

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

**INTRODUCTION D'UNE SOLUTION DE BIO-CONTROLE EN MELANGE AVEC UN FONGICIDE A BASE DE
PICOXYSTROBINE POUR LE CONTROLE DE LA SCLEROTINIOSE DU COLZA**

C. PIEKACZ ⁽¹⁾, E. HINH ⁽¹⁾, J.-M. SAUREL ⁽¹⁾

⁽¹⁾ DuPont Solutions, Défense Plaza, 23/25 rue Delarivière Lefoullon, 92800 Puteaux, FRANCE

RÉSUMÉ

La sclérotiniose est une maladie potentiellement très préjudiciable pour la culture du colza. La lutte contre ce pathogène passe par des traitements systématiques positionnés en préventif. A l'heure actuelle, aucune solution de bio-contrôle en végétation n'est disponible pour les producteurs, alors que leurs attentes et celles de toute la filière sont fortes sur cette culture.

DuPont a développé une solution fongicide innovante, à base d'un micro-organisme, la souche QST2808 de *Bacillus pumilus*. Celle-ci est autorisée pour l'usage « Crucifères oléagineuses * Traitement des Parties Aériennes * Sclérotiniose » sous le nom commercial BALLAD^{®1}. Les premiers usages s'effectueront dès le printemps 2015.

L'avantage principal porte sur le fait qu'il est proposé en association avec une demi-dose d'un fongicide à base de picoxystrobine (ACAPELA[®] 250SC) pour la lutte contre la sclérotiniose permettant ainsi de répondre aux objectifs de lutte intégrée, en limitant le recours aux seules solutions de synthèse. De plus, la combinaison de ces deux modes d'actions différents garantira à la fois une haute performance et la durabilité de la solution proposée sous le nom de ACAPELA[®] SOFT CONTROL[™].

Cette alliance d'un micro-organisme et d'un fongicide de synthèse apportera ainsi tous les bénéfices d'une solution de bio-contrôle, et sans concession sur les fondamentaux agronomiques.

Cette association offre un potentiel de développement important du bio-contrôle sur cette culture. En effet, sa mise en œuvre ne modifie pas les pratiques d'application et assure le niveau de performance attendu par les producteurs pour aujourd'hui et pour le futur.

Mots-clés : Bio-contrôle ; Micro-organismes ; *Sclerotinia sclerotiorum* ; Fongicides ; Lutte intégrée.

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum may be very harmful to oilseed rape crop. In practice, the protection against this disease is done only preventively. Currently, no foliar bio-control solution is proposed to the farmers, despite their expectations on this crop.

DuPont has developed a brand new fungicide containing a microorganism, *Bacillus pumilus* strain QST2808. This product is now authorized for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape under the commercial name BALLAD^{®1}. The first applications will be done in spring 2015.

The main advantage for the farmers is that it is presented as a unique association, combining half rate of a conventional fungicide containing picoxystrobin (ACAPELA[®] 250SC) and this biofungicide for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. This combination is in line with the integrated pest management objectives and limit the use of synthesis based pesticides. In addition, the association of two different modes of action will provide a high level of performance and the product's sustainability under the ACAPELA[®] SOFT CONTROL[™] commercial name.

This alliance of a microorganism and a synthetic fungicide will bring all the benefits from the use of a bio-control solution without any concession on the agronomical aspects.

This association will bring a huge opportunity to develop significantly the bio-control solutions on this rotational crop. Indeed, the use of such an innovation will not change the spraying practices and will ensure the farmers that they will reach the level of desired performance, today and tomorrow.

Keywords: Bio-control ; Microorganisms ; *Sclerotinia sclerotiorum* ; Fungicides ; Integrated Pest Management.

^{®1} Marque déposée Bayer

[®] Marque déposée DuPont

INTRODUCTION

La sclérotiniose est l'une des principales maladies du colza. Sa nuisibilité diffère selon les intensités d'attaque et peut engendrer d'importantes pertes de production allant jusqu'à plus de 10 q/ha (Allard et al; 2002). D'autres sources citent des cas pouvant aller jusqu'à 19 q/ha (CETIOM : site Internet).

La contamination du colza par *S. sclerotiorum* résulte d'une succession d'étapes qui débute par la germination des sclérotés. Dans le cycle épidémiologique de cette maladie, la germination des spores sur les pétales est une étape déterminante. En tombant sur les feuilles, les pétales contaminés vont permettre le passage de la maladie aux organes foliaires et ensuite aux tiges (Jamaux et Lamarque, 1995).

A ce jour, le positionnement des traitements fongicides en végétation contre *S. sclerotiorum* s'effectue de façon préventive. En pratique, la protection doit s'effectuer au stade G1 ou BBCH65 (chute des premiers pétales) qui a pour but d'une part de bloquer la germination des spores puis le développement mycélien sur les pétales et d'autre part de protéger les feuilles afin d'éviter le passage de la maladie sur celles-ci.

Des études préliminaires au laboratoire ont été conduites afin de démontrer l'activité fongicide intrinsèque de *Bacillus pumilus*. En effet, *B. pumilus* produit des métabolites capables de perturber le métabolisme des cellules et de détruire leurs parois.

S'appuyant sur la microscopie fonctionnelle à épifluorescence, l'étude avait pour objectif de mettre en évidence le mode d'action de BALLAD®⁽¹⁾ ainsi que sa complémentarité d'action avec ACAPELA® 250 SC dans le contrôle de *S. sclerotiorum*.

Dans le même temps, entre 2010 et 2014, 25 essais d'efficacité au champ ont été conduits et ont permis de mettre en évidence l'efficacité de BALLAD®¹, et de confirmer la performance en pratique du mélange avec ACAPELA® 250 SC sur la sclérotiniose du colza.

Enfin, des tests pratiques en grandes parcelles ont été conduits en 2014 et valident le concept auprès des agriculteurs qui se sont montrés très satisfaits des performances en comparaison avec leurs programmes conventionnels.

MATERIELS ET METHODES

• ETUDE EN LABORATOIRE

Préparation de la souche de *Sclerotinia sclerotiorum*

Une souche de *Sclerotinia Sclerotiorum* (Scl 54-1S) est cultivée sur milieu Malt-Agar (MA : Malt 15g/L et Agar 15 g/L) pendant 6 jours à 20°C. Un implant de 5mm de diamètre est ensuite prélevé et mis en culture sur lame de verre gélosée (500µl de milieu MA étalé au râteau). Les lames sont incubées 24h à 20°C en humidité saturante dans des boîtes de Petri avant leur mise en contact avec les fongicides.

Préparation des fongicides

Les deux produits utilisés sont BALLAD®¹ contenant 10⁹cfu/g de *Bacillus pumilus* (1.38 % de m.a./L) et ACAPELA® 250 SC (250g/l de picoxystrobine).

Des membranes de cellophane stérilisées par autoclavage sont déposées sur des lames de verre et recouverte de 500µl de milieu MA. Ces membranes de cellophane gélosées sont ensuite recouvertes avec 250µl d'eau distillée stérile (Témoin) ou de BALLAD®¹ dilué au 1/100 ou de picoxystrobine à 5µg/ml ou d'un mélange de ces deux produits aux doses indiquées précédemment. Les membranes sont ensuite incubées 24h à 25°C en humidité saturante dans des boîtes de Petri avant leur mise en contact avec *S. sclerotiorum*.

®¹ Marque déposée Bayer

® Marque déposée DuPont

Modèle expérimental

Après 24h d'incubation, *S. sclerotiorum* s'est développé et a formé une colonie mycélienne d'environ 1cm de diamètre autour de l'implant. Ce dernier est retiré, puis les membranes de cellophane gélées et traitées (Témoin eau, BALLAD^{®1}, ACAPELA[®] 250 SC ou BALLAD^{®1} + ACAPELA[®] 250 SC) sont déposées à la surface de la culture de *S. sclerotiorum*, de manière à ce qu'il n'y ait jamais de contact direct entre le BALLAD^{®1} et le mycélium de *S. sclerotiorum*. L'ensemble est ensuite incubé 2 jours à 20°C avant marquage et observation.

Marquages et observations

Les membranes de cellophane sont délicatement retirées et la culture de *S. sclerotiorum* présente sur la lame est incubée 15 minutes en présence d'un fluorochrome de mortalité (dépôt de brevet en cours, longueur d'onde d'émission : 617nm). Ce fluorochrome rouge marque spécifiquement les cellules mortes dont les membranes sont devenues perméables (Haugland, 1996). Les lames sont ensuite rincées et incubées 2 minutes en présence d'un fluorochrome de viabilité (dépôt de brevet en cours) avant observation. Le fluorochrome de viabilité diffuse facilement dans les cellules où il va être transformé en une molécule fluorescente verte (émission à 521nm) sous l'action du métabolisme cytoplasmique (Ormerod, 1990).

Après marquage, les lames sont observées et photographiées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (microscope 50i, Nikon) équipée d'une caméra CCD.

• ETUDE EN PLEIN CHAMP

L'efficacité de BALLAD^{®1} sur la sclérotiniose du colza appliqué seul ou en mélange avec ACAPELA[®] 250 SC a été testée dans le cadre d'un réseau d'essais principalement français mais qui inclut également quelques essais réalisés en Europe.

Entre 2010 et 2014, 25 essais ont présentés un niveau d'attaque suffisant et un comportement des références conformes aux attentes permettant ainsi de les valider. Ces essais se répartissent comme indiqué dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I : Répartition des essais au champ réalisés en France et en Europe entre 2010 et 2014.

Table I: Distribution of field trials carried out in France and Europe between 2010 and 2014.

Localisation	Années					Total
	2010	2011	2012	2013	2014	
<i>France</i>	1	1	2	9	6	19
<i>Allemagne</i>	-	-	1	1	-	2
<i>Pologne</i>	-	-	2	1	1	4
<i>République-Tchèque</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Angleterre</i>	-	-	-	-	-	-
Total	1	1	5	11	7	25

Dispositif expérimental

Les études ont été réalisées conformément à la méthode CEB n°220 pour tous les essais. Les variables observées sont la fréquence de tiges atteintes (25 tiges notées au minimum par parcelle élémentaire) et le rendement en q/ha.

^{®1} Marque déposée Bayer

[®] Marque déposée DuPont

Produits, doses, et application

La préparation de référence utilisée PICTOR PRO (boscalid 500g s.a./kg) utilisée à la dose de 0,5 kg/Ha. L'application est réalisée à l'aide d'un pulvérisateur à jet projeté avec un volume de bouillie compris entre 150 et 300 l/ha et une pression de 2 à 4 bars. Une seule application est réalisée à la chute des premiers pétales (G1) ou BBCH65.

• ETUDE EN GRANDES PARCELLES

Le dispositif retenu a été celui des parcelles couples qui permet de comparer deux solutions entre elles, en situation pratique, dans des conditions agronomiques et climatiques parfaitement identiques.

Les agriculteurs testeurs ont mis en place sur leurs exploitations, sur de grandes parcelles de colza, une bande de 10 ha de la solution ACAPELA® SOFT CONTROL™ en comparaison à leur programme conventionnel habituel. Les applications ont été mises en œuvre selon leurs pratiques habituellement utilisées.

Toutes les situations de pression parasitaire étaient représentées allant d'une faible infestation (inférieure à 10%) jusqu'à de fortes pressions (supérieures à 30%).

Une zone témoin non traitée a été systématiquement laissée afin de déterminer le niveau d'attaque par la sclérotiniose sur la parcelle considérée.

Ces 93 parcelles couples ont été implantées sur l'ensemble du territoire français dans les principaux bassins de production représentatifs de la sole de colza.

A l'issue des tests, des mesures de rendement ont pu être effectuées sur 74% des parcelles. Les pesées ont été réalisées soit à l'aide du système de pesée embarquée sur la moissonneuse-batteuse, soit par pesage séparé des 2 parties des parcelles couples.

®¹ Marque déposée Bayer

® Marque déposée DuPont

RESULTATS

ETUDE EN LABORATOIRE

Les doses de produits utilisées dans cette étude ont été choisies lors d'une pré-étude de manière à provoquer des perturbations de croissance de l'agent pathogène mais non une mort complète. Cette approche permet de mettre en évidence des différences dans les effets des produits testés. On observe ainsi une réduction mais non un arrêt de croissance de la colonie mycélienne quel que soit le produit utilisé en comparaison avec le Témoin (résultats non présentés).

Les observations en microscopie à épifluorescence montrent que *S. sclerotiorum* cultivé en absence de produit (Témoin eau) présente un mycélium dont les hyphes présentent une forte activité métabolique (marquage vert très intense) et une absence de mortalité (Figure 1A).

Les hyphes traités avec ACAPELA® 250 SC ne présentent pas de modification morphologique par rapport au Témoin. En revanche, l'activité métabolique est fortement réduite comme le révèle le marquage vert extrêmement faible voir absent (Figure 1B). Malgré cette réduction d'activité, aucun marquage rouge de mortalité n'est observable avec la picoxystrobine utilisée à une dose sub-optimale de 5 µg/ml (Figure 1B).

Le traitement indirect avec BALLAD®¹ à la dose de 1/100 provoque quelques modifications morphologiques des hyphes, et surtout provoque la présence à l'extrémité de certains hyphes d'amas en rouge (Figure 1C). Ces amas correspondent au relargage vers l'extérieur du contenu cellulaire des hyphes dû à la rupture des parois et des membranes. Il faut noter que certains hyphes sont encore bien vivants et intacts comme le montre leur marquage vert intense, mais la majorité des hyphes sont morts ou en train de mourir (marquage rouge) et présentent des ruptures de parois et membranes (Figure 1C).

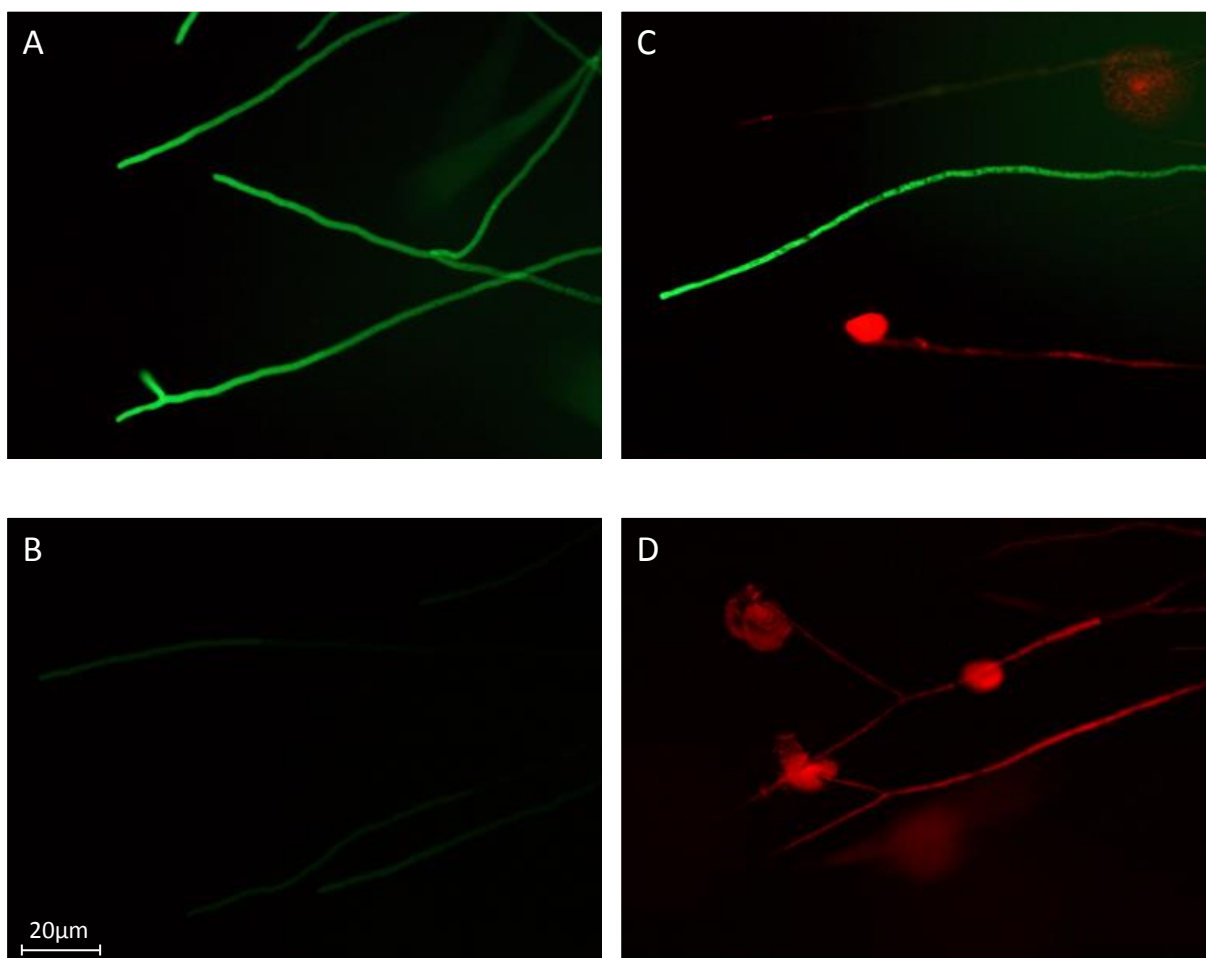
Le mélange de ACAPELA® 250 SC (picoxystrobine à 5 µg/ml) et de BALLAD®¹ au 1/100 provoque des symptômes comparables à ceux observés avec BALLAD®¹ utilisé seul au 1/100. La majorité des hyphes présentent un marquage rouge de mortalité (Figure 1D). Enfin de nombreuses ruptures de parois et membranes avec libération du contenu cellulaire sont observables (Figure 1D).

^{®1} Marque déposée Bayer

[®] Marque déposée DuPont

Figure 1 : Visualisation en microscopie à épifluorescence de l'activité métabolique (fluorochrome vert plus ou moins intense selon le niveau d'activité) et de la mortalité (fluorochrome rouge) des hyphes de *S. sclerotiorum* traités de manière indirecte avec de l'eau (A), du BALLAD^{®1} (B), de ACAPELA[®] 250 SC (C) ou le mélange de BALLAD^{®1} et de ACAPELA[®] 250 SC (D) .

Figure 1 : Visualization with fluorescence microscopy of the metabolic activity (green fluorescence more or less intense according to the level of activity) and of mortality (red fluorescence) of *S. sclerotiorum* hyphae treated in an indirect way with water (A), BALLAD^{®1} (B), ACAPELA[®] 250 SC (C) or a mixture of BALLAD^{®1} and ACAPELA[®] 250 SC (D).



^{®1} Marque déposée Bayer

[®] Marque déposée DuPont

ETUDE EN PLEIN CHAMP

L'efficacité de BALLAD^{®1} sur la sclérotiniose du colza appliqué seul ou en mélange avec ACAPELA[®] 250 SC a été testée dans le cadre d'un réseau de 25 essais réalisés entre 2010 et 2014.

Dans ces 25 essais, la fréquence moyenne d'attaque dans les témoins est de 22.3% pour l'ensemble de ces essais.

BALLAD^{®1} à la dose de 2L/ha présente une fréquence d'attaque réduite à 16.6% démontrant ainsi son activité au champ.

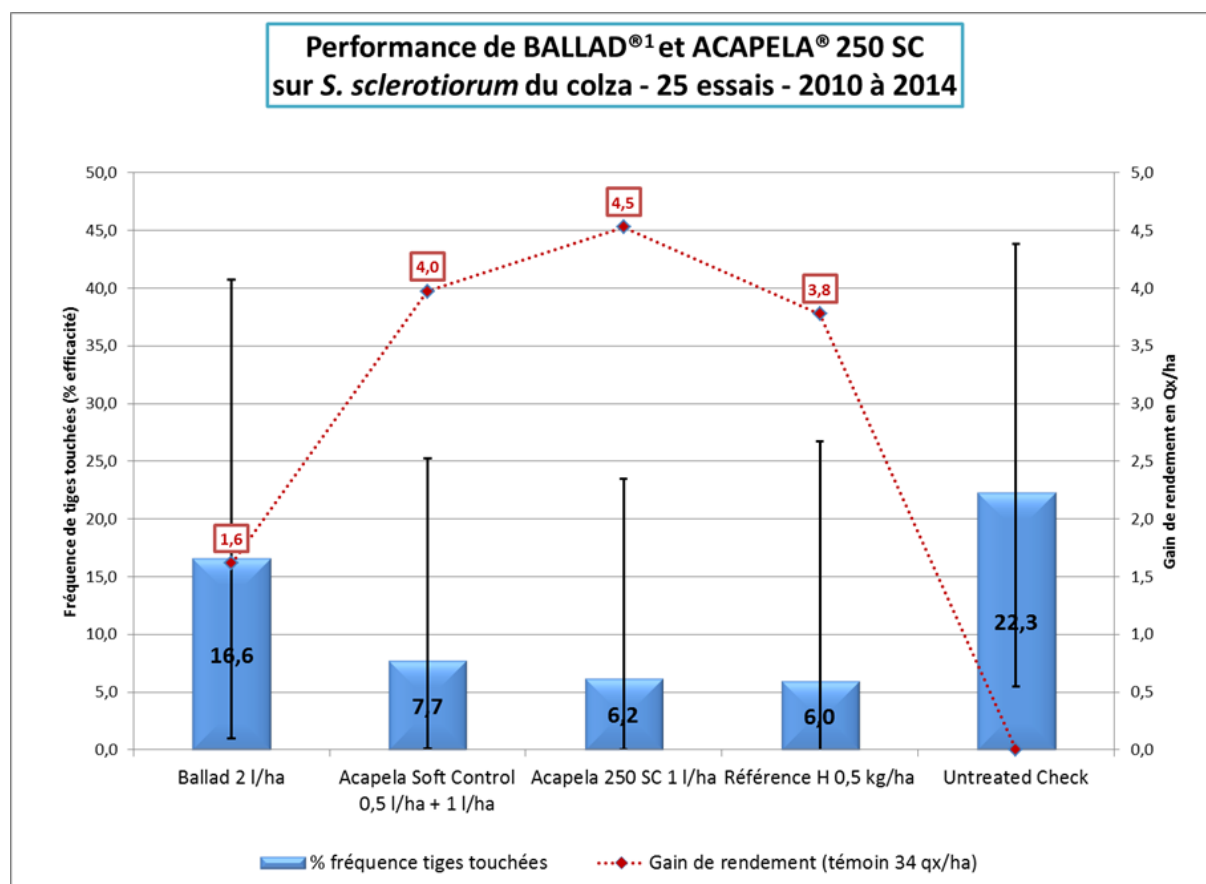
ACAPELA[®] 250 SC à la dose de 1 L/ha présente une fréquence de 6.2% équivalent à celle de la référence (6%),.

Lorsque l'on associe une demi-dose de BALLAD^{®1} à une demi-dose d'ACAPELA[®] 250 SC (ACAPELA[®] SOFT CONTROL[™]), on observe une fréquence de 7.7%. Cette association permet donc d'obtenir une efficacité et une régularité de performance comparable à celle obtenue avec les fongicides de synthèse appliqués à dose pleine.

Le rendement obtenu avec BALLAD^{®1} à 2 L/ha est supérieur de 5% (+1.6 q) par rapport au témoin non traité tandis que celui obtenu avec ACAPELA[®] 250 SC à 1 l/ha est lui supérieur de 13% (+4.5 q), équivalent à la parcelle référence (+3.8 q). Le mélange ACAPELA[®] 250 SC (0.5 L/ha) + BALLAD^{®1} (1 L/ha) se situant au même niveau avec un gain de 12% (+4 q).

Figure 2: Efficacité et rendement sur *S. sclerotiorum* du colza (25 essais)

Figure 2 : Field performance and yield after *S. sclerotiorum* control on oilseed rape (25 trials)



^{®1} Marque déposée Bayer

[®] Marque déposée DuPont

GRANDES PARCELLES

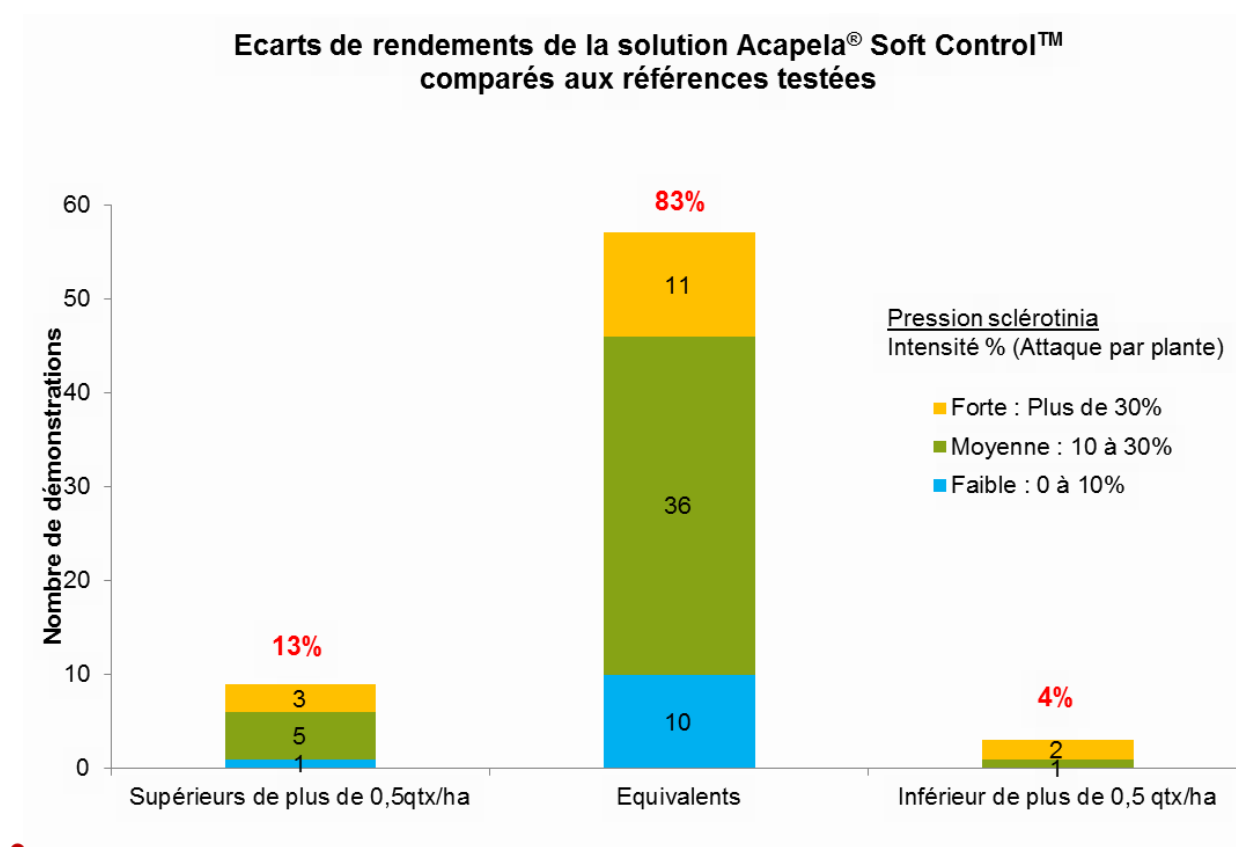
En 2014, pour valider les résultats obtenus dans les réseaux d'expérimentation en petites parcelles, DuPont a réalisé 93 tests en grandeur réelle représentant 930 Ha chez des producteurs de colza en France.

Sur les 69 grandes parcelles qui ont été récoltées et pesées séparément, les différences s'expriment à partir d'un écart supérieur ou inférieur à 0.5 q/ha par rapport à la solution conventionnelle:

- Dans 83% des cas, ACAPELA® SOFT CONTROL™ a été équivalent à la solution de protection conventionnelle,
- Dans 13% des cas, la récolte a été supérieure,
- Et seulement dans 4% des cas, la récolte s'est avérée inférieure.

Figure 3: Ecart de rendement sur les tests en grandes parcelles de colza de ACAPELA® SOFT CONTROL™ en comparaison aux programmes agriculteurs (69 tests)

Figure 3: Yield difference in the large oilseed rape plots tests for ACAPELA® SOFT CONTROL™ in comparison with the farmers programs (69 tests)



®¹ Marque déposée Bayer

® Marque déposée DuPont

DISCUSSION

L'activité fongicide de BALLAD^{®1} a été au préalable démontrée au laboratoire puis dans les essais au champ. Cette activité a été reconnue par une AMM en tant que fongicide pour lutter contre la sclérotiniose du colza. Cependant, sa performance pouvant présenter une variabilité significative, il est nécessaire de l'associer à un fongicide conventionnel afin d'assurer une bonne maîtrise du risque « sclérotiniose ». BALLAD^{®1} doit être utilisé à la dose de 1L/ha minimum en mélange avec ACAPELA[®] 250 SC (contenant 250 g/L de picoxystrobine – A.M.M. N° 9900206) à 0.5L/ha minimum. Cette association présente alors un niveau de protection du rendement équivalent aux solutions conventionnelles testées.

De plus, en proposant deux modes d'action différents et efficaces sur la sclérotiniose, l'association diminue et retarde le risque d'apparition de résistance. Il s'agit, pour la picoxystrobine, d'un mode d'action aujourd'hui peu utilisé sur colza, et totalement nouveau pour *Bacillus pumilus*. Le développement de cette solution répond donc aux principes de durabilité, et contribue à la diversité des solutions disponibles pour la protection du colza.

Un point clé du développement des solutions de bio-contrôle auprès des producteurs, est l'acceptabilité pour eux de ces nouvelles voies de protection des plantes. Les principes de l'agriculture intégrée doivent être présentés, expliqués, faciles à mettre en œuvre et acceptables sur le plan de la performance afin d'être adoptés par les acteurs de la filière. Pour ce faire, nous avons voulu connaître l'avis de ces 93 premiers utilisateurs.

Les grands enjeux pour l'agriculture qu'ils citent spontanément sont le maintien d'une agriculture performante (100% des répondants), la poursuite de l'innovation (86%), l'amélioration de l'image de l'agriculture (65%) et des questions d'ordre environnemental (50%).

Sur la solution elle-même, la praticité de mise en œuvre et le fait de ne pas changer les habitudes sont particulièrement appréciés.

Au vu des résultats de rendement et de l'intérêt en tant qu'outil de protection intégrée, la très grande majorité d'entre eux est convaincue et prête à utiliser cette solution dès 2015.

CONCLUSION

Le colza est une culture majeure en Europe, portée par un déficit structurel en protéines, et une utilisation massive de son huile en tant que biocarburant. Elle est soumise à de nombreux bio-agresseurs qui exigent un niveau de protection important, adapté à la préservation de son potentiel de rendement.

La sclérotiniose est la maladie principale du colza. Sa protection, en l'absence d'outils de pilotage pratique, passe par des traitements systématiques au stade G1 ou BBCH65. Il n'existe pas à ce jour de fongicide issu du bio-contrôle disponible pour cette protection en végétation.

ACAPELA[®] SOFT CONTROL[™], en associant un fongicide issu du bio-contrôle, BALLAD^{®1}, et un fongicide de synthèse utilisé à demi-dose d'homologation, ACAPELA[®] 250 SC, est la première proposition de lutte intégrée disponible pour les agriculteurs et la filière du colza. Les premiers usages auront lieu au printemps 2015. Elle introduit le bio-contrôle dans la réalité du marché, en le proposant non en alternative aux solutions de synthèse, mais en partenariat d'un processus de protection raisonné du rendement ayant recours à l'ensemble des outils disponibles.

ACAPELA[®] SOFT CONTROL[™] n'exige pas de la part des utilisateurs de faire des concessions sur les fondamentaux de la protection, en assurant un niveau de performance en phase avec les attentes du

^{®1} Marque déposée Bayer

[®] Marque déposée DuPont

marché. Sa logistique simple, sa mise en œuvre aisée permettent aux utilisateurs de ne pas changer leurs pratiques de protection. C'est l'un des points qui permettra une vulgarisation et une utilisation large de cette première solution de protection intégrée sur colza.

ACAPELA® SOFT CONTROL™ est un exemple de solutions de protection intégrées des plantes.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier, pour leur implication et leur apport dans les phases de développement de ce projet :

- Le CETIOM, pour ses travaux au champ et en serre.
- La société BIOtransfer, pour ses travaux en vue de déterminer et prouver le mode d'action de *Bacillus pumillus* souche QST 2008 sur la sclérotiniose du colza.
- Les 93 agriculteurs ayant pris part aux tests en plein champ.

BIBLIOGRAPHIE

- Allard L.M., Brun H., Jouffret P, Lagarde F., Penaud A., Pinochet X., Simonin P., Taverne M. 2002 – Les maladies du colza. In *Points techniques du Cetiom* 59 -68.
- Jamaux I, Lamarque C. 1995 – Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. *Plant Pathol.* 44, 22-30.
- Savchk S., Fernando D.W.G, 2004 – Effect of timing of application and population dynamics on the degree of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by bacterial antagonists. *FEMS Microbiology Ecology* 49 : 379-388.
- Haugland, R. P., 1996. *Handbook of Fluorescent Probes*. Molecular Probes Inc., Eugene, OR.
- Ormerod, M. G., 1990. *Flow Cytometry: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford.