

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE  
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES  
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**EVALUATION DE L'EFFICACITE DE DIFFERENTS PRODUITS DE BIOCONTROLE A BASE DE  
MICROORGANISMES ANTAGONISTES, POUR LUTTER CONTRE LA FUSARIOSE DU *DIPLADENIA***

J.-M. DEOGRATIAS <sup>1</sup>, B. DARLES <sup>1</sup>, M. TRIOLET <sup>1</sup>, R. JOUANNIC <sup>1</sup> ET J. GERBORE <sup>2</sup>

(1) GIE Fleurs et Plantes du Sud-Ouest,

jeanmarc.deogratias@astredhor.fr

romain.jouannic@astredhor.fr

(2) INRA UMR 1065 SAV/Biovitis s.a.

jonathan.gerbore@bordeaux.inra.fr

71 Avenue E. Bourleaux BP 81, 33883 Villenave-d'Ornon, France

**RÉSUMÉ**

De nouveaux produits biologiques aux propriétés à la fois de protection contre les pathogènes et de stimulation du développement des plantes, apparaissent en réponse au contexte actuel de réduction des intrants chimiques et de respect de l'environnement. Des méthodes de protection des cultures contre les pathogènes du sol à l'aide de microorganismes sont éprouvées et notamment sur le pathosystème « *Fusarium oxysporum-Dipladenia* ». Les résultats montrent qu'après inoculation artificielle des plants par *F.oxysporum*, les produits à base de certaines souches de *Trichoderma* et de *P. oligandrum* permettent de limiter la contamination. En revanche, certains produits n'ont pas pu révéler toute leur efficacité car les micro-organismes qu'ils contiennent n'ont pas été retrouvés dans la rhizosphère par les techniques de microbiologie et/ou moléculaire. C'est le cas des *Rhizofagus spp.* et de *Gliocladium catenulatum*.

Mots-clés : *Dipladenia* ; *Fusarium.oxysporum* ; biocontrôle ; biotisation ; microorganismes ; *Trichoderma spp* ; *Rhizofagus spp* ; *Pythium oligandrum* ; *Gliocladium catenulatum*.

**ABSTRACT**

**EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF VARIOUS PRODUCTS OF BIO-CONTROL WITH ANTAGONIST MICROORGANISMS, TO CONTROL THE FUSARIOSE OF DIPLADENIA**

New biological products to both protection against pathogens and stimulation of the development of the plants properties, appear in response to the current context of reducing chemical inputs and environment respect. During this test, products within various types of micro-organisms are tested on the pathosystem « *Fusarium oxysporum-Dipladenia* ». Results show that after artificial plants inoculation by *F.oxysporum*. Some strains of *Trichoderma spp* and *P. oligandrum* limit contamination. On the other hand, several products were unable to reveal their effectiveness because their containing microorganisms have not been found in the rhizosphere by microbiology or molecular technics. This is the case of *Rhizofagus spp.* and *Gliocladium catenulatum*.

Keywords: *Dipladenia*; *Fusarium.oxysporum*; biological control; biotisation; microorganisms; *Trichoderma spp*; *Rhizofagus spp*; *Pythium oligandrum*; *Gliocladium catenulatum*.

## INTRODUCTION

Les stratégies de protection des végétaux reposent essentiellement sur l'utilisation de molécules chimiques. Les traitements phytosanitaires restent le meilleur moyen d'obtenir une bonne qualité des végétaux ainsi que des rendements suffisants. Cependant, aujourd'hui l'impact de ces produits, qui, par définition, agissent sur les organismes vivants, sur la santé humaine (applicateurs et consommateurs) et sur l'environnement, apparaît au cœur des préoccupations sociétales.

Suite au Grenelle de l'environnement de 2008, un plan Ecophyto a été mis en place. Ce plan piloté par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt a pour objectif de réduire rapidement l'utilisation des produits phytosanitaires, et d'accélérer l'étude et la diffusion des méthodes alternatives (Decoin M ; 2014)

Ces pratiques alternatives sont regroupées sous le terme de « protection intégrée » qui consiste à combiner les différents moyens de lutte, qu'ils soient génétique, biologique, prophylactique ou chimique ; avec la volonté de limiter au maximum l'utilisation des produits phytopharmaceutiques puisque leur utilisation seule, avec un même produit peut aboutir à la résistance du ravageur ou de l'agent phytopathogène vis-à-vis de ce produit. La lutte biologique, consiste en l'utilisation de macro ou micro-organismes vivants, destinés à la protection des végétaux. Celle-ci s'intègre dans le « biocontrôle » qui regroupe également l'utilisation de substances et de préparations d'origine naturelle et/ou sans activité pesticide (Damoiseau ; 2012).

En termes de protection des végétaux, la principale difficulté liée à l'utilisation des produits à base de micro-organismes de biocontrôle est leur homologation. En effet, la durée et le coût de l'obtention de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) est un réel frein à leur commercialisation en Europe. En outre, montrer leur efficacité constante contre des pathogènes reste difficile dans la mesure où ce sont des organismes vivants, donc plus dépendants des facteurs biotiques et abiotiques. Il est fréquent que ces produits soient finalement homologués sous la dénomination « fertilisant » ou « stimulateur de la vitalité des plantes ». De plus, lorsque des produits à base d'agents de biocontrôle sont finalement homologués, c'est en majorité dans le secteur des grandes cultures, de l'arboriculture et des cultures légumières mais peu le sont pour les cultures ornementales (Darles ; 2013).

Même si le marché des produits de biocontrôle est en expansion, avec une croissance au rythme de 15% par an, il ne représente, en 2012, qu'1% des produits phytosanitaires vendus en agriculture (Fravel D ; 2003, 2005). Ce marché du biocontrôle génère tout de même un chiffre d'affaire d'un milliard d'euros par an (Damoiseau ; 2012). Le biocontrôle présente de réels avantages au niveau biologique comme leur action préventive contre les pathogènes, leur implantation et action à long terme dans le sol et leur compatibilité avec des produits chimiques.

En horticulture ornementale, associer ces micro-organismes de biocontrôle à un support de culture représente un réel intérêt pour la vitalité et la protection des plantes. En effet, le but est d'enrichir en vie microbienne les substrats « inertes » utilisés pour la culture hors-sol ; c'est ce que l'on appelle la biotisation (Deogratias 2012) La biotisation peut par exclusion compétitive, bloquer des sites contre une éventuelle colonisation par des agents pathogènes. Le plant biotisé possèdera un environnement moins propice au développement de microorganismes pathogènes. Ces effets sont dépendants de l'espèce végétale et du substrat et des complexes microbiens utilisés (Rafferty SM ; 2004).

Les micro-organismes sont étudiés depuis 2005 au GIE Fleurs et Plantes du sud-ouest pour lutter contre les champignons pathogènes du sol et afin de trouver des solutions alternatives à proposer aux producteurs au vu des nouvelles réglementations. Ces micro-organismes jouent principalement un rôle dans le biocontrôle mais ils permettent aussi la stimulation de la croissance des plantes (meilleure qualité, meilleur enracinement) Ces agents de biocontrôle ont une activité qui dépend principalement des différentes conditions environnementales et physicochimiques qu'ils rencontrent, c'est pourquoi le contrôle exercé par ces champignons est parfois imprévisible. L'efficacité de ces champignons comme agents de lutte biologique résulte de plusieurs mécanismes variés et complexes agissant en synergie afin de contrôler l'agent pathogène (Howell, 2003). Cette activité résulte soit d'une compétition vis-à-vis des nutriments ou de l'espace, ou bien résulte de la production de métabolites qui ont pour action d'inhiber la germination des spores, d'entraîner la mort cellulaire ou encore de modifier la rhizosphère, par exemple en acidifiant le sol, tout ceci afin que le pathogène ne

se développe pas. Le champignon peut également agir via une interaction directe avec le pathogène en utilisant des mécanismes tels que le mycoparasitisme, qui implique un contact physique et la synthèse d'enzymes hydrolytiques, de composés toxiques et/ou d'antibiotiques agissant en synergie avec les enzymes (Benitez T., 2004). Ces mécanismes peuvent intervenir seuls, en association ou séquentiellement pour une efficacité accrue.

Les méthodes de microbiologie sont couramment employées pour l'observation des micro-organismes et l'identification selon des critères phénotypiques. Ces méthodes sont basées sur l'ensemencement de milieux de culture et l'observation après une période d'incubation. Toutefois, l'approche biologique présente certains inconvénients : les résultats dépendent de l'état physiologique des micro-organismes qui peuvent être viables, viables mais non cultivables, en dormance (Massot, 2011). Elles ne permettent pas de discriminer plusieurs souches au sein d'une même espèce. La croissance des micro-organismes est sélective, ainsi les espèces à croissance rapide et les plus adaptées à des conditions de cultures (température, éléments nutritifs du milieu) sont favorisées. Pour appuyer l'approche biologique quant à la détection des micro-organismes, des méthodes basées sur des techniques de biologie moléculaire sont aussi utilisées et notamment, la PCR quantitative qui a une meilleure sensibilité que la PCR conventionnelle. Ainsi, c'est cette technique qui est utilisée pour appuyer la technique de microbiologie (Gerbore J ; 2014)

Afin d'évaluer l'installation des produits et suivre leurs évolutions au cours du temps au niveau de la rhizosphère des approches microbiologiques et/ou moléculaires sont nécessaires.

L'étude porte sur le pathosystème « *Fusarium oxysporum*-*Dipladenia* ». L'objectif est de comparer, dans des conditions de production, l'efficacité de différents produits à base de micro-organismes sur le développement et la qualité sanitaire de plants de *Dipladenia*. Conscient de la variabilité des facteurs biotiques et abiotiques, ce projet est mené sur trois ans (2012 à 2014).

## MATERIEL ET MÉTHODE

### MATERIEL VEGETAL ET PATHOSYSTEME

La variété de *Dipladenia* choisie pour mener cet essai est la variété Diamantina 'Opale Grenat' obtenue par l'entreprise Lannes. Elle a été choisie du fait qu'elle présente une forte sensibilité à la fusariose. Les plants de *Dipladenia* sont reçus sous forme de boutures enracinées réalisées à partir de pieds mères.

#### **Le pathosystème : *Fusarium oxysporum* et *Dipladenia* (*Dipladenia diamantina* cv. opale grenat)**

*Fusarium oxysporum* est un agent pathogène tellurique important touchant de très nombreuses cultures. En production ornementale, ce champignon est aussi très difficile à contrôler, même après un traitement préventif. Il provoque de nombreux symptômes. Ces symptômes vont de simples taches noires sur les feuilles à la pourriture des racines. L'étendue des symptômes montre la capacité de colonisation de ce champignon sur une gamme variée de plantes. Au niveau de l'espèce *Fusarium oxysporum*, un peu plus de 120 formes différentes (*formes spéciales*) ont été dénombrées et définies selon leur spécificité d'hôte. Il faut noter, que certains isolats ne sont pas pathogènes, c'est le cas de la souche Fo47. La forme asexuée (anamorphe) est la plus couramment rencontrée et le nom de genre est *Fusarium*. La forme parfaite (téléomorphe) a été rencontrée chez certaines espèces de *Fusarium*, dont les noms de genre sont *Gibberella* et *Nectria*. Les symptômes que présente cette maladie sur *Dipladenia* sont assez simples à observer et à identifier. Les feuilles deviennent jaunes puis tombent peu à peu et la plante se dessèche rapidement. Les plantes touchées se repèrent assez vite. Le *Fusarium sp.* engendre des amas duveteux ronds et orangés le long des tiges liguleuses. Ce sont des sporodochies, des regroupements de conidiophores.



**Figure 1** : symptômes sur *Dipladenia* (jaunissement et Sporodochies de *Fusarium sp.* à l'œil nu) et *Fusarium sp.* au microscope (x 200). (Symptoms on *Dipladenia* (yellowing and Sporodochies of *Fusarium sp.*) and *Fusarium sp.* in the microscope)

#### PRODUITS UTILISÉS ET MODALITÉS DE L'ESSAI

**Tous les produits sont employés aux doses recommandées par les distributeurs.**

#### Les microorganismes:

Les produits à base de micro-organismes sont fournis sous différentes formulations qui impactent le mode d'application. (Les pratiques d'application des produits sont définies par les firmes.)

**Trianum G® et P® + L1** : Le Trianum® peut se présenter sous forme de granulés ou de poudre. Il a été homologué par la société Koppert® en tant que stimulateur de vitalité des plantes par traitement du sol et classé parmi les produits phytosanitaires (Koppert Biological systems, 2010). Ce produit est à base de spores de *Trichoderma harzianum* souche T-22. Au cours de cet essai, sa forme granulés Trianum-G® a été mélangée au substrat, à la dose 0.75g/l de substrat, lors de l'empotage. 11 semaines après l'empotage, nous avons à nouveau inoculé le substrat avec le Trianum-P® en poudre dilué dans de l'eau à raison de 1g/l. La solution est donc appliquée à chaque plante en arrosage avec 30ml de solution de Trianum P® par plante. La société Koppert fournit également un produit activateur de vie microbienne, **le produit L1**, qui est composé d'extraits de plantes marines/algues. Ce produit liquide est dilué dans de l'eau à raison de 0.83ml/l puis 20ml de cette solution sont apportés toutes les 2 semaines, au niveau du substrat des plants de la modalité traitée au Trianum.

**Esquive WP® + AAEf®** : Il s'agit d'une préparation homologuée en tant que biofongicide contre les maladies du bois de la vigne par Agrauxine®. Cette préparation appliquée à 1g/l contient la souche I-1237 du champignon *Trichoderma atroviride*. Il a donc une action de protection préventive contre les pathogènes mais également d'inhibition du développement du champignon pathogène.

La société Agrauxine® a également développé un activateur nommé AAEf (1g/l) d'origine végétale (86.1%), minérale (6.6%) et marine (7.3%) afin d'améliorer l'efficacité des champignons.

**TIFI®** : Inoculum à base de spores et mycélium de champignons *Trichoderma atroviride* et *Rhizofagus spp.* homologué et commercialisé comme fertilisant par la société Italtapollina®. Son rôle est de stimuler la croissance des plantes en améliorant l'utilisation des nutriments et protégeant les racines des organismes pathogènes afin de réduire l'utilisation d'intrants chimiques. Il est apporté, sous forme de poudre, au moment de la préparation du support de culture pour le rempotage. La dose appliquée est de 2.5g/l de substrat.

**Team Enrobage®** : Ce produit contient un mélange d'inoculum de champignons mycorhiziens (appartenant à deux espèces de *Glomus*), de *Trichoderma* et de bactéries de la rhizosphère. Son efficacité sur la germination et le développement des jeunes plants lui ont permis d'être homologué en tant qu'agent fertilisant même s'il a également un rôle dans la protection des plants contre les pathogènes. Il est vendu sous forme de poudre qui est mélangée au substrat, à la dose 2.5g/litre de substrat, au moment de la préparation de l'empotage.

**Prestop®** : Ce produit est commercialisé par la société Ithec en tant qu'agent de lutte biologique contre des maladies à la fois foliaires et telluriques. Il est vendu sous forme de poudre mouillable contenant du mycélium et des spores de *Gliocladium catenulatum*, champignon naturellement présent dans certains sols. Le produit est mis en suspension à raison de 5g/l puis apporté par arrosage de 50ml de bouillie au collet de chaque plant de *Dipladenia*.

***Pythium oligandrum* : souche seule ou 2 souches en mix**: Ces souches sont fournies par le laboratoire SAVE de l'INRA qui mène actuellement des recherches sur leur efficacité vis-à-vis de la protection des végétaux contre les pathogènes telluriques mais également pour leur action positive sur le développement végétal, principalement racinaire. La dose de produit apportée est de  $4 \times 10^3$  spores par pot.

### Les produits phytosanitaires utilisés

**Topsin 70 WG®**: La substance active de ce produit phytosanitaire chimique est le Thiophanate-méthyl 70,4 %yl (famille chimique des benzimidazol). Il est homologué, entre autre, en production horticole pour le traitement du sol contre les champignons autres que les Pythiacées. La dose d'emploi recommandée est 1.2kg/ha (1.2g/l). Il est fourni sous forme de granulés dispersibles.

**Octave®** : Ce produit commercialisé sous forme de poudre mouillable a pour matière active le Prochloraze (46.1%). Il est indiqué dans le traitement des bulbes contre la fusariose (0.075kg/hl).

Ces deux traitements chimiques phytosanitaires sont appliqués en alternance et toutes les 4 semaines après le repotage.

### DISPOSITIF EXPERIMENTAL

#### Modalités de l'essai

Les modalités sont définies en fonction du type de produit incorporé au substrat. L'essai comporte 13 modalités en 2012 et 11 en 2013. Les témoins correspondent respectivement aux modalités:

- non biotisée et non inoculée par la fusariose, que l'on appelle témoin exclu
- non biotisée et inoculée par la fusariose
- traitée par fongicides, que l'on appelle témoin de référence

Les autres modalités sont biotisées par les différents produits testés.

Chaque modalité regroupe 30 plantes réparties de manière homogène sur 3 blocs. La modalité témoin exclu a été isolée sur une table à part des autres, limitant ainsi la possibilité de contamination, par la fusariose, de ces plants non-inoculés.

#### Mise en place de l'essai

L'apport des microorganismes se fait soit par arrosage, soit par incorporation dans le substrat.

Toutes les plantes sont repotées dans un pot de 12 cm de diamètre contenant un volume de substrat de 0.7-0.8 L. Le support de culture utilisé est un substrat Premier Tech Faliénor composé de tourbe blonde, de fibres de bois, d'écorce de pins compostée (granulométrie de 0 à 5mm) et de fibres de coco.

Les propriétés physico-chimiques (granulométrie, compostage spécifique, pH 6, Ec 0.50mS/cm) de ce substrat en font un support particulièrement adapté à l'installation des micro-organismes. En effet, les matériaux du type fibres de bois et écorce de pin compostée permettent une meilleure colonisation par les micro-organismes. Ces composés tamponnent les substrats contenant uniquement de la tourbe blonde et de la fibre de coco qui présentent un pouvoir acidifiant.

Un engrais est incorporé au substrat lors de l'empotage afin de fournir les éléments nutritifs nécessaires au développement des plants de *Dipladenia*. Il s'agit d'un engrais retard à diffusion lente : Basacote native 6 mois à (5-3-8). Il est mélangé au support de culture à raison de 2g/l de substrat.

### **Préparation de l'inoculum et méthodologie d'inoculation des plantes**

C'est à partir de plants de *Dipladenia* exprimant des symptômes de fusariose que nous avons isolé la souche de *Fusarium oxysporum*. Cette souche identifiée a ensuite été multipliée dans un milieu de culture spécifique.

Pour préparer la suspension d'inoculum, nous avons compté les conidies (forme asexuée du champignon), sur une cellule de Malassez et inoculé avec 3 millions de conidies par pied.

L'inoculation se fait par arrosage du substrat de culture des plantes avec les suspensions d'inoculum préparées précédemment après avoir blessé les racines à l'aide d'un greffoir et scarifié le collet de la plante avec un scalpel trempé dans la suspension d'inoculum.

Les témoins sont arrosés avec 20 ml d'eau stérile et blessés au collet avec un scalpel stérile.

Afin de favoriser le développement du *Fusarium*, nous avons mis un plastique micro perforé au-dessus des plantes et ainsi augmenté l'humidité et la chaleur. En outre, pour bien faire pénétrer le champignon dans les racines, l'écoulement de sortie de l'arrosage a été bouché pendant quelques jours afin que l'inoculum imprègne suffisamment le substrat de culture de la plante.

### **Suivi de la colonisation racinaire par les différents genres de micro-organismes contenus dans les produits testés**

Des analyses en laboratoire sont menées pour suivre la biotisation des plantes. Ces analyses reposent sur l'utilisation de techniques microbiologiques ou moléculaires afin de détecter la présence de la souche du micro-organisme de biocontrôle incorporée.

### **Observations effectuées**

Ces observations physiologiques et sanitaires des plantes permettent d'apprécier les effets des produits testés d'une part dans la protection contre *Fusarium oxysporum* et d'autre part vis-à-vis de la stimulation du développement des plants.

Le développement est apprécié en mesurant la hauteur totale du plant, du collet jusqu'à son apex. Toutes les plantes ont été taillées à la suite de leur empotage et ramenées à une hauteur homogène d'environ 9 cm.

Pour évaluer la qualité du développement racinaire, le pourcentage de recouvrement par les racines, de la périphérie du substrat de chaque pot est noté et classé en 4 catégories (1 : non raciné à 4 : racines recouvrent toute la motte).

Les plantes sont régulièrement surveillées (particulièrement après leur inoculation par *F.oxysporum*) au niveau racinaire et foliaire afin de repérer tout symptôme causé par *F.oxysporum* ou par d'autres pathogènes/ravageurs.

### **Traitement statistique**

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel StatBox. Les comparaisons entre les modalités sont effectuées par analyse de variance (ANOVA) dans le cas des variables quantitatives au seuil de 5%. Les différences sont donc significatives si  $p < 0.05$  et très significatives si  $p < 0.01$ .

## **RESULTATS & DISCUSSION**

### **Identification microbiologique de l'espèce: *Fusarium oxysporum***

La souche pathogène étudiée au cours de cet essai a été isolée à partir de plants de *Dipladenia* provenant d'un producteur adhérent au réseau ASTREDHOR. Ce choix s'est fait dans le but de proposer des solutions adéquates à cette nouvelle problématique qu'est la fusariose pour les producteurs de *Dipladenia*. Les symptômes des plants, origine de l'isolat, ont mené au diagnostic de fusariose mais seules des analyses microbiologiques permettent de confirmer l'espèce de *Fusarium* dont il est question.

*F. oxysporum* est la seule espèce de ce genre à l'origine de colonies dont l'aspect morphologique est spécifiquement caractéristique de cette espèce, dispensant ainsi d'une analyse moléculaire. C'est sur ce constat que se base l'ANSES pour réaliser l'identification des échantillons de *Fusarium*.

Les résultats sont le fruit de l'analyse microbiologique effectuée au laboratoire LDA33 à Bordeaux suivant la clé d'identification fournie par l'ANSES. En parallèle, une analyse effectuée par l'ANSES, sur milieu DCPA et PDA, a permis de confirmer ces résultats.

Par ailleurs la confirmation du postulat de Koch prouvant le lien entre l'agent causal et les symptômes est établie. Grâce à ce Postulat, nous pouvons confirmer la relation de cause à effets entre la souche inoculée et les symptômes générés mais également la pureté de l'inoculum et l'efficacité de la méthode d'inoculation,

## Effets des microorganismes sur le développement des plantes

### Croissance des *Dipladenia*

Du fait de sa capacité à produire des lianes, le *Dipladenia* possède un développement très hétérogène. Le processus de taille réalisé en début d'essai a permis d'homogénéiser la hauteur des plants. Cette homogénéité est prouvée par l'absence de différences significatives de hauteur entre les modalités dès les premières semaines de culture.

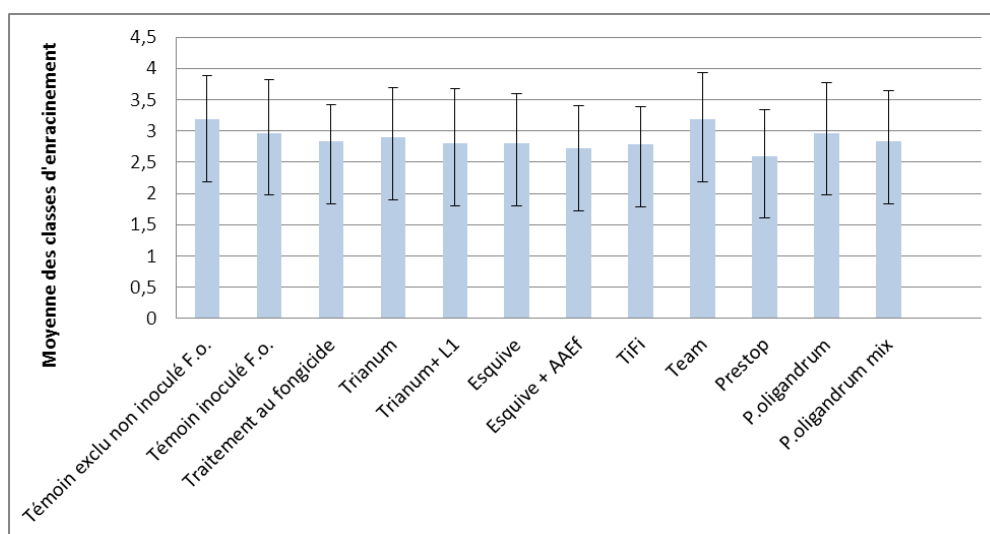
De façon générale, on constate que les micro-organismes antagonistes ne semblent pas avoir une influence notable sur le développement aérien des plants de *Dipladenia*. En effet, les hauteurs moyennes sont statistiquement homogènes quel que soit la semaine de notation. On note que toutes les modalités se retrouvent dans le même groupe statistique.

### Etat racinaire des *Dipladenia*

La croissance racinaire est relevée dès l'apparition des premières racines à la périphérie des mottes. Trois semaines après la mise en place de l'essai, la modalité contenant *Pythium oligandrum* se détache de manière positive. Elle contient un plus grand nombre de plantes recensées en classe 3 (la classe maximale à cette date) et pas de plantes en classe 0. Ces deux points sont gage du développement racinaire significativement plus avancé que dans les autres modalités. En contrepartie, à cette même date, cette modalité présentait des plants dont la hauteur était la plus faible. Les modalités « témoin non inoculé » et Esquive ont un système racinaire plus développé car les racines de toutes les plantes ont déjà émergé et il y a statistiquement plus de plants recensés en classe 2.

En revanche, l'appareil racinaire des plants des modalités Prestop est le moins développé, respectivement 14% des plants ne montrent pas encore de racines apparentes.

Deux mois après le repotage, le développement racinaire semble relativement homogène entre modalités, puis, la notation juste avant inoculation par le champignon tellurique *F.oxysporum* révèlent que toutes les plantes ont un système racinaire équivalent, aucune modalité ne se détache statistiquement du lot.



**Figure 2** : Etat racinaire des *Dipladénia* pour chaque modalité, deux mois après le repotage ( root state of *Dipladenia* for every modality)

## Suivi de la présence des micro-organismes de biocontrôle dans la rhizosphère

### Analyse microbiologique de la présence des champignons du genre *Trichoderma* (*Trianum*, *Esquive*, *Tifi*, *Team*)

Les analyses effectuées sur les modalités traitées avec un produit contenant différentes souches de *Trichoderma* permettent de révéler leur présence. Le tableau 1 résume le pourcentage d'explants de chaque modalité colonisés par une souche de *Trichoderma spp.*. Des champignons des genres *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* et *Mucor sp.* ont également été observés dans la plupart des modalités et pour les deux milieux de culture utilisés.

**Tableau 1 :** Pourcentage d'explants par modalité montrant une colonisation par *Trichoderma sp.* Sur milieux de culture (Percentage of explants /modalities showing a colonization by *Trichoderma sp.*)

| Produit | Témoin | <i>Trianum</i> - | <i>Trianum</i> -<br>+ L1 | <i>Esquive</i> + AAEf | TIFI  | <i>Team</i> |
|---------|--------|------------------|--------------------------|-----------------------|-------|-------------|
| %       | 13.3%  | 80%              | 66.7%                    | 100%                  | 73.3% | 86.7%       |

Ces analyses permettent de constater que les micro-organismes de biocontrôle du genre *Trichoderma*, inoculé en semaine 14, sont continuellement présents et actifs 3 mois après biotisation puisqu'ils sont capables de développer un important mycélium aérien *in vitro*.

### Analyse microbiologique de la présence de *Gliocladium catenulatum* (*Prestop*)

Les analyses effectuées n'ont pas permis de révéler la colonisation racinaire des *Dipladenia* par *G. catenulatum*. En effet, les colonies qui se développent autour des explants racinaires ne présentent pas les mêmes caractéristiques morphologiques que les colonies obtenues par mise en culture du produit brut.

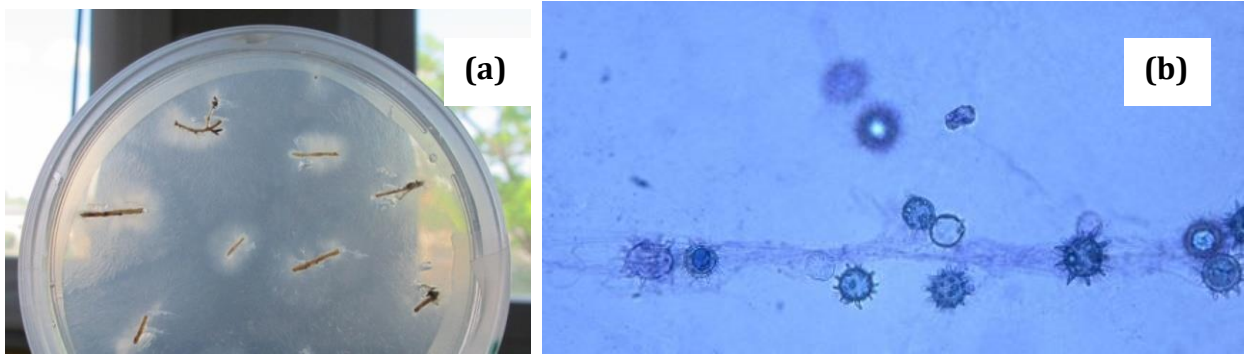
### Analyse microbiologique de la présence des endomycorhizes du genre *Rhizofagus sp.* (*Tifi*, *Team*)

Les étapes de coloration racinaires n'ont mis en évidence aucune endomycorhize pour les modalités analysées et possédant des *Rhizofagus sp.*

En 2012, seules très peu de racines révélaient la présence de *Glomus*, le taux de mycorhization est faible. Au vue de ces résultats il semble difficile de mettre en place une mycorhization du *Dipladenia* dans ces conditions expérimentales et environnementales. On peut également supposer que le *Dipladenia* est une plante peu réceptive à la mycorhization.

### Analyse microbiologique de la présence de *Pythium oligandrum*

Dans cette analyse, le pourcentage de colonisation racinaire par *P. oligandrum* est estimé par le pourcentage d'explants racinaires colonisés (cf. fig. 3). Les modalités testées sont le témoin ainsi que les deux modalités présentant des souches de *P. oligandrum*. Cinq semaines après leur biotisation, les deux modalités présentent le même pourcentage de colonisation racinaire par *P. oligandrum*. Seuls 30% des explants racinaires révèlent la présence de *P. oligandrum* et ce chiffre chute fortement dans les semaines qui suivent et est quasi nul avant inoculation. De ce fait, cette colonisation paraît insuffisante et une seconde inoculation est réalisée 1 jour avant l'inoculation par la souche de *F. oxysporum*. Ce court délai est tout de même suffisant pour permettre la pénétration et la colonisation racinaire par *P. oligandrum* (12h suffisent sur tomate). Lors de l'essai 2012, le pourcentage de colonisation était de 70%.



**Figure 3** : Confirmation de la présence de *P. oligandrum* par observation de l'émergence du mycélium rasant de *P. oligandrum* se développant sur CMAparp à partir d'explants racinaires (a) et observation microscopique des oospores (b)

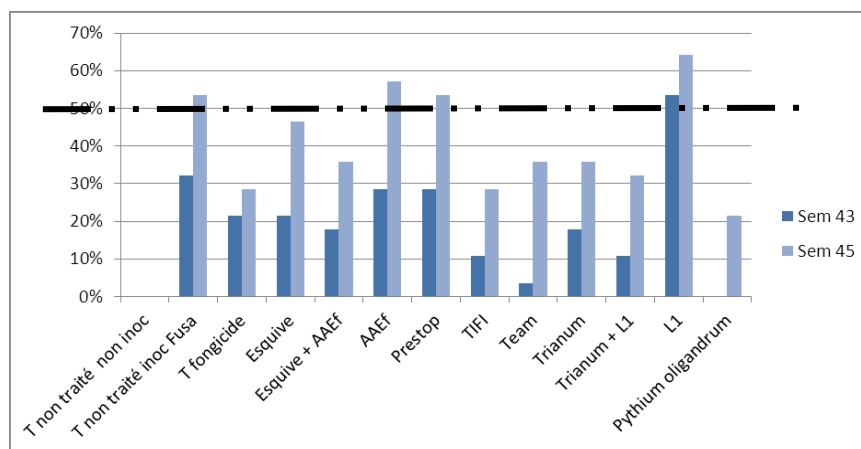
Des travaux de recherche ont été initiés en 2014 afin d'étudier la capacité qu'aurait *Pythium oligandrum* à s'installer durablement dans la rhizosphère des plants de *Dipladénia*. La colonisation dans le temps est suivie selon une approche (i) de microbiologie classique (réalisation d'isolement sur milieu de culture) et (ii) de biologie moléculaire (PCR quantitative). L'analyse par PCRq confirme les résultats obtenus sur les milieux de culture. D'une part, par la présence de l'oomycète tout au long de l'essai et d'autre part, par l'absence de différence significative entre les modalités où *P. oligandrum* est apporté mensuellement ou à concentration double.

#### Effets des microorganismes sur la contamination par *Fusarium oxysporum* : pourcentage de plantes contaminées après inoculation avec F. o.

##### Bilan protection 2012 :

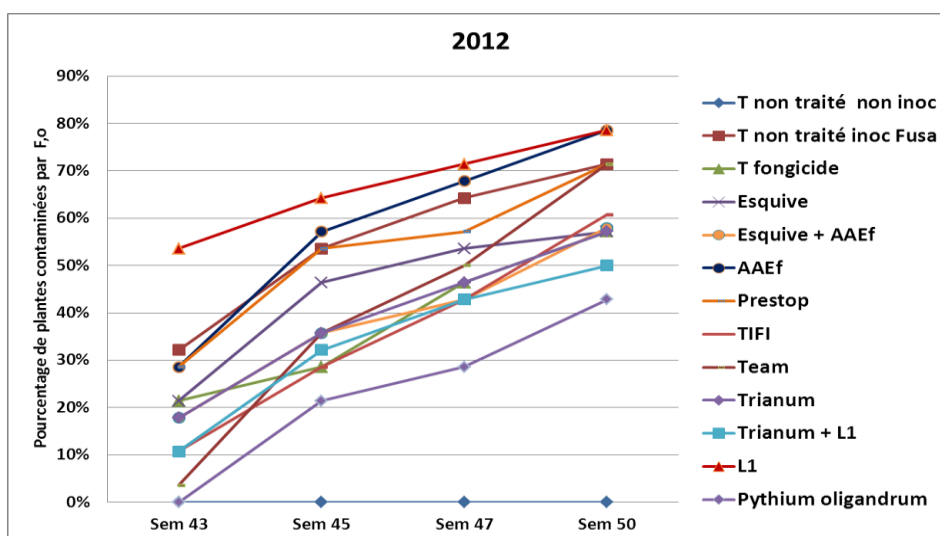
Dix-huit semaines après la mise en place de l'essai, les *Dipladenia* de chaque modalité excepté la modalité témoin exclu, sont inoculées avec la souche de *Fusarium oxysporum*. Deux inoculations avec F.o sont réalisées (sem. 32 et 36). Au bout de 3 semaines, on constate quelques plantes présentant des symptômes, notamment sur les modalités possédant le produit stimulateur, c'est-à-dire le produit L1 de Koppert et le produit AAEf d'Agrauxine.

En semaine 43, on atteint 50 % de plantes contaminées pour L1, alors que le témoin inoculé n'est qu'à 30%. En semaine 45, on commence à obtenir pour plusieurs modalités un taux de plantes contaminées supérieur à 50% (Figure 4)



**Figure 4** : Observation du nombre de *Dipladenia* contaminés en sem 43 et 45 (Observation of the number of *Dipladenia* contaminated (sem 43 and 45))

Les modalités exprimant le plus fort taux de plantes atteintes en comparaison avec le témoin inoculé sont avant tout, les modalités avec le produit « activateur/stimulateur » apporté seul dans le substrat, puis suivent les modalités avec *G. catenulatum* (Prestop) et la modalité avec *T. atroviride* (Esquive). Les autres modalités ont un pourcentage de plantes contaminées avoisinant 30%. La meilleure protection est obtenue avec le substrat biotisé avec *Pythium oligandrum*. En effet, il est intéressant de noter qu'en semaine 43 aucune plante n'exprime de symptômes de Fo et en semaine 45, on relève uniquement 20% de plantes mortes. Par ailleurs, on remarque que les microorganismes associés avec le produit stimulateur répondent mieux à l'infection que lorsque ces derniers sont inoculés seul dans le substrat. Ces résultats se confirment. En effet, les observations effectuées en semaine 47 et 50 (figure 5) montrent toujours une protection des Dipladenia contre Fo avec le substrat inoculé avec *Pythium oligandrum*. Plus de 50% des plantes sont indemnes de champignon pathogène. La contamination se produit progressivement par rapport aux autres modalités. Après, ce sont les modalités avec Trianum + L1, Esquive avec AAEf qui permettent d'obtenir un taux de contamination plus faible.



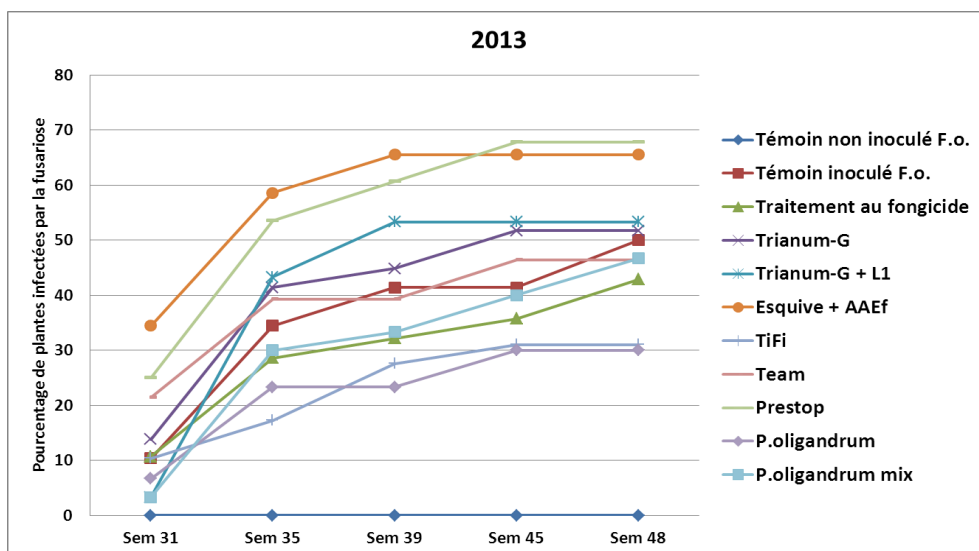
**Figure 5 :** Observation de la contamination des Dipladenia dans le temps (année 2012)  
(Observation of the contamination of Dipladenia (year 2012))

### Bilan protection 2013 :

La figure 6 montre qu'aucune des plantes de la modalité 'témoin exclu' ne présente de symptômes de fusariose. Ce constat permet d'exclure l'hypothèse que la simple blessure du système racinaire puisse être source du développement de la maladie. Par contre, le témoin inoculé par F.o. mais non traité et pour lequel on aurait dû avoir le plus de contaminations se révèle être moins contaminé que des plantes dont le substrat a été biotisé en préventif. Le témoin traité par fongicides apporte une légère amélioration vis-vis de la lutte contre la fusariose par rapport au témoin inoculé mais ce n'est pas la modalité la plus épargnée, d'autres traitements sont plus efficaces. L'augmentation du pourcentage de dépérissement est quasi-constante au cours du temps pour toutes les modalités excepté la modalité traitée au produit TIFI dont le pourcentage (17.2%) s'est stabilisé à partir de la semaine 32. La modalité avec *P. oligandrum* donne des résultats intéressants. Nous obtenons moins de 20% de plantes contaminées. En 2012 en fin d'essai, c'est cette modalité qui s'est révélée la plus efficace. Deux modalités sont nettement plus contaminées par la fusariose et se distinguent statistiquement. Ainsi, 6 semaines après l'inoculation plus de 50% des plants de ces modalités sont contaminés par la fusariose. Cela concerne les plants biotisés par les Esquive+AAEf et Prestop. En 2012, le cap des 50% de mortalité n'avait été atteint que 9 semaines après inoculation par *F.oxysporum*. A cette date, la modalité traitée par le produit Prestop faisait partie des modalités les plus touchées. A ces côtés, nous retrouvons les modalités traitées par les activateurs appliqués seul (L1 et AAEf). L'hypothèse émise était que la présence d'un microorganisme du type *Trichoderma* associé à l'activateur,

intervenait dans la compétition nutritive vis-à-vis de l'agent pathogène, alors qu'appliqués seuls, ces derniers agiraient en tant qu'activateur de l'agent pathogène.

Le taux de contamination général que nous constatons 6 semaines après inoculation est semblable au taux observé 9 semaines après l'inoculation en 2012. Néanmoins il faut signaler ici que les plantes qui avaient été inoculées en 2012, étaient plus âgées (un mois de plus que celles infectées en 2013) et disposaient de tiges beaucoup plus lignifiées avec un système racinaire plus dense, ce qui peut jouer sur la sensibilité des *Dipladenia* et leur réceptivité à l'inoculum.



**Figure 6 :** Observation de la contamination des *Dipladenia* dans le temps (année 2013)  
(Observation of the contamination of *Dipladenia* (year 2013))

Les observations menées jusqu'en semaine 48, donnent toujours la modalité Tifi (*T. atroviride*) et *P. oligandrum* comme étant les modalités qui permettent de mieux résister à la contamination par *F. oxysporum*.

## CONCLUSION

L'objectif de ce travail est de mettre en exergue l'effet des micro-organismes sur la protection des *Dipladenia* empotés dans un substrat adapté à la biotisation. Il nous paraît intéressant de voir l'effet bénéfique de cette biotisation dans un itinéraire de culture pour améliorer la production de plants sensibles à des champignons pathogènes du sol

Ce programme s'inscrit directement dans la recherche d'alternatives à la lutte chimique, cela nous amène donc à nous intéresser à des produits de lutte biologique qui peuvent supplanter voir être plus efficaces que les produits chimiques. En effet, certains d'entre eux sont amenés à éventuellement disparaître dans le cadre de l'action menée par le Plan Ecophyto visant à diminuer les intrants phytosanitaires. Dans ce cadre il est opportun de réfléchir dès aujourd'hui à de nouvelles stratégies de lutte qui intègrent des micro-organismes dont l'efficacité préventive permettrait de contenir la pression d'un pathogène. La compatibilité de certains de ces micro-organismes avec divers fongicides chimiques permettrait aussi au producteur de réaliser un traitement en cas de forte pression du pathogène.

Certains produits tels que *P. oligandrum*, Trianum+L1 (en 2012) ou encore TIFI, ont montré, à cette date, une efficacité non négligeable dans la lutte contre la fusariose du *Dipladenia*. Par ailleurs, l'adjonction de produits dits « activateur /stimulateur » de type L1 de chez Koppert et AAEf de chez Agrauxine permettent d'améliorer la protection lorsqu'ils sont associés avec certains microorganismes. Par contre ces produits incorporés seul semblent accélérer la contamination par le

champignon tellurique pathogène présent dans le substrat ou au niveau de la plante.

L'efficacité de ces produits de biocontrôle reste tout de même variable d'une année à l'autre. Cette variabilité est directement liée aux facteurs biotiques et abiotiques du milieu mais aussi à la « formulation » des produits, tous ces éléments influençant l'installation des microorganismes dans la rhizosphère. Les critères de culture, multiplication, préparation et application des microorganismes de biocontrôle sont autant de points qu'il est nécessaire de maîtriser dans le but de valoriser au mieux l'efficacité de ces agents de biocontrôle dans un pathosystème précis. C'est sur cela que portent les travaux de recherche et développement encore en cours pour certains produits.

De plus, l'approche moléculaire est un atout majeur dans l'étude de ce genre de système complexe puisqu'elle permettrait la quantification et le suivi des populations d'agents de biocontrôle dans la rhizosphère. Elle offre l'avantage de s'affranchir des méthodes traditionnelles que sont les techniques microscopiques et de microbiologie longues et fastidieuses.

Les résultats de ces trois années d'expérimentation sur *Dipladenia* s'ajoutent aux nombreuses études sur d'autres espèces végétales (vigne, tomate...) ayant révélé un réel intérêt des agents de biocontrôle dans la lutte contre divers organismes phytopathogènes. Les résultats encourageants obtenus en 2014 avec *P. oligandrum* sur *Dipladenia* nous conduisent à poursuivre les recherches et d'autres pathosystèmes sont explorés et notamment le couple « *Lavandula/Phytophthora* »

## BIBLIOGRAPHIE

**Benitez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC** (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7, pp.249-260

**Damoiseau L** (2012) Lucerne, plaque tournante du biocontrôle. *Phytoma- La défense des végétaux* 652: 14-16

**Darles B.** (2013), Évaluation de l'efficacité de différents produits de biocontrôle, pour lutter contre la fusariose du *Dipladenia*. Rapport de stage, « Bio ingénierie » option Biotechnologie végétales, Université Paul Sabatier, Toulouse, 35 p.

**Decoin M.** (2014). Produits de biocontrôle et évolution des lois. *Phytoma*, n°672, pp. 16-23.

**Deogratias JM.** (2012) Mycorhization et micro-organismes : leurs rôles dans la biotisation des substrats en pépinière ornementale. GIE FPSO Journées techniques Astredhor.

**Fravel D** (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:337-59

**Fravel D, Olivain C and Alabouvette C** (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157: 493-502.

**Gerbore J., Benhamou N., Vallance J., Le Floch G., Grizard D., Regnault-Roger C. and Rey P.** (2013). Biological control of plants pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ Science Pollution Research*, pp. 25-35.

**Howell CR** (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Diseases* 87, pp.4-10

**Massot M.** (2011). Lutte Biologique contre les pathologies affectant les parties aériennes de la vigne par utilisation de l'oomycète, *Pythium oligandrum*. Mémoire, ENITA de Bordeaux, Bordeaux, 77 p.

**Rafferty S.M.; Murphy J.C., Cassells,A.C.,** (2004) -Biofunctional composts and biotization. *Acta horticulturae*: 631; 243-251.