyens de personnel : 1 ingénieur responsable des expérimentations et 2 techniciens.
- Le laboratoire BBV (Bretagne Biotechnologie Végétale), Penn-ar-Prat, 29250 Saint Pol de Léon. Tél : 02 98 29 06 44. Fax : 02 98 69 24 26.– moyens de personnel: 1 chercheur et 1 stagiaire ingénieur, DESS «Elaboration et Amélioration de la Production Végétale ». Le laboratoire BBV travaille déjà depuis 10 ans sur les éliciteurs de défenses naturelles en cultures légumières. Ses chercheurs sont compétents et reconnus sur ce sujet au niveau national et international. Depuis 3 ans un quinzaine d'articles scientifiques sur se sujet ont été publiés.
- Le SAEP, Service d'Aide à l'Expérimentation Phytosanitaire, M. Jean Luc Tanguy, Kernonen, 29250 Plougoulm. Tél : 02 98 29 92 55. Fax : 02 98 29 82 93. M. Jean Luc Tanguy est reconnu comme expert en phytopathologie. Sa connaissance des maladies fongiques et du développement de l'inoculum est indispensable à ce projet.
- Les fournisseurs des produits. Pour des raisons confidentielles les produits testés sont anonymes dans ce rapport. Les produits efficaces pourront faire objet d'une homologation ou une commercialisation ultérieurement.

IV.2 Les phytostimulants

Les phytostimulants testés dans ce projet cette année sont présentés ci-dessous :

Produit*	Description	Produit testé sur / lieu station (s) laboratoire (l)	
		Cyclamen	Chrysanthème
B	Produit à base d'algues		X (s)
C	Produit à base d'acidobenzar-S-méthyl (ASM), un produit SDN de référence	X (s/l)	X (s)
D	Produit à base de <i>Trichoderma harzianum</i>	X (s)	
P04R12	Produit à base d'extrait de plante	X (l)	X (s/l)
P04A10	Produit à base d'extrait de carapaces de crustacée	X (l)	
P05B16	Produit à base de prohexadione calcium	X (s/l)	X (l)
P05C19	Produit à base d'extrait protéique d'origine bactérienne	X (s/l)	X (s/l)
BABA	Produit faisant partie de la famille des aminoacides avec effet SDN sur plusieurs végétaux		X (l)

* Les phytostimulants testés sont codés car, actuellement, il n'y a pas d'homologation phytosanitaire pour ces produits en horticulture ornementale

IV.3 Matériel et méthodologie (laboratoire)

Les travaux au laboratoire BBV sur les 2 couples hôte/pathogène nous a permis de bien préparer les essais sous conditions de production à la station STEPP et ensuite de bien évaluer l'efficacité des phytostimulants sélectionnés.

IV.3.1 Travail sur le couple cyclamen/fusariose

IV.3.1.1 Dispositif des essais

Trois essais ont été mis en place en serre.

Les essais 1 et 3 ont pour objectif d'identifier de nouveaux produits de type éliciteurs et de les évaluer pour leur efficacité de protection vis-à-vis de la fusariose. Au cours de ces deux essais, les produits testés seront comparés à des produits dont les efficacités sont connues (Produit C et carbendazime). Ces essais contiennent chacun 144 cyclamens. Suite aux notations effectuées sur toutes les feuilles de chaque plant de cyclamen notées (24 plants par modalité), nous avons pu calculer un indice de maladie (IM) et définir un taux d'efficacité pour chaque modalité testée. Cette efficacité n'est visible que 3 semaines minimum après l'inoculation. Les notations ont donc débuté à partir de cette date et ont été réalisées deux fois par semaine pendant 4 semaines. En fin d'essai, nous avons réalisé une analyse statistique suivi d'un test de Newman-Keuls permettant de déterminer des groupes homogènes avec les différentes modalités.

L'essai 2 a pour objectif de réaliser des prélèvements afin de rechercher des marqueurs de réponse de défense pouvant expliquer la protection observée éventuellement au cours de l'essai 1. 120 plants de cyclamens sont utilisés dans cet essai, et dans le même temps comme dans les essais 1 et 3, des notations ont aussi été effectuées pour confirmer les résultats obtenus dans l'essai 1.

Les essais 1 et 3 sont conduits de la même façon ; ce sont des essais en 4 blocs. Il y a 6 modalités avec 6 plants par modalité.

Les 6 modalités de l'essai 1 sont les suivantes :

- Deux témoins : l'un non inoculé (TNI) et l'autre inoculé (TE),
- Une référence fongicide (REF), à base de carbendazine, homologué et efficace contre la *F. oxysporum f.sp. lycopersici* de la tomate en application au sol. Nous avons choisi un produit non homologué contre la fusariose du cyclamen car il s'agit que les produits homologués contre la fusariose du cyclamen pour les cultures ornementales n'ont pas été efficaces.
- Une référence SDN produit C, à base d'acidobenzar-S-méthyl (ASM), homologué contre l'oïdium du blé, la bactériose de la tomate et le mildiou du tabac. C'est un produit avec des effets SDN, commercialisé par Syngenta.
- Produit P04R12, à base d'extrait de plante, homologué en tant que SDN sur l'oïdium de la vigne.
- Produit P04A10, à base d'extrait de carapaces de crustacée, distribué comme engrais et aurait une action anti-fongique et élicitrice sur certaines plantes.

Pour l'essai 2, il n'y avait que 5 modalités par rapport à l'essai 1 et 3, car le premier objectif de cet essai était de réaliser des prélèvements sur des plants préalablement traités et inoculés, dans le but de réaliser des dosages enzymatiques. Ainsi, la modalité TNI, n'a été utilisée que pour le premier prélèvement et n'est pas présente dans la suite de l'essai. Il n'y a donc que 5 modalités : TE, carbendazime, Produit C, P04R12 et P04A10

Au sein de l'essai 2, après avoir réalisé de la bibliographie de certains produits ayant un potentiel éliciteur, nous avons décidé d'en tester un sur cyclamen (Brisset et *al.*, 2005). Nous avons pris pour cela les plants non utilisés pour l'essai 2. Le produit testé est P05B16 à base de prohexadione calcium. Il est homologué comme régulateur de croissance sur pommier. Cette molécule a pour effet de bloquer les dioxygénases impliquées à la fois dans la voie des phénylpropanoïdes et de la biosynthèse des gibbérellines. Le premier effet permet d'activer certaines réponses de défense alors que la deuxième agit directement sur le développement du plant.

Au niveau de l'essai 3, après avoir obtenu les premiers résultats des essais 1 et 2, nous avons décidé de remplacer les produits P04A10 et P04R12 par deux nouveaux produits :

- Produit P05B16 : à base de prohexadione calcium, il est homologué comme régulateur de croissance.
- Produit P05C19 : à base d'extrait protéique d'origine bactérienne. Le produit est bien connu pour sa capacité à induire les mécanismes de défense des plantes.

IV.3.1.2 Inoculation

La provenance et le calibrage d'inoculum de FOC et la technique d'inoculation sont décrits dans les comptes rendus 2003 et 2004 du projet.

IV.3.1.3 Traitements des produits

La majorité des traitements sur cyclamen s'effectue par pulvérisation foliaire. Les concentrations apportées correspondent aux doses conseillées par les fabricants. Ce sont les suivantes pour chacune des modalités testées au cours des essais 1, 2 et 3 :

Carbendazime : 0,6%	P04R12 : 2%	P05B16 : 2,5g/l
Produit C : 0,1g/l	P04A10 : 2%	P05C19 : 0,5g/l

Pour la référence fongicide Pantor, 30 ml de produit sont apportés à chaque application par arrosage, car c'est un produit à systémie ascendante. Pour les autres modalités, 6 ml par plants sont pulvérisés pour le premier traitement. Ensuite, la quantité peut augmenter en fonction de la croissance des plants. Cela se détermine en réalisant le traitement eau en premier, puis de repérer la quantité appliquée au point de ruissellement.

Au niveau de l'essai 1, nous avons observé une légère phytotoxicité avec le produit C. Nous avons donc baissé la dose pour les essais 2 et 3. Celle-ci est passée de 0,1g/l à 0,08g/l.

IV.3.1.4 Observation des symptômes (échelle de notation) et évaluation efficacité

En 2003 une échelle de notation avec 7 niveaux a été développée pour évaluer les symptômes. Cette échelle prenait en compte le plant dans son ensemble et auquel on attribuait une note globale (de 0 à 6). L'échelle de notation disponible s'est avérée difficile à utiliser pour les plantes plus âgées. Pour cette raison, nous avons mis en place, une nouvelle échelle de notation prenant en compte chaque feuille indépendamment les unes des autres (un indice de maladie pour chaque feuille). Cette échelle comporte 6 niveaux décrits dans l'annexe 4

Ces notations nous ont permis de déterminer les indices de maladie par modalités et un pourcentage d'efficacité calculé par rapport au témoin eau inoculé. Pour un plant, nous avons en moyenne entre 10 et 20 notes, ce qui fait un total de plus ou moins 500 notes par modalités.

Pour calculer l'indice de maladie, la formule est la suivante :

$$((\text{nbr de feuilles indice } 0 \times 0) + (\text{nbr de feuilles indice } 1 \times 1) + (\text{nbr de feuilles indice } 2 \times 2) + (\text{nbr de feuilles indice } 3 \times 3) + (\text{nbr de feuilles indice } 4 \times 4) + (\text{nbr de feuilles indice } 5 \times 5)) / \text{nbr de feuilles total}$$

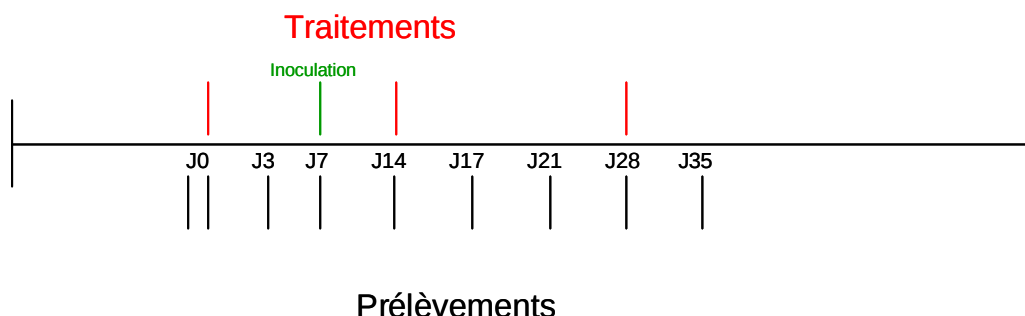
Pour calculer le pourcentage d'efficacité en fonction de TE, la formule est la suivante :

$$((\text{Moyenne IM TE} - \text{moyenne IM modalités X}) / \text{moyenne IM TE}) \times 100$$

Une étude statistique sur les indices de maladie obtenus par blocs et par modalités à l'aide du logiciel Statistica a été effectuée. Dans ces analyses statistiques, le facteur bloc ne sera pas pris en compte. Nous avons effectué une analyse de variance et un test de Newman-Keuls à 5%. Ce test nous a permis de constituer des groupes homogènes au sein desquels les modalités ne sont pas significativement différentes entre elles.

IV.3.1.5 Echantillonnage et prélèvements

Des prélèvements sont faits à intervalles réguliers. On considère pour ces prélèvements, qu'une plante sur laquelle on prélève des échantillons ne sert qu'une fois.



Représentation du calendrier des actions faites sur l'essai 2. A partir du premier traitement réalisé au jour 0 (J0) des prélèvements sont réalisés sur une période de 35 jours maximum (J35)

— : Date des prélèvements, ils sont au nombre de 9 sur la durée de l'essai.

— : Date de l'inoculation, une semaine après le premier traitement.

— : Date des différents traitements, il y a 15 jours d'intervalle entre chaque.

En effet, la méthode d'échantillonnage par perforation des tissus foliaires induit un stress pouvant perturber les analyses ultérieures.

Pour une même date, neuf prélèvements par modalités sont réalisés. Pour chaque modalité, à chaque date, 3 prélèvements sont réalisés sur 3 plants différents sur différentes feuilles du même étage foliaire. L'objectif étant d'analyser 3 marqueurs différents.

A chaque prélèvement, 100 mg de tissus de feuilles sont prélevés. Le prélèvement de feuilles se fait dans des tubes Eppendorf de 2 ml. Les tubes sont codés, échantillonnés, pesés et congelés dans l'azote liquide pour limiter l'évolution des tissus suite au stress engendré par le prélèvement. Après un certain temps dans l'azote liquide, les tubes sont stockés à -20°C jusqu'à l'analyse biochimique. Le poids frais réel est mesuré à la balance, afin de calculer le volume de tampon d'extraction à ajouter lors des tests biochimiques.

Les dosages enzymatiques sont effectuées par la suite.

IV.3.1.6 Dosages enzymatiques

Au niveau des cyclamens, nous avons choisi de doser les polyphénols totaux. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes. Cette production fonctionne comme un mécanisme de défense. L'oxydation des phénols en quinones et la consécutive polymérisation de celles-ci constituent des barrières toxiques et mécaniques contre des organismes pathogènes. Le protocole se trouve en annexe 6, il a été mis en place en 2005 au Centre Wallon de Recherches Agronomiques de Gembloux, avec pour objectif de déterminer la totalité des composés phénoliques de feuilles de pommier.

IV.3.2 Travail sur le couple *Chrysanthème/ Rouille Brune (Puccinia chrysanthemii)*.

La Rouille blanche (*Puccinia horiana*) étant une maladie de quarantaine, nous empêche de manipuler ce pathogène au laboratoire pour le moment. Un dossier de demande de dérogation a été envoyé au SRPV de Rennes et l'autorisation pour manipuler ce pathogène est prévue début 2006. En attendant, nous avons choisi la Rouille brune (*Puccinia chrysanthemii*) comme modèle pour avancer le travail sur la rouille blanche. Il a été attendu que certaines connaissances obtenus avec ce dernier pathogène seront transposables sur la rouille blanche.

IV.3.2.1 Production d'inoculum

Symptômes sur feuille et production d'inoculum

Pour reproduire les symptômes de rouille brune, nous avons dû dans un premier temps produire des spores. Pour cela, des feuilles de chrysanthème présentant des symptômes typiques de rouille brune infectées ont été prélevées en conditions naturelles dans la région de St Malo en novembre 2004. Pour produire des symptômes sur plantes saines plusieurs techniques ont été essayées. Tout d'abord, les feuilles infectées ont été frottées aux feuilles saines. La deuxième technique a consisté à taper les feuilles atteintes par la maladie au dessus des plants sains. Les deux techniques permettent de reproduire très facilement les symptômes de façon homogène et non calibrés, mais en quantité importante, des symptômes de rouille brune présentant des taches sporulantes au bout de 3 semaines. Cette reproduction dans nos conditions de serre peut se faire toute l'année puisque les plages de température et d'hygrométrie nécessaire au développement des symptômes sont relativement larges (de 10 à 20°C la nuit et de 15 à 30°C le jour)

Récolte des spores

Pour pouvoir réaliser des essais et reproduire les symptômes de rouille, il faut récolter les spores de rouille régulièrement. Pour cela, il faut attendre la maturité de celles-ci. A partir de ce moment, les spores tombent naturellement. Il suffit donc de déposer sous les chrysanthèmes une feuille de papier d'aluminium et de taper les plants pour que les spores tombent. Ensuite, les spores sont mises dans des tubes pour permettre leur conservation.

Conservation/étude de la viabilité des spores et pourcentage de germination

Après la récolte des spores, différents types de conservation ont été testés. Dans un premier temps, les spores au sec sont mises en tube Eppendorf et sont laissées à température ambiante. Dans un deuxième temps, les spores en tube Eppendorf sont congelées dans l'azote liquide à -180°C.

Suite à ces différents types de conservation, des tests de germination de spores ont été réalisés pour déterminer si le mode de conservation ne détruisait pas les spores. Pour cela, dans une boîte de Pétri sur de l'eau gélosée, des spores sont déposées et laissées à température ambiante pendant 24H. Ensuite, les spores sont observées au microscope.

Avant chaque inoculation de chrysanthème, un test de germination est réalisé et nous calculons le pourcentage germinatif des spores. Au microscope, sur une partie de la boîte de Pétri, nous observons les spores qui ont germées par rapport au total de spores. Nous recommençons plusieurs fois pour obtenir un taux de germination moyen pour la boîte.

Suite à différents tests de germination, il s'est avéré que les spores congelées ne germent pas toujours, ou que le taux de germination soit faible. Cette étape a suscité de nombreux problèmes qu'il a fallu résoudre afin d'identifier la meilleure technique pour leur conservation.

Reproduction des symptômes : technique d'inoculation

Différentes techniques d'inoculation ont été testées afin de définir la plus intéressante, c'est-à-dire celle permettant d'obtenir des symptômes homogènes : la vitesse d'apparition, en quantité et en localisation (absence d'agrégation), ainsi qu'une pression parasitaire satisfaisante. La première technique consistait à mélanger les spores de rouille avec du talc, puis nous avons déposé le mélange sur la face inférieure des feuilles de chrysanthème à l'aide d'un pinceau. Avec cette technique, la pression parasitaire est trop forte et les symptômes peu homogènes (taches non individualisées et difficiles à comptabiliser).

Par la suite, n'ayant obtenu aucun résultat satisfaisant, nous avons pris contact avec des laboratoires (INRA Grignon), travaillant sur la rouille des céréales pour connaître leur façon d'inoculer les plants. Ils nous ont alors conseillé d'essayer de mettre les spores de rouille en solution dans du Tween 80 (solution d'eau à 0,5% de Tween) ou dans du Soltrol pur (huile utilisée dans leur laboratoire pour les inoculations de rouille sur blé). Les spores ont donc été mises en suspension avec chacun de ces deux solvants et pulvérisées localement sur trois feuilles de chaque plant de chrysanthème. Malgré les conseils de l'INRA de Grignon, nous avons eu quelques problèmes avec ces deux solvants. Il a, en effet, été difficile de mettre les spores en suspension dans le Tween et avec le Soltrol, les symptômes se sont avérés rares voire absents, probablement dû à un effet phytotoxique de ces produits sur la plante mais également toxicité vis-à-vis des spores. Après ces résultats, nous avons envisagé de nous tourner à nouveau vers le talc pour inoculer nos plants, car nous avons obtenus des résultats satisfaisants. Nous avons donc modifié la première technique d'inoculation. Ainsi, au lieu de déposer le talc avec un pinceau, nous l'avons pulvérisé comme pour le Tween et le Soltrol. Les résultats obtenus par cette technique se sont avérés très intéressants et surtout homogènes.

Pour l'inoculation, nous utilisons donc un petit pulvérisateur en verre. Trois feuilles par plant sont inoculées avec le talc. Les plants sont mis 24h au phytotron à humidité saturante, puis ils sont mis en serre jusqu'à l'apparition des symptômes. La quantité de talc doit être très faible (léger film blanc sur les feuilles) et l'application se fait sur la face inférieure de la feuille.

IV.3.2.2 Validation du modèle

Criblage des produits efficaces

Suite à la validation de la méthode d'inoculation, nous avons lancé un premier essai de criblage. Celui-ci avait pour but de déterminer les références fongicides et SDN pouvant être utilisées comme témoin dans les futurs essais de criblage mais dans un premier temps, surtout valider notre test pour la capacité à discriminer des modalités entre elles.

Nous avons testé 2 molécules chimiques :

- Produit P05S03, Baycor 300 à base de bitertanol, homologué contre la rouille blanche du chrysanthème.
- Produit P05S04, Systane 6 à base de myclobutanil, homologué contre la rouille blanche et rouille brune du chrysanthème.

2 substances SDN ont été testés d'origine chimique largement connues pour leur capacité à induire des réponses de défense chez les plantes :

- Produit C
- BABA, faisant parti de la famille des aminoacides, ayant des capacités à stimuler les défenses chez de nombreuses espèces végétales (Pajot *et al.*, 2001 ; Silué *et al.*, 2002).

Pour le premier traitement, nous avons traité les plants sur toute leur surface (coté inférieur et supérieur des feuilles). Nous avons pulvérisé 4 ml de produit par plant sous hotte. Ces plants ont ensuite été remis en serre. Une semaine après le traitement, les plants sont inoculés avec la méthode validée, c'est-à-dire pour un plant inoculé : 2,3mg de spores mélangées à 1g de talc. Une fois inoculé, les plants sont placés au phytotron (18°C le jour et 15°C la nuit avec une photopériode de 12H) pendant 24H puis en serre. Un deuxième traitement est aussi réalisé une semaine après l'inoculation

Trois semaines après l'inoculation, les premiers symptômes de rouille sont observés. Au cours de cet essai, il s'est avéré que la dose d'inoculum était trop forte. Malgré cela, un produit a montré une certaine efficacité. En effet, ce produit à base de bitertanol, n'a donné aucune sporulation typique de rouille. Nous en avons donc conclu que le produit P05S03 présente une bonne efficacité de protection contre la rouille brune.

En ce qui concerne les autres produits, nous n'avons pas pu déterminer une efficacité à cause de la pression parasitaire.

Observation des symptômes (échelle de notation)

Après environ trois semaines en serre et après inoculation, les premiers symptômes de rouille apparaissent. Une première notation est alors réalisée. Pour chaque feuille inoculée, nous dénombrons le nombre d'impact (nécroses sporulantes en face inférieure) par feuille pour chaque plant inoculé ou non (témoin eau non inoculé).

Par la suite, le nombre moyen de tache sporulante par plant est calculé pour chaque modalité. Nous avons ensuite calculé le pourcentage d'efficacité par rapport au témoin inoculé (Ti)

Optimisation de la dose d'inoculum

Suite aux résultats obtenus avec le premier essai de criblage, nous avons réalisé une gamme d'inoculum pour obtenir une pression parasitaire satisfaisante. Cette gamme a été réalisée en utilisant comme référence la dose N utilisée pour le criblage sur plante décrit précédemment. Celle-ci était de 2,3 mg de spores par g de talc. Nous avons alors divisé cette dose par 20, 50 et 100.

Nous obtenons alors :

T0	→ 0 mg/g de talc
T N	→ 2,3 mg/g de talc
T N/20	→ 0,13 mg/g de talc
T N/50	→ 0,06 mg/g de talc
T N/100	→ 0,03 mg/g de talc

Les plants utilisés ont été inoculés sur trois feuilles, ils ont été placés au phytotron puis en serre.

Criblage des produits efficaces

Après avoir défini la dose d'inoculum optimale, nous avons réalisé un essai de criblage. Dans cet essai, nous avons utilisé P05S03 comme référence fongicide.

Les autres produits testés sont : BABA (B), Produit C, Produit P05B16, Produit P04R12, Produit P05C19. Trois plants par modalité sont utilisés. Pour le premier traitement, nous avons pulvérisé 10 ml de produit par plant, toujours 7 jours avant l'inoculation.

Les modalités testées :

B à 20 mM	C : 0,1 g/l	P05B16 : 2,5 g/l
B à 40 mM	P04R12 : 2%	P05C19 : 0,5 g/l
P05S03: 1ml/l		

Pour l'inoculation des plants, nous avons utilisé des spores congelées à la concentration T N/50. Ensuite, 1g de talc par plant a été pulvérisé. Pour le deuxième traitement, 15 ml ont été pulvérisés.

IV.3.2.3 Mise en évidence du mode d'action du produit

Mesure de l'effet fongicide direct des produits testés

Les produits étudiés dans le projet sont sélectionnés pour leur potentiel SDN, mais pour chacun d'eux, il est important de vérifier si les effets secondaires de type fongicide ne pourraient pas expliquer une éventuelle efficacité. Un test boîte de Pétri contenant de l'eau gélosée, permet d'évaluer la toxicité du produit vis-à-vis des rouilles en mesurant la germination des spores déposées.

Sur la boîte de Pétri, 1ml de produit est déposé et étalé pour permettre la diffusion du produit dans la gélose. Après avoir laissé sécher le produit, les spores de rouille sont déposées

minutieusement sur la gélose à l'aide d'un pinceau (Photo 20), mais sans contact direct avec celle-ci. La lecture se fait 24H plus tard, après avoir laissé les boîtes de Pétri à température ambiante. Cette expérience est répétée deux fois pour chaque traitement. Par ailleurs, pour ce type d'essai, deux témoins sont incorporés : un témoin fongicide de référence P05S03 et un témoin négatif correspondant à une boîte de Pétri sur laquelle le produit déposé est de l'eau. Le témoin eau permet de définir le pourcentage de spores germées. En plus des deux témoins, les différents produits testés ici, sont : P05S03 (Bitertanol, 1ml/l), P05S04 (Myclobutanil, 1%), P05C19 (0,5 g/l), BABA (40mM), P05B16 (2,5 g/l), P04R12 : 2%, Produit C (0,1 g/l).

Pour calculer le pourcentage de spores germées, nous avons observé les boîtes au microscope. Pour une boîte, nous avons dénombré pour un champ donné le nombre total de spores et le nombre total de spores germées. Le champ donné correspond à un champ microscopique, c'est-à-dire le cercle visible à l'objectif du microscope et dont la surface dépend du grossissement d'observation. Nous avons effectué ce comptage trois fois par boîte et pour les deux boîtes de chaque modalité. Au total, cela nous donne six répétitions avec 120 spores comptabilisées au total par modalité.

Prélèvements et échantillonnage

Suite au test antifongique, nous avons réalisé des prélèvements. Ceux-ci ont été réalisés sur des plants traités avec P05C19, Produit C et l'eau, car, avec le test antifongique, les pourcentages de spores germées étaient faibles avec ces modalités. Nous avons donc voulu évaluer si ces produits induisaient des réponses de défenses des plantes. Pour cet essai prélèvement, nous n'avons pas réalisé d'inoculation. On considère qu'une plante sur laquelle on prélève des échantillons ne sert qu'une fois, nous avons donc utilisé 36 plants. Nous avons prélevé à quatre dates qui correspondent à J0, J7, J14 et J21. J0 étant la date du premier traitement. Pour le prélèvement en lui-même, il est réalisé de la même façon que pour les cyclamens (paragraphe III.2.1.5).

Mesure de l'effet sur les réponses de défense des plants

En 2004, des essais effectués sur les chrysanthèmes ont permis de tester différents produits à la STEPP. Au cours de l'essai, des prélèvements sur chaque modalité et à différentes dates ont été effectués. Ces prélèvements ont permis de réaliser des dosages enzymatiques sur chrysanthème comme les glucanases et les peroxydases. Ces protéines sont connues pour leur rôle dans les systèmes de défense des plantes. Les protocoles de dosages sont décrits dans le compte rendu 2004.

IV.4 Matériel et méthodologie (station)

Des cultures de cyclamen et chrysanthèmes ont été mises en place à plus grande échelle à la station STEPP Bretagne en semaine 27. Les matériels et méthodes de travail en station (traitements, inoculations, observations etc.) ont été identiques avec ceux appliqués au laboratoire. Nous avons mise en place une culture de cyclamen (variété Halios violet foncé, Eyraud Plants) sous serre verre et une culture de chrysanthèmes (Louissette jaune, Challet-Herauld) sous tunnel plastique. Les fiches de culture du chrysanthème et du cyclamen (annexes 9 et 10) montrent les interventions effectuées dans les 2 cultures. Au niveau phytosanitaire nous avons donné la priorité à la protection biologique intégrée pour éviter des réactions induites des plantes suite aux applications des produits chimiques. Malgré l'application des techniques de lutte biologique, nous avons dû intervenir 1 fois en culture de chrysanthèmes contre pucerons noirs et chenilles avec des produits chimiques. Ceci pour éviter des réactions induites liées aux ravageurs qui peuvent masquer les effets des produits SDN sur les plantes. Les cultures ont été conduites sans interventions couramment utilisées

chez les horticulteurs (ébourgeonnage, application des régulateurs de croissance) après avoir constaté des réactions induites au niveau des feuilles prélevées susceptibles de masquer les réactions induites par les produits SDN. L'annexe 3 montre le climat enregistré dans les 2 cultures.

Un calendrier de suivi à la station, notamment les dates de traitement et d'inoculation, se trouve en annexe 7. Sept jours après la première application des produits, nous avons inoculé les cyclamen avec le fusariose selon une méthode expliquée dans le paragraphe III.2.2 du compte rendu 2003. Chaque fois un mélange de substrat et de d'inoculum a été préparé pour inoculer un lot de 8 pots. Ceci pour assurer une infestation la plus homogène possible dans les parcelles. Ensuite, les plantes ont été traitées à intervalles de 15 jours avec des produits à tester. Les volumes de bouillies de produits appliquées sont indiqués dans le tableau suivant :

Modalité et mode d'application	Cyclamen (volume par pot et concentration)	Chrysanthème (volume par pot et concentration)
Eau, pulvérisation	10 ml	30 ml et à partir du 3 ^{ème} traitement 40 ml (0,1%)
PRODUIT B, pulvérisation	N/A	30 ml et à partir du 3 ^{ème} traitement 40 ml (0,1%)
PRODUIT C, pulvérisation	10 ml (0,075 g/L)	30 ml et à partir du 3 ^{ème} traitement 40 ml (0,1g/l)
PRODUIT D, mélangé dans le substrat au moment du repiquage	1,15 g/l de substrat	N/A
PRODUIT P04R12	N/A	30 ml et à partir du 3 ^{ème} traitement 40 ml (20 g/l)
PRODUIT P05C19	10 ml (0,5 g/l)	30 ml et à partir du 3 ^{ème} traitement 40 ml (0,5 g/l)
PRODUIT P05B16	10 ml (2,5 mg/l)	N/A
Carbendazime (REF), traitement sol, seringue	30 ml (6ml/l)	N/A
Bitertanol (REF), pulvérisation	N/A	30 ml et à partir du 3 ^{ème} traitement 40 ml (1 ml/l)

A l'aide d'une nouvelle échelle de notation développée pour évaluer plus précisément les symptômes du fusariose sur cyclamen (voir paragraphe III.2.1.4), nous avons évalué pot par pot l'état des parcelles élémentaires à 4 périodes différentes, notamment 24, 29, 38 et 44 jours après inoculation de la maladie. Les 4 périodes d'observation nous permettent de suivre l'évolution de la maladie par parcelle.

Une inoculation de la rouille blanche et brune a été effectuée en culture de chrysanthème en suspendant 2 plantes infestées de la rouille blanche /100m² et 4 plantes infestées de la rouille brune /100m² au dessus de la culture à partir de la semaine 38, le début d'une période plus froide et humide. Au dessus des plantes infestées des ventilateurs ont été placés pour provoquer une infestation homogène dans les parcelles. Des consignes d'un climat favorisant la rouille a été établi dans cette culture en augmentant l'hygrométrie par micro aspersion. Le développement de la rouille brune sur chrysanthème a été évalué à l'aide d'une échelle de notation développée au laboratoire cette année (annexe 5). Une échelle de notation provisoire déjà utilisée en 2004 à la station a été choisie pour évaluer l'évolution des symptômes de la rouille blanche (voir compte rendu 2004).

Suite à la demande du Conseil Scientifique de l'ASTREDHOR, 5 plantes de cyclamen par parcelle élémentaire n'ont pas été inoculées, pour évaluer l'effet des produits sur le développement et la floraison du cyclamen.

Les prélèvements des échantillons au niveau de la station ont été arrêtés après avoir constaté trop de perturbations dans les dosages des marqueurs biochimiques. Les cultures sous conditions de production nous ne permettent pas d'obtenir des échantillons fiables.

V. RESULTATS

V.1 Résultats model cyclamen/fusariose (laboratoire)

V.1.1 Effet direct fongicide

Avant de mettre en place les essais de protection sur cyclamen, nous avons réalisé un test fongicide sur boîte de Pétri permettant de vérifier si les futurs produits testés au cours des essais menés à BBV et à la Stepp Bretagne n'avait pas un effet direct fongicide, effet qui pourrait être à l'origine d'une éventuelle efficacité observée lors de ces essais. Au cours de ce test, les cinq produits C, P04R12, P04A10, P05C19, P05B16 sont donc évalués pour leur effet fongicide par mesure de leur effet sur la croissance radiale de FOC (*F. oxysporum cycl*). Ces produits sont comparés à deux témoins : la référence fongicide, carbendazine, très efficace sur le fusariose de la tomate et un témoin négatif eau. Sans surprise, la croissance radiale est la plus faible avec la référence fongicide carbendazine et maximale avec la modalité eau. Ces résultats nous permettent de valider les conditions d'essai. Pour toutes les autres modalités testées, on ne distingue pas de différence de croissance avec le témoin eau. Tous ces produits n'ont donc pas d'effet direct sur FOC dans nos conditions d'évolution.

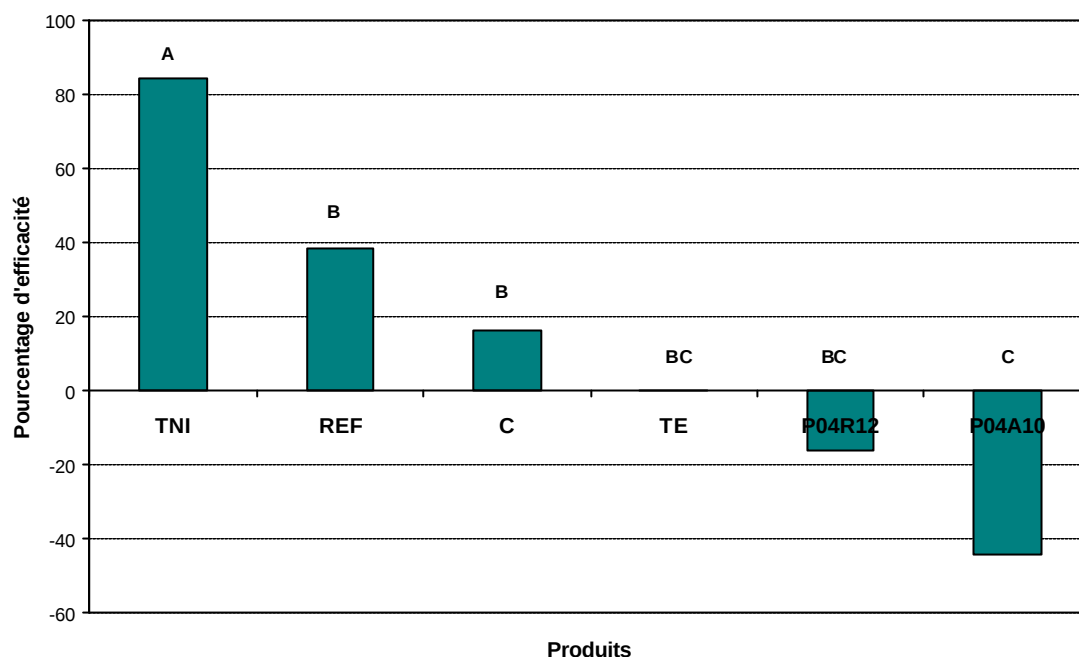
V.1.2 Efficacité de protection des produits vis-à-vis de FOC

Essai 1

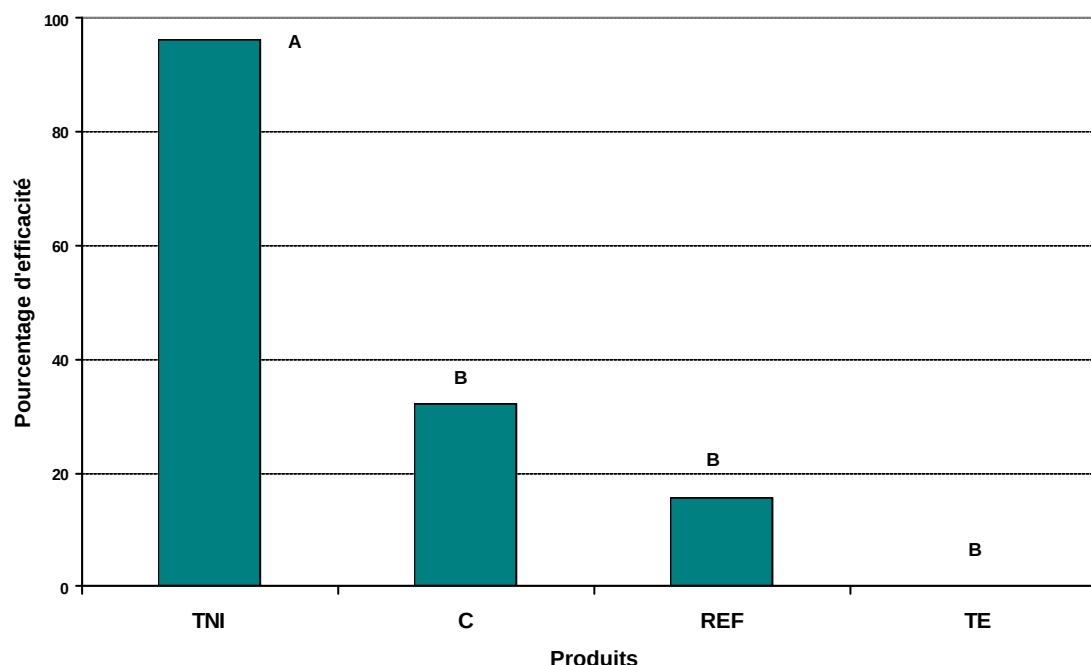
Le graphique 1 montre logiquement un taux d'efficacité proche de 80% pour la modalité TNI. On peut noter que les produits carbendazine (REF) et C obtiennent un pourcentage d'efficacité proche de 30%. Ainsi, produit C en tant que SDN aurait une efficacité, certes faible mais similaire au produit REF, produit fongicide de référence. En revanche, les produits P04R12 et P04A10 ne semblent pas efficace, au contraire ces produits accentuent les symptômes de la maladie. Cet effet est décevant, mais peu surprenant, vu que ce phénomène a déjà été observé avec d'autres molécules «phytostimulantes» sur certains couples hôte/pathogène et les effets observés peuvent donc être lié à une modification métabolique fragilisant la plante.

Onze jours plus tard, nous n'avons réalisé une 2^{ème} notation que sur quatre modalités (TE, TNI, REF et C) car pour les autres modalités, la majorité des plants était déjà mort, et nous avons constaté dans les résultats précédents qu'ils ne présentent aucune efficacité. Nous avons gardé les modalités REF et C, car elles semblent avoir un effet contre la fusariose et les témoins pour comparer les efficacités des autres produits.

Le témoin eau (TNI), montre un taux proche de 100% (graphique 2). En revanche, les pourcentages d'efficacité obtenus pour les modalités REF et C précédemment ont évolué. Ainsi produit C montre une efficacité plus importante que produit REF, avec 30% d'efficacité. En ce qui concerne produit REF, l'efficacité diminue et tend vers 15%.



Graphique 1 : Efficacité de protection obtenue au cours de l'essai 1, pour les modalités REF, C, P04R12, P04A10. Cette efficacité est exprimée en pourcentage par rapport à des plants témoins traités à l'eau (TE) et calculée 5 semaines après l'inoculation artificielle. L'efficacité de la modalité TNI (non inoculée) permet de juger de la pression parasitaire présente dans les pots au cours de l'essai. Les modalités présentant des lettres différentes sont significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ (Test Newman-Keuls).

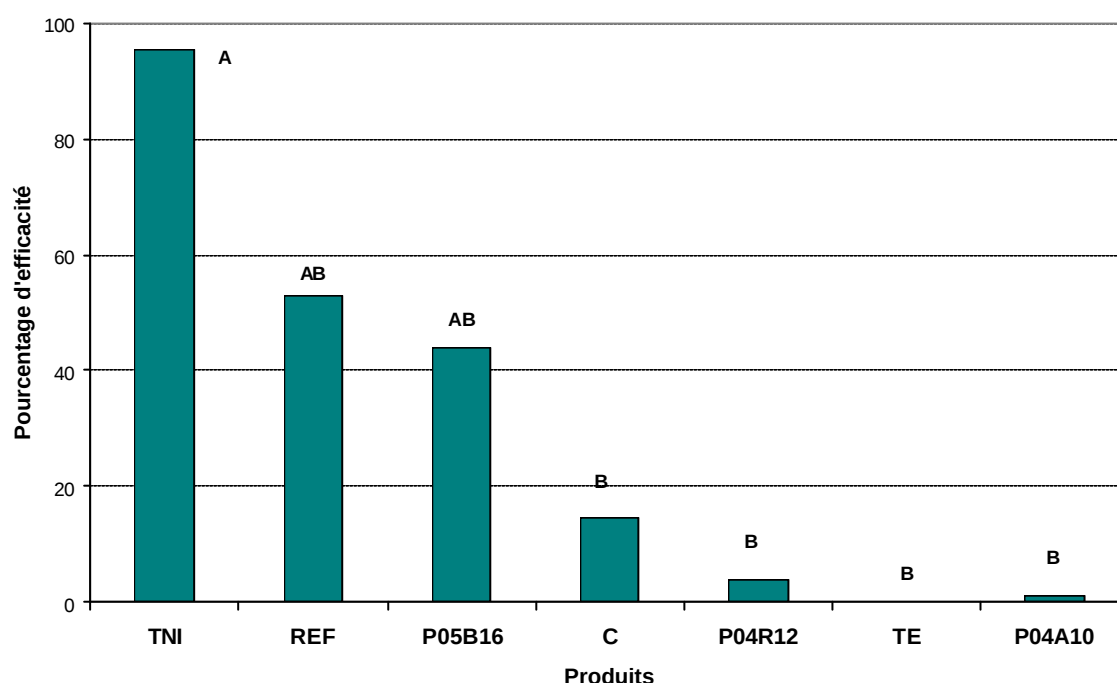


Graphique 2 : Efficacité de protection obtenue au cours de l'essai 1, pour les modalités REF et C. Cette efficacité est exprimée en pourcentage par rapport à des plants témoins traités à l'eau (TE) et calculée 7 semaines après l'inoculation artificielle. L'efficacité de la modalité TNI (non inoculée) permet de juger de la pression parasitaire présente dans les pots au cours de l'essai. Les modalités présentant des lettres différentes sont significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ (Test Newman-Keuls).

Essai 2

L'objectif de cet essai, mis en place avant l'obtention des résultats de l'essai 1 et dans les mêmes conditions que ce dernier, avait avant tout pour but de réaliser des prélèvements sur des plants traités et inoculés. Afin de suivre l'effet des traitements sur certaines réponses de défenses du cyclamen. Dans un second temps, cet essai permettait également de confirmer les tendances observées pour chaque modalité. Cependant, un septième traitement, P05B16, a été intégré à cet essai, mais avec un nombre de plants inférieur (12 plants) aux autres modalités.

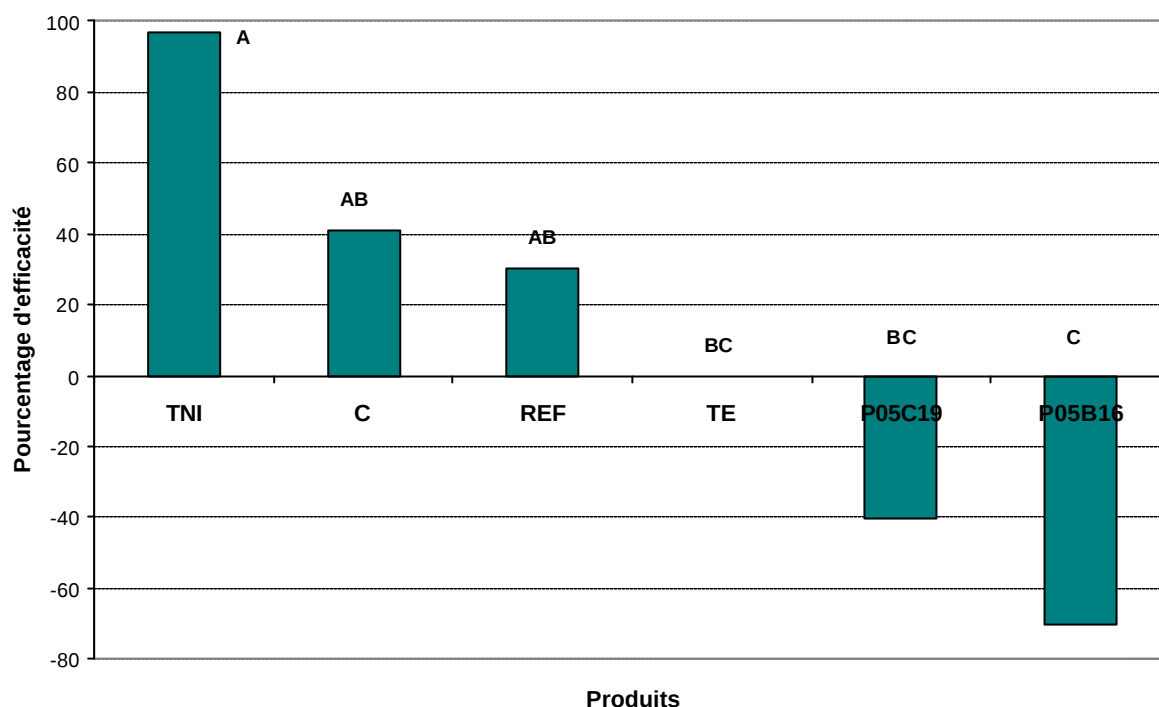
Dans le graphique 3, l'efficacité de la modalité TNI reste proche de 100%. On peut voir qu'à date de notation égale entre l'essai 1 et 2, les produits référence n'obtiennent pas les mêmes pourcentages d'efficacité. Le produit REF a un niveau d'efficacité plus important que dans l'essai 1, proche de 50%. A l'inverse, produit C obtient environ 20% d'efficacité, alors que précédemment, son efficacité est de 30%. P04R12 et P04A10 ne montrent à nouveau pas d'efficacité contre la fusariose. Enfin, pour P05B16, que l'on teste pour la première fois, le pourcentage d'efficacité est supérieure à 40%.



Graphique 3 : Efficacité de protection obtenue au cours de l'essai 2, pour les modalités REF, C, P04A10, P04R12, P05B16. Cette efficacité est exprimée en pourcentage par rapport à des plants témoins traités à l'eau (TE) et calculée 7 semaines après l'inoculation artificielle. L'efficacité de la modalité TNI (non inoculée) permet de juger de la pression parasitaire présente dans les pots au cours de l'essai. Les modalités présentant des lettres différentes sont significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ (Test Newman-Keuls).

Essai 3

Pour cet essai, nous avons testé les produits P05B16 et P05C19 (Graphique 4), en remplacement des produits P04R12 et P04A10, qui n'ont pas montré d'efficacité contre la fusariose. P05B16 a été testé dans l'essai 2 et a montré une certaine efficacité. Pour P05C19, nous avons peu de données, il est donc intéressant de le tester.



Graphique 4 : Efficacité de protection obtenue au cours de l'essai 3, pour les modalités REF, C, P05C19, P05B16. Cette efficacité est exprimée en pourcentage par rapport à des plants témoins traités à l'eau (TE) et calculée 7 semaines après l'inoculation artificielle. L'efficacité de la modalité TNI (non inoculée) permet de juger de la pression parasitaire présente dans les pots au cours de l'essai. Les modalités présentant des lettres différentes sont significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ (Test Newman-Keuls).

Les produits REF et C ont une efficacité comprise entre 30% et 40%, ce qui confirme les résultats de l'essai 1. En revanche, P05C19 et P05B16 ne montrent aucune efficacité. Il semblerait qu'ils accentuent les symptômes de la maladie. Or dans l'essai 2, P05B16, montrait une efficacité non négligeable.

V.1.3 Recherche marqueurs biochimiques.

Les échantillons issus des prélèvements dans l'essai 2 n'ont pas encore révélé des marqueurs fiables liés aux réactions de défense du cyclamen et la recherche d'un protocole de dosages reste encore très difficile développer pour le couple cyclamen / fusariose.

V.2 Résultats model chrysanthème/rouille (laboratoire)

V.2.1 Reproduction des symptômes

L'essai que nous avons réalisé pour valider le modèle de reproduction des symptômes a été effectué avec des spores congelées à la dose de 2,3mg de spores par g de talc. La pression parasitaire obtenue a été très forte et n'a pas permis de réaliser de notation, car les taches étaient non individualisées mais réparties de façons homogènes. Néanmoins la technique d'inoculation par pulvérisation de talc permet de reproduire les symptômes. Il n'est probablement pas possible de discriminer des produits entre eux avec un tel niveau de pression parasitaire. La détermination d'une gamme pour connaître la dose optimale permettant une pression raisonnable et quantifiable est à réaliser.

Malgré cette forte pression parasitaire, l'un des produits fongicides testé (bitertanol), a montré une efficacité visuelle totale contre la rouille (voir photos ci-dessous), le deuxième

produit fongicide (myclobutanil), n'a lui montré aucune efficacité. Pour les deux produits SDN, les observations visuelles ont simplement permis de voir une tendance d'efficacité pour BABA à 20mM qui devra être confirmée dans les prochains essais, après avoir défini la dose d'inoculum permettant une reproduction des symptômes quantifiables.



A



B



C

Résultats obtenus au bout de 3 semaines après inoculation de la rouille brune. A : témoin eau non inoculé. B : modalité inoculée et traitée avec bitertanol ayant une efficacité totale. C : Témoin eau inoculé.

V.2.2 Obtention de la dose d'inoculum

L'essai mis en place pour définir la dose d'inoculum optimale a été réalisé avec des spores fraîchement récoltées. En mettant en place cet essai, nous avons en parallèle calculé le pourcentage de germination des spores fraîches utilisées pour l'inoculation. Le résultat obtenu est faible (plus ou moins 2%). Trois semaines après l'inoculation, une notation a permis de définir le niveau de développement des symptômes de rouille en fonction de la dose d'inoculum utilisée. Le tableau 6 reprend ces résultats exprimés en nombre de taches sporulantes par dose d'inoculum.

Tableau 1 : Evaluation de l'intensité des symptômes de rouille, exprimée en nombre moyen de taches sporulantes / plantes inoculées, en fonction de la dose d'inoculum appliquée. 3 plantes ont été inoculées par dose d'inoculum. N est la dose de référence et correspond à 2,3 mg de spores par g de talc.

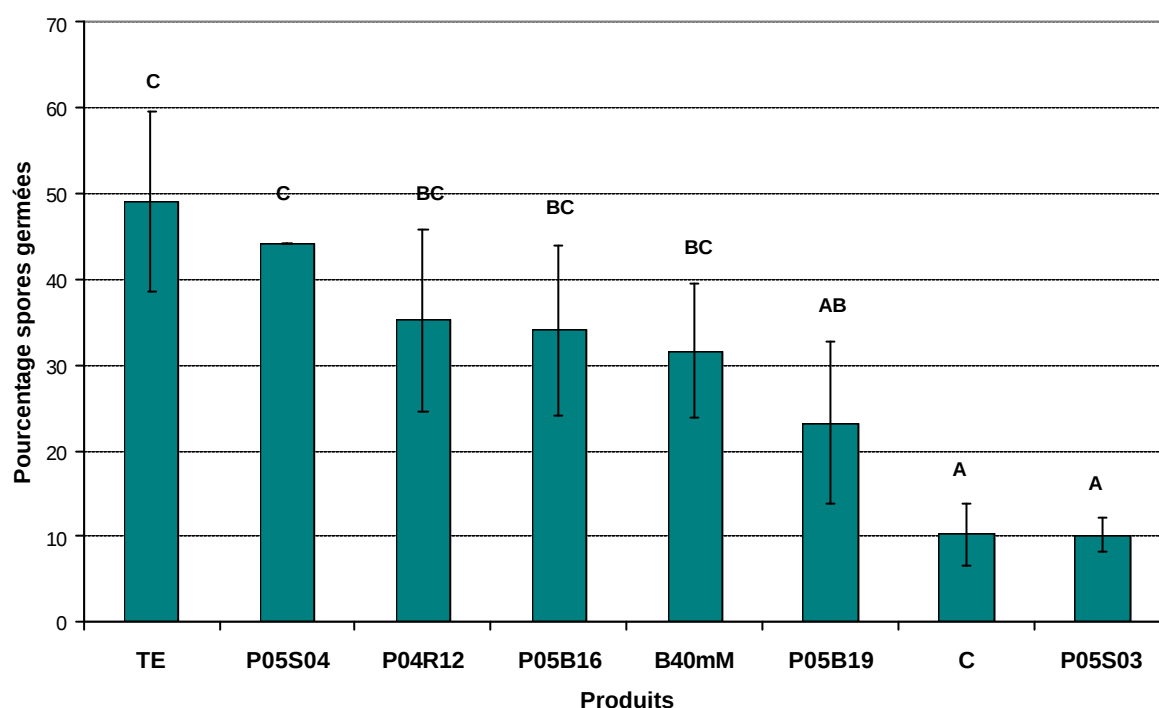
Gamme	Nombre moyen de taches sporulantes/plante inoculée
Témoin non inoculé	0
N	81,25
N/20	5,91
N/50	1,08
N/100	0,25

Nous avons une pression importante avec la dose référence, mais les taches sont parfaitement comptabilisables. Pour les doses N/20 et N/50, les taches sont homogènes et quantifiables, mais probablement insuffisamment nombreuses pour permettre un criblage phytosanitaire discriminant. L'interprétation de ces résultats doit prendre en compte le résultat du pourcentage de germination du lot de spores fraîches utilisées pour cet essai (environ 2%). En effet, par comparaison au premier essai réalisé aussi à la dose N, avec des spores congelées, l'intensité des symptômes est ici beaucoup plus faible. La qualité, c'est-à-dire la capacité germinative, du lot de spores fraîches utilisé est probablement très médiocre, qualité confirmée par le taux de germination très faible. Ainsi, cet essai « gamme » n'est peut être pas

une référence et à l'avenir, il est préférable d'évaluer la qualité du lot de spores utilisé pour l'inoculation en calculant son taux de germination.

V.2.3 Effet direct fongicide

Le test fongicide a permis de définir l'effet direct des produits phytostimulants étudiés, sur la germination des spores de *P. chrysanthemii*. Après avoir réalisé les comptages au microscope, nous avons calculé les moyennes de spores germées et ramené cela à un pourcentage de spores germées puis à l'aide du témoin eau, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition de la germination des spores pour chaque modalité. Les résultats obtenus sont regroupés dans le graphique n°5.



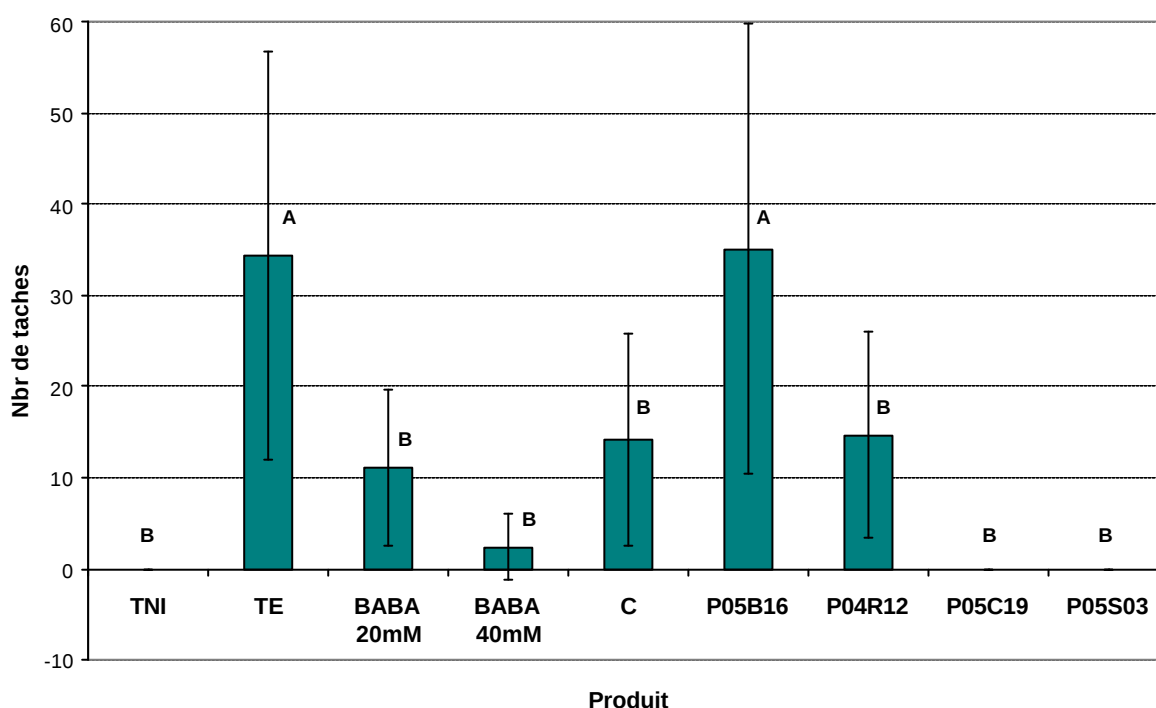
Graphique 5 : Pourcentage de spores de la rouille brune germées sur eau gélosée pour les modalités : P05S04, P04R12, P05B16, BABA 40mM, P05B19, produit C, P05S03 (référence fongicide), après 24 heures à Température ambiante. Les modalités présentant des lettres différentes sont significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ (Test Newman-Keuls). Les barres représentent les écart-types résultant de deux répétitions.

Dans nos conditions d'essai, 50% des spores observées ont germé pour la modalité TE (témoin eau). Dans cet essai, deux produits fongicides, P05S03 et P05S04, connu respectivement pour leur efficacité et non efficacité de protection vis-à-vis de la rouille brune, ont aussi été testés. Le fongicide P05S04, ne semble pas avoir d'effet significatif sur la germination des spores, (en corrélation avec son inefficacité). Alors que P05S03, inhibe très significativement (80%) la germination des spores (également en corrélation avec son efficacité de protection constatée sur le terrain). Ainsi, les deux références fongicides confirment les bonnes conditions du test. Les phytostimulants BABA, P04R12, P05B16, placés dans le même groupe homogène (BC), ne semblent que très peu perturber la germination des spores de rouille (entre 28 et 35% d'effet anti germinatif). Ce n'est pas le cas de l'éliciteur C, qui dans nos conditions présente une inhibition de la germination des spores de presque 90%, le plaçant dans le même groupe (A) que la référence fongicide bitertanol (P05S03). Concernant le phytostimulant P05C19, il inhibe à 50% environ la germination des

spores. Cet effet sera donc à prendre en compte dans les futures interprétations des résultats issues des tests de criblage. Ainsi, par la suite une corrélation entre efficacité de protection observée et effet anti germinatif pourra être intéressante pour l'interprétation du mode d'action impliqué dans l'efficacité des différents produits testés.

V.2.4 Validation du test et premier criblage phytosanitaire

Suite au premier essai de reproduction de symptômes (paragraphe V.2.1) qui nous a permis d'avoir une idée sur l'efficacité de protection de certains produits (P05SO3, P05S04 et BABA), nous avons voulu confirmer ces observations, en mettant en place cet essai. Au moment de la mise en place de cet essai, n'étant pas sûre de la dose « idéale » d'inoculum à utiliser, nous nous sommes appuyé sur les résultats obtenus au cours de l'essai « reproduction des symptômes ». Nous avons décidé de travailler à une dose d'inoculum de N/50 (N=2,3 mg/g de talc) préparé à partir de spores congelées du même lot que ceux utilisées dans l'essai « reproduction des symptômes ». La dose de N/50 a été choisie car la dose N de ce lot donnait une pression parasitaire trop élevée.



Graphique 6 : Nombre de taches moyen de la rouille brune par feuille pour les trois plants inoculés par modalité. Barres noires : représentation de l'écart type entre les 3 plants inoculés. Les modalités présentant des lettres différentes sont significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ (Test Newman-Keuls).

Le graphique 6 montre que le produit P05B16 n'a aucune efficacité. Le nombre de taches est similaire au nombre de taches présent sur feuilles de la modalité TE. Produits C et P04R12 montre une efficacité d'environ 50%, le nombre de tâches a été supérieur à 10. Pourtant lors du test sur boîte, le produit C a montré une efficacité intéressante. Pour BABA20mM et BABA40mM, le nombre d'impacts a été relativement faible. Le produit le plus intéressant est P05C19, car il obtient les mêmes résultats que P05S03. Nous n'avons pas observé de symptômes sur les plants traités avec P05C19. Il a une efficacité de 100%. De plus, lors du test sur boîte, son efficacité par rapport au témoin était de 35%. On peut donc penser que ce produit à une action anti-germinative, mais que son efficacité vient surtout du fait qu'il active les défenses naturelles des plantes.

V.2.5 Recherche marqueurs biochimiques

Au niveau biochimique, les dosages réalisés avec les prélèvements de chrysanthème effectués à la Stepp en 2004, n'ont pas confirmés ceux obtenus avec des prélèvements effectués en conditions contrôlées au laboratoire. Il semble donc difficile de pouvoir suivre in situ le niveau d'induction d'une plante (trop de paramètres influençant les mesures). Ceci étant possible en conditions contrôlées de manière significative (voir compte rendu 2004). La corrélation entre efficacité du produit testé en 2005 et le niveau des peroxydases et des glucanases chez le chrysanthème reste à vérifier avec les derniers prélèvements obtenus au laboratoire. Egalement une corrélation entre chrysanthème infesté avec de la rouille et un niveau élevé des peroxydases et des glucanases reste à confirmer.

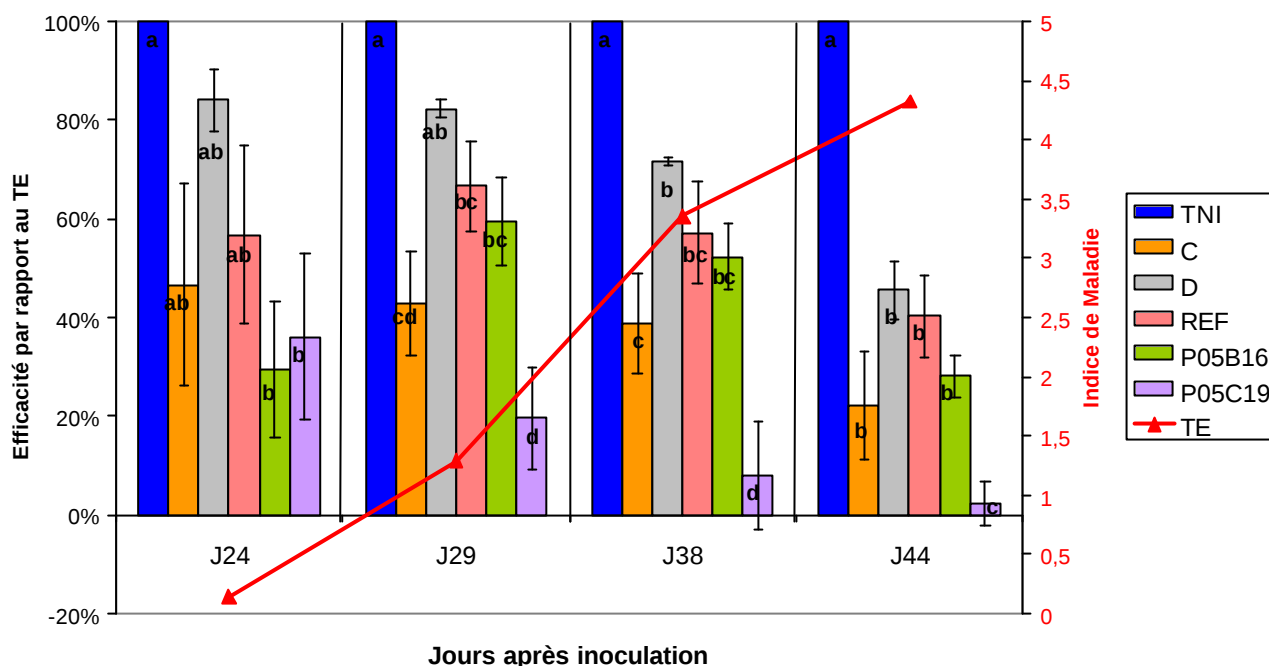
V.3 Résultats (station)

V.3.1 Efficacité des produits sur cyclamen

Dans le graphique 7 on voit que tous les produits testés en 2005 en conditions de production ont donné un certain niveau de protection au cyclamens contre la fusariose. Intéressant à noter : l'efficacité des produits testés (sauf P05C19 au J44) n'a pas été significativement différente avec le fongicide de référence (REF). Parmi les 5 produits testés dans la période J24-J44, 3 produits (C, D, P05B16) semblent relativement efficaces contre la fusariose en comparaison avec le fongicide de référence (REF), 44 jours après inoculation de la maladie (graphique 7). Malheureusement, comme déjà constaté dans les 2 dernières années du projet, l'efficacité des produits diminue dans le temps et dans une période de 20 jours l'efficacité peut diminuer considérablement. L'augmentation de la pression parasitaire dans le temps (ligne rouge dans le graphique) a diminuée l'efficacité de tous les produits. On voit que la modalité TNI (témoin non inoculé) a resté saine pendant toute la période de l'essai. Le produit P05B16 montre une évolution d'efficacité atypique, avec une efficacité croissante entre J24 et J29 et elle diminue après. Ceci est lié à l'effet régulateur de croissance de ce produit qui a influencé négativement les observations au début de la période de notations. Cet effet régulateur de croissance rend ce produit donc inutile (même à faible dose) dans une culture de cyclamen contre la fusariose, car la plante a été déformée et invendable. Le produit C (SDN de référence utilisé depuis 3 ans dans ce projet) a confirmé son efficacité, mais la protection a resté assez faible (entre 20% et 40% dans la période d'observation). Intéressant est le produit D avec une protection la plus élevée (entre 40 et 80%) pendant la période d'observation.

Tous les produits phytostimulants testés n'ont pas montré d'effet antifongique à la dose utilisée, donc leur efficacité contre la fusariose peut être un effet éliciteur ou SDN. Pour le produit D, appliqué en arrosage, une action antagoniste contre le pathogène pourra être à l'origine de son efficacité.

Suite à la demande du Conseil Scientifique de l'ASTREDHOR, 5 plantes par parcelle élémentaire n'ont pas été inoculées, pour évaluer l'effet des produits sur le développement et la floraison du cyclamen. Les plantes traitées avec les produits testés (sauf P05B16) ont été identiques avec celles traitées à l'eau, donc pas d'effets négatifs (phyto toxiques) ont été observés.



Graphique 7. Evolution de l'efficacité relative par rapport au témoin eau inoculé (TE) en fonction des produits testés contre *Fusarium oxysporum* cf *cyclaminis* (barres colorées) et évolution de la pression parasitaire dans la modalité TE (ligne rouge).

V.3.2 Efficacité des produits sur chrysanthème

L'infestation du chrysanthème sous tunnel avec de la rouille blanche et de la rouille brune a échoué en 2005. Deux facteurs pourront expliquer cet échec :

- Les conditions météorologiques ont été défavorables à l'installation de ces 2 pathogènes dans la culture. Des plantes infestées ont été introduites dans la culture en semaine 37, mais l'installation des 2 rouilles n'a pas eu lieu.
- Les plantes infestées avec de la rouille blanche et introduites dans la culture ont été traitées au fongicides, rendant le pathogène probablement moins performant.

Néanmoins, les produits testés en 2005 sur chrysanthème n'ont pas provoqué d'altérations au niveau du développement et de la floraison du chrysanthème.

VI. CONCLUSIONS

D'après les analyses agronomiques réalisées sur le cyclamen face à la fusariose vasculaire, nous avons, à nouveau observé sous conditions de production, une protection partielle avec les phytostimulants jusqu'à une certaine pression parasitaire. Parmi les produits testés, le produit P05C19 semble avoir une durée d'efficacité plus limitée que les produits D et REF. Le produit P05B16 a montré un effet néfaste sur le développement de la plant, donc ce produit sera éliminé dans les tests futurs. Les résultats d'efficacité obtenus en laboratoire ont été moins évidents que ceux obtenus en conditions de production, mais les écart types des moyennes ont été très importants en laboratoire indiquant un problème possible au niveau du dispositif de l'expérimentation. Il est regrettable de constater que toutes les plantes sont finalement atteintes de la fusariose et que les phytostimulants semblent simplement ralentir l'apparition des symptômes. On peut cependant espérer que ces produits soient plus efficaces en condition de pression parasitaire plus faible, c'est à dire en conditions de production. La technique d'inoculation a pu jouer un rôle aggravant dans la mortalité des plantes dans l'essai car, les racines ont été blessées pendant l'inoculation (c'est inévitable). Ainsi les pathogènes aura eu plus de possibilités de pénétrer dans la plante. En 2006, il sera préférable d'adapter la technique d'inoculation en évitant des blessures au niveau des racines et de voir si les plantes sont mieux capables à se défendre contre le pathogène. D'autres facteurs importants qui semblent jouer un rôle important dans l'évolution de la pression parasitaire, et donc dans l'efficacité des produits, sont les conditions climatiques. Au cours de l'année de la canicule (2003), l'apparition et l'évolution des symptômes de la fusariose a été plus rapide dans les parcelles et le produit C n'a pas été aussi efficace qu'en 2004 et 2005. Le niveau d'efficacité des produits testés n'est donc pas constant l'une année sur l'autre et dépend des facteurs externes qui pourra plus favoriser le développement du pathogène. La recherche d'une corrélation entre l'efficacité des phytostimulants et le niveau d'induction de certains marqueurs biochimiques révélant une réaction de défense du cyclamen, a été beaucoup plus compliquée que prévu et un protocole fiable n'est pas encore trouvé.

L'efficacité des phytostimulants testés contre la rouille blanche et la rouille brune du chrysanthème n'est pas encore démontrée à cause d'un problème de gestion du climat défavorable à l'installation des maladies dans la culture. Ceci malgré les efforts de contamination avec des plantes atteintes de la rouille blanche et de la rouille brune. Au laboratoire, une technique de reproduction des symptômes de la rouille brune a été développée ainsi qu'une échelle de notation des symptômes, mais cette connaissance ne sera malheureusement pas complètement transposable sur un modèle rouille blanche (*Puccinia horiana*). Les 2 pathogènes semblent trop différents au niveau de leur biologie, la reproduction et la dissémination des spores.

VII. BILAN ET PERSPECTIVES

Les résultats du projet semblent indiquer que les phytostimulants ne pourront pas véritablement remplacer les produits phytosanitaires classiques utilisés en traitement curatif contre les maladies. Cependant, les résultats que nous avons obtenu dans 3 ans d'expérimentation dans le cadre de ce projet, et les essais régionaux sur d'autres modèles plante/pathogène effectués dans le réseau ASTREDHOR (ex. les essais sur le couple pensée/pythium à Normandie Horticole et sur pâquerette/rouille et prunus/bactériose au GIEFPO), montrent que les applications préventives des produits classiques pourront être diminuées ou même supprimées avec les phytostimulants. L'identification des marqueurs biochimiques semble plus complexe que prévu pour mettre en évidence la réaction de défense induite chez le cyclamen et le chrysanthème suite à une attaque par un pathogène ou à l'application d'un éliciteur. Deux biomarqueurs (GLU et POX) ont été identifiés en 2004 chez le chrysanthème après application du produit C, un SDN de référence, mais ces marqueurs n'ont pas été trouvés en concentrations plus élevées chez les chrysanthèmes infestés de la rouille brune en 2005.

En 2006, le laboratoire aura une autorisation de la SRPV pour manipuler le pathogène de la rouille blanche, classée maladie de quarantaine, et le travail sur cette maladie peut finalement commencer. Plus d'attention sera consacrée à la maîtrise de la reproduction des symptômes de la rouille blanche sur chrysanthèmes pour finalement être capable à bien évaluer le niveau de protection obtenu avec les phytostimulants. La recherche des phytostimulants efficaces se poursuivra sur les 2 couples plante/pathogène du projet. Au niveau de la station, des différentes itinéraires techniques seront évalués en culture de cyclamen en intégrant les phytostimulants identifiés efficaces depuis le début du projet en 2003. Une synergie entre plusieurs phytostimulants pourra rendre la lutte contre la fusariose du cyclamen plus efficace qu'un produit seul. Parallèlement, on comparera une autre technique d'infestation sur cyclamen en évitant une détérioration des racines. Une itinéraire technique contre la rouille blanche du chrysanthème sera développée qu'après l'identification de phytostimulants efficaces contre cette maladie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allabouvette, C., C. Olivain, C. Cordier et C. Steinberg. 2003. Méthodes alternatives de lutte contre les maladies des plantes. **Phytoma**. 566 : 41-44.
- Amborabé, E., A. Aziz, P. Trotel Aziz, D. Quantinet, L. Dhuicq et G. Vernet. 2004. Essais d'emploi du chitosan contre le *Botrytis cinera*. **Phytoma**. 571 : p. 26.
- Anfoka, G.H. 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicum esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. **Crop Protection** 19 : 401-405.
- ASTREDHOR / STEPP, 2002. Influence de l'hygrométrie sur l'efficacité de la protection biologique intégrée en culture de chrysanthème dirigé sous tunnel plastique (3ieme année). **Rapport Technique ASTREDHOR 27 pp**.
- Bécot, S., E. Pajot, D. Le Corre, C. Monot et D. Silué. 2000. Phytogard (K₂HPO₃) induces localised resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection** 19 : 417-425.
- Bourgeois, H. 2002. Des résultats encourageants, mais peu d'homologations. **Le Maraicher**. Mai 2002 : 9-11.
- Brisset, M.N., R. Chartier, F. Didelot, L. Parisi, J-P. Paulin, P. Robert, M. Tharaud, A. Lemarquand, G. Orain, J-F. Toubon, L. Brun, S. Derrdj, B. Sauphanor. 2005. Inducteurs des défenses naturelles : Potensialités contre les bioagresseurs du pommier et du poirier. **Phytoma** 581
- Chatelet, P. 1998. Eliciteurs : Vers une agriculture sans produits phytosanitaires. **Veille Technologique Britta. Végétal / 03-98**
- Cortesero, A.M. et J.O. Stapel. 2000. Understanding and manipulating plant attributes to enhance biological control. **Biological Control**. 17: 35-49.
- Cortesero, A.M., C. M. DeMoraes, J. O. Stapel, J. H. Tumlinson, et W. J. Lewis. 1997. Comparisons and contrasts in host foraging strategies of two larval parasitoids with different degrees of host specificity. **Journal of Chemical Ecology**. 23 (6): 1589-1606.
- Coulomb, P.J. Les stimulateurs de défenses naturelles : SDN et la thérapie végétale appliquée. **www.enigma-france.com**
- De Moraes, C.M., W. J. Lewis, P. W. Paré, H. T. Alborn et J. H. Tumlinson. 1997. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**. 393 : 570-574.
- Diare, X., B. Poinssot, M. Bentejac, D. Silue et A. Pugin. 2002. Stimulation des défenses de la vigne contre les pathogènes : des résultats encourageants vis à vis du mildiou. **Phytoma**. 548 : 24-26.
- Diaz, J., A Ten Have, et J.A.L. Van Kan. 2002. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinera*. **Plant Physiol**. 129 :1341-1351.
- Elmer, W. 2002. Influence of inoculum density of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* and sodium chloride on cyclamen and the development of *Fusarium* wilt. **Plant Disease** : 389-393.
- Gilet, A. 2000. Les algues, un vaccin pour les plantes. **La France Agricole**. 20 Octobre 2002 : p 34.
- Godard, J.F., S. Ziadi, C. Monot, D. Le Corre et D. Silué. 1999. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. **Crop Protection**. 18 : 397-405.
- Gorlach, J., S. Volrath, G. Knauf-Beiter, G. Hengy, U. Beckhove, K.H. Kogel, M. Oostendorp, T. Staub, E. Ward, H. Kessmann et J. Ryals. 1996. Benzothiadazole (BTH), a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**. 8 : 629-649.

- Harada, Y., T. Iwama et T. Fukuda. 1996. Life cycle of *Puccinia chrysanthemii* Roze, the rust fungus of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. **Ann. Phytopath. Soc. Japan.** **62** : 199-201.
- Inbar, M., H. Doostdar, R.M. Sonoda, G.L. Leibee et R.T. Mayer. 1998. Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence. **Journal of Chemical Ecology.** **24** : 135-149.
- Klarzynski, O., B. Plesse, J.M. Joubert, J.C. Yvin, M. Kopp, B. Kloareg et B. Fritig. 2000. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in toboggan. **Plant Physiol.** **124** : 1027-1038.
- Lozach, O. 2001. Séparation des isoformes des PR-2 induites chez *Brassica oleracea* par *Peronospora parasitica* et le benzothiadiazole : recherche de corrélation entre leur présence et la résistance/sensibilité. Rapport de stage DESS de biologie-biotechnologie, **BBV**, 33p.
- Martinez, C., O. Besnard et J. Baccou. 1999. Stimulation des défenses naturelles des plantes. **Phytoma.** **521** : 16-19
- McKenzie, C.L., R.G. Shatters, H. Doostdar, S.D. Lee, M. Inbar et R.T. Mayer. 2002. Effect of geminivirus infection and Bemisia infestation on accumulation of pathogenesis related proteins in tomato. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** **49** : 203-214.
- Monot, C. E. Pajot, D. Le Corre et D. Silué. 2002. Induction of systemic resistance in broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) against downy mildew (*Peronospora parasitica*) by avirulent isolates. **Biological Control.** **24** : 75-81.
- Ohishi, K. et O. Morioka. 2000. Incubation of *Puccinia horiana* P. H. using chrysanthemum plants cultured in vitro. **J. Japan Soc. Hort. Sci.** **69** : 767-769.
- Pajot, E., D. Le Corre et D. Silué. 2001. Phytogard and DL-B-amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **European Journal of Plant Pathology.** **107** : 861-869.
- Panicker, S. et K. Gangadharan, 1999. Controlling downy mildew of maize caused by *Peronosclerospora sorghi* by foliar sprays of phosphonic acid compounds. **Crop Protection.** **18**, 115-118.
- Paré, P.W. et J.H. Tumlinson. 1997. Induced synthesis of plant volatiles. **Nature.** **385** : 30-31.
- Regnault-Roger, C., B.J.R. Philogène et C. Vincent. 2002. Biopesticides d'origine végétale. **337 p. Editions Tech et Doc. Paris.**
- Silué, D. E. Pajot et Y. Cohen. 2002. Induction of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower by DL-B-amino-n-butanoic acid (BABA). **Plant Pathology.** **51** : 97-102.
- Thaler, J.S. 1999. Jasmonate-inducible plant defenses cause increased parasitism of herbivores. **Nature.** **399** : 686-688
- Thurlings, T.C.J., P.J. McCall, H.T. Alborn et J.H. Tumlinson. 1993. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology.** **19** : 411-425.
- Umemura, K., N. Ogawa, J. Koga, M. Iwata et H. Usami. 2002. Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. **Plant Cell Physiol.** **43** : 778-784.
- Ziadi, S., S. Barbedette, J.F. Godard, C. Monot, D. Le Corre et D. Silué. 2001. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)-downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. **Plant Pathology.** **50** : 579-586.

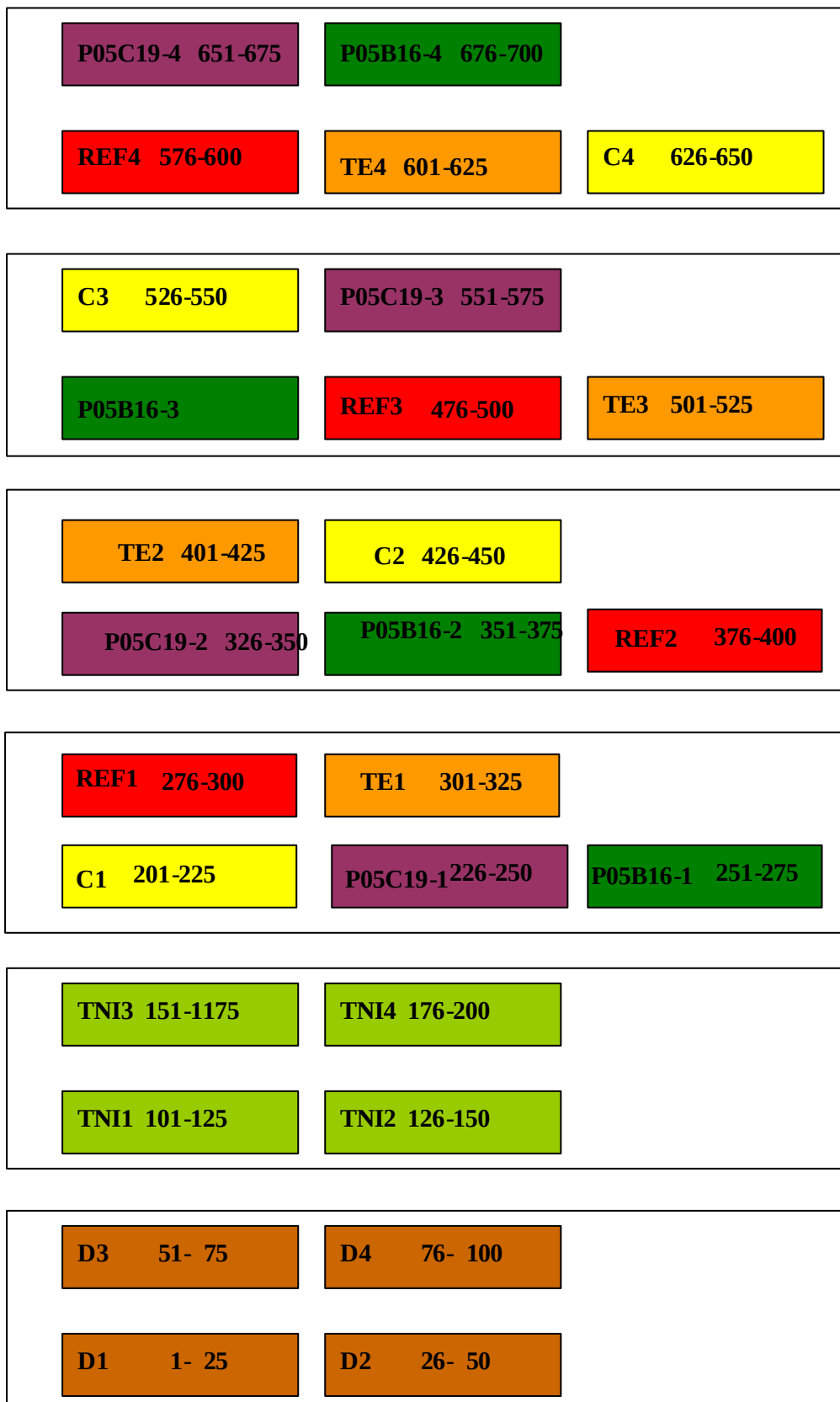
ANNEXES

ANNEXE 1	Plan expérimentation cyclamen à la STEPP
ANNEXE 2	Plan expérimentation chrysanthème à la STEPP
ANNEXE 3	Relevés climatiques sous serre verre, en extérieur et sous tunnel
ANNEXE 4	Nouvelle échelle de notation du fusariose sur cyclamen
ANNEXE 5	Echelle de notation de la rouille brune sur chrysanthème
ANNEXE 6	Protocole de dosage de l'activité des glucanases
ANNEXE 7	Calendrier d'activités à la station STEPP
ANNEXE 8	Photos : Etat des parcelles de cyclamen 34 jours après infestation avec du <i>Fusarium oxysporum cf. cyclaminis</i> .
ANNEXE 9	Fiche de culture chrysanthème dirigé
ANNEXE 10	Fiche de culture cyclamen
ANNEXE 11	Photos cultures de cyclamen et chrysanthème

ANNEXE 1

Plan d'expérimentation : cyclamen

Cyclamen serre verre
25 plantes par parcelle élémentaire



ANNEXE 2

Plan d'expérimentation : Chrysanthème

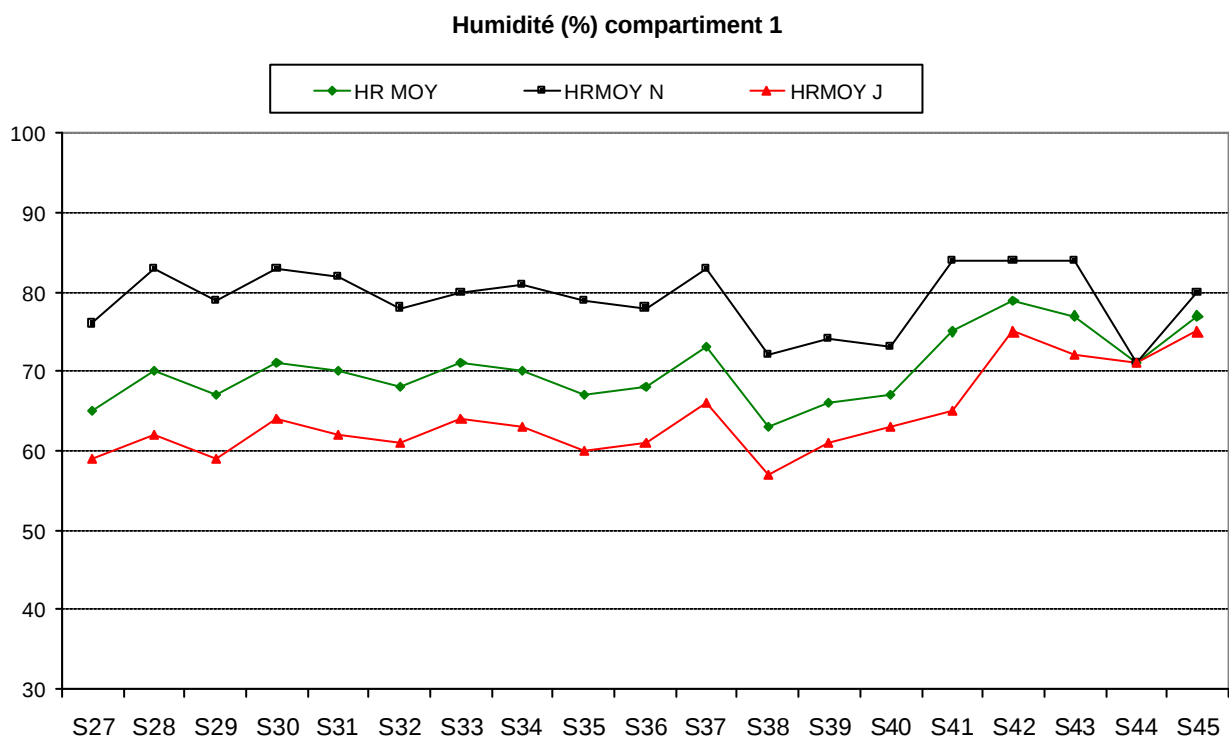
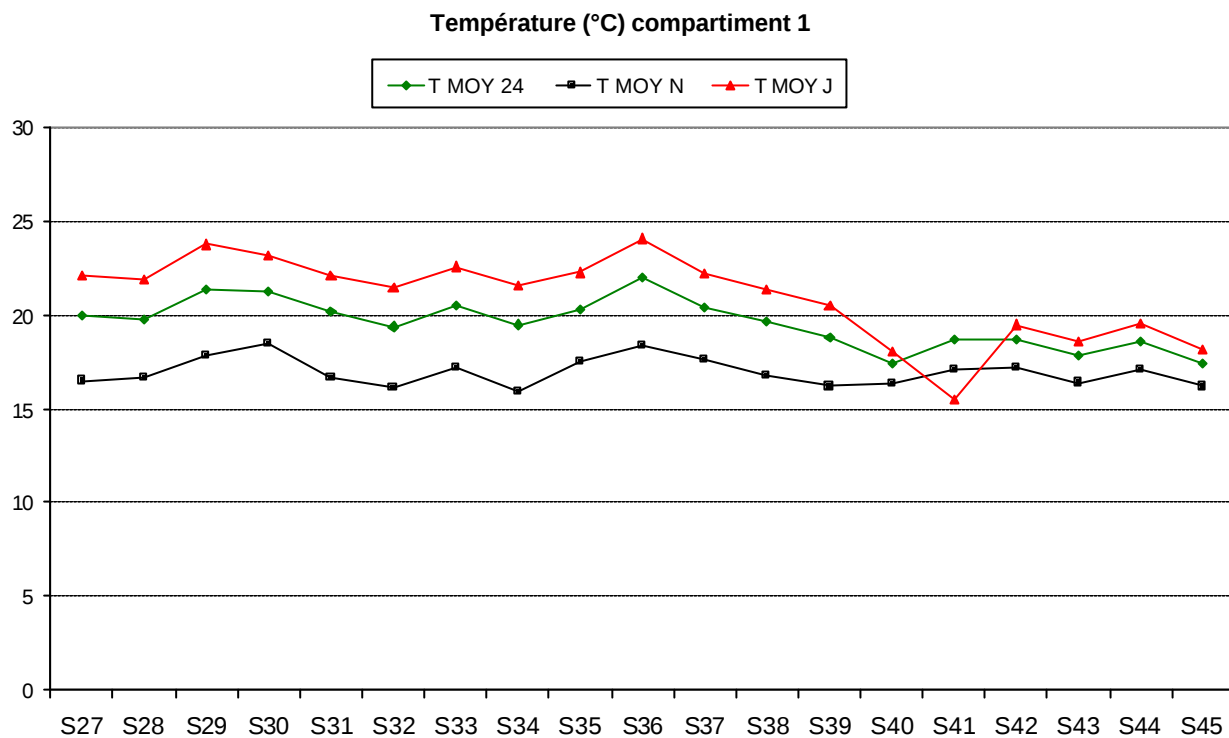
Plan Chrysanthèmes tunnel 15 plantes par parcelle élémentaire

C4	376-390
B4	361-375
P04R12-4	346-360
P05C19-4	331- 345
REF4	316-330
TE4	301-315
TNI2	286-300
B3	271-285
P04R12-3	256-270
P05C19-3	241-255
	226-240
TE3	211-225
C3	196-210
P04R12-2	181-195
P05C19-2	166-180
REF2	151-165
TE2	136-150
C2	121-135
B2	106-120
TNI1	91-105
P05C19-1	76- 90
REF1	61- 75
TE1	46- 60
C1	31- 45
B1	16- 30
P04R12-1	1- 15

Passage

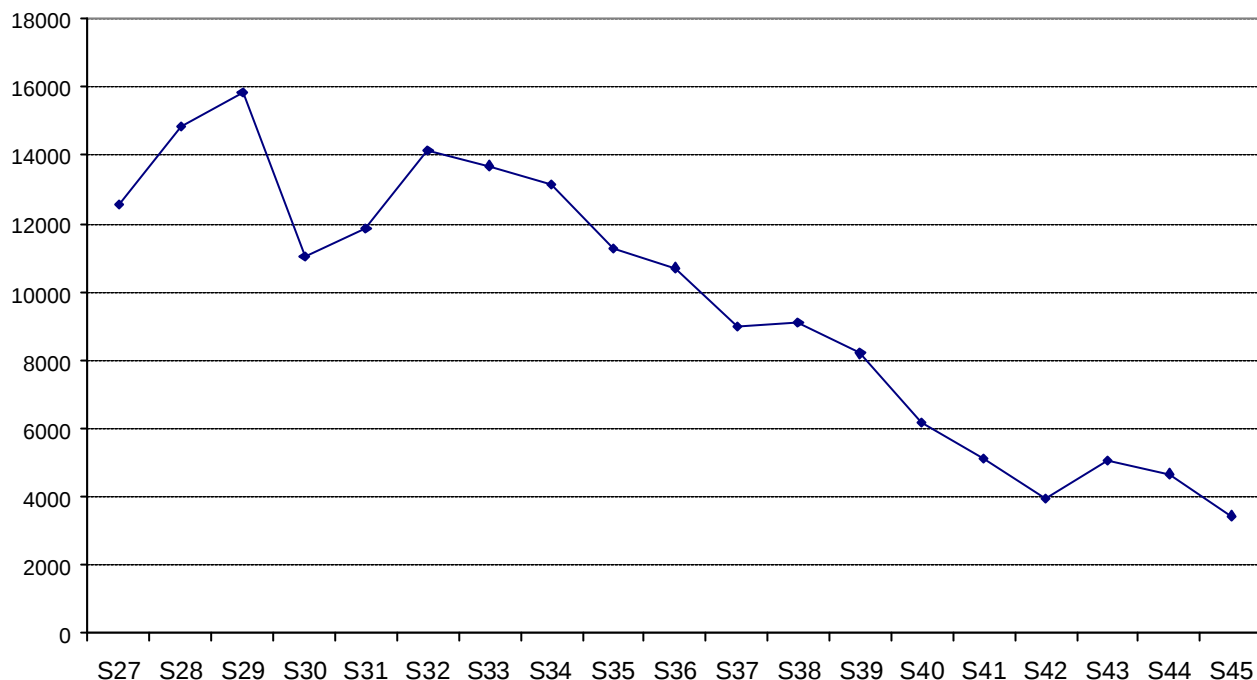
ANNEXE 3

Relevés climatiques en serre verre, en extérieur et au tunnel

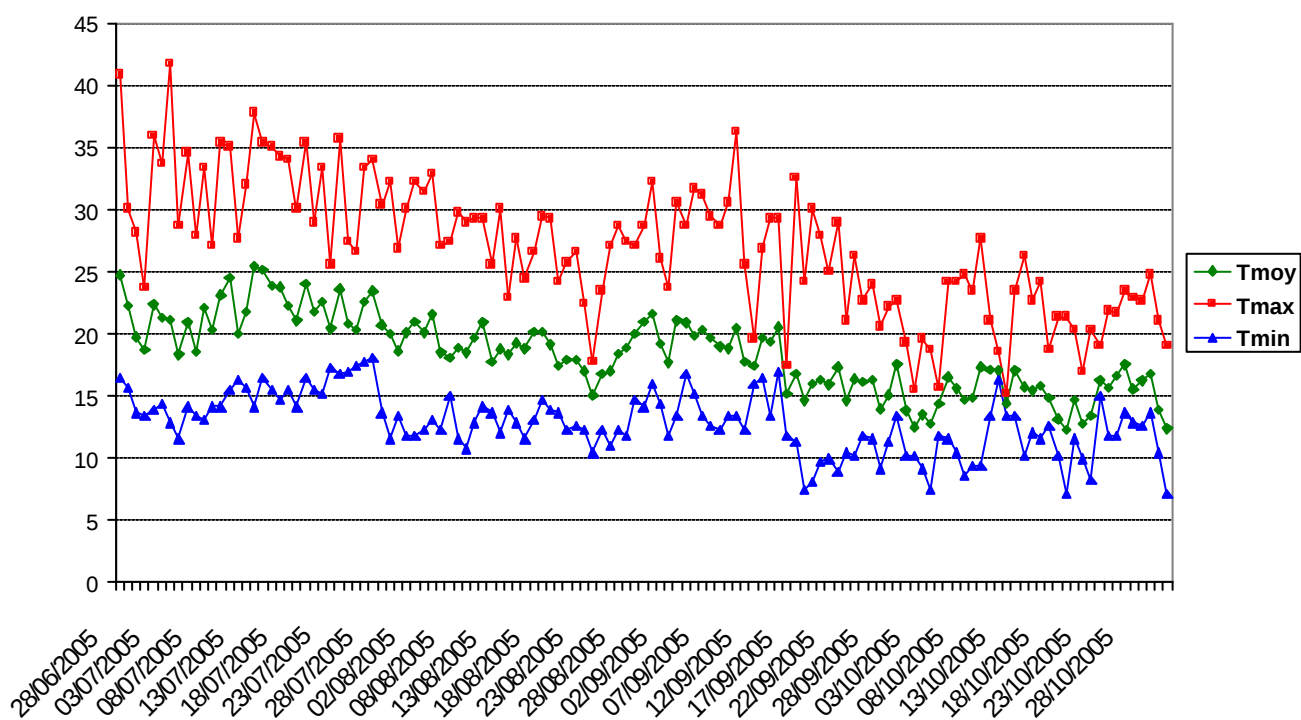


ANNEXE 3 (SUITE)

SOMRAD par semaine (J/cm2)



Tunnel 300m2 : Température (°C) par jour (24H)



ANNEXE 4

Echelle de notation pour cyclamen/FOC

Une notation plantes par plante est effectuée au moins une fois par semaine. Pour cela tous les plants sont numérotés. Pour chaque plante, le nombre de feuilles formées et naissantes et le nombre de boutons floraux sont notés, ainsi que l'aspect des feuilles c'est-à-dire présence ou absence de la maladie et à quel niveau de contamination.

Indice 0 : les feuilles n'ont aucun symptôme et la coloration des feuilles reste verte.



Indice 1 : les feuilles n'ont pas de symptômes, mais la coloration des feuilles diminue en intensité.

Indice 2 : les feuilles ont des symptômes, qui correspondent à moins de 30% de la surface de la feuille



ANNEXE 4 (SUITE)



Indice 3 : les feuilles ont des symptômes, qui correspondent à 30-60% de la surface de la feuille

Indice 4 : les feuilles ont des symptômes, qui correspondent à 60-100% de la surface de la feuille

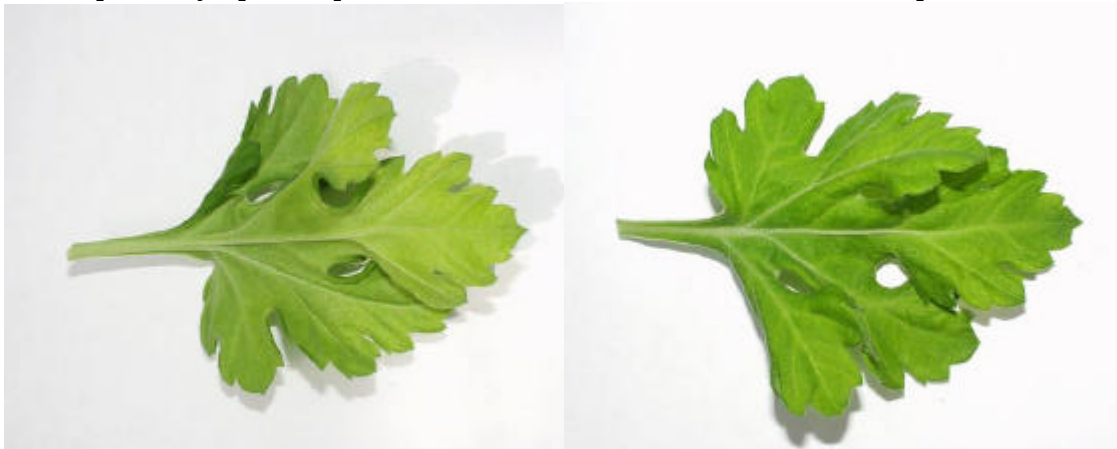


Indice 5 : les feuilles ont des symptômes, qui correspondent à 60-100% de la surface de la feuille. De plus, la feuille se dessèche. Quand 100% des feuilles sont à ce stade, on peut dire que la plante est morte.

ANNEXE 5

Echelle de notation pour chrysanthème/rouille brune

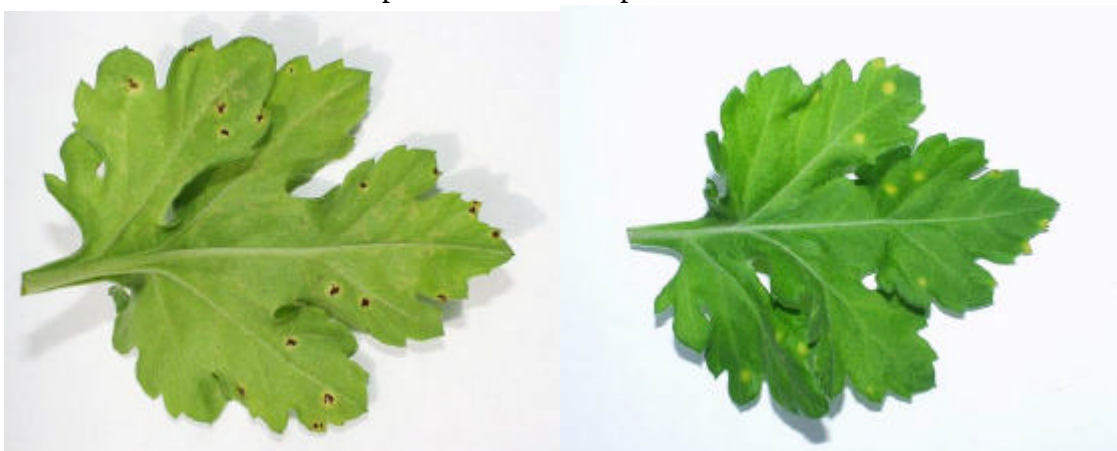
Indice 0 : pas de symptôme, pas de taches visibles coté inférieur et coté supérieur de la feuille



Indice 1 : nombre de taches inférieur à 10 par feuille



Indice 2 : nombre de taches compris entre 10 et 30 par feuille

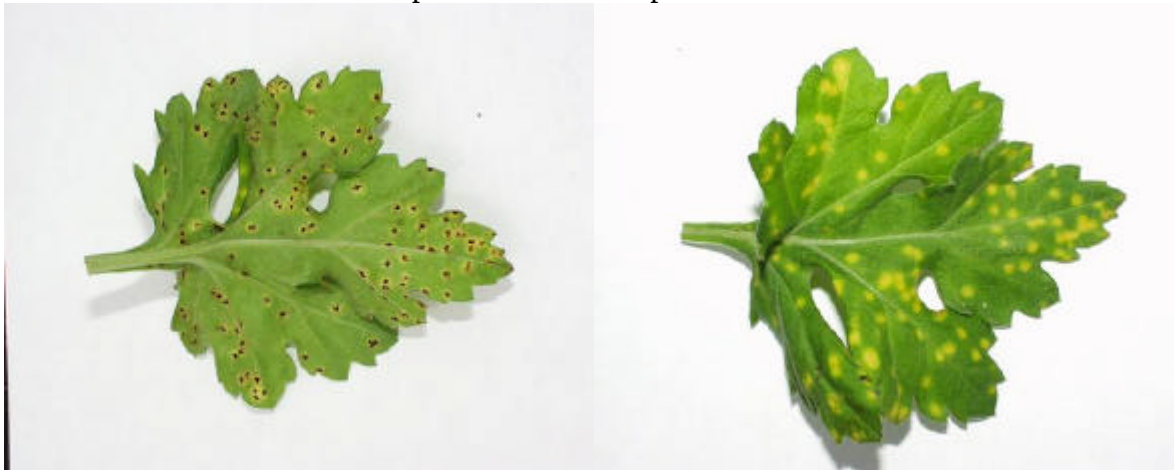


ANNEXE 5 (SUITE)

Indice 3 : nombre de taches compris entre 30 et 50 par feuille



Indice 4 : nombre de taches compris entre 50 et 80 par feuille



Indice 5 : nombre de taches supérieur à 80 par feuille



ANNEXE 6

Protocole de dosage de l'activité des glucanases

Broyage

100 à 150 mg de feuille dans un tampon de broyage. Le volume de tampon à ajouter est fonction de la masse de poids frais : le rapport de broyage à adopter est de 1/6 (p/v).

Pour le test de l'activité, il faut penser à doubler tous les échantillons pour effectuer par la suite une moyenne

Dans chaque tube à essai mettre 0.5 ml de laminarine et 1µl d'extrait enzymatique à analyser

Préparer des témoins :

Ts (témoin substrat : 0.5 ml de substrat seul (sol de laminarine)

TE (Témoin enzyme : 0.5 ml de tampon AcNa 0.1M + 1µl d'extrait enzymatique)

Mesure du pouvoir réducteur :

Après incubation, refroidir dans la glace

Ajouter 0.5 ml de solution C, vortexer, incuber 15min à 100°C

Refroidir dans la glace et ajouter 0.5 ml de solution As-Mo puis vortexer plusieurs fois, afin d'éliminer les bulles causées par la réaction.

Lecture :

Lire les DO au spectrophotomètre à 640 nm, ou bien à l'ELISA

L'activité glucanase des échantillons est calculée par rapport à une courbe étalon. Cette activité est exprimée en nmole de glucose/g de poids frais.

Solutions utilisées

Solution acétate de sodium : 0.1M, 2 mercapthoéthanol, 1µl/ml (IE 14mM), pH5.2

Laminarine : 1 mg de laminarine/ml dans AcNa 0.1M pH 5.2

Solution A (1L) : 20 g Na_2CO_3 anhydre (2% p/v)
 20 g KHNa (2% p/v)
 16 g NaHCO_3 (1.6 p/v)
 160 g Na_2SO_4 anhydre (16% p/v)

Solution B : CuSO_4 , 5 H_2O (15% p/v) + 1 à 2 gouttes de H_2SO_4

Solution C : 25 ml de A + 1 ml de B (à préparer juste avant utilisation)

Solution As-Mo : dissoudre 25 g de Molibdate d'ammonium $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (5% p/v) dans 450 ml d' H_2O . ajouter lentement 21 ml d' H_2SO_4 (4.2% v/v)
pH 5.2

ANNEXE 6 (SUITE)

Echantillon broyé mécaniquement (Appareil RETSCH, MM 300) pendant 3 minutes à 13 000g après addition du tampon broyage
Rapport tampon broyage : 1/6(p/v)

Centrifugation 20 minutes à 13 000g. le surnageant est l'extrait enzymatique brut

Réaction enzymatique : 2,250 ml tampon phosphate + 300µl H₂O₂ + 150µL de guaïacol + 150 µL d'extrait enzymatique

Lecture de DO à 470 nm. La mesure est effectuée pendant 10 min

Tampon phosphate 15 mM : 10 ml de solution mère 0,1 M
56 ml d'eau distillée
pH : 6

Tampon broyage : 7,5 ml de tampon phosphate
+ 42,5 ml d'eau distillée
+ 0,5 g de PVP (1%)
+ 5,56 mg EDTA (0,3 mM)

Guaïacol 400 mM : 444 µl de guaïacol à 9 M
9 666 ml d'éthanol (96,2°C)

H₂O₂ (C final = 1%) : 334 µl H₂O₂ à 30%
9 666 ml d'eau distillée

Les valeurs de DO obtenues sont converties en µmoles/s de produit formé.

DO = C * L * ε avec ε (guaïacol = 0,0266 M⁻¹.cm⁻¹).

Le calcul de l'activité s'exprime selon :

$$((? \text{ DO/min})/\epsilon)/60 * 0,003 * (6000/100) * 1\,000\,000 = X \text{ µkatal de tétraguaïacol/g de PF}$$

ANNEXE 7

Calendrier d'activités projet phyto stimulants (station STEPP)

Phyto stimulants - CYCLAMEN

Jour	Date	Activité sur cyclamen
J-7	2 août	Application produits sur cyclamen
J0	9 août	Inoculation fusariose en cyclamen
J14	16 août	Application produits sur cyclamen
J28	30 août	Application produits sur cyclamen
J42	13 septembre	Application produits sur cyclamen

Phyto stimulants – CHRYSANTHEME

Jour	Date	Activité sur chrysanthème
J-35	2 août	Application produits sur chrysanthème
J-14	16 août	Application produits sur chrysanthème
J-7	30 août	Application produits sur chrysanthème
J0	6 septembre	Introduction rouille brune et blanche
J7	13 septembre	Application produits sur chrysanthème
J21	27 septembre	Application produits sur chrysanthème

ANNEXE 8

Photos : état des parcelles de cyclamen 34 jours après infestation avec du *Fusarium oxysporum* cf. *cyclaminis*. TNI : témoin eau non-inoculé, TE : témoin eau inoculé, C, D, P05C19 et P05B16 : phytostimulants inoculés.



TNI



REF



C



D



TE



REG



MES

ANNEXE 9

FICHE DE CULTURE CHRYSANTHEME DIRIGE (TUNNEL PLASTIQUE)																			
PROGRAMME NATIONAL SDN 2005																			
<u>Contenant</u> : BT17 Teku (2 litres)																			
<u>Substrat</u> : 106 avec 13% d'argile (Agrofino)																			
<u>Plants</u> : Louissette jaune, 5 boutures /pot (CHALLET- HERAULT)																			
<u>Arrosage</u> : goutte à goutte																			
Semaine	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	Remarques	
Repiquage	X																	Boutures racinées	
Distançage	Touche-Touche			Distançage (14/m²)		Distançage final (7/m²)													
Irrigation	A la pomme			Arrosage goutte à goutte 1 gouteur /pot (500ml / pot)															
Eboutonnage																		Pas d'ébourgeonnage	
Occultation			X															5 nuits (13/14/15/16/17/18 juillet)	
Nanifiant			X															Alar à 3 gr/l	
Fertilisation	Eau claire A la pomme			13-10-23 1,5 gr/l															Engrais soluble Peters (Scotts)
Traitements phyto	N				N			D + P			N							N : <i>N. cucumeris</i> contre thrips D : Dimilin Flo (66ml/hl) contre chenilles P : Pirimor (75g/hl) contre pucerons	

ANNEXE 10

FICHE DE CULTURE CYCLAMEN (SERRE VERRE) PROGRAMME NATIONAL SDN 2005

Contenant : OCTO diam. 14 (1,5 litre, SOPARCO)

Substrat : Ref 120 (EGO)

Plants : Halios violet foncé (EYRAUDPLANTS)

Irrigation : Tablettes flux-reflux

Semaines	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	Remarques
Repiquage	X	X																			
Distançage	Touche-touche 48 pots/m²					Distançage 13 pots/m²															
Fertilisation	Eau claire EC : 1ms					14-12-32 EC : 1,8ms, pH : 5,8															Engrais solubles Plant-Prod (Fertil)
Traite ments phyto sanitaires			S		N A1 A2																S : Némasy N : N.cucumeris A1: Aphidioletes A2: Aphidius
Consignes température	18°C jour/nuit													14°C jour/nuit							
Consignes ventilation	20°C jour/nuit													16°C jour/nuit							Serre avec multi culture
Consignes d'ombrage	450 W/m²																				

ANNEXE 11 PHOTOS DES CULTURES



Inoculum de la rouille blanche au dessus de la culture régulièrement soumise à la micro aspersion (le matin et le soir pendant 15 minutes). Les ventilateurs ont été posés au dessus des plantes infestées pour aider à obtenir une infestation homogène dans la culture.



Le cyclamen 55 jours après inoculation. A gauche modalité TE, au milieu modalité D et à droite modalité TNI. Finalement toutes les mini parcelles traitées avec des phyto stimulants ont détruites par le fusariose. Derrière les parcelles : 5 plantes par bloc non inoculées et traitées