



Année 2010

ASTREDHOR
44 rue d'Alésia
75 682 Paris cedex 14

***Programme National 2010
Etude épidémiologique de la rouille blanche (*Puccinia horiana*) du chrysanthème****




STAPP
BRETAGNE
Station de l'Institut technique de l'horticulture


Vegenov
BBV


**G.I.E.
Fleurs & Plantes
du Sud-Ouest**
Station de l'Institut technique de l'horticulture

**52, rue de St Ilan
22 360 LANGUEUX**

**Penn-ar-Prat
29 250 St Pol de Léon**

**71, avenue Edouard Bourlaux
33 883 Villenave d'Ornon cedex**

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

SOMMAIRE

	Page
SITUATION ACTUELLE DU SUJET DE RECHERCHE	
1 DESCRIPTION ACTIVITES GIE FLEURS ET PLANTES DU SUD-OUEST	
1.1 Suivi des cultures et échantillonnage sur les sites pilotes	3
1.2 Observations de terrain	5
2 DESCRIPTION ACTIVITES STEPP BRETAGNE	
2.1 Suivi des cultures et échantillonnage sur les sites pilotes	5
3 DEVENIR DES ECHANTILLONS POUR LA DETECTION DE LA ROUILLE BLANCHE.....	6
4 ACTIONS COMMUNES GIEFPSO ET STEPP DANS LE CADRE DU PROGRAMME	6
4.1 Enquête chez les multiplicateurs : réalisation du questionnaire.....	6
4.2 Réunion de travail et diffusion des résultats.....	6
5 MISE AU POINT ET VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE DETECTION MOLECULAIRE DE LA ROUILLE BLANCHE PAR LE LABORATOIRE VEGENOV	7
5.1 Phase du projet.....	7
5.2 Matériel utilisé dans le cadre de ce projet.....	7
5.3 Résultats.....	8
5.4 Conclusions.....	12
6 PERSPECTIVES DU PROGRAMME EN 2011	13
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

Ce projet résulte d'une collaboration entre le GIE Fleurs et Plantes du Sud Ouest, la STEPP Bretagne et le laboratoire Vegenov. Il a pour objectif d'identifier les sources d'infection et de développer des itinéraires techniques limitant l'installation de la maladie chez les producteurs de jeunes plants et de plantes finies.

SITUATION ACTUELLE DU SUJET DE RECHERCHE

Les stations STEPP Bretagne et GIE Fleurs et Plantes du Sud Ouest réalisent des travaux dans le cadre de ce programme national depuis 2007 pour identifier les sources de contamination. Les boutures s'avèrent être le vecteur principal pour un développement de la maladie dans les cultures. Un test biologique de détection a été développé avec notre partenaire Vegenov permettant d'identifier si les boutures sont porteuses de la maladie.

En 2010, un test de détection précoce par analyse PCR quantitative a été développé, en collaboration avec Dr Kurt Heungens du laboratoire "Eenheid Plant" du centre de recherche ILVO en Belgique.

Ces travaux doivent aboutir à la mise au point d'un test rapide de détection qui permettra aux producteurs de boutures comme aux producteurs de plantes d'élevage d'assainir les cultures et ainsi diminuer l'application de produits phytopharmaceutiques et améliorer la qualité sanitaire des plantes.

L'adaptation de ce test et son utilisation ensuite à grande échelle nécessite que soit vérifié sa sensibilité, sa fiabilité et sa pertinence vis-à-vis des différents pathotypes de rouille.

La lutte contre la rouille blanche est coûteuse et la perte des plantes peut être importante. Les retombées du projet aideront à :

- mieux positionner les traitements phytosanitaires dans les cultures de jeunes plants et de plantes finies pour avoir une meilleure efficacité de lutte contre la rouille blanche.
- identifier et diminuer les facteurs favorables à l'installation de la rouille blanche dans les cultures.
- Aboutir à éradiquer le pathogène en effectuant un diagnostic précoce de la maladie dans les serres de pieds mères (S0) des obtenteurs/multiplicateurs.

1 DESCRIPTION ACTIVITES GIE FLEURS ET PLANTES DU SUD-OUEST

1.1 Suivi des cultures et échantillonnage sur les sites pilotes

Les sites pilotes sont les mêmes d'une année sur l'autre, soit 3 exploitations horticoles et la station d'expérimentation du GIE FPSO, et dont les caractéristiques sont données dans le tableau 1. Pour chacun d'entre eux, un prélèvement de feuilles est effectué sur les jeunes plants à réception, puis la culture et donc l'apparition de symptômes est suivie au cours de la saison.

Tableau 1 : Caractéristiques des sites pilotes échantillonnés

Site	Support de culture	Irrigation	Symptômes de rouille
Ets Frimont (la Réole-33)	Aire extérieure hors sol sous tunnel plastique ou non protégé. Uniquement petites fleurs	Ruissèlement	Oui, 2007 et 2008. Non 2009 et 2010
Ets Labat (Portets-33)	Aire extérieure et tunnel plastique. Petites et grosses fleurs.	Ruissèlement	Non, jamais
Ets Hortiland (Bastennes-40)	Serre plastique DPG sur bâche étanche. Petites et grosses fleurs.	Ruissèlement	Oui, 2007 et 2008. Non 2009 et 2010
GIE FPSO (Villenave-33)	Serre découvrable sur plate forme Hortigreen. Uniquement petites fleurs	Marée haute marée basse puis goutte à goutte	Non, jamais

L'échantillonnage est réalisé en semaine 25, 26 et 30 à réception des boutures sur l'ensemble des exploitations. La diversité des obtenteurs-multiplicateurs présent dans le Sud-Ouest (Bernard, Guittet, Challet-Hérault, Junique) est respectée lors des prélèvements, ainsi que la représentation de la diversité des variétés sur une même exploitation (Annexe 3A). Au total 80 boîtes de Pétri comprenant chacune 4 feuilles d'une même variété sont envoyé à BBV (Tableau 2). Aucun des échantillons prélevés ne présentaient de tâches suspectes.

Tableau 2 : Caractéristiques des échantillons prélevés

Site	Nombre de variétés échantillonnées	Nombre d'échantillons	Détection de rouille suite aux prélèvements
Ets Frimont (la Réole-33)	19 variétés pF	20 boîtes	Non
Ets Labat (Portets-33)	10 variétés de GF et 2 variétés de pF	24 boîtes	Non
Ets Hortiland (Bastennes-40)	9 variétés pF	20 boîtes	Non
GIE FPSO (Villenave-33)	8 variétés pF	16 boîtes	Non

1.2 Observations de terrain

Le suivi technique des entreprises adhérentes au GIE FPSO, soit environ une quarantaine de structure de tous types producteurs de chrysanthèmes, permet de donner une tendance générale quant à la pression de la maladie. Les boutures racinées reçues étaient homogènes et sans symptômes, ni à réception, ni dans les 15 jours suivants.

Globalement, les productions de chrysanthème en 2010 ont été peu touchées par la rouille blanche. Les traitements ont été moins systématiques qu'en 2008 et 2009. Le climat du Sud Ouest était également beaucoup moins propice au développement du champignon avec un temps sec et chaud jusque tard dans la saison.

2- DESCRIPTION ACTIVITES STEPP BRETAGNE

2.1 Suivi des cultures et échantillonnage

Contrairement aux années précédentes, les prélèvements des feuilles ont été principalement effectués sur boutures non-racinées reçues à la station car la programmation de prélèvements chez les producteurs pilotes n'a pas été en phase avec la capacité de réception au laboratoire Vegenov. 47 variétés provenant de 4 multiplicateurs (Challet Herault, Bernard, Stamens, Gediflora). Les 47 variétés, correspondent aux mêmes variétés utilisées par les 3 producteurs pilotes. Pour la description du protocole de prélèvement voir le compte rendu 2007. Au total 94 boîtes de Pétri ont été remplies avec 4 feuilles par boîte et 3 boîtes par variété. Voir annexe 3B pour la liste des variétés. La répartition du nombre de feuilles à prélever a été définie en fonction de l'importance de la commande de chaque variété par entreprise. Les échantillons de feuilles ont ensuite été rapidement envoyés par Chronopost (service 13 heures) au laboratoire Vegenov pour faire un diagnostic sur l'état phytosanitaire des plantes concernant la rouille. Au moment des prélèvements, nous n'avons pas constaté de plants avec des symptômes de la rouille blanche. A Vegenov, 2 bulks d'échantillons ont été analysés positif. Les analyses des échantillons venant de la STEPP sont encore en cours et les résultats définitifs seront disponibles mi-avril 2011.

Tableau 3 : Caractéristiques des sites pilotes

Site	Support de culture	Irrigation	Symptômes de rouille
Ets Brichet (Lannion-22)	Culture de chrysanthème dirigé en coupe 23cm, 7 têtes, hors sol sous tunnel plastique.	Aspersion manuelle à la pomme	oui 2007, oui 2008, non 2009 oui mais faible, 2010
Ets Merrer (St Pol de Léon-29)	Culture hors sol, multi chapelle, chrysanthème dirigé, plusieurs contenants, de 5 à 15 têtes	Goutte à goutte	oui 2007, non 2008, oui 2009, oui mais faible, 2010

Ets Delhommeau (La Planche-44)	Serre plastique double paroi gonflable, coupe 23-32, 5 à 15 têtes.	Goutte à goutte	oui 2007, non 2008 et non, 2009 oui mais faible, 2010
STEPP (Langueux-22)	Culture de chrysanthème dirigé, hors sol sous tunnel plastique	Goutte à goutte	non 2007, non 2008 n/a 2009. non 2010

3- DEVENIR DES ECHANTILLONS POUR LA DETECTION DE LA ROUILLE BLANCHE

Les échantillons prélevés sont envoyés au laboratoire Vegenov pour analyse (détection par PCR). Les 200 échantillons sont conservés au congélateur (-80°) en attendant la maîtrise du protocole.

4- ACTIONS COMMUNES GIEFPSO ET STEPP DANS LE CADRE DU PROGRAMME

4.1-Enquête chez les multiplicateurs : réalisation du questionnaire (Annexe)

Après les enquêtes effectuées en 2007 et 2008 dans les entreprises de production (70 entreprises questionnées : voir **CR 2009**), Une nouvelle enquête va être réalisée chez les obtenteurs/multiplicateurs en France.

Le questionnaire présenté en **annexe 1** se focalisera principalement sur :

- La plante: son origine
 - Régénération in vitro/multiplication végétative
 - Les contrôles effectués/diagnostics (pathologie)
 - Sensibilité vis-à-vis de pathogènes
- La structure de production: Nuclear stock, S0, S1, S2.
- La culture: techniques culturales appropriées (l'arrosage, la fertilisation, la poterie, le substrat....)
- Les traitements phytosanitaires: Préventif/curatif
- La gestion du climat.
- L'environnement autour des systèmes de production.

4.2-Réunions de travail et diffusion des résultats

- **25 Janvier 2010** : Réunion de travail Vegenov/GIEFPSO/STEPP pour valider les travaux prévus en 2010. Présentation des résultats.
- **22 – 26 Août 2010** : Participation de la STEPP au Congrès International d'Horticulture (IHC) organisé par ISHS à Lisbonne. Présentation orale : "High efficacy of a possible plant elicitor and other phytostimulants against white rust (*Puccinia horiana* Henn.) in potted chrysanthemum productions". Article soumis pour publication au journal scientifique Acta Horticulturae.

- **12 Novembre 2010** : Communication à la demande du CTPS plantes ornementales lors du congrès des chrysanthémistes aux floralies de PAU.
- **16 novembre 2010** : Réunion de travail pour échanger sur les résultats du travail sur la maîtrise de la détection précoce par PCR effectué par Vegenov et l'organisation d'une journée d'information pour les multiplicateurs et les expérimentateurs du réseau Astredhor. Cette réunion a eu lieu lors du salon du végétal à Angers le **17 Février 2011**.

5- MISE AU POINT ET VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE DETECTION MOLECULAIRE DE LA ROUILLE BLANCHE PAR LE LABORATOIRE VEGENOV.

L'objectif de ce travail consiste à **mettre au point et valider à Vegenov un test de détection moléculaire de la rouille blanche (*Puccinia horiana*) dans des échantillons foliaires de chrysanthème** par des marqueurs moléculaires spécifiques de l'agent pathogène, développés par Dr Kurt Heungens (laboratoire « Eenheid Plant », ILVO, Belgique).

5.1- Phases du projet

Dans le cadre de ce projet, les **quatre phases** suivantes ont été réalisées à Vegenov :

- **Phase 1** : mise au point d'un test de détection de la rouille blanche par PCR quantitative sur des échantillons foliaires de chrysanthème inoculés par un isolat de *Puccinia horiana*.
- **Phase 2** : évaluation de la sensibilité du test de détection moléculaire par PCR quantitative mis au point au cours de la phase 1. La sensibilité du test mis au point a été évaluée sur des échantillons foliaires de chrysanthème inoculés par l'isolat de *Puccinia horiana* utilisée lors de la phase 1 et prélevés à 3 stades différents après inoculation (stade précoce, semi-précoce et tardif).
- **Phase 3** : validation du test de détection moléculaire de *Puccinia horiana*. Le test moléculaire mis au point sur un isolat de *Puccinia horiana* a été validé sur une gamme de 4 autres isolats de l'agent pathogène disponibles à Vegenov. Une analyse en bulks (1 feuille contaminée parmi 9 feuilles saines) a également été validée.
- **Phase 4** : analyse moléculaire de 148 échantillons foliaires de chrysanthème fournis par la STEPP Bretagne et le GIE FPSO (étude épidémiologique 2010)

5.2- Matériel utilisé dans le cadre de ce projet

Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé le matériel pathogène et végétal suivant :

- **5 isolats de la rouille blanche (*Puccinia horiana*)** disponibles à Vegenov ;
- **des échantillons foliaires de chrysanthème contaminés** par les différents isolats de la rouille blanche disponibles à Vegenov (témoins positifs) ;
- **1 échantillon foliaire de chrysanthème sain**, non contaminé par la rouille blanche, disponible à Vegenov (témoin négatif) ;
- **148 échantillons foliaires de chrysanthème** fournis par la STEPP Bretagne (9 échantillons reçus à Vegenov le 01/07/10 et 39 échantillons reçus à Vegenov le 27/07/10) et par le GIE FPSO (80 échantillons reçus à Vegenov le 30/06/10 et 20 échantillons reçus à Vegenov le 02/08/10) pour l'analyse moléculaire de la campagne épidémiologique 2010.

Les extractions d'ADN des échantillons foliaires de chrysanthème (témoins positifs, témoins négatifs et échantillons de la campagne épidémiologique 2010) ont été réalisées à Vegenov.

Un marqueur moléculaire spécifique de la rouille blanche *Puccinia horiana*, mis au point par l'équipe du Dr Kurt Huenguens en Belgique (Alaei *et al.*, 2009), a été testé à Vegenov sur les ADN extraits des échantillons foliaires de chrysanthème (témoins positifs, témoins négatifs et échantillons de la campagne épidémiologique 2010).

Un témoin négatif (eau) a également été inclus dans les analyses moléculaires, afin de détecter la présence éventuelle d'une contamination des échantillons au cours de l'analyse.

5.3- Résultats

Phase 1 : mise au point du test de détection moléculaire de la rouille blanche

Au cours de cette 1^{ère} phase, nous avons testé à Vegenov un marqueur moléculaire spécifique de la rouille blanche, mis au point en Belgique par l'équipe du Dr Kurt Heungeuns (Alaei *et al.*, 2009). Ce marqueur moléculaire reconnaît une région cible de l'ADN ribosomique de *Puccinia horiana*.

Au cours de cette étape, nous avons extrait à Vegenov l'ADN d'échantillons de feuilles de chrysanthème sains (témoins négatifs) et contaminés par la rouille blanche et prélevés 14 jours après inoculation par l'agent pathogène (témoins positifs).

Nous avons utilisé à Vegenov une technique de détection moléculaire par PCR quantitative de la rouille blanche à partir du protocole décrit par l'équipe du Dr Kurt Heungens (Alaei *et al.*, 2009).

Les résultats obtenus lors de cette phase de mise au point du test de détection moléculaire sont présentés dans la **figure 1**. Lorsque la rouille blanche est présente dans un échantillon analysé, une courbe d'amplification caractéristique apparaît en PCR quantitative.

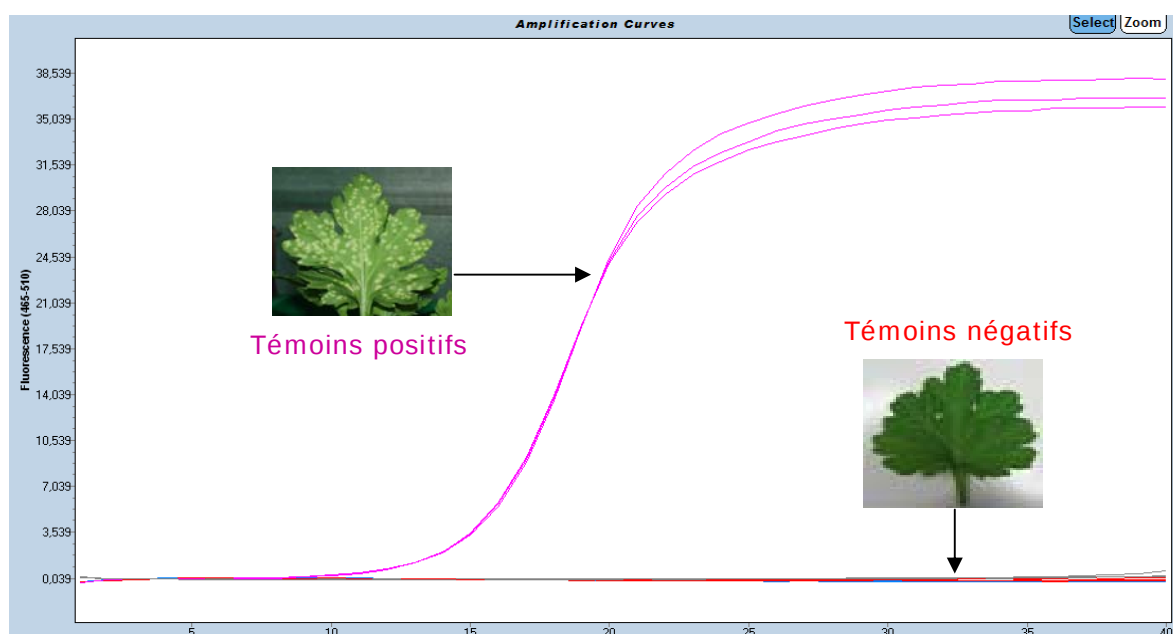


Figure 1 : Mise au point du test de détection moléculaire par PCR quantitative de la rouille blanche dans des échantillons foliaires de chrysanthème sains (3 échantillons en rouge) et contaminés par *Puccinia horiana* (3 échantillons en rose).

Cette première phase du projet a permis d'aboutir à la **mise au point d'un test de détection moléculaire fiable de la rouille blanche** sur des échantillons foliaires de chrysanthème contaminés par l'agent pathogène, adapté de celui décrit dans la publication de l'équipe belge du Dr Kurt Heungeuns.

Phase 2 : évaluation de la sensibilité du test de détection moléculaire de la rouille blanche

Au cours de cette 2^{ème} phase, nous avons voulu évaluer la sensibilité du test de détection moléculaire mis au point lors de la phase 1.

Nous avons inoculé des plants de chrysanthème avec l'isolat de *Puccinia horiana* utilisé au cours de la phase 1 et nous avons prélevé des échantillons de feuilles des plants de chrysanthème inoculés à 3 dates après inoculation (témoins positifs) : à 1 jour après inoculation (J+1, stade précoce), à 7 jours après inoculation (J+7, stade semi-précoce) et à 14 jours après inoculation (J+14, stade tardif). Le schéma de prélèvement est présenté dans la **figure 2**. Nous avons également prélevé des échantillons foliaires de chrysanthème sains (témoins négatifs).

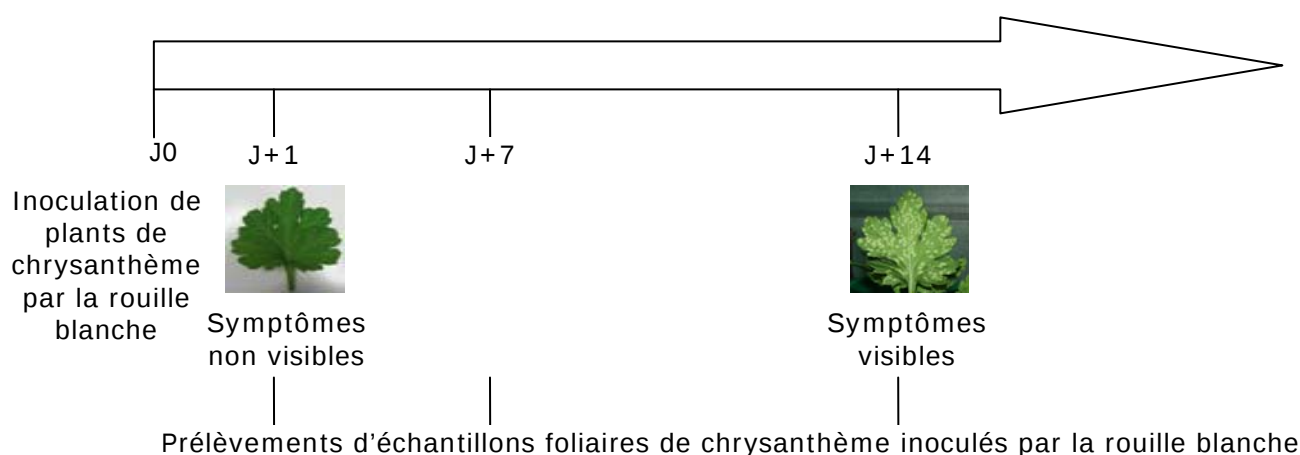


Figure 2 : Schéma de prélèvement des échantillons de feuilles de chrysanthème inoculés par la rouille blanche, à trois dates après inoculation.

Nous avons extrait l'ADN des différents échantillons foliaires de chrysanthème prélevés (inoculés et sains) et utilisé le test de détection moléculaire mis au point lors de la phase 1 afin d'identifier le seuil de détection de la rouille blanche dans ces différents échantillons.

Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 3**. Nous avons bien obtenu un **signal de détection par PCR quantitative proportionnel à la quantité d'inoculum de rouille blanche présente dans les échantillons** foliaires de chrysanthème contaminés.

Nous avons obtenu un signal de détection :

- très fort pour les échantillons foliaires prélevés 14 jours après inoculation (stade tardif, symptômes visibles sur feuilles) ;
- moyen pour les échantillons foliaires prélevés 7 jours après inoculation (stade semi-précoce) ;
- plus faible pour les échantillons foliaires prélevés 1 jour après inoculation (stade précoce, symptômes non visibles sur feuilles).

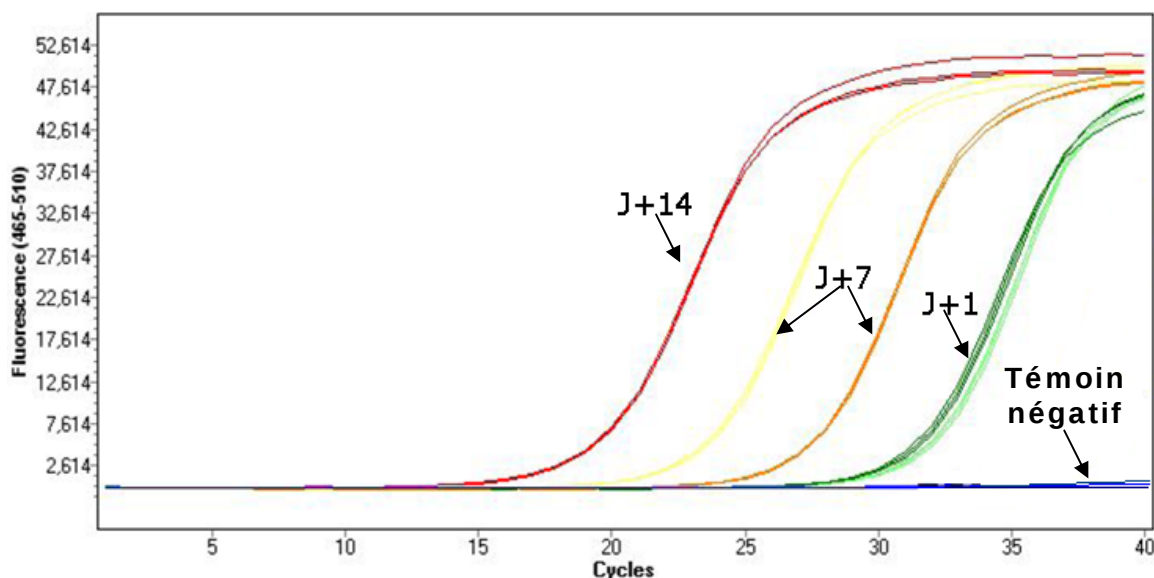


Figure 3 : Evaluation de la sensibilité du test de détection moléculaire par PCR quantitative de la rouille blanche dans des échantillons foliaires de chrysanthème contaminés par la rouille blanche et prélevés 14 jours après inoculation (J+14, en rouge), 7 jours après inoculation (J+7 en jaune et orange) et 1 jour après inoculation (J+1, en vert) et dans des échantillons foliaires de chrysanthème sains (témoin négatif, en bleu).

Cette 2^{ème} phase du projet a permis d'évaluer la **sensibilité du test de détection moléculaire** de la rouille blanche et de montrer que l'on pouvait détecter l'agent pathogène à des stades précoces d'infection, **avant apparition des symptômes sur feuilles visibles à l'oeil**.

Phase 3 : validation du test de détection moléculaire de la rouille blanche

Au cours de cette 3^{ème} phase, nous avons voulu valider le test de détection moléculaire :

- sur une gamme de 4 autres isolats de *Puccinia horiana* disponibles à Vegenov, afin de vérifier la sensibilité du test moléculaire sur différents isolats de l'agent pathogène ;
- sur des bulks de feuilles de chrysanthème constitués d'une feuille contaminée par la rouille blanche (prélevée à 1 jour ou 14 jours après inoculation) et 9 feuilles saines de chrysanthème.

Gamme d'isolats de *Puccinia horiana* :

Nous avons extrait l'ADN d'échantillons foliaires de chrysanthème inoculés respectivement par un des 4 nouveaux isolats de *Puccinia horiana* ou par l'isolat de la rouille blanche utilisé dans les deux premières phases de ce projet. Au total, les analyses moléculaires ont été réalisées sur des échantillons foliaires contaminés avec l'un des 5 isolats de *Puccinia horiana* disponibles à Vegenov (témoins positifs) et sur des échantillons foliaires sains (témoins négatifs).

Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 4**. Nous avons pu **détecter la rouille blanche par marqueurs moléculaires, quelque soit l'un des 5 isolats de *Puccinia horiana* utilisé pour l'inoculation des plants de chrysanthème**.

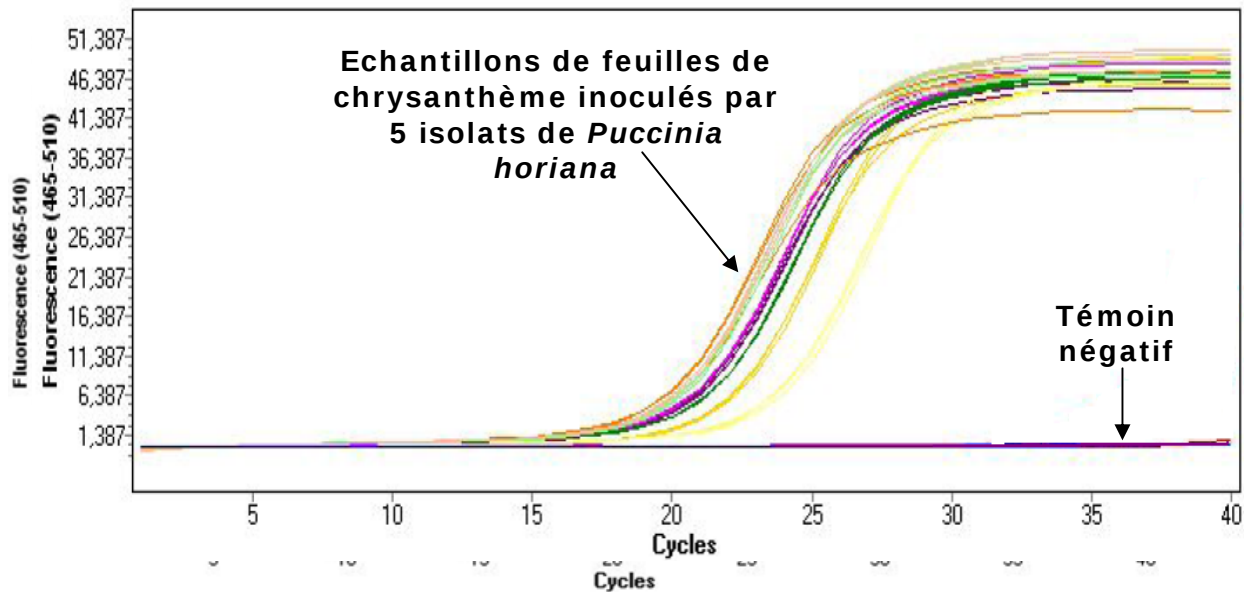
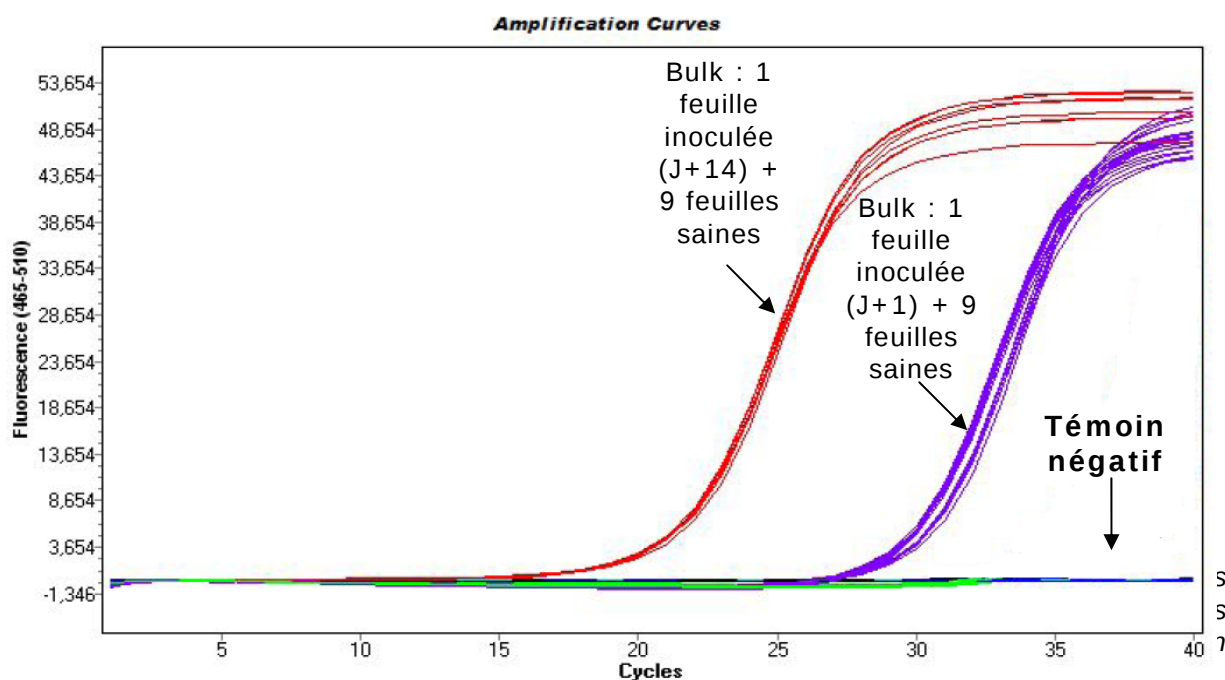


Figure 4 : Validation du test de détection moléculaire de la rouille blanche dans des échantillons foliaires de chrysanthème inoculés par une gamme de 5 isolats de *Puccinia horiana* disponible à Vegenov et dans des échantillons foliaires sains (témoin négatif).

Analyse en bulks :

Nous avons ensuite mélangé une feuille de chrysanthème inoculée par la rouille blanche et prélevée précocement (1 jour après inoculation) ou tardivement (14 jours après inoculation), avec 9 feuilles de chrysanthème saines afin de déterminer plus précisément le seuil de sensibilité de détection de la rouille blanche.

Nous avons extrait l'ADN total des bulks de feuilles saines et contaminées réalisés et nous avons analysé ces bulks en PCR quantitative, en utilisant le test de détection moléculaire mis au point au cours de cette étude. Nous avons comparé les profils de détection moléculaire obtenus pour ces bulks à celui d'un témoin négatif (échantillons foliaires sains). Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 5**.



Nous avons pu **détecter la présence de la rouille blanche en utilisant le test de détection moléculaire mis au point dans les bulks contenant une feuille contaminée par la rouille blanche parmi 9 feuilles saines**. La rouille blanche peut être détectable même lorsqu'il s'agit d'une feuille contaminée précocement, sans symptômes visibles à l'œil (J+1).

Phase 4 : analyse moléculaire de la campagne épidémiologique 2010

L'**analyse moléculaire des 148 échantillons** foliaires de chrysanthème de la campagne épidémiologique 2010, fournis par la STEPP Bretagne et le GIE FPSO, pour la détection de la présence éventuelle de la rouille blanche, est **actuellement en cours**.

Les premiers résultats des bulks des échantillons du GIEFPSO sont négatifs. Par contre 2 bulks des échantillons de la Stepp s'avèrent être positifs. Les autres bulks sont en cours d'analyse. La synthèse de ces résultats obtenus feront l'objet d'un rapport complémentaire.

5.4-Conclusions

Nous avons pu mettre au point et valider à Vegenov un **test de détection moléculaire fiable de la rouille blanche (*Puccinia horiana*)** dans des échantillons foliaires de chrysanthème à l'aide d'un marqueur moléculaire spécifique de l'agent pathogène par PCR quantitative. Ce **test de détection moléculaire a été reproductible vis-à-vis de 5 isolats différents de *Puccinia horiana*** disponibles à Vegenov.

Ce test s'est également montré **très sensible** puisque nous avons pu détecter la rouille blanche à un **stade très précoce de contamination**, sans symptôme visible à l'œil (1 jour après inoculation des plants par l'agent pathogène) et nous avons encore pu la détecter dans des **bulks de plants** contenant une feuille contaminée précocement sans symptôme visible et 9 feuilles saines.

Cependant, certaines **validations complémentaires sont encore nécessaires** avant de pouvoir proposer aux producteurs (de boutures et de plants d'élevage) ce test pour des analyses de détection moléculaire de la rouille blanche en routine. Il faudra en particulier :

- vérifier que ce test est bien **spécifique uniquement de la rouille blanche** et qu'il ne permet pas de détecter d'autres types de rouilles ;
- tester d'**autres isolats de *Puccinia horiana*** provenant de France ou d'autres pays ;
- étudier des **seuils de dilution plus importants en bulkage** (une feuille contaminée est-elle toujours détectable parmi un grand nombre de feuilles saines ?).

6- PERSPECTIVES DU PROGRAMME EN 2011

Les perspectives du programme en 2011 sont les suivantes :

- Poursuite de la veille bibliographique sur la rouille blanche et sur les facteurs favorisant l'apparition de la maladie et sur les moyens de détection.
- Finaliser l'enquête chez les multiplicateurs sur les techniques culturales des pieds mères de chrysanthèmes et les pratiques de lutte contre la rouille blanche du chrysanthème.
- Analyse des échantillons de feuilles provenant des 6 sites pilotes, utilisant la technique de détection moléculaire PCR.

L'objectif final est de :

- Proposer de mettre en place en France pour les obtenteurs intéressés un système de détection précoce de la rouille blanche en cultures de pieds mères par analyse PCR quantitative. Dans cette proposition on pourra imaginer effectuer des prélèvements de feuilles sur pieds mères réalisés par les obtenteurs selon un protocole établi. Les analyses seront effectuées par un laboratoire capable de maîtriser la technique de détection moléculaire. Les résultats des analyses seront confidentiels et directement communiqués aux obtenteurs concernés. En fonction des résultats des analyses les obtenteurs pourront ensuite prendre des mesures appropriées. Un schéma de certification phytosanitaire concernant la rouille blanche pourrait aussi être envisagé avec les obtenteurs.
- Proposer aux obtenteurs la possibilité de sélectionner et de générer des variétés résistantes à la rouille blanche. Des tests en série peuvent être envisagés pour déterminer le niveau de résistance de chaque nouvelle création génétique vis-à-vis de différents pathovars de *P. horiana*. Un laboratoire compétent pourra de ce fait réaliser ces tests dans pour lesquels, les variétés seront inoculées avec différents pathovars. Une nouvelle création résistante à la rouille blanche aurait un potentiel commercial important pour l'obteneur.

Les propositions décrites ci-dessus ont été accueillies avec grand d'intérêt par les obtenteurs lors de la dernière réunion au salon du végétal à Angers. Une telle initiative commune pourrait conduire à une solution durable pour lutter contre la rouille blanche du chrysanthème.

Une question reste cependant en suspend et qui préoccupe les obtenteurs et les collaborateurs du projet :

Puccinia horiana étant un pathogène de quarantaine, que se passerait-il si ce champignon est détecté précocement chez un multiplicateur quant à la destruction des plantes et à la fermeture du site de production. C'est un frein important à la poursuite du projet. Une réponse claire est nécessaire des instances publiques compétentes sur cet aspect.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bonde, M.R., Peterson, G.L., Rizvi, S.A., and Smilanick, J.L. 1995. Myclobutanil as a curative agent for chrysanthemum white rust. *Plant Disease* 79 : 500-505.
- Catley, A. (1987) Outbreak of chrysanthemum white rust in Australia. *FAO Plant Protection Bulletin* 35 : 99.
- Cook, R.T.A. 2001. First report in England of changes in the susceptibility of *Puccinia horiana*, the cause of chrysanthemum white rust, to triazole and strobilurin fungicides. *Plant Pathology* 50 : 792.
- Dickens, J.S.W. 1970. Infection of chrysanthemum flowers by white rust (*Puccinia horiana*). *Plant Pathology* 19, 122-124.
- Dickens, J.S.W. 1990. Studies on the chemical control of chrysanthemum white rust caused by *Puccinia horiana*. *Plant Pathology* 39, 434-442.
- Firmaman, I.D., Martin, P.H. 1968. White rust of chrysanthemum. *Ann. Appl. Biol.* 62:429-442.
- Grouet, D. 1984. Mise au point sur les possibilités actuelles de lutte contre la rouille blanche du chrysanthème. *Revue Horticole* 251, 33-36.
- Grouet, D.; Allaire, L. 1973. La rouille blanche du chrysanthème. *Evolution et méthodes de lutte. Horticulture Française* 30, 1-8.
- Guerrand, J. 2004. Les rouilles fongiques. Rapport bibliographique PN Rouille, BBV. 22p.
- Guerrand J., Drevo A., Colombel A.-S., Pajot E., Stapel O. 2006. « La résistance induite : une alternative prometteuse vis-à-vis des rouilles du chrysanthème ». *CIMA*. 8 : 157-165.
- Guerrand J., Drevo A., Colombel A.-S., Stapel O., Pajot E., 2007 - Des avancées prometteuses dans la protection intégrée vis-à-vis des rouilles du chrysanthème. 4èmes Rencontres du Végétal, Institut National d'Horticulture, Angers, France, 16-17 janvier ; p 85-86.
- Guerrand J., Aljabal, M., Lebihan, A., Stapel, O., Hallier, S. 2009 - Lutte contre la rouille blanche du chrysanthème. 9^e conférence internationale sur les maladies des plantes. AFPP, Tours, 8-9 décembre ; p 536-545.
- Guerrand, J., Aljabal, M., Stapel, O., Hallier, S. 2011. Lutte contre la rouille blanche du chrysanthème. AFPP- Méthodes alternatives en protection des cultures Lille – 8, 9 et 10 mars, p. 451-45.
- Harada Y., Iwama T. et Fukuda T. 1996. Life cycle of *Puccinia chrysanthemii* Roze, the rust fungus on *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 62:199-201.
- Hossein A. S., Baeyen, M., Maes, M., Höfte et K. Heungens, 2008. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. *Journal of Biological Methods*.

- MacDonald, L. 2001. *Floriculture Factsheet on Chrysanthemum White Rust*. British Columbia Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, Abbotsford, B.C., Canada. pp.3.
- Ohishi K., Okumura Y. et Moroika K. 2000. Incubation of *Puccinia horiana* P. H. using chrysanthemum plants cultured in vitro. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 69 (6): 767-769.
- OEPP/EPPO. 2006. *Data sheets on quarantine organisms*, 1982, 80p.
- ONIFLHOR. 2001. *Le marché du chrysanthème de Toussaint*. Publication CE-8/10/2001.
- Punithalingam, E. 1968. C.M.I. *Description of Pathogenic Fungi and Bacteria* No. 176 (*Puccinia horiana*). CAB International, Wallingford, UK.
- Rademaker, W.; Jong, J. de. 1987. Types of resistance to *Puccinia horiana* in chrysanthemum. *Acta Horticulturae* 197, 85-88.
- Rattink, H.; Zamorski, C.; Dil, M.C.. 1985. Spread and control of white rust (*Puccinia horiana*) on chrysanthemums on artificial substrate. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 50, 1243-1249.
- Takatsu Y., Ohishi K., Tomita Y., Hayashi M., Nakajima M., Akutsu K.. 2000. Use of chrysanthemum plantlets grown in vitro to test cultivar susceptibility to white rust, *Puccinia horiana* P. Hennings. *Plant Breeding* 119, 528-530.
- Srivastava, A.K.; Defago, G.; Kern, H. 1985. Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rusts. *Phytopathologische Zeitschrift*. 114, 73-78.
- Stapel, O. 2005. « Effets des biostimulants sur les défenses naturelles des plantes en culture de cyclamen et de chrysanthème ». *PHM Revue Horticole* 2005. N°468 : 15-20.
- Stapel, O. et J. Guerrand. 2011. High efficacy of a possible plant elicitor and other phytostimulants against white rust (*Puccinia horiana* Henn.) in potted chrysanthemum productions. *International Horticultural Congress Lisbon 2010. ISHS. Acta Hort.* Under review.
- Water, J.K.. 1981. Chrysanthemum white rust. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 11, 239-242.
- Wojdyla, A.T. 2002. Azoles in the control of *Puccinia horiana* on chrysanthemum. *J. Plant Protection Res.* 42 (3) : 263-270.
- Wojdyla, A.T. 2004. Development of *Puccinia horiana* on chrysanthemum leaves in relation to chemical compounds and time of their application. *J. Plant Protection Res.* 44 (2) : 91-102.
- Yamada S. 1956. Experiments on the epidemiology and control of chrysanthemum white rust, caused by *Puccinia horiana*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 20, 148-154.
- Yoder Bros. 1998. *Chrysanthemum white rust - a Bulletin*. Yoder Brothers, Inc., Florida, USA.
- Zamorski, C. 1982. Efficacité des fongicides pour la lutte contre la rouille blanche *Puccinia horiana*. *Acta Agrobotanica* 35, 251-256.

ANNEXES

ANNEXE 1 : QUESTIONNAIRE MULTIPLICATEURS

Chrysanthème Rouille Blanche

Etude Epidémiologique MultiPLICATEURS

Programme National ASTREDHOR

Date d'enquête :

Plage d'horaire :

Nom enquêteur :

Téléphone enquêteur :

Entreprise enquêtée :

Commune et département :

Nom de la personne entretenue :

Fonction :



G.I.E
Fleurs & Plantes
du Sud-Ouest



Stations de l'Institut technique de l'horticulture



Caractéristiques liées à la culture

- Type de chrysanthèmes : ☐ pomponette ☐ grosse fleur ☐ américain

- Type de jeune plant produit ☐ cutting ☐ bouture racinée

si cutting : conditions de bouturage pendant enracinement

☐ couverture ☐ air libre ☐ système fog

- Nombre de sites de production :

- Superficie totale de chrysanthèmes par site entreprise : m²

- Nombre de structures de production :

- Nombre de compartiments par structure de production :

- Type de structure de production par Nucléar stock

S00

Serre verre ☐ multi-chapelle ☐ autre ☐ spécifications :

Superficie m² m² m²

S0

Serre verre ☐ multi-chapelle ☐ autre ☐ spécifications :

Superficie : m² m² m²

S1

Serre verre ☐ multi-chapelle ☐ autre ☐ spécifications :

Superficie : m² m² m²

S2 (boutures chez les éleveurs et multiplicateurs). Même site, serres séparées?

Serre verre ☐ multi-chapelle ☐ autre ☐ spécifications :

Superficie : m² m² m²

Pratiques de prélèvement de boutures (à cocher) :

☐ gants ☐ outils ☐ désinfection (produit ?) des outils ☐ blouse ☐ autre

La plante: son origine :

- Combien de temps gardez vous vos pieds mères ?

- Renouvellement S0, S1 + commentaire ?

- A cocher : régénération in vitro ☐ / multiplication végétative ☐

- A quelle période constituez vous vos parcs de pieds mères ?

- Les contrôles effectués/diagnostics (pathologie) : virus ?

maladies fongique?

- Densité des pieds mères ?/m2

- Taille pot :

- Caractéristiques substrat :

Dans votre gamme variétale, connaissez-vous les sensibilités face à la rouille et pourquoi conservez vous les?

.....
.....
.....

Caractéristiques liées à la structure de production

Pratiques de désinfection

Vide sanitaire ? Combien de jours ?

Désinfection structures, tablettes, système d'arrosage, poterie ? ☐ oui ☐ non

Réutilisation de la poterie ? ☐ oui ☐ non

Quel produit, quelle dose, quelle fréquence ?

Caractéristiques liées à l'arrosage

- Source d'irrigation :

- | | |
|---|---|
| ☐ forage avec bassin de stockage | ☐ forage sans bassin de stockage |
| ☐ rivière/ruisseau avec bassin de stockage | ☐ rivière/ruisseau sans bassin de stockage |
| ☐ eau de pluie avec bassin de stockage | ☐ eau du réseau |

- Stockage d'eau : ☐ bassin à l'air libre ☐ bassin protégé

- Bassin : ☐ naturel ☐ artificiel

- Type d'arrosage : ☐ goutte à goutte ☐ aspersion ☐ ruissellement
☐ subirrigation ☐ nappe d'irrigation

- Déclenchement arrosage : ☐ manuel ☐ automatique

- Stratégie d'apport :

Fréquence d'arrosage est préétabli par jour ? ☐ Oui ☐ Non

Préférence période d'arrosage ?

☐ matin ☐ midi ☐ après midi ☐ soir

Arrosage au point de flétrissement ☐ Oui ☐ Non

Arrosage en fonction de l'état hydrique du substrat ☐ Oui ☐ Non

Si Oui, avec tensiomètre ☐ Oui ☐ Non

Déclenchement automatique ? ☐ Oui ☐ Non

Arrosage en fonction d'un autre paramètre ? ☐ Oui ☐ Non

Si Oui, lequel ?

Déclenchement automatique ? ☐ Oui ☐ Non

- Plage de fréquence d'arrosages : Début de culture à arrosages/jour
Milieu de culture à arrosages/jour
Fin de culture à arrosages/jour

Caractéristiques liées à la fertilisation

-Type d'engrais : ☐ engrais soluble ☐ engrais enrobés ☐ les deux

- Engrais foliaire ? Oui ☐ Non ☐

- Equilibres NPK et doses d'engrais soluble :

début de culture : équilibre : : Dose g/l solution fille

milieu de culture : équilibre : : Dose g/l solution fille

fin de culture : équilibre : : Dose g/l solution fille

- Equilibre NPK et dose d'engrais enrobé : équilibre : : Dose kg/m³

- Fréquence de fertilisation :

☐ Tous les arrosages ☐ 1 fois par 2 arrosages ☐ 1 fois par 3 arrosages
☐ Autre, à préciser :

Caractéristiques liées aux traitements phytosanitaires (pbi, insecticides, fongicides, herbicides, régulateurs)

- Traitements phytosanitaires préventifs (insecticides, fongicides)

Culture 1 (Précision/description) :

Produit	Dose	Cible	Date(s) d'application effectuée(s) ou prévue(s)	Stade de la culture

Culture 2 (Précision/description) :

Produit	Dose	Cible	Date(s) d'application effectuée(s) ou prévue(s)	Stade de la culture

Culture 3 (Précision/description) :

Produit	Dose	Cible	Date(s) d'application effectuée(s) ou prévue(s)	Stade de la culture

- Date passage traitement préventif à traitement curatif :

- Date d'observation premières symptômes de la rouille dans les cultures :

- Traitements phytosanitaires curatifs (insecticides, fongicides)

Culture 1 (Précision/description) :

Produit	Dose	Cible	Date(s) d'application effectuée(s) ou prévue(s)	Stade de la culture

Culture 2 (Précision/description) :

Produit	Dose	Cible	Date(s) d'application effectuée(s) ou prévue(s)	Stade de la culture

Culture 3 (Précision/description) :

Produit	Dose	Cible	Date(s) d'application effectuée(s) ou prévue(s)	Stade de la culture

- Traitements des régulateurs de croissance

Culture 1 (Précision/description) :

Produit	Dose		Date(s) d'application effectuée(s) ou prévue(s)	Stade de la culture

Culture 2 (Précision/description) :

Produit	Dose	Cible	Date(s) d'application effectuée(s) ou prévue(s)	Stade de la culture

Culture 3 (Précision/description) :

Produit	Dose	Cible	Date(s) d'application effectuée(s) ou prévue(s)	Stade de la culture

- Autres interventions :

Intervention	Date(s) effectuée(s) ou prévue(s)	Objectif
Pincement		
Ebourgeonnage		
Autre (à préciser)		

Caractéristiques liées à la gestion du climat / de la lumière

- Température de consigne/ Température de ventilation : °C / °C
- Hygrométrie de consigne / ventilation : %HR / %HR
- Période d'occultation (gestion photopériode) ? : ☐ Oui ☐ Non
 Si oui, à partir de quelle date ou semaine :
 Pendant combien de jours :
 Horaires :
- Utilisation ombrage (produit blanchiment ou écrans) ☐ Oui ☐ Non
 Si oui, produit :
 % d'ombrage : % ou dilution
- Utilisation des couvertures spéciales (ex. Solatrol etc.) ? ☐ Oui ☐ Non
 Si oui, produit :

Caractéristiques liées à l'environnement autour des systèmes de production

- Entreprise située dans une région
☐ urbaine ☐ semi urbaine ☐ rurale
- Description des cultures aux alentours de l'entreprise
- Distance de la production d'un cours d'eau ou d'un bassin : m
- Gestion des déchets des végétaux :
☐ Compostage. Distance entre lieu de compostage et cultures : m
☐ Brûlage. Distance entre lieu de brûlage et cultures : m
☐ Autre(à préciser) :

Mesures prises en cas de la contamination

Que faire face à un problème de contamination? Quelle est la procédure mise en place?

Jeter ☐ Bruler ☐ Traiter ☐ Éliminer variétés ☐

Quoi faire avec les sujets sans symptômes ?

Avertissements des clients ?

Retour clientèle en cas de problèmes.

- Quelle est l'action mise en place chez le multiplicateur
chez le client

Contrôles réglementaires

Vous êtes contrôlé ? ☐ Oui ☐ Non

Si oui, par qui ?

Combien de fois par an ?

Quelle période ?

Types de contrôles : ☐ visuels ☐ prélèvements

☐ analyses, quelles :

Connaissance réglementation

Pathogène de quarantaine ? ☐ Oui ☐ Non

Mesure à prendre / Procédures à respecter

Avez-vous déjà été soumis à des mesures de quarantaines et de destructions ? Qu'avez-vous fait ?

.....
.....
.....

Application des connaissances/techniques acquises dans le PN

Intéressé par la mise en place d'un schéma de sélection sanitaire (sur les bases des contrôles moléculaires)

.....
.....
.....

Aboutir à la certification ? Coûts, à quel prix ?

.....
.....
.....

Commercialisation : Communication intéressante sur boutures certifiées ou label?

.....
.....

Augmentation du prix de la bouture ?

.....
.....

Intéressé par sélection variétale sur la résistance contre la rouille blanche ?

.....
.....

Prêt à intégrer dans votre sélection variétale la résistance vis-à-vis de la rouille blanche et utiliser les techniques développées à Vegenov face à différents isolats ?

.....
.....

Prêt à cofinancer des projets de recherche sur la problématique de la rouille blanche ? Porteurs sains autres espèces et sources de contamination, identification des isolats et conservation. A quel prix ?

.....
.....
.....

Impressions du producteur vis-à-vis de la rouille blanche

- Quels facteurs favorisent, selon vous, la rouille blanche du chrysanthème ?

.....
.....
.....

- Vous avez l'impression que la pression parasitaire de cette maladie est variable suivant les années ou est ce que la pression reste assez stable depuis des années?

.....
.....
.....

- Est-ce que la rouille blanche est maîtrisable avec les produits d'aujourd'hui ?

.....
.....
.....

- L'importance économique de la maladie pour l'entreprise

☐ très important ☐ important ☐ moins important ☐ pas important

- Fréquence de l'apparition de la rouille du chrysanthème dans l'entreprise

☐ 2 fois par an ☐ 1 fois par an ☐ 1 fois par 2 ans ☐ 1 fois par 4 ans ☐ jamais

- Autres remarques du producteur :

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Observations et remarques de l'enquêteur

- Présentation globale de la culture (carences, maladies, ravageurs) :

☐ bien entretenue ☐ assez bien ☐ moyennement entretenue ☐ mal entretenue

Remarques :

- Propreté dans et autour des cultures de chrysanthèmes

☐ très propre ☐ propre ☐ assez propre ☐ moyen ☐ sale

Remarques :

- Impression de l'enquêteur par rapport au climat lors de la visite

hygrométrie dans la culture : ☐ élevée ☐ assez élevée ☐ assez basse ☐ basse
température : ☐ élevée ☐ assez élevée ☐ assez basse ☐ basse
ventilation : ☐ aérée ☐ confinée

Remarques :

- Humidité des cultures lors de la visite

humidité substrat : ☐ élevée ☐ assez élevée ☐ assez basse ☐ basse
humidité du feuillage: ☐ élevée ☐ assez élevée ☐ assez basse ☐ basse

Remarques :

- Etat physiologie des cultures / les cultures sont à quelles stades ?

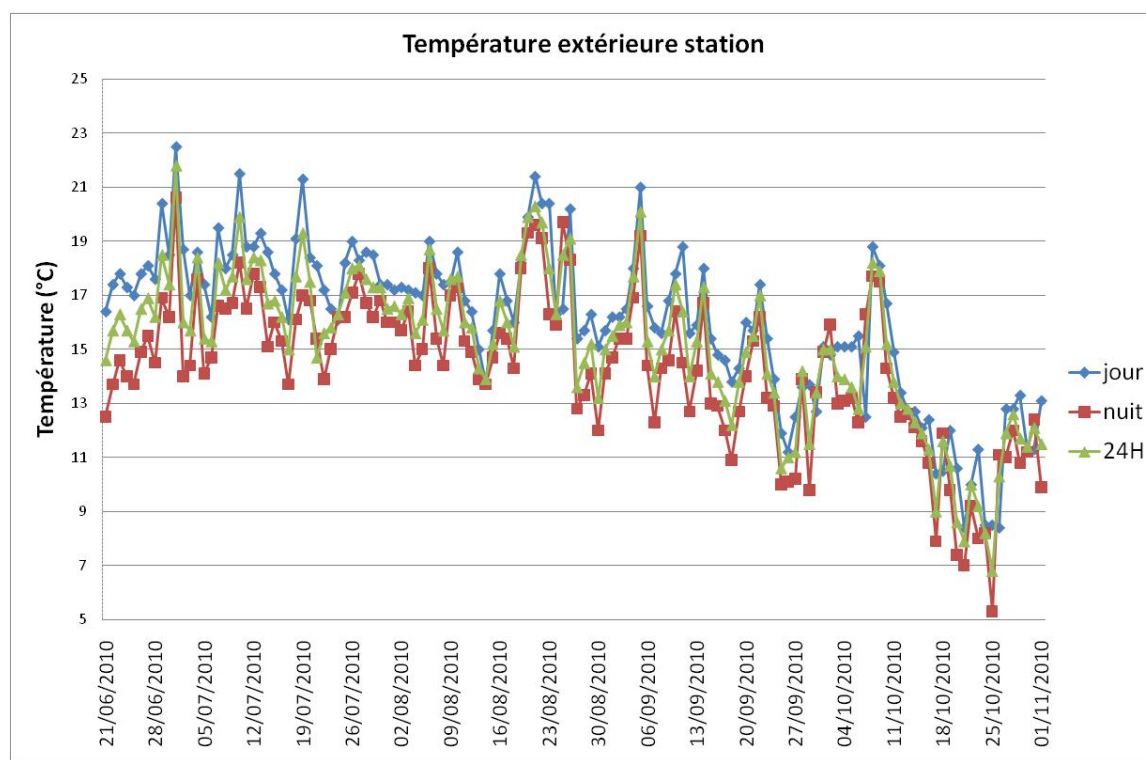
.....
.....

- Autres remarques et observations

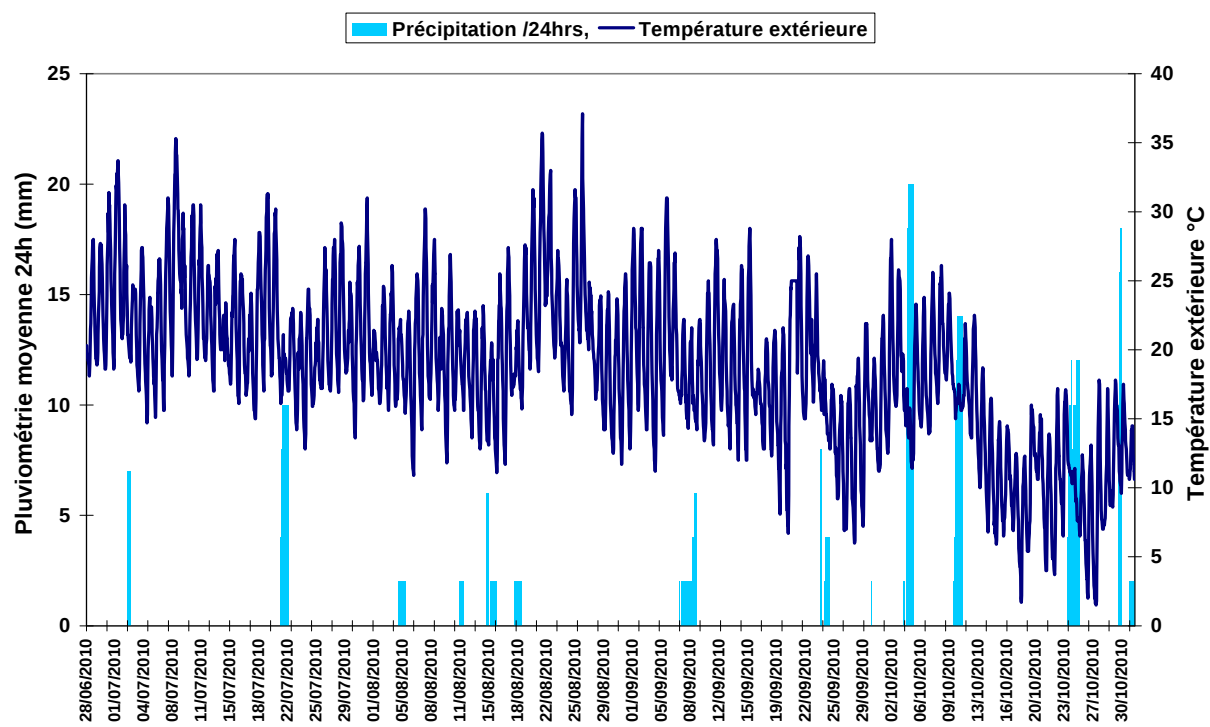
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ANNEXE 2 : Données météo stations

STEPP 2010



GIEFPO 2010



ANNEXE 3A : Caractéristiques des échantillons prélevés sur les sites pilotes du GIEFPSO

FRIMONT					
semaine d'échantillonnage	variété	fournisseur	code	type de fleur	nombre de BP
25	Sympa jaune	Challet Herault	FCH1, FCH2	pF	2
	Elektra jaune		FCH3, FCH4	pF	2
	Taiga blanc		FCH5, FCH6	pF	2
	Toundra blanc		FCH7, FCH8	pF	2
	Margot blanc		FCH9, FCH10	pF	2
	Urba rouge		FCH11,FCH12	pF	2
	Blanca blanc		FCH13,FCH14	pF	2
	Saga violet		FCH15	pF	2
	Balma violet		FCH17	pF	2
	Volta cerise		FCH19	pF	2
	Pantin jaune	Sauvé-Guittet	FSG1 à FSG4	pF	4
	Apopsis rose		FSG, FSG6	pF	2
	Pantin blanc		FSG7, FSG8	pF	2
	Voilactee		FSG9, FSG10	pF	2
	Adela rose		FSG11, FSG12	pF	2
	Velika jaune		FSG13, FSG14	pF	2
	Doria cuivre		FSG15,FSG16	pF	2
	Pantin rose		FSG17,FSG18	pF	2
	Phodia jaune		FSG19,FSG20	pF	2

LABAT					
semaine d'échantillonnage	variété	fournisseur	code	type de fleur	nombre de BP
25	Salambo jaune	Bernard	LB1	gF	2
	Polojo jaune		LB3	gF	2
	Torpedo rouge		LB5	gF	2
	Nerida violet		LB7	gF	2
	Polojo jaune		LB9	gF	2
	Mmalibu blanc		LB11	gF	2
	Bouldor jaune		LB13	gF	2
	Africa violet		LB15	gF	2
	Malieu blanc		LB17	gF	2
	Pikneige		LB19	gF	2
	Yahou coco		LB21	pF	2
	Yahou golden		LB23	pF	2

GIE FPSO					
semaine d'échantillonnage	variété	fournisseur	code	type de fleur	nombre de BP
26	Yahou abricot	Bernard	GB1,GB2	pF	2

	Yahou fraise		GB3, GB4	pF	2
	Corto orange		GB5,GB6	pF	2
	Tribal rouge		GB7,GB8	pF	2
	Frigo blanc		GB9,GB10	pF	2
	Soda lemon		GB11, GB12	pF	2
	Mitik rose		GB13, GB14	pF	2
	Teva rose		GB15,GB16	pF	2

HORTILAND					
semaine d'échantillonnage	variété	fournisseur	code	type de fleur	nombre de BP
30	Venus jaune	Unique	HJ1	pF	4
	Diane rouge		HJ5	pF	2
	Janus Rose		HJ7	pF	2
	Doris Blanc		HJ9	pF	2
	Eros Rose		HJ11	pF	2
	Vulcain Violet		HJ13	pF	2
	Minos orange		HJ15	pF	2
	Bacchus Framboise		HJ17	pF	2
	Junon orange		HJ19	pF	2

ANNEXE 3B : Caractéristiques des échantillons prélevés sur boutures non racinées STEPP

prélèvement le 29 juin 2010					prélèvement le 26 juillet 2010		
Variété	colori	Code			Variété	colori	fournisseur
balsa	rouge	B 1	B = bernard		toccata	jaune	challet
dodu	jaune tokoyo	B 2	CH = challet		jikila	jaune	challet
fada	ocre	B 3	S = Stamens		sakia	jaune	challet
krousty	cuiivre	B 4	G = Gediflora		carillon	cuiivre	challet
manga	mauve	B 5			kena	cuiivre	challet
mitik	rose	B 6			fifre	rose	challet
senso	violet	B 7			cymbale	violet	challet
soda	lemon	B 8					
studio	lilas	B 9			malibu	blanc	bernard
teva	rose	B 10					
vinci	blanc tokyo	B 11					
yahou	abricot	B 12					
balma	rose	CH1					
burma	rose	CH2					
castor	jaune	CH3					
clara	jaune	CH4					
fructa	framboise	CH5					
furia	cuiivre	CH6					
léna	violet	CH7					
loya	crème	CH8					
manga	jaune	CH9					
maya	jaune	CH10					
melissa	rose	CH11					
pollux	blanc	CH12					
songa	orange	CH13					
vaumoise	blanc	CH14					
volta	vanille	CH15					
cristina	orange	S 1					
dendara	ocre	S 2					
marelle	violet	S 3					
voilactée	blanc	S 4					
albanor	white	G 1					
contessa	lilac	G 2					
nestoro	gold	G 3					
odet	jaune	G 4					
oghana	lilac	G 5					
pianello	white	G 6					
pizzato	orange	G 7					
sanaya	jaune	G 8					