

**Recherche et développement de biopesticides et pesticides naturels à faible toxicité pour les organismes non ciblés et respectueux de l'environnement –**

**Rapport final – Volet Phytopathologie**

**Projet PARDE # 3333.52.02.01**

*Présenté au*

**Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (MDDEP)**

*Présenté par*

**Horti-Protection inc.  
Johanne Caron, M.Sc. & Lucie Laverdière, tech.**

**Université Laval  
Joëlle Venne, agr.  
Richard Bélanger, Ph.D.,**

**2006**

---

---

LES CONCLUSIONS ET OPINIONS FORMULÉES DANS CE RAPPORT SONT CELLES DES CHERCHEURS ET CHERCHEURES IMPLIQUÉS. ELLES NE CONSTITUENT EN RIEN UNE PRISE DE POSITION DU MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, DE L'ENVIRONNEMENT ET DES PARCS DU QUÉBEC

---

## Table des matières

<b>1. LISTE DES INTERVENANTS</b> .....	<b>21</b>
<b>2. LA PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE</b> .....	<b>23</b>
<b>LE MARCHÉ DES BIOPESTICIDES</b> .....	<b>24</b>
<b>OBJECTIFS DE RECHERCHE</b> .....	<b>24</b>
<b>3. PHASE 1 – R&amp;D EN LABORATOIRE ET MISE À L'ÉCHELLE</b> .....	<b>26</b>
<b>4. ÉTAPE 1 – SÉLECTION DES BIOPESTICIDES</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1.1 Activité 1 - Revue de littérature sur les biofongicides</b> .....	<b>26</b>
Définition.....	26
Avantages et inconvénients .....	26
Les biofongicides en milieu serricole.....	27
Introduction .....	27
Historique et diversité des produits .....	27
État de la situation au Canada .....	29
Recherche, développement.....	29
<b>CANDIDATS PROMETTEURS</b> .....	<b>29</b>
<b><i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> MAUL-20</b> .....	<b>30</b>
Introduction .....	30
Description du produit.....	30
Mode d'action et principe actif.....	33
Compétition et mycoparasitisme.....	33
Antibiose .....	33
Spectre d'activité.....	34
Compatibilité.....	34
Tests d'efficacité en laboratoire et/ou en serre.....	37
Marché et Production .....	45
Conclusions et potentiels de <i>Trichoderma harzianum</i> MAUL-20 .....	46
<b>RÉFÉRENCES <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> MAUL-20</b> .....	<b>48</b>
<b>SPORODEX® (<i>PSEUDOZYMA FLOCCULOSA</i>)</b> .....	<b>53</b>
Introduction .....	53
Description du produit.....	53
Mode d'action et principe actif.....	55
Spectre d'activité.....	56

Compatibilité.....	56
Tests d'efficacité en serre.....	57
Marché et Production .....	58
Conclusions et potentiels de SPORODEX 1.....	59
<b>RÉFÉRENCES SPORODEX.....</b>	<b>60</b>
<b>ROOTSHIELD® (TRICHODERMA HARZIANUM KRL-AG2) .....</b>	<b>62</b>
Description du produit.....	62
mode d'action et Principe actif.....	63
spectre d'activité.....	64
Compatibilité.....	65
tests d'Efficacité en serre.....	67
Marché et Production .....	72
<b>RÉFÉRENCES ROOTSHIELD® .....</b>	<b>73</b>
<b>SERENADE® (BACILLUS SUBTILIS) .....</b>	<b>76</b>
Description du produit.....	76
mode d'action et Principe actif.....	76
Spectre d'activité.....	77
Compatibilité.....	78
Tests d'efficacité .....	78
Marché et Production .....	81
<b>RÉFÉRENCES SERENADE® .....</b>	<b>82</b>
<b>PRESTOP® (GLIOCLADIUM CATENULATUM J1446) .....</b>	<b>83</b>
Description du produit.....	83
mode d'action et Principe actif.....	83
Spectre d'activité.....	84
Compatibilité.....	84
Tests d'Efficacité.....	84
Marché et Production .....	86
<b>RÉFÉRENCES PRESTOP®.....</b>	<b>87</b>
conclusions .....	89
<b>RÉFÉRENCES GÉNÉRALES .....</b>	<b>90</b>
<b>4.1.2 ACTIVITÉ 2. MISE À L'ÉCHELLE.....</b>	<b>92</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>92</b>
Productions chez AEF Global à St-Hyacinthe .....	92

Productions chez Lallemand à Montréal .....	92
Productions chez CWBI en Belgique .....	92
Productions chez CREFSIP à l'Université Laval .....	92
Durée de conservation du biofongicide Sporodex.....	92
<b>4.1.3 ACTIVITÉ 3. FORMULATION DE SPORODEX ET MAUL-20.....</b>	<b>93</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR SPORODEX .....</b>	<b>93</b>
Évaluation de la matière sèche .....	93
Évaluation du nombre de conidies, d'hyphes et du pourcentage de sporulation par le compte à l'hémacymètre .....	93
Dénombrement des UFC (Unité Formatrice de Colonie) sur un milieu gélosé ou « surface count » .	93
Réalisation d'une courbe de croissance.....	93
Évaluation de la compatibilité de <i>Pseudozyma flocculosa</i> avec différents surfactants .....	93
Courbe de croissance de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM0.5P0.5D.....	94
Courbe de croissance de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM1,5PD.....	94
Courbe de croissance de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM1,5P1,5D.....	94
Importance du type de mélasse et de la source d'acide - essai 1 .....	95
Importance du type de mélasse et de la source d'acide - essai 2.....	95
Influence du pH et de la concentration de l'inoculum.....	95
Importance du type d'extrait de levure sur la croissance de <i>Pseudozyma flocculosa</i> .....	96
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR MAUL-20 .....</b>	<b>97</b>
Amélioration des qualités nutritionnelles du milieu de culture utilisé pour multiplier <i>Trichoderma harzianum</i> MAUL-20.....	97
Effet de la cellulose et du sucrose .....	97
Effet de la thiamine ou du fer.....	98
Production à grande échelle de <i>Trichoderma harzianum</i> MAUL-20.....	98
<b>4.1.4 ACTIVITÉ 4. Compatibilité avec les pesticides chimiques et auxiliaires de lutte .....</b>	<b>100</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR L'Effet des pesticides sur la germination et survie de <i>Trichoderma</i> MAUL-20.....</b>	<b>100</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR L'Effet de <i>Trichoderma</i> MAUL-20 sur le développement et survie des insectes prédateurs et parasitoïdes.....</b>	<b>101</b>
Matériel entomologique .....	101
Matériel fongique.....	101
Dispositif pour <i>Encarsia formosa</i> et <i>Aphidius colemani</i> .....	102
Dispositif pour <i>Phytoseiulus persimilis</i> .....	102
Dispositif pour <i>Orius insidiosus</i> .....	102

<b>4.1.5 ACTIVITÉ 5. Efficacité <i>in vitro</i> .....</b>	<b>103</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTAGONISTE DE <i>TRICHODERMA MAUL-20</i> VIS-À-VIS LES AGENTS PATHOGÈNES .....</b>	<b>103</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR LA DÉTERMINATION DES ANTIBIOTIQUES PRODUITS PAR <i>TRICHODERMA MAUL-20</i> .....</b>	<b>104</b>
Peptaiboles.....	104
Milieu de culture et matériel fongique .....	104
Filtration et extraction .....	105
Bioessais pour les peptaiboles .....	105
Métabolites neutres et métabolites acides .....	105
Milieu de culture et matériel fongique .....	105
Filtration, acidification et extraction .....	106
Bioessais pour les métabolites neutres et métabolites acides .....	106
<b>4.2 PHASE 2 et 3. Essais sur le terrain.....</b>	<b>107</b>
<b>4.3 ÉTAPE 2. Biofongicides.....</b>	<b>107</b>
<b>4.3.1 ACTIVITÉ 1. Expérience #1 avec <i>Trichoderma MAUL-20</i>, RootShield et Prestop contre <i>Botrytis cinerea</i> sur la tomate de serre.....</b>	<b>107</b>
<b>4.3.2 ACTIVITÉ 2. Expérience #2 avec <i>Trichoderma MAUL-20</i>, RootShield et Prestop contre <i>Botrytis cinerea</i> sur la tomate de serre.....</b>	<b>109</b>
<b>4.3.3 ACTIVITÉ 3. Expérience #1 avec <i>Trichoderma MAUL-20</i>, RootShield et Prestop contre <i>Pythium</i> sur la tomate de serre et la célosie plumeuse.....</b>	<b>110</b>
<b>4.3.4 ACTIVITÉ 4. Expérience #2 avec <i>Trichoderma MAUL-20</i>, RootShield et Prestop contre <i>Pythium</i> sur la tomate de serre et la célosie plumeuse.....</b>	<b>111</b>
<b>4.3.5 ACTIVITÉ 5. Expérience #1 avec <i>Trichoderma MAUL-20</i>, RootShield et Prestop contre <i>Rhizoctonia solani</i> sur trois légumes en semis (le haricot nain, le céleri et la tomate de serre) et trois plantes ornementales (la célosie plumeuse, la giroflée et le zinnia).....</b>	<b>111</b>
<b>4.3.6 ACTIVITÉ 6. Expérience #2 avec <i>Trichoderma MAUL-20</i>, RootShield et Prestop contre <i>Rhizoctonia solani</i> sur trois légumes en semis (le haricot nain, le céleri et la tomate de serre) et trois plantes ornementales (la célosie plumeuse, la giroflée et le zinnia).....</b>	<b>114</b>
<b>4.3.7 ACTIVITÉ 7. Expérience avec Prestop et <i>Trichoderma MAUL-20</i> contre <i>Botrytis cinerea</i> sur la tomate de serre à l'échelle commerciale .....</b>	<b>114</b>
Matériel végétal .....	114
Traitements .....	115
Dispositif expérimental .....	116
Vérification de la présence de <i>Gliocladium catenulatum</i> sur les tiges.....	116
Décompte des chancres présents sur les tiges .....	116
Évaluation des rendements.....	117

<b>5. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>118</b>
<b>5.1 PHASE 1. R&amp;D labo et mise à l'échelle .....</b>	<b>118</b>
<b>5.2 ÉTAPE 1. Sélection des biopesticides.....</b>	<b>118</b>
<b>5.2.1 ACTIVITÉ 2. MISE À L'ÉCHELLE.....</b>	<b>118</b>
Productions chez AEF global .....	120
Productions au CWBI.....	121
Productions chez Lallemand .....	125
Productions au CREFSIP .....	130
Durée de conservation du biofongicide Sporodex.....	137
<b>5.2.2 ACTIVITÉ 3. formulation de sporodex et maul-20 .....</b>	<b>140</b>
<b>FORMULATION DE SPORODEX .....</b>	<b>140</b>
Évaluation de la matière sèche .....	140
Évaluation du nombre de conidies, d'hyphes et du pourcentage de sporulation par le compte à l'hémacymètre .....	140
Dénombrement des UFC (Unité Formatrice de Colonie) sur un milieu gélosé ou « surface count »	141
Réalisation d'une courbe de croissance.....	142
Évaluation de la compatibilité de <i>Pseudozyma flocculosa</i> avec différents surfactants .....	142
Courbe de croissance de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM0,5P0,5D.....	143
Courbe de croissance de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM1,5PD.....	146
Courbe de croissance de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM1,5P1,5D.....	149
Importance du type de mélasse et de la source d'acide - essai 1 .....	154
Importance du type de mélasse et de la source d'acide - essai 2.....	159
Importance du pH et de la concentration de l'inoculum .....	162
Importance du type d'extrait de levure sur la croissance de <i>Pseudozyma flocculosa</i> .....	165
<b>FORMULATION DE MAUL-20 .....</b>	<b>167</b>
Amélioration des qualités nutritionnelles du milieu de culture utilisé pour multiplier <i>Trichoderma harzianum</i> MAUL-20.....	167
Effet de la cellulose et du sucrose .....	167
Effet de la thiamine ou du fer sur la croissance de <i>Trichoderma</i> .....	170
Production à grande échelle de <i>Trichoderma harzianum</i> MAUL-20.....	171
<b>5.2.3 ACTIVITÉ 4. Compatibilité avec les pesticides chimiques et auxiliaires de lutte .....</b>	<b>174</b>
Effet des pesticides sur la germination et survie de <i>Trichoderma</i> MAUL-20 .....	174
Effet de <i>Trichoderma</i> MAUL-20 sur le développement et survie des insectes prédateurs et parasitoïdes .....	175

<b>5.2.4 ACTIVITÉ 5. Efficacité <i>in vitro</i> .....</b>	<b>177</b>
Évaluation de l'activité antagoniste de <i>Trichoderma</i> MAUL-20 vis-à-vis les agents pathogènes ....	177
Détermination des antibiotiques produits par <i>Trichoderma</i> MAUL-20 .....	179
Peptaiboles.....	179
Métabolites neutres et métabolites acides .....	182
Premier essai.....	182
Deuxième essai.....	184
Conclusion.....	187
Bibliographie.....	187
<b>5.3 PHASE 2 et 3. Essais sur le terrain .....</b>	<b>188</b>
<b>5.4 ÉTAPE 2. Biofongicides.....</b>	<b>188</b>
<b>5.4.1 ACTIVITÉ 1. Expérience #1 avec <i>Trichoderma</i> MAUL-20, RootShield et Prestop contre <i>Botrytis cinerea</i> sur la tomate de serre.....</b>	<b>188</b>
<b>5.4.2 ACTIVITÉ 2. Expérience #2 avec <i>Trichoderma</i> MAUL-20, RootShield et Prestop contre <i>Botrytis cinerea</i> sur la tomate de serre.....</b>	<b>192</b>
Vérification de la présence des agents de lutte biologique .....	193
Décompte des chancres présents sur les tiges .....	194
Vérification de la présence de <i>Botrytis cinerea</i> sur les chancres .....	194
Rendements.....	194
Vérification de la présence des agents de lutte biologique sur les tiges .....	194
Décompte des chancres présents sur les tiges .....	194
Efficacité des traitements en badigeonnage.....	195
Évaluation des rendements .....	195
<b>5.4.2.1 ACTIVITÉ 3. Expérience #1 avec <i>Trichoderma</i> MAUL-20, RootShield et Prestop contre <i>Pythium</i> sur la tomate de serre et la célosie plumeuse .....</b>	<b>202</b>
Célosie plumeuse.....	202
Tomate de serre .....	206
<b>5.4.2.2 ACTIVITÉ 4. Expérience #2 avec <i>Trichoderma</i> MAUL-20, RootShield et Prestop contre <i>Pythium</i> sur la tomate de serre et la célosie plumeuse .....</b>	<b>209</b>
Célosie plumeuse.....	209
Tomate de serre .....	214
<b>5.4.2.3 ACTIVITÉ 5. Expérience #1 avec <i>Trichoderma</i> MAUL-20, RootShield et Prestop contre <i>Rhizoctonia solani</i> sur trois légumes en semis (haricot nain, céleri et tomate de serre) et trois plantes ornementales (célosie plumeuse, giroflée et zinnia).....</b>	<b>217</b>
Haricot.....	218

Tomate .....	221
Céleri.....	224
Célosie plumeuse .....	226
Giroflée .....	229
Zinnia .....	232
<b>5.4.2.4 ACTIVITÉ 6. Expérience #2 avec Trichoderma MAUL-20, RootShield et Prestop contre Rhizoctonia solani sur trois légumes en semis (haricot nain, céleri et tomate de serre) et trois plantes ornementales (célosie plumeuse, giroflée et zinnia).....</b>	<b>236</b>
Haricot.....	237
Tomate .....	239
Céleri.....	242
Célosie plumeuse .....	244
Giroflée .....	247
<b>5.4.3 ACTIVITÉ 7. Expérience avec Prestop et Trichoderma MAUL-20 contre Botrytis cinerea sur la tomate de serre à l'échelle commerciale .....</b>	<b>250</b>
Vérification de la présence de <i>Gliocladium catenulatum</i> sur les tiges.....	250
Efficacité des traitements en pulvérisation.....	250
Efficacité des traitements en badigeonnage .....	250
Rendements .....	251

## Liste des figures

Figure 1. Microorganismes répertoriés sur les tissus de tiges ou de feuilles de tomate de serre – Estrie .....	40
Figure 2. Schéma d'un hémacymètre (tiré de <a href="http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemacytometer.htm">www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemacytometer.htm</a> )	141
Figure 3. Compatibilité de <i>Pseudozyma flocculosa</i> , l'agent actif du biofongicide Sporodex, avec différents surfactants.....	143
Figure 4. Évolution en fonction du temps a) de la matière sèche et du nombre UFC et b) du pH et du pourcentage de sporulation d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM0.5P0.5D. ....	144
Figure 5. Évolution en fonction du temps a) de la matière sèche et b) du nombre UFC d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM1.5PD et Czapek dans des fioles embossées et standards. ....	147
Figure 6. Évolution en fonction du temps a) du pH et b) du pourcentage de sporulation d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM1.5PD et Czapek dans des fioles embossées et standards. ....	148
Figure 7. Évolution en fonction du temps a) de la matière sèche et b) du nombre d'UFC d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM1.5P1.5D dans des fioles de 500 ml embossées, de 500 ml standard et de 250 ml embossées.....	150
Figure 8. Évolution en fonction du temps a) du pH et b) du pourcentage de sporulation d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM1.5P1.5D dans des fioles de 500 ml embossées, de 500 ml standard et de 250 ml embossées.....	151
Figure 9. Évolution en fonction du temps de la matière sèche dans a) des fioles embossées et b) des fioles standards d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu mélasse avec deux sources de mélasse et d'acide lors de l'essai 1. ....	155
Figure 10. Évolution en fonction du temps du nombre UFC/ml dans a) des fioles embossées et b) des fioles standards d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu mélasse avec deux sources de mélasse et d'acide - essai 1. ....	156
Figure 11. Évolution en fonction du temps du pH dans a) des fioles embossées et b) des fioles standards d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu mélasse avec deux sources de mélasse et d'acide - essai 1. ....	157
Figure 12. Pourcentage de sporulation après 48h de croissance d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans deux types de fioles dans le milieu mélasse avec deux sources de mélasse et d'acide - essai 1. ....	158
Figure 13. Évolution du nombre d'UFC/ml au sein de la formulation Sporodex lorsque entreposé à 4°C suite à une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> en fioles embossées dans le milieu mélasse avec deux sources de mélasse et d'acide - essai 1.....	158
Figure 14. Évolution en fonction du temps a) de la matière sèche et b) du nombre d'UFC au sein d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu mélasse avec deux types de mélasse et d'acide - essai 2.	159
Figure 15. Évolution en fonction du temps a) du pH et b) du pourcentage de sporulation au sein d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu mélasse avec deux types de mélasse et d'acide - essai 2.	160
Figure 16. Mesure a) de la matière sèche et b) du nombre UFC après 46.5 heures d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu mélasse de cane avec différents pH et taux d'inoculation. ....	163
Figure 17. Mesure a) du pH et b) du pourcentage de sporulation après 46.5 heures d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu mélasse de cane avec différents pH et taux d'inoculation initiaux..	164

Figure 18. Évolution du pourcentage de sporulation dans a) le milieu YM0.5P0.5D et b) le milieu mélasse lors d'une culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> avec 6 différents extraits de levure. ....	166
Figure 19. Rendement total en fruits et en fruits de catégorie #1 pour 30 récoltes .....	192
Figure 20. Poids moyen en fruit de catégorie #1 pour 30 récoltes .....	192
Figure 21. Évaluation des rendements vendables et des rendements en fruits de catégorie #1 issus des plants de tomate (cv. Trust) sous traitements fongicides et biofongicides en pulvérisation et en badigeonnage utilisés pour réprimer le chancre de la tige causé par <i>Botrytis cinerea</i> pour le deuxième essai en serre expérimentale mené au Centre de recherche en horticulture de l'Université Laval.....	196
Figure 22. Évaluation du nombre de fruits de catégorie #1 issus des plants de tomate (cv. Trust) sous traitements fongicides et biofongicides en pulvérisation et en badigeonnage utilisés pour réprimer le chancre de la tige causé par <i>Botrytis cinerea</i> pour le deuxième essai en serre expérimentale mené au Centre de recherche en horticulture de l'Université Laval .....	197
Figure 23. Évaluation du poids des fruits de catégorie #1 issus des plants de tomate (cv. Trust) sous traitements fongicides et biofongicides en pulvérisation et en badigeonnage utilisés pour réprimer le chancre de la tige causé par <i>Botrytis cinerea</i> pour le deuxième essai en serre expérimentale mené au Centre de recherche en horticulture de l'Université Laval. ....	198
Figure 24. Pourcentage de germination de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques.....	204
Figure 25. Hauteur moyenne (mm) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	204
Figure 26. Longueur moyenne des racines (mm) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	205
Figure 27. Poids frais de la partie aérienne (g) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	205
Figure 28. Poids frais du système racinaire (g) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	206
Figure 29. Pourcentage de germination de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques) .....	207
Figure 30. Hauteur moyenne (mm) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	207
Figure 31. Longueur moyenne des racines (mm) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	208
Figure 32. Poids frais de la partie aérienne (g) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	208
Figure 33. Poids frais du système racinaire (g) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	209
Figure 34. Pourcentage de germination de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques.....	212
Figure 35. Hauteur moyenne (mm) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	212
Figure 36. Longueur moyenne des racines (mm) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Pythium</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	213

Figure 37. Poids frais de la partie aérienne (g) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Pythium et/ou d'agents de lutte biologiques .....	213
Figure 38. Poids frais du système racinaire (g) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Pythium et/ou d'agents de lutte biologiques .....	214
Figure 39. Pourcentage de germination de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Pythium et/ou d'agents de lutte biologiques.....	215
Figure 40. Hauteur moyenne (mm) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Pythium et/ou d'agents de lutte biologiques .....	215
Figure 41. Longueur moyenne des racines (mm) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Pythium et/ou d'agents de lutte biologiques .....	216
Figure 42. Poids frais de la partie aérienne (g) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Pythium et/ou d'agents de lutte biologiques .....	216
Figure 43. Poids frais du système racinaire (g) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Pythium et/ou d'agents de lutte biologiques .....	217
Figure 44. Pourcentage de germination du haricot nain après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques..	218
Figure 45. Hauteur moyenne (mm) du haricot nain après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques .....	219
Figure 46. Poids frais de la partie aérienne (g) du haricot nain après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques .....	219
Figure 47. Poids sec de la partie aérienne (g) du haricot nain après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques..	220
Figure 48. Cote quantitative des racines du haricot nain après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques..	220
Figure 49. Pourcentage de germination de la tomate après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques .....	222
Figure 50. Hauteur moyenne (mm) de la tomate après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques .....	222
Figure 51. Poids frais de la partie aérienne (g) de la tomate après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques..	223
Figure 52. Poids sec de la partie aérienne (g) de la tomate après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques..	223
Figure 53. Pourcentage de germination du céleri après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques .....	224
Figure 54. Hauteur moyenne (mm) du céleri après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques .....	225
Figure 55. Poids frais de la partie aérienne (g) du céleri après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques..	225
Figure 56. Poids sec de la partie aérienne (g) du céleri après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène Rhizoctonia solani et/ou d'agents de lutte biologiques..	226

Figure 57. Pourcentage de germination de la célosie plumeuse après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	227
Figure 58. Hauteur moyenne (mm) de la célosie plumeuse après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	227
Figure 59. Poids frais de la partie aérienne (g) de la célosie plumeuse après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	228
Figure 60. Poids sec de la partie aérienne (g) de la célosie plumeuse après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	228
Figure 61. Cote qualitative des racines de la tomate après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	229
Figure 62. Pourcentage de germination de la giroflée après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	230
Figure 63. Hauteur moyenne (mm) de la giroflée après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	230
Figure 64. Poids frais de la partie aérienne (g) de la giroflée après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	231
Figure 65. Poids sec de la partie aérienne (g) de la giroflée après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	231
Figure 66. Cote qualitative des racines de la giroflée après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	232
Figure 67. Pourcentage de germination du zinnia après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	233
Figure 68. Hauteur moyenne (mm) du zinnia après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	234
Figure 69. Poids frais de la partie aérienne (g) du zinnia après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	234
Figure 70. Poids sec de la partie aérienne (g) du zinnia après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	235
Figure 71. Pourcentage de germination du haricot nain après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	237
Figure 72. Hauteur moyenne (mm) du haricot nain après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	238
Figure 73. Poids frais de la partie aérienne (g) du haricot nain après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	238
Figure 74. Poids sec de la partie aérienne (g) du haricot nain après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	239
Figure 75. Pourcentage de germination de la tomate après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	240

Figure 76. Hauteur moyenne (mm) de la tomate après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	240
Figure 77. Poids frais de la partie aérienne (g) de la tomate après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	241
Figure 78. Poids sec de la partie aérienne (g) de la tomate après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologique ...	241
Figure 79. Pourcentage de germination du céleri après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	242
Figure 80. Hauteur moyenne (mm) du céleri après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	243
Figure 81. Poids frais de la partie aérienne (g) du céleri après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	243
Figure 82. Poids sec de la partie aérienne (g) du céleri après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	244
Figure 83. Pourcentage de germination de la célosie plumeuse après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	245
Figure 84. Hauteur moyenne (mm) de la célosie plumeuse après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	245
Figure 85. Poids frais de la partie aérienne (g) de la célosie plumeuse après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	246
Figure 86. Poids sec de la partie aérienne (g) de la célosie plumeuse après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	246
Figure 87. Pourcentage de germination de la giroflée après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	247
Figure 88. Hauteur moyenne (mm) de la giroflée après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques .....	248
Figure 89. Poids frais de la partie aérienne (g) de la giroflée après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	248
Figure 90. Poids sec de la partie aérienne (g) de la giroflée après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> et/ou d'agents de lutte biologiques..	249

## Liste des tableaux

Tableau 1. Charte de compatibilité de Trichoderma avec les fongicides chimiques utilisés dans les serres .	35
Tableau 2. Charte de compatibilité de Trichoderma avec les insecticides chimiques utilisés dans les serres	35
Tableau 3. Effet du produit de désinfection sur Botrytis cinerea, Trichoderma MAUL-20 ou en combinaison et lorsqu'il est appliqué seul sur les blessures d'effeuillage.....	37
Tableau 4. Poids et qualité des fruits de tomate et présence de maladie et des agents biologiques sur les tiges de tomate – serre expérimentale, Sainte-Foy.....	39
Tableau 5. Pourcentage de chancres enlevés sur les tiges de tomate – serre commerciale, Estrie.....	39
Tableau 6. Nombre de plants de tomate morts causés par Botrytis cinerea, cultivés sous différents régimes d'humidité relative .....	41
Tableau 7. Rendement en fruits de tomate cultivés sous différents régimes d'humidité relative .....	41
Tableau 8. Nombre de chancres répertoriés sur les plants et rendement en fruits de tomate .....	42
Tableau 9. Nombre de plants morts à cause de Botrytis cinerea et rendement .....	42
Tableau 10. Nombre de chancres répertoriés sur les plants et rendement en fruits de tomate, Estrie.....	43
Tableau 11. Nombre de chancres répertoriés sur les plants et rendement en fruits de tomate, Portneuf .....	43
Tableau 12. Produits ou agents biologiques rapportés pour avoir une activité contre le blanc.....	53
Tableau 13. Détermination de la matière active de qualité technique (MAQT) .....	54
Tableau 14. Préparation commerciale de SPORODEX L.....	55
Tableau 15. Propriétés du biofongicide RootShield sous forme de granules ou Drench, BioWorks, USA ...	62
Tableau 16. Compatibilité de RootShield avec les fongicides, insecticides, herbicides, acaricides, biocides, surfactants et des mélanges en réservoir .....	65
Tableau 17. Effet de RootShield sur la taille des lésions causées par Botrytis cinerea sur les tiges de tomates cultivées en serre, 1998 .....	68
Tableau 18. Effet de RootShield sur le rendement en fruits, le nombre de fruits par plant et le poids moyen en fruits sur des plants de tomates inoculés avec Botrytis cinerea en serre, 1998.....	68
Tableau 19. Effet de RootShield sur la taille des lésions causées par Botrytis cinerea sur les tiges de tomates cultivées en serre, 1999 .....	68
Tableau 20. Effet de RootShield sur le rendement en fruits, le nombre de fruits par plant et le poids moyen en fruits sur des plants de tomates inoculés avec Botrytis cinerea en serre, 1999.....	69
Tableau 21. Effet de RootShield sur la taille des lésions causées par Botrytis cinerea sur les tiges de tomates cultivées en serre, 2000 .....	69
Tableau 22. Effet de RootShield sur le rendement en fruits, le nombre de fruits par plant et le poids moyen en fruits sur des plants de tomates inoculés avec Botrytis cinerea en serre, 2000.....	69
Tableau 23. Effet de RootShield sur la taille des lésions causées par Botrytis cinerea sur les tiges de tomates cultivées en serre, 2001 .....	70
Tableau 24. Effet de RootShield sur le rendement en fruits, le nombre de fruits par plant et le poids moyen en fruits sur des plants de tomates inoculés avec Botrytis cinerea en serre, 2001.....	70

Tableau 25. Développement de la fusariose sur des plants de tomates traités avec RootShield à quatre taux d'application.....	70
Tableau 26. Influence de <i>Trichoderma harzianum</i> sur l'incidence et la gravité de la fusariose .....	71
Tableau 27. Propriétés du biofongicide Serenade sous forme de poudre mouillable ou suspension aqueuse, AgraQuest, USA.....	76
Tableau 28. Différentes maladies et agents pathogènes contrôlés par Serenade.....	77
Tableau 29. Effet de Serenade sur l'incidence de <i>Elsinoe fawcetti</i> sur des plants de citron .....	79
Tableau 30. Effet de Serenade sur le développement de <i>Diaporthe citri</i> sur des plants de pamplemousses ..	79
Tableau 31. Efficacité de divers traitements appliqués sur des grappes de raisins .....	81
Tableau 32. Effet des différents traitements appliqués en prévention sur la taille des lésions et la mortalité des plants de tomates causées par <i>Botrytis cinerea</i> .....	85
Tableau 33. Effet des différents traitements appliqués en prévention sur le rendement en fruits, le nombre de fruits par plant et le poids des fruits issus de plants de tomates inoculés avec <i>Botrytis cinerea</i> .....	85
Tableau 34. Informations sur les productions réalisées dans le cadre du projet Sporodex en 2002-2003 ...	119
Tableau 35. Résumés des productions chez AEF Global.....	120
Tableau 36. Bilan des comptes cellulaires sur la formulation chez AEF Global .....	121
Tableau 37. Résumés des productions au CWBI .....	121
Tableau 38. Bilan des comptes cellulaires sur les formulations au CWBI.....	124
Tableau 39. Résumés des productions chez Lallemand .....	125
Tableau 40. Résumés des productions au CREFSIP .....	130
Tableau 41. Bilan des comptes cellulaires sur les productions au CREFSIP (photos 1 à 4).....	132
Tableau 42. Synthèse des observations effectuées antérieurement lors des différentes expérimentations réalisées afin d'améliorer le milieu nutritionnel traditionnel employé pour multiplier <i>Trichoderma</i> .....	167
Tableau 43. Observations effectuées lors des différentes expérimentations réalisées afin d'améliorer le milieu nutritionnel traditionnel employé pour multiplier <i>Trichoderma</i> .....	168
Tableau 44. Impact de la source d'hydrate de carbone et effet de la concentration sur le développement et la sporulation de <i>Trichoderma MAUL-20</i> lorsque cultivé sur milieu cellulose à base de PDA, en Pétri.....	169
Tableau 45. Impact de la source d'hydrate de carbone et effet de la concentration sur le développement et la sporulation de <i>Trichoderma MAUL-20</i> lorsque cultivé sur milieu cellulose à base de PDA et comparé au milieu conventionnel à base de V8, en plateau d'aluminium.....	170
Tableau 46. Impact du sucrose et de sa concentration sur le développement et la sporulation de <i>Trichoderma MAUL-20</i> lorsque cultivé sur milieu cellulose à base de PDA et comparé au milieu conventionnel à base de V8, en plateau d'aluminium .....	170
Tableau 47. Impact du fer et de la thiamine sur le développement et la sporulation de <i>Trichoderma MAUL-20</i> lorsque cultivé sur milieu standard alimenté de fer ou de thiamine et comparé au milieu conventionnel à base de V8, en plateau d'aluminium .....	171
Tableau 48. Effet de la congélation sur la viabilité des spores de <i>Trichoderma harzianum MAUL-20</i> lorsque comparé au poids frais.....	173

Tableau 49. Effet de la position de la biomasse dans le lyophilisateur sur la viabilité des spores de <i>Trichoderma harzianum</i> MAUL-20 lorsque comparé au poids frais.....	173
Tableau 50. Charte de compatibilité de <i>Trichoderma</i> avec les fongicides chimiques utilisés dans les serres .....	174
Tableau 51. Charte de compatibilité de <i>Trichoderma</i> avec les insecticides chimiques utilisés dans les serres .....	175
Tableau 52. Taux de croissance moyen journalier (mm) des champignons pathogènes et de l'agent de lutte biologique <i>Trichoderma</i> .....	177
Tableau 53. Identification et pondération des critères de décision sélectionnés pour évaluer la performance de <i>Trichoderma</i> à la confrontation en Pétri contre différents agents pathogènes.....	178
Tableau 54. Évaluation, in vitro, de l'activité antagoniste de <i>Trichoderma</i> vis-à-vis les agents pathogènes.....	179
Tableau 55. Apparence des milieux de culture ayant supporté la croissance des souches de <i>Trichoderma harzianum</i> après filtration pour l'extraction des peptaïboles.....	180
Tableau 56. Quantité de mycélium récolté lors de la filtration pour l'extraction des peptaïboles pour les souches de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	180
Tableau 57. Volumes de milieu de culture et de n-butanol utilisés lors de l'extraction des peptaïboles pour les différentes souches de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	180
Tableau 58. Poids des gommages obtenus suite à l'évaporation du n-butanol pour l'extraction des peptaïboles pour les différentes souches de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	180
Tableau 59. Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance de la bactérie <i>Bacillus subtilis</i> en présence d'extraits de peptaïboles issus de milieux de culture ayant supportés la croissance de souches de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	181
Tableau 60. Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance de la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i> en présence d'extraits de peptaïboles issus de milieux de culture ayant supportés la croissance de souches de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	181
Tableau 61. Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance du champignon <i>Botrytis cinerea</i> en présence d'extraits de peptaïboles issus de milieux de culture ayant supportés la croissance de souches de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	181
Tableau 62. Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance du champignon <i>Sclerotium cepivorum</i> en présence d'extraits de peptaïboles issus de milieux de culture ayant supportés la croissance de souches de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	182
Tableau 63. Apparence des milieux de culture ayant supporté la croissance des souches de <i>Trichoderma harzianum</i> après filtration pour l'extraction de métabolites – expérience 1.....	182
Tableau 64. Quantité de mycélium récolté lors de la filtration pour les souches de <i>Trichoderma harzianum</i> pour l'extraction de métabolites – expérience 1.....	182
Tableau 65. Volumes de milieu de culture et d'acétate d'éthyle utilisés lors de l'extraction de métabolites pour les différents traitements – expérience 1 .....	183
Tableau 66. Poids des gommages obtenues suite à l'évaporation de l'acétate d'éthyle pour les différents traitements pour l'extraction des métabolites – expérience 1.....	183
Tableau 67. Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance de la bactérie <i>Bacillus subtilis</i> en présence d'extraits de métabolites neutres issus de milieu de culture ayant supporté la croissance de souches de <i>Trichoderma harzianum</i> – expérience 1 .....	183

Tableau 68. Apparence des milieux de culture ayant supporté la croissance des souches de <i>Trichoderma harzianum</i> après filtration pour l'extraction de métabolites neutres et acides – expérience 2 .....	184
Tableau 69. Quantité de mycélium récolté lors de la filtration pour les souches de <i>Trichoderma harzianum</i> pour l'extraction de métabolites neutres et acides – expérience 2.....	184
Tableau 70. Volumes de milieu de culture et d'acétate d'éthyle utilisés lors de l'extraction de métabolites neutres et acides pour les différents traitements – expérience 2.....	184
Tableau 71. Poids des gommages obtenues suite à l'évaporation de l'acétate d'éthyle pour les différents traitements pour l'extraction des métabolites neutres – expérience 2 .....	184
Tableau 72. Poids des gommages obtenues suite à l'évaporation de l'acétate d'éthyle pour les différents traitements pour l'extraction des métabolites acides – expérience 2.....	185
Tableau 73. Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance de la bactérie <i>Bacillus subtilis</i> en présence d'extraits de métabolites neutres issus de milieu de culture ayant supporté la croissance de souches de <i>Trichoderma harzianum</i> – expérience 2 .....	186
Tableau 74. Observations microscopiques des organismes présents à la surface des blessures d'effeuillage récoltées avant chaque traitement.....	188
Tableau 75. Nombre de chancres de <i>Botrytis cinerea</i> observé pour les différents traitements en pulvérisation .....	190
Tableau 76. Nombre de chancres de <i>Botrytis cinerea</i> observé pour les différents traitements en badigeonnage.....	191
Tableau 77. Suivie phytosanitaire et traitements réalisés dans la serre de l'Université Laval – expérience #2 .....	193
Tableau 78. Fraction du rendement total en fruits de tomate associée au rendement non-vendable pour les traitements fongicides et biofongicides en pulvérisation et en badigeonnage – expérience #2, Université Laval, Québec.....	198
Tableau 79. Détection de la présence de <i>Pythium</i> et des agents de lutte biologique <i>Trichoderma</i> et <i>Gliocladium</i> sur les racines des plants de tomate et de célosie en cours de production.....	202
Tableau 80. Détection de la présence de <i>Pythium</i> et des agents de lutte biologique <i>Trichoderma</i> et <i>Gliocladium</i> sur les racines des plants de tomate et de célosie lors de la récolte des plants .....	203
Tableau 81. Détection de la présence de <i>Pythium</i> et des agents de lutte biologique <i>Trichoderma</i> et <i>Gliocladium</i> sur les racines des plants de tomate et de célosie en cours de production.....	210
Tableau 82. Détection de la présence de <i>Pythium</i> et des agents de lutte biologique <i>Trichoderma</i> et <i>Gliocladium</i> sur les racines des plants de tomate et de célosie lors de la récolte des plants .....	211
Tableau 83. Fontes de semis observées au collet de la tomate cultivée dans le substrat Pro-Mix BX en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> .....	221
Tableau 84. Fontes de semis observées au collet du céleri cultivé dans le substrat Pro-Mix BX en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> .....	224
Tableau 85. Fontes de semis observées au collet du zinnia cultivée dans le substrat Pro-Mix BX en présence ou non de l'agent pathogène <i>Rhizoctonia solani</i> .....	233
Tableau 86. Rendement et classification des fruits de tomate pour le traitement alternance Prestop / fongicides en comparaison avec le traitement fongicide en pulvérisation – Serres du St-Laurent div. Danville, Québec .....	251

## Liste des photos

Photo 1. Culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> lors de la production Spcr/1 au CREFSIP après a) 3h, b) 21h, c) 29h, d) 32h, e) 36h et f) 46h de croissance. Grossissement 400x.....	134
Photo 2. Culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> lors de la production Spcr/2 au CREFSIP au sein de a) l'inoculum et après b) 12h, c) 17h et d) 37h de croissance en fermenteur. Grossissement 400x.....	135
Photo 3. Culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> lors de la production Spcr/3 au CREFSIP au sein de a) l'inoculum et après b) 9h, c) 15.5h et d) 35h de croissance en fermenteur. Grossissement 400x.....	136
Photo 4. <i>Pseudozyma flocculosa</i> lors de la production Spcr-4 au CREFSIP au sein de a) l'inoculum et après b) 22.5h, c) 27.5h et d) 46h de croissance en fermenteur. Grossissement 400x.....	137
Photo 5. Culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM0.5P0.5D après a) 15,5h, b) 19,5h, c) 24,5h, d) 33h, e) 39,5h et f) 43,5h de croissance. Grossissement 400x. ....	145
Photo 6. <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM1.5P1.5D dans des fioles embossées après a) 6h, b) 10h, c) 23,5h, d) 30h, e) 38h et f) 61h de croissance. Grossissement 400x. ....	152
Photo 7. <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu YM1.5P1.5D dans des fioles standards après a) 6h, b) 23,5h, c) 30h, d) 38h, e) 61h et f) 103,5h de croissance. Grossissement 400x. ....	153
Photo 8. Culture de <i>Pseudozyma flocculosa</i> dans le milieu avec la mélasse de betterave et le pH ajusté avec du H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> après a) 10h, b) 15h, c) 19h, d) 25h, e) 34h et f) 47h de culture. Grossissement 400x. ....	161

## Liste des Annexes

Annexe 1. Dispositif expérimental utilisé en serre expérimentale pour l'expérience #1 – Université Laval	254
Annexe 2. Dispositif expérimental utilisé en serre expérimentale pour l'expérience #2 – Université Laval	255
Annexe 3. Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience portant sur la fonte de semis causé par <i>Pythium</i> sur la tomate et la célosie – première expérience .....	256
Annexe 4. Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience portant sur la fonte de semis causé par <i>Pythium</i> sur la tomate et la célosie – deuxième expérience .....	257
Annexe 5. Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience portant sur la fonte de semis causé par <i>Rhizoctonia solani</i> de légumes et plantes ornementales – première expérience .....	258
Annexe 6. Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience portant sur la fonte de semis causé par <i>Rhizoctonia solani</i> de légumes et plantes ornementales – deuxième expérience .....	260
Annexe 7. Pourcentage de germination des spores de <i>Trichoderma</i> estimé lors des observations effectuées pour l'établissement de la charte de compatibilité de <i>Trichoderma</i> avec les pesticides chimiques utilisés dans les serres .....	262
Annexe 8. Barème de pondération employé lors de l'évaluation de l'activité antagoniste de <i>Trichoderma</i> vis-à-vis les agents pathogènes.....	263
Annexe 9. Suivie phytosanitaire et traitements réalisés dans la serre de l'Université Laval – expérience #1 .....	265
Annexe 10. Rendement total et rendement en fruits de catégorie #1 pour les différents traitements - 30 récoltes .....	266
Annexe 11. Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de célosie – première expérience.....	268
Annexe 12. Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de tomate – première expérience.....	268
Annexe 13. Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de célosie – deuxième expérience.....	269
Annexe 14. Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de tomate – deuxième expérience.....	269
Annexe 15. Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de haricot nain avec <i>Rhizoctonia solani</i> et stade de croissance du haricot nain – première expérience .....	270
Annexe 16. Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de haricot nain avec <i>Rhizoctonia solani</i> et stade de croissance du haricot nain – deuxième expérience .....	273
Annexe 17. Plan de la serre commerciale – Serres du St-Laurent div. Danville.....	276

## 1. LISTE DES INTERVENANTS

**Requérant : Le Réseau Biocontrôle**  
**Université de Montréal**  
2900, boul. Édouard-Montpetit  
Montréal, Québec  
H3J 1J4

**Conseiller scientifique : M. Richard Bélanger, Ph.D., phytopathologiste**  
Département de phytologie - FSAA  
Université Laval, Québec  
G1K 7P4  
Téléphone : 418-656-2758  
Télécopieur: 418-656-7856  
Courriel : [richard.bélanger@plg.ulaval.ca](mailto:richard.bélanger@plg.ulaval.ca)

### Exécutants :

**Mme Johanne Caron, M.Sc., phytopathologiste**  
**Mme Lucie Laverdière, technicienne**  
**Horti-Protection inc.**  
11, rue des Peupliers  
Sainte-Hélène de Breakeyville, Québec  
G0S 1E1  
Téléphone : 418-832-0546  
Télécopieur: 418-832-0546  
Courriel : [hortipro@mediom.qc.ca](mailto:hortipro@mediom.qc.ca)

### Partenaires :

**Plant Products Co Ltd.**  
**A/s Mme Jennifer Hale**  
314, Orenda Road,  
Brampton, Ontario  
L6T 1G  
Téléphone : 905-793-7000  
Télécopieur: 905-793-9632  
Courriel : [jhale@plantprod.com](mailto:jhale@plantprod.com)

*Ou*

**Plant Products Co Ltd.**  
**A/s M. Serge Gagnon**  
3370 Le Corbusier  
Laval, Québec  
H7L 4S8.  
Téléphone : 450-682-6110  
Télécopieur: 450-682-6117  
Courriel : [sgagnon@plantprod.com](mailto:sgagnon@plantprod.com)

**Chaires de recherche du Canada**

**M. Richard Bélanger, Ph.D.**

Département de phytologie - FSAA

Université Laval, Québec

G1K 7P4

Téléphone : 418-656-2758

Télécopieur: 418-656-7856

Courriel : [richard.bélanger@plg.ulaval.ca](mailto:richard.bélanger@plg.ulaval.ca)

**Réseau québécois de recherche en phytoprotection (VRQ)**

Département de phytologie - FSAA

Environnement, local 1217

Université Laval, Québec

G1K 7P4

Téléphone : 418-656-2131 poste 12768

Télécopieur: 418-656-3515

Site Web : [www.phytoprotection.org](http://www.phytoprotection.org) ([www.phytoprotection.org](http://www.phytoprotection.org))

## 2. LA PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

La récente publication du Rapport Cousineau sur l'utilisation des pesticides en milieu urbain dresse un bilan fort éloquent de la problématique inhérente à l'utilisation des produits de synthèse à des fins phytosanitaires. Alors que les conclusions du rapport décrivent sans équivoque la perception négative de la population québécoise à l'égard des pesticides, ces mêmes conclusions relatent de façon tout aussi péremptoire le manque d'alternatives propres à diminuer la dépendance du secteur agricole envers les pesticides. Ces alternatives, que l'on peut définir ici sous le vocable générique de biopesticides, tardent à s'implanter sur le marché et demeurent en grande partie des solutions de rechange souhaitées plutôt que réelles (van Lenteren, 2000).

Plusieurs facteurs expliquent la disparité qui persiste entre le désaveu des pesticides chimiques et l'accessibilité à des produits plus respectueux de l'environnement au Canada. De façon plus particulière mais non-exhaustive, les raisons suivantes sont les plus souvent évoquées :

1. La production commerciale des biopesticides
2. La formulation des biopesticides
3. L'efficacité des biopesticides
4. Le financement de la recherche sur les biopesticides
5. L'homologation des biopesticides auprès de l'agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA)

De fait, la problématique actuelle ne réside plus tant dans la découverte de nouveaux agents de lutte biologique, mais plutôt dans le développement et la mise en marché de produits ou organismes pour lesquels la recherche scientifique a déjà fait état du potentiel prometteur au Canada. À titre d'exemple, l'Environmental Protection Agency (EPA), l'homologue américain de l'ARLA, recense plus de 50 biopesticides naturels et à base de micro-organismes disponibles commercialement ([http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ai/all\\_ais.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ai/all_ais.htm)). Cette situation indique clairement que le Québec pourrait se doter assez rapidement d'outils de lutte biologique efficaces dans la mesure où quelques-uns des produits homologués aux États-Unis devenaient disponibles au Canada sur la base d'une autorisation par l'ARLA.

On peut ainsi se questionner à juste titre sur les raisons de l'inéquation du développement du marché des biopesticides aux États-Unis par rapport à la stagnation apparente du même marché au Canada. Une compréhension de la réglementation offre les premiers éléments de réponse. Contrairement à l'ARLA, l'EPA (sauf pour la Californie qui a son propre système d'évaluation) n'exige pas de tests d'efficacité dans son processus de révision. On peut ainsi homologuer un biopesticide sur la base unique de son innocuité pour la santé humaine et l'environnement sans faire la preuve de son efficacité sous les différentes conditions pour lesquelles le produit pourrait être appelé à être utilisé. Au contraire, l'ARLA requiert que l'on fasse la démonstration du potentiel pesticide du produit et ce, sur plusieurs saisons et pour toutes les régions géographiques particulières du Canada. Cette exigence entraîne des coûts additionnels énormes pour les compagnies, coûts qui bien souvent ne justifient pas l'espérance du marché. Par contre, ces mêmes compagnies expriment spontanément leur intérêt à créer des alliances stratégiques avec des chercheurs canadiens dans le but d'obtenir les données d'efficacité nécessaires à l'homologation de leurs produits. De même, plusieurs chercheurs et compagnies au Québec ont découvert et développé des micro-organismes et des produits naturels pouvant servir de biopesticides, mais se trouvent confrontés aux exigences longues et onéreuses imposées par l'ARLA. Dans ce contexte, leurs efforts pourraient être facilités par une participation à regroupement des forces actives dans la recherche et le développement des biopesticides au Québec, objectif spécifique que ce projet cherche à réaliser.

## LE MARCHÉ DES BIOPESTICIDES

Considérant toutes les raisons invoquées précédemment, il est clair que le marché des biopesticides est à l'état embryonnaire; la proportion des biopesticides vendus versus les pesticides chimiques n'atteint que 0.25% (van Lenteren, 2000). Conséquemment, le marché est encore fragile et non-éprouvé. Il devient donc important de le stimuler et de l'alimenter à l'aide de données scientifiques rigoureuses propres à favoriser la confiance des utilisateurs éventuels et de l'ARLA. Incidemment, plusieurs projets de recherche ou produits en développement ont été abandonnés au fil des ans parce que les promoteurs avaient mal établi l'ampleur du marché dans leur plan d'affaires (Cross et Polonenko, 1996). L'erreur la plus commune réside dans une surévaluation du marché et du potentiel d'utilisation (van Lenteren, 2000). Il est important de se rappeler que la plupart des biopesticides sont composés d'organismes vivants qui ont un spectre relativement restreint de ravageurs cibles ainsi que de température et d'humidité relative à l'intérieur duquel ils agissent de façon optimale. Pour cette raison, il est utopique d'envisager qu'un biopesticide donné sera efficace dans toutes les conditions, contre tous les ravageurs, sur toutes les cultures et pour tous les systèmes agricoles. Dans un récent article de synthèse publié dans la prestigieuse revue *Annual Review of Phytopathology*, Paulitz et Bélanger (2001) décrivent la démarche inhérente à accroître les chances de succès de la mise en marché d'un biopesticide. Se référant au succès de la lutte biologique contre les insectes en serre, les auteurs concluent que dans une première approche, les produits devraient être utilisés dans les conditions où les chances de succès sont optimales i.e. dans un environnement propice tel les productions serricoles. Cette recommandation est particulièrement judicieuse dans la mesure où il est important de rapporter des cas de succès et d'efficacité si on veut que les biopesticides soient acceptés par les producteurs. À titre d'exemple, certains produits comme AQ-10® (Ecogen Inc.) ayant démontré un excellent niveau de succès en serre ont échoué dans le cadre d'applications au champ ce qui a eu pour résultat de miner la crédibilité du produit à tous les niveaux. C'est pourquoi dans le cadre de ce projet, les demandeurs veulent 1) identifier les meilleurs candidats et 2) les meilleures conditions d'application afin de favoriser une approche qui optimisera l'efficacité des biopesticides testés et d'assurer leur transition rapide sur le marché.

## OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'objectif général du présent projet est de réaliser les étapes requises de recherche et développement devant mener à la mise en marché des biopesticides les plus prometteurs pour les systèmes agricoles du Québec. Les objectifs spécifiques suivants seront abordés:

1. Sélectionner huit biopesticides (microorganismes ou produits naturels) les plus susceptibles d'être commercialisés au Québec dans un échéancier de trois ans. Par susceptible on entend les produits qui sont soit déjà homologués aux États-Unis et au Canada ou en voie de le devenir, ainsi que les produits développés au Québec qui ont déjà des acquis de succès potentiel.
2. Sélectionner les systèmes agricoles les plus adaptés pour l'utilisation des biopesticides retenus en 1). Par système agricole, on entend soit une culture particulière ou un système cultural particulier avec un ou des agents pathogènes ou ravageurs spécifiques.
3. Faire les études de laboratoire nécessaires pour compléter certaines exigences d'homologation des produits sélectionnés en 1). Ces études porteront le cas échéant sur : 1) la mise à l'échelle de la production massive du produit; 2) la formulation du produit; 3) la compréhension du mode d'action du produit; 4) la compatibilité du produit envers les produits conventionnels phytosanitaires utilisés dans les systèmes agricoles retenus pour les essais.
4. Obtenir les permis de recherche nécessaires auprès de l'ARLA pour la réalisation des études sur le terrain avec les biopesticides choisis.

5. Réaliser des tests d'efficacité des biopesticides sur au moins deux saisons selon les normes établies par l'ARLA dans les systèmes agricoles retenus en 2).
6. Comparer l'efficacité des biopesticides avec les systèmes conventionnels (pesticides) ainsi qu'entre les biopesticides sélectionnés s'attaquant au même problème phytosanitaire.
7. Déterminer les rendements des cultures sélectionnés en 2) sous traitement biopesticides versus pesticide chimiques.

### **3. PHASE 1 – R&D EN LABORATOIRE ET MISE À L'ÉCHELLE**

#### **4. ÉTAPE 1 – SÉLECTION DES BIOPESTICIDES**

##### **4.1.1 ACTIVITÉ 1 - REVUE DE LITTÉRATURE SUR LES BIOFONGICIDES**

#### **DÉFINITION**

La définition de Cook et Baker (1983) est acceptée et présente la lutte biologique comme la réduction de la densité de l'inoculum ou d'activités produisant la maladie par un agent pathogène ou parasite dans son état actif ou dormant, par un ou plusieurs organismes, réalisé naturellement ou par des manipulations de l'environnement, de l'hôte ou des antagonistes ou par une introduction de masse de un ou plusieurs agents antagonistes.

#### **AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS**

L'utilisation de biopesticides en agriculture comporte des avantages et des inconvénients. Voici une liste non exhaustive des bienfaits d'une telle lutte et les quelques inconvénients qui s'y rattachent.

##### *Avantages*

- ↳ Restreindre ou éliminer l'utilisation de pesticides chimiques
- ↳ Favoriser lors d'une utilisation en serre (culture serricole de haute valeur économique)
- ↳ Diminuer les risques de développer de la résistance
- ↳ Favoriser par le nombre restreint de fongicides homologués en serre
- ↳ Améliorer la qualité de vie des travailleurs agricoles
- ↳ Prévoir aucun délai avant la récolte
- ↳ Offrir aux consommateurs des produits sains
- ↳ Avoir une meilleure presse auprès des consommateurs
- ↳ Maintenir la biodiversité des biotopes.

##### *Inconvénients*

- ↳ Lutte souvent faite en prévention
- ↳ Effet moins drastique que les pesticides (plus d'applications)
- ↳ Seuil de tolérance très bas pour les maladies
- ↳ Peu d'organismes disponibles commercialement au Canada (2)
- ↳ Marché restreint pour le domaine serricole
- ↳ Efficacité pas toujours constante d'une production à l'autre
- ↳ Grande pression de la maladie
- ↳ Conditions d'entreposage des produits biologiques (demi-vie et température plus fraîche).

### INTRODUCTION

#### HISTORIQUE ET DIVERSITÉ DES PRODUITS

La lutte biologique des agents pathogènes est maintenant une sous-discipline dans la science de la phytopathologie. Bien qu'elle ait débuté il y a plus de 70 ans, c'est seulement autour de 1960 que la théorie et la pratique ont fait l'objet d'une première réunion (Baker et Snyder, 1965). Au cours des 20 dernières années, le nombre de recherche dans ce domaine a augmenté. Au cours des 10 dernières années, plus de 40 produits biologiques sont apparus sur le marché mais cela représente encore seulement une petite fraction du nombre et des ventes de produits chimiques destinés pour le champ, les vergers et la culture des arbres. En 1993, la vente des biofongicides représentait moins de \$1 million tandis que les ventes totales de fongicides excédaient \$5.5 billions. Pourtant, des estimateurs optimistes avaient projeté que les ventes des produits biologiques atteindraient \$15 millions avant l'an 2000... (Powell et Jutum, 1993). Cependant, l'agriculture destinée à la culture serricole et sous- abri offre une niche unique pour le développement et l'utilisation d'agents de lutte biologique. Sur les 33 produits biologiques commerciaux énumérés par Fravel et al. (1999), plus de la moitié ont une application dans les pépinières et les serres et plusieurs sont spécifiquement développés pour le contrôle des agents pathogènes du sol *Pythium* et *Rhizoctonia*, qui sont deux agents pathogènes majeurs dans les serres. La superficie totale en serre au monde est de 307 000 ha, incluant les serres de plastique et de verre (Guillino et al., 1999) tandis que la superficie totale cultivable en 1998, était de 1.51 billion ha (FOASTAT, 2000). La lutte biologique est plus intéressante dans les serres et cultures abritées qu'au champ, même si le secteur des serres représente seulement 0,02% de toute la zone utilisée pour faire l'agriculture.

L'environnement serricole présente une situation unique qui peut créer des conditions plus favorables pour le développement des maladies. Premièrement, plusieurs agents pathogènes ne peuvent être éliminés de l'environnement serricole : les spores qui entrent par les portes ou les moustiquaires, les agents pathogènes du sol qui entrent via la poussière, le sol contaminé sur les chaussures, les outils, ou les équipements; et plusieurs agents pathogènes sont introduits par les semences ou les transplants contaminés. Les agents pathogènes sous forme de zoospores (aquatiques) entrent via l'eau d'irrigation, les insectes transportent l'inoculum des champignons ou les maladies transmises par les virus. La température, la lumière et les programmes de fertilisation sont optimisés pour favoriser la croissance maximale des plantes mais malheureusement, ces conditions sont également favorables pour les agents pathogènes. De plus, la chaleur et l'humidité, causé par la transpiration des plantes et la mauvaise ventilation d'air vers l'extérieur fournissent des conditions idéales pour les agents pathogènes foliaires tels *Botrytis* et le blanc. À cause des coûts élevés en chauffage, la ventilation est souvent réduite afin de prévenir les pertes de chaleur. Les sols désinfectés ou les substrats tels la tourbe, la laine de roche manquent de diversités microbiennes et de la présence de tous les organismes biologiques qui se retrouvent naturellement dans les sols. En absence de compétiteurs les agents pathogènes du sol tels *Pythium* et *Rhizoctonia* peuvent rapidement se multiplier et se répandre. De plus, les stades de développement des plantes les plus souvent retrouvés dans les serres sont les semences, les plantules et les jeunes transplants, toutes des espèces également susceptibles aux attaques pathogéniques par la nature de leurs jeunes tissus succulents. Les hautes densités de plantation augmentent également les chances de développement de la maladie et la régie, qui inclut l'effeuillage et les récoltes, augmentent la dispersion et les infections par les blessures créés. Les systèmes hydroponiques, tels la laine de roche, les films nutritifs présentent d'autres sortes de problèmes de maladies (Paulitz, 1997). Dans les systèmes en recirculation fermée, les agents pathogènes aquatiques peuvent facilement se disperser dans l'eau du système.

Par contre, les conditions qui favorisent le développement des agents pathogènes favorisent également le contrôle des maladies par des agents de lutte biologique. Les conditions environnementales telles les températures et l'humidité relative peuvent être fortement contrôlées. Comme les pathogènes, les agents biologiques sont aussi sensibles aux conditions environnementales et celles régissant au champ sont souvent «plus aléatoires» été citées comme cause d'échec ou de succès plus ou moins marqués. Les conditions dans les serres peuvent être optimisées pour favoriser les agents biologiques. Par exemple, les agents biologiques du blanc sont plus efficaces quand l'humidité relative peut-être maintenue au-dessus de 80%, paramètre qui peut être facilement programmé sous des conditions serricoles (Bélanger et al., 1998; Jarvis et Slingsby, 1997).

Toute la logistique et l'aspect économique de l'application d'agents biologiques dans les serres sont plus avantageux que dans plusieurs applications au champ. Les productions serricoles ont une haute valeur économique et peuvent ainsi absorber un plus fort coût en intrants pour le contrôle des maladies. Les agents biologiques peuvent être appliqués directement dans les préparations de terreaux ou substrats, dans les systèmes de fertigation, pulvérisé sur les plantes ou par l'enrobage de semence de haute valeur économique. Il peut être appliqué plusieurs fois en serre ce qui ne serait pas aussi économique pour les productions de faible valeur au champ. À cause des espaces restreints et des plantation de forte densité, moins d'inoculum est requis lorsque comparé aux plantations extérieures.

Une autre raison pour laquelle la lutte biologique a trouvé une niche dans les serres est l'absence de fongicides homologués. Par exemple, jusqu'en 1999, aucun fongicide n'était homologué au Canada pour le contrôle de *Pythium* dans les productions légumières de serre. Les coûts élevés pour développer des produits chimiques et le faible retour sur l'investissement engagé considérant le petit marché que représente les serres n'incitent pas les grandes compagnies de l'agrochimie à travailler et homologuer de tels produits. De plus, les travailleurs sont très exposés aux pesticides chimiques dans les serres considérant les cultures de forte densité. La majorité des fongicides appliqués dans les serres exigent un délai avant d'entrer à nouveau dans les serres traitées et il faut également respecter un délai avant la récolte. En serre, l'effet des ultraviolets, de la température (pluies, rosées) et le lessivage sur les feuilles ou dans les substrats sont tous plus faibles en serre qu'au champ, ce qui confère aux pesticides une activité résiduelle plus importante. Finalement, le développement de la résistance aux fongicides par les agents pathogènes peut apparaître lorsqu'il y a une utilisation intensive du même produit suite à une mauvaise rotation des familles de produits ou à une utilisation abusive du même fongicide.

Il y a également un choix de société en ce qui concerne les effets des fongicides sur l'environnement, les écosystèmes et la santé des consommateurs. La gestion des technologies est plus facile dans les serres et les producteurs peuvent adopter plus facilement le contrôle biologique que les cultures en plein champ.

Cependant, les serres présentent également quelques contraintes qui peuvent limiter l'utilisation de la lutte biologique. À cause de la haute valeur commerciale des productions et l'emphase mis sur la qualité des produits en floriculture, productions légumières et plantes ornementales, il y a peu de place pour les dommages et les seuils de tolérance pour les maladies sont très bas. Si les agents biologiques ne peuvent performer de façon aussi efficace que les fongicides sur les cultures, ils ne pourront être adoptés.

Des cas de succès rapportant l'utilisation d'agents de lutte biologique pour combattre les pathogènes ont été rapportés dans la littérature (Bélanger et al., 1998; Harman, 2000). Des produits, pour contrôler les agents pathogènes du sol tels *Sclerotinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia* et *Fusarium*, inclut *Coniothyrium minitans*, des espèces de *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, des *Bacillus* et des *Fusarium* non-pathogène. Des produits contenant *Trichoderma*, *Ampelomyces quisqualis*, *Bacillus* et *Ulocladium* ont été développés pour contrôler les maladies foliaires causées par *Botrytis* et le blanc. Dans le futur, le contrôle biologique des maladies dans les serres pourrait dominer la lutte chimique, au même titre que le contrôle biologique contre les insectes. La lutte biologique contre les insectes et les acariens, de même que l'utilisation des bourdons dans les serres, ont fait diminuer considérablement l'utilisation des insecticides dans les productions

serricoles. Les résultats positifs générés par cette lutte biologique doivent maintenant être appliqués à l'égard des fongicides employés pour combattre les maladies. Cette lutte, si elle s'avère efficace, permettrait de rationaliser ou d'éliminer les fongicides actuellement utilisés.

## ÉTAT DE LA SITUATION AU CANADA

L'industrie serricole canadienne est relativement importante considérant la population du Canada (30 millions). En 1998, il y avait 4100 serres pour une superficie totale de 2583 ha sous serres de verre ou de plastique (Statistiques, 1998). Les légumes de serre sont évalués à \$285 millions CN, avec la production de la tomate en tête (\$164 millions), suivi du concombre (\$64 millions), poivrons (\$34 millions) et de la laitue (\$13 millions). La valeur des serres de tomate et de concombre a augmenté de 310% et 116% respectivement, depuis 1990. L'Ontario et la Colombie-Britannique sont les deux principaux producteurs de légumes.

Au Canada, en 2003, deux biofongicides sont homologués (Mycostop® et Sporodex®) et un autre produit a une homologation temporaire jusqu'en décembre 2003 (RootShield®) comparativement à plus de 50 biopesticides naturels à base de micro-organismes disponibles commercialement aux Etats-Unis ([http://epa.gov/pesticides/biopesticides/ai/all\\_ais.htm](http://epa.gov/pesticides/biopesticides/ai/all_ais.htm)).

## RECHERCHE, DÉVELOPPEMENT

Au Canada, hormis *Pseudozyma flocculosa* (consultez la section intitulée Sporodex) qui a obtenu une homologation temporaire en 2002, peu de produits sont en développement au Canada. Nous connaissons les travaux portant sur *Trichoderma harzianum* MAUL-20 (consultez la section intitulée MAUL-20) et sur *Pseudomonas fluorescens* 63-28, bactérie ayant des aptitudes à contrôler *Pythium aphanidermatum* dans les légumes de serre (concombre en particulier).

## CANDIDATS PROMETTEURS

Bien que l'on recense plus de 10 000 problèmes pathologiques, certains pathogènes (ou maladies) demeurent invariablement plus difficiles à réprimer et sont responsables d'une forte proportion des applications de fongicides en agriculture. Parmi ces maladies, la moisissure grise (et chancre de tige) causée par *Botrytis cinerea*, le blanc (ou Oïdium) causé par les Érysiphales, ainsi que les pourritures racinaires (et fontes de semis) causées entre autres par *Pythium* spp. causent des pertes annuelles importantes sur une vaste gamme de produits agricoles tant au niveau horticole que grande culture. C'est pourquoi plusieurs efforts de recherche ont récemment été investis dans le développement de biopesticides spécifiquement adaptés à la lutte contre ces maladies. Sur la base des plus récentes données scientifiques, les produits suivants apparaissent comme étant les plus susceptibles à un transfert technologique rapide vers les producteurs :

- ✓ MAUL-20 (*Trichoderma harzianum*)
- ✓ Serenade® (*Bacillus subtilis*)
- ✓ Sporodex® (*Pseudozyma flocculosa*)
- ✓ RootShield® (*Trichoderma harzianum*)
- ✓ Prestop® (*Gliocaldium catenulatum* J1446)

## ***TRICHODERMA HARZIANUM* MAUL-20**

### **INTRODUCTION**

Dans la nature, la plupart des micro-organismes sont utiles, tandis que d'autres constituent de véritables ennemis et entravent le développement de la plante et de son système racinaire. Certains agents pathogènes du sol sont responsables d'importantes pertes de récoltes en causant diverses maladies dont : **1**) pourritures des semences, **2**) fontes des semis, **3**) pourritures racinaires et **4**) flétrissements des plantes (Agrios, 1988; Anonyme, 1992) tandis que des parasites du phylloplan sont responsables des **1**) chancres de tiges, **2**) taches foliaires, **3**) flétrissement des plantes et **4**) pourritures sur les fruits, etc... (Agrios, 1988). Pour réduire l'importance de ces ennemis, les producteurs ont souvent recours à tout un arsenal de pesticides (Jarvis, 1993; Lumsden et Lewis 1989; Ole Becker et Schwinn, 1993) et de fumigants (Chet et Baker, 1981; Larkin et Fravel, 1998) avec des résultats souvent mitigés (Besnard et Davet, 1993; De Waard *et al.*, 1993; Jarvis, 1993) et des effets secondaires sur l'environnement et les organismes utiles parce que non sélectifs.

Les maladies sont complexes et difficiles à combattre parce que souvent initiées par des blessures ce qui facilitent l'entrée et la progression des champignons. Cette situation conduit à une utilisation abusive de pesticides chimiques de synthèse, qui polluent inutilement, créent des conditions favorables au développement de la résistance des ennemis (insectes, bactéries, nématodes et champignons) à ces produits et détruisent les organismes utiles (Harman, 1992).

Plusieurs micro-organismes peuvent, par contre, avoir un effet bénéfique dans le contrôle des champignons pathogènes et ainsi minimiser l'effet délétère des pesticides (Adams, 1990). La découverte de tels agents de lutte biologique et la démonstration de leur capacité à réduire l'incidence et la gravité des maladies ont tracé la voie à plusieurs recherches prometteuses (Alabouvette *et al.*, 1993; Bélanger et Labbé, 1994; Boland, 1990; Lewis et Papavizas, 1987). Dans ce contexte, une attention particulière a été portée aux champignons antagonistes, principalement à cause de leur potentiel à diminuer la densité de l'inoculum des champignons pathogènes (Dennis et Webster, 1971b; Elad *et al.*, 1982; Larkin et Favrel, 1998; Lockwood, 1988). Parmi les champignons antagonistes qui ont démontré un bon potentiel de lutte, *Trichoderma spp.* est sans contredit le plus rapporté dans la littérature (Elad *et al.*, 1982; Harman, 2000) ayant démontré des effets contre : *Pythium* (Bolton, 1980; Chet *et al.*, 1981; Clavet *et al.*, 1993); *Phytophthora cinnamomi* (Kelley, 1976), *Rhizoctonia solani* (Elad *et al.*, 1980; Lewis et Papavizas, 1987; Windham *et al.*, 1986); *Sclerotium rolfsii* (Backman et Rodriguez-Kabana, 1975), etc. Ces champignons pathogènes causent d'importants dégâts dans les cultures fruitières, légumières, serricoles et ornementales.

### **DESCRIPTION DU PRODUIT**

MAUL-20 est une souche de champignon appartenant au genre *Trichoderma*. Ce genre regroupe un ensemble de champignons imparfaits saprophytes qui est naturellement abondant dans le sol et la matière organique telle le bois mort ou en décomposition, les débris végétaux et la paille (Papavizas, 1985, Sippell *et al.*, 1985, Widden et Scattolin, 1988). Les espèces de ce genre possèdent également des aptitudes à dégrader de nombreux substrats organiques du sol pour se nourrir et se développer ce qui suggère qu'elles peuvent survivre dans plusieurs niches écologiques (Papavizas, 1985).

Dans une perspective de lutte biologique, il est important de sélectionner des isolats adaptés aux conditions climatiques du milieu et à l'écologie du parasite à combattre. Les propriétés antagonistes des diverses espèces de *Trichoderma* ne se manifestent qu'entre des limites précises de températures (Papavizas, 1985). Le spectre d'activité optimal de *Trichoderma* varie entre 18 et 25°C tandis que pour un agent pathogène comme *Botrytis cinerea*, il peut agir dans un spectre beaucoup plus large (entre 5 et 28°C). Le pouvoir

antagoniste d'un micro-organisme est également un critère de sélection important, sélection généralement effectuée *in vitro*, sur milieu de culture. Bien que contestable pour juger le comportement de l'antagoniste en nature, l'étude en laboratoire de ces modes d'action renseigne sur le potentiel d'un champignon antagoniste à l'égard du pathogène (Papavizas, 1985).

Caron (1993) a évalué le potentiel antagoniste de 142 souches indigènes de *Trichoderma* isolées à partir de sols provenant de différentes régions agricoles du Québec. De toutes ces souches, *Trichoderma harzianum* MAUL-20 fut la souche retenue en raison de son développement adapté aux conditions climatiques observées dans les serres au Québec. La vitesse de croissance de *Trichoderma*, à différentes températures, est connue puisque toutes les souches de *Trichoderma* ont subi une caractérisation thermique (entre 5 et 30°C par gradation de 5°C) ce qui permet de travailler avec des souches adaptées aux conditions climatiques où elles seront utilisées (Caron, 1993). Ce paramètre est important pour l'installation de l'agent biologique car plus sa vitesse de croissance sera grande, meilleures seront ses chances de s'établir rapidement et d'accroître le contrôle de la maladie. La vitesse de croissance est certes un facteur important mais elle peut également être contournée en appliquant plus tôt l'agent antagoniste dans le but de favoriser son installation avant l'arrivée de l'agent pathogène. *Trichoderma* est également sensible aux variations climatiques (sécheresse, basses températures).

L'agressivité de l'isolat et son pouvoir antagoniste sont également des critères de premier ordre puisqu'en l'absence de tels pouvoirs, les propriétés de l'agent biologique seront affaiblies (Papavizas, 1985). Plusieurs jours sont requis par l'antagoniste pour augmenter son pouvoir (arme offensive) et prévenir les infections par les agents pathogènes à l'inverse de la lutte chimique qui a une efficacité palpable dès l'application. À conditions égales, pendant que l'antagoniste devient progressivement efficace, la lutte chimique perd graduellement de son efficacité. Le fort potentiel antagoniste de MAUL-20 contre *Botrytis cinerea*, un champignon pathogène des organes aériens de la tomate, a été démontré sur des plants cultivés en serre au Québec (Caron et al., 1994 à 97). *Botrytis cinerea* est responsable de la moisissure grise et cause les plus grandes pertes monétaires dans les légumes de serre au Québec et ce, particulièrement dans sa forme conduisant à la production de chancres de tige. La maladie sévit même dans les serres très bien contrôlées puisque la principale porte d'entrée pour l'agent pathogène est provoquée lors de l'effeuillage. Au cours des dernières années, le potentiel antagoniste de *T. harzianum* MAUL-20 a également été démontré contre les agents pathogènes des substrats dans les cultures serricoles (productions légumières et plantes ornementales) (Caron et al., 2002).

Une technique de production massive de spores de *Trichoderma* a également été mise au point (Caron et al., 1994a; 1998, 2002; 2003). Nous savons, suite aux tests effectués, que *Trichoderma* ne cause pas de stress aux plants, qu'il n'a pas d'effets négatifs observés sur le développement des plants et qu'il peut accroître la production (Caron et al., 2002a). En production commerciale, *Trichoderma* a permis d'accroître les rendements de 7% par rapport aux parcelles traitées chimiquement (Caron et al., 1994b). Par contre, pour que *Trichoderma* soit efficace, il doit être appliqué en prévention. Selon Davet et Camporota (1986), à mesure que les traitements *Trichoderma* augmente, la population initiale augmente assurant un niveau croissant de contrôle. Par contre, à l'arrêt des traitements, les populations de *Trichoderma* diminuent et sont ramenées à son niveau initial lors de l'arrêt définitif des traitements.

Selon Caron (2002b), l'emploi de l'agent biologique *Trichoderma harzianum* MAUL-20 tel qu'il est disponible actuellement, permettrait de :

- ✓ Restreindre l'utilisation de fongicides en agriculture : protection du consommateur et de l'environnement;
- ✓ Favoriser le développement des plantes en l'absence d'agents pathogènes dans les substrats (effet stimulant);

- ✓ Offrir un contrôle efficace, *in vitro*, contre *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), *Pythium ultimum*, *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thielaviopsis basicola* et *Verticillium dahliae*;
- ✓ Contrôler efficacement, *in vivo*, *Botrytis cinerea*, FORL, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thielaviopsis basicola* et *Verticillium dahliae* et à un niveau moindre, *Pythium ultimum* et *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*;
- ✓ Survivre et se multiplier dans les substrats pour toute la période de germination et de production des semis;
- ✓ Lutter efficacement contre plusieurs agents pathogènes présents en même temps dans un substrat;
- ✓ Se comporter de façon égale ou supérieure à un biofongicide actuellement homologué au États-Unis (Rootsheild®);
- ✓ Offrir un produit facile à manipuler, disponible sous forme de poudre mouillable, pour les arrosages ou les incorporations directes au substrat;
- ✓ Ne laisser aucun résidu sur les fruits;
- ✓ Être compatible avec la majorité des pesticides chimiques;
- ✓ Être d'utilisation sécuritaire en production commerciale (aucune nocivité pour les utilisateurs, l'environnement, le consommateur et les cultures).

L'emploi de l'agent biologique *Trichoderma harzianum* MAUL-20 permettrait également les caractéristiques économiques suivantes (Caron, 2002b) :

Le domaine serricole, la production de transplants, les pépinières ornementales et forestières et la culture ornementale sont les principaux secteurs visés pour l'utilisation de *Trichoderma*. Plusieurs secteurs d'application sont déjà connus pour une utilisation éventuelle du produit développé.

**Le domaine serricole** est un secteur à privilégier suite aux nouveaux modes de production. En effet, **1)** les fortes densités de plantation, **2)** les conditions de productions intensives (~ 11 mois par année), **3)** les variétés performantes mais de moins en moins rustiques, **4)** l'abandon de culture en pleine terre pour opter pour des substrats artificiels (sacs de tourbe, laine de roche), **5)** l'humidité permanente entretenue aux racines par le système d'arrosage favorisant certains pathogènes (ex. *Pythium*) et **6)** une protection chimique insatisfaisante fournissent les conditions requises au développement des organismes pathogènes des racines et du collet. La protection par les auxiliaires biologiques devient donc une solution alternative attendue et espérée.

**La production de transplants** pour le champ est un secteur important en agriculture. Les avantages qu'offre l'utilisation des transplants pour le champ sous nos conditions particulières de production sont nombreux : **1)** demande de plus en plus forte de Primeurs, **2)** prolonger la période de production, **3)** favoriser les productions à jour long, etc... . Par contre, le matériel produit en serre doit être exempt de maladies et l'ajout de l'agent de lutte biologique *Trichoderma* au terreau servirait de «police d'assurance» en plus de poursuivre son travail de protection des racines et de colonisation des sols une fois installé au champ.

**La production ornementale** (fleurs annuelles, paniers suspendus, plantes vivaces, potées fleuries, etc...) est en pleine effervescence. Avant que les fleurs arrivent dans les différents points de vente, de nombreuses pertes dues aux maladies ont déjà été enregistrées dans les serres de production. Les plantes sont produites en serre au cours de l'hiver ou tôt au printemps avec tous les avantages et inconvénients qui s'y rattachent. La ventilation est moins efficace et les arrosages sont fréquents ce qui créent des conditions propices au développement des maladies. Par exemple, *Botrytis* cause fréquemment la fonte de semis chez différentes fleurs annuelles (chrysanthème, muflier, tagète, zinnia, etc...).

## MODE D'ACTION ET PRINCIPE ACTIF

Trois modes d'action sont principalement utilisés par *Trichoderma* dans la lutte aux agents pathogènes (Baker et Cook, 1982; Whipps, 1992, Papavizas, 1985). Il y a **1**) la compétition, **2**) le mycoparasitisme et **3**) l'antibiose. Ces modes d'action peuvent par contre être utilisés en synergie. Les modes 1 et 3 étant les plus communs. Ces modes d'action permettent à *Trichoderma* de s'installer prioritairement avant l'agent pathogène ce qui facilite sa survie et conservation dans le milieu.

### Compétition et mycoparasitisme

La compétition permet à *Trichoderma* d'utiliser les ressources du milieu aux dépens de l'agent pathogène tandis que le parasitisme fait référence à l'altération ou la destruction des hyphes de l'agent pathogène par des mécanismes de prédation et/ou de lyses enzymatiques (chitinases et  $\beta(1,3)$  glucanases) (Harman et al., 1993; Widden et Scuttolin, 1988).

Lors de nos tests avec MAUL-20 et *B. cinerea*, la compétition et le mycoparasitisme se sont manifestés par contact entre les deux antagonistes : **1**) La croissance de l'agent pathogène s'arrête tandis que celle de *Trichoderma* se poursuit et envahit l'agent pathogène ou **2**) au contact entre les deux protagonistes, *Trichoderma* sporule abondamment avant de poursuivre sa progression vers l'agent pathogène. Lors de la compétition, *Trichoderma* croît fréquemment en parallèle avec son hôte et s'attache au mycélium de l'hôte par des crochets ou haustorium soit par enroulement ou appressorium. La dégradation des parois mycéliennes se fait grâce à la présence d'enzymes telles les  $\beta(1,3)$  glucanases, les chitinases et parfois des cellulases (Elad et al., 1983; Harman et al., 1993; Papavizas, 1995). L'enroulement des hyphes de *Trichoderma* autour de ceux de l'agent pathogène *Botrytis* a été mis en évidence par Scanning Electronic Microscopy (SEM) (Bélanger et al., 1995; Caron, 1993). Les hyphes de *Botrytis* étaient collapsés et les spores de *Botrytis* avaient amorcé une germination afin d'assurer la survie de l'espèce. Il est intéressant de considérer que les hyphes de *Botrytis* sont gros comparativement à ceux de *Trichoderma* et que dans certaines situations, cette barrière physique peut devenir un obstacle à la pénétration.

De plus, *Trichoderma* a un effet inhibiteur sur les sclérotés de *Botrytis* (Dubos et al., 1982). Il diminue le nombre de conidies provenant des sclérotés par effet putrescible, ce que les fongicides ne font pas. *Trichoderma* inhibe également la formation de nouveaux sclérotés.

Lors des différentes expériences réalisées, le mode de compétition a été mis en évidence sur les blessures d'effeuillage puisque *Trichoderma* ne détruit pas ou n'empêche pas les autres micro-organismes de croître contrairement aux fongicides (Caron et al., 1994 à 97).

### Antibiose

L'antibiose se manifeste par un arrêt de la croissance mycélienne des deux champignons. *In vitro*, aucune évolution des champignons dans le temps n'est observée et les fronts mycéliens sont séparés par une zone claire, généralement de 3 à 5 mm (Caron, 1993). Ghisalberti et Sivasithamparam (1991) ont décrit une batterie de substances antibiotiques produites par *Trichoderma* qui serait responsable de leurs propriétés antagonistes. Bélanger et al (1995) ont démontré, dans l'interaction entre *Trichoderma* et *Botrytis*, que l'antibiose et le parasitisme par des enzymes pouvaient être impliqués, simultanément ou séquentiellement. Dans ce cas, des changements au niveau de la membrane de *Botrytis* ont été détectés 12 heures avant un contact physique entre les deux antagonistes. Cette réaction a été suivie par une perturbation graduelle et généralisée du cytoplasme et une perte complète de la turgescence des cellules (24 heures plus tard). Dans tous les échantillons étudiés, cette réaction a toujours été observée avant la pénétration de *T. harzianum* dans

les cellules de l'hôte. Les changements ultrastructuraux notés, incluant la rétraction de la membrane, affaissement des organelles, désintégration cytoplasmique et la perte de turgescence, sont des manifestations typiques de cellules fongiques exposées à des antibiotiques (Klecan et al., 1990; Hajlaoui et al., 1992; Hajlaoui et Bélanger, 1993).

## **SPECTRE D'ACTIVITÉ**

*Trichoderma* MAUL-20 a été étudié dans le phylloplan et les substrats commerciaux contre différents agents pathogènes les plus agressifs sur les cultures vivrières et ornementales.

### **Phylloplan**

- ❖ *Botrytis cinerea* (moisissure grise) de la fraise (Caron, 1993)
- ❖ *Botrytis cinerea* (moisissure grise) de la tomate de serre (*Lycopersicon esculentum* cv Trust) (Caron et al., 1994a, 1994b, 1995a et 1996)

### **Substrat**

- ❖ *Botrytis cinerea* (moisissure grise) de la tomate de serre (*L. esculentum* cv Capello) (Caron et al., 1993)
- ❖ *Pythium ultimum*, *P. aphanidermatum* (concombre seulement), *Rhizoctonia solani* et *Verticillium dahliae* sur tomate (*L. esculentum*), concombre (*Cucumis sativus*), Pétunia (*Petunia x hybrida*) (Caron et al., 2002a seulement) et Muflier (*Antirrhinum majus*) (Caron et al., 2002a et 2003).

Dans toutes les expériences réalisées dans le phylloplan, il a été observé que *Trichoderma* perturbait peu la microfaune existante contrairement aux fongicides qui ont une action plus drastique.

## **COMPATIBILITÉ**

*Trichoderma* est reconnu pour avoir un large spectre de tolérance vis-à-vis les pesticides comparativement à beaucoup de micro-organismes du sol (Harman, 2002; Papavizas, 1985). De plus, *Trichoderma* possède la capacité de coloniser les sols traités chimiquement. Il peut être appliqué avec les mêmes appareils que ceux employés pour pulvériser les pesticides chimiques.

Les tests effectués en laboratoire (Caron et al., 1993; 1994a; Venne et al., 2003 (non publié)) ont permis d'établir la charte de compatibilité de *Trichoderma* MAUL-20 avec les pesticides les plus couramment utilisés dans les serres (tab. 1 et 2). MAUL-20 est compatible avec tous les insecticides vérifiés et résistant ou tolérant à la majorité des fongicides. Par contre, MAUL-20 est sensible à la famille des captanes, produit largement utilisé dans les serres.

**Tableau 1.** Charte de compatibilité de *Trichoderma* avec les fongicides chimiques utilisés dans les serres

Fongicide		Statut
nom commercial	matière active	R ou S ou T*
Aliette WDG	fosetyl-al	R
Benlate	bénomyl	R
Botran	dichloran	R
Copper spray	oxychlorure de cuivre	R
Decree 50 WDG	fenhexamid	R
Ferbam 76 WDG	ferbame	T
Folpan 50 WP	folpet	S
Maestro	captane	T
Captan 50 W	captane	S
Captan 80 W	captane	S
Supra Captan 80 WDG	captane	R
Manzate 200 DF	mancozèbe	S
Meltatox	dodémorphe-acétate	R
No-Damp	oxine de benzoate	S
Nova 40WP	myclobutanil	R
Rovral	iprodione	R
Senator 70 WP	thiophanate-méthyl	R
Soufre microfin 92%	soufre	R
Thiram 75 WP	thirame	T
Truban 25EC	étridiazole	R

**Remarque :** \* = R = Résistant au produit testé  
 S = Sensible au produit testé  
 T = Tolérance au produit testé

**Tableau 2.** Charte de compatibilité de *Trichoderma* avec les insecticides chimiques utilisés dans les serres

Insecticide		Statut
nom commercial	nom commun	R ou S ou T*
Ambush 50 EC	perméthrine	R
Avid 1,9% EC	abamectine	R
Decis 5 EC	deltaméthrine	R
Diazinon 500	diazinon	R
Dyno-Mite	pyridaben	R
Enstar II	s-Kinoprène	R
Kelthane	dicofol	R
Orthène T&O Spray	acéphate	R
Pirliss 50 DF	pirimicarbe	R
Savon insecticide	acides gras	R
Thiodan 50 WP	endosulfan	R
Trumpet 80 WP	bendiocarbe	R

Parallèlement à la recherche et développement de *Trichoderma* MAUL-20, d'autres moyens de contrôle, autres que les pesticides chimiques de synthèse, ont été intégrés et combinés à MAUL-20 dans le but de contrer la moisissure grise (Caron et Thibodeau, 1996). En laboratoire, des effeuillages ont été simulés sur des tiges de tomate afin de provoquer des blessures fraîches et différents agents de désinfection ou de barrières physiques ont ensuite été appliqués sur ces sites de blessures et comparés à des :

- 1) tiges témoins (effeuillage seulement)
- 2) tiges traitées avec *Botrytis cinerea* seul
- 3) tiges traitées avec *Trichoderma* MAUL-20 seul
- 4) tiges traitées avec *Trichoderma* MAUL-20 et *B. cinerea* seul
- 5) tiges traitées avec *B. cinerea* + agent de désinfection
- 6) tiges traitées avec *Trichoderma* MAUL-20 seul + agent de désinfection
- 7) tiges traitées avec *Trichoderma* MAUL-20 et *B. cinerea* seul + agent de désinfection

Les agents de désinfection testés étaient :

- a) hypochlorite de sodium
- b) jus de citron
- c) alcool éthylique
- d) peroxyde d'hydrogène
- e) iode organique
- f) acide acétique
- g) bicarbonate de soude
- h) iode
- i) soufre
- j) chaux soufrée.

Suite à ces tests, *Trichoderma* serait tolérant envers l'alcool 70 et 95%, l'eau de javel à 0,5, 1 et 2%, le soufre et la chaux soufrée aux concentrations de 0,5, 1 et 1,5% (tab. 3). Par contre, ces produits n'ont aucun effet sur *Botrytis* seul. Dans le tandem *Trichoderma* – *Botrytis*, lorsque *Trichoderma* est appliqué en premier, suivi par *Botrytis*, l'alcool, l'eau de javel et le soufre assureraient un certain contrôle de la maladie sans affecter *Trichoderma*.

**Tableau 3. Effet du produit de désinfection sur *Botrytis cinerea*, *Trichoderma* MAUL-20 ou en combinaison et lorsqu'il est appliqué seul sur les blessures d'effeuillage**

Produit testé	Seul	Effet du produit		
		<i>Botrytis</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Botrytis + Trichoderma</i>
Alcool 70%	S	R	R	S
Alcool 95%	S	R	R	S
Eau de javel 0,5%	S	R	R	S
Eau de javel 1%	S	R	R	S
Eau de javel 2%	S	R	R	S
Peroxyde d'hydrogène 7,5%	R	R	S	R
Peroxyde d'hydrogène 15%	S	R	S	R
Peroxyde d'hydrogène 30%	S	R	S	R
Jus de citron 25%	S	R	S	R
Jus de citron 50%	S	R	S	R
Acide acétique 5%	R	R	S	R
Acide acétique 10%	R	R	S	R
Bicarbonate de soude 10%	R	R	S	R
Bicarbonate de soude 25%	R	R	S	R
Iode 2,5%	R	R	S	R
Iode 5%	R	R	S	R
Soufre 0,5%	S	R	R	S
Soufre 1%	S	R	R	S
Soufre 1,5%	S	R	R	S
Chaux soufrée 0,5%	S	R	R	R
Chaux soufrée 1%	S	R	R	R
Chaux soufrée 1,5%	S	R	R	R

### TESTS D'EFFICACITÉ EN LABORATOIRE ET/OU EN SERRE

Les agents antagonistes doivent être sélectionnés sur la base de leurs propriétés antagonistes en culture pure et sur leur habileté à combattre l'agent pathogène sur les organes cibles, en conditions contrôlées. La compétitivité saprophytique a été démontrée comme un pré-requis important pour *Trichoderma* dans le biocontrôle des champignons à sclérotés.

**Expériences en laboratoire,** *Trichoderma* MAUL-20 a démontré des aptitudes à combattre la moisissure grise dans un écart se situant entre 15 et 25°C. Par contre, son potentiel de croissance sous différents régimes de températures (5 à 30°C, par gradation de 5°C) est connu. MAUL-20 a démontré une activité antagoniste contre 3 souches de *Botrytis cinerea* (souches à spores, à sclérotés et hybride) selon les exigences thermiques pré-établies et sa compétitivité saprophytique a été déterminée selon la méthode des disques foliaires et des

tiges de tomate (Caron, 1993; 1994a) Cette méthode est basée sur une échelle d'évaluation du nombre de conidiophores présents sur l'organe cible. Cette technique donne une bonne indication de l'activité éprouvée de l'agent antagoniste au champ.

L'agressivité de la souche MAUL-20 a également été comparée à 3 souches européennes (B11, ACC L1 et ACC C3) (Caron, 1994a). Dans tous les cas, sauf dans le témoin, aucune présence de l'agent pathogène *Botrytis* n'a été décelée. La présence de *Trichoderma* a été répertoriée sur 25% des tissus traités avec ACC L1 et B11, 18 à 25% des tissus ont été colonisés par *Trichoderma* MAUL-20 et une faible présence de ACC C3 a été notée.

Le milieu de culture et la technique de production massive de spores de *Trichoderma* en «glacière» ont été modifiés au fil des ans afin de permettre une production accrue de la biomasse dans un temps plus court tout en diminuant les coûts de fabrication. Ainsi, la technique de production en «glacière» permettait de produire une quantité importante de spores viables après 6 jours de croissance sur un milieu semi-solide (Caron, 1994a). Cette technique a été remplacée par la technique en «plateau» et permet de récolter les spores après 3 j de croissance sur un milieu solide alimenté d'une cellulose raffinée (microcristalline de 20 µm), produit dégradé par les *Trichoderma* (Caron et al., 2003).

### **Expériences en serres expérimentales ou commerciales dans le PHYLLLOPLAN**

À moins d'avis contraire, les expériences ont été réalisées sur des plants de tomate (cv Capello ou Trust) et avec l'agent pathogène *Botrytis cinerea*, selon une régie standard de la production de la tomate (laine de roche). Toute la biomasse de *Trichoderma* a été produite selon la technique de production massive en «glacière» et MAUL-20 titrait pour 10<sup>9</sup> CFU / g et a été appliqué à un taux de 0,2%.

Les applications ont été effectuées immédiatement après l'effeuillage à l'aide d'un pulvérisateur manuel à dos de 10 litres (type solo (40 PSI)) dans les serres expérimentales et de type «maison» d'une capacité de 170 litres (100 PSI; buses de type D2-D3) ou de 2000 litres (100PSI) en serres commerciales. Toutes les pulvérisations ont été effectuées sur la partie effeuillée de la tige seulement. Aucun problème n'a été observé lors des pulvérisations et le produit biologique ne bouche pas les buses.

Au début de la recherche sur *Trichoderma*, deux souches biologiques québécoises (MAUL-20 et MAUL - 131) présentaient un potentiel biologique pour le contrôle des agents pathogènes en serre (Caron et al., 1994b) Une expérience en serre expérimentale a permis de retenir *Trichoderma* MAUL-20 comme candidat ayant de meilleures aptitudes à combattre la maladie. Les rendements obtenus (tab. 4) dans le traitement témoin étaient supérieurs aux plants traités avec MAUL-20, fongicides et MAUL-131 respectivement. Par contre, seuls les plants traités avec MAUL-20 ont permis une éradication complète de la maladie. De plus, l'analyse de la microflore présente sur les tissus a permis de constater qu'un plus grand nombre de micro-organismes se retrouvait dans le traitement biologique, comparativement aux traitements fongicides, démontant un effet plus clément de la lutte biologique.

**Tableau 4.** Poids et qualité des fruits de tomate et présence de maladie et des agents biologiques sur les tiges de tomate – serre expérimentale, Sainte-Foy

Traitement	Poids fruits #1 (Kg)	Qualité des fruits #1	Présence de <i>Botrytis</i> sur tige (%)	Présence de MAUL-20 sur tige
<b>Témoin</b>	154	qualité constante	< 10	-
<b>MAUL-20</b>	142	plus de fruits difformes	0	++
<b>Fongicide</b>	131	plus de fruits petits	< 10	-
<b>MAUL-131</b>	130	Plus aléatoire	< 10	++

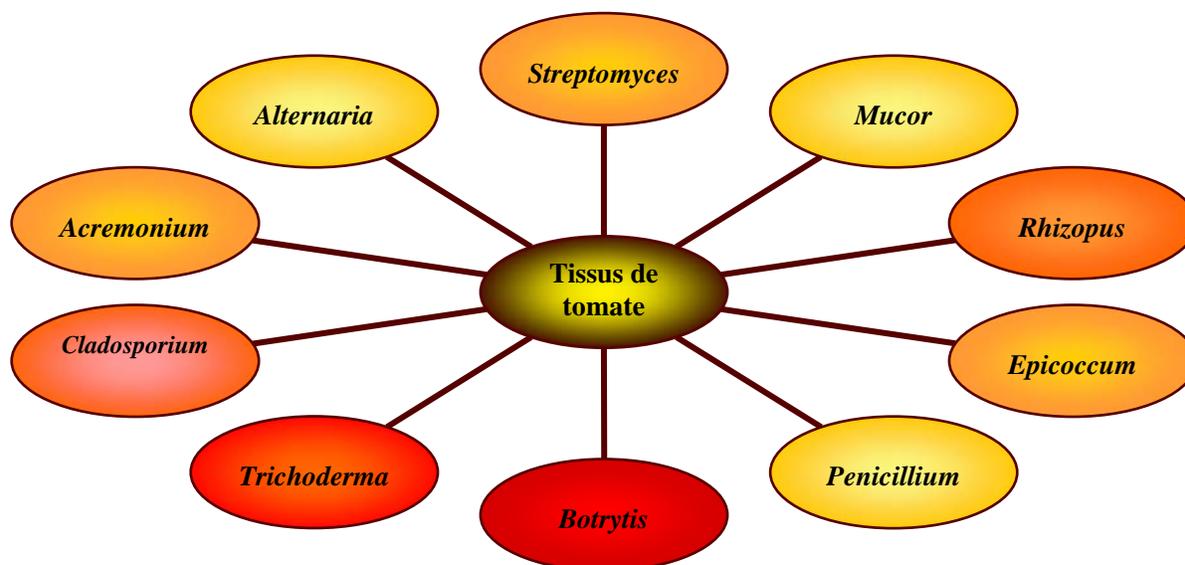
Suite à cette sélection de *Trichoderma* MAUL-20, son activité biologique a été comparée aux traitements conventionnels employés en production commerciale, à un système d’alternance entre MAUL-20 et fongicides et à un témoin (Caron et al., 1995a). L’expérience a été réalisée dans une serre qui avait la particularité d’être difficile à ventiler en hiver; ce qui pouvait favoriser le développement de la maladie (*B. cinerea*). En production commerciale, lorsque des chancres sont observés sur les plants, ils sont enlevés et badigeonnés avec le fongicide Ferbam (appliqué sous forme de pâte). Cette opération a pour but de freiner le développement de la maladie et limiter les foyers d’infestation. Le tableau 5 montre le pourcentage de chancres enlevés et badigeonnés qui ont permis de contrôler ou non la maladie. Malgré l’installation tardive d’une parcelle témoin, une grande quantité de chancres a été répertoriée. Les plants traités chimiquement présentaient un peu moins de maladie que ceux traités biologiquement.

**Tableau 5.** Pourcentage de chancres enlevés sur les tiges de tomate – serre commerciale, Estrie

Traitement	% de chancres enlevés, badigeonnés et contrôlés	% de chancres enlevés, badigeonnés et NON contrôlés
<b>Témoin</b>	64	< 3
<b>MAUL-20</b>	52	< 5
<b>Alternance</b>	n/d	n/d
<b>Fongicide</b>	48	< 1

Les observations effectuées sur les tiges AVANT et APRÈS les traitements visaient à vérifier si *Trichoderma* pouvait se développer et s’installer entre les traitements. En général, dans le traitement biologique et alternance, *Trichoderma* a été observé sur plus de 50% des tissus mais sur moins de 50% de la surface du tissu. Le traitement fongique présentait peu de micro-organismes. La figure 1 schématise l’inventaire des micro-organismes présents sur les tissus de tomate.

**Figure 1.** Microorganismes répertoriés sur les tissus de tiges ou de feuilles de tomate de serre – Estrie



Les rendements dans ce complexe commercial se situaient, à l'époque, entre 0,8 e 1,2 Kg/m<sup>2</sup>/sem. Avec le traitement biologique, nous avons obtenu 0,95 Kg/m<sup>2</sup>/sem comparativement à 0,89 Kg/m<sup>2</sup>/sem pour la parcelle traitée chimiquement, soit une augmentation de 7%.

Dans un autre essai effectué serre expérimentale, l'efficacité de *Trichoderma* MAUL-20 a été comparée à Trichodex (un produit Israélien à base de *Trichoderma*) à réprimer la moisissure grise sous différentes influences d'humidité relative (haute et normale) (Caron et al., 1995b). *Trichoderma* MAUL-20 a été comparé à **1**) témoin, **2**) Trichodex 25WP (10<sup>10</sup> cfu/g), **3**) fongicides, **4**) alternance entre les traitements fongicides et biologiques (2 traitements biologiques pour 1 fongicide) et **5**) alternance entre les traitements fongicides et un témoin (2 fois sans traitement pour 1 fongicide). Une inoculation de la maladie (*Botrytis cinerea*) a été effectuée en début de production pour assurer un certain niveau de la maladie dans les serres. Un traitement phytosanitaire a été réalisé aux 2 semaines. L'humidité relative influence grandement le comportement des souches de *Trichoderma* et de *Botrytis*. Le développement des plants s'est effectué normalement dans les conditions réelles de production tandis que dans la serre très humide, la croissance a été ralentie et la propagation de la maladie favorisée. Dans la serre humide plus de 90% des plants sont morts en cours de production comparativement à 12% pour l'autre serre. La maladie est apparue dans les serres lors des grands froids et faible luminosité (janvier/février). Les traitements Trichodex et fongicides ont été très rapidement affectés par la maladie. Les meilleurs traitements ont été *Trichoderma* MAUL-20 et l'alternance entre un produit biologique et les fongicides (tab. 6).

**Tableau 6.** Nombre de plants de tomate morts causés par *Botrytis cinerea*, cultivés sous différents régimes d'humidité relative

Traitement	nombre de plants morts Serre humide ( / 36 plants)	nombre de plants morts Serre normale( / 36 plants)
<b>Trichodex</b>	30	2
<b>Alternance (Témoin / fongicide)</b>	27	2
<b>Fongicide</b>	25	3
<b>Témoin</b>	23	6
<b>MAUL-20</b>	21	3
<b>Alternance (<i>Trichoderma</i> / fongicide)</b>	20	3

Dans la serre à humidité normale, les rendements ont été près de 2 fois plus élevés que dans la serre humide (tab. 7). *Trichoderma* MAUL-20 est plus tolérant à l'humidité que Trichodex, qui par contre, a fourni de meilleurs rendements en condition normale. Le traitement alternances (témoin/fongicide) est une bonne alternative aux fongicides. La rotation entre les fongicides et le témoin suggère qu'un travail minimal sur les plants est moins stressant que tous les autres traitements puisque le traitement chimique ne revenait qu'à chaque six semaines (traitement effectué aux 2 semaines).

**Tableau 7.** Rendement en fruits de tomate cultivés sous différents régimes d'humidité relative

Traitement	Rendement (Kg) en fruits de catégorie #1 Serre humide	Rendement (Kg) en fruits de catégorie #1 Serre normale
<b>Trichodex</b>	57	146
<b>Alternance (Témoin / fongicide)</b>	98	155
<b>Fongicide</b>	73	123
<b>Témoin</b>	79	104
<b>MAUL-20</b>	71	113
<b>Alternance (<i>Trichoderma</i> / fongicide)</b>	75	123

Des traitements ont été appliqués à différentes fréquences afin de déterminer si un traitement aérien hebdomadaire est nécessaire pour le contrôle de la moisissure grise. Les traitements comprenaient **1**) témoin, **2**) *Trichoderma* MAUL-20 (1 x / semaine), **3**) *Trichoderma* MAUL-20 (1 x / 2 semaines), **4**) alternance (*Trichoderma* / fongicide), **5**) fongicide (1 x / semaine) et **6**) fongicide (1 x / 2 semaines) (Caron et al., 1995c). Une inoculation de la maladie (*Botrytis cinerea*) a été effectuée en début de production pour assurer un certain niveau de la maladie dans les serres. Des différences majeures ont été observées entre les fréquences d'application et entre les traitements. Une application aux deux semaines apparaît plus efficace que les traitements effectués hebdomadairement. Lorsque la maladie est présente, les traitements conventionnels sont plus performants mais ils sont suivi de très près par le traitement alternance (tab. 8). Des rendements élevés ont été obtenus dans les parcelles traitées aux deux semaines. Le traitement alternance a permis d'avoir des résultats intermédiaires entre les traitements effectués hebdomadairement et ceux réalisés aux deux semaines.

**Tableau 8.** Nombre de chancres répertoriés sur les plants et rendement en fruits de tomate

Traitement	Nombre de chancres Serre normale ( / 36 plants)	Rendement en fruits de catégorie #1 (kg)
<b>Témoin</b>	42	35
<b>Alternance (MAUL-20 / fongicide)</b>	11	46
<b>MAUL-20 (1 x / sem)</b>	18	41
<b>MAUL-20 (1 x / 2 sem)</b>	13	56
<b>Fongicide (1 x / sem)</b>	10	38
<b>Fongicide (1 x / 2 sem)</b>	8	58

En serres expérimentales, les meilleurs traitements retenus au cours des expériences antérieures et qui pouvaient offrir une alternative intéressante aux pesticides chimiques de synthèse ont été testés à nouveau selon la régie de la production commerciale. Les traitements retenus étaient **1)** témoin, **2)** *Trichoderma* MAUL-20 (1 x / 2 semaines), **3)** fongicide (1 x / 2 semaines), **4)** alternance (*Trichoderma* / fongicide) et **5)** alternance (Témoin / fongicide) (Caron et al., 1995a). Très peu de plants morts ont été observés dans les serres. Le traitement MAUL-20 (1x/2 sem) offre d'excellents rendements et un bon contrôle de la maladie (tab. 9). Le traitement alternance (MAUL-20 / fongicide) serait également une bonne alternative, étant similaire à alternance (témoin / fongicide) mais protégeant mieux les plants contre la maladie.

**Tableau 9.** Nombre de plants morts à cause de *Botrytis cinerea* et rendement

Traitement	Nombre de plants morts Serre #1	Nombre de plants morts Serre #2	Rendement (Kg) en fruits Serre #1	Rendement (Kg) en fruits Serre #2
<b>Témoin</b>	1	3	57	70
<b>Alternance (MAUL-20 / fongicide)</b>	2	0	77	62
<b>Alternance (témoin / fongicide)</b>	2	7	72	76
<b>Fongicide (1 x / 2 sem)</b>	1	0	53	64
<b>MAUL-20 (1 x / 2 sem)</b>	0	4	82	70

Les meilleurs traitements obtenus en serres expérimentales ont été vérifiés dans deux serres commerciales. Dans la serre #1, *Trichoderma* MAUL-20 a été comparé à **1)** alternance (*Trichoderma* / fongicide), **2)** fongicide et **3)** témoin (Caron et al., 1997). Suite à ces tests, la classification des traitements pour le contrôle de la maladie pouvait se lire ainsi (tab. 10) :

<b>Alternance (<i>Trichoderma</i> / fongicide) &gt; fongicide &gt; témoin* &gt; <i>Trichoderma</i></b>
--

\* Le témoin avait été traité sur 2 mois avant son installation définitive comme témoin ce qui a contribué à diminuer le nombre de chancre dans cette parcelle.

La majorité des chancres sont apparus en janvier et février, période critique pour la maladie dans les gros complexes serricoles. Par contre, aucune différence significative n'a été notée au niveau des rendements.

**Tableau 10.** Nombre de chancres répertoriés sur les plants et rendement en fruits de tomate, Estrie

Traitement	Nombre de chancres Serre #1	Rendement (Kg) en fruits Serre #1	Rendement (Kg/m <sup>2</sup> /sem) en fruits Serre #1
Témoin	521	6983	0.98
Alternance (MAUL-20 / fongicide)	472	7043	0.99
fongicide	508	7079	1.00
MAUL-20	627	6983	0.98

Dans la serre #2, *Trichoderma* MAUL-20 a été comparé à **1**) alternance (*Trichoderma* / fongicide), **2**) *Trichoderma* MAUL-20 (1 x / sem), **3**) *Trichoderma* MAUL-20 (1 x / 2 sem), **4**) fongicide (1 x / sem), **5**) *Trichoderma* MAUL-20 (1 x / 2 sem) et **6**) témoin (Caron et al., 1997). Suite à ces tests, la classification des traitements pour le contrôle de la maladie pouvait se lire ainsi (tab. 11) et aucune différence n'a été enregistrée au niveau des rendements.

**Alternance (*Trichoderma* / fongicide) > fongicide (1x / sem) > fongicide (1x / 2 sem) > *Trichoderma* (1x / sem) > *Trichoderma* (1x / 2 sem) > témoin**

**Tableau 11.** Nombre de chancres répertoriés sur les plants et rendement en fruits de tomate, Portneuf

Traitement	Nombre de chancres Serre #2	Rendement (Kg) en fruits Serre #2	Rendement (Kg/m <sup>2</sup> /sem) en fruits Serre #2
Témoin	324	5755	1,09
Alternance ( <i>Trichoderma</i> / fongicide)	151	5365	1,02
Fongicide (1x / sem)	158	5560	1,05
Fongicide (1x / 2 sem)	186	5643	1,07
<i>Trichoderma</i> (1x / sem)	298	5977	1,13
<i>Trichoderma</i> (1x / 2 sem)	319	5560	1,05

### Expériences en serres expérimentales ou commerciales dans les SUBSTRATS

L'objectif général de ce projet était d'éliminer l'utilisation de fongicides de synthèse et de fumigants pour la répression des champignons pathogènes dans les substrats par l'utilisation d'un biofongicide éprouvé d'une souche du champignon antagoniste *Trichoderma harzianum* spécifiquement adaptée aux conditions climatiques du Québec. Les objectifs spécifiques étaient **1**) Évaluer, *in vitro*, l'activité antagoniste de *T. harzianum* contre huit champignons pathogènes importants dans les substrats : *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), *Pythium ultimum*, *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thielaviopsis basicola* et *Verticillium dahliae*. **2**) Évaluer en serre, dans cinq terreaux commerciaux, la performance de *T. harzianum* vis-à-vis chaque champignon pathogène contre lesquels *Trichoderma* est le plus efficace *in vitro*. **3**) Déterminer la dose d'inoculum minimale requise de *T. harzianum* pour assurer le meilleur contrôle des agents pathogènes racinaires dans les

substrats. **4)** Évaluer, en serre, l'efficacité de *T. harzianum* lorsque confronté à plusieurs agents pathogènes présents dans le même substrat; **5)** Comparer l'efficacité de notre souche indigène de *T. harzianum* avec un produit disponible commercialement et homologué aux États-Unis (Rootsheild®) et **6)** Tester l'efficacité de *T. harzianum* en serre commerciale.

*Trichoderma harzianum* est efficace contre tous les agents pathogènes testés *in vitro*. Il lutte par contre plus difficilement contre *P. ultimum* et *P. nicotiana* var. *parasitica*. *Trichoderma harzianum* croît également très rapidement sur un milieu de culture, ce qui devrait l'avantager lors des confrontations *in situ* et pour la colonisation rapide des niches écologiques. *Trichoderma harzianum* devra être ajouté au substrat à une concentration de  $10^6$  cfu/g de sol comparativement à  $10^3$  à  $10^4$  cfu/g de sol pour la majorité des agents pathogènes. *Trichoderma harzianum*, lorsqu'il est ajouté au substrat, n'est pas pathogène pour les plantes; il stimule même le développement de celles-ci lorsqu'il est appliqué à une concentration supérieure à  $10^5$  cfu/g de sol (Caron et al., 2003).

Les différentes expériences portant sur le choix d'un système de production ont permis de sélectionner le système (Substrat + *Trichoderma*) + agents pathogènes. L'introduction de l'agent de lutte biologique au substrat au moins 2 semaines avant l'arrivée de l'agent pathogène est l'approche à privilégier (4; 46). Pour le producteur, il est plus avantageux de permettre à l'agent de lutte biologique de s'établir *a priori* dans les substrats avant l'arrivée des agents pathogènes. En permettant à *T. harzianum* de coloniser la rhizosphère en premier lieu, celui-ci pourra créer plus facilement son manchon protecteur autour du système racinaire empêchant ainsi, aux différents agents pathogènes potentiels, l'accès aux sites recherchés. Il met alors à profit un de ses modes d'action : la compétition (Papavizas 1985). Par le fait même, la répression de l'ennemi à combattre est facilitée.

En général, *T. harzianum* colonise très bien les différents terreaux et il est en mesure d'assurer une bonne protection du système racinaire. Le terreau PRO-MIX BX permet un meilleur développement des plantes que les terreaux Véranda (trop lourd) et Mycorhizes. Ce terreau comporte un champignon mycorhizien qui est reconnu pour avoir une action prédatrice sur *Trichoderma* (Clavet et al., 1993). Effectivement, au cours des différentes expériences, nous avons constaté que *T. harzianum* et les agents pathogènes se développaient peu dans ce substrat. Par contre, le développement de la plante était également très réduit. Est-ce que le phénomène observé provient d'une action non ciblée des mycorhizes présents dans le terreau? Globalement, *T. harzianum* protège bien :

- **Les plantes ornementales contre :** *B. cinerea*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *T. basicola* et *V. dahliae*.
- **Les plantes légumières contre :** *B. cinerea*, FORL, *R. solani* (concombre seulement), *S. sclerotiorum*, *T. basicola* (tomate seulement) et *V. dahliae*.

Lorsque différentes combinaisons d'agents pathogènes ont été inoculées aux différents terreaux, préalablement ensemencés avec *T. harzianum* deux semaines avant, il ressort que lorsque *P. ultimum* et/ou FORL sont présents, il y a développement de la maladie. Cette constatation est vraie pour toutes les plantes étudiées. De plus, le concombre est sensible à *V. dahliae* et la tomate à *R. solani*. *Trichoderma harzianum* réussit à s'établir, à se développer et à assurer la protection du système racinaire des plantes même lorsque confronté à plusieurs champignons pathogènes dans le même terreau. Le terreau Véranda est «trop lourd» ce qui affecte le développement des plantes et par conséquent, favorise plus l'expression de la maladie. Il est vrai que ce terreau convient plus à la transplantation qu'à la germination et production de semis.

Les traitements effectués aux deux complexes serricoles comportaient des applications de *Trichoderma* dans les cubes de laine de roche, au niveau du système racinaire lors **1)** du repiquage seulement, **2)** de la plantation seulement; **3)** du repiquage et à la plantation. Le témoin était composé des plants traités selon la régie conventionnelle employée par le producteur. Les résultats obtenus en serres commerciales sont

encourageants. Malgré le faible niveau de maladies dans les serres, *T. harzianum* n'a pas eu d'effets négatifs sur le développement du système racinaire et de la plante. Même si aucune différence significative n'a été observée entre les différents traitements, l'introduction de *T. harzianum* au substrat devrait se faire à la plantation. Une légère augmentation des rendements a été enregistrée dans ce traitement. La même tendance a été notée pour les deux complexes serricoles. Les observations effectuées sur les racines des plants inoculés dans les serres commerciales ont permis de constater que *T. harzianum* ne détruisait pas ou n'éliminait pas les micro-organismes existants mais les empêchait de pénétrer à l'intérieur des racines.

Les tests effectués avec *T. harzianum* MAUL-20 ont démontré une efficacité similaire et dans certains cas, supérieure au biofongicide Rootshield (Caron et al., 2002a, 2002b). Cette constatation est très importante puisque notre biofongicide *T. harzianum* MAUL-20 a été appliqué à une concentration qui est 10 fois inférieure à celle recommandée pour Rootshield® (Harman, 2000; Larkin and Fravel, 1998). De plus, Rootshield® est issu d'une fusion protoplasmique de deux souches de *Trichoderma harzianum* (Harman, 2000; Stasz et al., 1988) tandis que *T. harzianum* MAUL-20 est une souche indigène au Québec. Plusieurs recherches mentionnent qu'une souche indigène de *Trichoderma* n'est pas aussi bonne compétitrice de la rhizosphère que celles ayant reçu un caractère spécifique (Ahmad and Baker, 1988; Papavizas, 1985). Nos données démontrent un effet simulant de *T. harzianum* MAUL-20 sur le développement de la plante et de son système racinaire, ce qui se traduit par un développement aérien accru et une meilleure compétitivité de la plante lorsque confrontée à différents agents pathogènes (*P. ultimum*, *R. solani* et FORL). Ces résultats rejoignent ceux énoncés par Sivan and Chet (1989) qui ont démontré qu'une souche indigène de *Trichoderma* pouvait très bien se développer et compétitionner dans la rhizosphère.

## MARCHÉ ET PRODUCTION

La production a débuté dans un premier temps selon la technique de la «glacière» qui consistait à faire croître *Trichoderma* sur un milieu semi-solide et à récolter les spores 6 jours plus tard. La matière était ensuite centrifugée, lyophilisée et mise sous vide. L'inoculum de départ titrait pour  $1 \times 10^8$  spores / ml. Lors de l'hydratation de la poudre, l'agent mouillant aqua-aid était à privilégier (Caron et al., 1994b).

*Trichoderma harzianum* peut être cultivé en utilisant différents modes de production, chacun comportant des avantages et des inconvénients. La méthode actuelle de production en plateaux est très simple d'opération et elle produit un bon rendement en spores (Caron et al., 2002b). Cependant, elle pose un problème de taille pour la production à l'échelle industrielle puisque l'augmentation de la capacité de production exigerait une augmentation proportionnelle en surface d'opération. Par contre, nous avons appris que la compagnie américaine Bioworks, Inc., qui produit Rootshield®, le fabriquerait dans des conditions similaires à celle que nous employons actuellement. Les essais réalisés en fermenteur ne se sont pas révélés aussi avantageux qu'on l'aurait espéré. Premièrement, pour bien travailler avec ce genre d'équipements, il faut des gens compétents. Il y a toute une démarche à respecter et il est important de bien maîtriser tous les paramètres de production et le fonctionnement du fermenteur avant de se lancer corps et âme dans ce type de production. Nous avons eu la chance de travailler avec un ingénieur chimiste au début du projet. Malgré tous les efforts déployés, nous sommes arrivées à la même conclusion que les autres équipes de recherche dans le monde : *Trichoderma* peut être difficilement produit en fermenteur. La culture statique peut toujours être utilisée en fermenteur mais pour des raisons d'ordre économique (coût de la main d'œuvre, coût énergétique, maintenance du matériel, etc....), elle est moins intéressante que la production actuelle en plateaux.

*Trichoderma* semble trouver des conditions optimales de croissance sur un support solide qui lui permet d'être exposé à l'air au moment de la sporulation (Caron et al., 2002b). Ces conditions se trouvent dans la culture statique actuelle ainsi que dans la fermentation solide statique (FSS) en colonne ou encore dans le fermenteur à disques rotatifs (FDR). Si la FSS était envisagée, il faudrait trouver un substrat convenable, probablement des fibres végétales. Les fibres du jus V8 se sont avérées un bon substrat pour la croissance mais idéalement, il faudrait qu'elles soient plus grossières afin de permettre la présence d'air entre elles et par

conséquent, permettre la croissance et la sporulation du mycélium. Finalement, le FDR semble une alternative très innovatrice et prometteuse qu'il n'a pas été possible d'évaluer en profondeur.

## CONCLUSIONS ET POTENTIELS DE *TRICHODERMA HARZIANUM* MAUL-20

La culture de la tomate est particulièrement difficile pendant les mois de l'année où l'énergie lumineuse est faible. Pendant cette période, les plants deviennent plus vulnérables et la moisissure grise en profite pour faire son apparition. De plus, le nombre de produits phytosanitaires actuellement disponible pour lutter contre la moisissure grise dans la culture de la tomate de serre est très limité. Ce phénomène force les sericulteurs à utiliser régulièrement les mêmes fongicides ce qui augmente les risques de développement de la résistance. Considérant la moisissure grise comme la principale maladie chez la tomate en serre, des alternatives de lutte doivent être sérieusement envisagées.

Aucune trace de phytotoxicité ou retard de croissance n'a été observé dans toutes les expériences réalisées avec la préparation biologique à base de *Trichoderma* MAUL-20. Aucun résidu n'a été détecté sur les fruits de tomate et pas de baisses de rendements ont été notés dans les expériences, ce qui est très positif.

Les expériences réalisées ont également permis de vérifier que la préparation biologique pouvait être appliquée sans aucun problème et en utilisant les méthodes conventionnelles employées pour pulvériser les fongicides. *Trichoderma* «cohabite» avec les micro-organismes présents à la surface des plants ce qui signifie qu'il n'a pas un effet aussi drastique des fongicides. Cette observation permet d'avancer que les plants sont moins stressés lorsqu'ils sont traités avec un produit plus doux comme ceux biologiques.

Si la lutte biologique au sens strict du terme est souvent difficilement réalisable, la lutte intégrée serait, par contre, une avenue très intéressante et prometteuse. En effet, plusieurs des expériences réalisées au cours des dernières années ont permis de démontrer que l'alternance entre les traitements biologiques et chimiques offrait souvent des résultats supérieurs aux traitements chimiques ou biologiques seuls. Pour avoir une lutte efficace, il faut que *Trichoderma* soit installé en prévention i.e. avant l'arrivée de l'agent pathogène. Il est souvent mentionné dans la littérature d'introduire *Trichoderma* une semaine avant la plantation et par expérience, nous pouvons affirmer que deux semaines est préférable.

De part sa nature, l'activité antagoniste de *Trichoderma* est extrêmement dépendante des conditions climatiques sous lesquelles il est utilisé. Dans ce contexte, une souche développée en France, en Israël ou ailleurs dans le monde ne serait pas aussi efficace au Québec puisqu'elle n'est pas adaptée aux conditions de culture spécifiques à nos régions. Ces facteurs mettent en relief la nécessité de fournir aux producteurs québécois une solution à ce problème récurrent, solution qui doit tenir compte de leurs besoins spécifiques. *Trichoderma* MAUL-20 offre les caractéristiques suivantes :

1) **Être indigène** : Le principal avantage économique du biofongicide *Trichoderma* MAUL-20, et il vaut de l'or, est que la souche est **indigène** au Québec. Nous savons, par expérience et par le contenu littéraire, qu'un organisme de lutte biologique peut être très efficace *in vitro* mais échouer lorsqu'il est utilisé *in vivo*. L'efficacité de l'agent de lutte est extrêmement dépendante des conditions climatiques et de la région de production sous lesquelles il sera employé. Le biofongicide *Trichoderma* MAUL-20 a été sélectionné à des fins serricoles et, jusqu'à maintenant, il a démontré un excellent potentiel *in vitro* et *in vivo*.

2) **La vocation** : Les tests comparatifs que nous avons effectués en serre avec *Trichoderma* MAUL-20 ont démontré que le produit Trichodex (Israël) était peu efficace à réprimer la moisissure grise sur la tomate de serre comparativement à la souche québécoise et ensuite, *Trichoderma* MAUL-20 a fourni une réponse similaire ou supérieure au biofongicide homologué Rootsheild®.

3) Le principal problème observé dans la littérature concernant la préparation et l'élaboration d'un biofongicide est l'omission d'un paramètre crucial : **la température**. C'est, en bonne partie, la clef du succès. Encore aujourd'hui, ce paramètre est régulièrement oublié. Une souche performante aux températures du champ n'est pas nécessairement efficace et active dans les conditions serricoles et l'inverse est également vrai. Notre banque de 142 souches de *Trichoderma* a été caractérisée à des températures variant entre 5 et 30°C, par gradation de 5°C. Les souches (MAUL-57, MAUL-111 et MAUL-157) que nous avons employées au champ contre la moisissure grise de la fraise avaient des caractéristiques différentes de *Trichoderma* MAUL-20 utilisé en serre.

4) **Les conditions d'utilisation** : Les conditions particulières du Québec en hiver incitent les producteurs serricoles à favoriser les produits indigènes parce qu'ils savent qu'ils sont bien adaptés à nos conditions climatiques. En hiver, le contrôle de l'humidité relative dans les serres est tout un défi et les variations de températures et d'humidité à l'intérieur de la serre peuvent parfois engendrer des écarts importants qu'un biofongicide «étranger non-ciblé» supporte plus difficilement.

## RÉFÉRENCES *TRICHODERMA HARZIANUM* MAUL-20

---

1. **Adams, P.B. 1990.** The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28 : 59-72.
2. **Agrios, G.N. 1988.** *Plant Pathology*. 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press, New-York. 803 pp.
3. **Ahmad, J.S., and R. Baker. 1988.** Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 34 : 229-234.
4. **Alabouvette, C., P. Lemanceau and C. Steinberg. 1993b.** Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. *Pestic. Sci.* 37 : 365-373.
5. **Anonyme. 1992.** *Noms des Maladies des Plantes au Canada*. Société de Protection des Plantes du Québec. 477 pp.
6. **Backman, P.A., and R. Rodriguez-Kabana. 1975.** A system for the growth delivery of biological control agents to the soil. *Phytopathology* 65 : 819-821.
7. **Baker, K.F. and R.J. Cook, eds. 1982.** *Biological Control of Plant Pathogens*. St Paul: APS Press 433 pp.
8. **Bélanger, R.R., N. Dufour, J. Caron and N. Benhamou. 1995.** Chronological events associated with antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* : Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology* 5 : 41-53.
9. **Bélanger, R.R., and C. Labbé. 1994.** Commercial-scale control of rose powdery mildew with a fungal antagonist. *Plant Dis.* 78 : 420-424.
10. **Besnard, O., et P. Davet. 1993.** Mise en évidence de souches de *Trichoderma* spp. à la fois antagonistes de *Pythium ultimum* et stimulatrices de la croissance des plantes. *Agronomie* 13 : 413-421.
11. **Boland, G.J. 1990.** Biological control of plant diseases with fungal antagonists : Challenges and opportunities. *Can. J. Plant Pathol.* 12 : 295-299.
12. **Bolton, A.T. 1980.** Control of *Pythium aphanidermatum* in poinsettia in a soilless culture by *Trichoderma viride* and *Streptomyces* spp. *Can. J. Plant Pathol.* 2 : 93-95.
13. **Caron, J., L. Laverdière et P.O. Thibodeau. 2003.** Amélioration des qualités nutritionnelles du milieu de culture utilisé pour produire *Trichoderma*, afin d'en maximiser le potentiel antagoniste. Rapport de recherche, CRAAQ. 44 pp.
14. **Caron, J., L. Laverdière, P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 2002a.** Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. *Phytoprotection* 83 : 73-87.

15. **Caron, J., L. Laverdière, P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 2002b.** Contrôle biologique des micro-organismes pathogènes dans les substrats à l'aide d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum*. Rapport de recherche – projet #98-FP-0096, FPGST-E, 166 pp.
16. **Caron, J., P.O. Thibodeau et F. Charrier. 1998.** Technique rapide de production massive d'inoculum de micro-organismes : cas de *Trichoderma* et de *Botrytis*. *Phytoprotection* 79 : 97.
17. **Caron, J., L. Laverdière et P.O. Thibodeau. 1997.** Évaluation d'un biofongicide à base de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la tomate de serre – phase 2. Rapport de recherche, Serres du St-Laurent. 43 pp.
18. **Caron, J., P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 1996a.** Évaluation d'un biofongicide à base de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la tomate de serre – deuxième expérience. Rapport de recherche, Université Laval. 16 pp.
19. **Caron, J. et P.O. Thibodeau. 1996b.** Évaluation de diverses techniques de prévention de la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) sur les tiges de tomate. Rapport de recherche, MAPAQ et Syndicat des producteurs en serre du Québec. 29 pp.
20. **Caron, J., C. Roy et R.R. Bélanger. 1995a.** Évaluation de différentes souches de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la tomate de serre sous deux niveaux d'humidité relative. Rapport de recherche, Université Laval. 75 pp.
21. **Caron, J., P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 1995b.** Évaluation d'un biofongicide à base de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la tomate de serre. Rapport de recherche, Serres du St-Laurent et Club d'encadrement technique Pro-Serre. 40 pp.
22. **Caron, J., P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 1995c.** Évaluation d'un biofongicide à base de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la tomate de serre – deuxième expérience. Rapport de recherche, Programme d'aide à l'innovation technologique, Entente Auxiliaire Canada-Québec. 56 pp.
23. **Caron, J., P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 1994a.** Sélection d'isolats de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la tomate de serre. Rapport de recherche, Club d'encadrement technique Pro-Serre. 48 pp.
24. **Caron, J., P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 1994b.** Évaluation d'un biofongicide à base de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la tomate de serre. Rapport de recherche, Club d'encadrement technique Pro-Serre. 52 pp.
25. **Caron, J. 1993.** Isolement et caractérisation de divers isolats de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la fraise. Thèse M.Sc. no 12 350, Université Laval, Québec. 121 pp.

26. **Caron, J., P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 1993.** Isolation et caractérisation de diverses souches de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise dans la production de la fraise. Rapport final de recherche – CORPAQ – projet #1A1-41696634-134. 47 pp.
27. **Chet, I., and R. Baker. 1981.** Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71 : 286-290.
28. **Chet, I., G.E. Harman, and R. Baker. 1981.** *Trichoderma harzianum* : Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbiol. Ecol.* 7 : 29-38.
29. **Clavet, C., J. Pera, and J.M. Barea. 1993.** Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant Soil* 148 : 1-6.
30. **Davet, P. et P. Camporota. 1986.** Étude comparative de quelques méthodes d'estimation de l'aptitude à la compétition saprophytique dans le sol des *Trichoderma*. *Agronomie* 6 : 575-581.
31. **Dennis, L. and J. Webster. 1971b.** Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57 : 41-48.
32. **De Waard, M.A., S.G. Georgopoulos, D.W. Hollomon, H. Ishii, P. Leroux, N.N. Ragsdale, and F.J. Schwinn. 1993.** Chemical control of plant diseases: problems and prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31 : 403-421.
33. **Dubos, B., F. Jailloux et J. Bulit. 1982.** Protection des vignobles contre la pourriture grise : les propriétés antagonistes du *Trichoderma* à l'égard du *Botrytis cinerea*. Pages 205-218 dans *La Sélection des Plantes*, Bordeaux.
34. **Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Henis. 1982.** Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73 : 85-88.
35. **Elad, Y., I. Chet and J. Katan. 1980.** *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotinia rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 119-121.
36. **Ghisalberti, E.L. and K. Sivasthamparam. 1991.** Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.* 23 : 1011-1020.
37. **Hajlaoui, M.R. and R.R. Bélanger. 1993.** Antagonism of the yeast-like phylloplane fungus *Sporothrix flocculosa* against *Erysiphe graminis* var. *tritici*. *Biocontrol Science and technology* 3 : 427-434.
38. **Hajlaoui, M.R., N. Benhamou and R.R. Bélanger. 1992.** Cytochemical study of the antagonistic activity of *Sporothrix flocculosa* on rose powdery mildew, *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*. *Phytopathology* 82 : 583-589.
39. **Harman, G.E. 2000.** Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84 : 377-393.

40. **Harman, G.E. 1992.** Development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens. *J. Plant Nut.* 15:835-843.
41. **Harman, G.E., C.K. Hayes, M. Lorito, R.M. Broadway, A. Di Pietro, C. Peterbauer and A. Tronsmo. 1993.** Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* : purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83 : 313-318.
42. **Jarvis, W. R. 1993.** *Managing Diseases in Greenhouse Crops.* 2<sup>nd</sup> Ed. APS Press, Minnesota. 288 pp.
43. **Kelley, W.D. 1976.** Evaluation of *Trichoderma harzianum* - impregnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinnamoni* causing damping-off of pine seedlings. *Phytopathology* 66 : 1023-1027.
44. **Klecan, A.L., S. Hippe and S.C. Somerville. 1990.** Reduced growth of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* induced by *Tilleopsis pallescens*. *Phytopathology* 80 : 325-331.
45. **Larkin, R.P., and D.R. Fravel. 1998.** Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Dis.* 82 : 1022-1028.
46. **Lewis, J.A., R.P. Larkin, and D.L. Rogers. 1998.** A formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* to reduce damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen in soilless Mix. *Plant Dis.* 82 : 501-506.
47. **Lewis, J.A., and G.C. Papavizas. 1987.** Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for controls of *Rhizoctonia solani* damping-off. *Plant Pathol.* 36 : 438-446.
48. **Lockwood, J.L. 1988.** Evolution of concept associated with soilborne plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26 : 93-121.
49. **Lumsden, R.D. and J.C. Locke. 1989.** Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. *Phytopathology* 79 : 61-366.
50. **Ole Becker, J., and F.J. Schwinn. 1993.** Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi : status and outlook. *Pestic. Sci.* 37 : 355-363.
51. **Papavizas, G.C. 1985.** *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23 : 23-54.
52. **Sippell, D.W., J.G.N. Davidson, and R.S. Sadasivaiah. 1985.** *Rhizoctonia* root rot of raspberry in the peace region of Alberta. *Can. J. Plant Pathol.* 7 : 184-186.
53. **Sivan, A., and I. Chet. 1989.** The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79 : 198-203.
54. **Stasz, T.E., G.E. Harman, and N.F. Weeden. 1988.** Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia* 80 : 141-150.

55. **Whipps, J.M. 1992.** Status of biological disease control in horticulture. *Biocontrol Science and Technology* 2:3-24.
56. **Widden, P. and V. Scattolin. 1988.** Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycologia* 80 : 795-803.
57. **Windham, M.T., Y. Elad, and R. Baker. 1986.** A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76 : 518-521.

## **SPORODEX® (*PSEUDOZYMA FLOCCULOSA*)**

### **INTRODUCTION**

Les blancs (ou Oïdium) causés par les Érysiphales sont des champignons pathogènes ubiquistes de la phyllosphère de nombreuses cultures au champ et serricole. Malgré l'étude intensive de leur épidémiologie et pathogénicité, cette maladie demeure encore aujourd'hui parmi les problèmes pathogéniques les plus importants dans le monde. En serre, le blanc est particulièrement agressif à cause des conditions environnementales favorables qui accélèrent leur développement (Bélanger et Benyagoub, 1997). Ils attaquent de nombreuses espèces de plante et sont prédominants dans les trois cultures les plus importantes en serre : les roses, le concombre et la tomate (Bélanger et Benyagoub, 1997; Bélanger et Jarvis, 1994). Pris ensemble, ces trois productions comptent pour plus de 50% de la valeur totale des ventes en serre (Statistics Canada, 1998). Bien qu'il soit difficile d'estimer la valeur exacte des pertes attribuées au blanc, le coût pour leur contrôle peut atteindre \$6000 CN/ha/année. *Pseudozyma flocculosa* (Traquair, L.A., Shaw & Jarvis) Boekhout & Traquair est l'agent antagoniste le plus récemment identifié dans la lutte contre le blanc et probablement le plus efficace des agents antagonistes en développement contre cette maladie (tab. 12).

**Tableau 12.** Produits ou agents biologiques rapportés pour avoir une activité contre le blanc

	<b>Produits</b>	<b>Mode d'action</b>	<b>Référence</b>
<b><u>Organismes vivants</u></b>			
<b>Bactéries</b>	<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade)	Parasitisme / antibiose / Résistance induite	Highland, 2000
<b>Champignons</b>	<i>Ampelomyces quisqualis</i> (AQ-10) <i>Verticillium leucanii</i> <i>Acremonium alternatum</i> <i>Cladosporium</i> spp. <i>Tilletiopsis</i> spp. <i>Pseudozyma rugulosa</i> <i>Pseudozyma flocculosa</i> (Sporodex)	Parasitisme Parasitisme / antibiose Parasitisme Antibiose Antibiose Antibiose	Sztejnberg et al., 1989 Askary et al., 1998 Malathrakis, 1985 Sundheim et Tronsmo, 1988 Hijwegen, 1986 Jarvis et al., 1989 Hajlaoui et Bélanger, 1991
<b>Arthropodes</b>	<i>Orthotydeus lambi</i>	Parasitisme	Gadoury et al., 1998

### **DESCRIPTION DU PRODUIT**

Le champignon *Pseudozyma flocculosa* a été isolé en 1986 des feuilles du trèfle des prés, *Trifolium pratense*, infecté de blanc, *Erysiphe polygoni*, par des chercheurs d'Agriculture et agroalimentaire Canada, à Harrow (Ontario). *Pseudozyma flocculosa* a été découvert en même temps qu'une espèce proche, *P. rugulosa* (Traquair, J.A., Shaw, L.A & W.R. Jarvis) Boekhout, T. et J.A. Traquair (Traquair et al., 1988).

Traquair et al. (1988) ont décrit, au début, les deux espèces comme étant des levures ascomycètes ayant un état anamorphique dans le genre *Sporothrix* et un état téléomorphique dans le genre *Stephanoascus*. Cependant, en 1995, ils ont été reclassés comme des Deutéromycètes de l'anamorphe des Ustilaginales sous

le genre *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout suite à une analyse d'ADN ribosomique (Boekhout, 1995). Le *Pseudozyma flocculosa* est une phyllosphère épiphyte et un hyperparasite principalement du blanc (Bélanger et Deacon, 1996). Il est très répandu en Amérique du Nord ainsi qu'en Europe sur les surfaces aériennes des plantes dans les champs et dans les écosystèmes agricoles en serre. Les tableaux 13 et 14 résument la description du micro-organisme (ARLA, 2002).

Jarvis et al. (1989) ont été les premiers à rapporter que les deux champignons étaient de puissants agents antagonistes contre le blanc du concombre *Sphaerotheca fuliginea*. Par contre, *P. flocculosa* était plus actif que *P. rugulosa* sous certaines conditions environnementales. Les deux mêmes antagonistes ont démontré une efficacité similaire contre *S. pannosa* var. *rosae* et *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, agents responsables du blanc sur les roses et le blé respectivement (Hajlaoui et Bélanger, 1991; 1993). De plus, *P. rugulosa* et *T. washingtonensis* ont des exigences plus restreintes en regard de la température et de l'humidité relative que *P. flocculosa*.

Ces résultats ont suscité un intérêt commercial pour le développement de *P. flocculosa* comme biofongicide. La compagnie Plant Products Co. Ltd. (Brampton, Ontario) ont acquis les droits exclusifs et assurer la recherche en vue de la commercialisation du produit Sporodex® (à base de *P. flocculosa*). Tous les investissements de la compagnie ont été jumelés à ceux du gouvernement provincial (programme Synergie) et fédéral (CRSNG). Au cours des dernières années, les travaux sur *P. flocculosa* ont permis de franchir les étapes scientifiques, légales et administratives requises pour l'homologation d'un micro-organisme. C'est au Québec, à l'Université Laval, que tout le développement s'est effectué, permettant d'acquérir une expérience unique dans le développement d'agents antagonistes.

**Tableau 13.** Détermination de la matière active de qualité technique (MAQT)

<b>Microorganisme actif</b>	<i>Pseudozyma flocculosa</i> (souche PF-A22 UL)
<b>Utilité</b>	Fongicide biologique
<b>Nom scientifique</b>	<i>Pseudozyma flocculosa</i> (Traquair, J.A., Shaw, L.A & W.R. Jarvis) Boekhout, T. et J.A. Traquair, souche PF-A33 UL
<b><u>Rang taxonomique</u></b>	
<b>Royaume</b>	Champignons
<b>Phylum</b>	Deuteromycotina
	Champignon asexuel du groupe des dématiaccés
<b>Genre</b>	<i>Pseudozyma</i>
<b>Espèce</b>	<i>flocculosa</i>
<b>Souche</b>	PF-A22 UL
<b>Renseignements relatifs à un brevet canadien</b>	Un brevet a été accordé à la compagnie Plant Products Co. Ltd, Canada

**Tableau 13 (suite).** Détermination de la matière active de qualité technique (MAQT)

<b>Microorganisme actif</b>	<i>Pseudozyma flocculosa</i> (souche PF-A22 UL)
<b>Pureté nominale de la matière active</b>	La souche PF-A22 UL de l'organisme <i>Pseudozyma flocculosa</i> est composée à 100% de matière active en milieu de fermentation épuisé correspondant à un minimum de $3 \times 10^8$ cellules de souches unipotentes (CFU)/ml de la souche PF-A22 UL du champignon <i>Pseudozyma flocculosa</i> .  1,3% p/p (équivalent à un minimum de $3 \times 10^8$ CFU/ml) dans le SPORODEX L (préparation commerciale).
<b>Nature des impuretés pertinentes d'importance toxicologique, environnementale et autre</b>	Le produit de qualité technique ne contient aucune impureté, ni micropolluants. La souche PF-A22 UL ne produit aucune toxine connue active contre les mammifères.

**Tableau 14.** Préparation commerciale de SPORODEX L

Propriété	SPORODEX L
<b>État physique à 25C</b>	Liquide
<b>Couleur</b>	Beige
<b>Odeur</b>	Faible odeur de champignon
<b>pH dans l'eau distillée</b>	6,4 – 6,8
<b>Densité</b>	1,05 g/ml
<b>Viscosité</b>	51 centipoises
<b>Corrosivité</b>	aucune

Le SPORODEX L doit être utilisé sous forme de solution aqueuse préparée en diluant 500 ml du produit dans 100 L d'eau (équivalent à approximativement  $10^5$  à  $10^6$  CFU/ml). Un agent mouillant à une concentration finale de 0,02% est ajouté pour améliorer son efficacité. Les plantes doivent être traitées dès que les conditions environnementales sont propices pour la croissance du blanc ou dès le premier signe de la maladie. Les plantes doivent être traitées par pulvérisation jusqu'au point d'écoulement à des intervalles d'une semaine. L'humidité relative doit être maintenue à plus de 70% pendant 12 heures après l'application du produit.

## MODE D'ACTION ET PRINCIPE ACTIF

Une étape cruciale dans la lutte biologique est de bien comprendre les propriétés des agents antagonistes. Des études cytologiques et microscopiques ont indiqué que *P. flocculosa* ne pénètre pas à l'intérieur de l'hôte mais qu'il induisait plutôt une plasmolyse rapide des cellules du blanc (Hajlaoui et al., 1992). Ces résultats suggèrent que l'agent antagoniste agit par antibiose plutôt que par parasitisme. Plus tard, des extraits de filtrat de cultures du champignon ont reproduit les mêmes réactions sur les cellules du champignon du blanc comme *P. flocculosa* (Hajlaoui et al., 1994).

Les filtrats de culture contiennent au moins quatre composés qui ont une activité antifongique, trois d'entre eux sont rattachés aux acides gras (Benyagoub et al., 1996; Choudhury et al., 1994). Avis et al. (2000) ont

synthétisé deux de ces acides et démontré qu'il dupliquait l'activité antifongique de *P. flocculosa*. Ces fongitoxines perturbent les membranes plasmiques et les organelles cytoplasmiques dans les 30 minutes suivant son exposition. La réaction inhibitrice comprend la perte de protéines et d'électrolytes. Après 24 heures, les cellules hôtes d'affaissent rapidement et meurent en raison de l'activité des fongitoxines sur les membranes cellulaires et lipides des cellules hôtes. Évidemment, les champignons de la phyllospère, qui sont en contact avec *S. flocculosa*, sont plus susceptibles à l'action de cet antagoniste comparativement aux champignons de la rhizosphère (Bélangier et Deacon, 1996). Cette sensibilité aux acides gras libres C-17 non saturés est liée à un niveau élevé de non saturation aux acides libres phospholipides et une faible proportion de stérols (Benyagoub et al., 1996), ce qui expliquerait pourquoi *P. flocculosa* a dans ses membranes un contenu élevé en stérols, ce qui le rend plutôt insensible à ses propres antibiotiques. Il a été démontré que les acides gras méthylés (acide 6-méthyl-9-heptadécenoic) étaient plus toxiques que ceux qui ne les sont pas, signalant l'importance de l'aspect structural des acides gras dans leur toxicité. Il a également été démontré que ces acides gras antifongiques étaient rapidement dégradés sous conditions naturelles (Avis et al., 2000). Cette découverte est importante puisqu'elle signifie que le développement de la résistance du blanc (*Sphaerotheca*) à *Pseudozyma* est peu probable. Du genre *Pseudozyma* spp., seul le genre *flocculosa* possède des habiletés d'agent de lutte biologique et la production des acides gras antifongiques (Avis et al., 2001).

Dans un autre ordre d'idées, des mutants de *P. flocculosa*, déficients en production d'antibiotiques, ont été obtenus en insérant un plasmide dans les protoplastes (Cheng et Bélangier, 2000; Cheng et al., 2001). Les bioessais ont confirmé que ces mutants avaient perdu leur habileté à produire des antibiotiques et par le fait même, leurs propriétés antagonistes. À l'inverse, lorsque *S. fuliginea* est exposé répétitivement aux antibiotiques produits synthétiquement, il n'a pas été possible d'obtenir une souche résistante de *S. fuliginea* (Avis et Bélangier, 2001).

La gamme d'hôtes peut comprendre l'antagonisme contre les genres *Sphaerotheca* et *Erysiphe*, mais son activité est moindre contre les genres *Trichoderma*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* et *Rhizoctonia* selon des essais biologiques effectués *in vitro*. Les conditions optimales pour l'infection des champignons hôtes sont une température de 26°C et une humidité relative de plus de 70%. Le *Pseudozyma* colonise les feuilles en absence du blanc mais ne se reproduit rapidement que lorsque cette maladie est présente.

## SPECTRE D'ACTIVITÉ

*Sporodex* a été étudié dans le phylloplan contre le blanc de :

- ❖ Rose (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*)
- ❖ Concombre (*Sphaerotheca fuliginea*)

## COMPATIBILITÉ

Il existe un nombre limité de produits de lutte contre le blanc dans les serres. Le myclobutanil (Nova 40W) et le soufre microfin (Kumulus) sont homologués au Canada pour les concombres, et l'acétate de dodémorfe (Meltatox 40 EC) et le cuivre (Phyton 27) sont homologués pour les roses. Les produits les plus efficaces sont systémiques, doivent être appliqués fréquemment, peuvent être toxiques aux insectes bénéfiques et sont sujets au développement de résistance chez les pathogènes responsables du blanc. Des cas de phytotoxicité des fleurs et des fruits, dans certaines conditions, ont été signalés avec le myclobutanil et le dodémorfe et provoquent tous les deux des cas de feuilles de superficie réduite chez le concombre et la rose.

Le SPORODEX L peut réduire ou remplacer les pulvérisations de fongicides chimiques sur les concombres et les roses, et les essais d'efficacité ont montré que l'on peut l'alterner avec quelques-uns de ces produits. Le SPORODEX L semble également être compatible avec les méthodes de lutte intégrée contre les insectes et les acariens. Le SPORODEX L n'a cependant pas été analysé pour déterminer sa compatibilité avec tous les produits chimiques, ni avec d'autres organismes microbiens de lutte contre les maladies, et le producteur doit donc s'informer auprès du fabricant pour les derniers renseignements. Les pratiques de lutte intégrée comprennent actuellement la surveillance des cultures pour déceler les premiers signes de la maladie, et ainsi assurer que le SPORODEX L est appliqué aussitôt que possible pour augmenter au maximum son efficacité.

Les pathogènes responsables du blanc peuvent dans certains cas développer une résistance aux fongicides chimiques. La résistance au *P. flocculosa* est cependant moins probable en raison de son mode d'action élargi et son manque de persistance sur la plante de culture. Le *P. flocculosa* détruit l'intégrité des membranes des cellules, ce qui provoque des fuites dans les cellules. Les conditions optimales pour la colonisation ne sont pas présentes de façon constante dans les serres. L'organisme colonise les feuilles en l'absence du blanc mais ne se reproduit rapidement que lorsque la maladie est présente. Le SPORODEX L joue un rôle dans la prolongation de l'efficacité des fongicides chimiques; il peut réduire la pression sur le pathogène pour développer une résistance aux fongicides dirigés en réduisant les populations de pathogènes et le nombre de pulvérisations de fongicides appliquées pour lutter contre le blanc.

## TESTS D'EFFICACITÉ EN SERRE

Onze essais ont été réalisés avec *Pseudozyma flocculosa* sur les concombres dans les serres de recherche ou commerciales, aux Pays-Bas et au Canada. Les plantes ont été cultivées dans la laine de roche selon les pratiques hydroponiques normales. Le SPORODEX WP (deux préparations anciennes) ou le SPORODEX L ont été appliqués à des intervalles correspondant aux directives de l'étiquette à des plantes qui étaient habituellement inoculées de blanc (*Sphaerotheca* spp.). Des fongicides étalons ont été appliqués au besoin à des fins de comparaison. Le blanc (pourcentage de feuilles malades sur les plantes entières) a été évalué à des intervalles réguliers et la surface sous la courbe de la progression de la maladie a été préparée pour la saison entière afin de comparer les différents traitements. Les concombres ont été récoltés et classés, et le rendement total ou le rendement de qualité première ont été notés.

Dans sept essais avec le concombre, en se basant sur la qualité totale d'occurrence de la maladie au cours de la saison, un niveau de répression de la maladie de 18 à 48% a été obtenu avec SPORODEX WP, ce qui différait de façon considérable du témoin mais était inférieur au niveau de répression obtenu avec les fongicides chimiques (44 à 66%). Dans deux essais comparatifs effectués dans des conditions de maladie modérée, une préparation plus récente de SPORODEX WP était considérablement plus efficace (>56 %) que le témoin et l'ancienne préparation, qui n'était pas efficace. Le rendement des concombres traités au SPORODEX était généralement plus élevé que celui du témoin et légèrement moins élevé que celui des plantes traitées aux produits chimiques. Dans deux essais indépendants effectués à grande échelle, Sporodex<sup>®</sup> a mieux contrôlé le blanc sur le concombre anglais que AQ-10<sup>®</sup> et une préparation de *Verticillium leucanii* (Dik et al., 1998). Cependant, la formulation laisse des résidus sur les feuilles, qui sont difficiles à dissoudre, et une qualité variable des fruits.

Des études du blanc sur les roses ont été menées dans des serres au Canada et en Colombie. L'efficacité du SPORODEX WP était comparable à celle de différents fongicides chimiques (dodémorph-acétate et soufre microfin) (Bélangier et al., 1994). De plus, pour certains cultivars, le traitement biologique a amélioré la qualité des fleurs en éliminant le stress (phytotoxicité) causé par les fongicides. Le produit était moins efficace lorsque l'humidité n'était pas maintenue à un niveau élevé.

La formulation a été retravaillée et la nouvelle préparation ne laisse plus de résidus sur les feuilles et elle est facile à dissoudre dans l'eau. Cette version améliorée de Sporodex a été testée de nouveau en serres

commerciales aux Pays-Bas, Canada et Colombie. Aux Pays-Bas, les cultivars de concombre anglais, traités avec Sporodex, ont été en production durant 16 semaines (saison complète de production) sans utiliser de fongicides. Au Canada, Sporodex a été comparé au fongicide myclobutanil en productions commerciales. Le contrôle absolu du blanc avec Sporodex n'a pas été aussi efficace que les traitements fongiques. Par contre, une augmentation des rendements de 15% a été enregistrée. En Colombie, l'efficacité de Sporodex a été évaluée contre le blanc de la rose (Bureau, 1999). Dans deux essais indépendants, le produit a été aussi efficace que les traitements fongicides et a amélioré la qualité des fleurs. Finalement, l'efficacité de Sporodex a été évaluée en serre commerciale aux Pays-Bas au printemps 2000. Les producteurs de roses ont été satisfaits des essais effectués avec Sporodex. Il a contrôlé le blanc aussi bien que les pesticides chimiques en plus de fournir des fleurs de meilleure qualité.

D'autres résultats ont été obtenus de deux essais supplémentaires effectués aux Pays-Bas et en Colombie-Britannique (C.-B.). Ces résultats ont montré que la réduction du blanc et l'amélioration du rendement des roses attribuables au SPORODEX L étaient comparables aux résultats obtenus avec l'acétate de dodémorfe. Des études d'efficacité ont montré que l'humidité doit être maintenue à un niveau élevé (humidité relative >70 %) pour assurer la viabilité et l'efficacité constante des produits SPORODEX.

Ces études démontrent que l'efficacité du SPORODEX dans la lutte contre le blanc et l'amélioration du rendement des concombres et de la qualité des roses cultivés en serre, peut être comparable aux traitements par pulvérisation de fongicides chimiques. Le SPORODEX a réduit le blanc de façon considérable en comparaison avec les témoins non traités. Bien que l'ancienne formulation n'était pas aussi efficace que les étalons chimiques, des essais limités avec des formulations plus récentes indiquent que le SPORODEX L sera aussi efficace que les étalons chimiques pourvu que l'on maintienne l'humidité à un niveau élevé. D'ailleurs, il ne produit pas d'effets phytotoxiques qui réduisent indirectement les rendements comme dans le cas de certains traitements chimiques.

Selon le mode d'emploi proposé, le SPORODEX L sera appliqué sur le feuillage des roses et des plantes de concombre. Il est probable que des résidus sur les aliments soient visibles mais peu dangereux parce qu'aucun effet nocif n'a été observé aux doses maximales dans l'étude de toxicité aiguë par voie orale de niveau 1. De plus, une recherche approfondie de la documentation n'a révélé aucun cas de production de toxines actives contre les mammifères par le *P. flocculosa* (ARLA, 2002).

## MARCHÉ ET PRODUCTION

Au printemps 2000, la compagnie Plant Products Co. Ltd. a soumis une demande d'homologation pour Sporodex afin qu'elle soit étudiée conjointement par Environmental Protection Agency (EPA) aux États-Unis et à l'Agence de Réglementation et de la Lutte Antiparasitaire (ARLA) au Canada. Si tout est conforme, Sporodex devrait être homologué dans les deux pays. Cette nouvelle initiative par EPA et l'ARLA devrait faciliter et accélérer les homologations de biofongicides en Amérique du Nord. En 2002, Sporodex a obtenu un statut d'homologation temporaire au Canada en attendant que certains renseignements soient fournis à l'ARLA (ARLA, 2002).

La valeur à la ferme des concombres de serre en Ontario est de 25 millions \$. Il existe des régions où l'on cultive le concombre en serre en Colombie-Britannique, en Alberta et au Québec. Les cultures valent de 625 000 à 1 250 000 \$ annuellement par hectare. Il existe environ 24 ha de rosiers en serre au Canada, principalement en Ontario, avec quelques opérations en C.-B., en Alberta et au Québec. Les roses de première qualité sont évaluées à 0,50 \$ par tige. Même si le blanc s'attaque rarement aux fruits, il se propage rapidement sur les feuilles et peut provoquer la perte de surface photosynthétisante et du stress hydrique, menant à une réduction de la production ou du rendement des fleurs, et jusqu'à 100 % de perte. Les moisissures peuvent aussi avoir des effets sur la qualité marchande et le prix des roses, étant donné que

l'on ne tolère aucunement la présence de taches de moisissure sur les feuilles et les fleurs; et que leur qualité est diminuée. La différence de prix pour les producteurs entre les fleurs de première classe et celles de deuxième classe est de 0,15 \$ par tige, et la lutte contre les moisissures peut faire augmenter les revenus de 37 000 \$ par hectare. On emploie actuellement des fongicides pour contrer les moisissures, mais ils peuvent avoir des effets nocifs sur le rendement et la qualité des fruits et de la floraison.

## **CONCLUSIONS ET POTENTIELS DE SPORODEX L**

Le SPORODEX L est une formulation liquide contenant l'organisme *Pseudozyma flocculosa* à une concentration de  $3 \times 10^8$  CFU/ml destinée à la lutte contre le blanc sur les roses et concombres cultivés en serre. La dose de SPORODEX L proposée est de 500 mL de produit dans 100 L d'eau, appliqué jusqu'à écoulement (1500 L/ha pour les roses coupées et concombres et 1000 L/ha pour les plantes en pot). On a procédé à onze essais de *Pseudozyma flocculosa* sur les concombres aux Pays-Bas et au Canada dans des serres de recherche ou commerciales. Cinq études du blanc sur les roses ont été menées dans des serres au Canada et en Colombie. Le SPORODEX L a réduit le blanc de façon considérable en comparaison avec les témoins non traités. Bien que l'ancienne formulation n'était pas aussi efficace que les étalons chimiques, des essais limités avec des formulations plus récentes indiquent que le SPORODEX L sera aussi efficace que les étalons chimiques, pourvu que l'on maintienne l'humidité à un niveau élevé. D'ailleurs, il ne produit pas d'effets phytotoxiques, qui réduisent indirectement les rendements, comme avec certains traitements chimiques. D'autres travaux sur la gestion de l'environnement dans les serres devront être entrepris afin de bénéficier de tout le potentiel de lutte contre la maladie qu'offre le SPORODEX L. Le SPORODEX L est un produit microbien auquel peut nuire la co-application de fongicides ou d'autres produits. La portée des précautions indiquées sur l'étiquette doit être élargie pour aviser le producteur de cette limitation et l'étiquette doit porter des directives visant à améliorer le rendement. Il n'existe aucune preuve que le SPORODEX L nuit aux autres outils comme les agents de lutte biologique, ou qu'il provoque des effets phytotoxiques sur les cultures. De plus, le SPORODEX L est généralement compatible avec les pratiques de lutte intégrée adoptées pour la production en serre.

## **RÉFÉRENCES *SPORODEX***

---

1. **ARLA. 2002.** Préparation Commerciale SPORODEX L et matière active de qualité technique (MATQ) *Pseudozyma flocculosa* souche PF-A22 UL – Note réglementaire REG2002-02. 27 pp.
2. **Askari, H., Y. Carrière, R.R. Bélanger et J. Brodeur. 1998.** Pathogenicity of the genus *Verticillium leucanii* to aphids and powdery mildew. *Biocontrol Sci. Technol.* 8:23-32.
3. **Avis, T.J. and R.R. Bélanger 2001.** Activity of the antifungal *cis*-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*: specificity and mode of action. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 956960.
4. **Avis, T.J., R. Boulanger and R.R. Bélanger. 2000.** Synthesis and biological characterization of (*Z*)-9-heptadecenoic and (*Z*)-6-methyl-9-heptadecenoic acids, fatty acids with antibiotic activity produced by *Pseudozyma flocculosa*. *J. Chem. Ecol.* 26:987-1000.
5. **Bélanger, R.R., W.R. Jarvis and J.A. Traquair. 2001** *Sphaerotheca* and *Erysiphe* spp., powdery mildews (Erysiphales : Erysiphaceae). In *Biological Control Programmes in Canada 1981-2000*. Mason, P.G., Huber, J.T., eds. Wallingford, Oxon : CAB Int.
6. **Bélanger, R.R. and M. Benyagoub. 1997.** Challenges and prospects for integrated control of powdery mildews in the greenhouse. *Can. J. Plant Pathol.* 19:310-14.
7. **Bélanger, R.R. and J.W. Deacon. 1996.** Interaction specificity of the biocontrol agent *Sporothrix flocculosa*: a video microscopy study. *Phytopathology* 86:1317-23.
8. **Bélanger, R.R. and W.R. Jarvis 1994.** Occurrence of powdery mildew on greenhouse tomatoes in Canada. *Plant Dis.* 78:640.
9. **Bélanger, R.R., C. Labbé and W.R. Jarvis WR. 1994.** Commercial-scale control of rose powdery mildew with a fungal antagonist. *Plant Dis.* 78:420-24.
10. **Benyagoub, M., R. Bel Rhlid and R.R. Bélanger. 1996.** Purification and characterization of new fatty acids with antibiotic activity produced by *Sporothrix flocculosa*. *J. Chem. Ecol.* 22:405-13.
11. **Benyagoub, M., C. Willemot and R.R. Bélanger. 1996.** Influence of a subinhibitory dose of antifungal fatty acids from *Sporothrix flocculosa* on cellular lipid composition in fungi. *Lipids* 31:1077-82.
12. **Boekhout, T. 1995.** *Pseudozyma bandoni* emend. Boekhout, a genus for yeast-like anamorphs of Ustilaginales. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41:355-66.
13. **Bureau, A. 1999.** *Évaluation du biofongicide Sporodex contre le blanc poudreux de la rose cultivée sous serres colombiennes*. MS thesis. Univ. Laval, Can. 65 pp.
14. **Cheng, Y.L., F. Belzile, P. Tanguay, L. Bernier and R.R. Bélanger. 2001.** Establishment of a gene transfer system for *Pseudozyma flocculosa*, an antagonistic fungus of powdery mildew fungi. *Mol. Gen. Genet.* Mol. Genet. Genomics 266:96-102.
15. **Cheng, Y.L. and R.R. Bélanger. 2000.** Protoplast preparation and regeneration from spores of the biocontrol fungus *Pseudozyma flocculosa*. *FEMS-Microbiol. Lett.* 180:287-91.

16. Choudhury, S.R., J.A. Traquair and W.R. Jarvis. 1994. 4--Methyl-7,11-heptadecadenal and 4-methyl-7,11-heptadecadienoic acid: new antibiotics from *Sporothrix flocculosa* and *Sporothrix rugulosa*. *J. Nat. Prod.* 57:700-4.
17. Dik, A.J., M.A. Verhaar and R.R. Bélanger. 1998. Comparison of three biological control agents against cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in semi-commercial-scale glasshouse trials. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:413-23.
18. Gaboury, D.M., G. English-Loeb, A.P. Norton, R.C. Seem and W.F. Wilcox. 1998. Suppression of grape powdery mildew by a mycophagous mite. *Phytopathology* 88:S30.
19. Hajlaoui, M.R., J.A. Traquair, W.R. Jarvis and R.R. Bélanger. 1994. Antifungal activity of extracellular metabolites produced by *Sporothrix flocculosa*. *Biocontrol Sci. Technol.* 4:229-37.
20. Hajlaoui, M. and R.R. Bélanger. 1993. Antagonism of the yeast-like phylloplane fungus *Sporothrix flocculosa* against *Erysiphe graminis* var. *tritici*. *Biocontrol Sci. Technol.* 3:427-34.
21. Hajlaoui, M.R., N. Benhamou and R.R. Bélanger. 1992. Cytochemical study of the antagonistic activity of *Sporothrix flocculosa* on rose powdery mildew, *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*. *Phytopathology* 82:583-89.
22. Hajlaoui, M. and R.R. Bélanger. 1991. Comparative effects of temperature and humidity on the activity of three potential antagonists of rose powdery mildew. *Neth. J. Plant Pathol.* 97:203-8.
23. Highland, H.B. 2000. AgraQuests search for Serenade : The isolation and development of a new biopesticide for plant protection. (Abstr.) *Phytopathology* 90:S101.
24. Hijwegen, T. 1986. Biological control of powdery mildew by *Tilletiopsis minor*. *Neth. J. Plant Pathol.* 92 : 93-95.
25. Jarvis, W.R. AND L.A. Shaw and J.A. Traquair. 1989. Factors affecting antagonism of cucumber powdery mildew by *Stephanoascus flocculosus* and *S. rugulosus*. *Mycol. Res.* 92:162-65.
26. Malathrakis, N.E. 1985. The genus *Acremonium alternatum* Link:Fr., a hyperparasite of the cucurbit powdery mildew pathogen *Sphaerotheca fuliginea*. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* 92:509-515.
27. Statistics Canada. 1998. *Greenhouse, Sod and Nursery Industries*. Catalogue no. 22--202—XIB, pp. 14-15.
28. Sundheim, L. and A. Tronsmo. 1988. Hyperparasites in biological control. Pages 53-69 *In* : *Biocontrol of Plant Diseases*. Vol. 1. K.G. Mukerji and K.L. Garg, eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
29. Sztjnberg, A., S. Galper, S. Mazar and N. Lisker. 1989. *Ampelomyces quisqualis* for biological and integrated control of powdery mildew in Israel. *J. Phytopathol.* 124:285-295.
30. Traquair, J.A., L.A. Shaw and W.R. Jarvis. 1988. New species of *Stephanoascus* with *Sporothrix* anamorphs. *Can. J. Bot.* 66:926-33.

## ROOTSHIELD® (*TRICHODERMA HARZIANUM*KRL-AG2)

### DESCRIPTION DU PRODUIT

Le fongicide biologique RootShield se veut un produit à base de spores de *Trichoderma harzianum* Rifai souche KRL-AG2 (BioWorks, 2003). Les *Trichoderma* spp. sont des champignons de la famille des Deutéromycètes et de l'ordre des Hyphomycètes (Chaverri et al., 2002). La souche de *Trichoderma* qui compose le biofongicide RootShield est mieux connue sous le nom de *T. harzianum* T-22. Cette souche est le résultat d'une fusion protoplasmique entre la souche T-12 et la souche T-95. La souche T-95 a été sélectionnée pour sa compétence à se développer dans la rhizosphère alors que la souche T-12 a été retenue pour son habileté à compétitionner avec les bactéries dans un environnement limité en fer (Ahmad et Baker, 1987; Ahamad et Baker, 1988; Hadar et al., 1984 cité dans Harman,2000). La souche T-22 possède ces caractéristiques et colonise le système racinaire de manière plus efficace que les souches parentales (Sivan et Harman, 1991).

La compagnie BioWorks Inc. utilise une préparation technique contenant 100% de matière active, soit  $5,0 \times 10^8$  CFU/ g de matière sèche. Cette préparation sert à l'élaboration des préparations commerciales contenant un minimum de  $1,0 \times 10^7$  CFU / g de poids sec. Ces préparations commerciales sont donc composées de *Trichoderma harzianum* Rifai souche KRL-AG2 à 1,15% et d'ingrédients inertes à 98,85%. Ces ingrédients inertes sont toutefois gardés secrets (ARLA, 2002; BioWorks, 2003).

Les préparations commerciales se retrouvent sous deux formes. L'une se présente sous forme de poudre mouillable (RootShield Drench) alors que l'autre se trouve sous forme granulaire (RootShield Granules). Ces préparations possèdent des propriétés physiques quelques peu différentes. Ces propriétés sont synthétisées dans le tableau 15 qui suit (ARLA, 2002 ; BioWorks, 2003).

**Tableau 15.** Propriétés du biofongicide RootShield sous forme de granules ou Drench, BioWorks, USA

Propriété	RootShield Granules	RootShield Drench
État physique à 25°C	Poudre granuleuse grossière	Poudre granuleuse fine
Couleur	Gris ou vert Indice Munsell 7.5Y 5/ 1.4	Gris ou vert Indice Munsell 2.5Y 8.3/2
Odeur	Inodore à terreuse	Inodore à terreuse
PH dans l'eau distillée	7.05	7.92
Densité	Masse volumétrique apparente : 0,61 g/cm <sup>3</sup> Densité après tassement : 0,68 g/cm <sup>3</sup>	Masse volumétrique apparente : 0,29 g/cm <sup>3</sup>  Densité après tassement : 0,63 g/cm <sup>3</sup>
Viscosité	Sans objet	Sans objet
Corrosion	Aucune évaluation effectuée	Aucune évaluation effectuée
Suspension / teneur en eau	Aucune évaluation effectuée	Aucune évaluation effectuée
Humidité	Aucune évaluation effectuée	Aucune évaluation effectuée

(ARLA, 2002)

L'application du biofongicide se fait directement sur le terreau. Lorsque la poudre mouillable est utilisée, elle est pulvérisée à basse pression à raison de 115 à 220 grammes de préparation par mètre cube. Il importe de laisser décanter la préparation de poudre mouillable, car celle-ci se veut à base d'argile. La préparation granulaire est quant à elle ajoutée directement au terreau (600 à 850 g/m<sup>3</sup>) (ARLA, 2002; BioWorks, 2003; Lambert et al., 2002).

L'efficacité de RootShield est maximale à pH neutre ou acide, à des températures supérieures à 10°C. L'entreposage de ce biofongicide à des températures entre 2 et 5°C permet de conserver le produit pour une durée maximale de 12 mois. À température ambiante, la durée de conservation est de 6 mois (BioWorks, 2003).

## MODE D'ACTION ET PRINCIPE ACTIF

Le champignon *Trichoderma harzianum* Rifai est reconnu comme antagoniste des agents pathogènes du sol (ARLA, 2002). Il prévient l'attaque du système racinaire des plantes par les champignons du sol de plusieurs manières. Tout d'abord, le mycélium de *Trichoderma* colonise le sol et les racines avant les agents pathogènes. De plus, il protège les racines en formation en créant un manchon autour de celles-ci que ce soit à l'enracinement ou sur un plant adulte. Cette habileté à coloniser la rhizosphère et à compétitionner pour l'espace lui permet d'agir à titre préventif sur une période de 10 à 12 semaines (Lambert et al., 2002; Sivan et Harman, 1991).

Le mode d'action de *Trichoderma harzianum* Rifai souche KRL-AG2 se veut complexe. Il comprend la chimiotaxie, l'antibiose, la production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire, le parasitisme, la compétition ou une combinaison de ces divers modes d'action (Howell, 2002; Wells, 1988). L'activité de cet agent de lutte biologique commence par le repérage de l'agent pathogène. L'orientation du *Trichoderma* est rendue possible grâce aux lectines sécrétées dans le milieu par l'agent pathogène. Ces substances se lient aux résidus de galactose sur les parois cellulaires de *T. harzianum* (ARLA, 2002; Harman, 2000). C'est ce qui permet la croissance chimiotactique de *Trichoderma*.

Au cours de cette croissance, avant même le contact physique entre les deux organismes, *Trichoderma* produit des composés permettant l'affaiblissement de l'agent pathogène. Ces composés sont des enzymes et des antibiotiques. Les enzymes sont principalement des chitinases, des lipases, des protéases et des glucanases. Ces enzymes sont responsables du bris des polysaccharides, de la chitine et des  $\beta(1,3)$  glucanases impliqués dans la rigidité des parois cellulaires des champignons (Harman, 2000; Howell, 2003). Les chitinases se divisent en trois groupes soit, les  $\beta(1,4)$ N-acetylglucosaminidases, les endochitinases et les exochitinases (Kullnig et al., 2000; Lorito et al., 1994; Viterbo, 2002a). Leur production est plus ou moins stimulée selon la quantité de carbone et d'azote dans le milieu ou selon les stress environnementaux (CHIT42). Leur production peut aussi être stimulée par la présence de chitine, de chito-olisaccharides ou de leurs produits cataboliques (CHIT73) (Donzelli et Harman, 2001; Mach et al., 1999). Les glucanases peuvent être du type des  $\beta(1,3)$  glucanases, des  $\beta(1,6)$  glucanases ou des  $\beta(1,4)$  glucanases (Ait-Lahsen et al., 2001; De la Cruz et Llobell, 1999; Tronsmo et Harman, 1993). La quantité de  $\beta(1,3)$  glucanases produite varie selon la source d'hydrates de carbone, selon la quantité d'azote disponible et selon la quantité de  $\beta(1,3)$  glucan présent dans les parois cellulaires de l'agent pathogène (Donzelli et Harman, 2001; Vazquez-Garciduenas et al., 1998).

Les antibiotiques sont quant à eux volatiles ou non-volatiles. Ce sont les diterpènes, les peptaibols, les butenolides, les furanones, les pyrones et les pyridones (ARLA, 2002; Lo, 1998; Ordentlich et al., 1992). Les antibiotiques peuvent causer l'apparition d'invaginations du plasmalemme indiquant une perturbation de la membrane chez *B. cinerea* (Bélanger et al., 1995). Il peut y avoir un déséquilibre osmotique interne, une rétraction graduelle du plasmalemme, une désorganisation du cytoplasme, une rupture des vacuoles et une

perte de turgescence chez *B. cinerea* (Bélangier et al., 1995; Benhamou et Chet, 1993). Certains auteurs affirment que les enzymes et les antibiotiques ont un effet synergique avant le contact des deux champignons. Les enzymes provoquent l'affaissement de la membrane cellulaire et augmentent le rythme de diffusion des antibiotiques à travers la paroi (ARLA, 2002). D'autres chercheurs prétendent que certains enzymes ne sont activés qu'une fois le contact établi (Carsolio et al., 1994; Lorito et al., 1996; Mach et al., 1999; Zeilinger et al., 1999 cités dans Viterbo et al., 2002b). En dernier lieu, certains auteurs n'ont observé aucun enzyme impliqué dans l'activité antagoniste de *Trichoderma* sur l'agent pathogène (Bélangier et al., 1995).

Lors du contact physique entre les hyphes de l'agent de lutte biologique et de l'agent pathogène, les hyphes de *Trichoderma* s'enroulent autour des hyphes de l'agent pathogène et font une pression mécanique sur les hyphes de l'agent pathogène qui s'effondrent sous l'insuffisance de la pression hydrostatique intracellulaire (ARLA, 2002; Bélangier et al., 1995; Davet, 1983). Il peut aussi y avoir une digestion des parois par les chitinases produites par *Trichoderma*. Ainsi, il peut y avoir pénétration de *Trichoderma* à l'intérieur des hyphes de l'agent pathogène et dissolution ou agrégation du cytoplasme de ce dernier (Benhamou et Chet, 1993; Howell, 2003).

Plusieurs expériences ont aussi démontré que la présence de *T. harzianum* KRL-AG2 entraîne une augmentation de la vigueur et un accroissement du développement des plants traités. De même, certains rendements se sont vus plus élevés chez les plants traités avec RootShield en comparaison avec des plants témoins non traités. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que *Trichoderma* peut solubiliser certains nutriments inorganiques. En conditions *in vitro*, *T. harzianum* KRL-AG2 a solubilisé du MnO<sub>2</sub>, du Zn, du Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et du phosphate. La présence d'acides organiques n'a pas été détectée. Par contre, la production de métabolites pouvant réduire le Fe (III) et le Cu (II) a été notée de même que la présence de métabolites pouvant chélater le fer. Ces nutriments pourraient alors être plus facilement prélevés par la plante, mais moins facilement par certains agents pathogènes ne pouvant utiliser les nutriments sous cette nouvelle forme (Altomare et al., 1999; Harman, 2000).

La littérature mentionne l'induction d'une réponse de défense chez la plante inoculée avec *Trichoderma harzianum*. En 2000, Yedida et al. ont constaté l'action de *T. harzianum* sur les racines de plants de concombre. Ils ont observé la pénétration de l'agent de lutte biologique à l'intérieur de l'épiderme et du cortex externe de la racine. Aux sites de pénétration, il y avait apposition de calloses et infiltration de cellulose au niveau des parois cellulaires. Il y a eu production de protéines PR et de composés phénoliques. De même, l'activité des peroxydases et des chitinases a augmenté systématiquement deux à trois jours après l'inoculation de *Trichoderma*.

Certains ouvrages démontrent aussi la capacité de certains *Trichoderma* à empêcher la germination des spores de l'agent pathogène ou de réduire l'efficacité de ce dernier. En effet, les enzymes  $\beta(1,3)$  glucanases,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases et les peptaiboles empêchent la germination des spores de *B. cinerea* alors que les protéases inactivent les enzymes hydrolytiques de *B. cinerea* (Ait-Lahsen et al., 2001; Elad et Kapat, 1999, Lorito et al., 1994; Viterbo, 2002a; Zimand et al., 1996). Les pyrones et les isonitriles inhibent, pour leur part, la germination des spores de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Graeme-Cook et Faull, 1991). Il est aussi mentionné que *Trichoderma* peut s'attaquer aux rhizomorphes, aux sclérotés et aux structures de survie de nombreux champignons pathogènes (Bliss, 1951; Hennis et al., 1983 cités dans Wells, 1988).

## SPECTRE D'ACTIVITÉ

Au Canada, RootShield se veut d'abord et avant tout efficace contre les maladies racinaires présentes dans les cultures en serre telles que la tomate, le concombre et les plantes ornementales. En ornemental, T-22

permet une protection contre *Pythium* et *Rhizoctonia* alors que dans la tomate de serre, il est aussi efficace contre *Fusarium* (ARLA, 2002; BioWorks, 2003).

Aux États-Unis, des essais ont été faits dans les cultures de maïs, de blé, d'oignons, de tomates, de poivrons, de fraises, de gazon, de *Catharanthus*, de *Poinsettia*, de *Geranium* et de *Spathiphyllum*. Plusieurs agents pathogènes étaient alors visés : *F. gramineum*, *P. ultimum*, *S. rolfsii*, *B. cinerea*, etc.... (Harman, 2000).

## COMPATIBILITÉ

Afin de rendre cette section plus structurée, les résultats des tests de compatibilité de *Trichoderma harzianum* Rifai KRL-AG2 avec les divers pesticides sont présentés au tableau 16. Lorsqu'il y a incompatibilité, la compagnie recommande d'attendre de 7 à 10 jours après l'application du fongicide chimique avant l'application de RootShield (BioWorks, 2003).

**Tableau 16.** Compatibilité de RootShield avec les fongicides, insecticides, herbicides, acaricides, biocides, surfactants et des mélanges en réservoir (BioWorks, 2003)

Fongicides compatibles	Noms commerciaux
azoxystrobine	Abound, Heritage, Quadris
captane	Captan
carboxine	Vitavax 34, Vitavax 200
chloronèbe	Chloroneb, Demosan, Terraneb, Terramec
chlorothalonil	Bravo, Daconil
sulfate de cuivre	Phyton-27
dichloran	Botran
étridiazole/thiophanate-méthyl	Banrot
étridiazole	Terrazole, Truban
fenarimol	Rubigan, Lesco Twosome
fludioxonil	Maxim, Medallion
fosétyl-Al	Aliette
flutolanil	Moncut
iprodione	Chipco 26019, Fungicide X, Rovral
mancozèbe	Fore, Pace 70W, Duosan, Dithane, Manzate
manèbe	Maneb, Manex
mefenoxam	Subdue Maxx, Ridomil Gold
métalaxyle	Apron, Subdue Pace 7W
myclobutanil	Eagle, Nova
propamocarbe	Banol, Previcur
propanil	Prostar
quintozène	Terraclor, Turfside, Penstar, PCNB, Quintozène
thiophanate-méthyl	Cleary's 3336, Topsin M, Tops 5, Fungo, Senator
thirame	Spotrete, Vitavax 200, Thiram

**Tableau 16 (suite).** Compatibilité de RootShield avec les fongicides, insecticides, herbicides, acaricides, biocides, surfactants et des mélanges en réservoir (BioWorks, 2003)

<b>Fongicides compatibles (suite)</b>	<b>Noms commerciaux</b>
triadiméfon	Bayleton
triadimenol	Baytan
vinclozolin	Ronilan, Touche, Curalan

<b>Fongicides INCOMPATIBLES</b>	<b>Noms commerciaux</b>
bénomyl	Benlate, Tersan 1991, Bonide Lawn Fungicide
imazilil	Fungaflor, Flo-Pro Nuzone
propiconazole	Banner
tébuconazole	Folicur 3.6 F
triflumizole	Terraguard

<b>Herbicides compatibles</b>	<b>Noms commerciaux</b>
pendimethalin	Prowl
glyphosate	Roundup

<b>Insecticides compatibles</b>	<b>Noms commerciaux</b>
diazinon	Diazinon
lindane	Lindane
chlorpyrifos	Lorsban
malathion	Malathion
pyréthrines, butoxide piperonyl	Marathon
méthoxychlore	Methoxychlor
	Orthène
carbaryl	Sevin

<b>Acaricide compatible</b>	<b>Noms commerciaux</b>
dicofol	Kelthane

<b>Biocides compatibles</b>	<b>Noms commerciaux</b>
1-Bromo-3-Chloro-5,5-diméthylhydantoin	Agribrom
Hydrogen dioxide/peroxyacetic acid	ZeroTol

<b>Surfactants compatibles</b>
Latron B 1956
AtPlus S-12
Bivert
Flozine
PsiMatric
AquaGro 2000
R-11
Majorité des surfactants non-ioniques

**Tableau 16 (suite).** Charte de compatibilité des mélanges en réservoir

Matière active	Préparation	Nom commercial	Taux d'application	Dilution
Captane	85% WP	Captan 85 WP	1.88 lb. / A	0.1 oz. / gal.
Chlorothalonil	82.5% WDG	Daconil Ultrex	3.7 ox. / 1000 sq. ft.	0.56 oz. / gal.
Iprodione	23.3% FL	Chipco 26019 Flo	2.0 oz. / 1000 sq. ft.	0.3 oz. / gal.
Mefenoxam	21.3% FL	Subdue Maxx	1.0 oz. / 1000 sq. ft.	0.005 oz. / gal.
Triadiméfon	25% SG	Bayleton 25 T&O	0.75 oz. / 1000 sq. ft.	0.11 oz. / gal.
Azoxystrobine	50% SG	Heritage	0.4 oz. / 1000 sq. ft.	0.06 oz. / gal.
Vinclozoline	50% WP	Ronilin DF	0.75 lb. / A	0.04 oz. / gal.

## TESTS D'EFFICACITÉ EN SERRE

Plusieurs tests d'efficacité ont été effectués avec RootShield sur des cultures serricoles (tomates, poivrons, aubergines, oignons, ornemental). Dans tous les cas, le terreau était traité avec RootShield, puis inoculé avec *Pythium* ou *Rhizoctonia* de 0 à 10 jours plus tard. Des essais ont aussi été faits contre *Fusarium*. Les plants étaient partis en serre et transplantés dans un champ infecté. Contre *Rhizoctonia*, RootShield Drench a permis une meilleure survie végétale de 8 à 44%, un meilleur poids et une légère augmentation de la qualité des racines et des plantules dans le cas des plantes ornementales. Contre *Pythium*, une augmentation du poids des racines séchées et du poids des plantes ornementales fraîches ont été observées de même qu'une augmentation de rendement chez la tomate. Contre *Fusarium*, une diminution de 25 à 57% de la pourriture du collet et des racines et une augmentation des rendements en tomates ont été obtenus (ARLA, 2002).

Dans son article, Harman (2000) rapporte l'effet de RootShield sur les plants de maïs. Il y explique que la colonisation des racines par ce champignon entraîne le développement de plants plus larges et plus robustes. De plus, il mentionne que le rendement des parcelles traitées avec RootShield est 1,7 fois plus élevé que celui des parcelles non traitées. Des plants plus verts permettent de croire à un meilleur prélèvement d'azote en présence de *Trichoderma*. Il en va de même pour la différence au niveau de la grosseur de la tige et du rendement en grain et en ensilage. Les plants non traités atteignent normalement leur rendement maximal avec 240 kg d'azote par hectare alors que les plants traités avec RootShield exigent seulement 150 kg d'azote par hectare pour un même rendement. Il s'agit d'une réduction d'azote de 38%. Dans ce même article, Harman (2000) mentionne que l'alternance fongicide-RootShield dans des parcelles d'oignons a permis d'accroître de 10% les rendements en comparaison avec un traitement au fongicide seulement (Harman, 2000).

En 1998, Utkhede et al. (2001) ont vérifié l'efficacité de RootShield à réduire l'incidence du chancre de la tige (*B. cinerea*) lorsqu'il est appliqué en post-infection (tab. 17). Dans une première expérience, chaque traitement comportait dix plants et sur chaque plant, cinq lésions ont été faites et inoculées avec *B. cinerea*. RootShield a été appliqué après l'inoculation de l'agent pathogène à raison de 0,6 g/L. La mesure de la longueur des lésions et des rendements en fruits ont permis d'observer une diminution de la taille des lésions traitées avec RootShield en comparaison avec le témoin inoculé. De même, il y a eu une augmentation du rendement total en fruits en comparaison avec le témoin inoculé (tab. 18). Toutefois, il n'y a pas eu de différence avec le témoin non inoculé avec *B. cinerea*. L'infection par *B. cinerea* a réduit de 44% le rendement total en fruit et de 38% le nombre de fruits par plant en comparaison avec le témoin non inoculé.

RootShield a augmenté le nombre total de fruits en comparaison avec le témoin inoculé, mais il n'y a pas eu de différence significative avec le témoin non inoculé. Cependant le témoin non inoculé a présenté une moyenne de poids de fruit significativement supérieure à RootShield. À ce niveau, il n'y a pas eu de différence entre RootShield et le témoin inoculé (Utkhede et al., 2001).

**Tableau 17.** Effet de RootShield sur la taille des lésions causées par *Botrytis cinerea* sur les tiges de tomates cultivées en serre, 1998

Traitement	Dose	Taille des lésions (cm)				
		Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre
RootShield	0,6 g/L	0,71	0,93	1,47	2,63	3,47
Témoin inoculé	---	1,45	4,57	5,31	9,01	10,27

**Tableau 18.** Effet de RootShield sur le rendement en fruits, le nombre de fruits par plant et le poids moyen en fruits sur des plants de tomates inoculés avec *Botrytis cinerea* en serre, 1998

Traitement	Dose	Rendement en fruits/plant (kg)	Nombre de fruits/plant	Moyenne du poids/fruit (g)
RootShield	0,6 g/L	8,64	49,2	172,9
Témoin inoculé	---	5,54	30,1	180,0
Témoin non inoculé	---	9,96	48,8	204,1

Les mêmes manipulations ont été répétées en 1999. À partir du mois de juin, RootShield a raccourci les lésions en comparaison avec le témoin inoculé (tab. 19). Le rendement total des plants traités avec RootShield a été supérieur au rendement du témoin inoculé (tab. 20). De plus, le nombre de fruits par plant était plus élevé que chez le témoin inoculé et le témoin non inoculé avec *B. cinerea*. Toutefois, RootShield n'a pas eu d'effet sur le poids des fruits. Quant au nombre de plants morts, il était plus faible dans les parcelles traitées avec RootShield. Il apparaît donc que RootShield a la capacité de réduire la gravité de la maladie lorsqu'il est vaporisé au niveau foliaire. De plus, il entraîne une augmentation de la croissance et du rendement (Utkhede et al., 2001).

**Tableau 19.** Effet de RootShield sur la taille des lésions causées par *Botrytis cinerea* sur les tiges de tomates cultivées en serre, 1999

Traitement	Dose	Taille des lésions (cm)					
		Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept
RootShield	0,6 g/L	0,29	0,65	0,75	0,85	2,63	2,67
Témoin inoculé	---	0,31	0,74	0,83	6,22	6,94	7,66

**Tableau 20.** Effet de RootShield sur le rendement en fruits, le nombre de fruits par plant et le poids moyen en fruits sur des plants de tomates inoculés avec *Botrytis cinerea* en serre, 1999

Traitement	Dose	Rendement en fruits/plant (kg)	Nombre de fruits/plant	Moyenne du poids/fruit (g)
RootShield	0,6 g/L	14,48	81,6	148,8
Témoin inoculé	---	12,64	68,8	137,1
Témoin non inoculé	---	12,80	74,4	142,3

En 2000, Utkhede et al. ont vérifié l'effet de RootShield sur la jambe noire causée par *B. cinerea* chez la tomate de serre. Les manipulations étaient les mêmes qu'en 1998 et 1999, sauf qu'il y avait 15 plants par traitement au lieu de 10. À partir du mois de juin, la longueur des lésions des plants traités avec RootShield était inférieure à celle témoin inoculé (tab. 21). De plus, RootShield a favorisé l'augmentation du rendement et du nombre de fruits (tab. 22). Toutefois, la différence de poids était non significative. Le nombre de plants morts était aussi plus faible en comparaison avec le témoin inoculé avec *B. cinerea*. (Utkhede, 2002)

**Tableau 21.** Effet de RootShield sur la taille des lésions causées par *Botrytis cinerea* sur les tiges de tomates cultivées en serre, 2000

Traitement	Concentration	Longueur des lésions (cm) pour des inoculations faites en					% de plants morts
		Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	
RootShield	0,6 g/L	1,1	1,27	1,28	1,42	1,67	34,8
Témoin inoculé	---	1,09	1,78	1,95	2,38	3,53	71,1

**Tableau 22.** Effet de RootShield sur le rendement en fruits, le nombre de fruits par plant et le poids moyen en fruits sur des plants de tomates inoculés avec *Botrytis cinerea* en serre, 2000

Traitement	Concentration	Rendement en fruits/plant (kg)	Nbre de fruits/plant	Moyenne du poids/fruits (g)
RootShield	0,6 g/L	11,54	56,6	179,7
Témoin inoculé	---	10,06	45,3	183,6

En 2001, Utkhede et al. ont plutôt opté pour un traitement préventif. RootShield a été vaporisé deux heures avant *B. cinerea* à un taux de 0,6 g/L. Dans les expériences précédentes, RootShield se voulait efficace en post-inoculation comme moyen curatif et en applications à répétition. En traitement préventif, une seule application a été effectuée ce qui n'a pas permis le contrôle de *B. cinerea* (tab. 23 et 24). Ceci indique donc la nécessité de laisser à *Trichoderma* le temps de s'implanter et de coloniser l'espace (Utkhede, 2002).

**Tableau 23.** Effet de RootShield sur la taille des lésions causées par *Botrytis cinerea* sur les tiges de tomates cultivées en serre, 2001

Traitement	Concentration	Longueur des lésions (cm) pour des inoculations faites en					% de plants morts
		Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	
RootShield	0,6 g/L	3,8	4,6	3,7	5,0	7,1	17,8
Témoin inoculé	---	3,8	4,5	5,1	6,9	7,2	26,4

**Tableau 24.** Effet de RootShield sur le rendement en fruits, le nombre de fruits par plant et le poids moyen en fruits sur des plants de tomates inoculés avec *Botrytis cinerea* en serre, 2001

Traitement	Concentration	Rendement en fruits/plant (kg)	Nbre de fruits/plant	Moyenne du poids/fruits (g)
RootShield	0,6 g/L	11,44	64,0	188,9
Témoin inoculé	---	10,38	60,6	187,2

En 1998, Larkin et Fravel ont vérifié l'efficacité de RootShield contre la fusariose de la tomate (tab. 25). RootShield a été appliqué à des taux de 0,05 ; 0,1 ; 0,2 et 0,5%. Rootshield a réduit de 62% l'incidence de la maladie à un taux de 0,2% (3 à 4 x 10<sup>4</sup> CFU/g). Toutefois, cette efficacité a chuté à 41% à un taux de 0,5%. De même, son efficacité est diminuée à des taux de 0,05 et 0,1% avec 22 et 25% de réduction de la maladie. Par la suite, des tests additionnels ont été effectués à un taux de 0,2%. À un tel taux, l'incidence de la maladie n'était que de 38,5% alors qu'elle était de 83,4% chez le témoin non traité. La réduction de la maladie était donc de 53,8%. Il importe de noter que le taux recommandé par le fabricant est de 0,06 à 0,09% (600 à 900g/m<sup>3</sup>) alors que dans la présente expérience, un taux de 0,2% a permis un bon contrôle de la maladie.

**Tableau 25.** Développement de la fusariose sur des plants de tomates traités avec RootShield à quatre taux d'application

Traitement	Taux d'application (%)	% de flétrissement	% de réduction de la maladie
Témoin	---	73,4	0
RootShield	0,05	57,0	22
	0,1	55,0	25
	0,2	28,0	62
	0,5	43,0	41

En 1995, Datnoff et al. avaient aussi vérifié l'impact d'une souche de *Trichoderma harzianum* KRL-AG2 sur le contrôle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* sur des plants de tomates (tab. 26). Ils ont observé une diminution de l'incidence de la maladie chez les plants traités avec *Trichoderma*. Cependant, les rendements n'ont pas été différents de ceux obtenus chez les plants non traités avec *Trichoderma*.

**Tableau 26.** Influence de *Trichoderma harzianum* sur l'incidence et la gravité de la fusariose

Traitement	1991		1993	
	Incidence de la maladie (%)	Sévérité de la maladie (%)	Incidence de la maladie (%)	Gravité de la maladie (%)
Témoin	48,0	18,1	56,6	16,2
<i>Trichoderma harzianum</i>	32,0	12,4	25,0	7,5

En 2002, Caron et al. ont vérifié l'activité biologique de RootShield contre *R. solani*, *V. dahliae*, *S. sclerotiorum*, FORL et *P. ultimum*. RootShield a été mélangé au terreau PRO-MIX 'PGX' à un taux de  $1 \times 10^7$  CFU/g tel que recommandé. Ce mélange a été laissé au repos 2 semaines avant d'y ajouter les agents pathogènes à raison de  $1 \times 10^3$  CFU/g. Des plants de concombres et des tomates ont été semés dans ce terreau. Après 30 jours, la hauteur des plants de concombres était plus élevée avec RootShield en traitement contre *R. solani* et le poids frais aérien était plus important avec RootShield en traitement contre *P. ultimum* et *R. solani*. Dans les parcelles de tomates, la germination des plants a significativement été réduite par la présence de *R. solani*. Malgré cela, la hauteur et le poids frais aérien des plants traités avec RootShield en traitement contre *P. ultimum* et *R. solani* étaient plus élevés.

En 1996, Nemeč et al. ont vérifié l'efficacité de *T. harzianum* KRL-AG2 à coloniser le système racinaire des plants et à contrôler les maladies racinaires de légumes (tomates, poivrons) et d'agrumes. En tout premier lieu, la colonisation racinaire a été vérifiée. Dans les cultures de poivrons et de tomates par immersion, la colonisation racinaire par *T. harzianum* a été de 91,7% et 100% respectivement en comparaison avec des témoins non inoculés de 0% et 1,4%. Dans la culture de poivrons en cellule de polystyrène, la colonisation a été de 100% en comparaison avec une valeur de 2,1% chez le témoin. Dans la culture d'agrumes, le taux de colonisation était de 89,2% chez les plants inoculés et de 30,4% chez les plants témoins non inoculés. Dans des essais au champ sur des plants de tomates, *T. harzianum* a permis de diminuer de 39% l'incidence de la pourriture du collet causée par FORL en comparaison avec la parcelle témoin. De même, ce traitement a permis une réduction de la gravité de la maladie de 42%. Par contre, dans les essais sur l'impact de *T. harzianum* sur les orangers, il n'y a pas eu de différence significative entre les plants traités et le témoin en ce qui concerne la vigueur des tiges, la hauteur des tiges ou la pourriture racinaire causée par *Phytophthora parasitica*. Dans la culture de poivrons au champ, il n'y a pas eu de différence significative dans l'incidence de la pourriture du collet causée par *Phytophthora capsici*.

En 1996, Harman et al. ont évalué le potentiel de *T. harzianum* KRL-AG2 à contrôler la pourriture de la grappe du raisin causée par *B. cinerea*. Le pourcentage de grappes infectées par *B. cinerea* était plus élevé sur les plants traités avec *T. harzianum* seulement que sur les plants traités avec Rovral (iprodione, 2 kg/ha). Harman et al. ont alors vérifié la possibilité de substituer certains traitements au Rovral par des traitements à base de *T. harzianum* en cours de saison. Le traitement en alternance le plus efficace s'est avéré être l'application de *T. harzianum* au stade 5% en fleurs, au stade 90% en fleurs et 2 semaines après le stade Brix 5°. Le Rovral a quant à lui été appliqué à la fermeture des grappes et au stade Brix 5° à 50% de la dose (1 kg/ha). Avec ce traitement, 17% des grappes étaient infectées en comparaison avec 9% d'infection chez les plants ayant reçu 4 traitements de Rovral (2 kg/ha) et 23% pour les plants ayant reçu 4 traitements de Rovral (1 kg/ha). Harman et al. (1996) ont aussi vérifié la possibilité de mélanger les 2 traitements dans le même réservoir. Le meilleur traitement s'est avéré être l'application de *T. harzianum* aux 3 premiers stades et l'application combinée de *T. harzianum* et du Rovral (1 kg/ha) aux 2 derniers traitements. Avec cette séquence de traitements, seulement 1,6% des grappes étaient infectées, soit une infection 4 fois moins importante qu'avec le Rovral seul (1 kg/ha) appliqué au 2 derniers stades. Quoiqu'il en soit, tous les traitements en alternance ont permis un meilleur contrôle de la maladie que le Rovral seul (1 kg/ha).

En 1997, Lo et al. ont vérifié l'efficacité de *T. harzianum* KRL-AG2 dans le contrôle *Pythium graminicola*, de *Rhizoctonia solani* et de *Sclerotinia homoeocarpa* dans leur phase foliaire sur le gazon. Des traitements granulaires et foliaires ont été effectués. Au niveau des traitements foliaires en serre, la suspension de conidies de *T. harzianum* enrichie du surfactant Triton X-100 a permis la réduction des trois maladies la plus importante. L'incidence de *Pythium* a été réduite de 2,5 fois, l'incidence de *Rhizoctonia* de 4 fois et l'incidence de *Sclerotinia* de près de 7 fois. Des essais en champs ont permis de constater que l'application hebdomadaire d'une suspension de *T. harzianum* entraîne le même contrôle qu'un fongicide chimique (propiconazole). Tant avec le traitement granulaire que le traitement foliaire, la population de *T. harzianum* s'établit et atteint un niveau élevé et stable, soit environ  $5 \times 10^5$  CFU/g. Avec l'application foliaire hebdomadaire, la population peu même atteindre  $10^6$  CFU/g.

## MARCHÉ ET PRODUCTION

RootShield demeure l'un des premiers biofongicides homologués par l'EPA. Il s'agit d'un produit approuvé par l'OMRI (Organic Materials Review Institute) pour les cultures biologiques. Il est vendu pour les cultures en serre, les cultures en rangs et les gazons. En 1999, les ventes s'élevaient environ à 3 millions de dollars (Harman, 2000). Au Canada, une homologation temporaire a été accordée par l'ARLA en 2002 (ARLA, 2002). Cette autorisation prendra fin en décembre 2003. Il s'agit du deuxième biopesticide après Mycostop® à faire son entrée au pays (Lambert, 2002). Ce produit est distribué par la compagnie Koppert Canada. En 2002, le coût du RootShield Granules variait entre 27 et 36,50\$/kg selon la quantité achetée, soit de 3,5 à 4 cents/g/plant. Le coût de RootShield Drench varie quant à lui de 2 à 2,5 cents/g pour 5 plants (Lambert, 2002).

## RÉFÉRENCES ROOTSHIELD®

---

1. **Ahmad, J. and R. Baker. 1988.** Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology 34 : 229-234.
2. **Ahmad, J. and R. Baker. 1987.** Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 77(2): 182-189.
3. **Ait-Lahsen, H., A. Soler, M. Rey, J. De la Cruz, E. Monte et A. Llobell. 2001.** An antifungal exo- $\alpha$ -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 67 : 5833-5839.
4. **Altomare, C., W.A. Norvell, T. Björkman and G.E. Harman. 1999.** Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Applied and Environmental Microbiology 65 : 2926-2933.
5. **ARLA, 2002.** Fongicide biologique RootShield *Trichoderma harzianum* Rifai souche KRL-AG2. Note réglementaire REG2002-01. Santé Canada, 27pp.
6. **Bélanger, R.R., N. Dufour, J. Caron et N. Benhamou. 1995.** Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. Biocontrol Science and Technology 5 : 41-53.
7. **Benhamou, N. and I. Chet. 1993.** Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of mycoparasitic process. Phytopathology 83 : 1062-1071.
8. **BioWorks, Inc..** Page consultée le 22 juillet 2003. Adresse URL: <http://www.bioworks.com/rootshield/rootshieldtechfiles.html>
9. **Bliss, D.E. 1951.** The destruction of *Armillaria* in citrus soils. Phytopathology 41 : 665.
10. **Caron, J., L. Laverdière, P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 2002.** Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. Phytoprotection 83 : 73-87.
11. **Chaverri, P., L.A. Castlebury, G.J. Samuels and D.M. Geiser. 2002.** Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum* / *Hypocrea lixii* complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 27 : 302-313.
12. **Datnoff, L.E., S. Nemeč and K. Pernezny. 1995.** Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. Biological Control 5 : 427-431.
13. **Davet, P. 1983.** Les *Trichoderma*: exemple de champignons antagonistes d'agents pathogènes. Pages 193-204 dans Journées d'études et d'informations, Paris. ACTA.
14. **De la Cruz, J. and A. Llobell. 1999.** Purification and properties of a basic endo- $\beta$ -1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry 265 : 145-151.

15. **Donzelli, B.G.G. and G.E. Harman. 2001.** Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. Applied and Environmental Microbiology 67 : 5643-5647.
16. **Elad, Y. and A. Kapat. 1999.** The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 105 : 1777-189.
17. **Graemme-Cook, K.A. and J.L. Faull. 1991.** Effect of ultraviolet-induced mutants of *Trichoderma harzianum* with altered antibiotic production on selected pathogens *in vitro*. Canadian Journal of Microbiology 37 : 659-664.
18. **Hadar, Y., G.E. Harman and A.G. Taylor. 1984.** Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Pythium* spp. Phytopathology 74 : 106-110.
19. **Harman, G.E. 2000.** Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84 : 377-393.
20. **Harman, G.E., B. Latorre, E. Agosin, R. San Martin, D.G. Riegel, P.A. Nielsen, A. Tronsmo and R.C. Pearson. 1996.** Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. Biological Control 7 : 259-266.
21. **Hennis, Y., P.B. Adams, J.A. Lewis and G.C. Papavizas. 1983.** Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. Phytopathology 73 : 1043.
22. **Howell, C.R. 2003.** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87 : 4-10.
23. **Kullnig, C., R.L. Mach, M. Lorito and C.P. Kubicek. 2000.** Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. Applied and Environmental Microbiology 66 : 2232-2234.
24. **Lambert, L., J. Caron et T. Chouffot. 2002.** Avertissement phytosanitaire des cultures en serre. Réseau d'avertissements phytosanitaires, no.10. Page consultée le 22 juillet 2003. Adresse URL: <http://www.agr.gouv.qc.ca/dgpar/rap/cs02.htm>
25. **Larkin, R.P. and D.R. Fravel. 1998.** Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. Plant Disease 82 : 1022-1028.
26. **Lo, C.T., E.B. Nelson, C.K. Hayes and G.E. Harman. 1998.** Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and the phylloplane of creeping bentgrass. Phytopathology 88 : 129-136.
27. **Lo, C.T., E.B. Nelson and G.E. Harman. 1997.** Improved efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phases of turf diseases by use of spray applications. Plant Disease 81 : 1132-1138.
28. **Lorito, M., C.K. Hayes, A. Di Pietro, S.L. Woo and G.E. Harman. 1994.** Purification, characterization, and synergistic activity of glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase and an N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 84 : 398-405.

29. **Mach, R.L., C.K. Peterbauer, K. Payer, S. Jaksits, S.L. Woo, S. Zeilinger, C.M. Kullnig, M. Lorito and C.P. Kubicek. 1999.** Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Applied and Environmental Microbiology* 65 : 1858-1863.
30. **Nemec, S., L.E. Datnoff and J. Strandberg. 1996.** Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protection* 15 : 735-742.
31. **Ordentlich, A., Z. Wiesman, H.E. Gottlieb, M. Cojocar and I. Chet. 1992.** Inhibitory furanone produced by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry* 31 : 485-486.
32. **Sivan, A. and G.E. Harman. 1991.** Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology* 137 : 23-29.
33. **Tronsmo, A. and G.E. Harman. 1993.** Detection and quantification of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry* 208: 74-78.
34. **Utkhede, R. and S. Mathur. 2002.** Biological control of stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Microbiology* 48 : 550-554.
35. **Utkhede, R., C. Bogdanoff and J. McNevin. 2001.** Effects of biological and chemical treatments on *Botrytis* stem canker and fruit yield of tomato under greenhouse conditions. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23 : 253-259.
36. **Vazquez-Garciduenas, S., C.A. Leal-Morales and A. Herrera-Estrella. 1998.** Analysis of the  $\beta$ -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64 : 1442-1446.
37. **Viterbo, A., O. Ramot, L. Chernin and I. Chet. 2002a.** Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current Genetics* 42 : 114-122.
38. **Viterbo, A., M. Montero, O. Ramot, D. Friesen, E. Monte, A. Llobell and I. Chet. 2002b.** Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* 81 : 549-556.
39. **Yedidia, I., N. Benhamou and I. Chet. 1999.** Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 : 1061-1070.
40. **Wells, H.D. 1988.** *Trichoderma* as a biocontrol agent. Pages 71-82 *In* Biocontrol of plant diseases, Vol.1. Mukerji, K.G. et Garg, K.L. CRC Press, Inc.
41. **Zimand, G., Y. Elad and I. Chet. 1996.** Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86 : 1255-1260.

## SERENADE® (*BACILLUS SUBTILIS*)

### DESCRIPTION DU PRODUIT

Serenade se veut un biofongicide à base de *Bacillus subtilis*. Il s'agit d'une bactérie gram positive en forme de bâtonnet et munies de flagelles. Elle se retrouve abondamment dans le sol, l'eau et l'air (EPA, 2003). La souche contenue dans ce biofongicide est la souche QST-713. Cette souche de *Bacillus* a été découverte dans un verger de la Californie par les chercheurs de la compagnie AgraQuest (Marrone, 2002). Ce biofongicide se présente sous plusieurs formes, soit, la poudre mouillable, les granules mouillables et la suspension aqueuse. La préparation sous forme de poudre mouillable contient 10% de matière active et 90% d'ingrédients inertes. AgraQuest garantit une concentration minimale de  $5 \times 10^9$  CFU/g. La suspension aqueuse contient, quant à elle, 1,34% de matière active et 98,66% d'ingrédients actifs. AgraQuest garantit une concentration minimale de  $1 \times 10^9$  CFU/g (AgraQuest, 2003). Ces préparations ont des propriétés quelque peu différentes. Elles sont synthétisées dans le tableau suivant.

**Tableau 27.** Propriétés du biofongicide Serenade sous forme de poudre mouillable ou suspension aqueuse, AgraQuest, USA

Propriété	Serenade® Biofongicide WP (poudre mouillable)	Serenade® (poudre mouillable)	Serenade AS (suspension aqueuse)
Synonyme	QST 713 WP	QST 713 Organic WP	QST 713 AS; QRD131AS; QRD140AS
Point d'ébullition	Pas applicable	Pas applicable	$\geq 100^\circ\text{C}$
Densité	0,64 g/cm <sup>3</sup>	0,45 g/cm <sup>3</sup>	1,0 à 1,3 g/cm <sup>3</sup>
Solubilité dans l'eau	miscible	miscible	miscible
Apparence	Poudreuse	Poudreuse	Suspension aqueuse
Couleur	Brun pâle à brun foncé	Brun pâle à brun foncé	Brun pâle à brun foncé
Odeur	Légèrement terreuse	Légèrement terreuse	Légèrement terreuse

Le mélange d'eau et de poudre mouillable de même que la suspension aqueuse doivent être agités constamment lors de l'application. Le traitement doit commencer avant l'apparition de la maladie et les traitements doivent être répétés régulièrement (7 à 10 jours). Des applications peuvent être faites jusqu'à la récolte. Toutefois, il importe de respecter un délai de réentrée de 4 heures (AgraQuest, 2003; Marrone, 2002).

### MODE D'ACTION ET PRINCIPE ACTIF

Serenade se veut un traitement préventif (AgraQuest, 2003). Les bactéries du type *B. subtilis* sont reconnues pour relâcher des composés permettant de réduire la compétition pour l'espace et les nutriments. De même, ces bactéries produisent des composés pouvant induire une résistance systémique contre les agents pathogènes chez les plantes (AgraQuest, 2003). Les cellules vivantes de *B. subtilis* QST-713 produisent des lypopeptides qui ont un effet antifongique et un effet antibactérien. Ces lypopeptides sont des « *iturins* », des « *agrastatins* » / « *plipastatins* » et des « *surfactins* ». Les « *agrastatins* » et les « *surfactins* » agissent en synergie avec les « *iturins* » pour inhiber la germination des spores, la croissance des tubes germinatifs,

la croissance du mycélium, le développement bactérien et l'attachement de l'agent pathogène au niveau foliaire (AgraQuest, 2003; EPA, 2003; Marrone, 2002).

## SPECTRE D'ACTIVITÉ

Serenade peut être utilisé dans de nombreuses cultures telles que les légumes de serre, les brocolis, les carottes, les cucurbitacées, les haricots verts, les tomates, les pommes de terre, les poivrons, l'ail, les oignons, la menthe et les légumes à feuilles (sauf les *Brassica* spp.). Ce biofongicide est aussi utilisé sur les cerisiers, les pommiers, les poiriers, les vignes, le houblon, les arachides, les grenadines et les marronniers. Serenade est efficace pour contrôler les deutéromycètes, les oomycètes, les ascomycètes et les bactéries reconnus comme agents pathogènes (AgraQuest, 2003). Le tableau 28 montre les différentes maladies et agents pathogènes qui peuvent être contrôlés par Serenade.

**Tableau 28.** Différentes maladies et agents pathogènes contrôlés par Serenade

Nom commun	Agent pathogène
Brûlure hâtive	<i>Alternaria solani</i>
Tache noire	<i>Alternaria brassicicola</i>
Brûlure alternarienne Pourriture noire alternarienne	<i>Alternaria alternata</i>
Pourriture noire	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
Moisissure grise	<i>Botrytis cinerea</i>
Mildiou	<i>Bremia lactucea</i>
Cercosporiose	<i>Cercospora beticola</i>
Gale	<i>Cladosporium cucumerinum</i>
Tavelure	<i>Cladosporium carpophilum</i>
Anthracnose	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
Anthracnose	<i>Colletotrichum acutatum</i>
Pourriture noire	<i>Didymella bryoniae</i>
Pourriture molle	<i>Erwinia carotovora</i>
Brûlure bactérienne	<i>Erwinia amylovora</i>
Blanc	<i>Erysiphe cichoracearum</i>
Flétrissement verticillien	<i>Fusarium oxysporum</i>
Blanc	<i>Leveillula taurica</i>
Pourriture brune	<i>Monilinia fructicola</i>
Mildiou	<i>Peronospora parasitica</i>
Jambe noire	<i>Phoma lingam</i>
Brûlure des feuilles	<i>Phomopsis obscurans</i>
Branche moribonde	<i>Phomopsis viticola</i>
Brûlure tardive	<i>Phytophthora infestans</i>
Pourriture des fruits	<i>Phytophthora capsici</i>
Mildiou	<i>Plasmopara viticola</i>
Blanc	<i>Podosphaera leucotricha</i>
Brûlure bactérienne	<i>Pseudomonas syringae</i>
Mildiou	<i>Pseudoperonospora humali</i>
Rouille	<i>Puccinia antirrhini</i>

**Tableau 28 (suite).** Différentes maladies et agents pathogènes contrôlés par Serenade

Pyriculariose	<i>Pyricularia oryzae</i>
Fonte des semis	<i>Rhizoctonia solani</i>
Pourriture scérotique	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Tache septorienne	<i>Septoria apii</i>
Blanc	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>
Blanc	<i>Sphaerotheca macularis</i>
Cloque	<i>Taphrina deformans</i>
Moisissure verte du champignon	<i>Trichoderma</i> spp.
Blanc	<i>Uncinula necator</i>
Rouille	<i>Uromyces phaseoli</i>
Tavelure du poirier	<i>Venturia pyrina</i>
Tavelure du pommier	<i>Venturia inaequalis</i>
Verticilliose	<i>Verticillium dahliae</i>
Tache bactérienne	<i>Xanthomonas campestris</i>

(AgraQuest, 2003)

## COMPATIBILITÉ

Serenade se veut compatible avec des produits à base de soufre et de cuivre de même qu'avec les engrais foliaires. Le biofongicide est aussi compatible avec les insecticides et les fongicides chimiques. C'est aussi le cas des surfactants à base de silicone (AgraQuest, 2003).

Ce biofongicide utilisé en application foliaire peut être utilisé seul, en alternance avec un fongicide chimique ou en mélange avec un fongicide chimique (AgraQuest, 2003). Serenade s'est montré efficace en rotation avec les strobilurines et certains autres fongicides. Une telle rotation a permis l'obtention d'un meilleur contrôle des maladies (Marrone, 2002). Un mélange de Serenade et d'un produit à base de cuivre a permis d'augmenter l'efficacité du traitement contre les bactéries et les mildious (Marrone, 2002).

Ce biofongicide se veut sans danger pour les poissons, les oiseaux et les invertébrés aquatiques. De même, il est sans effet pour les insectes bénéfiques tels que les abeilles, les coccinelles, les guêpes parasitoïdes et les *Chrysoperla* spp. Il en va de même pour les vers de terre (AgraQuest, 2003; Marrone, 2002).

## TESTS D'EFFICACITÉ

En 2001, Olsen et al. ont évalué *B. subtilis* en tant qu'agent de lutte biologique contre le blanc (*Oidiopsis taurica*) dans les serres commerciales de poivrons. Les plants étaient traités tous les 10 à 14 jours. À la fin de l'expérience, dix feuilles étaient prélevées sur chaque plant afin d'évaluer le pourcentage de couverture de la surface foliaire par l'agent pathogène. De même, le nombre de feuilles infectées était évalué. Une moyenne des dix plants des quatre répétitions a été calculée. Il en est ressorti que Serenade, appliqué au taux de 1%, a significativement diminué la gravité et l'incidence de la maladie en comparaison avec le témoin. En effet, le pourcentage de surface foliaire couvert par le blanc était de 20,3% chez le témoin et de 2,4% chez les plants traités avec Serenade. De même, le nombre de feuilles infectées était de 5,8 sur 10 feuilles évaluées chez le témoin en comparaison avec 1,8 feuille atteinte sur 10 feuilles évaluées chez les plants traités avec Serenade.

En 2003, Agostini et al. ont évalué le potentiel de Serenade à contrôler des maladies telles que la tavelure chez le citron (*Elsinoe fawcetti*), la mélanose chez le pamplemousse (*Diaporthe citri*) et la tache brune chez la tangerine (*Alternaria alternata* p.v. *citri*) (tab. 29). Des applications en pré-inoculation de la maladie ont permis de réduire l'incidence de *E. fawcetti* chez les plants traités avec Serenade. Lors d'une première expérience où l'incidence de la maladie était faible, il a été possible d'observer une réduction significative de la maladie en comparaison avec le témoin non traité, diminution comparable à celle obtenue avec un fongicide chimique (Benlate 50WP). Lors d'une deuxième expérience où l'incidence de la tavelure était plus élevée, Serenade s'est vu moins efficace à contrôler la maladie, le nombre de lésions par feuilles se rapprochant tantôt de la valeur témoin, tantôt de la valeur obtenue avec Benlate (tab. 29).

**Tableau 29.** Effet de Serenade sur l'incidence de *Elsinoe fawcetti* sur des plants de citron

Traitement	Taux d'application (g/l)	Expérience 1		Expérience 2	
		Nbre de jours avant l'inoculation de <i>E. fawcetti</i>	Nbre de lésions par feuille	Nbre de jours avant l'inoculation de <i>E. fawcetti</i>	Nbre de lésions par feuille
Témoin	---	---	5,9 a	---	49,8 a
Serenade	14,5	-13, -5	1,7 b	-15, -5	24,4 ab
Serenade	14,5	-5	2,2 ab	-5	59,0 a
Serenade	29,0	-13, -5	2,9 ab	-15, -5	35,8 ab
Serenade	29,0	-13, -1	0,1 b	-15, -1	26,1 ab
Serenade	29,0	-5	1,5 b	-5	25,0 ab
Benlate 50WP	1,2	-13, -5	1,4 b	-15, -5	13,1 b

En ce qui concerne le contrôle de la mélanose chez le pamplemousse, les applications pratiquées une journée avant l'inoculation avec *Diaporthe citri* ont été remarquablement efficaces (tab. 30). La gravité de la maladie sur les plants traités avec Serenade, une journée avant l'inoculation de l'agent pathogène, était alors comparable à celle des plants traités avec un fongicide chimique (Abound 2,08EC). Ceci s'explique probablement par le fait que *B. subtilis* est plus efficace à inhiber la germination des spores des agents pathogènes qu'à induire une réponse de défense chez les plants d'agrumes.

**Tableau 30.** Effet de Serenade sur le développement de *Diaporthe citri* sur des plants de pamplemousses

Traitement	Taux d'application par litre	Expérience 1		Expérience 2	
		Nbre de jours avant l'inoculation de <i>Diaporthe citri</i>	Taux de gravité (0-4)*	Nbre de jours avant l'inoculation de <i>Diaporthe citri</i>	Taux de gravité (0-4)*
Témoin	---	---	1,7 ab	---	2,1 a
Serenade	14,5 g	-5	1,5 abc	-5	0,9 cd
Serenade	14,5 g	-11, -5	1,7 ab	-12, -5	1,5 b
Serenade	29,0 g	-5	1,8 ab	---	---
Serenade	29,0 g	-11, -5	1,8 ab	-12, -5	1,4 bc
Serenade	29,0 g	-11, -1	1,0 c	-12, -1	0,4 e
Abound 2,08EC	1,0 ml	-15, -5	1,2 bc	-12, -5	0,8 de

\* 0 = pas de lésion

- 1 = 1 à 10 lésions par feuille
- 2 = 11 à 100 lésions par feuille
- 3 = 101 à 1000 lésions par feuille
- 4 = toutes les lésions se touchent 2 à 3 semaines après l'inoculation

Agostini et al. ont aussi vérifié l'efficacité de Serenade à contrôler *Alternaria alternata* p.v. *citri* sur des plants de tangerines. Ils ont observés une diminution significative du nombre de lésions par feuilles sur les plants traités avec Serenade en comparaison avec les plants non traités. Toutefois, les plants traités avec Serenade ont présentés plus de lésions par feuilles que les plants traités avec le fongicide chimique (Abound 2,08EC).

En 2002, Utkhede et Mathur ont étudié l'effet de *B. subtilis* (QRD 136 et QRD 137) sur la jambe noire causée par *B. cinerea* sur des plants de tomates. Le Quadra 136 est une formulation liquide (20 g/l) alors que le Quadra 137 est poudre mouillable (10g/l). Des lésions ont été faites sur les plants. Ces blessures ont été vaporisées avec *B. subtilis* puis, avec *B. cinerea* deux heures plus tard. Une diminution significative de la taille des lésions a été observée sur les plants traités avec QRD 136 au cours des mois de mai, juillet et août. Toutefois, il n'y a pas eu de différence quant au rendement par plant, au nombre de fruits par plant et au poids des fruits. Ces produits à base de *B. subtilis* ont un potentiel de lutte contre *B. cinerea*. Cependant, il importe de laisser plus de temps à l'agent de lutte biologique pour s'établir sur les lésions avant d'introduire l'agent pathogène.

En 2002, Holtz et al. ont vérifié l'effet de Serenade sur le contrôle de la brûlure bactérienne causée par *Erwinia amylovora*. Serenade a été appliqué pendant la floraison de trois cultivars sur les arbres traités à un taux d'application de 6,73 kg/ha et de 8,97 kg/ha. À un taux d'application de 6,73 kg/ha, l'incidence de la brûlure bactérienne a été réduite en comparaison avec un témoin non traité. Toutefois, aucune diminution de la maladie n'a été observée sur les plants traités à un taux de 8,97 kg/ha.

En 2003, Du Toit et Derie ont observé l'impact de Serenade sur diverses maladies du chou de Bruxelles. Dans un premier temps, ils ont vérifié l'effet de *B. subtilis* QRD 131 et QRD 137 sur la moisissure grise. Il n'y a pas eu de différence significative entre les plants traités et les plants non traités, que ce soit au niveau du poids sec des plants ou de l'incidence de la maladie. Dans un deuxième temps, ils ont observé l'impact de Serenade en alternance avec le fongicide chimique Bravo sur *Sclerotinia sclerotiorum* et sur *Alternaria brassicicola*. Ils n'ont obtenu aucune différence significative entre les plants traités avec Serenade et les plants non traités en ce qui concerne la répression de *S. sclerotiorum*. Toutefois, l'importance de *A. brassicicola* a été diminuée dans les parcelles traitées avec Serenade en comparaison avec les plants non traités. L'incidence de la maladie était de 31 à 40% chez les plants traités et de 61 à 70% chez les plants non traités. Finalement, ils ont vérifié l'efficacité de Serenade à contrôler *S. sclerotiorum* et *Mycosphaerella brassicicola* sans alternance avec un fongicide chimique. Aucune différence significative n'a été notée quant à l'incidence de ces maladies ou à leur progression.

Plusieurs tests ont été effectués par la compagnie AgraQuest afin de déterminer l'efficacité de Serenade à prévenir les diverses maladies retrouvées sur les grappes de raisins. Dans bien des cas, l'efficacité de Serenade était comparable à celle des fongicides chimiques normalement utilisés. Un effet curatif a même été noté contre des maladies telles que le blanc et le mildiou.

**Tableau 31.** Efficacité de divers traitements appliqués sur des grappes de raisins

	Serenade	Rovral	Elite	Rally	Vangard	Elevate	Sovran	Dithane	Abound	Flint
Pourriture de la grappe ( <i>B. cinerea</i> )	Préventif	Préventif			Préventif	Préventif		Préventif		
Blanc ( <i>U. necator</i> )	Préventif		Préventif	Préventif	Curatif		Préventif		Préventif	Préventif
Pourriture amère ( <i>B. cinerea</i> )	Préventif									
Mildiou ( <i>P. viticola</i> )	Curatif						Préventif	Préventif	Préventif	Préventif
Intervalle avant la récolte (jrs)	0	*	14	14	7	0	14	66*	14	14
Intervalle de réentrée (heures)	4	48	12	24	12	4	12	24	12	12

(AgraQuest, 2003)

\* Pas d'application après la floraison

	Préventif
	Curatif

## MARCHÉ ET PRODUCTION

Serenade est homologué aux États-Unis, au Chili, au Mexique, en Nouvelle-Zélande et au Costa Rica. De plus, son homologation est en processus aux Philippines, au Japon et en Europe (Marrone, 2002). Ce biofongicide est homologué pour les cultures en serre et en champs de même que pour la vente au détail (intérieur/extérieur) (Marrone, 2002). Aux États-Unis, la préparation granulaire est reconnue par l'OMRI (Marrone, 2002).

## RÉFÉRENCES SERENADE®

---

1. **Agostini, J.P., P.M. Bushong and L.W. Timmer. 2003.** Greenhouse evaluation of products that induce host resistance for control of scab, melanose, and *Alternaria* brown spot citrus. *Plant Disease* 87 : 69-74.
2. **AgraQuest, 2003.** Serenade biofungicide. Page consultée le 12 septembre 2003. Adresse URL : <http://www.agraquest.com/serenade/sermain.html>
3. **Du Toit, L.J. and M.L. Derie. 2003.** Diseases of Brassica seed crops : 2001/02 fungicide efficacy trials. Proceeding of the 92<sup>nd</sup> annual meeting of the Western Washington Horticulture Association, SeaTac, WA.
4. **EPA, 2003.** Bacillus subtilis strain QST 713. Page consultée le 12 septembre 2003. Adresse URL : [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech\\_docs/tech\\_006479.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/tech_006479.htm)
5. **Marrone, P.G. 2002.** An effective biofungicide with novel modes of action. *Pesticide-Outlook* 13 : 193-194.
6. **Olsen, M.W., J. Oehler and P. Rorabaugh. 2001.** Evaluation of fungicide for control of powdery mildew of greenhouse pepper. University of Arizona College of Agriculture, Vegetable Report. Page consultée le 12 septembre 2003. Adresse URL : <http://ag.arizona.edu/pubs/crop/az1252/>
7. **Utkhede, R. and S. Mathur. 2002.** Biological control of stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Microbiology* 48 : 550-554.

### Documents suggérés

1. **Aldwinckle, H.S., M.V.B. Reddy, J.L. Norelli, C. Hale and R. Mitchell. 2002.** Evaluation of control of fire blight infection of apple blossoms and shoots with SAR inducers, biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials. Proceeding of the IX<sup>th</sup> international workshop on fire blight, Napier, New Zealand. *Acta-Horticulturae* 590 : 325-334.
2. **Holtz, B.A., E.W. Hoffman, S.E. Lindow, B.L. Tediotald, C. Hale and R. Mitchell. 2002.** Enhancing flower colonization of *Pseudomonas fluorescens* strain A506, and efficacy of Apogee and Serenade, for fire blight control in the San Joaquin Valley of California. Proceeding of the IX<sup>th</sup> international workshop on fire blight, Napier, New Zealand. *Acta-Horticulturae* 590 : 319-324.
3. **Isebaert, S., R. Verhoeven et G. Haesaert. 2002.** Disease control by means of induced resistance. 54<sup>th</sup> International Symposium on Crop Protection, Part 1. Mededelingen-Faculteit-Landbouwkundige-en-Toegepast-Biologische-Wetwenschappen-Universiteit-Gent 67 : 159-164.
4. **Stephan, D., E. Koch, Y. Elad, J. Kohl et D. Shtienberg. 2002.** Screening of plant extracts, microorganisms and commercial preparations for biocontrol of *Phytophthora infestans* on detached potato leaves. IOBC-WPRS Working Group 'Biological control of fungal and bacterial plant pathogens'. Proceeding of the 7<sup>th</sup> working group meeting, Influence of abiotic and biotic factors on biocontrol agents at Pine Bay, Kusadasi, Turkey. *Bulletin-OILB-SROP* 25 : 391-394.

## **PRESTOP® (*GLIOCLADIUM CATENULATUM*J1446)**

### **DESCRIPTION DU PRODUIT**

Prestop est un biofongicide à base de *Gliocladium catenulatum*. Il s'agit d'un champignon saprophyte largement répandu à l'état naturel (EPA, 2002). Plus précisément, il s'agit de la souche J1446 qui a été isolée dans un champ en Finlande et commercialisée par la compagnie Kemira Agro Oy (Paulitz et Bélanger, 2001).

C'est une préparation sous forme de poudre mouillable contenant 37% de matière active (*G. catenulatum*). Ce biofongicide peut être utilisé en vaporisation sur le sol, les racines et le feuillage ou en incorporation dans le substrat. Le traitement peut être effectué au semis, à l'empotage ou à la transplantation. De même, le traitement doit être répété de 2 à 6 semaines après l'empotage et de 2 à 8 semaines après la transplantation. Lorsqu'il est incorporé au sol, il est recommandé de l'utiliser à raison de 0,05 à 1,2 grammes par litre de substrat (0,05 à  $1,2 \times 10^8$  CFU/l). Au semis, un taux de 5 à 25 grammes par mètre carré est préconisé ( $5$  à  $25 \times 10^8$  CFU/l) alors qu'un taux de 1 à 10 grammes par mètre carré est appliqué au niveau foliaire ( $1$  à  $10 \times 10^8$  CFU/l). La croissance est optimale à des températures de 25 à 28°C et à un pH de 5 à 6. Par ailleurs, il n'y a pas de délai de réentrée nécessaire suite à l'application de ce biofongicide. (EPA, 2002)

### **MODE D'ACTION ET PRINCIPE ACTIF**

Les champignons du genre *Gliocladium* sont reconnus comme antagonistes et parasites d'autres champignons. Ils agissent contre les agents pathogènes fongiques par divers moyens. Dans un premier temps, ils compétitionnent pour l'espace et les nutriments disponibles de l'écosystème. De même, ils produisent des substances antibiotiques et des enzymes hydrolytiques qui permettent à cet agent biologique d'affaiblir les agents pathogènes. Les antibiotiques peuvent être la gliotoxine, la viridine et la gliovirine. Les enzymes peuvent être les exoglucanases, les endoglucanases, les cellobiases et les chitinases. De plus, *Gliocladium* privilégie les contacts directs, d'hyphe à hyphe, dans le but de parasiter son opposant (Bailey et Lumsden, 1998; Papavizas, 1985).

Il est à noter que bon nombre d'articles traitent des modes d'action de *Gliocladium* de manière parallèle aux modes d'action de *Trichoderma* et que souvent les exemples présentés concernent principalement *Trichoderma*. Dans une étude portant sur l'interaction de *G. catenulatum* avec *Botrytis aclada*, Köhl et al. (1997) ont observé une perte de turgescence, une dégradation du cytoplasme et un épaississement de la paroi des cellules de *B. aclada* placées à proximité de *G. catenulatum*. Il s'agit du résultat de l'activité antibiotique exprimée par l'agent de lutte biologique (Köhl et al., 1997; Okuda et al., 2000).

Selon la compagnie Kemira Agro Oy, le principal mode d'action de *G. catenulatum* J1446 résiderait dans le parasitisme. L'agent de lutte biologique s'enroulerait autour des hyphes de l'agent pathogène. De même, la production d'enzymes hydrolytiques permettrait la lyse des cellules de l'agent pathogène (Kemira Agro Oy, 2000 cité dans Utkhede et Mathur, 2002).

En 2001, McQuilken et al. ont observé l'interaction entre l'agent de lutte biologique *G. catenulatum* J1446 et les agents pathogènes *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani* au microscope électronique. Les hyphes de *G. catenulatum* se sont enroulés autour des hyphes des agents pathogènes. De plus, grâce à l'appressorium de *G. catenulatum*, les hyphes de l'agent de lutte biologique ont pénétré à l'intérieur des hyphes des agents pathogènes procédant ainsi à leur dégradation partielle.

## SPECTRE D'ACTIVITÉ

L'efficacité de *G. catenulatum* a été reconnue dans 55 cultures différentes. Au départ, l'homologation s'appliquait strictement aux cultures en serre ou aux plantes d'intérieur. Maintenant, il est aussi homologué dans les cultures au champ telles les légumes, les fines herbes, les plantes ornementales, les arbres, les arbustes et le gazon. Ce biofongicide peut traiter des légumes et des fruits variés : artichaut, asperge, haricot, betterave, brocoli, chou de Bruxelles, chou, carotte, chou-fleur, céleri, chicorée, chou chinois, maïs, concombre, aubergine, endive, ail, raifort, chou frisé, poireau, lentille, laitue, melon, épinard, oignon, panais, pois, poivron, pomme de terre, citrouille, radis, rutabaga, courge, fraise, tomate, navet et melon d'eau. Les fines herbes traitées sont aussi multiples : anis, basilic, cumin, ciboulette, aneth, fenouil, lavande, marjolaine, origan, persil, romarin, sauge, sariette, thym et cresson (EPA, 2002; Niemi et Lahdenpera, 2000; Ohio University, 2003; Walsh, 2001).

Ce biofongicide contrôle diverses maladies telles que la fonte des semis, la pourriture des semis, la pourriture racinaire et le flétrissement. Prestop contrôle donc *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Didymella*, *Botrytis*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Penicillium* et *Plicaria* (EPA, 2002; Niemi et Lahdenpera, 2000; Ohio University, 2003; Paulitz et Bélanger, 2001).

## COMPATIBILITÉ

En 2001, McQuilken et al. ont vérifié l'impact des fongicides chimiques sur la croissance de *G. catenulatum*. Il a été noté que le furanaxyl (), le propamocarbe (Banol, Previcur) et le fosétyl (Aliette) n'avait qu'un effet minime sur la croissance de l'agent de lutte biologique.

Aucun effet néfaste n'a été noté sur la faune ailée, les poissons, les invertébrés aquatiques ou les plantes non ciblées. De même, ce biofongicide n'a pas d'impact négatif sur les insectes bénéfiques tels que les hyménoptères parasitoïdes, les coccinelles et les abeilles. Un effet toxique à court terme peut survenir chez les *Chrysoperla* spp (EPA, 2002).

## TESTS D'EFFICACITÉ

En 2002, Utkhede et Mathur ont vérifié l'efficacité de Prestop à contrôler la jambe noire causée par *B. cinerea* sur des plants de tomates cultivés en conditions semi-commerciales (tab. 32). Ils ont fait une lésion par plant et ce, cinq semaines après leur transplantation. Ils ont traité ces lésions avec Prestop puis, ils les ont vaporisées avec *B. cinerea* deux heures plus tard. Tout au long de l'expérience, Prestop a significativement diminué la taille des lésions en comparaison avec les plants non traités, offrant ainsi une protection similaire à celle obtenue avec le fongicide chimique Decree (fenhexamid). La mortalité des plants a aussi été diminuée par le traitement avec Prestop et ce, au même titre qu'avec Decree. Selon ces mêmes auteurs, Prestop serait aussi efficace en tant que traitement curatif contre la moisissure grise.

**Tableau 32.** Effet des différents traitements appliqués en prévention sur la taille des lésions et la mortalité des plants de tomates causées par *Botrytis cinerea*

Traitement	Concentration (g/l)	Taille des lésions (cm)					% plants morts
		Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	
Decree	5	2,8 a	1,3 c	0,9 c	1,5 de	0,7 d	0,0 a
Prestop	10	1,2 b	1,1 c	0,7 c	0,8 e	0,7 d	0,0 a
Témoin	---	3,8 a	4,5 a	5,1 ab	6,9 a	7,2 a	26,4 b

De même, Utkhede et Mathur ont aussi observé une augmentation du rendement en fruits sur les plants traités avec Prestop tout comme chez les plants traités au Decree (tab. 33). Dans le cas de ces deux traitements, il n'y a cependant pas eu d'augmentation significative du nombre de fruits par plants ou du poids des fruits en comparaison avec les plants non traités.

**Tableau 33.** Effet des différents traitements appliqués en prévention sur le rendement en fruits, le nombre de fruits par plant et le poids des fruits issus de plants de tomates inoculés avec *Botrytis cinerea*

Traitement	Concentration (g/l)	Rendement par plant (kg)	Nbre de fruits par plant	Poids moyen par fruit (g)
Decree	5	12,14 a	67,5 a	186,5 ab
Prestop	10	11,72 a	63,9 a	195,6 ab
Témoin	---	10,38 b	60,6 a	187,2 ab

McQuilken et al. ont vérifié l'aptitude de *G. catenulatum* à réduire l'incidence de *P. ultimum* chez les *Viola* et les *Antihinum* et l'incidence de *R. solani* chez les *Alyssum* et les *Salvia*. Ils ont conclu que Prestop est aussi efficace que des fongicides chimiques à base de propamocarbe ou de tolclofos pour réduire la fonte des semis (McQuilken et al., 2001; McQuilken et Mohammadi, 1997).

Toutefois, une autre expérience menée sur des plants de géranium a permis d'observer qu'il n'y avait pas de différence de hauteur chez les plants d'abord inoculés avec *Pythium* et ensuite traités avec Primastop en comparaison avec les plants inoculés avec *Pythium* (5,1 cm vs 6,0 cm). Par contre, les plants non inoculés avec *Pythium* et non traités avec Primastop atteignaient une hauteur de 9,2 cm (Michigan University, 2002).

De même, une expérience menée sur l'effet de Primastop sur *Phytophthora capsici* chez le poivron a permis de noter qu'il n'y a pas eu de différence entre les plants traités avec Primastop et les plants non traités quant à la progression de la maladie, le rendement vendable et les nombre de fruits infectés par *Phytophthora*. Il importe de noter que la maladie était présente au champ dès la transplantation alors que le premier traitement avec Primastop a été effectué après la transplantation (Miller, 2000).

En 2002, Punja et al. ont évalué le niveau de contrôle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* et de *Pythium aphanidermatum* par le biofongicide Prestop sur des plants de concombres de serre semi-commerciale. Le biofongicide était appliqué dans le terreau ou sur la laine de roche. Un tel traitement a permis une diminution de la mortalité des plants de plus de 65%.

## **MARCHÉ ET PRODUCTION**

La souche J1446 de *G. catenulatum* a été homologuée par l'EPA sous le nom commercial de Primastop. Le processus d'homologation sous le nom commercial Prestop est en cours en Europe (EPA, 2002).

## RÉFÉRENCES PRESTOP®

---

1. **Bailey, B.A. and R.D. Lumsden. 1998.** Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. Dans G.E. Harman et C.P. Kubicek (eds), *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2 : 185-204.
2. **EPA, 2002.** Biopesticides registration action document, *Gliocladium catenulatum* strain J1446 (PC Code 021009). Page consultée le 12 septembre 2003. Adresse URL : [www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech\\_docs/brad\\_021009.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/brad_021009.pdf)
3. **Köhl, J., R.R. Bélanger and N.J. Fokkema. 1997.** Interaction of four antagonistic fungi with *Botrytis aclada* in dead onion leaves: a comparative microscopic and ultrastructural study. *Phytopathology* 87 : 634-642.
4. **McQuilken, M.P., J. Gemmell and M.L. Lahdenpera. 2001.** *Gliocladium catenulatum* as a potential biological control agent of damping-off in bedding plants. *Journal of Phytopathology* 149 : 171-178.
5. **McQuilken, M.P. and O. Mohammadi. 1997.** Evaluation of a commercial formulation of *Gliocladium catenulatum* (J1446) for biocontrol of damping-off in bedding plants. Proceedings of the 49<sup>th</sup> International symposium on crop protection, Gent, Belgium, Part IV. Mededelingen-Faculteit-Landbouwkundige-en-Toegepaste-Biologische-Wetenschappen, Universiteit Gent 62 : 987-992.
6. **Michigan University. 2002.** Managing diseases on geranium: recent studies. *Greenhouse Alert*, no.9. Page consultée le 23 septembre 2003. Adresse URL : <http://www.ipm.msu.edu/greenhouse02/G04-9-02.htm>
7. **Miller, S. 2000.** Pepper research update: *Phytophthora* blight control. Departement of Plant Pathology, Ohio State University.
8. **Niemi, M. and M.L. Lahdenpera. 2000.** *Gliocladium catenulatum* J1446 – a new fungicide for horticultural crops. 17<sup>th</sup> Danish plant protection conference, horticulture. DJF-Rapport, Havebrug (12) : 81-88.
9. **Ohio University. 2003.** Alternative disease control strategies. 2003 Ohio Vegetable Production Guide, Bulletin 672-03. Page consultée le 23 septembre 2003. Adresse URL : [http://ohioline.osu.edu/b672/alternative\\_disease\\_control\\_strategies.html](http://ohioline.osu.edu/b672/alternative_disease_control_strategies.html)
10. **Okuda, T., J. Kohno, N. Kishi, Y. Asai, M. Nishio and S. Komatsubara. 2000.** Production of TMC-151, TMC-154 and TMC-171, a new class of antibiotics, is specific to '*Gliocladium roseum*' group. *Mycoscience* 41 : 239-253.
11. **Papavizas, G.C. 1985.** *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23 : 23-54.
12. **Paulitz, T.C. and R.R. Bélanger. 2001.** Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39 : 103-133.
13. **Punja, Z.K., S. Rose, R. Yip, Y. Elad, J. Kohl and D. Shtienberg. 2002.** Biocontrol agents and composts suppress *Fusarium* and *Pythium* root rots on greenhouse cucumbers. IOBC-WPRS Working

Group 'Biological control of fungal and bacterial plant pathogens'. Proceeding of the 7<sup>th</sup> working group meeting, Influence of abiotic and biotic factors on biocontrol agents at Pine Bay, Kusadasi, Turkey. Bulletin-OILB-SROP 25 : 93-96.

14. **Utkhede, R.S. and S. Mathur. 2002.** Biological control of stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. Can. J. of Microbiology 48 : 550-554.
15. **Walsh, D. 2001.** Agrichemical & Environmental News (184) : 10.

**Documents suggérés**

1. **Joshi, B.K., J.B. Gloer and D.T. Wicklow. 1999.** New verticillin and glioprenin analogues from *Gliocladium catenulatum*, a mycoparasite of *Aspergillus flavus* sclerotia. Journal of Natural Products 62 : 730-733.

## CONCLUSIONS

Qu'arrivera-t-il de la lutte biologique contre les maladies dans les serres? Le modèle de la lutte biologique contre les insectes dans les serres peut être un excellent modèle pour continuer les recherches sur les biofongicides. Selon le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, l'utilisation de la lutte chimique et biologique en Grande-Bretagne a été évaluée depuis 1968 (Garthwaite, 2000). L'utilisation des agents biologiques pour toutes les productions en Grande-Bretagne est passée de 17 ha traités en 1968 à 3813 en 1981 et à 30 889 en 1995; une augmentation décuplée au cours des 14 dernières années principalement à cause de la lutte biologique aux insectes puisque aucun biofongicide n'était homologué en Grande-Bretagne en 1995. Cependant, les plus grandes augmentations ont été enregistrées pour la protection des cultures serricoles : 13 960 ha pour les plantes comestibles et 7074 ha pour les plantes ornementales en 1995. Même si les productions serricoles ne représentent qu'un faible pourcentage de la superficie totale cultivable, elles utilisent près du deux tiers de tous les agents biologiques disponibles. Au même moment, l'utilisation des insecticides dans les serres a chuté de 4866 ha traités en 1981 à 2292 ha en 1995. Pour la tomate de serre, la plus importante plante comestible de la Grande-Bretagne, ces aires traitées avec les insecticides chimiques sont passés de 2497 ha en 1976 à 324 ha en 1995 tandis que les aires traitées biologiquement passaient de 406 ha en 1976 à 10 350 ha en 1995, soit une augmentation de 23 fois. En 1985, seulement quatre produits étaient disponibles tandis que dix ans plus tard, il y avait 16 produits biologiques.

Bien que le marché des serres soit petit lorsque comparé à la surface cultivable au champ, il représente plus de 300 000 ha dans le monde dont 50 000 ha sont consacrés à des systèmes de production hautement sophistiqués. Les rendements peuvent excéder ceux du champ de près de 40 fois pour des aires de production similaires (van Lenteren, 2000). Les serres offrent donc un environnement privilégié pour le contrôle des maladies mais leur utilisation à cette fin est encore très limitée. Quelques produits sont actuellement disponibles et plusieurs autres devraient occuper le marché au cours des prochaines années.

## RÉFÉRENCES GÉNÉRALES

---

1. **Baker, K.F. and Snyder, WC, eds. 1965.** Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens: Prelude to Biological Control. Berkeley, CA: Univ. Calif. Press. 571 pp.
2. **Bélanger, R.R., A.J. Dik and J.G. Menzies. 1998.** Powdery Mildews – Recent Advances toward Integrated Control. *In* Plant-Microbe Interactions and Biological Control. Boland, GJ, Kuykendall, LD, eds. New-York: Marcel Dekker. pp. 89-109.
3. **Cook, R.J. and K.F. Baker. 1983.** The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St Paul : APS Press. 539 pp.
4. **Cross, J. and D.R. Polonensko. 1996.** An industry perspective on registration and commercialization of biocontrol agents in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 18 : 455-62.
5. **FAOSTAT. 2000.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://apps.fao.org/>
6. **Fravel, D.R., D.J. Rhodes and R.P. Larkin. 1999.** Production and Commercialisation of Biocontrol Products. *In* Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. Albajes, R., Guillino, M.L., van Lenteren, J.C. and Elad Y., eds. Pp. 365-76.
7. **Garthwaite, D. 2000.** Changes in biological control usage in Great Britain between 1968 and 1995 with particular reference to biological control on tomato crops. *Biocontrol Science Technol.* 10:451-57.
8. **Guillino, M.L., R. Albajes and J.C. van Lenteren. 1999.** Setting the Stage: Characteristics of Protected Cultivation and Tools for Sustainable Crop Protection. *In* Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. Albajes, R., Guillino, M.L., van Lenteren, J.C. and Elad Y., eds. Pp. 1-15.
9. **Harman, G.E. 2000.** Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84 : 377-393.
10. **Jarvis, WR and K. Slingsby. 1977.** The Control of Powdery Mildew of Greenhouse Cucumber by Water Sprays and *Ampelomyces quisqualis*. *Plant Dis. Repr.* 61 : 728-30.
11. **Paulitz, T. 1997.** Biological control of root pathogens in soilless and hydroponic systems. *HortScience* 32 : 193-96.
12. **Paulitz, T. and R.R. Bélanger. 2001.** Biocontrol in greenhouse systems. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39:103-133.
13. **Powell, K.A. and A.R., Jutum. 1993.** Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pest. Sci.* 37:315-21.
14. **Statistics Canada. 1998.** Greenhouse, sod and nursery Industries. Catalogue no 22-202-XIB, pp. 14-15.

15. van Lenteren, JC. 2000. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? Crop Prot. 19 : 375-84.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le biofongicide Sporodex, constitué du champignon *Pseudozyma flocculosa*, a été créé afin de réprimer le blanc ou oïdium dans plusieurs cultures dont en particulier le concombre et la rose. La formulation commerciale, sous la forme d'un concentré liquide congelé, a démontré son efficacité au cours des dernières années lors de tests en serre dans différents pays. En effet, les expérimentations ont démontré que le biofongicide Sporodex permettrait de contrôler le blanc aussi efficacement que les pesticides chimiques. De plus, il est facile à utiliser et peu toxique pour les utilisateurs.

Le biofongicide Sporodex a donc été homologué pour le Canada et les États-Unis en 2002. À cet effet, plusieurs expérimentations se devaient d'être réalisées afin d'optimiser la production et la formulation de ce produit. Tout d'abord, il était important d'effectuer des productions commerciales en fermenteur afin d'enseigner les techniques de production aux intervenants concernés, d'optimiser le procédé de production, d'évaluer le potentiel de nouvelles installations de production ainsi que de produire de la biomasse pour divers essais. De plus, afin de mieux comprendre le développement de l'agent de lutte *P. flocculosa* et d'optimiser la production et l'utilisation, des essais en laboratoire devaient être effectués.

Dans le but d'atteindre ces objectifs, de nombreuses expérimentations et travaux ont été réalisés dans le laboratoire du Dr Richard Bélanger. Des productions en fermenteur du champignon *P. flocculosa* ont été réalisées dans quatre sites dont :

**Productions chez AEF Global à St-Hyacinthe**

**Productions chez Lallemand à Montréal**

**Productions chez CWBI en Belgique**

**Productions chez CREFSIP à l'Université Laval.**

Parallèlement à ces productions, des essais ont été réalisés en fioles afin de comprendre le développement de *P. flocculosa* dans diverses conditions de milieu et des tests de formulation, d'entreposage et de fermentation ont été effectués.

### **Durée de conservation du biofongicide Sporodex**

La survie à l'entreposage du biofongicide Sporodex est un facteur crucial et limitant dans le procédé. En effet, les distributeurs exigent une survie à l'entreposage d'au moins six mois avec un minimum acceptable de  $3 \times 10^8$  UFC/ml (Unité Formant des Colonies / ml). Ces exigences sont atteintes facilement avec des productions en petits volumes (fermenteur de 30L, 100L et 150L) alors qu'avec des gros volumes (1500L et 2000L), ce n'est pas toujours le cas.

Au cours de ce projet, il a donc été important d'évaluer la durée de conservation de différentes productions afin de s'assurer qu'elles respectent les exigences commerciales. Cette partie avait donc pour objectif de résumer les principaux résultats obtenus à cet effet.

L'évaluation de la durée de conservation est déterminée par des étalements sur un milieu gélosé à différents moments lors de l'entreposage. Cette technique permet de déterminer précisément si la formulation respecte les exigences commerciales mais elle a le désavantage de s'échelonner sur une longue période. Toutefois, afin d'obtenir rapidement approximation de la durée de conservation d'un lot spécifique de Sporodex, des

étalements sur milieu gélosé sont réalisés sur des échantillons placés à 4°C. En fonction de la durée de conservation dans ces conditions, il est possible de connaître grossièrement le potentiel de survie de *P. flocculosa* lors de la congélation. Dans le cas de bonnes productions, le nombre UFC de l'agent de lutte peut demeurer au dessus de  $3 \times 10^8$  UFC/ml pendant 10 jours. Toutefois, si la survie n'excède pas 2 à 3 jours à 4°C, il est probable de croire que le seuil ne sera pas atteint. **Ces activités ont permis de répondre partiellement à l'objectif 3).**

### 4.1.3 ACTIVITÉ 3. FORMULATION DE SPORODEX ET MAUL-20

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR SPORODEX

La formulation de Sporodex était à l'étude. Afin de respecter les exigences de l'ARLA au niveau de l'étiquette du produit, un procédé standard et reproductible de formulation devait être mis au point. La quantité de biomasse de *P. flocculosa* a été déterminée par différentes méthodes d'analyse. En effet, il est possible de l'exprimer en **1)** gramme de matière sèche par litre, **2)** en conidies ou hyphes par ml, **3)** en pourcentage de sporulation ou **4)** en Unité Formant des Colonies par ml (UFC/ml). Cette partie traitera donc des différents protocoles d'analyse de la biomasse qui ont été utilisés ainsi que de la procédure appliquée pour réaliser les courbes de croissance. Ces protocoles sont :

##### Évaluation de la matière sèche

**Évaluation du nombre de conidies, d'hyphes et du pourcentage de sporulation par le compte à l'hémacymètre**

**Dénombrement des UFC (Unité Formatrice de Colonie) sur un milieu gélosé ou « surface count »**

**Réalisation d'une courbe de croissance**

##### Évaluation de la compatibilité de *Pseudozyma flocculosa* avec différents surfactants

Il est important, lorsque le biofongicide Sporodex est appliqué en serre, d'utiliser un surfactant afin d'obtenir une couverture uniforme sur le feuillage. Toutefois, étant donné que le biofongicide est constitué d'un organisme vivant, *P. flocculosa*, plusieurs surfactants peuvent lui être néfaste. Il était donc important d'évaluer l'effet de ces derniers sur la viabilité de l'agent de lutte. Pour cette expérience, trois pots de Sporodex du 26/06/2000 ont été dégelés. Cinq types de surfactants ont été évalués dont un à deux doses différentes. Les sept traitements étaient : **1)** Témoin sans surfactant, **2)** Agral 0.02%, **3)** Agral 0.05%, **4)** Aqua-aid 0.02%, **5)** Motto 0.02%, **6)** Super Spred 0.02% et **7)** tween 80 0.02%. Trois répétitions de chacun des traitements ont été réalisées avec respectivement un pot du Sporodex du 23/06/2000. Quarante-neuf ml d'eau physiologique (9 g/l NaCl) ont été placés dans des erlenmeyers de 250 ml et stérilisés. Les surfactants ont été ajoutés par la suite dans les erlenmeyers suivi de 1 ml du Sporodex. Le tout a ensuite été placé sur un agitateur rotatif à 150 rpm et à 30°C pour une heure. Un étalement sur un milieu gélosé a alors été réalisé pour chacun des traitements et les erlenmeyers ont ensuite été placés à 4°C pour 24 heures supplémentaires. Un deuxième étalement sur milieu gélosé a été réalisé à ce moment.

Au cours de ce projet, différents tests ont été réalisés en fioles afin de suivre le développement de *P. flocculosa* et d'évaluer différents paramètres de culture. Ces informations s'avèrent importantes afin d'optimiser la croissance du champignon sans avoir recours automatiquement à un fermenteur. De plus, il est important de comprendre précisément comment *P. flocculosa* se développe et d'observer cette croissance dans différentes conditions. Ces expériences ont donc permis de réaliser trois courbes de croissance de *P. flocculosa* dans des fioles et milieux différents. De plus, deux expériences ont été réalisées afin de vérifier l'importance du type de mélasse, d'extrait de levure et d'acide sur la croissance de ce champignon.

### **Courbe de croissance de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM0.5P0.5D**

Dans la première expérience, l'objectif de la recherche était de réaliser une courbe de croissance de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM0.5P0.5D. Ce milieu est utilisé lors de la préculture en fiole. Cette courbe permettra donc de comprendre le développement du champignon dans ces conditions. L'expérience a été réalisée sur 8 fioles embossées de 500 ml contenant chacune 100 ml du milieu YM0.5P0.5D (extrait de levure Difco (3g/l), extrait de malt R3 Organotechnie (3g/l), peptone de soya A2 Organotechnie (2.5g/l) et dextrose anhydre BDH (5g/l)). Les fioles ont été inoculées avec 5ml d'une culture de *P. flocculosa* âgée de 4 jours ( $1.57 \times 10^8$  UFC/ml). Elles ont ensuite été placées à la température de la pièce et agitées à 150 rpm. À différents moments, un échantillon a été prélevé afin de déterminer le taux de matière sèche, le nombre d'UFC, le pH ainsi que le pourcentage de sporulation au microscope.

### **Courbe de croissance de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM1,5PD**

Dans la seconde expérience, les objectifs de cette expérience étaient d'observer : **1)** l'influence du niveau de peptone et de dextrose sur la croissance de *Pseudozyma flocculosa* avec le milieu YM1,5PD; **2)** la croissance de *P. flocculosa* dans le milieu Czapek et **3)** l'influence du type de fioles (embossées ou standards) sur la croissance de *P. flocculosa*. Au cours de cette expérience, quatre traitements ont été évalués: **1)** milieu YM1,5PD en fioles embossées (Ym emb); **2)** Milieu YM1,5PD en fioles standards (Ym std); **3)** Milieu Czapek en fioles embossées (Cz emb) et **4)** Milieu Czapek en fioles standards (Cz std). Pour ce faire, trois fioles de 500 ml, embossées ou standards, ont été utilisées par traitement et chacune contenait 100 ml du milieu YM1,5PD (extrait de levure Difco (3 g/l), extrait de malt R3 Organotechnie (3 g/l), peptone de soya A2 Organotechnie (7,5 g/l) et dextrose anhydre EMscience (10 g/l) et du milieu Czapek (saccharose EMscience (30 g/l), nitrate de sodium Fisher (2 g/l), dipotassium phosphate ACP (1 g/l), sulfate de magnésium EMscience (0,5 g/l), chlorure de potassium Sigma (0,5 g/l) et sulfate de fer heptahydrate EMscience (0,01 g/l). Le pH des deux milieux a été ajusté à 5,5 avec du HCl 1N. Les fioles ont été autoclavées 20 minutes et inoculées avec 5ml d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* Pf1 ( $1,9 \times 10^8$  UFC/ml). Les fioles ont été placées sur un agitateur rotatif à 150 rpm à la température de la pièce. Par la suite, à différents intervalles de temps, la matière sèche, le nombre UFC, le pH ainsi que le pourcentage de sporulation ont été mesurés.

### **Courbe de croissance de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM1,5P1,5D**

Dans la dernière expérience, la réalisation de cette courbe, pour faire suite aux deux premières, avait pour objectifs : **1)** d'observer la croissance de *P. flocculosa* dans un milieu enrichi en peptone et en dextrose et **2)** de comparer la croissance de *P. flocculosa* entre trois différents types de fioles. Cette expérience comportait trois traitements : **1)** Milieu YM1,5P1,5D en fioles embossées de 500 ml (Pf1 emb.); **2)** Milieu YM1,5P1,5D en fioles standards de 500 ml (Pf1 std.) et **3)** Milieu YM1,5P1,5D en fioles embossées de 250 ml (Pf1 petit). Quatre fioles ont été utilisées par traitement et elles contenaient 100 ml de milieu YM1,5P1,5D (extrait de levure Difco (3 g/l), extrait de malt Difco (3 g/l), peptone de soya A2 Organotechnie (7,5 g/l) et dextrose anhydre EMscience (15 g/l). Le pH initial n'a pas été ajusté et il était à 6,64. Les fioles ont été autoclavées et inoculées avec 5 ml d'une culture de *P. flocculosa* Pf1 âgée de 3 jours ( $2,58 \times 10^8$  UFC/ml). Elles ont ensuite été placées à la température de la pièce sur un agitateur rotatif à 150 rpm. Un échantillon de 4 ml a été prélevé à différents intervalles afin de mesurer le pH, la matière sèche, le nombre UFC ainsi que le pourcentage de sporulation.

Suite aux essais en fermenteur chez la compagnie Lallemand, il est apparu important d'évaluer l'effet de la source de mélasse et d'acide sur la croissance de *P. flocculosa*. En effet, le milieu de culture original contient de la mélasse de betterave et de l'acide phosphorique. Toutefois, il semble qu'il est devenu difficile de ce procurer ce type de mélasse et que la mélasse de cane serait préférable. De plus, étant donné que les normes

environnementales sont de plus en plus sévères relativement aux rejets en phosphore des eaux résiduelles des usines de fermentation, il semble que l'acide sulfurique serait préférable. Elle est moins dispendieuse et moins polluante.

### **Importance du type de mélasse et de la source d'acide - essai 1**

Pour ce faire, deux expériences (essai 1 et 2) ont été réalisées afin d'évaluer si cette modification au milieu de culture allait influencer la croissance de *P. flocculosa*. Les objectifs de ce premier essai étaient : **1)** d'évaluer la croissance de *P. flocculosa* en fonction du type de mélasse et d'acide utilisé; **2)** de comparer les fioles embossées et standards avec ces milieux et **3)** de vérifier la survie à 4°C et à l'entreposage de *P. flocculosa* formulé en tant que Sporodex. Quatre traitements ont été évalués dans cette expérience : **1)** Mélasse betterave x H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Bet-S); **2)** Mélasse betterave x H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Bet-P); **3)** Mélasse cane x H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Ca-S) et **4)** Mélasse cane x H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Ca-P). Pour chacun d'eux, trois fioles de 500 ml embossées et une standard contenant chacune 100 ml de milieu ont été utilisées. Le milieu était le milieu mélasse de la culture en fermenteur. Le pH a été ajusté à 5,5 avec du H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 9N et du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N. Elles ont ensuite été inoculées avec 5 ml d'une culture de *P. flocculosa* (Pfliq-10-3 fermenteur) âgée de 48 heures (3,1<sup>E</sup>8 UFC/ml). L'inoculum de départ était donc à 1.6 x 10<sup>7</sup> UFC/ml. Elles ont finalement été placées sur un agitateur rotatif à 150 rpm à la température de la pièce. À deux moments différents, un échantillon de 4 ml a été prélevé afin d'évaluer la matière sèche, le nombre UFC, le pH ainsi que le pourcentage de sporulation au microscope. Après 47 heures de culture, le contenu des fioles embossées a été regroupé par traitement, centrifugé et formulé. Deux tubes de chaque traitement ont été conservés à 4°C afin d'évaluer la survie dans le temps et le reste des tubes ont été placés au congélateur à -24°C pour des tests ultérieurs.

### **Importance du type de mélasse et de la source d'acide - essai 2**

Tout comme pour le premier essai, l'objectif de celui-ci va permettre de confirmer l'influence de la source de mélasse et d'acide sur la croissance de *P. flocculosa*. En effet, lors de l'essai 1, peu de différences ont été observées entre la mélasse de cane et de betterave et entre l'acide phosphorique et sulfurique. Le milieu à base de mélasse de betterave et d'acide phosphorique pourrait donc être remplacé par un constitué de mélasse de cane et d'acide sulfurique. Ce milieu serait donc plus polyvalent et moins polluant. Comme pour l'expérience précédente, quatre traitements ont été comparés : **1)** Mélasse betterave x H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Bet-S); **2)** Mélasse betterave x H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Bet-P); **3)** Mélasse cane x H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Ca-S) et **4)** Mélasse cane x H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Ca-P). Pour chacun d'eux, trois fioles embossées de 500 ml ont été utilisées. Chacune d'elles contenait 100 ml du milieu mélasse de culture en fermenteur. Le pH a été ajusté à 5,5 avec du H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 9N et du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N. Les fioles ont été autoclavées et inoculées avec 3 ml d'une culture de *P. flocculosa* (Pfliq-13-2 ferm.) qui contenait 1.62 x 10<sup>8</sup> UFC/ml. L'inoculum au départ était à 5 x 10<sup>6</sup> UFC/ml. Les fioles ont ensuite été placées sur un agitateur rotatif à 150 rpm à la température de la pièce. À différents intervalles de temps, un échantillon de 4 ml a été prélevé afin d'évaluer la matière sèche, le nombre d'UFC, le pH et le pourcentage de sporulation.

### **Influence du pH et de la concentration de l'inoculum**

Cette expérience avait pour objectif d'observer l'influence du pH initial et de la quantité d'inoculum sur la croissance de *P. flocculosa* en fiole. Il n'a pas été possible d'effectuer plusieurs répétitions de cette expérience mais ces données vont toutefois apporter quelques informations sur l'influence de ces facteurs. Généralement, dans le milieu YM0,5P0,5D et YM1,5P1,5D, le taux se situe généralement à 5% et le pH n'est pas ajusté (6,64 dans le cas du milieu YM1,5P1,5D). Lors de cette expérience, trois niveaux de pH et deux quantités d'inoculum ont été vérifiés selon un plan factoriel. En effet, les pH initiaux ont été ajustés à 4, 5 ou 6 et les fioles ont été inoculées à un pourcentage de 1 et 5%. Pour ce faire, deux fioles embossées de 500 ml ont été utilisées par traitement et 100 ml du milieu ont été placés à l'intérieur. Le milieu utilisé était celui de fermentation à base de mélasse de cane. Le pH a été ajusté à différents niveaux avec de l'acide sulfurique

(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Les fioles ont été autoclavées 20 minutes et inoculées avec 1 ou 5 ml d'une culture de *P. flocculosa* (Pfliq-10-4 ferm.) âgée de 72 h. L'inoculum contenait 3,35 x 10<sup>8</sup> UFC/ml. Les fioles ont ensuite été placées sur un agitateur rotatif à 150 rpm et à la température de la pièce. Après 46,5 h, la culture a été arrêtée et différentes mesures ont été prises dont la matière sèche, le nombre UFC, le pH et le pourcentage de sporulation.

### **Importance du type d'extrait de levure sur la croissance de *Pseudozyma flocculosa***

Lors des cultures en fioles et en fermenteur, il est important de connaître l'effet de chacun des constituants du milieu sur la croissance du microorganisme. Dans ce cas-ci, une attention particulière a été portée sur l'extrait de levure. En effet, en fonction de l'endroit où est réalisé la culture, le type d'extrait de levure est différent. Il était donc important, avant de quitter pour la Belgique, d'effectuer un essai préliminaire avec différents types d'extrait de levure. La composition des extraits de levure varie grandement d'une compagnie à l'autre et d'un type à l'autre. La quantité de vitamines, d'acides-aminées et de minéraux est très variable ce qui risque d'influencer la culture de *P. flocculosa*.

Il s'agit ici d'une expérience préliminaire avec six types d'extrait de levure et deux types de milieu. L'objectif n'était pas d'évaluer précisément l'influence des types d'extraits de levure mais de démontrer que la croissance peut être influencée par ces derniers. Pour ce faire, 1 fiole de 500 ml embossée à été utilisée par traitement. Deux types de milieu ont été utilisés soit le milieu YM0,5P0,5D (extrait de levure (3g/l), extrait de malt BD (3g/l), peptone water Difco (2.5g/l) et dextrose anhydre BDH (5g/l)) et le milieu mélasse industriel. Six extraits de levure ont été utilisés soit:

Traitement	Marque commerciale	Compagnie	# catalogue	# lot
1	Bacto Yeast extract	BD (Difco)	212750	1080006
2	Yeast extract	Organotechnie	19512	90
3	Yeast extract	EM science	1,03753,01005	1200
4	FNI 100	Lallemand	3150-26	1124Q
5	FNI 200	Lallemand	2312-26	0302Q
6	FNI 205	Lallemand	3155-25	1152Q

Cent ml de milieu ont été placés dans chacune des fioles et le pH n'a pas été ajusté. Les fioles ont été autoclavées et elles ont été inoculées avec une culture de *P. flocculosa* dans un milieu YM0,5P0,5D âgée de 48 h. Les fioles ont ensuite été placées sur un agitateur rotatif à 150 rpm à la température de la pièce. Des échantillons ont été prélevés après 20, 44 et 68 heures afin d'observer le pourcentage de sporulation au microscope.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR MAUL-20

### Amélioration des qualités nutritionnelles du milieu de culture utilisé pour multiplier *Trichoderma harzianum* MAUL-20

#### Effet de la cellulose et du sucre

À chaque mois, MAUL-20 a été repiqué sur des tissus de tomate afin de raviver sa virulence. C'est à partir de ces repiquages que les tests subséquents ont été effectués. Lors de recherches antérieures, un milieu de culture pour multiplier *Trichoderma* avait été développé. Par contre, ce milieu devait être retravaillé afin d'améliorer le développement et la vitesse de croissance de *Trichoderma*. Le milieu de base était semi-solide et permettait la croissance de MAUL-20 en 6 jours en Pétri et en plateaux d'aluminium (53.3 x 33 x 3.8 cm). Ce milieu était composé (/ litre) de 8 g d'agar, 3 g de carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>), 200 ml de jus V8 non modifié et 800 ml d'eau distillée. Ce milieu a été modifié afin de lui ajouter une source de cellulose, ingrédient prisé des champignons dégradateurs tel les *Trichoderma*. Le nouveau milieu cellulose permet de produire des spores de *Trichoderma* à l'intérieur de 3 jours en Pétri. *Trichoderma* MAUL-20 a démontré une sporulation nettement supérieure sur milieu cellulose lorsque comparé à celle de MAUL-20 sur un milieu PDA standard. Le milieu cellulose est composé de (/ litre) :

Potato Dextrose Agar	15 g
Cellulose de type raffinée (20 µm)	1,5 %
Sucrose	0,1 %
Jus V8 non modifié	200 ml
Eau distillée	800 ml

Par contre, deux paramètres restaient à travailler : **1)** l'ajout de la source de sucre (glucose / sucrose) n'avait pas été déterminé à sa juste valeur et **2)** nous ne connaissons pas son efficacité lorsque cultivé dans de gros volumes. À partir de ces faits, des tests ont été réalisés afin de vérifier l'impact de l'ajout d'une source de sucre au milieu cellulose et l'effet de la concentration de sucre et de cellulose sur la croissance et sporulation de *Trichoderma* lorsque produit en grand volume. Nous savons qu'un champignon sporule davantage lorsqu'il rencontre un obstacle ou qu'il atteint les parois d'un contenant. Nous connaissons la vitesse de croissance et de sporulation de MAUL-20 lorsqu'il est cultivé en Pétri (90 mm). Nous étions intéressées à tester *Trichoderma* sur ces milieux (nouveau et ancien milieu de culture) et dans de grands volumes.

Dans un premier temps, des concentrations croissantes de sucrose ou glucose (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 2 et 3%) ont été ajoutées au milieu de culture. La vitesse de croissance et la sporulation de *Trichoderma* ont été notées en Pétri. Les tests se sont déroulés à la température de la pièce (22 ± 2°C; noirceur) et répétés 6 fois. Pour chaque concentration de sucrose ou glucose, des rondelles de 6 mm de diamètre d'une culture de *Trichoderma* âgée de 10 j ont prélevées à l'aide d'un emporte-pièce et déposées au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu à base de cellulose. Des lectures de croissance radiale ont été réalisées à chaque jour durant la durée de l'expérience. Les meilleurs milieux de culture à base de cellulose et d'une source de sucres ont été ensemencés avec *Trichoderma* et évalués dans des plateaux en aluminium (53.3 x 33 x 3.8 cm).

## Effet de la thiamine ou du fer

D'autres expériences visait à mesurer l'effet d'un enrichissement du milieu de culture en fer ou en thiamine sur la quantité et la viabilité des spores de *Trichoderma harzianum*, agent actif du biofongicide MAUL-20. Les essais ont été menés à plus petite échelle que la production normale. En conditions normales, des plateaux d'aluminium de 47 x 27 cm sont utilisés (1269 cm<sup>2</sup>) alors que pour les essais, des plateaux d'aluminium de 15 x 10 cm ont été utilisés (150 cm<sup>2</sup>). En conditions de production, un volume de 666 ml de milieu de culture est versé dans chacun des plateaux. Pour obtenir la même épaisseur de milieu de culture qu'en conditions de production, un volume de 80 ml de milieu de culture a été versé dans chacun des plateaux d'essais à raison de 3 répétitions (240 ml).

Le milieu de culture de base mis au point par Horti-Protection est le suivant (par litre). Ce milieu servait de comparatif.

8 g de bacto-agar  
200 ml de jus V8  
800 ml d'eau distillée

Ce milieu de culture a été enrichi en fer (FeCl<sub>3</sub>; BDH Chemicals, Canada) à raison de 0,0016 %, 0,016 % et 0,032 %. Ce milieu a aussi été enrichi en thiamine hydrochloride (Sigma, États-Unis) à raison de 50, 100 et 200 µg / L.

La culture-mère de *T. harzianum* MAUL-20 était maintenue sur PDA dans un cabinet de croissance, à la noirceur et à une température de 22 ± 2°C. Une suspension de spores a été réalisée à partir d'une culture âgée de 10 jours afin d'obtenir une sporulation maximale. Les spores et le mycélium ont été récoltés en grattant la gélose avec une lamelle en présence d'eau distillée stérile contenant du Tween 80 (Sigma, Canada). La concentration de spores a été évaluée à l'aide d'un hémacytomètre (C.A. Hausser and Son, États-Unis). En conditions de production, 5 plats de Pétri sont utilisés pour préparer l'inoculum destiné à 2 litres de milieu de culture. Une fois les milieux coulés dans les plateaux d'aluminium, ces derniers ont été placés à température pièce pendant 7 jours. Par la suite, la gélose, le mycélium et les spores de *T. harzianum* ont été récoltés et homogénéisés à la main. La récolte a été pesée et la concentration en spores a été évaluée. De l'argile a été ajoutée à la préparation à raison de 25 % du poids frais récolté. Le tout a été homogénéisé et placé au lyophilisateur 24 heures.

Afin de vérifier la viabilité des spores de *T. harzianum* produites sur différents milieux de culture, la poudre récoltée a été pesée et 1 g de la préparation a été dilué dans un volume total de 100 ml (10<sup>-2</sup>). Des dilutions ont été faites à partir de cette solution (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>). Pour chacune des dilutions, un volume de 100 µl a été étalé sur Potato Dextrose Agar (PDA, 39 g / L; Difco, États-Unis). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque dilution. Le nombre de spores germées a été évalué après 48 heures.

## Production à grande échelle de *Trichoderma harzianum* MAUL-20

L'application d'agents de lutte biologique, à plus ou moins grande échelle, demande une production massive de biomasse. Parce que la production massive de spores de *Trichoderma* en fermenteur est presque impossible, celui-ci est cultivé dans des plateaux en aluminium munis d'un couvercle en aluminium. La technique permet de produire 2 litres de milieu de culture/3 plateaux de culture. Il suffit de préparer son milieu de culture et de le stériliser. Après, le milieu est alimenté de *Trichoderma* est tout simplement versé dans le plateau et refermé avec le couvercle. Actuellement, le produit est prêt six jours plus tard. La technique est rapide et la récolte est facile. La biomasse récoltée est ensuite homogénéisée avec un mélangeur domestique, mélangée avec un matériel inerte, lyophilisée pendant 48 heures, moulue et

ensachée. Les plateaux en aluminium sont d'un usage unique afin d'éviter l'oxydation de ceux-ci et la contamination par d'autres champignons.

L'application du produit se fait simplement en réhydratant la biomasse et en pulvérisant selon les mêmes techniques utilisées pour appliquer les fongicides. Ce procédé permettait d'obtenir un nombre considérable de spores viables de *Trichoderma* dans un temps relativement court. La formulation développée est efficace et permet de conserver les spores sur une longue période (~12 mois).

Suite aux différents essais réalisés précédemment, plusieurs paramètres pourraient faire varier la viabilité des spores de *Trichoderma* :

1) le milieu de culture :

Milieu standard semi-solide  
Milieu standard solide  
Milieu cellulose + 0,1% sucrose  
Milieu cellulose + 1,0% sucrose

2) le traitement après la récolte :

Lyophilisation  
Congélation à  $-14^{\circ}\text{C}$   
Congélation à  $-72^{\circ}\text{C}$

3) la chambre du lyophilisateur : la position de la tablette peut faire varier la quantité d'oxygène ou la température

4) l'ajout d'argile lors de la congélation

La composition des milieux de culture était :

**Milieu standard solide :** 15 g de bacto-agar  
200 ml de V-8 non-modifié  
800 ml d'eau distillée

**Milieu standard semi-solide :** 8 g de bacto-agar  
200 ml de V-8 non-modifié  
800 ml d'eau distillée

**Milieu cellulose + 0,1% sucrose :** 15 g de PDA  
200 ml de V-8 non-modifié  
800 ml d'eau distillée  
1,5% de cellulose raffinée (20  $\mu\text{m}$ )  
0,1% de sucrose

**Milieu cellulose + 1% sucrose :** 15 g de PDA  
200 ml de V-8 non-modifié  
800 ml d'eau distillée  
1,5% de cellulose raffinée (20  $\mu\text{m}$ )  
1,0% de sucrose

Pour la préparation des milieux standard semi-solide, cellulose + 0,1% sucrose et cellulose + 1,0% sucrose, les produits ont été pesés pour préparer 2 litres de chacun de milieux. Pour le milieu standard solide, l'équivalent de 666 ml de milieu a été préparé. Les milieux ont été autoclavés pendant 20 minutes à 121°C.

Les suspensions de spores ont été produites en grattant chaque Pétri de *T. harzianum* MAUL-20 avec une lamelle et de l'eau distillée stérile alimentée de Tween 80. Pour chaque 2 litres de milieu, 5 Pétri ont été récoltés. Une fois les milieux standard semi-solide et cellulose refroidis (42-44°C), la suspension de spores a été ajoutée au milieu puis le milieu a été agité et coulé dans les plateaux d'aluminium. Pour le milieu de culture standard solide, il a été coulé dans le plateau d'aluminium et la suspension de spores a été étalée une fois le milieu figé.

Six jours plus tard, la récolte des spores a été réalisée sur les différents milieux préparés. Pour les milieux standard semi-solide, cellulose +0,1% sucrose et cellulose 1,0% sucrose, les spores et la gélose ont été récoltées. La gélose a été broyée au mélangeur et le tout a été mesuré et pesé. Une partie de cette récolte a été prélevée et placée dans des bouteilles de 30 ml et congelées à -14°C et -72°C. Au reste de la récolte, de l'argile a été ajoutée à raison de 25% du poids récolté. Encore une fois, une partie du mélange a été prélevée et placée dans des bouteilles de 30 ml et congelées à -14°C et -72°C. Le reste du mélange a été séparé en 3 et placé dans des plats d'aluminium. Pour chaque milieu, un plat a été placé sur chaque tablette du lyophilisateur (haut, milieu et bas). La biomasse a été lyophilisée pendant 48 heures. Le mélange lyophilisé a ensuite été récolté, broyé et ensaché. Pour le milieu standard solide, la glose a été grattée afin de détacher les spores.

L'évaluation de la viabilité des spores a été faite en travaillant avec la biomasse sèche et congelée. Les échantillons lyophilisés ont été pesés. Pour chaque échantillon, 1 gramme de produit a été ajouté à 100 ml d'eau distillée stérile (dilution  $10^{-2}$ ). Des dilutions subséquentes de  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  ont été effectuées. Pour chacune des dilutions ( $10^0$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ), 100 µl ont été étalés sur un milieu PDA et trois répétitions ont été réalisées. Le nombre de spores germées a été évalué au microscope inversé.

Pour les échantillons congelés, ils ont d'abord été décongelés puis des dilutions successives de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  ont été réalisées. Pour chacune des dilutions ( $10^0$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ), un volume de 100 µl a été étalé sur un milieu de PDA et trois répétitions ont été réalisées. Le nombre de spores germées a été évalué au microscope inversé. Les échantillons ont été recongelés pour une évaluation ultérieure.

**Toutes ces activités ont permis de répondre partiellement à l'objectif 3).**

#### **4.1.4 ACTIVITÉ 4. COMPATIBILITÉ AVEC LES PESTICIDES CHIMIQUES ET AUXILIAIRES DE LUTTE**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR L'EFFET DES PESTICIDES SUR LA GERMINATION ET SURVIE DE *TRICHODERMA* MAUL-20**

La revue de littérature nous a renseigné sur les informations déjà disponibles quant à la compatibilité des biopesticides avec les produits conventionnels. Nous avons réalisé en laboratoire les tests requis pour compléter nos connaissances sur MAUL-20. Ainsi, nous avons évalué, selon la technique standard d'analyse, l'effet des principaux pesticides de synthèse utilisés dans les productions serricoles (légumières et ornementales) sur la survie de MAUL-20 qui est à base de *Trichoderma harzianum*. Ces fongicides chimiques servent à combattre : *Alternaria*, l'anthracnose, *Botrytis*, *Fusarium*, le mildiou, le blanc,

*Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, la rouille, *Sclerotinia*, *Thielaviopsis*, des maladies bactériennes ou *Septoria*.

La méthode européenne a été utilisée et consiste à ensemencer des spores de *Trichoderma* (100 µl) sur un milieu gélosé frais (Potato Dextrose Agar (PDA)) contenant le fongicide à vérifier. Les concentrations testées étaient 0, 1, 10 et 100 ppm de matières actives des différents pesticides de synthèse vérifiés et la suspension de spores de *Trichoderma* a été ajustée à environ  $1 \times 10^5$  spores/ml. Les cultures de *Trichoderma* étaient âgées entre 7 et 10 jours. L'action du fongicide (positive ou non) sur la germination des spores de *Trichoderma* a été vérifiée au microscope inversé 18 à 24 heures après l'ajout du champignon sur le milieu. Une spore est considérée germée lorsque son tube germinatif dépasse la longueur de la spore. Cent spores de *Trichoderma*/concentration ont été dénombrées sur chaque Pétri. Trois répétitions par concentration et matière active ont été faites et incubées à la température de la pièce ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; noirceur). L'analyse statistique sera effectuée ultérieurement et s'agira d'un ANOVA avec test de comparaison multiple de Duncan.

Les résultats obtenus permettent de dire s'il y a résistance ou non et de quantifier le pourcentage de spores résistantes dans la population. Cette méthode est coûteuse (matériel et temps) et exige de nombreuses manipulations (isolement et mise en culture pure des champignons, obligation d'avoir un milieu gélosé frais contenant le fongicide (cas par cas), observation microscopique obligatoire, etc...). De l'ensemencement des spores à l'obtention des résultats finaux, près de 48 heures se seront écoulées. Par contre, la technique est précise.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR L'EFFET DE *TRICHODERMA* MAUL-20 SUR LE DÉVELOPPEMENT ET SURVIE DES INSECTES PRÉDATEURS ET PARASITOÏDES**

De plus, il importe de vérifier que MAUL-20 n'a pas d'impact négatif sur le développement et la survie des insectes prédateurs et parasitoïdes impliqués dans la lutte aux ravageurs. Plusieurs auxiliaires de lutte sont disponibles pour les serres mais en réalité, la lutte s'effectue réellement qu'avec quelques auxiliaires. Pour ces tests, nous avons opté pour ceux qui sont les plus fréquemment employés et ceux qui représentent le mieux les différents ordres et familles utilisés. Ainsi, les tests ont été réalisés avec *Encarsia formosa*, *Phytoseilus persimilis*, *Aphidius colemani* et *Orius insidiosus*.

### **Matériel entomologique**

Les parasitoïdes *E. formosa* ont été reçus sous forme de pupes d'aleurodes parasitées placées sur des cartes alors que les parasitoïdes *A. colemani* ont été reçus sous forme de pupes de pucerons parasitées dans la vermiculite (Biobest N.V., Belgique). Les parasitoïdes adultes ont été utilisés dès leur émergence. Les acariens prédateurs *P. persimilis* ont été reçus aux stades de nymphes et d'adultes sur des feuilles de haricots (*Phaseolus vulgaris* L.) en présence de *T. urticae* (Applied Bio-Nomics Ltd., Canada). Les punaises prédatrices *Orius insidiosus* ont été reçues aux stades de nymphes et d'adultes dans des écailles de sarrasin (Biobest N.V., Belgique).

### **Matériel fongique**

Afin de vérifier l'effet du biofongicide MAUL-20 sur les insectes bénéfiques, deux concentrations ont été testées soit 1X (2 g / L), la dose recommandée par le fabricant et 2X (4 g / L). De plus, un témoin eau et un témoin eau-argile (1,4 g / L) ont été ajoutés aux essais afin d'évaluer l'effet des ingrédients inertes du biofongicide sur les organismes.

### **Dispositif pour *Encarsia formosa* et *Aphidius colemani***

Une fois émergés, les parasitoïdes adultes ont été placés dans des pots cylindriques de plastique de 4,5 cm de diamètre par 10 cm de longueur. Dans le couvercle, une ouverture circulaire était recouverte de mousseline afin de favoriser la ventilation. Ces cylindres de plastique étaient placés horizontalement. Des pièces de papier chromatographique (Whatman, États-Unis) ont été trempées dans les solutions (eau, eau-argile, MAUL-20 à 2 g / L ou MAUL-20 à 4 g / L) pendant 10 secondes. Ces pièces de papier imbibées des différents traitements ont été séchées à l'air pendant environ une heure afin qu'elles soient humides, mais non détremées (Thomson *et al.*, 1996; Shipp *et al.*, 2000). Chaque pièce de papier était alors placée dans un cylindre de plastique de manière à tapisser le cylindre sur toute sa longueur et la moitié de sa circonférence. Ces pièces de papier servaient de substrat pour le contact des insectes avec les résidus des différents traitements. Un coton dentaire imbibé d'une solution d'eau et de sucrose (10 %) a été ajouté pour nourrir les parasitoïdes au cours de l'expérience (Thomson *et al.*, 1996). En effet, *E. formosa* et *A. colemani* se nourrissent normalement du miellat produit par les aleurodes des serres et les pucerons. La température était de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Chaque cylindre comptait pour une répétition. Il y avait quinze parasitoïdes par répétition à raison de quatre répétitions par traitement. Par ailleurs, l'expérience a été menée deux fois dans le temps. Des observations ont été réalisées après 24 heures afin de mesurer le taux de mortalité à court terme pour les différents traitements (Thomson *et al.*, 1996). Une analyse statistique basée sur une régression logistique et une comparaison des moyennes par contrastes polynomiaux a été effectuée. La régression logistique permettait d'ajuster le nombre d'insectes sur lequel sont basées les observations pour chaque répétition en cas d'évasion.

### **Dispositif pour *Phytoseiulus persimilis***

Des pots de plastique de 11,5 cm de diamètre et de 7,5 cm de hauteur munis d'un couvercle ont été utilisés comme cages. Trois ouvertures circulaires de 3 cm de diamètre étaient présentes sur la paroi du pot. Deux étaient recouvertes de mousseline et servaient pour la ventilation alors que la troisième servait pour les manipulations diverses et était fermée par un bouchon-mousse. Au fond de chaque pot, un essuie-tout renforcé circulaire (Kimberly Clark, États-Unis) de 11,5 cm de diamètre a été déposé et imbibé d'eau afin de maintenir une hygrométrie suffisante à la survie des acariens (Stolz, 1990). Un cerne de vaseline de 1,5 cm de largeur a été fait sur la circonférence du pot de plastique à environ 2 cm du fond pour empêcher la fuite des acariens prédateurs (Stolz, 1990). Une feuille de tomate trempée pendant 10 secondes dans la solution (eau, eau-argile, MAUL-20 2 g / L ou MAUL-20 4 g / L) a été placée à plat au centre du pot et séchée à l'air environ 30 minutes (Stolz, 1990; Zhang et Sanderson, 1990; Malezieux *et al.*, 1992; Spollen et Isman, 1996). Quinze acariens prédateurs ont été déposés sur cette feuille à l'aide d'un pinceau fin avec un supplément nutritif, soit *T. urticae*. Chacune des trois répétitions comptait 15 acariens prédateurs. L'expérience a été menée deux fois dans le temps. Après 24 heures, le taux de mortalité à court terme a été évalué. Une analyse statistique basée sur une régression logistique et une comparaison des moyennes par contrastes polynomiaux a été effectuée.

### **Dispositif pour *Orius insidiosus***

Des plats de Pétri de 5 cm de diamètre ont été utilisés. Des couvercles perforés recouverts de mousseline permettaient le passage de l'air. Au fond du plat de Pétri était déposée une pièce de papier chromatographique (Whatman, États-Unis) trempée pendant 10 secondes dans la solution à tester (Hafez *et al.*, 1995; Ludwig et Oetting, 2001; Van de Veire *et al.*, 2002). Un coton dentaire imbibé d'une solution d'eau et de sucrose (10 %) a été placé dans le plat de Pétri pour nourrir *O. insidiosus* au cours de l'expérience. Une seule punaise était déposée sur cette pièce de papier à l'aide d'un pinceau fin. Chacune des quatre répétitions comptait 15 acariens. L'expérience a été menée deux fois dans le temps. Après 24

heures, le taux de mortalité à court terme a été évalué. Une analyse statistique basée sur une régression logistique et une comparaison des moyennes par contrastes polynomiaux a été effectuée.

**Toutes ces activités ont permis de répondre partiellement à l'objectif 3).**

#### 4.1.5 ACTIVITÉ 5. EFFICACITÉ *IN VITRO*

### MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTAGONISTE DE *TRICHODERMA MAUL-20* VIS-À-VIS LES AGENTS PATHOGÈNES

Pour le produit en développement MAUL-20, nous avons initié en laboratoire des tests d'efficacité *in vitro*. Il s'agit essentiellement de vérifier l'agressivité de MAUL-20 vis-à-vis les agents pathogènes potentiels des cultures serricoles (ornementales et légumières). Ces tests sont simples dans leur approche mais ils permettent de connaître rapidement le potentiel d'un agent biologique. Par contre, l'agressivité d'un biofongicide *in vitro* n'est pas toujours reproductible *in vivo*.

Dans un premier temps, afin de rendre équitable les confrontations, la vitesse de croissance de chaque champignon a été évaluée en mesurant leur croissance radiale, à des intervalles de 24 heures, jusqu'à confluence du Pétri (~ 90 mm). Pour ce faire, à partir de la culture des isolats-mères de chaque champignon, un disque de 5 mm de diamètre a été prélevé et placé au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu de culture PDA, CZA (Czapek Solution Agar) et PYT (milieu P<sub>5</sub>ARP) dans le cas de *Pythium*. Le prélèvement de la rondelle de gélose a été fait juste à l'extrémité des hyphes du champignon de façon à utiliser le matériel le plus jeune et le plus agressif possible. La croissance radiale des champignons a été mesurée à l'aide d'une règle graduée transparente en présence de lumière diffuse, permettant ainsi de bien délimiter la zone de croissance du champignon. Deux lectures ont été prises pour éliminer les erreurs grossières et ainsi permettre une meilleure précision. Pour chaque champignon, la croissance radiale a été déterminée à l'aide de la moyenne de six échantillons répartis aléatoirement à la température de la pièce (22 ± 2°C; noirceur).

Par la suite, si *Trichoderma* prenait trois jours pour coloniser tout le Pétri et que *Rhizoctonia* en prenait sept, lors des tests de confrontation, *Rhizoctonia* devait être déposé sur le milieu de culture quatre jours avant *Trichoderma*. Ainsi, afin de vérifier si la souche de *Trichoderma MAUL-20* avait un pouvoir pathogène contre les champignons pathogènes des serres, un test de confrontation en Pétri a été effectué. Ce test consistait à placer de façon diamétralement opposé sur un milieu de culture PDA, CZA ou PYT, la souche de *Trichoderma MAUL-20* et une souche d'un champignon pathogènes à tester. En même temps, nous procédions à l'inoculation des cultures de chaque champignon comme moyen de contrôle. Les tests ont été réalisés à la température de la pièce (22 ± 2°C; à la noirceur) et les Pétri ont été répartis aléatoirement. Six répétitions par souche ont été réalisées. La présence d'une zone d'inhibition au point de contact entre les deux champignons a été notée. L'action de compétition et en particulier l'effet "prédateur" de *Trichoderma* sur l'agent pathogènes, en présence ou en l'absence d'une zone d'inhibition, ont également été notés lors de ce test.

Les champignons à l'étude étaient :

*Acremonium*  
*Alternaria*  
*Alternaria alternata*  
*Botryosporium*  
*Botrytis cinerea*  
*Cladosporium*  
*Epicoccum*

*Fusarium moniliforme*  
*Fusarium solani*  
*Gloeosporium roseum*  
*Penicillium*  
*Pythium ultimum*  
*Pythium irregularea*  
*Rhizoctonia solani*

## MATÉRIEL ET MÉTHODES POUR LA DÉTERMINATION DES ANTIBIOTIQUES PRODUITS PAR *TRICHODERMA MAUL-20*

Ceci est le protocole recommandé par l'ARLA, tel que transmis par M. Denis Rochon, pour comparer la production de métabolites / peptaïboles de *Trichoderma harzianum* MAUL-20 avec une souche commerciale disponible. La souche commerciale utilisée s'est avérée être la souche T-22, aussi connue sous le nom de souche KRL-AG2, constituant la matière active du biofongicide RootShield® (BioWork inc., États-Unis). Ce protocole se base sur la littérature et a permis de vérifier le potentiel de MAUL-20 à contaminer les serres de tomate avec des métabolites et / ou des peptaïboles. L'ARLA reconnaît que l'habileté de *T. harzianum* à produire des métabolites ou des peptaïboles varie selon les conditions de culture. Afin d'éviter des tests inutiles, il était préférable de se baser sur les conditions de culture recommandées et préalablement reconnues pour induire la production de métabolites et / ou de peptaïboles. L'ARLA a aussi sélectionné des organismes reconnus comme étant sensibles à un ou plusieurs des métabolites et / ou peptaïboles rapportés dans la littérature.

L'ARLA recommandait de faire des essais sur plats de Pétri avec des extraits de milieu n'ayant supporté aucune croissance fongique, des extraits de milieu ayant supporté la croissance de *T. harzianum* MAUL-20 et des extraits de milieu ayant supporté la croissance de *T. harzianum* T-22. Les bioessais ont été réalisés avec des organismes dits sensibles comme indicateurs. Il s'agissait de *Staphylococcus aureus* ATCC 25992 (Laboratoire d'expertise alimentaire, Ste-Foy), *Bacillus subtilis* ATCC 6051 (Dr Boissinot, Centre de Recherche en Infectiologie, CHUL, Québec), *Escherichia coli* GN-45 ATCC 25992 (Laboratoire d'expertise alimentaire, Ste-Foy), *Botrytis cinerea* souche 30.3 (Horti-Protection inc., Québec) et *Sclerotium cepivorum* LKW 73-20 (Agriculture et Agroalimentaire Canada, Ottawa).

### Peptaïboles

#### Milieu de culture et matériel fongique

Le milieu suivant était recommandé à raison de 2,5 L / échantillon (Goulard et al., 1995)

Glucose	0,5%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,08%
KNO <sub>3</sub>	0,07%
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,02%
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,05%
MnSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	0,001%
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	0,0005%
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,0001%

L'inoculum de départ provenait de la souche *T. harzianum* MAUL-20 mis en culture sur Potato Dextrose Agar (PDA, 39 g / L, Difco, États-Unis) pendant 10 jours à 22 ± 2°C. Les spores ont été récoltées en grattant la gélose avec une lamelle en présence d'eau distillée et de Tween 80 à une concentration de 0,1 % (Sigma, Canada). La concentration de spores a été ajustée à 5,0 x 10<sup>3</sup> CFU / ml à l'aide d'un hémacytomètre (C.A. Hausser and Son, États-Unis). Par la suite, le milieu de fermentation décrit ci-haut a été réparti dans 15 erlenmeyers de 500 ml à raison de 166,7 ml de milieu par erlenmeyer. Chaque erlenmeyer a été inoculé avec 2 ml de la suspension de spores et incubé au mode stationnaire à 28°C pendant 15 jours dans l'obscurité. Le

même dispositif a été utilisé pour *T. harzianum* T-22. La sporulation du champignon était considérée complète lorsque le mycélium tournait au vert uniformément (Goulard et *al.*, 1995).

### **Filtration et extraction**

La pré-filtration a été effectuée grâce à un coton fromage et a été suivie d'une filtration avec un Buchner et un filtre papier Whatman 40 (Whatman International Ltd., Angleterre). Le mycélium a été séché et pesé. Le filtrat a subi 3 extractions avec du n-butanol (Laboratoire MAT, Canada). Les deux premières extractions ont été faites avec un volume de n-butanol correspondant à 20 % du volume du filtrat. La troisième extraction a été réalisée avec un volume de n-butanol correspondant à 10 % du volume du filtrat. L'extrait a ensuite été divisé en 2 échantillons qui ont été séchés à pression réduite pour récolter les peptaïboles de chaque échantillon. La fraction n-butanol a été placée dans un évaporateur rotatif à 40°C (Büchi, Suisse). L'évaporation à l'azote a permis l'obtention d'une gomme brunâtre. Les extraits de peptaïboles ont ensuite été pesés (Goulard et *al.*, 1995).

### **Bioessais pour les peptaïboles**

Les propriétés antibactériennes des peptaïboles ont été examinées en effectuant des essais de croissance radiale sur Tryptic Soy Agar (40 g / L, Difco, États-Unis). Une suspension de 100 µl de la bactérie à tester a été étalée et laissée à sécher une heure (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*). L'échantillon a été dissous dans du DMSO (Sigma-AldrichCo., États-Unis). Des disques antibiogrammes (S&S Biopath Inc., États-Unis) sur lesquels ont été déposés 50 µg d'extraits de peptaïboles ont été placés au centre des plats de Pétri de 9 cm (4 répétitions). Le DMSO seul servait de témoin (Goulard et *al.*, 1995). Les zones d'inhibition ont été mesurées après une incubation de 24 heures à 37°C selon les critères suivants : - : pas d'inhibition, + : rayon d'inhibition < 5 mm, ++ : rayon d'inhibition > 5,1 mm (Faull et *al.*, 1994).

Les propriétés antifongiques des peptaïboles ont été examinées à partir de bioessais sur malt agar (Malt Agar, 10g / L et Bacto Agar, 15 g / L; Difco, États-Unis). L'échantillon de peptaïboles a été dissous dans une quantité appropriée de méthanol (Laboratoire MAT, Canada) pour récolter 100 µg / ml de milieu de culture à une concentration de méthanol de 0,5%. L'inoculum du champignon, une rondelle de mycélium de 5 mm de diamètre, a été déposé au centre du Pétri de 6 cm de diamètre et incubé à 25°C pendant 72 heures (4 répétitions). Des témoins avec le champignon en croissance seule ont aussi été utilisés. Le diamètre de croissance a été mesuré et le pourcentage d'inhibition a été déterminé en comparant avec le méthanol seul (Goulard et *al.*, 1995).

### **Métabolites neutres et métabolites acides**

#### **Milieu de culture et matériel fongique**

Un des milieux suivants était recommandé (environ 2,5L / échantillon) :

- Potato Dextrose Broth (Faull et *al.*, 1994)
- 1% malt extract, 1% yeast extract, 0,1% polypepton, 2% glucose et pH 5,5 (Sawa et *al.*, 1994)
- malt medium (Dickinson et *al.*, 1989)

Le Potato Dextrose Broth a été utilisé (PDB, 24 g / L, Difco, États-Unis). Dix fioles embossées de 500 ml contenant chacune 250 ml de PDB ont été inoculées avec 2 ml d'une solution titrant  $2,0 \times 10^3$  CFU / ml de la souche de *T. harzianum* MAUL-20 âgée de 10 jours. Le même dispositif a été utilisé pour *T. harzianum* T-

22. Un milieu stérile ne supportant pas la croissance de *T. harzianum* a été utilisé comme témoin. Les échantillons ont été incubés à 25°C sur un agitateur rotatif à 200 rpm dans l'obscurité pendant 15 jours.

### **Filtration, acidification et extraction**

La pré-filtration a été effectuée grâce à un coton fromage et a été suivie d'une filtration avec un filtre papier Whatman 40 et un Buchner. Le mycélium a été séché et pesé. Le filtrat a subi 3 extractions avec le tiers de son volume en acétate d'éthyle (Laboratoire Mat, Canada). La fraction acétate d'éthyle a été placée dans un évaporateur rotatif à 40°C. L'évaporation à l'azote a permis l'obtention d'une gomme brunâtre. Les extraits de métabolites neutres ont été pesés. Le pH du filtrat a ensuite été ajusté à 2,0 avec de l'acide chlorhydrique concentré (Laboratoire Mat, Canada). Le filtrat acidifié a subi 3 extractions avec le tiers de son volume en acétate d'éthyle. La fraction acétate d'éthyle a été placée dans un évaporateur rotatif à 40°C. L'évaporation à l'azote a permis l'obtention d'une gomme brunâtre. Les extraits de métabolites acides ont été pesés.

### **Bioessais pour les métabolites neutres et métabolites acides**

Les propriétés antibactériennes des extraits de métabolites neutres et acides ont été mesurées grâce à des essais de croissance radiale sur milieu de culture. Une suspension de 100 µl de la bactérie (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*) à tester a été étalée sur Tryptic Soy Agar (Tryptic Soy Broth, 30 g / L et Bacto Agar 15 g / L, Difco, États-Unis) et laissée à sécher une heure. L'échantillon a été dissout dans l'acétate d'éthyle. Des disques antibiogrammes sur lesquels ont été déposés 50 et 75 µg d'extraits de métabolites ont été placés au centre des plats de Pétri (4 répétitions). L'acétate d'éthyle seul servait de témoin. Les zones d'inhibition ont été mesurées après une incubation de 24 heures à 37°C selon les critères suivants : - : pas d'inhibition, + : rayon d'inhibition < 5 mm, ++ : rayon d'inhibition > 5,1 mm (Faull et al., 1994).

Les propriétés antifongiques des métabolites neutres et acides ont été examinées grâce à des bioessais sur PDA. Une rondelle de 5 mm de diamètre du champignon a été placée au centre du plat de Pétri (*B. cinerea*, *S. cepivorum*). Des disques antibiogrammes sur lesquels ont été déposés 50 et 75 µg d'extraits de métabolites ont été placés à 2 cm du centre une fois le solvant évaporé. L'acétate d'éthyle seul servait de témoin. Des témoins avec le champignon en croissance seule ont aussi été utilisés. Le pourcentage de croissance était évalué après 48 et 72 heures à 20°C selon les critères suivants : - : 90-100% de croissance, + : 50-90% de croissance et ++ : < 49% de croissance (Faull et al., 1994).

## 4.2 PHASE 2 ET 3. ESSAIS SUR LE TERRAIN

Les phases 2 et 3 avaient pour objectif de déterminer en conditions naturelles le potentiel des produits en début de développement. Des tests d'efficacité en conditions contrôlées sur de petites superficies en serres ou en champs et à l'échelle commerciales, ont été menés à différentes échelles spatiales. La nature des tests a varié selon les biopesticides étudiés, en fonction de leur avancement respectif dans le processus d'homologation. Dans tous les cas, nous avons suivi rigoureusement les procédures décrites et exigées par l'ARLA, notamment en ce qui concerne les types de traitements et de témoins.

## 4.3 ÉTAPE 2. BIOFONGICIDES

Les activités prévues à cette étape ont été changées puisque le produit américain SERENADE n'a pas été retenu. La compagnie californienne AgraQuest a refusé de nous fournir des données scientifiques sur les tests d'efficacité réalisés avec son produit. Suite à ce refus, nous avons décidé de bannir le produit SERENADE de notre sélection. Nous désirons travailler seulement avec les compagnies qui sont intéressées à faire avancer la cause des produits biologiques au Canada. La compagnie Finlandaise Verdera, division de Kemira Agro Oy, a manifesté son intérêt pour le marché canadien et nous avons opté pour celle-ci. Ainsi des tests ont été entrepris avec les biofongicides *Trichoderma* MAUL-20 (Horti-Protection inc., Québec), RootShield (Bio-works inc., USA) et Prestop (Verdera, Finlande).

Considérant l'ampleur des tests à l'échelle expérimentale et la nécessité de répéter l'expérience sur deux saisons de croissance différentes tel qu'exigé par l'ARLA, nous avons procédé à la mise à l'échelle de trois systèmes agricoles en serre expérimentale soit les systèmes **1**) tomate de serre vs *Botrytis cinerea*, **2**) tomate de serre et célosie plumeuse pour la fonte de semis vs *Pythium ultimum* et **3**) trois légumes en semis (haricot nain, céleri et tomate de serre) et trois plantes ornementales (célosie plumeuse, giroflée et zinnia) pour la fonte de semis causée vs *Rhizoctonia solani*. De plus, nous avons procédé à la mise à l'échelle d'un système agricole à l'échelle commerciale soit le système : **1**) tomate de serre vs *Botrytis cinerea*. Les biofongicides Prestop et MAUL-20 ont été testés puisque seules les compagnies Verdera et Horti-Protection inc. ont demandé un permis de recherche à l'ARLA. Un permis restrictif a été alloué pour MAUL-20 à Horti-Protection inc. en échange de tests sur les antibiotiques produits par la souche MAUL-20 (voir section 4.4.4. Activité 5). **Cette activité a permis de répondre à l'objectif 4).**

### 4.3.1 ACTIVITÉ 1. Expérience #1 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Botrytis cinerea* sur la tomate de serre

Le but de cette expérience était de vérifier en serre expérimentale l'efficacité de 3 biofongicides potentiels pour réprimer *Botrytis cinerea*, agent responsable de la moisissure grise de la tomate de serre (cv Trust). Malgré tous les efforts déployés au cours des dernières années pour contrer cet agent pathogène, la moisissure grise demeure encore la priorité #1 des producteurs de tomate de serre. Des pertes économiques très importantes sont enregistrées chaque année. **Cette activité a permis de répondre partiellement aux objectifs 5), 6) et 7).**

Les résultats escomptés, suite à l'emploi des agents biologiques MAUL-20, RootShield® et Prestop®, devront permettre de :

- 1) Restreindre l'utilisation de fongicides en serre (protection des travailleurs, du consommateur et de l'environnement);

- 2) Offrir un contrôle efficace contre la moisissure grise;
- 3) Être capable de survivre et se multiplier sur le plant afin d'assurer un bon contrôle durant toute la durée de l'expérience;
- 4) Être d'utilisation sécuritaire en production commerciale (aucune nocivité pour les utilisateurs, l'environnement, le consommateur et les cultures);
- 5) Démontrer le potentiel commercial de ces trois biofongicides.

L'expérience s'est déroulée dans une serre de l'Université Laval, selon les paramètres suivants. Les traitements étaient :

1. Témoin avec présence de *Botrytis cinerea*
2. Conventionnel avec fongicides (Decree, Botran et Rovral)
3. Vinaigre en badigeonnage
4. Prestop® en badigeonnage
5. Prestop® en pulvérisation
6. MAUL-20 en badigeonnage
7. MAUL-20 en pulvérisation
8. RootShield® en badigeonnage
9. RootShield® en pulvérisation

Les traitements en pulvérisation étaient effectués après chaque effeuillage qui avait lieu aux 2 semaines. Les traitements ont été réalisés avec un pulvérisateur Chaplin de 4 litres. Le badigeonnage des blessures était effectué lorsqu'un chancre apparaissait aux sites d'effeuillage. Le chancre était enlevé à l'aide d'un exacto et la tige badigeonnée avec une préparation à base de vinaigre (témoin badigeonnage), de *Trichoderma* ou de *Gliocladium*.

Les doses utilisées pour les traitements avec les biofongicides étaient celles recommandées par les manufacturiers :

1. **Prestop®** : a été appliqué au taux de 1% au niveau foliaire. Prestop® titre pour  $1 \times 10^7$  CFU/ g de matière sèche
2. **MAUL-20** : a été appliqué au taux de 0,2%. MAUL-20 titre pour  $1 \times 10^7$  CFU/g de matière sèche
3. **RootShield** : a été appliqué au taux de 0,075%. RootShield titre pour  $1 \times 10^7$  CFU/g de matière sèche

Les doses employées pour les badigeonnages étaient :

1. **Vinaigre** : même proportion d'eau et de vinaigre
2. **Trichoderma MAU-20** : proportion de 1:1.5 i.e. 10 g de *Trichoderma* MAU-20 dans 15 ml d'eau
3. **RootShield** : proportion de 1:1.5 i.e. 10 g de RootShield (*T. harzianum*) dans 15 ml d'eau
4. **Prestop** : proportion de 1:2 i.e. 10 g de PreStop (*Gliocladium catenulatum*) dans 20 ml d'eau

Après le premier effeuillage, les plants ont été traités avec les produits biologiques. Deux semaines plus tard, une introduction de l'agent pathogène *Botrytis cinerea* à une concentration de  $2 \times 10^4$  CFU/ml a été effectuée afin d'assurer un niveau de la maladie dans la serre. Tous les plants ont été traités. Les fruits ont été récoltés deux fois par semaine et classés selon les catégories employées à l'échelle commerciale :

1. Catégorie #1 entre 90 et 400 g sans défaut
2. Catégorie #2 entre 70 et 90 g sans défaut
3. Catégorie #3 < 70 g ou > 400 g ou entre 70 et 400 g avec défauts

Les défauts ont été notés. Les causes potentielles de rejet étaient :

Pourriture apicale	Dégâts causés par les thrips
Présence de <i>Botrytis</i>	Gold speck (accumulation de calcium à l'apex du fruit)
Blessures mécaniques	Présence de taches

La régie conventionnelle de culture de la tomate a été respectée. La lutte biologique avec des auxiliaires de lutte a été priorisée pour contrer les insectes nuisibles. Seule l'aleurode des serres (*Trialeurodes vaporariorum* – mouches blanches) a causé des problèmes et l'introduction de la guêpe parasitoïde *Encarsia formosa* a permis un contrôle efficace. Pour chaque traitement, il y avait 3 répétitions de 6 plants par traitement (annexe 1). Neuf traitements ont été réalisés pour un total de 162 plants en traitement. Dans la serre, il y avait un total de 336 plants (16 matelas x 3 plants / matelas \* 7 rangées) afin d'uniformiser les paramètres de cultures et climatiques dans la serre. L'expérience a duré 6 mois. L'expérience a été répétée une autre fois dans le temps, dans une saison de production différente.

**Les paramètres étudiés étaient :**

- 1) Développement du plant (toxicité, état général de la culture, anomalies observées pouvant avoir un lien avec les traitements);
- 2) Rendement en fruit de première qualité : données de récolte 2 fois par semaine;
- 3) Déterminer la sévérité de la maladie sur les plants (tiges et feuilles);
- 4) Vérification de la présence de *Botrytis* et de *Trichoderma* sur les organes.

#### **4.3.2 ACTIVITÉ 2. Expérience #2 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Botrytis cinerea* sur la tomate de serre**

L'expérience décrite à l'activité 4.6.1) a été répétée afin de respecter les normes de l'ARLA. Seules les modifications suivantes ont été apportées au protocole précédent.

Le 16 septembre, une introduction de l'agent pathogène *Botrytis cinerea* par injection (concentration de  $2 \times 10^4$  CFU/ml) a été effectuée dans les deux rangs de garde seulement. Seul le plant du centre de chaque matelas a été injecté. En même temps, le premier effeuillage des parcelles traitées biologiquement et chimiquement a été réalisé et les plants traités avec leur produit respectif. La semaine suivante, les parcelles en badigeonnages ont été effeuillées et un traitement avec *Botrytis* a été réalisé à la grandeur de la serre le jour même. Par la suite, il y a eu alternance entre les semaines de traitements biologiques et introduction de *Botrytis*.

La lutte biologique avec des auxiliaires de lutte a été priorisée pour contrer les insectes nuisibles. Seule l'aleurode des serres (*Trialeurodes vaporariorum* – mouches blanches) a causé des problèmes et l'introduction de la guêpe parasitoïde *Encarsia formosa* a permis un contrôle efficace. Pour chaque traitement, il y avait 3 répétitions de 6 plants par traitement (annexe 2). Neuf traitements ont été réalisés pour un total de 162 plants en traitement. Dans la serre, il y avait un total de 240 plants (16 matelas x 3 plants / matelas \* 5 rangées) afin de faciliter les traitements et le travail quotidien dans la serre. L'expérience a duré 4 mois. **Cette activité a permis de répondre partiellement aux objectifs 5), 6) et 7).**

### 4.3.3 ACTIVITÉ 3. Expérience #1 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Pythium* sur la tomate de serre et la célosie plumeuse

Le but de cette expérience était de vérifier en serre expérimentale l'efficacité de 3 biofongicides potentiels à réprimer *Pythium*, agent responsable de la fonte de semis de la tomate (cv Bush Beefmaster) et de la célosie plumeuse, plante ornementale très sensible à *Pythium*. Malgré tous les efforts déployés au cours des dernières années pour contrer cet agent pathogène, la fonte de semis hâtive ou de pré-émergence demeure une des priorités tant pour les producteurs de tomate que ceux de plantes ornementales. Des pertes économiques importantes sont enregistrées chaque année.

Les résultats escomptés, suite à l'emploi des agents biologiques MAUL-20, RootShield® et Prestop®, devront permettre de :

- 1) Restreindre l'utilisation de fongicides en serre (protection des travailleurs, du consommateur et de l'environnement);
- 2) Offrir un contrôle efficace contre la fonte de semis;
- 3) Être capable de survivre et se multiplier sur le plant afin d'assurer un bon contrôle durant toute la durée de l'expérience;
- 4) Être d'utilisation sécuritaire en production commerciale (aucune nocivité pour les utilisateurs, l'environnement, le consommateur et les cultures);
- 5) Démontrer le potentiel commercial de ces trois biofongicides.

L'expérience s'est déroulée dans une serre au complexe scientifique, selon les paramètres suivants. Les traitements étaient :

1. Témoin plante seule
2. Témoin *Pythium*
3. Prestop seul
4. Prestop + *Pythium*
5. *Trichoderma* MAUL-20 seul
6. *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*
7. RootShield seul
8. RootShield + *Pythium*

Les plantes sélectionnées pour leur vulnérabilité face à *Pythium* étaient :

1. Tomate
2. Célosie

Les traitements étaient appliqués au niveau du sol, au début de la saison. Dans un premier temps, le 15 juin 2004, le sol des traitements 3 à 8 a reçu la dose requise de l'agent biologique pour combattre *Pythium*. Les caissettes ont été au repos pendant 2 semaines, seul un arrosage hebdomadaire a été fait. Après ce temps, l'agent pathogène *Pythium* a été introduit (le 29 juin) dans les traitements 2, 4, 6 et 8 à une dose de  $2,5 \times 10^3$  cfu/ml (40 ml par caissette). Le sol devait toujours être maintenue humide afin de favoriser le travail de *Pythium* au niveau de l'émergence et/ou des racines.

Les doses utilisées pour les traitements avec les biofongicides étaient celles recommandées par les manufacturiers :

- 1) **Prestop<sup>®</sup>** : a été appliqué au taux de 0,2 g / l de substrat. Prestop titre pour  $1 \times 10^7$  cfu/g de matière sèche
- 2) **MAUL-20** : a été appliqué au taux de 0,2 g/l de substrat. MAUL-20 titre pour  $1 \times 10^7$  cfu/g de matière sèche
- 3) **RootShield** : a été appliqué au taux de  $220 \text{ g/m}^3 = 0,220 \text{ g/l}$  de substrat. RootShield titre pour  $1 \times 10^7$  cfu/g de matière sèche

Pour chaque traitement, il y avait 4 répétitions de 6 plants par traitement (annexe 3). Huit traitements ont été réalisés pour un total de 192 plants par plante étudiée. L'expérience a duré 10 semaines (incluant les 2 semaines d'attente avant le semis) et sera répétée une autre fois dans le temps, dans une saison de production différente. **Cette activité a permis de répondre partiellement aux objectifs 5), 6) et 7).**

**Les paramètres étudiés étaient :**

- 1) Développement des plantes (toxicité, état général de la culture, anomalies observées pouvant avoir un lien avec les traitements);
- 2) Déterminer la sévérité de la maladie sur les plantes (racines et collet);
- 3) Vérification de la présence de *Pythium* et de *Trichoderma* et/ou *Gliocladium* sur les racines.

#### **4.3.4 ACTIVITÉ 4. Expérience #2 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Pythium* sur la tomate de serre et la célosie plumeuse**

L'expérience décrite à l'activité 4.6.3) a été répétée afin de respecter les normes de l'ARLA. Aucune modification n'a été apportée au protocole précédent. **Cette activité a permis de répondre partiellement aux objectifs 5), 6) et 7).**

Les traitements étaient appliqués au niveau du sol, au début de la saison. Dans un premier temps, le 26 octobre 2004, le sol des traitements 3 à 8 a reçu la dose requise de l'agent biologique pour combattre *Pythium*. Les caissettes ont été au repos pendant 2 semaines, seul un arrosage hebdomadaire a été fait. Après ce temps, l'agent pathogène *Pythium* a été introduit (le 8 novembre) dans les traitements 2, 4, 6 et 8 à une dose de  $1 \times 10^4$  cfu/ml (40 ml par caissette). Le sol devait toujours être maintenue humide afin de favoriser le travail de *Pythium* au niveau de l'émergence et/ou des racines.

Pour chaque traitement, il y avait 4 répétitions de 6 plants par traitement (annexe 4). Huit traitements ont été réalisés pour un total de 192 plants par plante étudiée. L'expérience a duré 10 semaines (incluant les 2 semaines d'attente avant le semis) et évalué le 10 janvier 2005.

#### **4.3.5 ACTIVITÉ 5. Expérience #1 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Rhizoctonia solani* sur trois légumes en semis (le haricot nain, le céleri et la tomate de serre) et trois plantes ornementales (la célosie plumeuse, la giroflée et le zinnia)**

Le but de cette expérience était de vérifier en serre expérimentale l'efficacité de 3 biofongicides potentiels à réprimer *Rhizoctonia solani*, agent responsable de la fonte de semis chez le haricot, le céleri, la tomate de

<sup>1</sup>  $1 \text{ m}^3 = 1\,000 \text{ litres}$

serre, la célosie plumeuse et la giroflée et de la pourriture des racines sur le zinnia. Malgré tous les efforts déployés au cours des dernières années pour contrer cet agent pathogène, la fonte de semis hâtive, de pré-émergence ou de pourriture des racines demeurent une des priorités tant pour les producteurs de légumes de transplants, de tomate de serre que de plantes ornementales. Des pertes économiques importantes sont enregistrées chaque année. **Cette activité a permis de répondre partiellement aux objectifs 5), 6) et 7).**

Les résultats escomptés, suite à l'emploi des agents biologiques MAUL-20, RootShield® et Prestop®, devront permettre de :

1. Restreindre l'utilisation de fongicides en serre (protection des travailleurs, du consommateur et de l'environnement);
2. Offrir un contrôle efficace contre la fonte de semis;
3. Être capable de survivre et se multiplier sur le plant afin d'assurer un bon contrôle durant toute la durée de l'expérience;
4. Être d'utilisation sécuritaire en production commerciale (aucune nocivité pour les utilisateurs, l'environnement, le consommateur et les cultures);
5. Démontrer le potentiel commercial de ces trois biofongicides.

L'expérience s'est déroulée dans une serre au complexe scientifique, selon les paramètres suivants. Les traitements étaient :

- 1) PRO-MIX BX témoin (sans *Rhizoctonia solani*)
- 2) PRO-MIX BX avec *Trichoderma* MAUL-20 (sans *R. solani*)
- 3) PRO-MIX BX avec Rootshield (sans *R. solani*)
- 4) PRO-MIX BX avec Prestop (sans *R. solani*)
  
- 5) PRO-MIX BX témoin (**avec** *R. solani*)
- 6) PRO-MIX BX avec *Trichoderma* MAUL-20 (**avec** *R. solani*)
- 7) PRO-MIX BX avec Rootshield (**avec** *R. solani*)
- 8) PRO-MIX BX avec Prestop (**avec** *R. solani*)

Les plantes sélectionnées pour leur vulnérabilité face à *R. solani* étaient :

1. Tomate var Beefmaster VFN (taux de germination de 88%)
2. Haricot nain (taux de germination de 90%)
3. Céleri var Utha Green Giant (taux de germination de 97%)
  
4. Giroflée (taux de germination de 85-90%)
5. Zinnia (taux de germination de 85-90%)
6. Célosie plumeuse (taux de germination de 85-95%)

Les traitements étaient appliqués au niveau du substrat. Contrairement aux deux expériences portant sur le contrôle de *Pythium*, les agents de lutte biologique n'ont pas été introduits deux semaines avant l'agent pathogène. Nous voulions vérifier si les agents de lutte étaient en mesure de lutter immédiatement contre *Rhizoctonia*. Le 31 mars 2005, l'essai portant sur les 3 légumes a été initié et le 4 avril, celui avec les plantes ornementales démarrait. Pour chaque expérience, la démarche a été similaire. Le substrat a reçu la dose de

l'agent biologique et / ou de l'agent pathogène, selon le traitement en cause. Pour les traitements avec les biofongicides, les doses utilisées étaient celles recommandées par les manufacturiers :

1. **Prestop<sup>®</sup>** : a été appliqué au taux de 1,2 g / L
2. **MAUL-20** : a été appliqué au taux de 2 g / L
3. **RootShield** : a été appliqué au taux de 0,3 g / L

L'agent pathogène *R. solani* a été introduit dans les traitements E à H à une dose de  $1 \times 10^4$  cfu/ml (20 ml par litre de substrat). Comme *Rhizoctonia* est un champignon stérile, ce sont les fragments d'hyphes et les sclérotés qui ont été dénombrés à l'hématimètre. *Rhizoctonia* a été préparé avec des cultures âgées d'environ 10 j et inondées avec de l'eau distillée stérile alimentée de 1 goutte de Tween 80 (un agent dispersant). La surface de la gélose a été grattée avec une lamelle et l'inoculum récolté a été broyé 10 sec à l'aide d'un polytron. Un aliquot a été prélevé et déposé sur un hématimètre pour évaluation. Nous recherchions une concentration de  $10^4$  cfu/ml.

Pour chaque traitement, il y avait 4 répétitions de 8 plants par traitement (annexe 5). Huit traitements ont été réalisés pour un total de 256 plants par plante étudiée. Les conditions de la serre étaient : une température de 23 °C le jour et 21 °C la nuit, une photopériode de 18 heures avec un éclairage de 15 000 Lux. L'arrosage a été fait manuellement, deux fois par jour et deux fertilisations ont été réalisées (22 et 29 avril). Les expériences ont duré 6 semaines et ont été évaluées le 9 et 10 mai 2005.

#### **Les paramètres étudiés étaient :**

1. Le pourcentage de germination
2. Le taux de survie à chaque semaine
3. La hauteur des plants aux deux semaines jusqu'à la récolte
4. À la récolte, l'observation des systèmes racinaires et la notation de l'apparence de symptôme par un système de cote
5. À la récolte, prendre les masses fraîches et masse sèches des parties aériennes

#### **4.3.6 ACTIVITÉ 6. Expérience #2 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Rhizoctonia solani* sur trois légumes en semis (le haricot nain, le céleri et la tomate de serre) et trois plantes ornementales (la célosie plumeuse, la giroflée et le zinnia)**

Le même protocole qu'au point 4.6.5) a été répété pour cette expérience puisque nous devons répéter dans le temps le même protocole pour satisfaire les exigences de l'ARLA. Seules les modifications suivantes ont été apportées. **Cette activité a permis de répondre partiellement aux objectifs 5), 6) et 7).**

Le 29 juin 2005, les substrats ont été humidifiés et inoculés avec les agents biologiques respectifs et laissés au repos pendant deux semaines. Le 14 juillet, les essais portant sur les 3 légumes et 4 plantes ornementales ont été initiés. L'agent pathogène *R. solani* a été introduit dans les traitements 5 à 8 à une dose de  $1,5 \times 10^4$  cfu/ml (20 ml par litre de substrat). Deux fertilisations ont été réalisées (02 et 08 août). Les expériences ont duré 5 semaines et a été évaluées les 17 et 18 août 2005. La durée a été raccourcie d'une semaine considérant le temps chaud estival qui a fait croître les plantes plus rapidement (annexe 6).

#### **4.3.7 ACTIVITÉ 7. Expérience avec Prestop et *Trichoderma* MAUL-20 contre *Botrytis cinerea* sur la tomate de serre à l'échelle commerciale**

Le chancre de la tige causé par *B. cinerea* demeure une maladie largement répandue dans la production de la tomate de serre. Cet agent pathogène ayant déjà démontré une résistance à plusieurs matières actives utilisées par les producteurs, des essais en serre expérimentale ont été menés afin de vérifier l'efficacité de biofongicides commercialisés ou en développement tels que Prestop®, RootShield® et MAUL-20 à réprimer le chancre de la tige. À la lumière des résultats obtenus lors des essais en serre expérimentale, une expérience a été menée aux Serres du St-Laurent div. Danville afin de vérifier le potentiel d'utilisation commerciale des biofongicides selon deux modes d'application soit, comme traitement préventif en pulvérisation ou comme traitement curatif en badigeonnage lors du retrait d'un chancre. Cette expérience a été réalisée selon l'intérêt des partenaires privés et selon l'émission de permis de recherche par l'ARLA. Ainsi, quatre traitements ont été comparés : 1) fongicides en pulvérisation et Thiram en badigeonnage; 2) alternance Prestop / fongicides en pulvérisation et Thiram en badigeonnage; 3) fongicides en pulvérisation et Prestop en badigeonnage et 4) fongicides en pulvérisation et MAUL-20 en badigeonnage. **Cette activité a permis de répondre partiellement aux objectifs 5), 6) et 7).**

L'essai en serre commerciale s'est déroulé aux Serres du St-Laurent div. Danville. Il s'agit d'un complexe de serres avec un revêtement de double polyéthylène de type De Klerk. Dans le bloc nord-est, trois chapelles de 337 m<sup>2</sup> ont été utilisées soit, les chapelles 4 et 5 du module 1 ainsi que la chapelle 10 du module 2 (annexe C). L'expérience a débuté le 11 août 2004 et s'est terminée le 15 mars 2005.

#### **Matériel végétal**

Chaque chapelle était constituée de 4 rangs de plants de tomate à raison de 204 plants par rang soit, une densité de 2,4 plants / m<sup>2</sup>. Les plants de tomate produits par la compagnie Ontario Plants Propagation Ltd. ont été transplantés dans les serres le 28 juillet 2004 sur des matelas de laine de roche de type Master 50 x 20 x 10 cm (Grodan, Danemark). Il s'agit d'un porte-greffe de type Beaufort et d'un greffon du cultivar Trust.

La température de croissance visée pour 24 heures variait selon que le temps soit ensoleillé (18-18,5°C) ou nuageux (17°C). L'humidité relative se situait entre 70 et 80 %. Un système d'éclairage artificiel permettait une photopériode de 16 heures. De même, un système d'enrichissement carboné permettait une teneur en

CO<sub>2</sub> de 400 à 1300 ppm selon la ventilation. L'irrigation se faisait selon les besoins des plants et la lumière disponible soit 1 ml d'eau / joule / cm<sup>2</sup>. L'eau d'irrigation avait un pH de 5,7 et une conductivité électrique de 3,5 mS / cm alors que la conductivité électrique de l'eau de lessivage était de 1,5 à 2 fois supérieure. Quant à la pollinisation, elle était assurée par les bourdons pollinisateurs (Koppert, Pays-Bas).

## Traitements

Les traitements conventionnels ont été appliqués dans la chapelle 5 soit, les fongicides en pulvérisation et le Thiram en badigeonnage tels qu'utilisés par le producteur. L'alternance Prestop / fongicides en pulvérisation a été utilisée dans la chapelle 10 de même que le Thiram en badigeonnage. Quant à la chapelle 4, elle a été utilisée pour vérifier l'efficacité des fongicides en pulvérisation de même que celle des biofongicides Prestop et MAUL-20 en badigeonnage. La fréquence des traitements en pulvérisation était de une fois par semaine alors que les traitements en badigeonnage étaient appliqués lors du retrait d'un chancre. L'alternance Prestop / fongicides se définit comme suit. La fréquence des traitements en pulvérisation étant d'une fois par semaine, Prestop était appliqué une semaine sur trois, les fongicides Rovral, Botran et Maestro étant utilisés pour compléter cette rotation de matières actives. Le choix de cette alternance s'explique par la quantité de produit fournie par la compagnie Verdera de même que par la réticence des producteurs quant à l'efficacité d'un biofongicide. Les différents fongicides appliqués en pulvérisation et au souffleur pour chacune des chapelles de même que la date et la dose d'application ont été appliqués selon la sédule suivante :

Date	Traitement Chapelle 10	Dose (kg / ha)	Date	Traitement Chapelles 4-5	Dose (kg / ha)
18-08-04	Rovral	2,0	11-08-04	Rovral	2,0
25-08-04	Folpan	2,0	23-08-04	Folpan	2,0
09-09-04	Prestop	N.A.	14-09-04	Soufre	3,0
15-09-04	Soufre	3,0	24-09-04	Botran	2,0
23-09-04	Botran	2,0	26-09-04	Decree	2,2
01-10-04	Prestop	23,7	08-10-04	Rovral	2,0
08-10-04	Rovral	2,0	12-10-04	Folpan	2,0
22-10-04	Prestop	23,7	16-10-04	Decree	2,2
26-10-04	Botran	2,0	27-10-04	Botran	2,0
07-11-04	Maestro	3,0	07-11-04	Maestro	3,0
12-11-04	Prestop	23,7	10-11-04	Rovral	2,0
	Rovral	2,0			
23-11-04	Folpan	2,0	17-11-04	Folpan	2,0
03-12-04	Prestop	23,7	24-11-04	Folpan	2,0
08-12-04	Botran	2,0	28-11-04	Decree	2,2
17-12-04	Rovral	2,0	08-12-04	Botran	2,0
19-12-04	Maestro	3,0	17-12-04	Rovral	2,0
21-12-04	Prestop	23,7	19-12-04	Maestro	3,0
04-01-05	Folpan	2,0	07-01-05	Folpan	2,0
13-01-05	Prestop	23,7	14-01-05	Soufre	3,0
27-01-05	Rovral	2,0	16-01-05	Decree	2,2
04-02-05	Prestop	23,7	24-01-05	Rovral	2,0
11-02-05	Botran	2,0	05-02-05	Maestro	3,0
17-02-05	Soufre	3,0	11-02-05	Botran	2,0
22-02-05	Soufre	3,0	17-02-05	Soufre	3,0
01-03-05	Prestop	23,7	22-02-05	Soufre	3,0
12-03-05	Folpan	2,0	19-03-05	Rovral	2,0

La pulvérisation des différentes matières actives a été réalisée à l'aide d'un pulvérisateur de fabrication artisanale (100 Psi, 8 buses D1). Un volume de 80 L d'une solution de 10 g de Prestop par litre d'eau a permis de couvrir la superficie de la chapelle 10. Des volumes de 60 L de solutions de 1,7 g de Maestro par litre d'eau ou de 1,25 g de Decree par litre d'eau ont permis de couvrir la superficie d'une chapelle. Un souffleur de type Solo Port 423 (Solo Inc., États-Unis) a été utilisé pour appliquer les fongicides Rovral, Botran, Folpan et Soufre microfin 92 %. En ce qui concerne les traitements en badigeonnage, une pâte constituée d'un ratio 1 : 1,5 de MAUL-20 et d'eau était appliquée sur les plaies créées par l'élimination des chancres. Il en était de même pour le Thiram. Un ratio de 1 : 2 était utilisé dans le cas de Prestop. Il est à noter que des traitements ont été faits afin de lutter contre les insectes ravageurs. Ainsi, des hyménoptères parasitoïdes tels que *Encarsia formosa* et *Dicyphus hesperus* (Koppert, Pays-Bas) ont été introduits afin de réprimer l'aleurode des serres. Deux applications de Dyno-Mite (1g / 62,5 ml) ont aussi été faites les 3 et 18 novembre 2004.

### **Dispositif expérimental**

Chaque chapelle contenait quatre rangs. Toutefois, seuls les deux rangs du centre ont été utilisés pour la prise de données. Les rangs situés de chaque côté ont servi de rangs de garde pour limiter les variations. Afin de faciliter les observations, 40 plants ont été sélectionnés aléatoirement et identifiés dans les rangs du centre à raison de 20 plants par rang et ce, pour le traitement conventionnel et l'alternance Prestop / fongicides (chapelles 5 et 10). Ces 40 plants ont été observés pour le suivi des chancres et l'efficacité des badigeonnages. En ce qui concerne les traitements Prestop et MAUL-20 en badigeonnage (chapelle 4), 80 plants ont été identifiés sur les rangs du centre à raison de 40 plants par rang. Les 20 premiers plants du deuxième rang étaient destinés au badigeonnage avec Prestop et les 20 derniers plants au badigeonnage avec MAUL-20. L'inverse a été fait sur le troisième rang (annexe C).

### **Vérification de la présence de *Gliocladium catenulatum* sur les tiges**

Afin de vérifier la présence et la persistance de *G. catenulatum* dans la chapelle 10 (alternance Prestop / fongicides en pulvérisation), des blessures d'effeuillage cicatrisées ont été prélevées au hasard sur les plants identifiés juste avant une nouvelle pulvérisation avec Prestop et une semaine après la pulvérisation au Prestop. Les blessures d'effeuillage cicatrisées ont été prélevées dans la partie de la tige traitée lors de la pulvérisation précédente afin d'avoir une certaine homogénéité quant au stade des tissus prélevés. Les prélèvements ont ensuite été mis en culture sur PDA à raison de 3 morceaux de tissu par plat de Pétri. Les plats ont été incubés 7 jours à  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  le jour et  $18^\circ\text{C}$  la nuit avec une photopériode de 16 heures. Par la suite, les organismes présents sur le milieu de culture ont été identifiés à l'aide d'une loupe binoculaire, d'un microscope inversé et / ou d'un microscope optique. Des prélèvements ont aussi été faits à quelques reprises dans les chapelles 4 et 5 afin de s'assurer que *G. catenulatum* n'était pas présent dans les chapelles traitées avec les fongicides en pulvérisation.

### **Décompte des chancres présents sur les tiges**

L'efficacité des traitements en pulvérisation a été mesurée par le nombre de chancres s'étant développés suite à l'application d'un traitement préventif. L'efficacité des traitements curatifs en badigeonnage a été vérifiée par le taux de reprise des chancres éliminés et badigeonnés. Le décompte des chancres présents sur les tiges a été effectué une fois par semaine. Les chancres observés sur les plants identifiés ont été dénombrés puis, éliminés. Les blessures ainsi créées ont été badigeonnées avec le Thiram dans les chapelles 5 et 10. Quant aux chancres observés dans la chapelle 4, ils ont été badigeonnés avec Prestop ou avec MAUL-20 selon leur position dans la chapelle. À la fin de l'expérience, les chancres éliminés et badigeonnés sur les plants identifiés ont été prélevés avec un couteau de type exacto afin de s'assurer qu'il n'y avait pas eu reprise par l'agent pathogène dans les tissus et vaisseaux des plants de tomate.

## **Évaluation des rendements**

Les rendements ont été évalués afin de vérifier l'impact des différents traitements sur les plants de tomate. Les récoltes ont été effectuées de trois à quatre fois par semaine. Pour chacune des récoltes, le rendement total en kilogrammes a été mesuré pour le troisième rang de chaque chapelle. Une fois par mois, il y a eu classification des fruits selon quatre catégories. Lors de la classification, deux bacs de fruits en provenance du troisième rang ont été évalués. La catégorie #1 correspondait à des fruits ronds, de couleur uniforme et non difformes. Il n'y avait pas de maladie, de blessure ou d'égratignure. La catégorie #2 comprenait des fruits n'ayant qu'un seul défaut. Il pouvait s'agir d'une légère déformation, d'une coloration inégale, d'une égratignure causée par une corde, d'un léger fendillement près de la queue (maximum 1 pouce) ou d'une maladie peu apparente (légère pourriture apicale inférieure à 1 cm). Quant à la catégorie #3, il s'agissait de fruits difformes, de faces de chat, de fendillements, de pourritures apicales inférieures à 2 centimètres, etc. Il s'agissait de fruits vendus en caisse de huit livres directement aux serres. La catégorie #4 était constituée de fruits mous ou suintants. Il s'agissait de fruits invendables.

## **5. RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### **5.1 PHASE 1. R&D LABO ET MISE À L'ÉCHELLE**

### **5.2 ÉTAPE 1. SÉLECTION DES BIOPESTICIDES**

#### **5.2.1 ACTIVITÉ 2. MISE À L'ÉCHELLE**

Au cours de ce projet, de nombreuses productions du biofongicide Sporodex ont été réalisées sur quatre sites distincts. Trois de ces sites sont situés au Québec et le dernier à Liège en Belgique. Les renseignements relatifs aux sites et dates de production sont compilés dans le tableau 34.

Les objectifs visés par ces productions sont variés. Tout d'abord, elles visaient à optimiser la production et la formulation du biofongicide Sporodex. Parallèlement, dans certains cas, elles avaient également pour objectif de produire de la biomasse pour des essais en serre (France, Hollande, etc.) alors que dans d'autres cas, elles s'orientaient vers une production commerciale. Les productions au CWBI et chez Lallemand font parties de cette dernière catégorie.

Les productions au CRDA, réalisées par la compagnie AEF Global, et celles au CREFSIP avaient pour objectif également de produire de la biomasse pour des essais expérimentaux. Le fermenteur de 150 litres du CRDA avait déjà été utilisé en 2001 pour la production de Sporodex™ alors que celui de 30 litres du CREFSIP n'avait encore jamais été employé à cette fin. Dans les deux cas, la formulation produite a été conservée à l'Université Laval et envoyée aux chercheurs qui en ont fait la demande.

Dans le cas du CWBI en Belgique, un des mandats était de transmettre les connaissances relatives à la production de Sporodex™ aux employés d'Agrostar. Cette compagnie, située à Namur en Belgique, est le fournisseur du Sporodex™ à Plant Product. Il était donc important de produire du Sporodex afin de combler des commandes.

Pour ce qui est de Lallemand, qui possède un laboratoire de recherche sur la production de levures à IRB (Montréal), le but principal consistait à vérifier la possibilité de produire commercialement du Sporodex™ dans des fermenteurs de très gros volume. À cet effet, il était important d'adapter le procédé de production à leurs équipements et de vérifier la compatibilité entre la production de *Pseudozyma flocculosa* et celle de la levure.

**Tableau 34.** Informations sur les productions réalisées dans le cadre du projet Sporodex en 2002-2003

Sites de production	Compagnies associées	Personnes responsables de la production	Objectifs visés	Nombre de productions et volume du fermenteur	Dates de production
<b>CRDA</b> 3600, boul. Casavant ouest Saint-Hyacinthe, Qc J2S 8E3 Tel: (450) 773-1105	AEF Global	Sébastien Couture Érik Tremblay	-Produire Sporodex pour des essais en serre. -Effectuer un essai de refroidissement -Essais de formulation	1 * 150 litres	1/10/02 au 3/10/02
<b>CWBI</b> Université de Liège Sart-Tilman, B40 4000, Liège, Belgique 04 366 21 61	Agrostar	Sébastien Couture Frédéric Weekers Dr Philippe Thonart Thierry Beaudry	-Transmettre les connaissances relatives à la production. -Produire Sporodex pour remplir une commande de la cie Plant Product.	5 * 2000 litres	26/10/02 au 29/11/02
<b>IRB</b> 6100 ave. Royalmount Montréal. Québec, H4P 2R2 (514) 496-6374	Lallemand	Sébastien Couture Ziggen Zhang	-Adapter le procédé de production aux équipements de Lallemand. -Préparer une production industrielle en gros volume.	6 * 30 litres	21/1/03 au 14/2/03
<b>CREFSIP</b> Pavillon Marchand Université Laval, Qc G1K 7P4	Nil	Sébastien Couture	-Adapter les paramètres de production. -Produire la biomasse pour des essais en serre.	4 * 30 litres	31/3/03 au 9/4/03

Pour réaliser ces productions, il a été important de se déplacer sur les différents sites de fermentation. En effet, à l'automne 2002, plusieurs allers-retours Québec Saint-Hyacinthe et un voyage d'un mois et demi en Belgique ont été nécessaires. Dans le cas des productions chez Lallemand, une chambre a dû être louée à Montréal pour la durée des expériences alors qu'au CREFSIP, les équipements étaient situés à l'Université Laval et aucun déplacement n'a été requis. Il est important de mentionner que, dans tous les cas à l'exception du CWBI, les précultures et les principaux travaux de laboratoire ont été réalisés au laboratoire du Dr Richard Bélanger au pavillon Environnement de l'Université Laval.

Dans cette partie, les productions ont été traitées séparément. Pour chacune d'elles, un résumé ainsi qu'un bilan des comptes cellulaires sur les formulations ont été fournis. De plus, les photos des cultures en fermenteur de *P. flocculosa* lors des productions au CREFSIP sont également incluses.

## Productions chez AEF global

Tableau 35. Résumés des productions chez AEF Global

<b>Description:</b>	
Lot	APF/11-a
Dates de production	1/10/2002 au 3/10/2002
Lieu de production	CRDA, St-Hyacinthe (par AEF global) Fermenteur: 150 litres Bioengineering.
Objectifs de la production	- Produire de la biomasse pour des essais en serre. - Centrifuger après seulement 1h de refroidissement.
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture	2,08 <sup>E8</sup> UFC/ml
Fin de culture	2,60 <sup>E8</sup> UFC/ml
Formulation	8,60 <sup>E8</sup> UFC/ml
Matière sèche en fin de culture	3,19 g/L
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	9,8 kg
Contamination	Non
Production acceptable	Oui
Renseignements sur la production	- Très belle production. - Survie à l'entreposage faible comparativement à APF/11-b. - La formulation a été congelée à -24C en pots de 250 ml.
Lot	APF/11-b
Dates de production	1/10/2002 au 3/10/2002
Lieu de production	CRDA, St-Hyacinthe (par AEF global) Fermenteur: 150 litres Bioengineering.
Objectifs de la production	- Produire de la biomasse pour des essais en serre. - Centrifuger après 5h de refroidissement. - Essai de 11 formulations différentes.
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture	2,08 <sup>E8</sup> UFC/ml
Fin de culture	2,60 <sup>E8</sup> UFC/ml
Formulation	9,40 <sup>E8</sup> UFC/ml
Matière sèche en fin de culture	3,19 g/L
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	9,8 kg
Contamination	Non
Production acceptable	Oui
Renseignements sur la production	- Très belle production. - Survie à l'entreposage élevée comparativement à APF/11-a. - La formulation a été congelée à -24C en pots de 250 ml.

**Tableau 36.** Bilan des comptes cellulaires sur la formulation chez AEF Global

Lots	Méthodes employées	# jours au congélateur	# de jours subséquents à 4°C	Dates des comptes	Comptes cellulaires (UFC/ml)
APF/11-a	Surface count	0	1	4/10/02	8,6 <sup>E8</sup>
			5	8/10/02	3,4 <sup>E8</sup>
			8	11/10/02	6,9 <sup>E7</sup>
			12	15/10/02	2,75 <sup>E6</sup>
APF/11-b	Surface count	0	1	4/10/02	9,4 <sup>E8</sup>
			5	8/10/02	5,4 <sup>E8</sup>
			8	11/10/02	2,7 <sup>E8</sup>
			12	15/10/02	8,9 <sup>E7</sup>
APF/11-a	Surface count	356	0	24/9/03	1,75 <sup>E7</sup>
APF/11-b	Surface count	356	0	24/9/03	1,83 <sup>E8</sup>

**Remarque :** Les étalements sur un milieu gélosé ou « Surface Count » ont été réalisés sur 2 tubes différents.

### Productions au CWBI

**Tableau 37.** Résumés des productions au CWBI

<b>Description:</b>	
Lot	FW79
Dates de production	26/10/2002 au 31/10/2002
Lieu de production	CWBI, Liège, Belgique (pour Agrostar) Fermenteur: 100 litres Gourdon-Biolafite 2000 litres LSL Biolafite S.A.
Objectif de la production	- Produire de la biomasse.
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture fiole	2,90 <sup>E8</sup> UFC/ml
Fin de culture 100 L	1,05 <sup>E8</sup> UFC/ml
Fin de culture 2000 L	1,0 <sup>E8</sup> UFC/ml
Formulation	5,73 <sup>E8</sup> UFC/ml
Matière sèche en fin de culture	2,45 g/L
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	262,15 kg
Contamination	Oui, dans la formulation.
Production acceptable	Non
Renseignements sur la production	- Production moyenne. seulement 80% de conidies - La mélasse n'a que 30% de saccharose au lieu de 45-60%. - La formulation a été mélangée dans le fermenteur. - Il était difficile de diminuer la température de la formulation avant embouteillage. - Le fed-batch a été réalisé trop rapidement. - La formulation a été congelée à -20C en pots de 2L.

Tableau 37 (suite). Résumés des productions au CWBI

<b>Description:</b>	
Lot	FW83
Dates de production	5/11/2002 au 7/11/2002
Lieu de production	CWBI, Liège, Belgique (pour Agrostar) Fermenteur: 100 litres Gourdon-Biolafite 2000 litres LSL Biolafite S.A.
Objectif de la production	- Produire de la biomasse.
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture fiole	2,58 <sup>E8</sup> UFC/ml
Fin de culture 100 L	4,48 <sup>E7</sup> UFC/ml
Fin de culture 2000 L	----
Formulation	----
Matière sèche en fin de culture	----
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	----
Contamination	Oui
Production acceptable	Non
Renseignements sur la production	- La quantité de mélasse a été augmentée étant donné sont faible taux de saccharose. - Présence de bacilles dans le 2000L après 10,5h. - La contamination provient de la formulation qui a été mélangée dans le fermenteur lors de FW79. - Le fermenteur a été décontaminé et stérilisé à vide.
<b>Description:</b>	
Lot	FW87
Dates de production	7/11/2002 au 9/11/2002
Lieu de production	CWBI, Liège, Belgique (pour Agrostar) Fermenteur: 100 litres Gourdon-Biolafite 2000 litres LSL Biolafite S.A.
Objectif de la production	- Produire de la biomasse.
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture fiole	2,70 <sup>E8</sup> UFC/ml
Fin de culture 100 L	4,08 <sup>E7</sup> UFC/ml
Fin de culture 2000 L	----
Formulation	3,03 <sup>E8</sup> UFC/ml
Matière sèche en fin de culture	3,02 g/l
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	357,23 kg
Contamination	Oui
Production acceptable	Non
Renseignements sur la production	- La quantité de mélasse a été augmentée étant donné sont faible taux de saccharose. - Présence de bacilles dans le 2000L en fin de culture. - La biomasse a été centrifugée et formulée. - Le fermenteur a été restérilisé à vide.

Tableau 37 (suite). Résumés des productions au CWBI

<b>Description:</b>	
Lot	FW90
Dates de production	18/11/2002 au 22/11/2002
Lieu de production	CWBI, Liège, Belgique (pour Agrostar) Fermenteur: 100 litres Gourdon-Biolafite 2000 litres LSL Biolafite S.A.
Objectif de la production	- Produire de la biomasse
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture fiole	3,28 <sup>E8</sup> UFC/ml
Fin de culture 100 L	5,85 <sup>E7</sup> UFC/ml
Fin de culture 2000 L	1,93 <sup>E8</sup> UFC/ml
Formulation	5,78 <sup>E8</sup> UFC/ml
Matière sèche en fin de culture	3,41 g/l
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	301,54 kg
Contamination	non
Production acceptable	Oui
Renseignements sur la production	- La quantité de mélasse a été augmentée étant donné sont faible taux de saccharose. - La biomasse a été centrifugée et formulée. - La formulation a été mélangée dans une cuve à lait. - De la glace a été ajoutée pour diminuer la température de la formulation.
<b>Description:</b>	
Lot	FW91
Dates de production	27/11/2002 au 29/11/2002
Lieu de production	CWBI, Liège, Belgique (pour Agrostar) Fermenteur: 100 litres Gourdon-Biolafite 2000 litres LSL Biolafite S.A.
Objectifs de la production	- Produire de la biomasse
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture fiole	3,28 <sup>E8</sup> UFC/ml
Fin de culture 100 L	7,60 <sup>E7</sup> UFC/ml
Fin de culture 2000 L	2,0 <sup>E8</sup> UFC/ml
Formulation	7,50 <sup>E8</sup> UFC/ml
Matière sèche en fin de culture	----
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	305,46 kg
Contamination	non
Production acceptable	Oui
Renseignements sur la production	- La quantité de mélasse a été augmentée étant donné sont faible taux de saccharose. - De la glace a été ajoutée pour diminuer la température. - La formulation a été mélangée dans une cuve à lait et formulée dans cette même cuve. - La T de la formulation est demeurée sous 10°C.

**Tableau 38.** Bilan des comptes cellulaires sur les formulations au CWBI

<b>Lots</b>	<b>Méthode employée</b>	<b># jours au congélateur</b>	<b># de jours subséquent à 4°C</b>	<b>Date du compte</b>	<b>Compte cellulaire (CFU/ml)</b>
FW79	Surface count	0	1	1/11/02	5,73 <sup>E8</sup>
			4	4/11/02	5,95 <sup>E7</sup>
FW79	Surface count	5	0	5/11/02	4,10 <sup>E8</sup>
FW87	Surface count	0	1	10/11/02	3,03 <sup>E8</sup>
FW90	Surface count	0	1	23/11/02	5,78 <sup>E8</sup>
		0	4	26/11/02	7,75 <sup>E6</sup>
FW90	Surface count	4	0	26/11/02	5,98 <sup>E8</sup>
FW91	Surface count	0	1	30/11/02	7,50 <sup>E8</sup>

**Remarque :** Les étalements sur un milieu gélosé ou « Surface Count » ont été réalisés sur 2 tubes différents.

## Productions chez Lallemand

Tableau 39. Résumés des productions chez Lallemand

<b>Description:</b>	
Lot	Spla/1
Dates de production	21/1/2003 au 22/1/2003
Lieu de production	IRB, Montréal (avec Lallemand) Fermenteur: 30 litres
Objectifs de la production	- Évaluation du matériel (fermenteur et centrifugeuse). - Identifier les paramètres de la culture.
<b>Culture en fermenteur</b>	
Informations pertinentes	- Il est difficile de stériliser adéquatement le fermenteur: Il y a des valves de vapeur et la valve de prise d'échantillons qui ne fonctionnent pas. Beaucoup de condensats reviennent dans le milieu suite à la stérilisation. Le manomètre ne fonctionne pas bien. La pression s'ajuste difficilement. - La température a monté à 34°C - Contamination par des bacilles après 18h. - L'inoculation doit se faire en enlevant un bouchon sur le dessus du fermenteur. - Il n'y a pas de sonde d'oxygène de disponible.
<b>Résultats</b>	
Contamination	Oui
Production acceptable	Non
Facteur à modifier	Désinfecter adéquatement le fermenteur avec une solution basique.

### Informations supplémentaires :

1. Il va être difficile d'utiliser la mélasse de betterave pour des productions à l'usine. La mélasse de cane serait préférable.
2. Le pH va devoir être ajusté avec du  $H_2SO_4$  et non avec du  $H_3PO_4$  afin de satisfaire aux normes environnementales en phosphore de l'usine.
3. Il va être difficile, sans une sonde à oxygène, d'optimiser les paramètres de production avec ce fermenteur.
4. À l'usine, les fermenteurs disponibles sont de type "Air-lift" ce qui est très différent des fermenteurs sur lesquels le développement du procédé a été réalisé.

**Tableau 39 (suite).** Résumés des productions chez Lallemand

<b>Description:</b>	
Lot	Spla/2
Dates de production	22/1/2003
Lieu de production	IRB, Montréal (avec Lallemand) Fermenteur: 30 litres
Objectifs de la production	---
<b>Culture en fermenteur</b>	
Informations pertinentes	- La préculture était contaminée par des bacilles. - Décontamination de la préculture. - Annulation de la production.
<b>Résultats</b>	
Contamination:	Oui
Production acceptable	Non
Facteur à modifier	- Relancer de nouveau une préculture avec la souche lyophilisée de <i>Pseudozyma flocculosa</i> .
<b>Description:</b>	
Lot	Spla/3
Dates de production	27/1/2003 au 29/1/2003
Lieu de production	IRB, Montréal (avec Lallemand) Fermenteur: 30 litres
Objectifs de la production	- Évaluation du matériel (fermenteur et centrifugeuse). - Identifier les paramètres de la culture. - Essai de la centrifugeuse.
<b>Culture en fermenteur</b>	
Informations pertinentes	- Problèmes avec la stérilisation - Contamination par des bacilles après 39h. - L'inoculation doit se faire en enlevant un bouchon sur le dessus du fermenteur. - Il n'y a pas de sonde d'oxygène de disponible. - Il semble que la culture manque d'aération. - En fin de culture: 50% de conidies. - Le milieu a été centrifugé malgré la contamination - Beaucoup de perte de biomasse lors de la centrifugation.
<b>Résultats</b>	
Contamination	Oui
Production acceptable	Non
Matière sèche	---
Facteur à modifier	Désinfecter adéquatement le fermenteur avec une solution basique.

**Informations supplémentaires :**

1. Il va être difficile de centrifuger un milieu contenant seulement 3 g/l de matière sèche.
2. Il s'agit d'une centrifugeuse à disque à débouillage continu.
3. Beaucoup de *P. flocculosa* est resté dans le fond de la centrifugeuse.

**Tableau 39 (suite).** Résumés des productions chez Lallemand

<b>Description:</b>	
Lot	Spla/4
Dates de production	29/1/2003 au 31/1/2003
Lieu de production	IRB, Montréal (avec Lallemand) Fermenteur: 30 litres
Objectifs de la production	- Évaluation du matériel (fermenteur et centrifugeuse). - Identifier les paramètres de la culture. - Essai de la centrifugeuse
<b>Culture en fermenteur</b>	
Informations pertinentes	- Problèmes avec la stérilisation - Contamination par des bacilles après 37h. - L'inoculation doit se faire en enlevant un bouchon sur le dessus du fermenteur. - Il n'y a pas de sonde d'oxygène de disponible. - Il semble que la culture manque d'aération. - En fin de culture: 70% de conidies. - Le milieu a été centrifugé malgré la contamination - Beaucoup de perte de biomasse lors de la centrifugation.
<b>Résultats</b>	
Contamination	Oui
Production acceptable	Non
Matière sèche	2,71 g/l
Facteur à modifier	Désinfecter adéquatement le fermenteur avec une solution basique

**Informations supplémentaires :**

1. Il va être difficile de centrifuger un milieu contenant seulement 3 g/l de matière sèche.
2. Il s'agit d'une centrifugeuse à disque à débordage continu.
3. Beaucoup de *P. flocculosa* est resté dans le fond de la centrifugeuse.
4. Le produit centrifugé semblait presque aussi liquide que le surnageant; la séparation n'a pas été réalisée adéquatement.

**Tableau 39 (suite).** Résumés des productions chez Lallemand

<b>Description:</b>	
Lot	Spla/5
Dates de production	10/2/2003 au 12/2/2003
Lieu de production	IRB, Montréal (avec Lallemand) Fermenteur: 30 litres
Objectifs de la production	- Évaluation du matériel (fermenteur et centrifugeuse). - Identifier les paramètres de la culture. - Augmenter la quantité d'inoculum. - Évaluer la centrifugeuse
<b>Culture en fermenteur</b>	
Informations pertinentes	- Problèmes avec la stérilisation - Aucune contamination - Inoculation avec 1,6% au lieu de 0,4% - Il n'y a pas de sonde oxygène de disponible. - Le manomètre ne donne pas la bonne valeur. - En fin de culture: 50% de conidies. - Beaucoup de perte de matériels lors de la centrifugation.
<b>Résultats</b>	
Contamination	Non
Production acceptable	Non
Matière sèche fin culture	2,65 g/l
Facteur à modifier	

**Informations supplémentaires :**

1. Il va être difficile de centrifuger un milieu contenant seulement 3 g/l de matière sèche.
2. Il s'agit d'une centrifugeuse à disque à débordage continu.
3. Beaucoup de *P. flocculosa* est resté dans le fond de la centrifugeuse.
4. La centrifugeuse n'a rien séparé. Il n'y avait pas de surnageant.

**Tableau 39 (suite).** Résumés des productions chez Lallemand

<b>Description:</b>	
Lot	Spla/6
Dates de production	13/2/2003 au 14/2/2003
Lieu de production	IRB, Montréal (avec Lallemand) Fermenteur: 30 litres
Objectifs de la production	- Évaluation du matériel (fermenteur et centrifugeuse). - Identifier les paramètres de la culture. - Augmenter la quantité d'inoculum.
<b>Culture en fermenteur</b>	
Informations pertinentes:	- Problèmes avec la stérilisation - Aucune contamination - Inoculation avec 1,6% au lieu de 0,4% - Il n'y a pas de sonde d'oxygène de disponible. - La pression a été diminuée. - L'aération n'était pas suffisante. Le problème n'était pas la pression mais me manque d'aération. Trop tard pour le modifier. - En fin de culture: peu ou pas de conidies
<b>Résultats</b>	
Contamination	Non
Production acceptable	Non
Matière sèche fin culture	---
Facteur à modifier	Aération

**Information supplémentaire :**

Sans la sonde oxygène et un manomètre adéquat, il est très difficile d'ajuster les paramètres de culture.

## Productions au CREFSIP

Tableau 40. Résumés des productions au CREFSIP

<b>Description:</b>	
Lot	Spcr/1
Dates de production	31-3-2003 au 2/4/2003
Lieu de production	CREFSIP, Pavillon Marchand, Université Laval Fermenteur de 30 L Biogénie
Objectifs de la production	- Obtenir de la biomasse pour des essais en serre - Déterminer les paramètres de culture dans le fermenteur de 30 litres
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture	$3,05^{E8}$ UFC/ml
Fin de culture	$1,18^{E8}$ UFC/ml
Formulation	$4,90^{E8}$ UFC/ml
Matière sèche en fin de culture	3,59 g/L
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	3,8 kg
Contamination	Non
Production acceptable	Oui
Renseignements sur la production	- Il a été difficile de maintenir la pression et le débit d'air constant. - Le filtre de sortie d'air devra être enlevé. - Faible survie à l'entreposage. - La formulation a été congelée en pots de 250 ml.
<b>Description:</b>	
Lot	Spcr/2
Dates de production	2/4/2003 au 4/4/2003
Lieu de production	CREFSIP, Pavillon Marchand, Université Laval Fermenteur de 30 L Biogénie
Objectifs de la production	- Obtenir de la biomasse pour des essais en serre - Déterminer les paramètres de culture dans le fermenteur de 30 litres
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture	$3,80^{E8}$ UFC/ml
Fin de culture	$2,30^{E8}$ UFC/ml
Formulation	$9,63^{E8}$ UFC/ml
Matière sèche en fin de culture	3,07 g/L
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	3,51 kg
Contamination	Non
Production acceptable	Oui
Renseignements sur la production	Le débit d'air ainsi que la vitesse d'agitation ont dû être augmentés à plusieurs reprises. - Survie à l'entreposage faible. - La formulation a été congelée à -24C en pots de 250 ml.

**Tableau 40 (suite).** Résumés des productions au CREFSIP

<b>Description:</b>	
Lot	Spcr/3
Dates de production	4/4/2003 au 6/4/2003
Lieu de production	CREFSIP, Pavillon Marchand, Université Laval Fermenteur de 30 L Biogénie
Objectifs de la production	- Obtenir de la biomasse pour des essais en serre - Valider les paramètres obtenus avec Spcr/2.
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture	5,05 <sup>E8</sup> UFC/ml
Fin de culture	4,33 <sup>E8</sup> UFC/ml
Formulation	1,50 <sup>E9</sup> UFC/ml
Matière sèche en fin de culture	3,63 g/L
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	4,03 kg
Contamination	Non
Production acceptable	Oui
Renseignements sur la production	- Très belle production. - Paramètres de cultures adéquats. - La formulation a été congelée à -24C en pots de 250 ml.
<b>Description:</b>	
Lot	Spcr/4
Dates de production	7/4/2003 au 9/4/2003
Lieu de production	CREFSIP, Pavillon Marchand, Université Laval Fermenteur de 30 L Biogénie
Objectifs de la production	- Diminuer le taux d'inoculation. - Évaluer l'effet d'un double fed-batch.
<b>Évaluation de la biomasse</b>	
Pré-culture	3,75 <sup>E8</sup> UFC/ml
Fin de culture	2,28 <sup>E8</sup> UFC/ml
Formulation	7,73 <sup>E8</sup> UFC/ml
Matière sèche en fin de culture	5,47 g/L
<b>Résultats</b>	
Quantité de formulation produite	6,79 kg
Contamination	Non
Production acceptable	Oui
Renseignements sur la production	- Très belle production. - Survie à l'entreposage faible. - Bris mécanique lors du 2 <sup>e</sup> fed-batch. - La formulation a été congelée à -24C en pots de 250 ml.

**Tableau 41.** Bilan des comptes cellulaires sur les productions au CREFSIP (photos 1 à 4)

<b>Lot</b>	<b>Méthodes employées</b>	<b># jours au congélateur</b>	<b># de jours subséquents à 4°C</b>	<b>Date des comptes</b>	<b>Comptes cellulaires</b>
Spct/1	Hémacymètre	0	0	2/4/03	Con: 7,30 <sup>E8</sup> cell./ml Hyphes: 1,46 <sup>E8</sup> cell./ml Total: 8,76 <sup>E8</sup> cell./ml
Spct/1	Surface count	0	1	3/4/03	4,90 <sup>E8</sup> UFC/ml
		0	4	6/4/03	1,90 <sup>E8</sup> UFC/ml
		0	9	11/4/03	4 <sup>E6</sup> UFC/ml
Spct/1	Surface count	187	0	6/10/2003	3,78 <sup>E7</sup> UFC/ml
<b>Lot</b>	<b>Méthodes employées</b>	<b># jours au congélateur</b>	<b># de jours subséquents à 4°C</b>	<b>Date des comptes</b>	<b>Comptes cellulaires</b>
Spct/2	Hémacymètre	0	0	4/4/03	Con.: 9,40 <sup>E8</sup> cell./ml Hyphes: 1,12 <sup>E8</sup> cell./ml Total: 1,05 <sup>E9</sup> cell./ml
Spct/2	Surface count	0	0	4/4/03	9,63 <sup>E8</sup> UFC/ml
			2	6/4/03	9,58 <sup>E8</sup> UFC/ml
			7	11/4/03	1,5 <sup>E7</sup> UFC/ml
Spct/2	Surface count	189	0	6/10/2003	2,71 <sup>E7</sup> UFC/ml
<b>Lot</b>	<b>Méthodes employées</b>	<b># jours au congélateur</b>	<b># de jours subséquents à 4°C</b>	<b>Date des comptes</b>	<b>Comptes cellulaires</b>
Spct/3	Hémacymètre	0	0	6/4/03	Con.: 1,41 <sup>E9</sup> cell./ml Hyphes: 7,80 <sup>E7</sup> cell./ml Total: 1,48 <sup>E9</sup> cell./ml

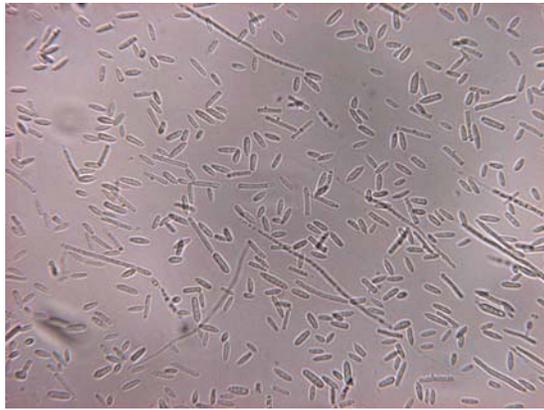
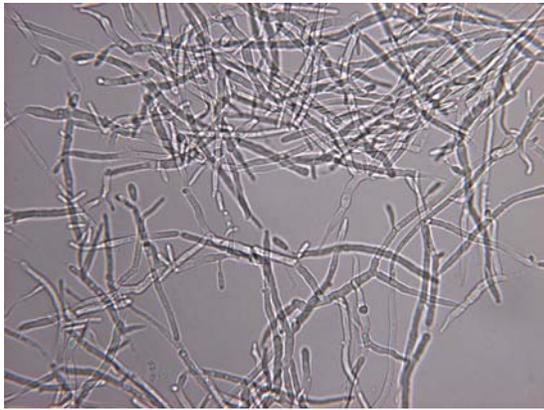
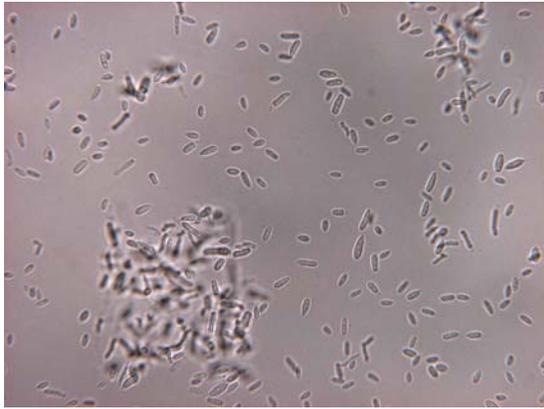
**Tableau 41 (suite).** Bilan des comptes cellulaires sur les productions au CREFSIP

Lot	Méthodes employées	# jours au congélateur	# de jours subséquents à 4°C	Date des comptes	Comptes cellulaires
Spcr/3	Surface count	0	0	6/4/03	1,50 <sup>E9</sup> UFC/ml
			5	11/4/03	9,30 <sup>E8</sup> UFC/ml
			8	14/4/03	5,08 <sup>E8</sup> UFC/ml
			11	17/4/03	2,40 <sup>E8</sup> UFC/ml
Spcr/3	Surface count	191	0	6/10/03	6,87 <sup>E8</sup> UFC/ml
Lot	Méthodes employées	# jours au congélateur	# de jours subséquents à 4°C	Date des comptes	Comptes cellulaires
Spcr/4	Hémacymètre	0	0	9/4/03	Con.: 1,04 <sup>E9</sup> cell./ml Hyphes: 5,00 <sup>E7</sup> cell./ml Total: 1,09 <sup>E9</sup> cell./ml
Spcr/4	Surface count	0	0	9/4/03	7,73 <sup>E8</sup> UFC/ml
			2	11/4/03	7,58 <sup>E8</sup> UFC/ml
			5	14/4/03	4,33 <sup>E8</sup> UFC/ml
			8	17/4/03	1,18 <sup>E8</sup> UFC/ml
Spcr/4	Surface count	194	0	6/10/03	3 <sup>E8</sup> UFC/ml

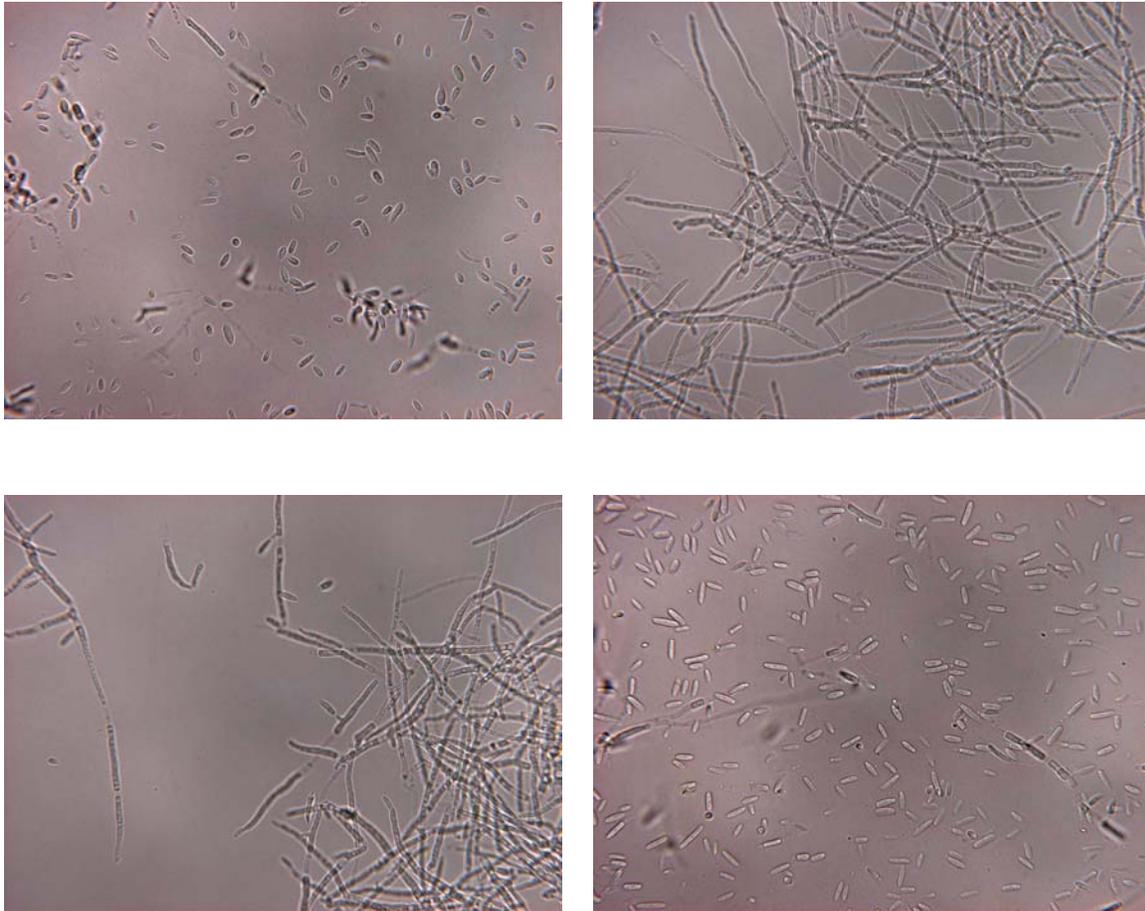
**Remarque :** Les étalements sur un milieu gélosé ou « Surface Count » ont été réalisés sur 2 tubes différents.



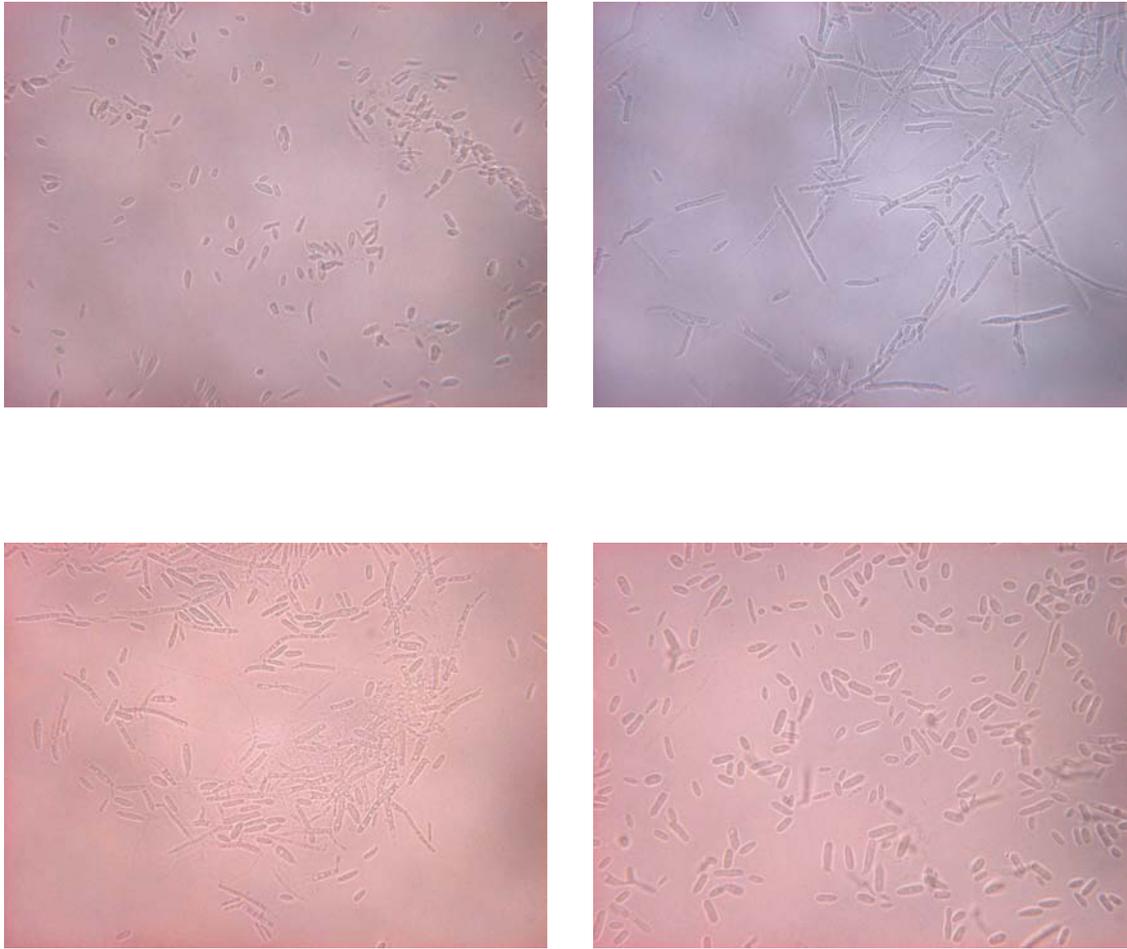
**Photo 1.** Culture de *Pseudozyma flocculosa* lors de la production Spcr/1 au CREFSIP après **a)** 3h, **b)** 21h, **c)** 29h, **d)** 32h, **e)** 36h et **f)** 46h de croissance. Grossissement 400x.



**Photo 2.** Culture de *Pseudozyma flocculosa* lors de la production Spcr/2 au CREFSIP au sein de **a)** l'inoculum et après **b) 12h, c) 17h et d) 37h** de croissance en fermenteur. Grossissement 400x



**Photo 3.** Culture de *Pseudozyma flocculosa* lors de la production Spcr/3 au CREFSIP au sein de **a)** l'inoculum et après **b) 9h, c) 15.5h et d) 35h** de croissance en fermenteur. Grossissement 400x



**Photo 4.** *Pseudozyma flocculosa* lors de la production Spcr-4 au CREFSIP au sein de a) l'inoculum et après b) 22.5h, c) 27.5h et d) 46h de croissance en fermenteur. Grossissement 400x

#### Durée de conservation du biofongicide Sporodex

Lots	Nombre de jours à 4°C <sup>1</sup>	UFC/ml (*1 <sup>E</sup> 8 UFC/ml)		Nombre de jours à -24°C	UFC/ml (*1 <sup>E</sup> 8 UFC/ml)
APF/3 150L	0	11.1		0	11,1
	3	9.93		12	10,7
	7	---		31	8,48
	11	2.2		60	10,5
	14	2.5		96	7,33
	---	---		163	17,6
	---	---		213	4,95
	---	---		253	3,68
	---	---		300	1,06

**Durée de conservation du biofongicide Sporodex (suite)**

<b>Lots</b>	<b>Nombre de jours à 4°C<sup>1</sup></b>	<b>UFC/ml (*1<sup>E</sup>8 UFC/ml)</b>		<b>Nombre de jours à -24°C</b>	<b>UFC/ml (*1<sup>E</sup>8 UFC/ml)</b>
APF/4 150L	0	11.9		0	11,9
	2	10.1		7	12
	6	4.5		54	8,58
	9	4.1		92	9,15
	13	0.18		120	9,73
	---	---		251	6
APF/5 150L	0	14.3		0	14,3
	5	2.38		11	10,6
	---	---		39	12,4
	---	---		78	11,1
	---	---		105	8,65
	---	---		145	7,25
	---	---		195	4,3
	---	---		235	4
			282	0,785	
APF/6 150L	0	12.9		0	12,9
	3	10.5		5	11,6
	5	5.13		33	11,5
	7	2.23		71	13,5
	10	1.53		99	14,5
	---	---		139	11,1
	---	---		189	8,6
	---	---		229	5,1
			276	0,95	
APF/7 150L	---	---		0	9,58
	---	---		6	14,7
	---	---		24	9,35
	---	---		63	11
	---	---		90	12,6
	---	---		130	7,1
	---	---		180	1,68
APF/9 1500L	0	8.4		0	8,4
	4	5.6		33	11
	9	1.33		69	8,4
	12	0.78		116	1,85
APF/11-a 150L	1	8.6		0	8.6
	5	3.4		356	0.175
	8	0.69		---	---
	12	0.028		---	---

**Durée de conservation du biofongicide Sporodex (suite)**

<b>Lots</b>	<b>Nombre de jours à 4°C<sup>1</sup></b>	<b>UFC/ml (*1<sup>E</sup>8 UFC/ml)</b>		<b>Nombre de jours à -24°C</b>	<b>UFC/ml (*1<sup>E</sup>8 UFC/ml)</b>
APF/11-b 150L	1	9.4		0	9.4
	5	5.4		356	1.83
	8	2.7		---	---
	12	0.89		---	---
Spcr/1 30L	1	4.9		0	4.9
	4	1.9		187	0.378
	9	0.04		---	---
Spcr/2 30L	0	9.63		0	9.63
	2	9.58		189	0.271
	7	0.15		---	---
Spcr/3 30L	0	15		0	15
	5	9.30		191	6.87
	8	5.08		---	---
	11	2.4		---	---
Spcr/4 30L	0	7.73		0	7.73
	2	7.58		194	3
	5	4.33		---	---
	8	1.18		---	---

<sup>1</sup> : La période d'évaluation du nombre UFC à 4°C débute au jour 0 de la formulation.

**FORMULATION DE SPORODEX****Évaluation de la matière sèche**

1. Prélever 3 ml de la culture et le placer dans un tube conique à centrifuger « Sarsted »
2. Placer les tubes dans la centrifugeuse de table (IEC model CL centrifuge) à #7 pendant 10 minutes.
3. Enlever le surnageant et ajouter de l'eau distillée pour porter le poids à 9 g (avec le bouchon).
4. Agiter et centrifuger de nouveau 10 minutes à #7.
5. Enlever le surnageant, ajouter 1 ml d'eau distillée et agiter.
6. Peser avec la balance de précision des tubes à essai en verre identifiés et secs (minimum 1h au four vacuum à 22 Psi et 60°C) (poids tare).
7. Transférer le contenu des tubes à centrifuger dans les tubes à essai et rincer ces derniers avec 1 ml d'eau distillée.
8. Placer les tubes à essai dans le four vacuum à 60°C et 22 Psi de vacuum pour une durée minimum de 24h.
9. Placer les tubes à essai dans un dessiccateur et les peser à nouveau sur la balance de précision lorsqu'ils sont refroidis (poids sec).
10. La quantité de matière sèche est obtenue par la formule suivante :
11. Quantité de matière sèche (g/L) = 
$$\frac{\text{Poids sec (g)} - \text{Poids tare (g)}}{0.003 \text{ L}}$$

**Évaluation du nombre de conidies, d'hyphes et du pourcentage de sporulation par le compte à l'hémacymètre**

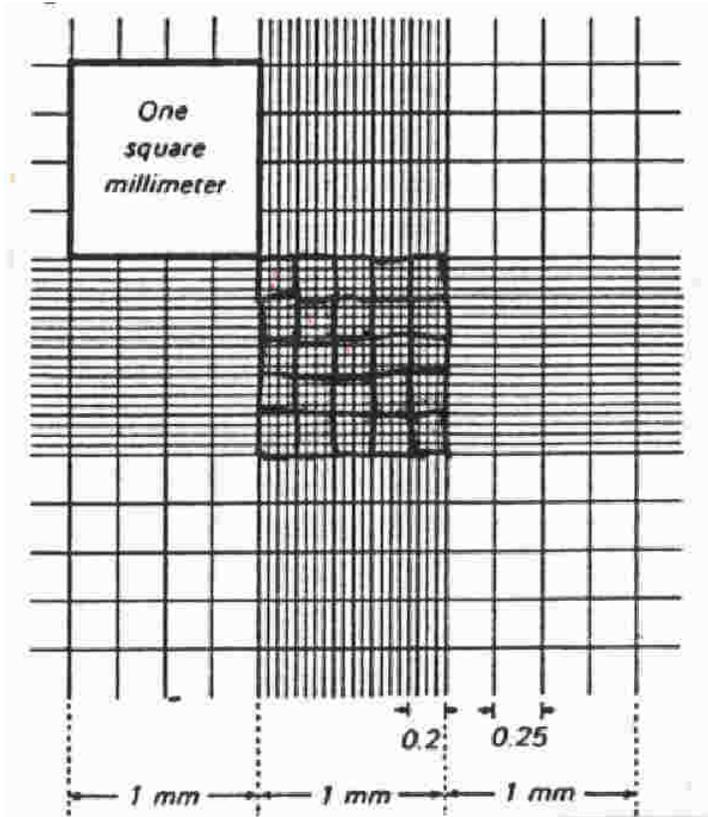
Les cellules fongiques peuvent être dénombrées directement au microscope à l'aide d'une cellule de numération ou hémacymètre. Ce comptage permet de calculer le nombre total de cellules dans un milieu et d'en déterminer la proportion de conidies et d'hyphes. Toutefois, ce décompte ne permet pas de distinguer les cellules vivantes des mortes. Il ne peut également être utilisé pour des cultures de microorganismes filamenteux tel que de jeunes cultures de *P. flocculosa*. Cette technique est donc intéressante au terme de la culture de *P. flocculosa* afin de déterminer le pourcentage de sporulation ainsi que le nombre total de cellules pour des calculs de mortalité et de taux d'inoculation.

Dans une culture de *P. flocculosa*, on retrouve différentes formes de cellules. En effet, il y a les conidies (cellules ovoïdes de survie), les bâtonnets (cellules cylindriques de la même taille ou un peu plus grande que les conidies) et les hyphes (cellules allongées, ramifiées ou non). Lors du comptage à l'hémacymètre, les bâtonnets et les hyphes sont comptés comme des hyphes. En effectuant le rapport de conidies sur le nombre total de cellules, il est possible de déterminer le pourcentage de sporulation.

**Procédure :** 2 x 1 ml d'une culture de *P. flocculosa* sont prélevés et trois dilutions (1/10) dans de l'eau peptonnée (4.5 g NaCl, 1.5 g peptone water et 2 ml de tween 80 dans 1 L d'eau distillée) sont réalisées. Bien agiter et remplir les deux cotés de l'hémacymètre à l'aide d'une pipette pasteur avec la dernière dilution des deux séries respectivement. Faire le décompte des conidies et des hyphes pour les 4 carrés du tour et celui du centre pour les deux cotés de l'hémacymètre (Figure 2). Par la suite, le nombre de cellules se calcule par la formule suivante :

$$\text{Cellules/ml} = \frac{\text{Nombre total de cellules}}{\text{Nbre de carrés (10)} * \text{aire comptée (0.01 cm}^2) * \text{profondeur (0.01 cm)} * \text{dilution (10}^{-3})}$$

$$\text{Ce qui revient à : Cellules/ml} = \frac{\text{Nombre total de cellules}}{\text{Nombre de carrés}} * 10^4 * 10^3$$



**Figure 2.** Schéma d'un hémacymètre (tiré de [www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemacytometer.htm](http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemacytometer.htm))

### Dénombrement des UFC (Unité Formatrice de Colonie) sur un milieu gélosé ou « surface count »

Le dénombrement du nombre de propagules vivantes de *P. flocculosa* peut être réalisé par un étalement sur un milieu gélosé. En effet, les colonies qui vont se développer à la surface de la gélose correspondent à ce qui est réellement vivant au sein du milieu comparativement au compte à l'hémacytètre. Toutefois, ce dénombrement ne permet pas de différencier les conidies des hyphes, des bâtonnets et des amas d'hyphes. Une colonie qui se développe sur la gélose est alors considérée comme une Unité Formant des Colonies (UFC).

**Procédure :** Pour réaliser un dénombrement sur milieu gélosé, il est important d'effectuer une série de dilutions (1/10) afin d'obtenir entre 10 et 100 colonies à la surface de la gélose. Pour ce faire, 1ml d'une culture ou de la formulation du biofongicide Sporodex est placé dans un tube contenant 9 ml d'eau peptonnée (4.5 g/l NaCl, 1.5 g/l peptone water et 2 ml/l tween 80 dans de l'eau distillée) pour former la première dilution. Généralement, 6 dilutions (1/10) sont nécessaires. Il est important de bien agiter les tubes

avant chaque prélèvement. Cent µl de la dernière dilution sont alors placés à la surface de la gélose PDA sur un plat de pétri et étendus à l'aide d'un tube de verre recourbé. Les plats de pétri sont alors placés dans un incubateur à 25°C et le dénombrement est réalisé après 48h. En connaissant les dilutions effectuées, il est alors possible d'exprimer le nombre de colonies en UFC/ml.

### Réalisation d'une courbe de croissance

#### Procédure :

**A) Prélèvement :** Placer 4 ml de la culture, prélevée dans chacune des fioles, dans des tubes coniques à centrifuger propres (Tcentri). Agiter et prélever 1 ml de chacun de ces tubes et les regrouper par traitement dans un nouveau tube conique (Tsurface). Placer les tubes (Tsurface) à 4°C.

**B) pH :** Prendre le pH dans chacun des tubes "Tcentri" à la température de la pièce.

**C) Évaluation de la matière sèche :** Suivre le protocole

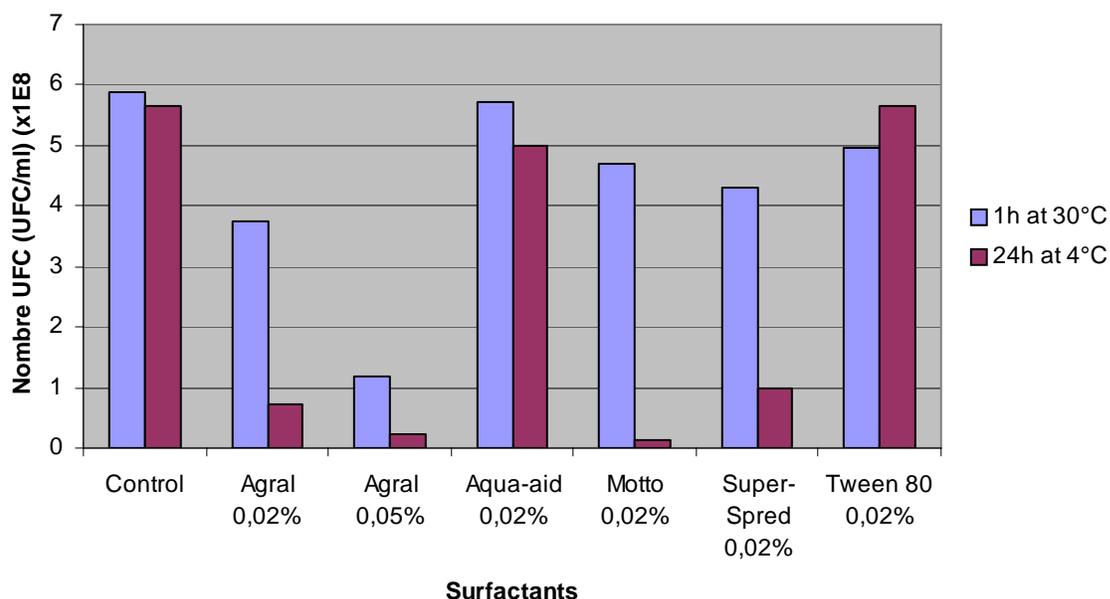
**D) Dénombrement sur un milieu gélosé ou « surface count »:** Suivre le protocole

**E) Observations au microscope :** Placer une goutte du contenu des tubes (Tsurface) sur une lame et l'observer à 400x au microscope. Prendre des photos au microscope.

### Évaluation de la compatibilité de *Pseudozyma flocculosa* avec différents surfactants

Les résultats démontrent que les surfactants affectent à différents niveaux l'agent de lutte *P. flocculosa* (fig. 3). Après 1 heure à 30°C, la viabilité de ce dernier n'est que légèrement affectée par l'Aqua-aid, le motto, le Super-Spred et le tween 80 alors que l'Agral à 0.05% réduit cette dernière de plus de 80%. Toutefois, la situation est très différente après 24h à 4°C. En effet, dans ce cas-ci, seuls l'Aqua-aid et le Tween 80 semblent ne pas affecter l'agent de lutte alors que les autres affectent sa viabilité à plus de 80%.

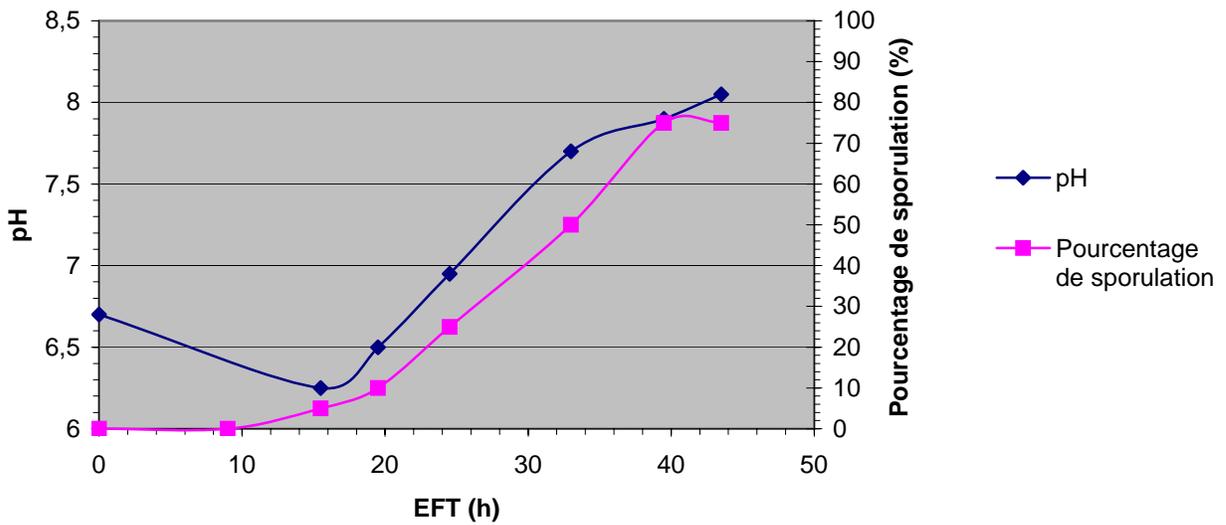
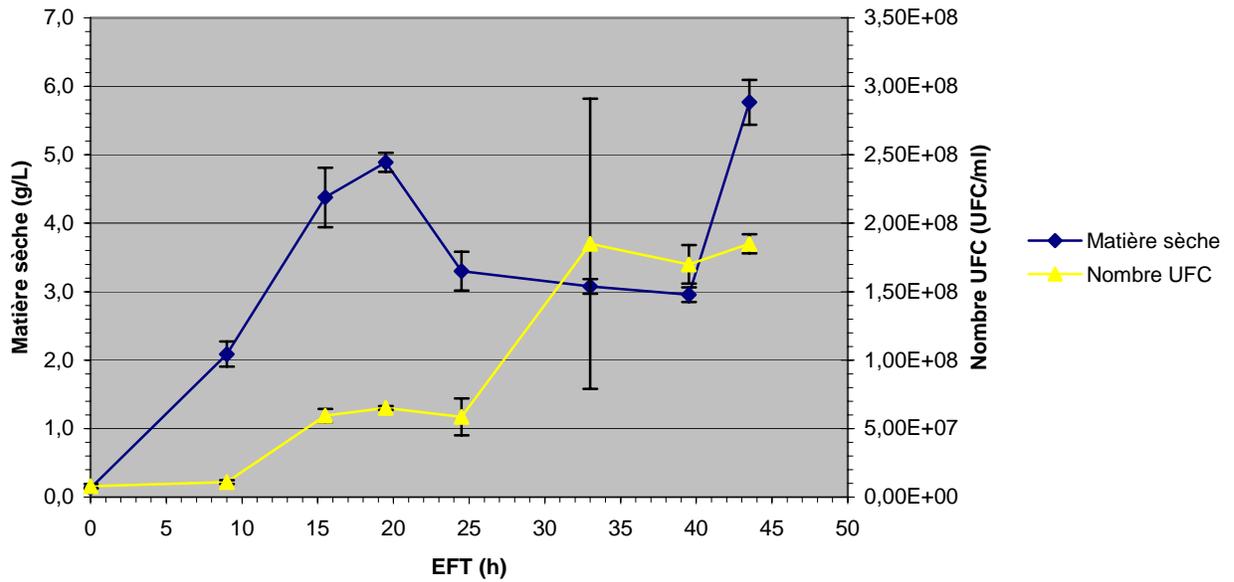
En règle générale, les producteurs vont mélanger dans l'eau le biofongicide Sporodex et le surfactant immédiatement avant de pulvériser les plants. Les deux produits vont alors être en contact qu'un très court laps de temps. Toutefois, il peut arriver dans certains cas que le mélange reste en contact une nuit entière. Cette situation va devoir être évitée étant donné le risque important de perte de viabilité de *P. flocculosa*.



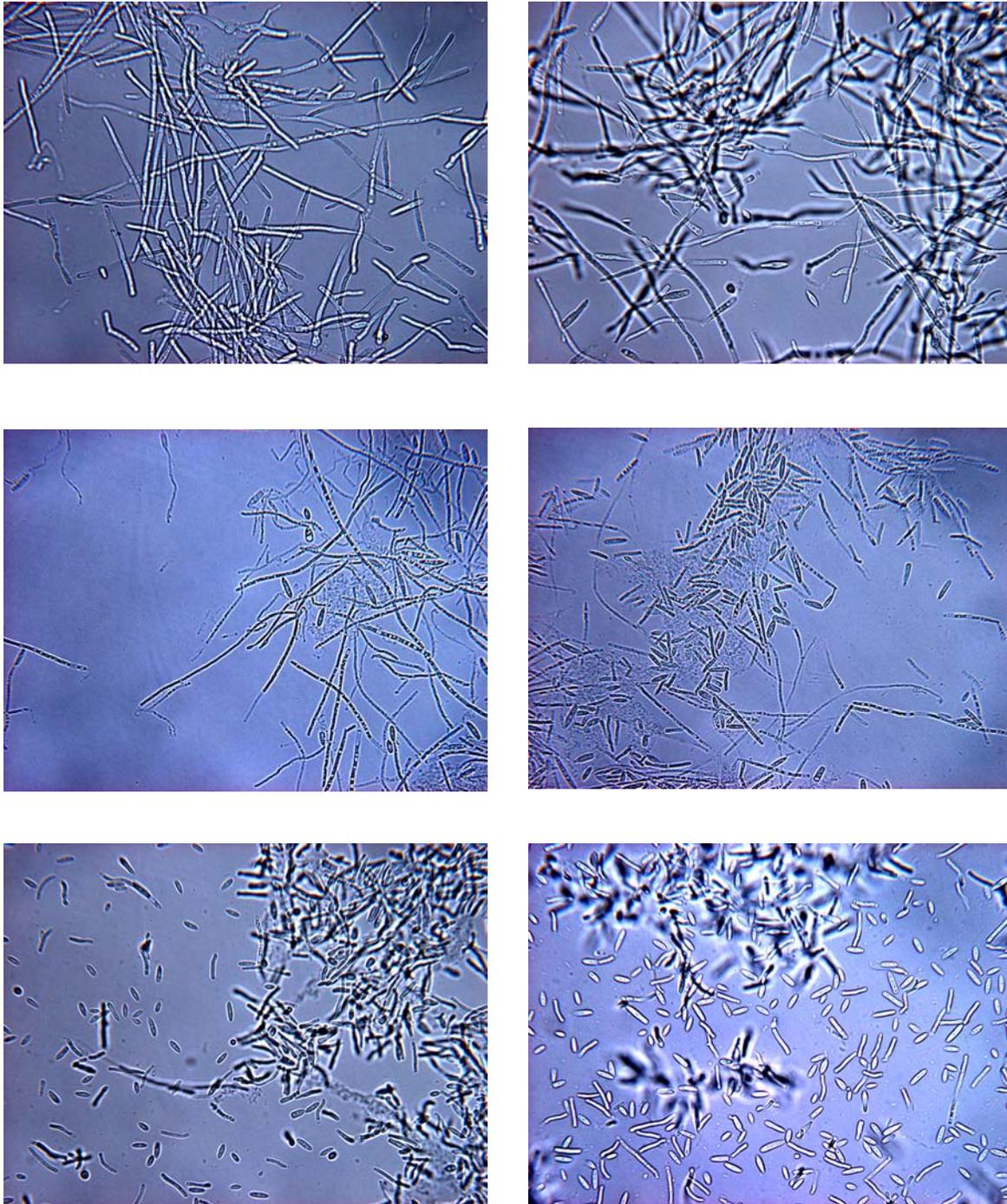
**Figure 3.** Compatibilité de *Pseudozyma flocculosa*, l'agent actif du biofongicide Sporodex, avec différents surfactants.

### Courbe de croissance de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM0.5P0.5D

Suite à l'observation des graphiques, il ressort qu'après environ 38 heures, le nombre UFC et le pourcentage de sporulation atteignent un plateau (fig. 4). La culture n'est donc pas prête à être utilisée avant ce moment. De plus, il est important de mentionner que le taux de matière sèche diminue avec la sporulation de *P. flocculosa*. Il utilise donc probablement ses réserves pour sporuler. Toutefois, la dernière donnée de matière sèche semble erronée car jamais une telle augmentation n'a été observée lors d'expériences subséquentes. Finalement, le champignon a formé, au cours de sa croissance, de gros amas de longs hyphes qui ont ensuite sporulé (photo 5). La sporulation a engendré des débris cellulaires qui se sont dégradés par la suite.



**Figure 4.** Évolution en fonction du temps a) de la matière sèche et du nombre UFC et b) du pH et du pourcentage de sporulation d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM0.5P0.5D.



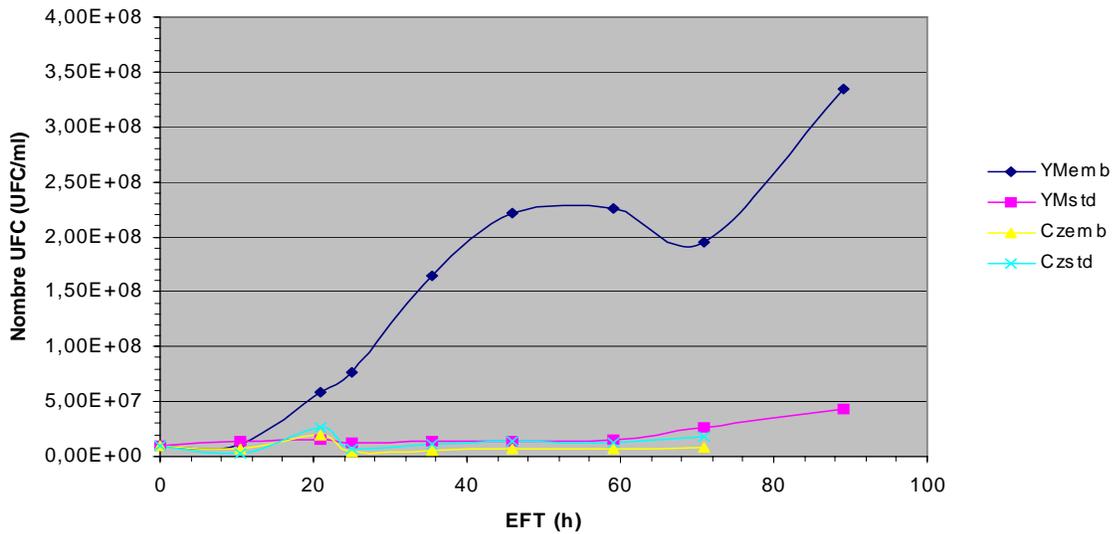
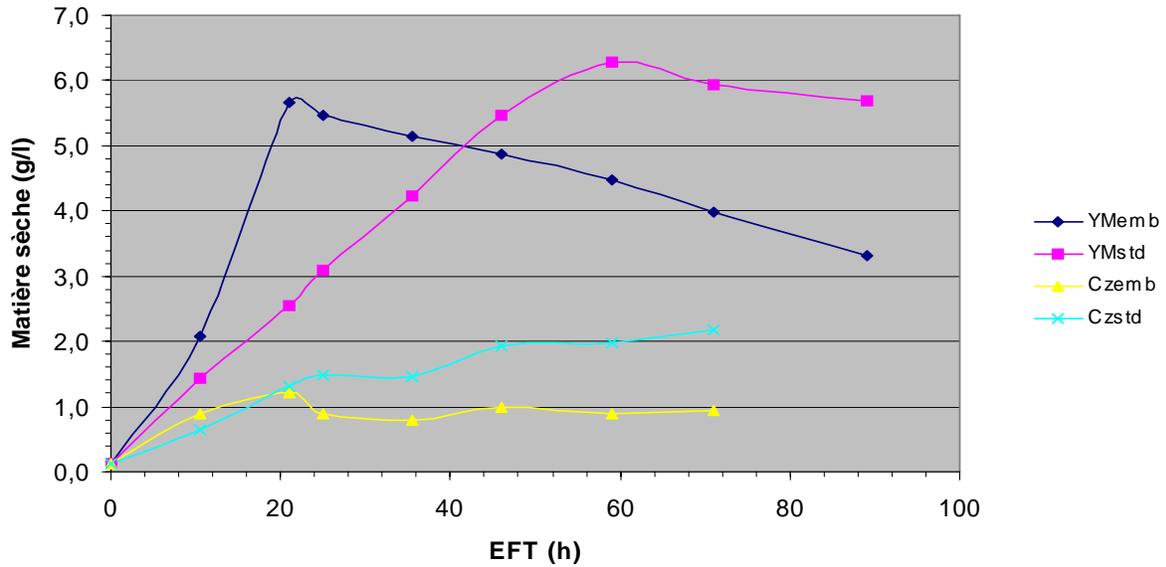
**Photo 5.** Culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM0.5P0.5D après a) 15,5h, b) 19,5h, c) 24,5h, d) 33h, e) 39,5h et f) 43,5h de croissance. Grossissement 400x.

## **Courbe de croissance de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM1,5PD**

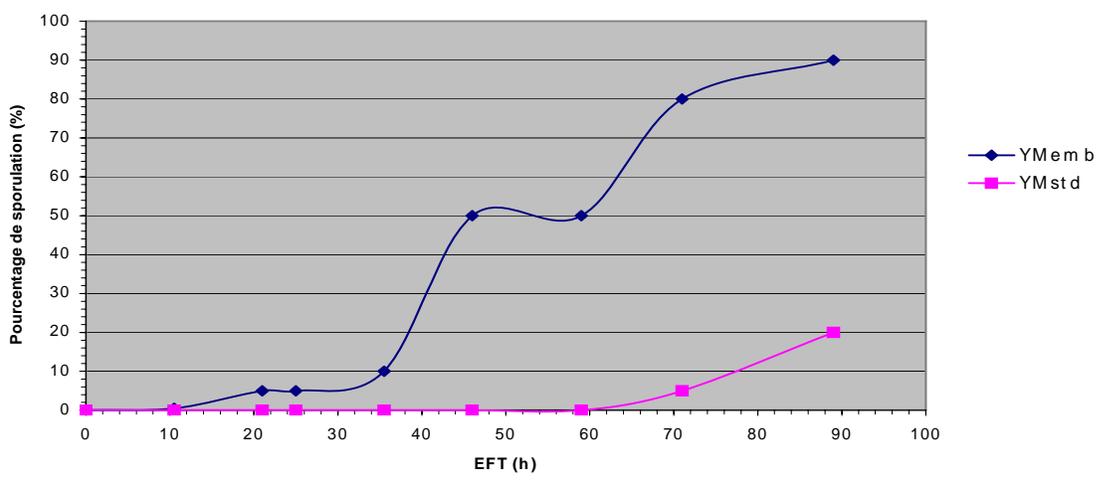
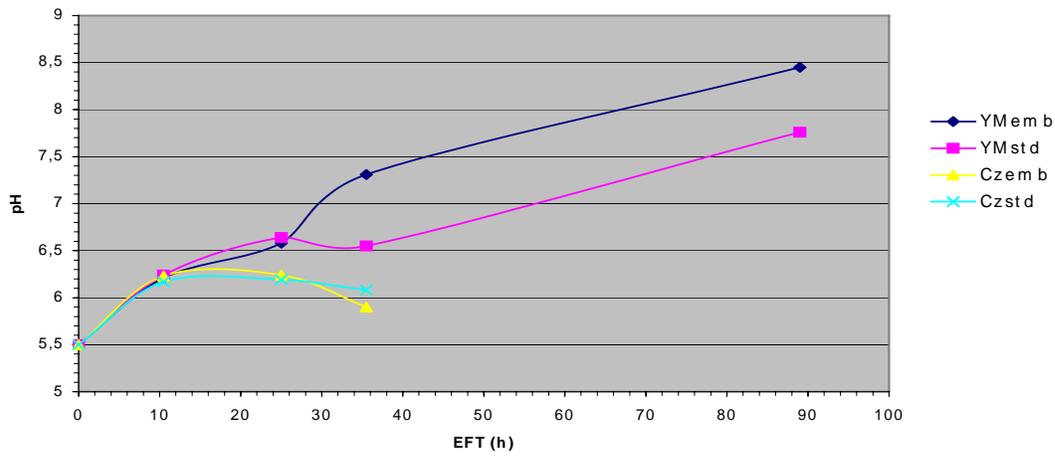
Il ressort tout d'abord de l'étude de ces résultats que le milieu Czapek ne permet pas à *P. flocculosa* de se développer adéquatement (fig. 5 et 6). En effet, la matière sèche n'atteint que 2 g/l comparativement à 6 g/l pour le milieu YM1,5PD. De plus, dans ce milieu, le champignon n'a pas sporulé et les hyphes se sont dégradés très rapidement. Ce milieu ne pourra donc pas être utilisé pour la croissance de *P. flocculosa*. Il serait cependant intéressant de vérifier quelle est la cause de l'inhibition dans ce milieu.

Également, il y a une grande différence entre les deux types de fioles. En effet, dans les fioles embossées, la matière sèche ainsi que le nombre UFC augmentent très rapidement comparativement aux fioles standards. Dans ces dernières, les hyphes ont manqué d'oxygène et ils ont pris l'aspect de gros hyphes bosselés et ils n'ont pas sporulés. Il sera donc impossible d'utiliser ces fioles pour des tests ultérieurs.

Finalement, tout comme lors de l'expérience précédente, la matière sèche augmente puis diminue lorsque le champignon sporule. Elle atteint 6 g/l et le nombre UFC atteint pour sa part  $3,3 \times 10^8$  UFC/ml ce qui est supérieur au milieu YM0,5P0,5D.



**Figure 5.** Évolution en fonction du temps **a)** de la matière sèche et **b)** du nombre UFC d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM1.5PD et Czapek dans des fioles embossées et standards.



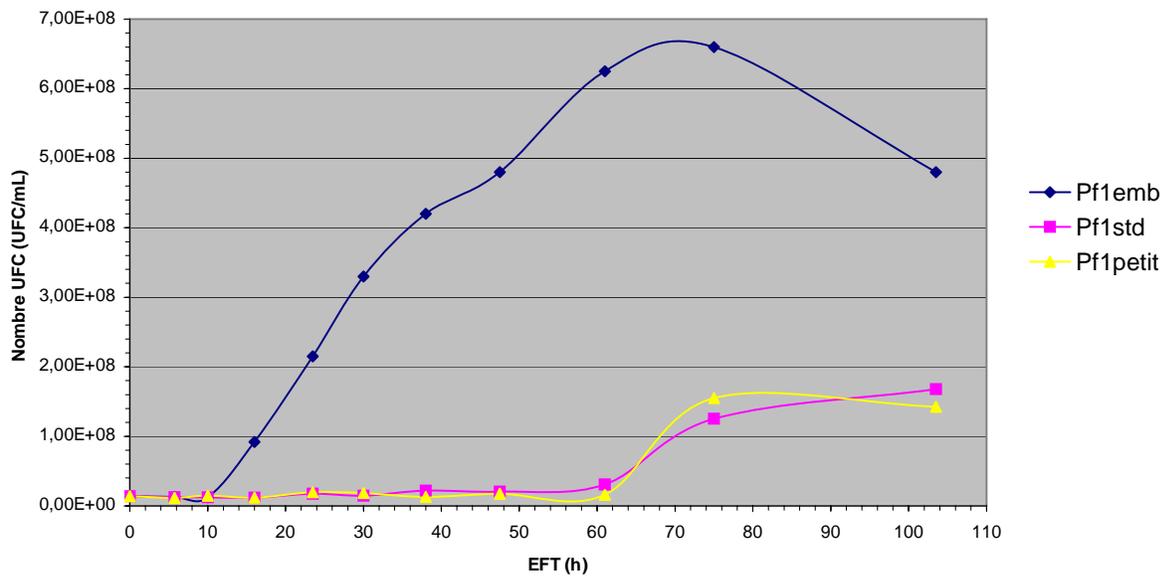
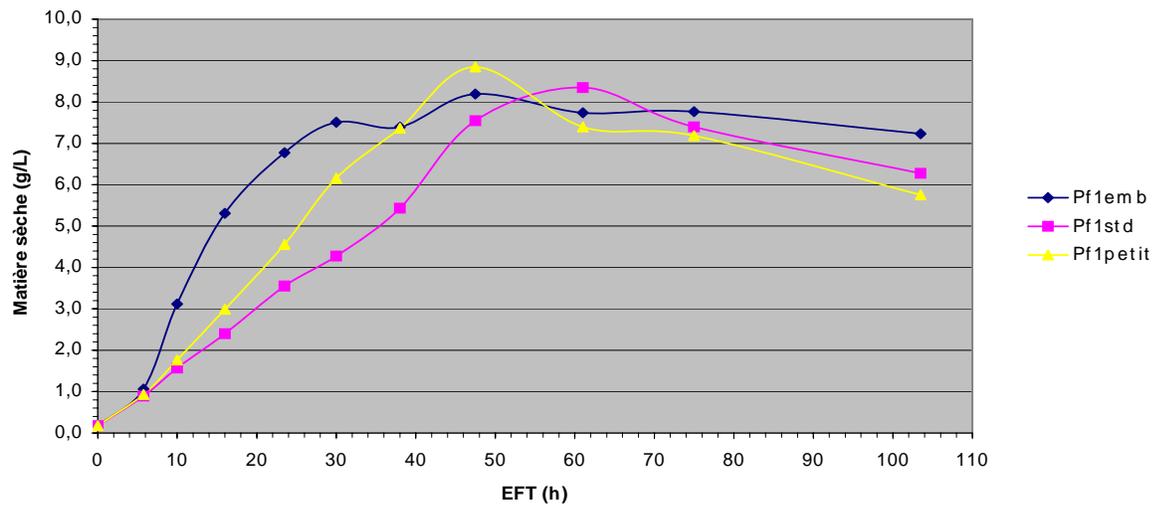
**Figure 6.** Évolution en fonction du temps a) du pH et b) du pourcentage de sporulation d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM1.5PD et Czapek dans des fioles embossées et standards.

## **Courbe de croissance de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM1,5P1,5D**

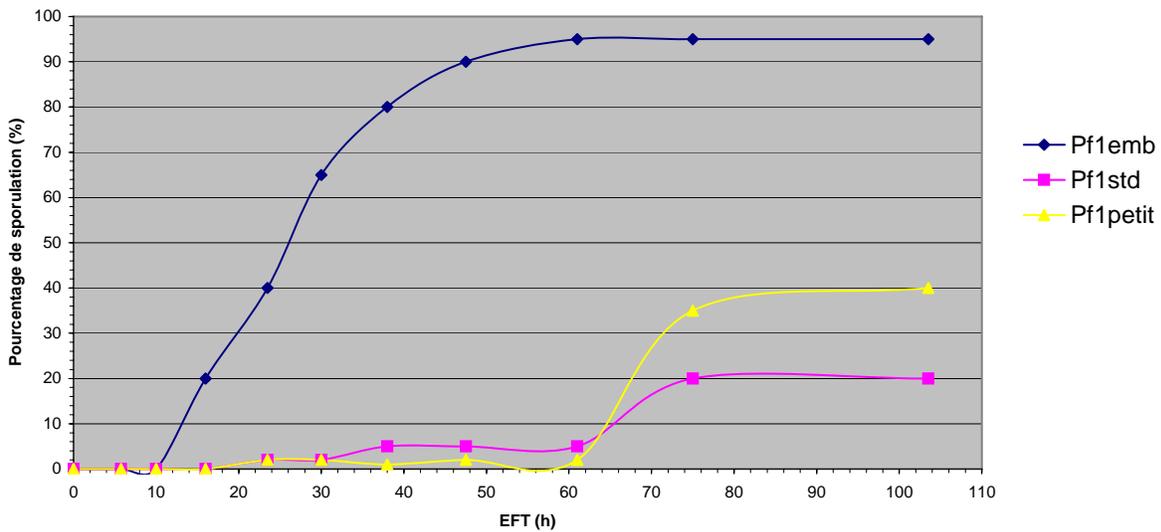
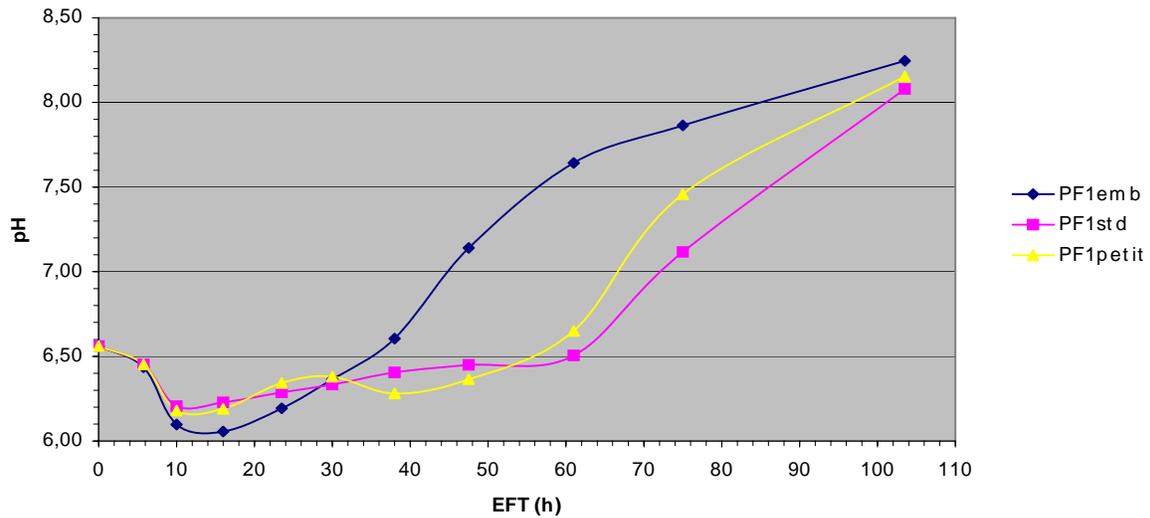
Cette expérience a permis de confirmer le fait que la croissance de *P. flocculosa* dans des fioles standards est très faible en comparaison avec des fioles embossées (fig. 7 et 8). Le taux d'aération étant un facteur important dans la croissance de ce microorganisme, il n'est pas surprenant qu'il ne se développe pas bien dans un milieu où les échanges d'air sont faibles. Dans ces conditions, les hyphes de *P. flocculosa* sont très gros et il y a peu de conidies. Pour les fioles embossées de 250 ml, il semble que le niveau d'aération soit intermédiaire entre les fioles embossées et lisses de 500 ml. Il est important de mentionner que le volume de milieu a été maintenu à 100 ml afin qu'il atteigne les embossures. Il semble donc que seules les fioles embossées de 500 ml permettent d'assurer une bonne croissance de *P. flocculosa*.

En augmentant la quantité de dextrose et de peptone dans les fioles embossées de 500 ml, la quantité de matière sèche a été augmentée jusqu'à 8 g/l (fig. 7a). Toutefois, le maximum a été atteint après 40 heures de culture alors que dans le milieu YM0,5P0,5D, il a été atteint à 20 heures. En ce qui concerne le nombre d'UFC, il a atteint une valeur très élevée de  $6,5 \times 10^8$  UFC/ml ce qui est 3 fois plus élevé que ce qui est obtenu dans le milieu YM0,5P0,5D (fig. 7b).

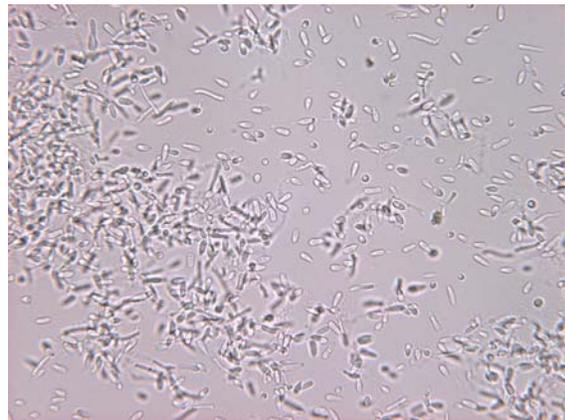
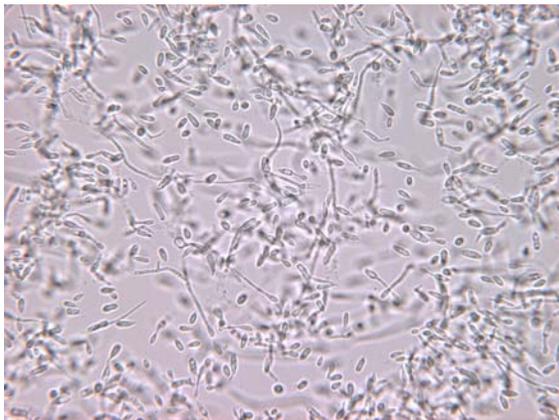
Toutefois, dans ce milieu, la morphologie de *P. flocculosa* est très différente de celle observée dans le milieu YM0,5P0,5D (photos 6 et 7). En effet, dans le milieu plus riche, il s'est formé de petits hyphes qui ont sporulés rapidement et il y avait beaucoup de bourgeonnement alors que dans le milieu plus pauvre, il y avait de grands hyphes qui ont sporulés par la suite. Le type de croissance de *P. flocculosa* est intimement relié à la quantité de carbone, d'azote et d'oxygène. Ces courbes vont alors permettre de mieux comprendre le développement du champignon dans différentes circonstances.



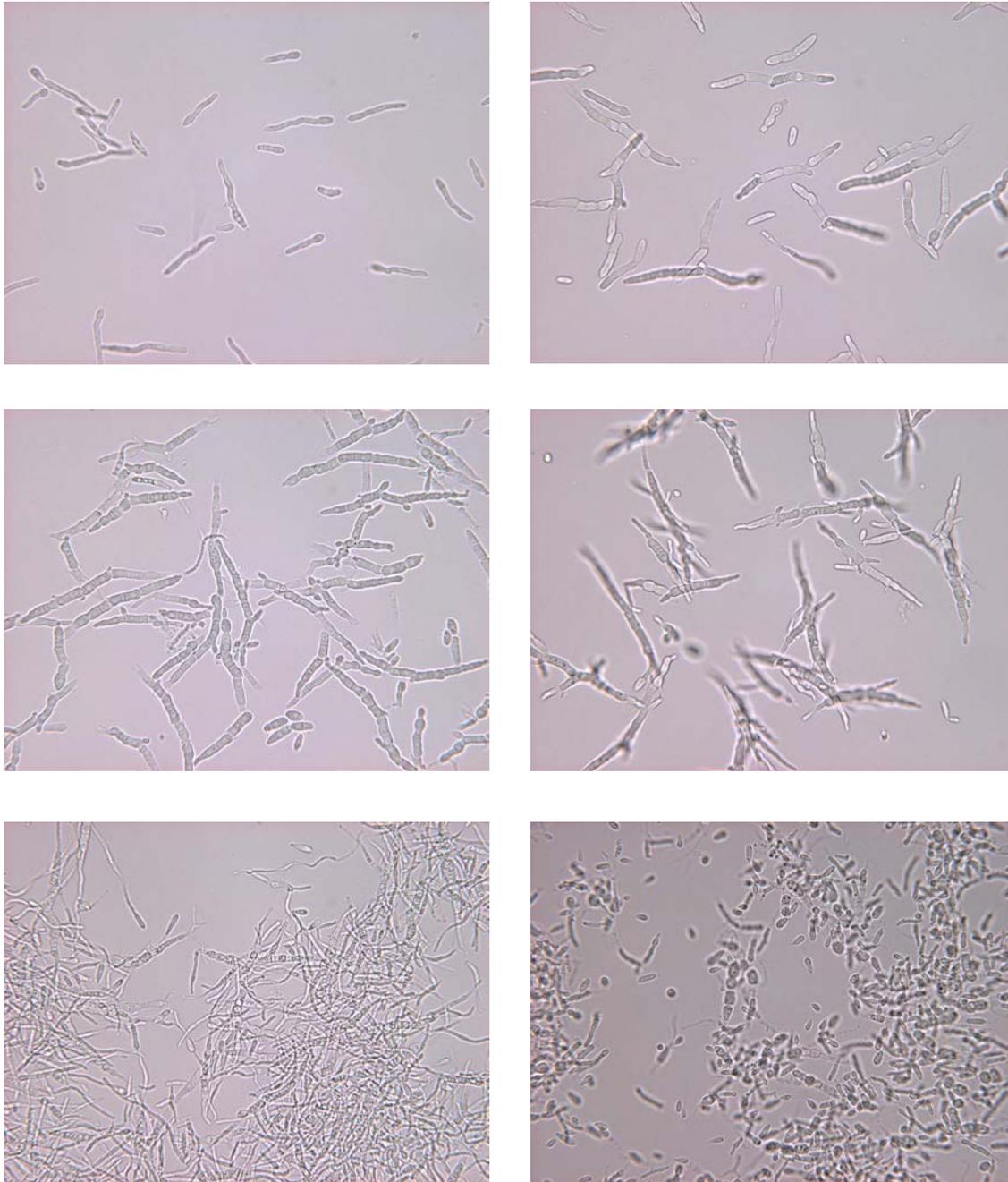
**Figure 7.** Évolution en fonction du temps a) de la matière sèche et b) du nombre d'UFC d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM1.5P1.5D dans des fioles de 500 ml embossées, de 500 ml standard et de 250 ml embossées.



**Figure 8.** Évolution en fonction du temps a) du pH et b) du pourcentage de sporulation d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM1.5P1.5D dans des fioles de 500 ml embossées, de 500 ml standard et de 250 ml embossées.



**Photo 6.** *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM1.5P1.5D dans des fioles embossées après **a)** 6h, **b)** 10h, **c)** 23,5h, **d)** 30h, **e)** 38h et **f)** 61h de croissance. Grossissement 400x.



**Photo 7.** *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu YM1.5P1.5D dans des fioles standards après a) 6h, b) 23,5h, c) 30h, d) 38h, e) 61h et f) 103,5h de croissance. Grossissement 400x.

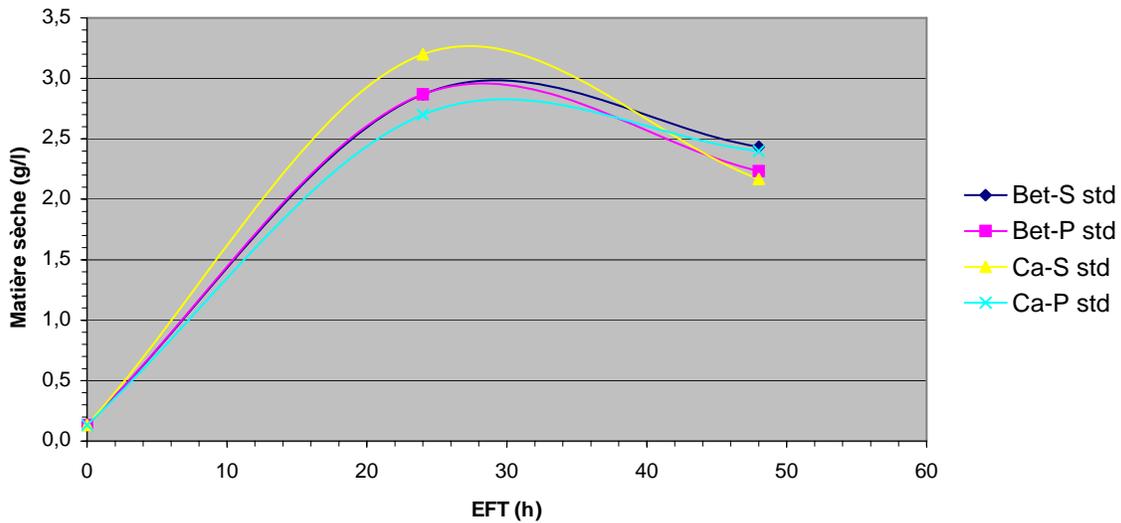
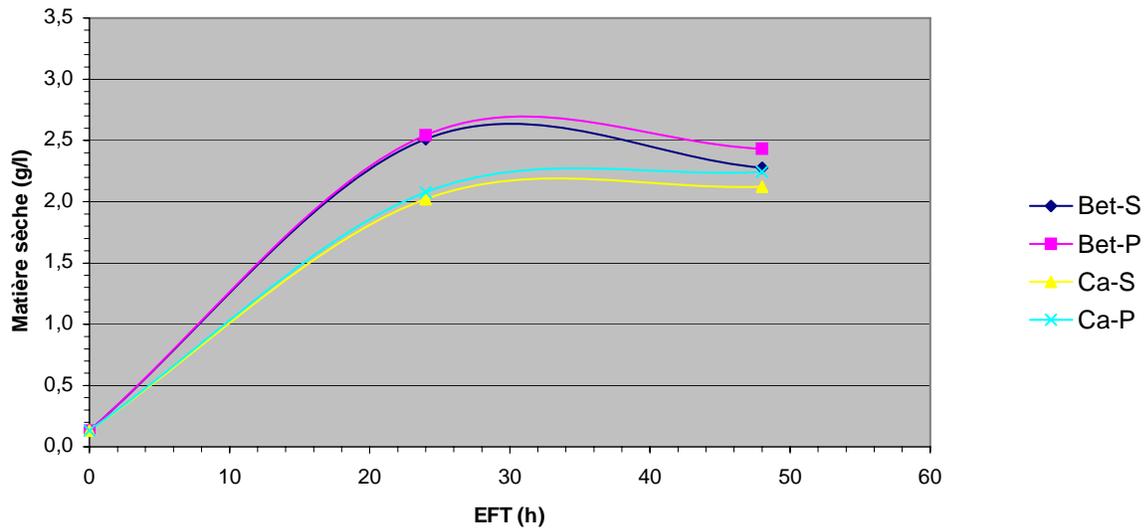
## Importance du type de mélasse et de la source d'acide - essai 1

En analysant les résultats, il apparaît tout d'abord qu'il n'y a que très peu de différences entre les deux types de mélasse et d'acide relativement à la croissance de *P. flocculosa* en fioles embossées. Les données de matières sèche (fig. 9a), du nombre UFC (fig. 10a) et du pH (fig. 11a) ne démontrent que peu de différences. Il semble donc que peu importe le type de mélasse et d'acide, la culture de *P. flocculosa* serait équivalente. Toutefois, il n'a pas été possible de mesurer le degré brix et la composition en sucres des deux types de mélasse. Cette donnée pourrait être intéressante afin d'ajuster la quantité de mélasse en fonction de cette mesure.

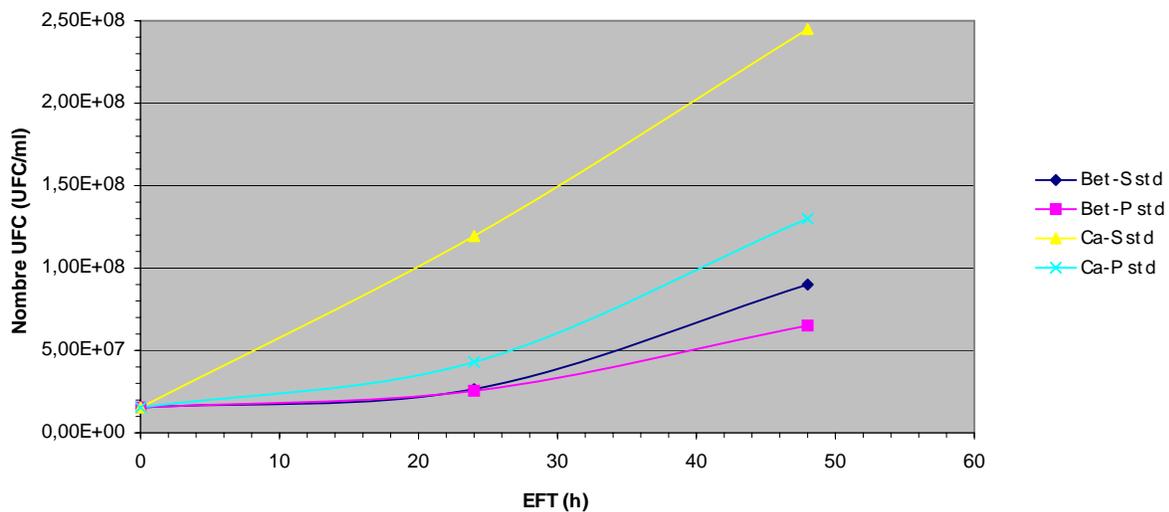
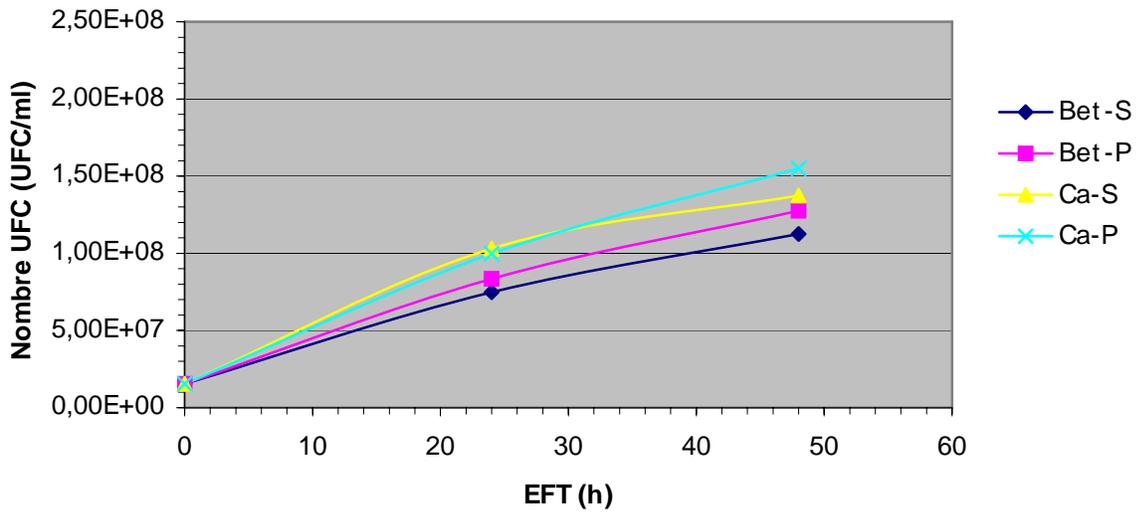
Il est important de mentionner qu'étant donné que seulement deux prélèvements ont été réalisés (22 et 47 heures), il est impossible d'établir avec précision la courbe de croissance. Les données peuvent être comparées entre elles à une heure fixe mais aucune relation ne peut être établie entre les heures. Toutefois, pour l'essai 2, une quantité supérieure de prélèvements ont été effectuées ce qui permet de réaliser une courbe de croissance pour chaque traitement.

Pour les fioles standards, la situation est différente de ce qui avait été observée avec les milieux YM1,5PD et YM1,5P1,5D. En effet, dans ces milieux, de grandes différences ont été observées entre les fioles embossées et standards, alors que dans ce cas-ci, il y a moins de différences. Dans les fioles embossées et standards, la matière sèche (fig. 9b) était au environ de 2,3 g/l en fin de culture. Elle a même atteint un niveau plus élevé dans les fioles standards. Le nombre d'UFC (fig. 10b) a augmenté plus lentement dans les fioles standards que dans les embossées à l'exception du traitement Ca-S. Il semble donc que le manque d'oxygène ait été moins nuisible dans ce type de milieu que dans les précédents (YM1.5PD et YM1.5P1.5D). Des essais supplémentaires devraient toutefois être réalisés pour confirmer ces résultats.

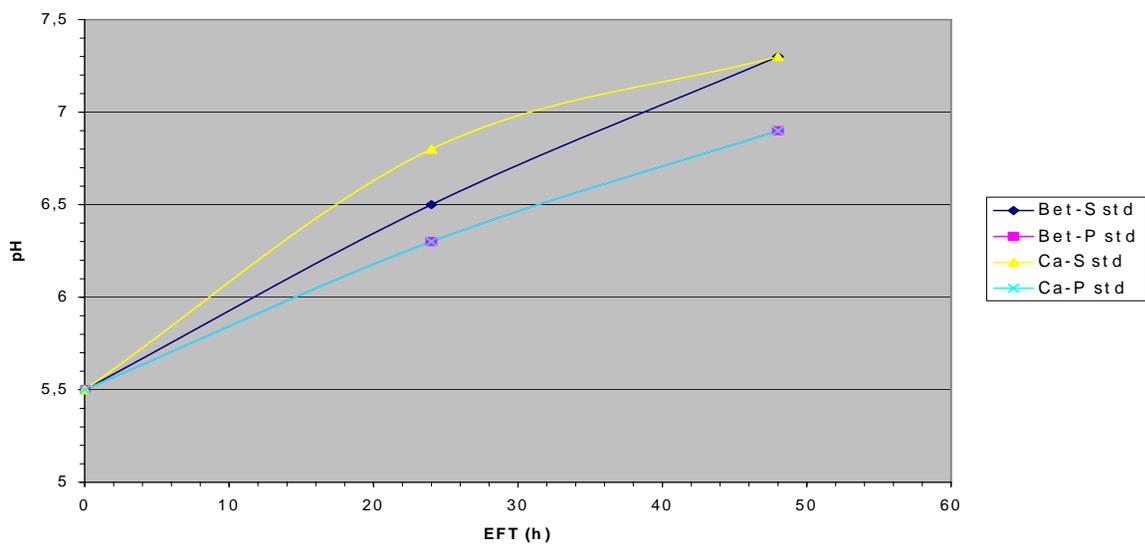
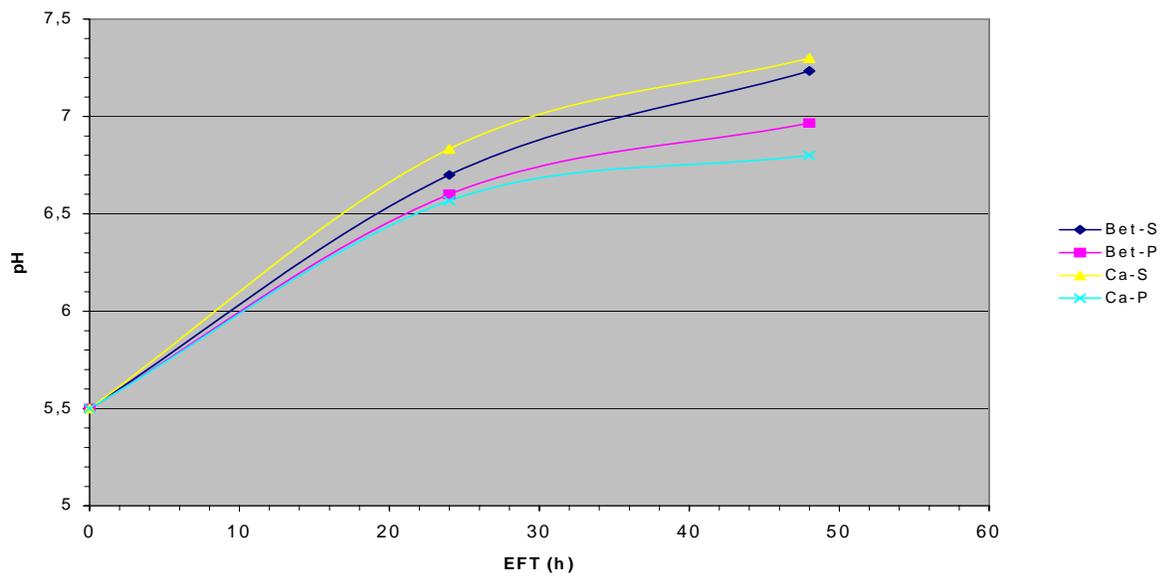
Les observations au microscope démontrent un manque d'oxygène dans les fioles standards mais beaucoup moins important que celui observé avec les autres milieux.



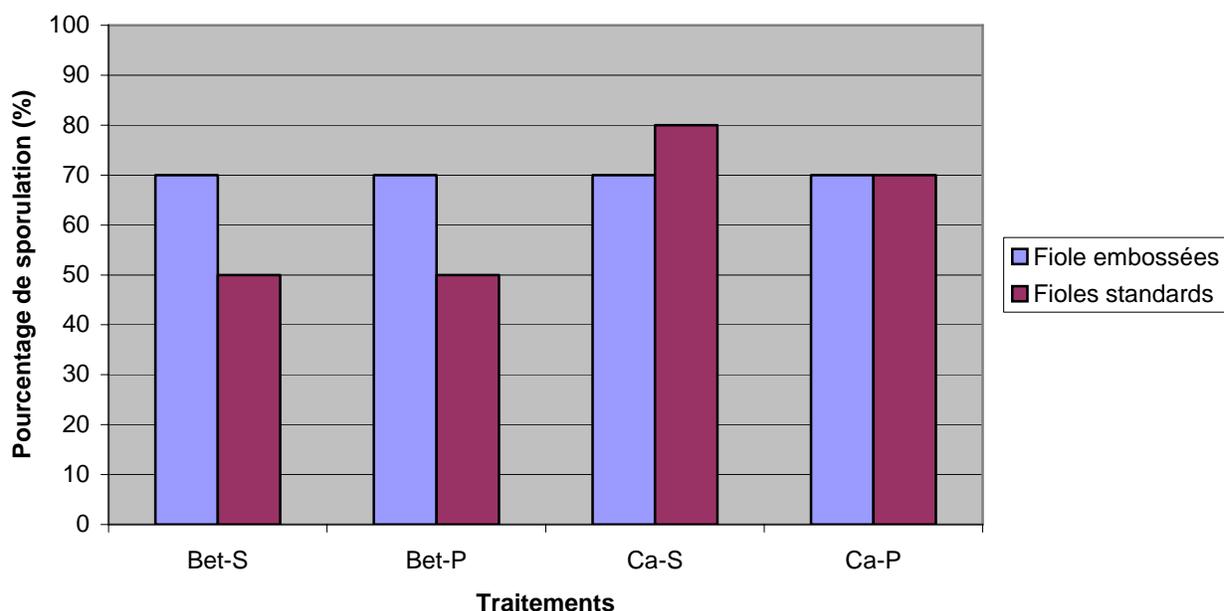
**Figure 9.** Évolution en fonction du temps de la matière sèche dans **a)** des fioles embossées et **b)** des fioles standards d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu mélasse avec deux sources de mélasse et d'acide lors de l'essai 1.



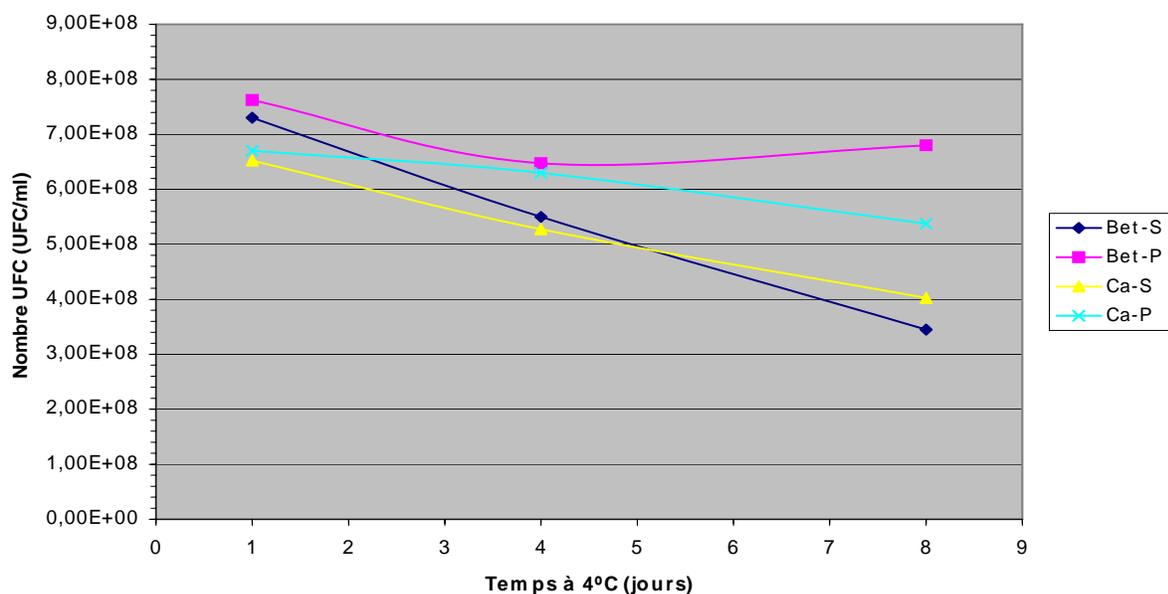
**Figure 10.** Évolution en fonction du temps du nombre UFC/ml dans **a)** des fioles embossées et **b)** des fioles standards d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu mélasse avec deux sources de mélasse et d'acide - essai 1.



**Figure 11.** Évolution en fonction du temps du pH dans **a)** des fioles embossées et **b)** des fioles standards d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu mélasse avec deux sources de mélasse et d'acide - essai 1.



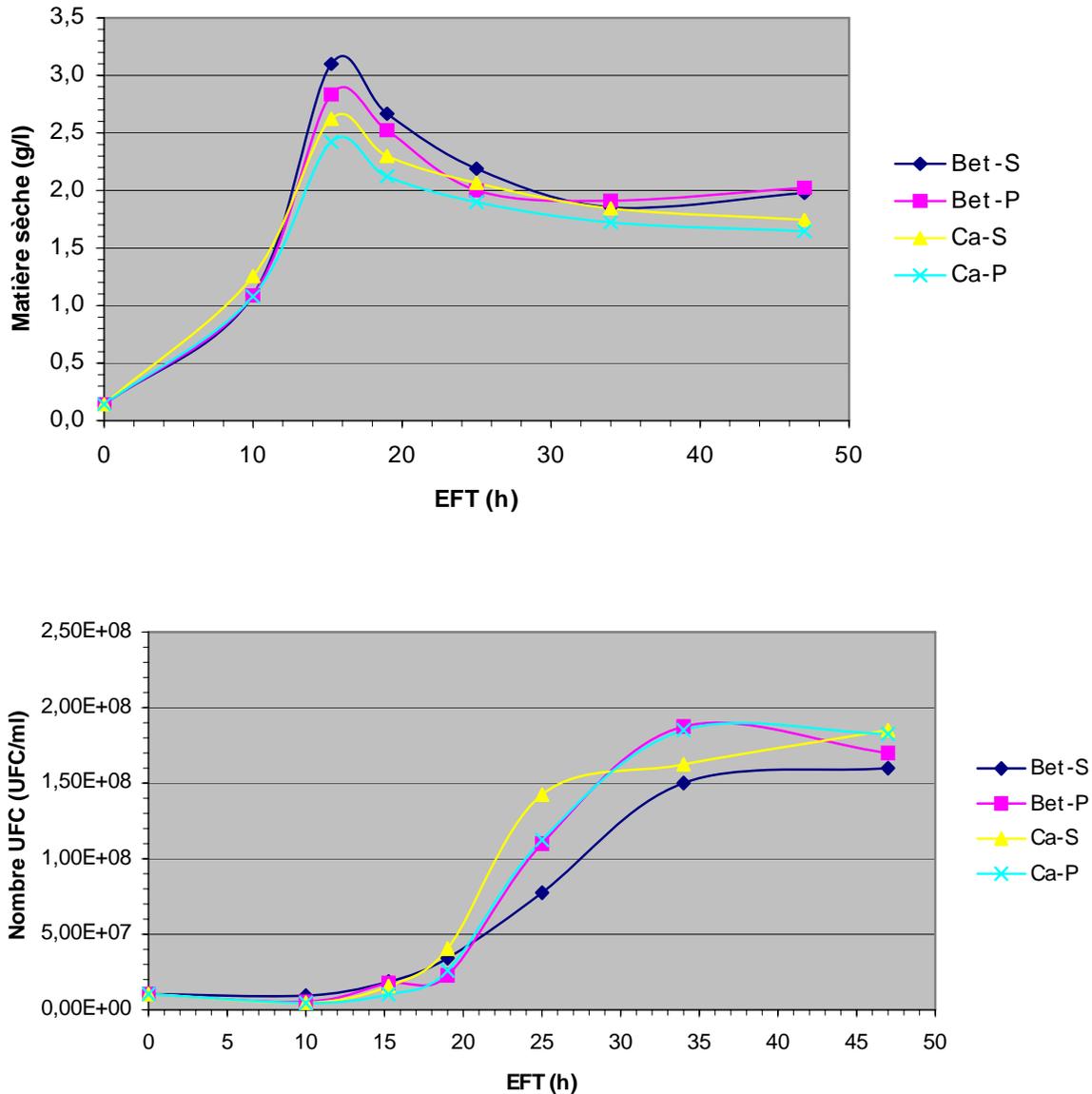
**Figure 12.** Pourcentage de sporulation après 48h de croissance d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans deux types de fioles dans le milieu mélasse avec deux sources de mélasse et d'acide - essai 1.



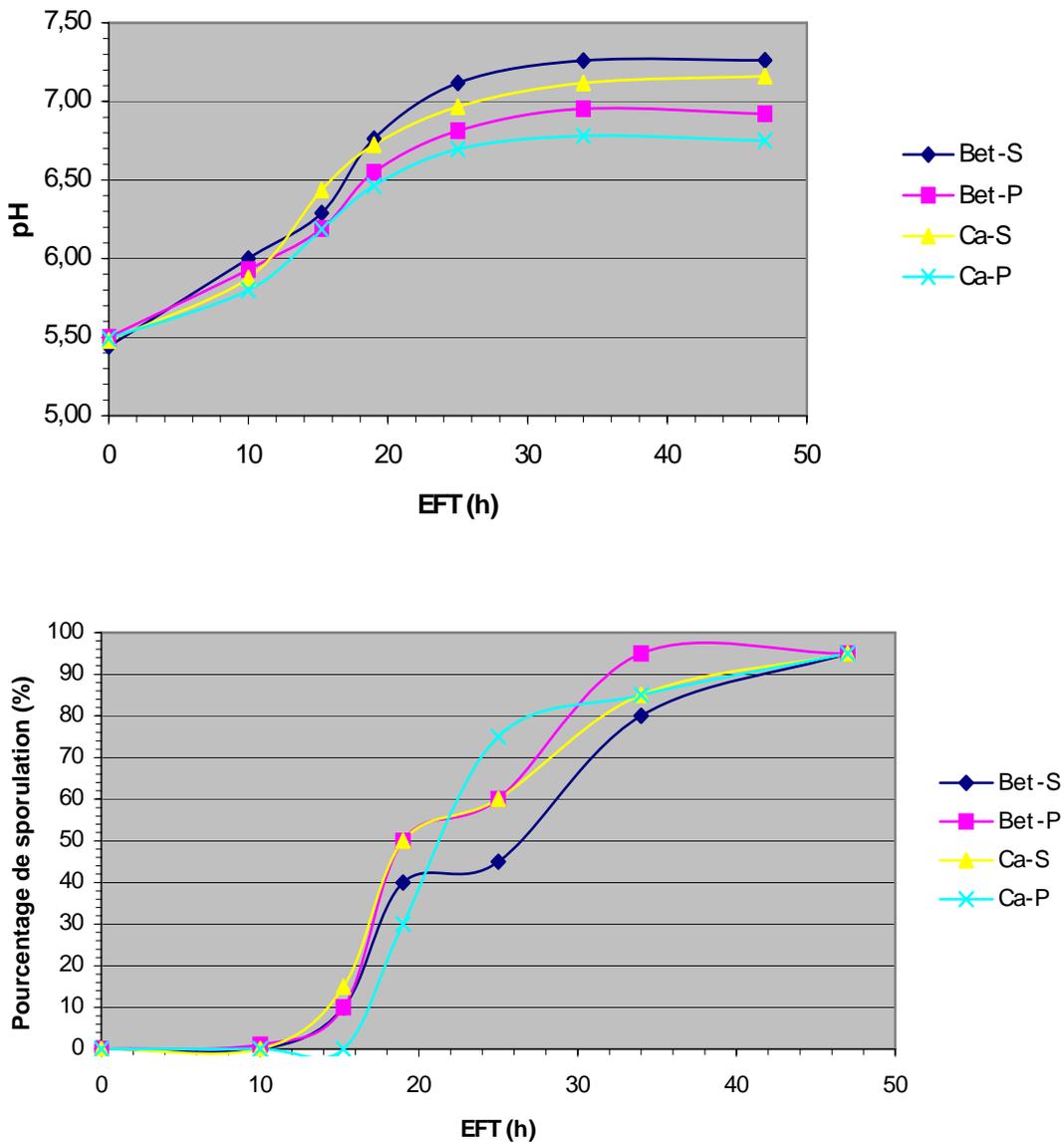
**Figure 13.** Évolution du nombre d'UFC/ml au sein de la formulation Sporodex lorsque entreposé à 4°C suite à une culture de *Pseudozyma flocculosa* en fioles embossées dans le milieu mélasse avec deux sources de mélasse et d'acide - essai 1.

## Importance du type de mélasse et de la source d'acide - essai 2

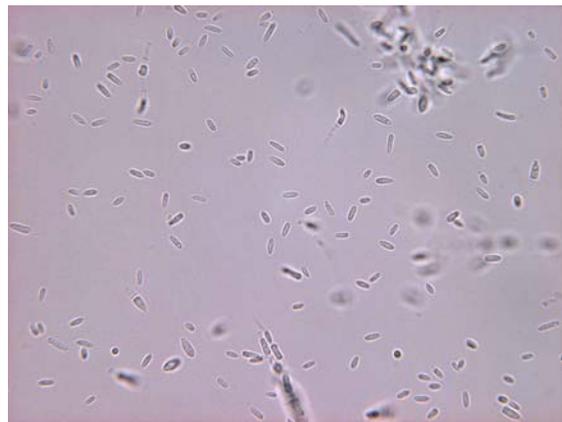
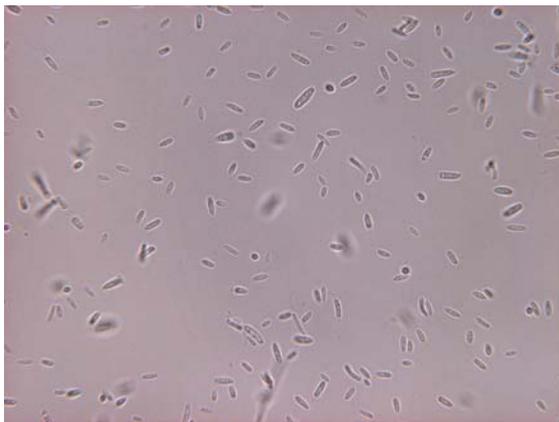
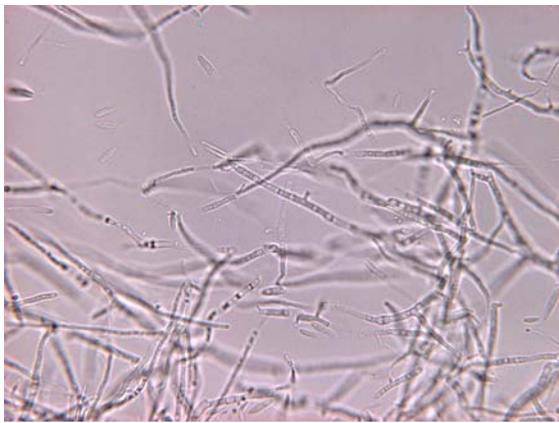
Les résultats confirment le fait que la croissance de *P. flocculosa* est similaire avec la mélasse de betterave ou de canne ainsi qu'avec l'acide phosphorique ou sulfurique (fig. 14 et 15). Tel qu'observé lors des expériences précédentes, la matière sèche augmente rapidement pour ensuite diminuer lorsque le microorganisme sporule (fig. 14a). Comparativement à l'essai précédent, il est important de mentionner que *P. flocculosa* a sporulé davantage et que le nombre UFC est plus élevé (fig. 14b; 15b). Cette différence peut avoir été occasionnée par le taux d'inoculation qui était inférieur mais peut provenir aussi de la température qui n'était pas contrôlée.



**Figure 14.** Évolution en fonction du temps **a)** de la matière sèche et **b)** du nombre d'UFC au sein d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu mélasse avec deux types de mélasse et d'acide - essai 2.



**Figure 15.** Évolution en fonction du temps a) du pH et b) du pourcentage de sporulation au sein d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu mélasse avec deux types de mélasse et d'acide - essai 2.



**Photo 8.** Culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu avec la mélasse de betterave et le pH ajusté avec du  $H_3PO_4$  après a) 10h, b) 15h, c) 19h, d) 25h, e) 34h et f) 47h de culture. Grossissement 400x.

## Importance du pH et de la concentration de l'inoculum

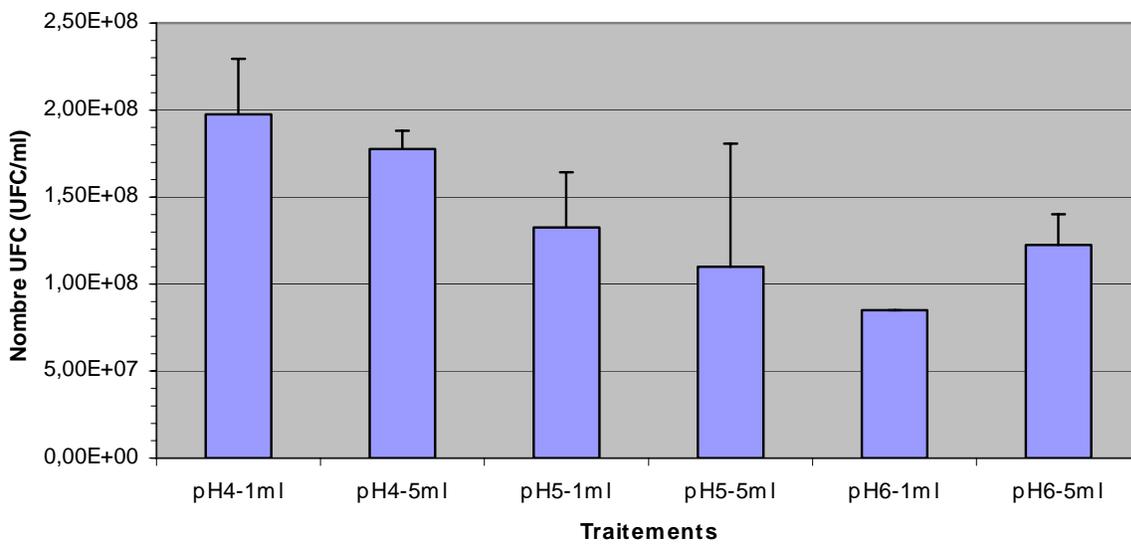
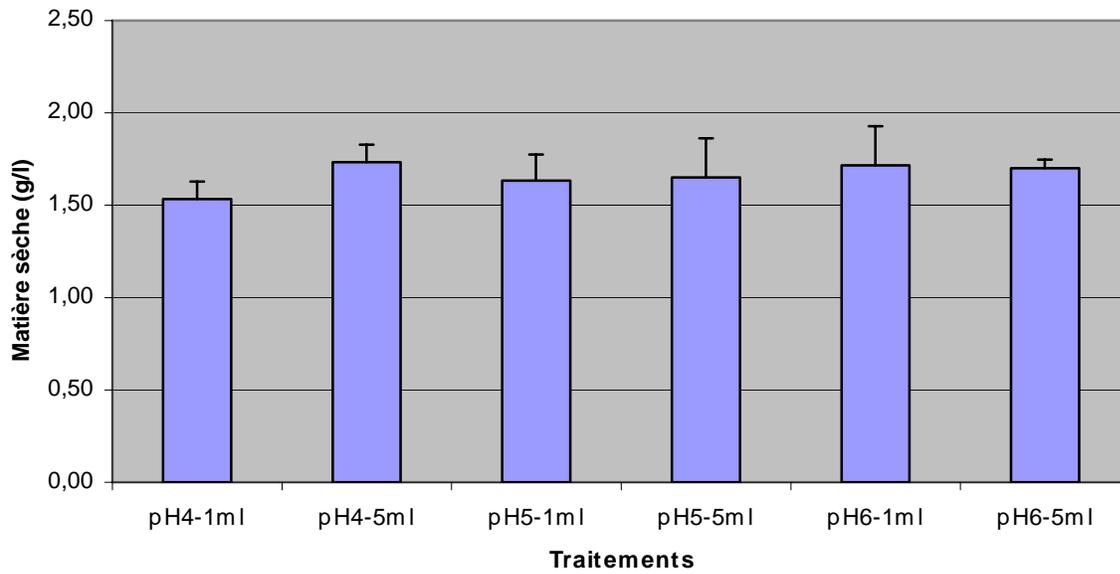
Dans cette expérience, les résultats tendent à démontrer que le niveau de pH et d'inoculation n'influencent pas la quantité de matière sèche dans le milieu mais affectent la type de sporulation (fig. 16a). En effet, le taux de matière sèche se situe entre 1,5 et 2 g/l pour tous les traitements ce qui correspond à ce qui a été observé lors des expériences précédentes.

Pour la sporulation, l'observation microscopique tend à démontrer que le taux d'inoculation a influencé le type de sporulation (fig. 17b). En effet, lorsque le taux se situe à 1%, il y a plus de conidies de libérées dans le milieu alors que lorsque le taux est à 5%, les conidies se sont préférentiellement développées dans les hyphes. Dans ce dernier cas, elles sont demeurées dans les hyphes ce qui a réduit le nombre UFC lors des "surfaces counts" (fig. 16b) et lors de l'évaluation du pourcentage de sporulation (fig. 17b). La culture n'a pas été suivie dans le temps mais il semble qu'avec un taux de 5%, il s'est formé davantage de mycélium dans le milieu comparativement à celui de 1% où le champignon a sporulé plus rapidement. *P. flocculosa*, peut sporuler de différentes façons soit en formant des conidiophores et des conidies à l'extérieur des hyphes ou soit en développant ses conidies directement des les hyphes. Cette expérience n'a pas permis d'observer précisément la croissance de *P. flocculosa* dans les différents traitements mais il semble que le type de sporulation a été différent.

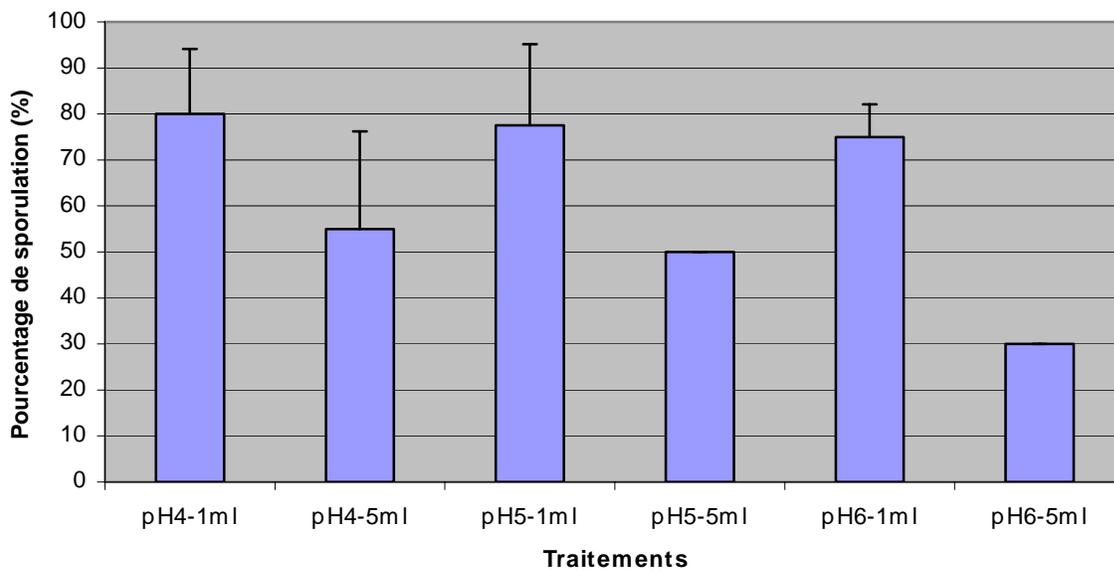
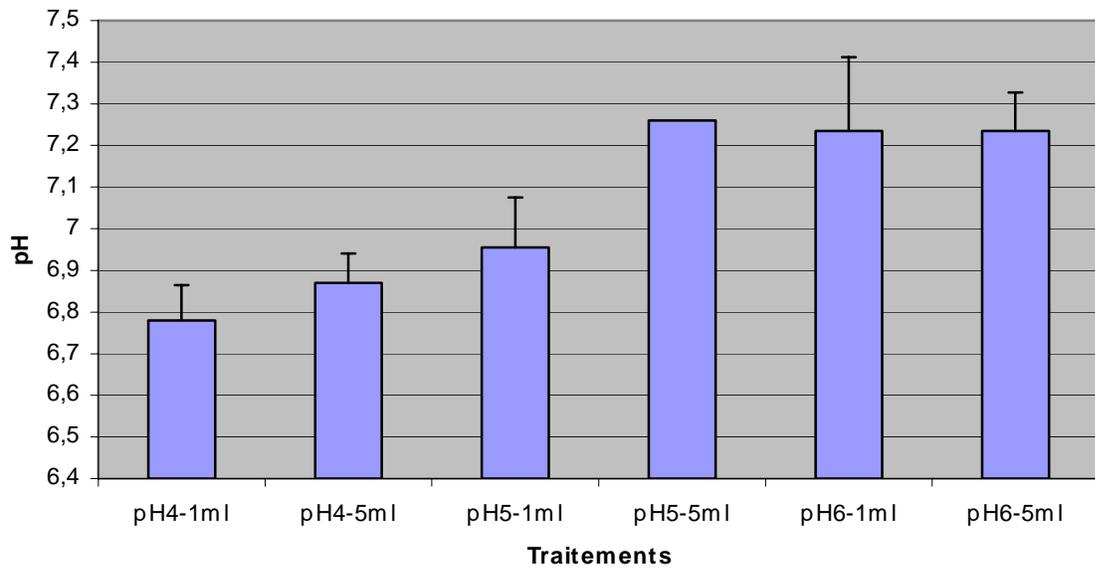
De plus, en règle générale, lorsque le taux d'inoculation est augmenté, la vitesse de croissance est accélérée. L'accélération n'a pas pu être vérifiée lors de cette expérience mais, à l'inverse, après 46 h, il semble que c'est la culture à 1% qui est la plus mature. Pour ce qui est du pH, il ne semble pas avoir d'effets néfastes sur la croissance de *P. flocculosa* (fig. 17a). Au contraire, une réduction du pH initial à 4 semble favoriser la sporulation du champignon.

Il est intéressant de noter que la croissance a été différente entre les traitements. En effet, cette différence provient en grande partie du type de sporulation. Après 46,5 h, les observations microscopiques étaient:

- ❖ pH 6 – 5%      30% de conidies libres dans le milieu. Le reste de la culture est constitué de conidies emprisonnées dans les hyphes. Les hyphes sont translucides entre les conidies.
- ❖ pH 6 – 1%      75% de conidies libres dans le milieu. Il y a de gros amas de conidies et il y a très peu de conidies dans les hyphes.
- ❖ pH 5 – 5%      50% de conidies libres dans le milieu. Le reste est constitué de conidies dans les hyphes.
- ❖ pH 5 – 1%      78% de conidies libres dans le milieu. Il y a quelques amas d'hyphes avec des conidies à l'intérieur mais très peu.
- ❖ pH 4 – 5%      50% de conidies libres dans le milieu. Il y a beaucoup de conidies encore dans les hyphes.
- ❖ pH 4 – 1%      80% de conidies libres dans le milieu. Il y a un peu de conidies dans les hyphes.



**Figure 16.** Mesure **a)** de la matière sèche et **b)** du nombre UFC après 46.5 heures d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu mélasse de cane avec différents pH et taux d'inoculation.

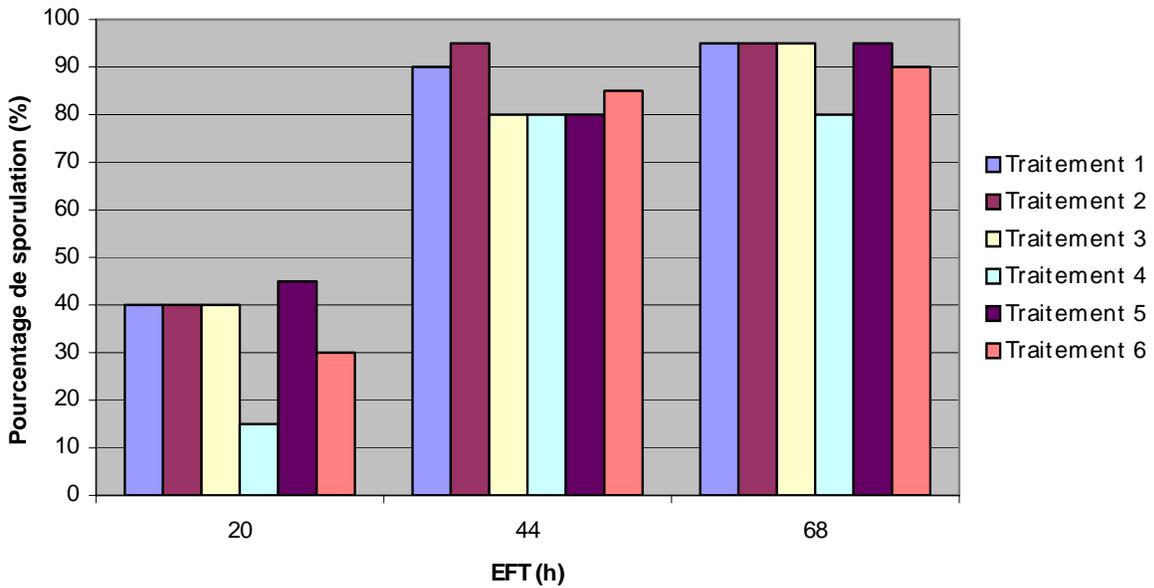
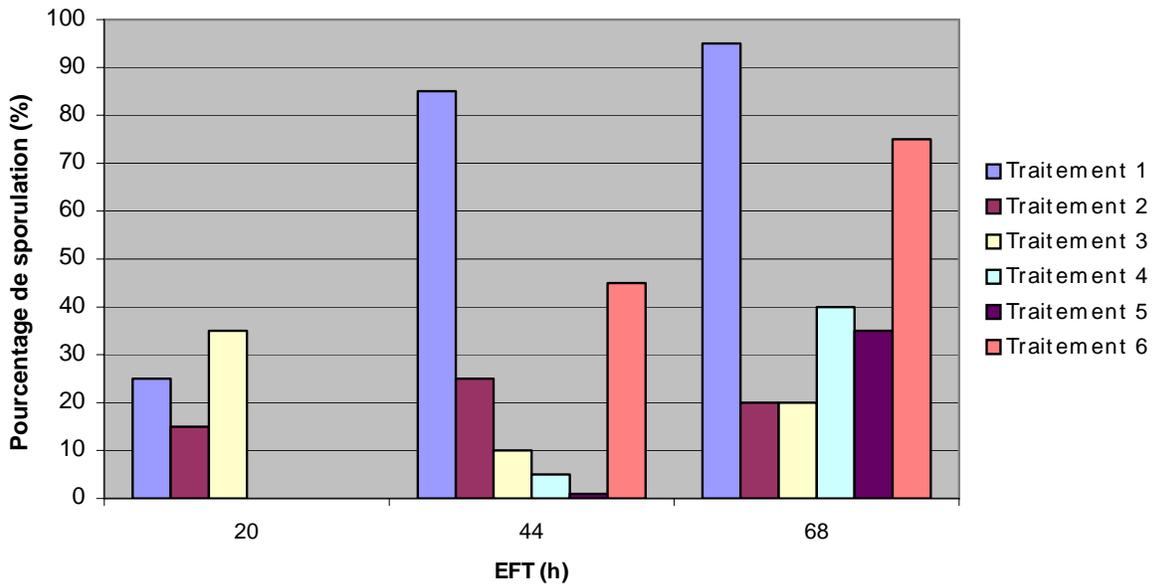


**Figure 17.** Mesure a) du pH et b) du pourcentage de sporulation après 46.5 heures d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* dans le milieu mélasse de canne avec différents pH et taux d'inoculation initiaux.

### **Importance du type d'extrait de levure sur la croissance de *Pseudozyma flocculosa***

Cette expérience préliminaire démontre que le type d'extrait de levure est important pour la croissance de *P. flocculosa* et ce principalement dans le milieu YM0,5P0,5D. En effet, dans le milieu mélasse (fig. 18b), il y a peu de différences de sporulation entre les différents extraits de levure alors que dans le milieu YM0,5P0,5D, la sporulation a été réduite grandement dans certains cas (fig. 18a). La différence entre ces deux milieux pourrait s'expliquer par le fait que la mélasse de betterave, qui contient beaucoup de vitamines et d'éléments divers, aurait compensé les carences contenues dans les extraits de levure.

Il est important toutefois de mentionner que l'extrait de levure Difco, qui est utilisé au laboratoire à l'Université Laval, a permis la meilleure croissance du champignon dans le milieu YM0,5P0,5D. Des expériences subséquentes devraient être menées afin de préciser quels extraits de levures favorisent ou non la croissance et d'essayer de comprendre le pourquoi.



**Figure 18.** Évolution du pourcentage de sporulation dans **a)** le milieu YM0.5P0.5D et **b)** le milieu mélasse lors d'une culture de *Pseudozyma flocculosa* avec 6 différents extraits de levure.

## FORMULATION DE MAUL-20

### Amélioration des qualités nutritionnelles du milieu de culture utilisé pour multiplier *Trichoderma harzianum* MAUL-20

#### Effet de la cellulose et du sucrose

Le tableau 42 schématise les résultats obtenus lors des différentes expériences antérieures. Dans la littérature, il est recommandé d'ajouter des substances telles du glucose, sucrose, glycérol, peptones, etc... afin de stimuler le développement de *Trichoderma*. Par contre, ces substances ne doivent pas dépasser 10% de la concentration de cellulose présente dans le milieu. Les tests qui avaient les mieux réussi (en gras au tableau 42) ont été repris en ajoutant une dose de sucrose ou de glucose puisque ce sont deux ingrédients peu coûteux.

**Tableau 42.** Synthèse des observations effectuées antérieurement lors des différentes expérimentations réalisées afin d'améliorer le milieu nutritionnel traditionnel employé pour multiplier *Trichoderma*.

Milieu de culture avec présence de cellulose	Nombre de jours pour atteindre la croissance radiale maximale en Pétri	croissance radiale moyenne après 2 jours (mm)
V-8 semi-solide avec CaCO <sub>3</sub>	5	---
V-8 solide avec CaCO <sub>3</sub>	5	---
Eau + agar	5	---
PDA	4	---
V-8 solide sans CaCO <sub>3</sub> et concentration +++ de cellulose	3	51
<b>V-8 semi-solide sans CaCO<sub>3</sub></b>	<b>3</b>	<b>54,5</b>
<b>V-8 solide sans CaCO<sub>3</sub></b>	<b>3</b>	<b>54</b>
<b>PDA + jus V-8 sans CaCO<sub>3</sub></b>	<b>3</b>	<b>58,5</b>
<b>½ PDA + jus V-8 sans CaCO<sub>3</sub></b>	<b>3</b>	<b>58</b>

**Légende :** --- : n / a car vérifié seulement avec ceux qui ont atteint la croissance radiale maximale après 3 jours

Les tests subséquents avaient permis de sélectionner le milieu cellulose à base de PDA comme meilleur milieu de propagation de *Trichoderma* MAUL-20 (tab. 43). La croissance radiale de MAUL-20 était d'environ 10 mm plus grande que les autres milieux à l'essai. Les tests ultérieurs ont été effectués avec ce milieu en modifiant la source de sucres.

**Tableau 43.** Observations effectuées lors des différentes expérimentations réalisées afin d'améliorer le milieu nutritionnel traditionnel employé pour multiplier *Trichoderma*.

Milieu de culture SANS cellulose	Nombre de jours pour atteindre la croissance radiale maximale en Pétri	croissance radiale moyenne après 2 jours (mm)
V-8 semi-solide + glucose	3	46,5
V-8 semi-solide + sucrose	3	47
½ PDA + Jus V-8 + glucose	3	47,5
½ PDA + Jus V-8 + sucrose	3	52
<b>PDA + Jus V-8 + glucose</b>	<b>3</b>	<b>56,5</b>
<b>PDA + Jus V-8 + sucrose</b>	<b>3</b>	<b>61</b>
V-8 solide + glucose	3	49
V-8 solide + sucrose	3	52

Le tableau 44 présente les résultats obtenus lors des différentes expérimentations effectuées en Pétri sur l'effet de la concentration de sucrose et glucose sur le développement et la sporulation de *Trichoderma* MAUL-20. L'intensité de la sporulation a été déterminée visuellement et à l'aide d'un hémacytomètre. Le dénombrement des spores de *Trichoderma* sur le milieu alimenté de glucose n'a pas permis de retenir une concentration puisque celles-ci étaient soit inférieures ou égales au témoin. Par contre, avec le sucrose, les concentrations 0,1; 0,3 et 0,5% ont donné des résultats supérieurs lorsque comparé au témoin. Une croissance rapide du champignon antagoniste est à souhaiter dans les premiers instants suivants son introduction dans un site. Ce paramètre permet à l'antagoniste d'assurer sa survie et de coloniser rapidement les sites à protéger. Dans ces expériences, *Trichoderma* a eu un meilleur taux de croissance avec le sucrose à 1% et le glucose à 0,8%. Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'ajout d'une substance stimulatrice ne devrait pas être supérieur à 10% du contenu en cellulose. Dans notre milieu cellulose, nous avons 1,5% de cellulose raffinée ce qui signifie que 0,15% devrait être le maximum ajouté en substances stimulatrices. Dans les prochaines expériences, ce point a été vérifié puisque nous avons comparé, en plateau d'aluminium, les meilleures concentrations obtenues de sucrose et de glucose à celle de 0,1% de sucrose.

**Tableau 44.** Impact de la source d'hydrate de carbone et effet de la concentration sur le développement et la sporulation de *Trichoderma* MAUL-20 lorsque cultivé sur milieu cellulose à base de PDA, en Pétri

Source de sucre et concentration (%)	Croissance radiale (mm)			Intensité de la sporulation* (x 10 <sup>4</sup> cfu / ml)
	après 2 j	après 3 j	Après 4 j	
<b>Sucrose - 0</b>	39,3	75,2	90,0	1,53
<b>Sucrose - 0,1</b>	39,8	75,5	90,0	1,77
<b>Sucrose - 0,3</b>	41,5	76,6	90,0	1,66
<b>Sucrose - 0,5</b>	40,8	76,0	90,0	1,75
<b>Sucrose - 0,8</b>	42,0	76,0	90,0	1,30
<b>Sucrose - 1,0</b>	43,1	78,0	90,0	1,43
<b>Sucrose - 2,0</b>	35,9	74,0	90,0	1,56
<b>Sucrose - 3,0</b>	40,4	76,2	90,0	0,73
<b>Glucose - 0</b>	39,3	75,2	90,0	1,53
<b>Glucose - 0,1</b>	42,5	75,6	90,0	1,02
<b>Glucose - 0,3</b>	43,3	71,9	90,0	1,34
<b>Glucose - 0,5</b>	44,3	71,0	90,0	1,11
<b>Glucose - 0,8</b>	46,0	77,5	90,0	0,80
<b>Glucose - 1,0</b>	39,0	73,3	90,0	1,13
<b>Glucose - 2,0</b>	39,5	73,9	90,0	1,18
<b>Glucose - 3,0</b>	38,5	72,3	90,0	1,53

Remarque : \* = visuellement, tous les Pétri avaient le même aspect c'est-à-dire une sporulation abondante, floconneuse et verte.

Les expériences réalisées ont permis de constater que le temps de sporulation était 2 fois plus long lorsque cultivé dans de gros volumes comparativement à une culture en Pétri (tab. 45). Cet essai a également permis de retenir le sucrose comme source de carbone à amender su milieu cellulose + PDA. Par contre, à la surprise générale, le milieu conventionnel à base de V8 a donné les meilleurs résultats avec 1,18 x 10<sup>9</sup> cfu/ml. Une partie de la biomasse récoltée a été congelée à -14°C ou -72°C et fera l'objet d'une analyse ultérieurement afin de vérifier si une production liquide est envisageable (spores viables). Le reste de la biomasse a été mélangée à un matériel inerte (25%), lyophilisée pendant 48 heures, moulue, pesée et ensachée.

**Tableau 45.** Impact de la source d'hydrate de carbone et effet de la concentration sur le développement et la sporulation de *Trichoderma* MAUL-20 lorsque cultivé sur milieu cellulose à base de PDA et comparé au milieu conventionnel à base de V8, en plateau d'aluminium

Source de sucre et concentration (%)	Coloration de la sporulation de <i>Trichoderma</i>		Intensité de la sporulation (x 10 <sup>8</sup> cfu / ml)
	après 3 j	après 6 j	
Sucrose - 0	blanc	vert	3,60
Sucrose - 0,1	blanc	vert	5,53
Sucrose - 1,0	vert	vert	8,60
Glucose - 0,8	blanc	vert	3,43
Milieu V8 conventionnel	vert	vert	11,80

Après 3 jours de croissance, le milieu conventionnel commençait à sporuler tandis que les milieux cellulose étaient encore floconneux et blancs (tab. 46). La sporulation a été légèrement supérieure avec le milieu V8 dans la première expérience mais supérieure dans les milieux cellulose lors du deuxième essai. Comme pour l'expérience précédente, une partie de la biomasse récoltée a été conservée aux températures décrites précédemment. L'expérience a été répétée deux fois.

**Tableau 46.** Impact du sucrose et de sa concentration sur le développement et la sporulation de *Trichoderma* MAUL-20 lorsque cultivé sur milieu cellulose à base de PDA et comparé au milieu conventionnel à base de V8, en plateau d'aluminium

Source de sucre et concentration (%)	Coloration de la sporulation de <i>Trichoderma</i>		Intensité de la sporulation - #1 (x 10 <sup>8</sup> cfu / ml)	Intensité de la sporulation - #2 (x 10 <sup>8</sup> cfu / ml)
	après 3 j	(x 10 <sup>8</sup> cfu / ml)		
Sucrose - 0,1	blanc	vert	---	5,25
Sucrose - 1,0	blanc	vert	1,31	5,00
Milieu V8 conventionnel	vert	vert	1,55	3,25

#### Effet de la thiamine ou du fer sur la croissance de *Trichoderma*

Le fer et la thiamine ne semblent pas affecter, ni améliorer le développement et la croissance de *Trichoderma* MAUL-20 (tab. 47).

**Tableau 47.** Impact du fer et de la thiamine sur le développement et la sporulation de *Trichoderma* MAUL-20 lorsque cultivé sur milieu standard alimenté de fer ou de thiamine et comparé au milieu conventionnel à base de V8, en plateau d'aluminium

	<b>Standard</b>	<b>FeCl<sub>3</sub> 0,0016 %</b>	<b>FeCl<sub>3</sub> 0,016 %</b>	<b>FeCl<sub>3</sub> 0,032 %</b>
<b>Concentration en spores à la récolte (spores / ml)</b>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	1,57 x 10 <sup>8</sup>	2,05 x 10 <sup>8</sup>	1,70 x 10 <sup>8</sup>
<b>Poids frais récolté (g)</b>	208,91	194,36	194,73	190,58
<b>Poids d'argile ajouté (g)</b>	52,22	48,59	48,68	47,64
<b>Poids sec total (g)</b>	41,38	41,0	38,54	37,45
<b>Viabilité après lyophilisation (spores / ml) 14-11-05</b>	1,40 x 10 <sup>7</sup>	3,05 x 10 <sup>7</sup>	1,50 x 10 <sup>7</sup>	3,53 x 10 <sup>7</sup>
	<b>Standard</b>	<b>Thiamine 50 µg / L</b>	<b>Thiamine 100 µg / L</b>	<b>Thiamine 200 µg / L</b>
<b>Concentration en spores à la récolte (spores / ml)</b>	1,80 x 10 <sup>8</sup>	4,47 x 10 <sup>8</sup>	3,42 x 10 <sup>8</sup>	1,45 x 10 <sup>8</sup>
<b>Poids frais récolté (g)</b>	208,91	200,80	203,01	197,32
<b>Poids d'argile ajouté (g)</b>	52,22	50,20	50,75	49,33
<b>Poids sec total (g)</b>	41,38	40,00	36,62	41,75
<b>Viabilité après lyophilisation (spores / ml) 14-11-05</b>	1,40 x 10 <sup>7</sup>	3,13 x 10 <sup>7</sup>	1,90 x 10 <sup>7</sup>	1,40 x 10 <sup>7</sup>

### Production à grande échelle de *Trichoderma harzianum* MAUL-20

Pour la production à grande échelle, différents essais ont été réalisés avec des milieux de culture qui offraient une bonne croissance de *Trichoderma*. Les milieux suivants ont été testés et comparés entre eux :

#### Milieu standard semi solide (/ Litre) :

8 g d'agar  
200 ml de V8 non-modifié  
800 ml d'eau distillée

#### Milieu PDA + cellulose + sucrose (/ Litre)

39 g de PDA  
15 g de cellulose (1,5%)  
1 g de sucrose (0,1%)  
200 ml de V-8 non-modifié  
800 ml d'eau distillée

**Milieu PDA semi-solide + cellulose + sucrose (/ Litre)**

**15 g de PDA**

15 g de cellulose (1,5%)

1 g de sucrose (0,1%)

200 ml de V-8 non-modifié

800 ml d'eau distillée

**Milieu ½ PDA + cellulose + sucrose (/ Litre)**

**19,5 g de PDA**

15 g de cellulose (1,5%)

1 g de sucrose (0,1%)

200 ml de V-8 non-modifié

800 ml d'eau distillée

L'évaluation de la biomasse récoltée permet de déterminer le nombre de propagules présentes dans le produit (titration), paramètre essentiel pour la mise en marché du produit. Pour chaque milieu évalué, la concentration en spores / ml et la quantité totale de spores / volume ont été estimées avant la lyophilisation (production liquide) et la concentration en spores / g a été évaluée après la lyophilisation (production solide). Par exemple, avant la lyophilisation, si le décompte des spores à l'hématimètre donne  $1 \times 10^8$  spores / ml pour un volume récolté de 2 litres. Nous aurons donc une quantité totale en spores de  $2 \times 10^{11}$  spores pour un volume de 2 L. Si nous mettons 25 % de matériels inertes comme matériel de remplissage, nous obtiendrons donc  $1,5 \times 10^{11}$  spores. Après lyophilisation, si le même produit donne 500 g de matériel séché, nous aurons donc  $\frac{1,5 \times 10^{11} \text{ spores}}{500 \text{ g}} = 3 \times 10^8$  spores / g.

En consultant le tableau 48, il est évident que la congélation affecte la viabilité des spores de *Trichoderma* puisque un facteur variant entre 6,5 et 291,8 % est perceptible par rapport au poids frais de *Trichoderma*. Avec le matériel frais, la plus grande quantité de spores avait été obtenue avec le milieu cellulose + 1% sucrose. En général, pour le milieu :

**Standard solide** = la congélation à  $-72^\circ\text{C}$  affecte moins la viabilité des spores de *Trichoderma* que celle à  $-14^\circ\text{C}$ . À cette température, le milieu congelé avec de l'argile protège également mieux les spores que lorsque l'argile est absente.

**Standard semi-solide** = la congélation à  $-72^\circ\text{C}$  affecte moins la viabilité des spores que celle à  $-14^\circ\text{C}$  lorsque l'argile est présente. Lorsqu'il n'y a pas d'argile, les spores sont plus nombreuses à  $-14^\circ\text{C}$ .

**Cellulose + 0,1% sucrose** = c'est le même patron que celui observé avec les milieux semi-solides.

**Cellulose + 1,0% sucrose** = la congélation à  $-72^\circ\text{C}$  affecte moins la viabilité des spores de *Trichoderma* que celle à  $-14^\circ\text{C}$ . Par contre, à cette température, les spores sont moins bien protégées lorsqu'il y a de l'argile.

Lorsque nous regardons chaque facteur pouvant influencer la viabilité des spores, nous remarquons que la :

**Congélation à  $-14^\circ\text{C}$  sans argile** = le milieu cellulose + 1,0% argile est le moins affecté et le milieu standard solide réagit le moins bien.

**Congélation à  $-14^\circ\text{C}$  avec argile** = c'est encore le milieu cellulose + 1,0% argile qui est le moins affecté et le milieu standard semi-solide réagit le moins bien.

**Congélation à  $-72^\circ\text{C}$  sans argile** = le milieu cellulose + 1,0% argile est le moins affecté et le milieu standard semi-solide réagit le moins bien.

**Congélation à -72°C avec argile** = c'est le milieu cellulose + 0,1% argile qui est le moins affecté et encore le milieu standard semi-solide réagit le moins bien.

Suite à ces observations, le milieu cellulose + 1,0% sucrose, la congélation à -72°C et l'ajout d'argile semblent à prioriser.

**Tableau 48.** Effet de la congélation sur la viabilité des spores de *Trichoderma harzianum* MAUL-20 lorsque comparé au poids frais

Milieu de culture	Congélation -14°C		Congélation -72°C		Poids frais
	sans argile	avec argile	sans argile	avec argile	
<b>standard solide</b>	1,53 x 10 <sup>7</sup> (176,5%)	1,53 x 10 <sup>7</sup> (176,5%)	4,13 x 10 <sup>7</sup> (65,4%)	8,17 x 10 <sup>7</sup> (33,0%)	2,70 x 10 <sup>9</sup>
<b>standard semi-solide</b>	1,47 x 10 <sup>7</sup> (144,9%)	8,30 x 10 <sup>6</sup> (256,6%)	7,30 x 10 <sup>6</sup> (291,8%)	2,30 x 10 <sup>7</sup> (92,6%)	2,13 x 10 <sup>9</sup>
<b>cellulose + 0,1% sucrose</b>	1,80 x 10 <sup>7</sup> (129,4%)	3,73 x 10 <sup>7</sup> (62,5%)	1,07 x 10 <sup>7</sup> (217,8%)	<b>3,59 x 10<sup>8</sup></b> <b>(6,5%)</b>	2,33 x 10 <sup>9</sup>
<b>cellulose + 1,0% sucrose</b>	<b>3,30 x 10<sup>7</sup></b> <b>(125,8%)</b>	<b>1,16 x 10<sup>8</sup></b> <b>(35,8%)</b>	<b>1,22 x 10<sup>8</sup></b> <b>(34,0%)</b>	7,03 x 10 <sup>7</sup> (59,0%)	<b>4,15 x 10<sup>9</sup></b>

Remarque : ( ) = Pourcentage de diminution de la viabilité des spores de *Trichoderma* par rapport au poids frais

La position des différents milieux de culture dans le lyophilisateur ne permet pas de déterminer si une place est préférable par rapport aux autres puisque les résultats varient d'un milieu à l'autre (tab. 49). Les variations notées pour les milieux semi-solide et cellulose + 0,1% sucrose sont faibles mais plus marquées pour le milieu cellulose + 1% sucrose. Dans ce dernier cas, la tablette du bas semble à prioriser. D'autres essais devront être faits afin de confirmer cette tendance.

**Tableau 49.** Effet de la position de la biomasse dans le lyophilisateur sur la viabilité des spores de *Trichoderma harzianum* MAUL-20 lorsque comparé au poids frais

Milieu de culture	tablette haut	tablette centre	tablette bas	poids frais
<b>standard solide</b>	6,00 x 10 <sup>8</sup> (4,5%)	N/D	N/D	2,70 x 10 <sup>9</sup>
<b>standard semi-solide</b>	<b>2,10 x 10<sup>9</sup></b> <b>(1,0%)</b>	<b>8,23 x 10<sup>8</sup></b> <b>(2,6%)</b>	1,36 x 10 <sup>9</sup> (1,6%)	2,13 x 10 <sup>9</sup>
<b>cellulose + 0,1% sucrose</b>	9,00 x 10 <sup>8</sup> (2,6%)	8,00 x 10 <sup>8</sup> (2,9%)	1,20 x 10 <sup>9</sup> (1,9%)	2,33 x 10 <sup>9</sup>
<b>cellulose + 1,0% sucrose</b>	3,00 x 10 <sup>8</sup> (13,8%)	5,00 x 10 <sup>8</sup> (8,3%)	<b>2,00 x 10<sup>9</sup></b> <b>(2,1%)</b>	<b>4,15 x 10<sup>9</sup></b>

Remarques : ( ) = Pourcentage de diminution de la viabilité des spores de *Trichoderma* par rapport au poids frais  
N/D = information non disponible

### 5.2.3 ACTIVITÉ 4. COMPATIBILITÉ AVEC LES PESTICIDES CHIMIQUES ET AUXILIAIRES DE LUTTE

#### Effet des pesticides sur la germination et survie de *Trichoderma* MAUL-20

*Trichoderma* est reconnu pour avoir un large spectre de tolérance vis-à-vis les pesticides comparativement à beaucoup de micro-organismes du sol. De plus, *Trichoderma* possède la capacité de coloniser les sols traités chimiquement. Il peut être appliqué avec les mêmes appareils que ceux employés pour pulvériser les pesticides chimiques.

Les tests effectués en laboratoire ont permis d'établir la charte de compatibilité de *Trichoderma* MAUL-20 avec les pesticides les plus couramment utilisés dans les serres (tab. 50 et 51). L'annexe 7 présente les pourcentages de germination des spores de *Trichoderma* MAUL-20 pour chaque concentration étudiée. MAUL-20 est compatible avec tous les insecticides vérifiés et résistant ou tolérant à la majorité des fongicides. Par contre, MAUL-20 est sensible à la famille des captanes, produit largement utilisé dans les serres. Cette constatation nous incite à réfléchir sérieusement à développer une souche résistante à ces matières actives.

**Tableau 50.** Charte de compatibilité de *Trichoderma* avec les fongicides chimiques utilisés dans les serres

Fongicide		Statut
nom commercial	matière active	R ou S ou T*
Aliette WDG	fosetyl-al	R
Benlate	bénomyl	R
Botran	dichloran	R
Copper spray	oxychlorure de cuivre	R
Decree 50 WDG	fenhexamid	R
Ferbam 76 WDG	ferbame	S
Folpan 50 WP	folpet	S
Maestro	captane	T
Captan 50 W	captane	S
Captan 80 W	captane	S
Supra Captan 80 WDG	captane	T
Manzate 200 DF	mancozèbe	S
Meltatox	dodémorphe-acétate	T
No-Damp	oxine de benzoate	S
Nova 40WP	myclobutanil	T
Previcur	Banol	R
Rovral 50 WP	iprodione	R
Senator 70 WP	thiophanate-méthyl	R
Soufre microfin 92%	soufre	R
Terraclor 75%	Quintozène	R
Thiram 75 WP	thirame	T
Truban 25EC	étridiazole	R
Truban 30WP	étridiazole	T

Remarques : R = Résistant au produit testé  
 S = Sensible au produit testé  
 T = Tolérance au produit testé

**Tableau 51.** Charte de compatibilité de *Trichoderma* avec les insecticides chimiques utilisés dans les serres

Insecticide		Statut
nom commercial	nom commun	R ou S ou T*
Ambush 50 EC	perméthrine	R
Avid 1,9% EC	abamectine	R
Decis 5 EC	deltaméthrine	R
Diazinon 500	diazinon	R
Dibrom	Naled	R
Dyno-Mite	pyridaben	R
Enstar II	s-Kinoprène	R
Kelthane	dicofol	R
Malathion 25W	Malathion	R
Malathion 500E	Malathion	R
Orthène T&O Spray	acéphate	R
Pirliss 50 DF	pirimicarbe	R
Pounce	Perméthrine	R
Savon insecticide	acides gras	R
Thiodan 50W	Endosulfan	R
Thiodan 50 WP	endosulfan	R
Trounce	Trounce	Trounce
Trumpet 80 WP	bendiocarbe	R
Vendex 50%	Vendex 50%	Vendex 50%

Remarques : R = Résistant au produit testé  
 S = Sensible au produit testé  
 T = Tolérance au produit testé

### Effet de *Trichoderma* MAUL-20 sur le développement et survie des insectes prédateurs et parasitoïdes

Selon l'analyse statistique basée sur une régression logistique, le taux de survie après 24 heures de l'hyménoptère parasitoïde *E. formosa* s'est avéré similaire pour tous les traitements et ce, pour les deux répétitions dans le temps (Pr > ChiSq : 0,8871 et 0,4359). Au cours de la première expérience, un taux de survie de 98 % a été noté avec le traitement eau et le traitement MAUL-20 (2 g / L) alors qu'un taux de survie de 96 % a été noté avec le traitement eau-argile et le traitement MAUL-20 (4 g / L). Au cours de la deuxième expérience, un taux de survie de 98 % a été noté avec le traitement eau et un taux de survie de 100 % a été noté avec le traitement eau-argile, le traitement MAUL-20 (2 g / L) et le traitement MAUL-20 (4 g / L).

Le taux de survie de l'hyménoptère parasitoïde *A. colemani* a été similaire pour tous les traitements et ce, pour les deux expériences (Pr > ChiSq : 0,1359 et 0,9605). Au cours de la première expérience, un taux de survie de 93,3 % a été noté avec le traitement eau, 96,5 % avec le traitement eau-argile et le traitement MAUL-20 (4 g / L) et 100 % avec le traitement MAUL-20 (2 g / L). Au cours de la deuxième expérience, un taux de survie de 95 % a été noté avec le traitement eau, le traitement MAUL-20 (2 g / L) et le traitement MAUL-20 (4 g / L) et 96,6 % avec le traitement eau-argile.

Le taux de survie de l'acarien prédateur *P. persimilis* s'est avéré similaire pour tous les traitements à l'étude (Pr > ChiSq : 0,3277 et 0,5116). Au cours de la première expérience, un taux de survie de 80 % a été noté avec le traitement eau, 88 % avec le traitement eau-argile, 90 % avec le traitement MAUL-20 (2 g / L) et 93 % avec le traitement MAUL-20 (4 g / L). Au cours de la deuxième expérience, un taux de survie de 81 % a été noté avec le traitement eau, 83 % avec le traitement eau-argile, 72 % avec le traitement MAUL-20 (2 g / L) et 88 % avec le traitement MAUL-20 (4 g / L).

La punaise prédatrice *O. insidiosus* a présenté un taux de survie similaire pour tous les traitements (Pr > ChiSq : 0,4405 et 0,0823). Un taux de survie de 94 % a été observé pour le traitement eau, le traitement eau-argile et le traitement MAUL-20 (2 g / L) et un taux de survie de 88 % a été noté pour le traitement MAUL-20 (4 g / L) pour la première expérience. Pour la deuxième expérience, un taux de survie de 100 % a été noté pour le traitement eau et le traitement MAUL-20 (2 g / L), 98 % pour le traitement eau-argile et 95 % pour le traitement MAUL-20 (4 g / L).

Les résultats de cette étude indiquent que le biofongicide MAUL-20 à base de *T. harzianum* n'a pas d'impact sur la viabilité à court terme (24 heures) des hyménoptères parasitoïdes *E. formosa* et *A. colemani*, de l'acarien prédateur *P. persimilis* et de la punaise prédatrice *O. insidiosus*. Ces données corroborent celles obtenues avec d'autres souches de *T. harzianum* ainsi qu'avec *G. catenulatum*. En effet, Sterk *et al.* (2002) ont démontré que le biofongicide Trichodex 25WP à base de *T. harzianum* souche T-39 ( $10^{10}$  CFU / g) utilisé à une concentration de 1 g de matière active / L était inoffensif pour les bourdons pollinisateurs (*Bombus impatiens*), l'acarien prédateur *P. persimilis*, l'hyménoptère parasitoïde *E. formosa* (pupes et adultes) et la punaise prédatrice *O. laevigatus*. De plus, le biofongicide Prestop, à base de *G. catenulatum*, n'a pas eu d'effet toxique sur les hyménoptères parasitoïdes, les coccinelles, les chrysopes et les abeilles (EPA, 2002). Lors de l'homologation du biofongicide RootShield à base de *T. harzianum* souche KRL-AG2 par l'ARLA, une exemption d'études a été permise pour les essais de toxicologie sur les arthropodes. L'exemption a été justifiée par le fait qu'aucune référence de cas n'existait quant au fait que *T. harzianum* puisse avoir un impact sur les insectes ou autres invertébrés (ARLA, 2002). De même, certains articles traitent de la dispersion de *Trichoderma* spp. par les abeilles et bourdons pollinisateurs sans effet néfaste (ARLA, 2002; Escande *et al.*, 2002).

L'effet des pesticides sur les auxiliaires de lutte peut se quantifier de plusieurs façons. En effet, il est possible de mesurer les effets directs ou les effets indirects (Sterk *et al.*, 1999). Les effets directs peuvent être évalués par la mortalité à court terme (< 24 heures), la mortalité à long terme (> 24 heures), les effets sublétaux (fécondité, viabilité, longévité, activité de prédation ou de parasitisme, etc.) ou la durée de l'activité toxique (Sterk *et al.*, 1999). Les effets indirects sont quant à eux mesurés par la réduction de la population hôte / proie ou l'ingestion d'hôtes ou de proies contaminés par les pesticides. Ces deux types d'effets mènent au même résultat soit, la diminution de la population d'auxiliaires. Au cours de cette étude, seule la mortalité à court terme a été évaluée pour les quatre auxiliaires à l'étude et ce, sur les stades de développement les plus sensibles des auxiliaires à une dose représentative de la dose appliquée en conditions réelles (OEPP / EPPO, 1989; Thomson *et al.*, 1996; Sterk *et al.*, 1999). Il s'agit par ailleurs du paramètre le plus important (Sterk *et al.*, 2002).

Nos résultats viennent donc s'ajouter aux résultats pré-existants, corroborant le fait que les biofongicides à base de *T. harzianum* et *G. catenulatum* sont inoffensifs pour les insectes bénéfiques utilisés en serre.

## 5.2.4 ACTIVITÉ 5. EFFICACITÉ *IN VITRO*

### Évaluation de l'activité antagoniste de *Trichoderma* MAUL-20 vis-à-vis les agents pathogènes

*Trichoderma* atteint la confluence du Pétri 3 jours après son ensemencement. Il a un taux de croissance moyen journalier de 30 mm par jour (tab. 52). *Pythium*, lorsqu'il pousse sur le milieu PYT, croît au même rythme que *Trichoderma*. *Sclerotinia sclerotiorum* et *B. cinerea* devront être déposés sur le milieu de culture 1 journée avant *Trichoderma*. *Rhizoctonia solani* devra, quant à lui, être mis 3 jours avant *Trichoderma* et ainsi de suite pour les autres champignons. Ceux qui ont une croissance journalière très lente (par ex. : *Acremonium*, *Epicoccum*, *V. dahliae*, etc...) ne seront pas de bons compétiteurs, ce qui devrait faciliter le travail de *Trichoderma*. À l'inverse, dans les cas de *Pythium*, *R. solani*, *B. cinerea* et *S. sclerotiorum*, la lutte devrait être plus intense puisqu'ils ont un taux de croissance similaire. Dans ces cas, la colonisation rapide des niches écologiques est déterminante.

**Tableau 52.** Taux de croissance moyen journalier (mm) des champignons pathogènes et de l'agent de lutte biologique *Trichoderma*

Champignon	Croissance radiale moyenne journalière (mm)	Temps pour atteindre la confluence du Pétri (jours)	Dépôt de l'agent pathogène (# jour) sur le milieu de culture <b>avant</b> <i>Trichoderma</i>
<i>Trichoderma</i>	30	3	---
<i>Pythium irregularea</i>	30	3	---
<i>Pythium ultimum</i>	30	3	---
<i>Botrytis cinerea</i>	22,3	4	1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	22,5	4	1
<i>Rhizoctonia solani</i>	14,8	6	3
<i>Fusarium solani</i>	8,9	10	7
<i>Fusarium moniliforme</i>	8,1	11	8
<i>Alternaria alternata</i>	8,1	11	8
<i>Gloeosporium roseum</i>	7,4	12	9
<i>Alternaria sp.</i>	6,8	13	10
<i>Botryosporium</i>	5,6	16	13
<i>Cladosporium</i>	5,2	17	14
<i>Verticillium dahliae</i>	4,9	18	15
<i>Epicoccum</i>	4,7	19	16
<i>Acremonium</i>	3,6	25	22
<i>Penicillium</i>	n/a	n/a	n/a

**Remarque :** n/a = croissance très diffuse qui ne permet par une belle confrontation entre les deux champignons.

*Trichoderma* a fait l'objet d'une "analyse multicritère simple". Au total, sept critères de décision qualitatifs et quantitatifs ont été déterminés et ces critères ont permis d'évaluer la performance de *Trichoderma* à la confrontation. Le tableau 53 présente les critères de décision retenus pour l'analyse.

**Tableau 53.** Identification et pondération des critères de décision sélectionnés pour évaluer la performance de *Trichoderma* à la confrontation en Pétri contre différents agents pathogènes.

Intervalle des poids	Critères de décision*
0 à 20	Temps (jour) requis pour obtenir la zone de contact entre les deux champignons
0 à 9	La croissance radiale mesurée (mm) à partir du centre de la pastille de gélose de <i>Trichoderma</i> jusqu'à la zone de contact
0 à 5	Zone d'inhibition entre les deux champignons (intensité de la coloration)
0 à 2	Sporulation différente et/ou dense au contact entre les deux champignons
0 à 1	Zone claire au contact entre les deux champignons
0 à 4	Envahissement de <i>Trichoderma</i> sur l'agent pathogène ou vice et versa
0 à 3	Intensité de la sporulation de <i>Trichoderma</i> sur l'agent pathogène ou vice et versa

**Remarques :** \* Consulter l'annexe 8 pour connaître le barème de pondération employé lors de l'évaluation.

Cette pondération a été faite de façon à favoriser l'action de *Trichoderma* sur les agents pathogènes. Le poids le plus grand étant celui du meilleur lors de la confrontation. Il faut noter que dans le cas des *Pythium*, la confrontation a également eu lieu sur milieu PYT. *Trichoderma* est capable de croître sur ce milieu même si sa croissance est un peu ralentie. À l'inverse, lorsque les *Pythium* croissent sur le milieu PDA et CZA, leur croissance est difficile, rendant la confrontation inégale. La confrontation a eu lieu en tenant compte de la vitesse de croissance des champignons.

Lors de ces tests *in vitro*, il apparaît que *Trichoderma* a une forte activité antagoniste contre tous les agents pathogènes testés (tab. 54). Malgré le fait que les *Pythium* avaient le même taux de croissance que *Trichoderma*, la lutte a été effectuée en faveur de *Trichoderma*, peu importe le milieu de culture utilisé. Que *Trichoderma* soit efficace contre ceux qui ont un faible taux de croissance est tout à fait logique mais qu'il soit un bon compétiteur contre *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* et *R. solani* est tout à son honneur. Par contre, *Trichoderma* a eu beaucoup de difficultés contre *Épicoccum*. En effet, le contact n'a jamais eu lieu entre les deux protagonistes puisqu'une zone claire, d'une largeur de 15 mm, a été clairement observée entre les deux agents. Les *Fusarium* ont également lutté fortement contre MAUL-20 et dans ces dernières confrontations, *Fusarium* envahissait parfois *Trichoderma*.

La vitesse de croissance de *Trichoderma* est importante. Elle se traduit généralement par un envahissement de *Trichoderma* sur l'agent pathogène et une sporulation très abondante de l'agent de lutte biologique sur ces derniers. L'envahissement de *Trichoderma* est généralement direct et intense. Suite à ces tests, des cas d'enroulement et de pénétration de *Trichoderma* contre *Rhizoctonia*, les *Alternaria*, *Botryosporium*,

*Sclerotinia* et *Cladosporium* ont été observés au microscope optique. L'affaissement des hyphes a même été noté dans certains de ces systèmes. Le comportement de *Trichoderma* envers *Epicoccum* pourrait se révéler comme un cas d'antibiose mais le tout reste à confirmer.

**Tableau 54.** Évaluation, *in vitro*, de l'activité antagoniste de *Trichoderma* vis-à-vis les agents pathogènes

Champignon	Activité antagoniste *			Croissance radiale moyenne journalière (mm)
	Milieu PDA	Milieu CZA	Milieu PYT	
<i>Botryosporium</i>	+34	+33	---	5,6
<i>Pythium irregulare</i>	+33	+31	+20	30
<i>Pythium ultimum</i>	+31	+30	+27	30
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+30	+28	---	22,5
<i>Cladosporium</i>	+29	+29	---	5,2
<i>Gloeosporium</i>	+29	+23	---	7,4
<i>Verticillium dahliae</i>	+29	+19	---	4,9
<i>Alternaria alternata</i>	+28	+28	---	8,1
<i>Botrytis cinerea</i>	+28	+28,5	---	22,3
<i>Alternaria sp.</i>	+27,5	+18	---	6,8
<i>Rhizoctonia solani</i>	+ 25,5	+25,5	---	14,8
<i>Acremonium</i>	+24	+18	---	3,6
<i>Fusarium solani</i>	+22	+20	---	8,9
<i>Fusarium moniliforme</i>	+20	+18,5	---	8,1
<i>Epicoccum</i>	+17	+21	---	4,7

Remarques : \* + = avantage *Trichoderma*  
 - = avantage l'agent pathogène

## Détermination des antibiotiques produits par *Trichoderma* MAUL-20

### Peptaiboles

Différents paramètres ont été notés tels que l'apparence du filtrat, la quantité de mycélium récoltée, le volume de filtrat ayant subi l'extraction de même que la quantité de gommes récoltées suite à l'extraction (tableaux 55 à 58).

**Tableau 55.** Apparence des milieux de culture ayant supporté la croissance des souches de *Trichoderma harzianum* après filtration pour l'extraction des peptaïboles

Traitement	Couleur
Témoin	Incolore
RootShield	Jaune verdâtre
MAUL-20	Jaune verdâtre

**Tableau 56.** Quantité de mycélium récolté lors de la filtration pour l'extraction des peptaïboles pour les souches de *Trichoderma harzianum*

Traitement	Poids du mycélium frais (g)	Poids du mycélium séché (g)
Témoin	0	0
RootShield	23,7	2,9
MAUL-20	19,4	3,0

**Tableau 57.** Volumes de milieu de culture et de n-butanol utilisés lors de l'extraction des peptaïboles pour les différentes souches de *Trichoderma harzianum*

Traitement	Volume de milieu de culture (ml)	Volume de n-butanol (ml)
Témoin	2300	1150
RootShield	2300	1150
MAUL-20	2300	1150

**Tableau 58.** Poids des gommes obtenus suite à l'évaporation du n-butanol pour l'extraction des peptaïboles pour les différentes souches de *Trichoderma harzianum*

Traitement	Poids de la gomme destinée au DMSO (g)	Poids de la gomme destinée au méthanol (g)	Poids total de gomme (g)
Témoin	0,0971	0,0760	0,1731
RootShield	0,1352	0,1879	0,3231
MAUL-20	0,1160	0,1424	0,2584

Aucune zone d'inhibition n'a été notée lors de la croissance de la bactérie *E. coli* et ce, pour les traitements DMSO, témoin, RootShield et MAUL-20. Par contre, une zone d'inhibition a été observée lors de la croissance des bactéries *B. subtilis* et *S. aureus* (tableaux 59 et 60). Aucune inhibition de croissance n'a été notée avec le champignon *B. cinerea* pour les différents traitements en comparaison avec le méthanol seul alors qu'une inhibition de croissance du champignon *S. cepivorum* a été mesurée pour certains traitements (tableaux 61 et 62).

**Tableau 59.** Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance de la bactérie *Bacillus subtilis* en présence d'extraits de peptaiboles issus de milieux de culture ayant supportés la croissance de souches de *Trichoderma harzianum*

Traitement	Quantité d'extraits de peptaiboles (µg)	Rayon d'inhibition moyen (mm)	Intensité de l'inhibition *
DMSO	-	0,18	+
Témoin	50	2,12	+
RootShield	50	0,75	+
MAUL-20	50	2,43	+

\* Intensité de l'inhibition : - : pas d'inhibition, + : rayon d'inhibition < 5 mm, ++ : rayon d'inhibition > 5,1 mm

**Tableau 60.** Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance de la bactérie *Staphylococcus aureus* en présence d'extraits de peptaiboles issus de milieux de culture ayant supportés la croissance de souches de *Trichoderma harzianum*

Traitement	Quantité d'extraits de peptaiboles (µg)	Rayon d'inhibition moyen (mm)	Intensité de l'inhibition *
DMSO	-	0	-
Témoin	50	0	-
RootShield	50	0,37	+
MAUL-20	50	0,18	+

\* Intensité de l'inhibition : - : pas d'inhibition, + : rayon d'inhibition < 5 mm, ++ : rayon d'inhibition > 5,1 mm

**Tableau 61.** Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance du champignon *Botrytis cinerea* en présence d'extraits de peptaiboles issus de milieux de culture ayant supportés la croissance de souches de *Trichoderma harzianum*

Traitement	Quantité d'extraits de peptaiboles (µg)	Diamètre de croissance (mm)	Intensité de l'inhibition *
<i>B. cinerea</i> seul	-	50,6	x
Méthanol	-	45,4	-
Témoin	100	48,1	-
RootShield	100	45,3	-
MAUL-20	100	47,0	-

\* Intensité de l'inhibition : - : 90-100% de croissance, + : 50-90% de croissance et ++ : < 49% de croissance

**Tableau 62.** Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance du champignon *Sclerotium cepivorum* en présence d'extraits de peptaiboles issus de milieux de culture ayant supportés la croissance de souches de *Trichoderma harzianum*

Traitement	Quantité d'extraits de peptaiboles (µg)	Diamètre de croissance (mm)	Intensité de l'inhibition *
<i>S. cepivorum</i> seul	-	49,5	x
Méthanol	-	40,2	-
Témoin	100	39,7	-
RootShield	100	30,0	+
MAUL-20	100	38,0	-

\* Intensité de l'inhibition : - : 90-100% de croissance, + : 50-90% de croissance et ++ : < 49% de croissance

### Métabolites neutres et métabolites acides

#### Premier essai

Seuls les métabolites neutres ont été évalués à raison de 20 µg d'extrait de métabolites par disque antibiogramme. Différents paramètres ont été notés tels que l'apparence du filtrat, la quantité de mycélium récoltée, le volume de filtrat ayant subi l'extraction de même que la quantité de gommes récoltées suite à l'extraction (tableaux 63 à 66).

**Tableau 63.** Apparence des milieux de culture ayant supporté la croissance des souches de *Trichoderma harzianum* après filtration pour l'extraction de métabolites – expérience 1

Traitement	Couleur
Témoin	Jaune pâle (PDB)
RootShield	Rouge
MAUL-20	Orangé

**Tableau 64.** Quantité de mycélium récolté lors de la filtration pour les souches de *Trichoderma harzianum* pour l'extraction de métabolites – expérience 1

Traitement	Poids du mycélium frais (g)	Poids du mycélium séché (g)
Témoin	0	0
RootShield	44,44	4,65
MAUL-20 *	19,53	2,50

\* La filtration du milieu ayant supporté la culture de *T. harzianum* MAUL-20 a exigée plus de coton fromage que les autres milieux. Il y a donc eu plus de perte de mycélium dans le coton fromage pour ce traitement.

**Tableau 65.** Volumes de milieu de culture et d'acétate d'éthyle utilisés lors de l'extraction de métabolites pour les différents traitements – expérience 1

Traitement	Volume de milieu de culture (ml)	Volume d'acétate d'éthyle (ml)
<b>Témoin</b>	2250	750
<b>RootShield</b>	2200	733
<b>MAUL-20 *</b>	1900	633

\* Une forte émulsion a été obtenue lors de l'extraction à l'acétate d'éthyle du milieu ayant supporté la croissance de *T. harzianum* MAUL-20.

**Tableau 66.** Poids des gommages obtenues suite à l'évaporation de l'acétate d'éthyle pour les différents traitements pour l'extraction des métabolites – expérience 1

Traitement	Poids de la gomme (g)
<b>Témoin</b>	0,0631
<b>RootShield</b>	1,0062
<b>MAUL-20 (phase acétate d'éthyle)</b>	0,8945
<b>MAUL-20 (émulsion) *</b>	0,0468

\* L'émulsion ne se dissolvait pas dans l'acétate d'éthyle. Il s'agissait d'une fraction associée à la phase aqueuse.

Aucune zone d'inhibition n'a été notée lors de la croissance des bactéries *S. aureus* et *E. coli* ou lors de la croissance des champignons *B. cinerea* et *S. cepivorum* et ce, pour les traitements témoin, RootShield et MAUL-20. Par contre, une zone d'inhibition a été observée lors de la croissance de *B. subtilis* en présence d'un disque antibiogramme contenant 20 µg de l'extrait de métabolites neutres obtenu lors de l'évaporation de la fraction acétate d'éthyle ayant servi à l'extraction du milieu ayant supporté la croissance de *T. harzianum* T-22 (RootShield) (tableau 67).

**Tableau 67.** Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance de la bactérie *Bacillus subtilis* en présence d'extraits de métabolites neutres issus de milieu de culture ayant supporté la croissance de souches de *Trichoderma harzianum* – expérience 1

Traitement	Quantité d'extraits de métabolites neutres (µg)	Rayon d'inhibition moyen (mm)	Intensité de l'inhibition *
<b>Témoin</b>	20	0	-
	2	0	-
	0,2	0	-
<b>RootShield</b>	20	1,0	+
	2	0	-
	0,2	0	-
<b>MAUL-20</b>	20	0	-
	2	0	-
	0,2	0	-

\* Intensité de l'inhibition : - : pas d'inhibition, + : rayon d'inhibition < 5 mm, ++ : rayon d'inhibition > 5,1 mm

## Deuxième essai

Un deuxième essai a été réalisé en juillet 2005. Les métabolites neutres et acides ont été évalués à raison de 50 et 75 µg d'extrait de métabolites par disque antibiogramme. Différents paramètres ont été notés tels que l'apparence du filtrat, la quantité de mycélium récoltée, le volume de filtrat ayant subi l'extraction de même que la quantité de gommages récoltés suite à l'extraction (tableaux 68 à 72).

**Tableau 68.** Apparence des milieux de culture ayant supporté la croissance des souches de *Trichoderma harzianum* après filtration pour l'extraction de métabolites neutres et acides – expérience 2

Traitement	Couleur
Témoin	Jaune pâle (PDB)
RootShield	Rouge-orangé
MAUL-20	Orangé

**Tableau 69.** Quantité de mycélium récolté lors de la filtration pour les souches de *Trichoderma harzianum* pour l'extraction de métabolites neutres et acides – expérience 2

Traitement	Poids du mycélium frais (g)	Poids du mycélium séché (g)
Témoin	0	0
RootShield	76,3	10,8
MAUL-20	42,9	2,7

**Tableau 70.** Volumes de milieu de culture et d'acétate d'éthyle utilisés lors de l'extraction de métabolites neutres et acides pour les différents traitements – expérience 2

Traitement	Volume de milieu de culture (ml)	Volume d'acétate d'éthyle (ml)
Témoin	2 360	780
RootShield *	2 300	760
MAUL-20 *	2 300	760

Une émulsion a été obtenue lors de l'extraction à l'acétate d'éthyle du milieu ayant supporté la croissance de *T. harzianum* MAUL-20 et RootShield. De l'acétone a donc été ajoutée pour remédier à l'émulsion.

**Tableau 71.** Poids des gommages obtenus suite à l'évaporation de l'acétate d'éthyle pour les différents traitements pour l'extraction des métabolites neutres – expérience 2

Traitement	Poids de la gomme (g)
Témoin	0,1958
RootShield	0,1292
MAUL-20 *	1,2895

\* La gomme obtenue avec MAUL-20 s'est avérée plus liquide que celle obtenue avec les autres traitements.

**Tableau 72.** Poids des gommages obtenues suite à l'évaporation de l'acétate d'éthyle pour les différents traitements pour l'extraction des métabolites acides – expérience 2

Traitement	Poids de la gomme (g)
Témoin	0,0945
RootShield	0,1777
MAUL-20 *	0,5497

\* La gomme obtenue avec MAUL-20 s'est avérée plus liquide que celle obtenue avec les autres traitements.

Aucune zone d'inhibition n'a été notée lors de la croissance des bactéries *S. aureus* et *E. coli* ou lors de la croissance des champignons *B. cinerea* et *S. cepivorum* et ce, pour les traitements témoin, RootShield et MAUL-20. Par contre, une zone d'inhibition a été observée lors de la croissance de *B. subtilis* en présence de disques antibiogrammes contenant 50 et 75 µg de l'extrait de métabolites neutres obtenu lors de l'évaporation de la fraction acétate d'éthyle ayant servi à l'extraction du milieu ayant supporté la croissance de *T. harzianum* T-22 (RootShield) et *T. harzianum* MAUL-20 (tableau 73). Aucune zone d'inhibition n'a été observée avec les extraits de métabolites acides.

**Tableau 73.** Mesure de la zone d'inhibition observée lors de la croissance de la bactérie *Bacillus subtilis* en présence d'extraits de métabolites neutres issus de milieu de culture ayant supporté la croissance de souches de *Trichoderma harzianum* – expérience 2

Traitement	Quantité d'extraits de métabolites neutres (µg)	Rayon d'inhibition moyen (mm)	Intensité de l'inhibition *
Témoin	0	0	-
	50	0	-
	75	0	-
RootShield	0	0	-
	50	1,5	+
	75	1,7	+
MAUL-20	0	0	-
	50	1,1	+
	75	2,7	+

\* Intensité de l'inhibition : - : pas d'inhibition, + : rayon d'inhibition < 5 mm, ++ : rayon d'inhibition > 5,1 mm

Lors des procédures visant l'extraction des peptaïboles, une masse similaire de mycélium a été récoltée pour le traitement MAUL-20 et le traitement RootShield. De même, la masse de gomme récoltée pour le traitement MAUL-20 s'est avérée supérieure à la masse récoltée pour le traitement témoin, mais inférieure à celle récoltée avec le traitement RootShield.

Lors des bioessais avec *B. subtilis*, un rayon d'inhibition inférieur à 5 mm a été noté pour tous les traitements incluant le DMSO seul. Par contre, le rayon d'inhibition obtenu avec ce traitement s'est avéré inférieur aux rayons d'inhibition mesurés pour les traitements témoin, RootShield et MAUL-20. Le rayon d'inhibition observé avec le traitement témoin laisse croire que les composés du milieu suggéré par Goulard *et al.* ont un effet inhibiteur sur la croissance de *B. subtilis* lorsque concentrés par des procédés tels que la filtration, l'extraction avec du n-butanol et l'évaporation de ce solvant. Ces mêmes composés sont probablement aussi dissous dans le DMSO et ainsi déposés sur les disques antibiogrammes. Si le rayon d'inhibition observé avec MAUL-20 s'apparente à celui obtenu avec le traitement témoin, le rayon d'inhibition mesuré avec le traitement RootShield demeure inférieur. Ceci s'explique peut-être par une utilisation plus importante des composés du milieu par la souche de *T. harzianum* T-22 (RootShield) en comparaison avec la souche MAUL-20. Les composés étant moins présents dans le milieu, ils auraient donc un impact plus faible sur la croissance de la bactérie *B. subtilis*. Un autre milieu de culture serait probablement plus adéquat pour vérifier l'effet des extraits de souches de *T. harzianum* sur la croissance de *B. subtilis*. En ce qui concerne les bioessais menés avec *S. aureus*, une zone d'inhibition inférieure à 5 mm a été observée pour les traitements MAUL-20 et RootShield. Il semble que cette inhibition ne soit pas liée à la présence de DMSO ou de composés issus du milieu suggéré par Goulard *et al.*, mais bien de composés produits par les souches de *T. harzianum*. Quant à la croissance de la souche de *E. coli* utilisée, elle ne semble pas affectée par les composés produits par les souches de *T. harzianum*.

Lors des bioessais menés avec *B. cinerea* et *S. cepivorum*, une réduction de la croissance mycélienne a été notée en présence du méthanol dans le milieu de culture. Par contre, le protocole demandait de comparer le diamètre de croissance obtenu avec les traitements témoin, MAUL-20 et RootShield au traitement méthanol seul et ainsi de déterminer le pourcentage d'inhibition en comparant avec le traitement méthanol seul. Ainsi, aucune inhibition de croissance n'a été observée avec *B. cinerea*. Dans le cas de *S. cepivorum*, les traitements témoin et MAUL-20 ne se sont pas distingués du traitement méthanol (98,7 et 94,5 % de croissance) alors qu'une inhibition de la croissance a été observée avec le traitement RootShield (74,6 % de croissance en comparaison avec le méthanol seul).

Lors des procédures visant l'extraction de divers métabolites, le filtrat obtenu avec le traitement MAUL-20 s'est avéré plus pâle que le filtrat obtenu avec le traitement RootShield. De même, la masse de mycélium récoltée pour le traitement MAUL-20 s'est avérée inférieure à celle récoltée pour le traitement RootShield. La masse de gomme obtenue avec MAUL-20 était similaire à celle obtenue avec RootShield lors du premier essai alors que lors du deuxième essai, la masse de gomme obtenue avec MAUL-20 s'est avérée supérieure à celle obtenue avec RootShield. En effet, une certaine quantité d'eau présente dans l'échantillon n'a pu être évaporée.

Lors des bioessais, seul un effet sur la croissance de *B. subtilis* a été noté et ce, pour les bioessais menés avec les gommes issues de l'extraction à l'acétate d'éthyle à pH neutre. Un rayon d'inhibition inférieur à 5 mm a été observé pour les traitements MAUL-20 et RootShield à des concentrations de 50 et 75 µg lors du deuxième essai alors qu'un rayon d'inhibition inférieur à 5 mm a été mesuré seulement pour le traitement RootShield à une concentration de 20 µg lors du premier essai. En ce qui concerne les bioessais menés avec *B. cinerea* et *S. cepivorum*, aucune inhibition de croissance mycélienne n'a été observée.

## Conclusion

Il apparaît donc que certains composés produits par MAUL-20 ont un effet sur la croissance bactérienne au même titre que RootShield. Par ailleurs, aucun effet n'a été observé sur la croissance mycélienne avec MAUL-20 à l'instar de RootShield. Par contre, les solvants tels que l'acétate d'éthyle et le n-butanol peuvent accumuler plusieurs composés autres que des peptaiboles et / ou métabolites qui peuvent s'avérer toxiques pour certains organismes lorsque présents en grande concentration. Il serait donc important d'identifier ces composés avant de prétendre qu'il s'agit d'antibiotiques.

## Bibliographie

**Dickinson, J. J. Hanson et P. Hitchcock. 1989.** Structure and biosynthesis of harzianopyridone, and antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. J. Chem. Soc. Perkins Trans. 1 : 1885–1887.

**Faull, J.L., K.A. Graeme-Cook et B.L. Pilking. 1994.** Production of an insonitirile antibiotic by an UV-Induced mutant of *Trichoderma harzianum*. Phytochemistry 5 : 1273–1276.

**Goulard, C., S. Hlimi, S. Rebuffat et B. Bodo. 1995.** Trichorzins HA and MA, Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum* I. Fermentation, Isolation and Biological Properties. The Journal of Antibiotics 48 : 1248–1253.

**Sawa, R., Y. Mori, H. Iinuma, H. Naganawa, M. Hamada, S. Yoshida, H. Furutani, Y. Kajimura, T. Fowa, et T. Takeuchi. 1994.** Harzianic acid, a new antimicrobial antibiotic from a fungus. The Journal of Antibiotics 47 : 731–732.

## 5.3 PHASE 2 ET 3. ESSAIS SUR LE TERRAIN

### 5.4 ÉTAPE 2. BIOFONGICIDES

#### 5.4.1 ACTIVITÉ 1. Expérience #1 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Botrytis cinerea* sur la tomate de serre

Le semis a été effectué le 17 octobre et le repiquage le 4 novembre dans les serres de l'Université Laval. Le 27 novembre, la plantation a été effectuée et le suivi de l'expérience s'est terminé le 27 mai 2004. Le premier effeuillage et la première inoculation des agents de lutte biologiques ont été réalisés le 7 janvier 2004. L'annexe 9 montre le suivie phytosanitaire et les traitements réalisés dans la serre.

Avant les traitements, des blessures d'effeuillage ont été prélevées à l'aide d'un exacto afin de vérifier la présence et le développement des agents biologiques introduits. Les morceaux de tissus ont été déposés, sans désinfection, sur des milieux PDA avec antibiotiques (PDA++) et observés après 4 à 7 jours de croissance. Le tableau 74 résume les observations enregistrées. Tout au long des observations, RootShield et MAUL-20 ont été abondamment observés tandis que *Gliocladium* se faisait plus timide. D'ailleurs, Prestop croît moins rapidement que les deux souches de *Trichoderma*, ce qui constitue en soit un inconvénient par rapport aux deux autres agents biologiques. *Botrytis* a été fréquemment remarqué dans le traitement Prestop dès le début des observations. Un mois avant la fin de l'expérience, *Botrytis* a été dénombré dans toutes les parcelles traitées biologiquement, l'inoculum de ce dernier étant plus important dans la serre suite aux nombreuses introductions réalisées. Des contaminants de type saprophyte pour la majorité ont également été notés.

**Tableau 74.** Observations microscopiques des organismes présents à la surface des blessures d'effeuillage récoltées avant chaque traitement

Date de prélèvement	Date d'observation	Traitement	Agent biologique	Autres organismes
10-02-04	16-02-04	RootShield	+++	<i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Botrytis</i>
		MAUL-20	+++	<i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i>
		Prestop	+	<i>Penicillium</i> <i>Trichoderma</i>
24-02-04	02-03-04	RootShield	+++	??? Gros mycélium floconneux
		MAUL-20	+++	<i>Penicillium</i>
		Prestop	+	<i>Penicillium</i> <i>Trichoderma</i> <i>Botrytis</i>
09-03-04	15-03-04	RootShield	+++	<i>Penicillium</i>
		MAUL-20	+++	<i>Penicillium</i> <i>Botrytis</i>
		Prestop	+	<i>Penicillium</i> <i>Botryosporium</i>

**Tableau 74 (suite).** Observations microscopiques des organismes présents à la surface des blessures d'effeuillage récoltées avant chaque traitement

Date de prélèvement	Date d'observation	Traitement	Agent biologique	Autres organismes
24-03-04	30-03-04	RootShield	+++	<i>Penicillium</i>
		MAUL-20	+++	<i>Penicillium</i> <i>Gliocladium</i>
		Prestop	+	<i>Penicillium</i> <b><i>Botrytis</i></b>
07-04-04	12-04-04	RootShield	+++	??? Gros mycélium floconneux
		MAUL-20	+++	<i>Penicillium</i>
		Prestop	+	<i>Penicillium</i> <b><i>Botrytis</i></b>
		Témoin	---	<i>Penicillium</i> ??? Gros mycélium floconneux
20-04-04	26-04-04	RootShield	+++	<i>Penicillium</i> <b><i>Botrytis</i></b>
		MAUL-20	+	<i>Penicillium</i> <b><i>Botrytis</i></b>
		Prestop	+	<i>Penicillium</i> <b><i>Botrytis</i></b>
		Témoin	---	<i>Penicillium</i> <b><i>Botrytis</i></b> <b><i>Trichoderma (1/3)</i></b>
04-05-04	10-05-04	RootShield	+++	<i>Penicillium</i> <b><i>Botrytis</i></b> ??? Gros mycélium floconneux
		MAUL-20	+++	<i>Penicillium</i> <b><i>Botrytis</i></b> <i>Acremonium</i>
		Prestop	+	<i>Penicillium</i> <b><i>Botrytis</i></b> Bactéries
		Témoin	---	<i>Penicillium</i> <b><i>Botrytis</i></b>
		Fongicides	---	<i>Penicillium</i> Bactéries

**Légende :**

+ = < 25% de la gélose recouverte  
 ++ = 25-50% de la gélose recouverte  
 +++ = >50% de la gélose recouverte

Le suivi des chancres, tant en badigeonnages qu'en pulvérisation, a été décevant car malgré le haut niveau de maladie dans la serre, *Botrytis* s'est peu exprimé sur les tiges de tomate. Le tableau 75 résume les observations faites sur les plants suite aux traitements effectués en pulvérisation. Il est bon de noter que des chancres se sont quand même développés même si des traitements en pulvérisation étaient effectués (sauf dans le témoin). Les traitements biologiques (5, 6 et 3 chancres) semblent moins bien protéger les plants que les traitements fongiques (2 chancres). L'analyse statistique (loi de Poisson) n'a révélée aucune différence significative entre les traitements mais une différence significative a été enregistrée par rapport au témoin.

Le tableau 76 montre les observations réalisées sur les plants suite au retrait du chancre et au badigeonnage de ces blessures. Dans ce type d'observations, il est important de comprendre que le traitement est efficace que lorsque le chancre enlevé ne reprend pas vie. Si une reprise est observée, il peut s'agir **1)** le produit appliqué a été mal mis ou ne couvrait pas totalement la plaie à protéger, **2)** l'agent pathogène n'a pas été complètement enlevé ou **3)** le produit est inefficace à contrôler adéquatement l'agent pathogène visé. Malgré le fait que peu de chancres aient été enlevés, il semble que le vinaigre et Prestop soient moins efficaces à contrôler *Botrytis* que les deux produits à base de *Trichoderma*. Aucune analyse statistique n'a pu être faite à cause du faible nombre de chancres enregistrés.

**Tableau 75.** Nombre de chancres de *Botrytis cinerea* observé pour les différents traitements en pulvérisation

Traitement	Répétition	Nombre de chancres
<b>Témoin</b>	1	3
	2	5
	3	3
	<b>Total</b>	<b>11</b>
<b>Fongicides</b>	1	0
	2	1
	3	1
	<b>Total</b>	<b>2</b>
<b>Prestop</b>	1	2
	2	2
	3	1
	<b>Total</b>	<b>5</b>
<b>MAUL-20</b>	1	3
	2	2
	3	1
	<b>Total</b>	<b>6</b>
<b>RootShield</b>	1	2
	2	0
	3	1
	<b>Total</b>	<b>3</b>

**Tableau 76.** Nombre de chancres de *Botrytis cinerea* observé pour les différents traitements en badigeonnage

Traitement	Répétition	Nombre de chancres	Reprise des chancres
<b>Vinaigre (témoin)</b>	1	1	1
	2	0	0
	3	2	0
	<b>Total</b>		
<b>Prestop</b>	1	4	0
	2	3	1
	3	2	1
	<b>Total</b>		
<b>MAUL-20</b>	1	1	0
	2	1	0
	3	3	0
	<b>Total</b>		
<b>RootShield</b>	1	0	0
	2	0	0
	3	1	0
	<b>Total</b>		

Les rendements ont été pris sur une période de 15 semaines à raison de 2 fois / semaine. L'annexe 10 montre les données obtenues. La majorité des fruits obtenus étaient de catégorie #1 (fig. 19) et les traitements effectués en pulvérisation ont tous donné des rendements légèrement supérieurs (sauf MAUL-20) à ceux réalisés en badigeonnages ou lorsque comparé au témoin. Les plus forts rendements ont été enregistrés dans le traitement fongique. Malgré ce fait, aucune différence statistique n'a été décelée entre les traitements faits en pulvérisation et en badigeonnages (par ex. entre Prestop badigeonnage vs Prestop pulvérisation), ni par rapport au témoin. Statistiquement, aucune différence n'a été notée entre les poids moyen/fruit de catégorie #1 (fig. 20). Les analyses statistiques étaient une Anova avec comparaisons à priori.

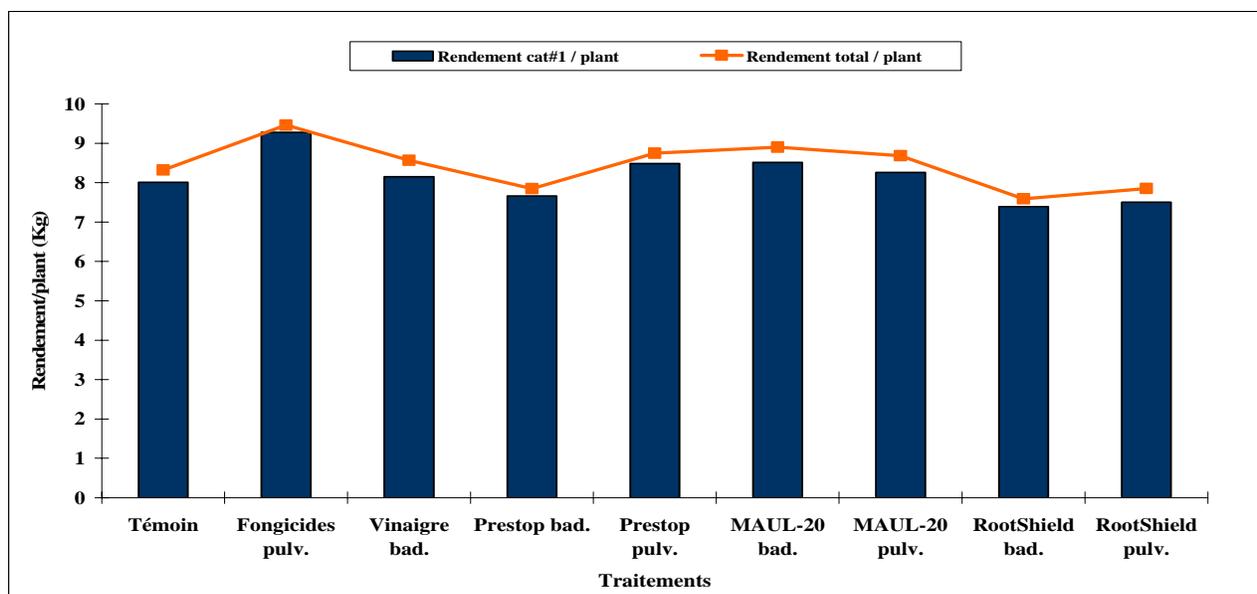


Figure 19. Rendement total en fruits et en fruits de catégorie #1 pour 30 récoltes

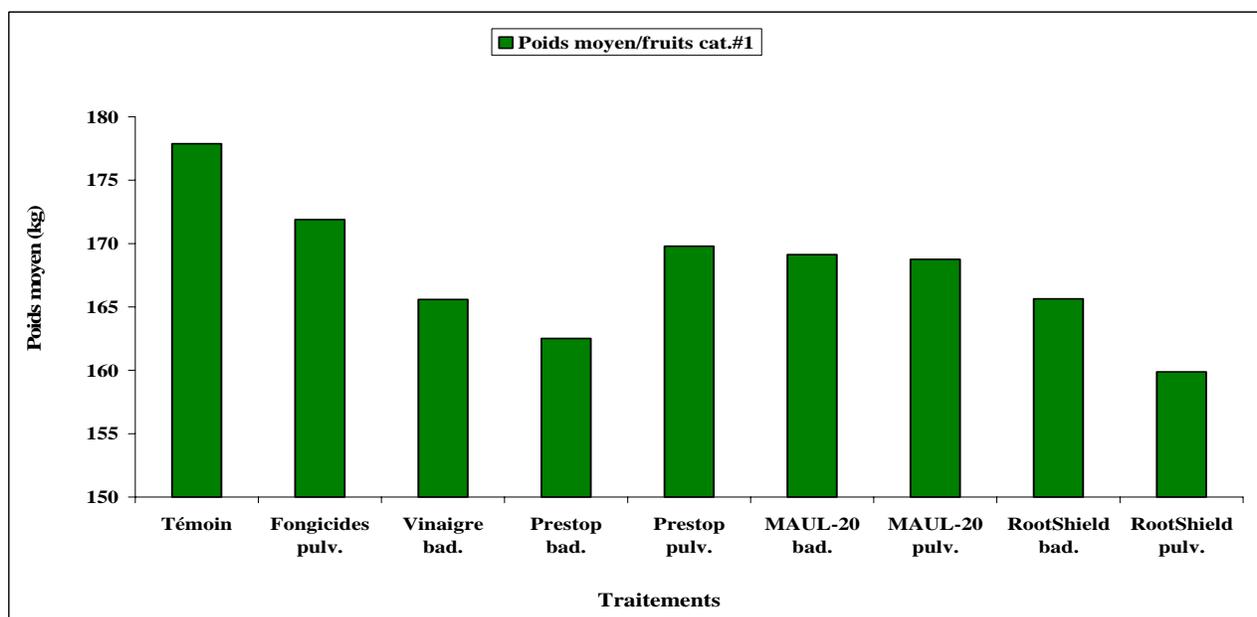


Figure 20. Poids moyen en fruit de catégorie #1 pour 30 récoltes

#### 5.4.2 ACTIVITÉ 2. Expérience #2 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Botrytis cinerea* sur la tomate de serre

Le semis a été effectué le 19 juillet 2004 et le repiquage a été fait le 9 août 2004 et les plants ont été placés directement dans la serre afin de faciliter leur acclimatation. La plantation a eu lieu le 24 août 2004. L'expérience se terminera le 17 décembre après 4 mois de culture. Le tableau 77 résume la régie phytosanitaire actuellement réalisée dans la serre. Le premier effeuillage à la main a été fait le 16 septembre

2004 et ce, seulement pour les parcelles destinées aux traitements en pulvérisation. Ces traitements ont d'ailleurs été effectués dans la même journée (tab. 77).

**Tableau 77.** Suivie phytosanitaire et traitements réalisés dans la serre de l'Université Laval – expérience #2

Date	Lutte aux insectes	Traitements en pulvérisation	Traitements en badigeonnage	Traitements chimiques	Introduction de <i>Botrytis</i>
16-09-04	<i>Encarsia formosa</i>	oui		Rovral	oui
23-09-04					oui
30-09-04		oui		Botran	
07-10-04	<i>Encarsia formosa</i>				oui
14-10-04		oui		Decree	
22-10-04					oui
28-10-04	<i>Encarsia formosa</i>	oui		Rovral	
04-11-04					oui
11-11-04		oui		Botran	
18-11-04	<i>Encarsia formosa</i>				oui
25-11-04				Decree	

La semaine suivant la première pulvérisation, un effeuillage a été effectué dans les parcelles témoins et les parcelles destinées au badigeonnage. Une pulvérisation de *B. cinerea* a été faite dans la même journée afin de favoriser l'implantation de l'agent pathogène. Par la suite, *B. cinerea* a été introduit dans la serre à raison de 3 litres d'une suspension de  $10^5$  spores / ml à chaque 2 semaines, soit la semaine sans pulvérisation de biofongicides et de fongicides. La dernière introduction de *B. cinerea* a été faite le 18 novembre 2004.

Une application de Enstar II (50 ml / 100 L) et une application de Avid 1,9 % EC (1 ml / L) en début de culture ont permis de lutter contre les pucerons verts du pêcher et les thrips des petits fruits (16 et 22 août 2004). De même, *Orius insidiosus* a été introduit pour réprimer les thrips des petits fruits (1<sup>er</sup> septembre 2004). Par la suite, *Encarsia formosa* a été introduit dans la serre de façon régulière afin de prévenir les infestations d'aleurodes des serres. Une application de Soufre microfin 92 % (2 g / L) a été faite pour contrer le blanc le 12 octobre 2004.

### Vérification de la présence des agents de lutte biologique

Afin de vérifier la présence des agents de lutte biologique dans les parcelles ayant reçu les traitements en pulvérisation, des blessures d'effeuillage ont été prélevées au hasard dans chacune des répétitions. Avant chaque nouvelle pulvérisation, des blessures d'effeuillage cicatrisées ont été prélevées dans la partie de la tige traitée lors de la pulvérisation précédente afin d'avoir une certaine homogénéité quant au stade des tissus prélevés. Les prélèvements ont ensuite été mis en culture sur PDA à raison de trois morceaux de tissu par plat de Pétri. Les plats de Pétri ont été incubés 7 jours à 24°C le jour et 18°C la nuit avec une photopériode de 16 heures. Par la suite, les organismes présents sur le milieu de culture ont été identifiés à l'aide d'une loupe binoculaire, d'un microscope inversé et / ou d'un microscope optique.

## **Décompte des chancres présents sur les tiges**

L'efficacité des traitements préventifs a été mesurée par le nombre de chancres s'étant développés suite à l'application de traitements en pulvérisation. L'efficacité des traitements curatifs a été mesurée par le taux de reprise des chancres éliminés et badigeonnés. Le décompte des chancres présents sur les tiges a été effectué une fois par semaine. Les chancres observés dans les parcelles témoins ont été notés et laissés sur les plants. Les chancres observés sur les plants destinés aux traitements en pulvérisation ont été dénombrés puis, éliminés. Les blessures ainsi créées ont été badigeonnées au Ferbam (ratio 1 : 1 de Ferbam et d'eau). Quant aux chancres observés sur les plants destinés aux traitements en badigeonnage, ils ont été notés, éliminés et badigeonnés selon le traitement concerné (vinaigre, Prestop, MAUL-20 ou RootShield). À la fin de l'expérience, les chancres éliminés et badigeonnés ont été prélevés à l'aide d'un couteau de type exacto afin de s'assurer qu'il n'y avait pas eu reprise par l'agent pathogène. L'analyse statistique portant sur le nombre de chancres des traitements en pulvérisation était basée sur une régression de Poisson et une comparaison des moyennes par contrastes polynomiaux. L'analyse statistique portant sur l'efficacité des traitements en badigeonnage consistait en une régression logistique avec comparaison des moyennes par contrastes polynomiaux.

## **Vérification de la présence de *Botrytis cinerea* sur les chancres**

Dans le but de vérifier que *B. cinerea* était bien l'agent causal des chancres observés, ces derniers ont été prélevés sur les tiges infectées et mis en culture sur PDA à raison de trois morceaux de tissu par plat de Pétri. Les plats de Pétri ont été incubés pendant 7 jours à 24°C le jour et 18°C la nuit avec une photopériode de 16 heures. L'identification des organismes présents sur la gélose s'est faite à l'aide d'une loupe binoculaire, d'un microscope inversé et / ou d'un microscope optique.

## **Rendements**

Afin de vérifier l'impact des traitements sur les plants de tomate, les rendements ont été évalués. Deux récoltes par semaine ont permis de mesurer le rendement total et de classer les fruits selon 3 catégories. La catégorie #1 comprenait les fruits sans défaut de 90 à 400 grammes. La catégorie #2 correspondait aux fruits sans défaut de 70 à 90 grammes et la catégorie #3 comprenait les fruits avec défaut ou d'un poids inférieur à 70 ou supérieur à 400 grammes. Les défauts pouvaient être d'origines variées dont la déformation, des blessures mécaniques, la pourriture apicale, etc. Les catégories #1 et 2 constituaient la part de fruits vendables. L'analyse statistique des rendements était une ANOVA avec comparaison des moyennes par LSD protégé.

## **Vérification de la présence des agents de lutte biologique sur les tiges**

Les mises en culture de blessures d'effeuillage cicatrisées sur PDA ont permis de vérifier la présence des trois agents de lutte biologique sur les tiges de tomate avant chaque nouvelle pulvérisation. Ces mêmes agents de lutte n'ont pas été décelés dans les mises en culture de tissus prélevés dans les parcelles témoins ou sous traitement fongicide.

## **Décompte des chancres présents sur les tiges**

Au cours de la deuxième expérience en serre expérimentale, 20 chancres ont été observés dans les parcelles témoins, soit une moyenne de 6,7 chancres par répétition. De même, huit chancres ont été dénombrés dans les parcelles traitées avec les fongicides en pulvérisation (2,7 chancres par répétition). Dans les parcelles

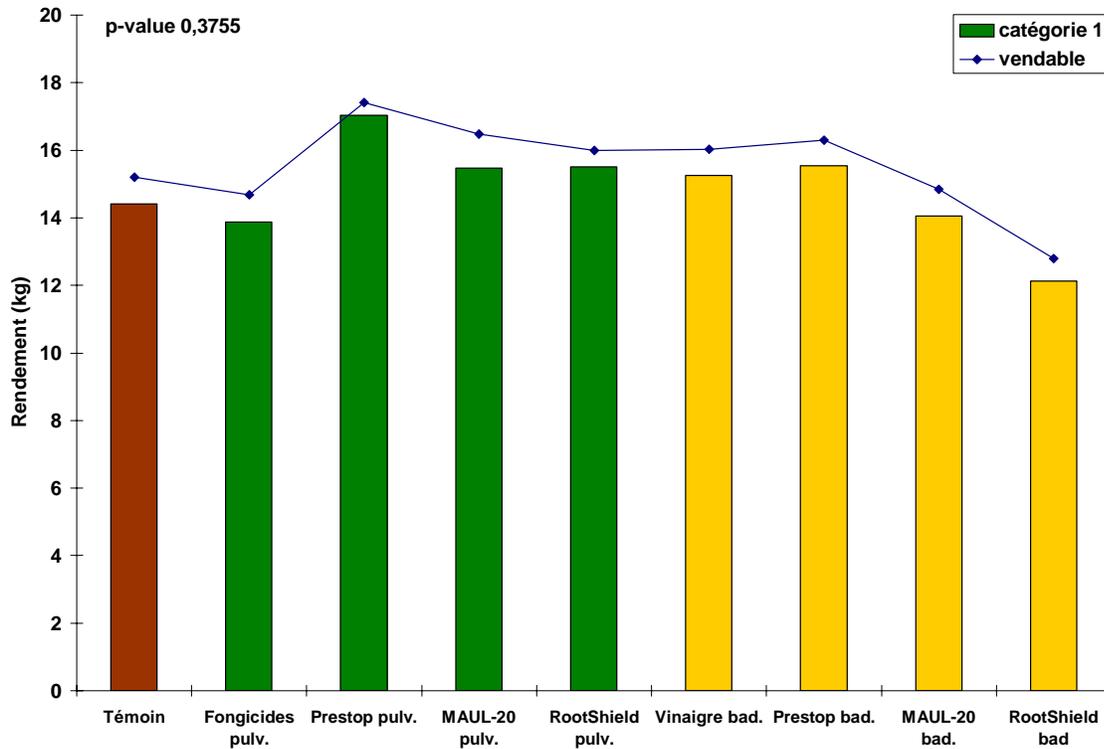
traitées avec le Prestop en pulvérisation, trois chancres ont été observés (un chancre par répétition). Quant aux parcelles traitées avec MAUL-20 en pulvérisation, on a recensé 11 chancres (3,67 chancres par répétition). Dans les parcelles destinées à la pulvérisation avec RootShield, sept chancres ont été dénombrés (2,3 chancres par répétition). L'analyse statistique, une régression de Poisson a démontré qu'il y avait une différence significative entre certains traitements ( $Pr > ChiSq : 0,0112$ ). La comparaison des moyennes par contrastes polynomiaux a démontré que tous les traitements avaient permis une répression significative de la maladie en comparaison avec le témoin ( $Pr > ChiSq : 0,001$ ). De plus, les biofongicides ont permis une répression équivalente à celle démontrée par les fongicides ( $Pr > ChiSq : 0,7508$ ). Selon cette même analyse statistique, tous les biofongicides ont permis une répression similaire du chancre de la tige ( $Pr > ChiSq : 0,0809$ ).

### **Efficacité des traitements en badigeonnage**

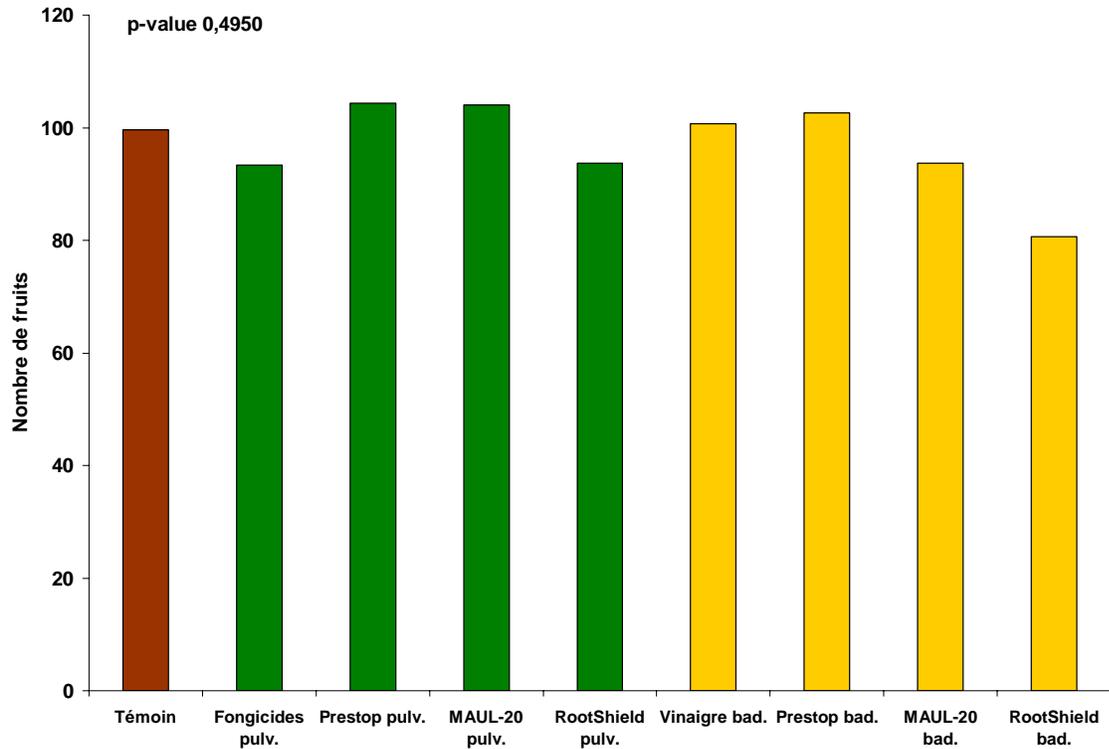
Dans cette deuxième expérience en serre expérimentale, le badigeonnage à base de Prestop a démontré une efficacité maximale, aucun des neuf chancres badigeonnés n'ayant démontré de reprise par l'agent pathogène. Dans les parcelles destinées au badigeonnage avec le MAUL-20, 13 chancres ont été badigeonnés et un seul a repris suite au traitement. Quant au badigeonnage avec RootShield, huit chancres ont été badigeonnés alors qu'un seul a repris suite au traitement. Dans les parcelles destinées au badigeonnage avec le vinaigre, neuf chancres badigeonnés sur 10 ont repris suite au traitement. L'analyse statistique, une régression logistique ( $Pr > ChiSq : < 0,0001$ ) avec contrastes polynomiaux pour comparer les moyennes des traitements, a révélé que tous les biofongicides avaient donné une efficacité similaire ( $Pr > ChiSq : 0,2162$ ) alors que le vinaigre a permis une efficacité inférieure à celle des biofongicides ( $Pr > ChiSq : < 0,0001$ ). Il en résulte une efficacité maximale pour le Prestop en badigeonnage, une efficacité de 92 % avec le MAUL-20 et de 87 % avec le RootShield en badigeonnage. Quant au vinaigre en badigeonnage, une efficacité de 10 % a été notée. L'aspect des chancres badigeonnés avec les biofongicides était le même que lors du premier essai.

### **Évaluation des rendements**

En raison de la grande variabilité intra-traitement, le rendement moyen en fruits vendables et en fruits de catégorie #1, de même que le nombre de fruits se sont avérés similaires pour chacun des traitements selon l'ANOVA (figures 21 et 22). En ce qui concerne le poids moyen des fruits de catégorie #1, la comparaison des moyennes par LSD protégé a permis de constater que seuls les traitements Prestop en pulvérisation et RootShield en pulvérisation se sont démarqués du témoin au niveau du poids moyen par fruit (figure 23). Les poids moyens par fruit des traitements fongicides en pulvérisation, MAUL-20 en pulvérisation de même que tous les traitements en badigeonnage étaient similaires au témoin. Selon une analyse statistique basée sur une ANOVA et une comparaison des moyennes par un LSD protégé, le rendement en fruits non-vendables (p-value 0,4493) et le pourcentage moyen du rendement non-vendable (p-value 0,1658) se sont avérés équivalents pour les différents traitements (tableau 78).



**Figure 21.** Évaluation des rendements vendables et des rendements en fruits de catégorie #1 issus des plants de tomate (cv. Trust) sous traitements fongicides et biofongicides en pulvérisation et en badigeonnage utilisés pour réprimer le chancre de la tige causé par *Botrytis cinerea* pour le deuxième essai en serre expérimentale mené au Centre de recherche en horticulture de l'Université Laval



**Figure 22.** Évaluation du nombre de fruits de catégorie #1 issus des plants de tomate (cv. Trust) sous traitements fongicides et biofongicides en pulvérisation et en badigeonnage utilisés pour réprimer le chancre de la tige causé par *Botrytis cinerea* pour le deuxième essai en serre expérimentale mené au Centre de recherche en horticulture de l'Université Laval

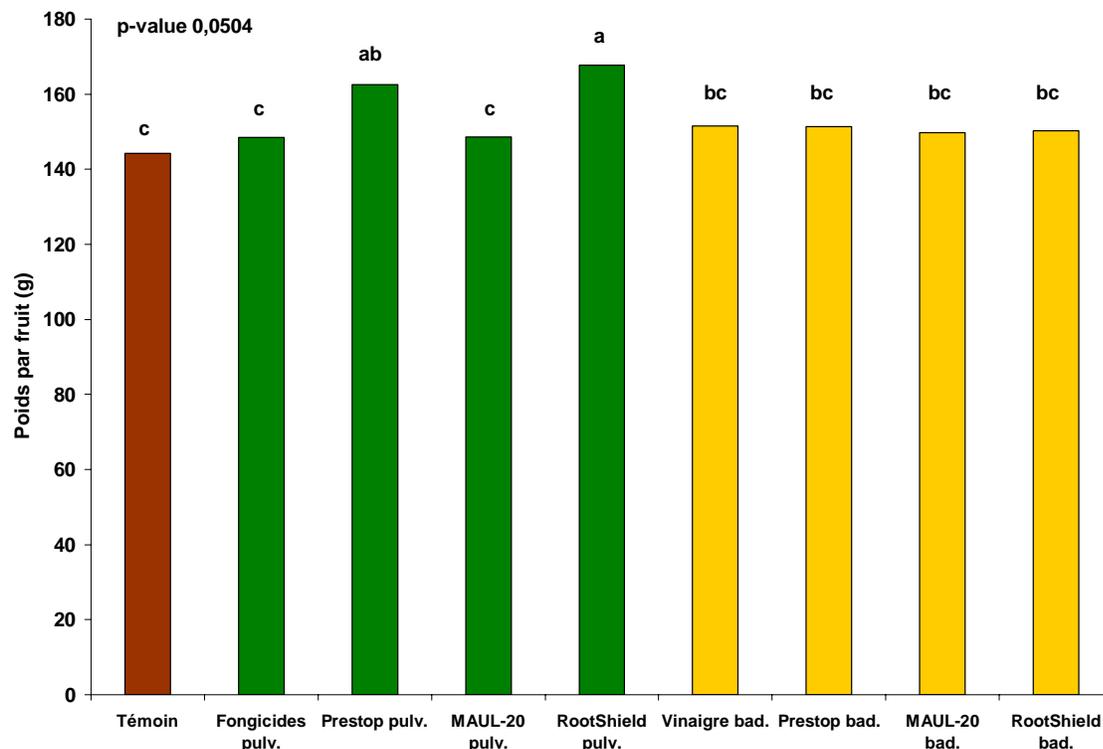


Figure 23. Évaluation du poids des fruits de catégorie #1 issus des plants de tomate (cv. Trust) sous traitements fongicides et biofongicides en pulvérisation et en badigeonnage utilisés pour réprimer le chancre de la tige causé par *Botrytis cinerea* pour le deuxième essai en serre expérimentale mené au Centre de recherche en horticulture de l'Université Laval. Les valeurs identifiées par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de comparaison des moyennes LSD de Fisher ( $P < 0,05$ )

Tableau 78. Fraction du rendement total en fruits de tomate associée au rendement non-vendable pour les traitements fongicides et biofongicides en pulvérisation et en badigeonnage – expérience #2, Université Laval, Québec

Traitement	Rendement total moyen (kg)	Rendement non-vendable moyen (kg)	% moyen du rendement non-vendable
Témoin	16,0	0,8	5,45
Fongicides en pulvérisation	15,5	0,8	5,42
Prestop en pulvérisation	18,5	1,1	6,11
MAUL-20 en pulvérisation	17,2	0,7	4,46
RootShield en pulvérisation	16,6	0,6	4,09
Vinaigre en badigeonnage	16,7	0,7	4,48
Prestop en badigeonnage	17,5	1,2	6,97
MAUL-20 en badigeonnage	15,5	0,7	4,66
RootShield en badigeonnage	14,2	1,4	10,38

Tous les biofongicides utilisés comme traitements préventifs en pulvérisation ont permis une répression significative du chancre de la tige causé par *B. cinerea* chez la tomate de serre en comparaison avec le

témoin. De même, la répression offerte par les biofongicides en pulvérisation s'est avérée équivalente à celle offerte par les fongicides en pulvérisation. L'efficacité des biofongicides Prestop, RootShield et MAUL-20 comme traitements curatifs en badigeonnage s'est avérée similaire. L'efficacité des biofongicides était d'ailleurs supérieure à celle du vinaigre en badigeonnage.

D'abord, la présence des agents de lutte biologique *T. harzianum* MAUL-20, *T. harzianum* KRL-AG2 et *G. catenulatum* J1446 sur les tiges de tomate démontre le développement et la persistance de ces organismes lorsque soumis aux conditions climatiques prévalant dans les serres. La colonisation des tiges de tomate par ces organismes antagonistes permet ainsi la mise en œuvre de l'un des principaux modes d'action des *Trichoderma* et des *Gliocladium* soit, la compétition pour l'espace bien que d'autres modes d'action puissent être utilisés.

La présence des agents de lutte biologique pulvérisés sur les tiges de tomate a permis une répression du chancre de la tige causé par *B. cinerea*. Une répression significative de la maladie a été observée pour tous les traitements en pulvérisation en comparaison avec le témoin. De même, l'efficacité des biofongicides en pulvérisation Prestop, MAUL-20 et RootShield s'est avérée similaire à celle des fongicides couramment employés par les producteurs.

D'un point de vue biologique, certains biofongicides ont mieux performé que d'autres. Au cours des deux essais en serre expérimentale, le biofongicide RootShield en pulvérisation a permis une répression de la maladie similaire à celle offerte par les fongicides en pulvérisation. De même, Utkhede *et al.* (2001) et Utkhede et Mathur (2002) avaient aussi vérifié l'efficacité de RootShield en pulvérisation à réduire la taille des lésions causées par *B. cinerea*. Trois des quatre essais menés avaient démontré l'efficacité de RootShield en pulvérisation à réduire la taille des lésions causées par *B. cinerea* en comparaison avec un témoin inoculé avec *B. cinerea*. La taille des lésions observées sur les plants de tomate traités avec RootShield s'était avérée équivalente ou inférieure à celle des lésions sur les plants de tomate traités avec l'iprodione (Rovral).

En ce qui concerne le biofongicide Prestop en pulvérisation, il a permis une bonne répression de la maladie au cours du premier essai et s'est avéré particulièrement efficace lors du deuxième essai. D'un point de vue biologique, le biofongicide Prestop en pulvérisation a mieux performé que les fongicides en pulvérisation au cours du deuxième essai. C'est d'ailleurs au cours du deuxième essai que la pression de maladie a été la plus forte. Il devient alors intéressant d'utiliser le biofongicide Prestop comme traitement préventif en production commerciale. L'utilisation de Prestop permettrait en effet une réduction des matières actives appliquées. D'ailleurs, Utkhede et Mathur (2002) avaient aussi observé une réduction de la taille des lésions causées par *B. cinerea* sur les plants de tomate traités avec Prestop en pulvérisation comme traitement préventif en comparaison avec un témoin inoculé avec *B. cinerea*. De même, la répression obtenue avec Prestop en pulvérisation était similaire à celle obtenue avec le fenhexamide (Decree).

L'efficacité du biofongicide MAUL-20 en pulvérisation a été constante pour les deux essais en serre expérimentale. Le nombre de chancres observés dans les parcelles traitées avec MAUL-20 en pulvérisation s'est avéré inférieur au nombre de chancres observés dans les parcelles témoins, mais supérieur au nombre de chancres notés dans les parcelles traitées avec les fongicides. Lors du premier essai en serre expérimentale, la répression offerte par MAUL-20 en pulvérisation était semblable à celle offerte par Prestop en pulvérisation. Par contre, lors du deuxième essai en serre, la répression démontrée par MAUL-20 en pulvérisation s'est avérée moindre que celle offerte par Prestop et RootShield en pulvérisation. Plusieurs essais menés par Caron *et al.* (1994b, 1995a, 1995b, 1996a, 1997) avaient démontré l'efficacité du biofongicide MAUL-20 en pulvérisation à réprimer le chancre de la tige en comparaison avec le témoin. Cependant, cette efficacité était généralement moindre que celle des fongicides en pulvérisation. Si le biofongicide MAUL-20 en pulvérisation a permis une certaine répression de la maladie, les biofongicides RootShield et Prestop en pulvérisation se sont particulièrement démarqués, le premier pour sa constance et le deuxième pour son efficacité sous forte pression de maladie.

L'efficacité des biofongicides utilisés comme traitements curatifs en badigeonnage permet d'envisager leur utilisation en serre commerciale. Selon nos résultats, le vinaigre est toutefois un traitement curatif à effet mitigé. Par ailleurs, si l'efficacité des biofongicides comme traitements en badigeonnage importe, l'apparence du chancre badigeonné est aussi déterminante, car en production commerciale, les travailleurs n'hésitent pas à éliminer et badigeonner de nouveau un chancre s'il est d'apparence douteuse et laisse croire à la reprise du développement de l'agent pathogène. Dans le cas des biofongicides RootShield et MAUL-20, les chancres badigeonnés avaient un aspect normal, l'argile ayant recouvert les plaies cicatrisées (voir figure 1). Dans le cas du biofongicide Prestop, l'aspect des chancres badigeonnés était douteux. Les plaies traitées prenaient une couleur brun-beige et les tissus s'affaissaient légèrement. Parfois, des cloques beiges apparaissaient sur le pourtour de la plaie. Malgré l'aspect de ces chancres badigeonnés, il n'y avait pas de reprise de l'agent pathogène. Cependant, en production commerciale, de tels chancres badigeonnés seraient sans aucun doute éliminés à nouveau par les travailleurs, faisant ainsi perdre temps et argent. Il serait donc dans l'intérêt de la compagnie Verdera de travailler à l'aspect du produit pour faciliter la reconnaissance des chancres badigeonnés par les travailleurs.

L'analyse de variance a démontré que les rendements obtenus avec les différents traitements étaient similaires et ce, tant au niveau du rendement en fruits de catégorie #1, en fruits de catégorie #2, en fruits de catégorie #3, en fruits vendables ou au niveau du rendement total et ce, pour les deux essais. L'absence de différence significative s'explique par la grande variabilité intra-traitement, ce qui empêche de faire ressortir la variabilité inter-traitements et ainsi, les différences entre les divers traitements. Un plan en bloc complet ainsi qu'une quatrième répétition auraient probablement permis d'éviter cette situation. Cependant, le nombre de traitements à l'étude et l'espace disponible dans la serre expérimentale ne le permettaient pas. Bien qu'il n'y ait pas eu de différence statistique significative, des tendances intéressantes se sont dégagées pour les deux essais en serre expérimentale. La catégorie #1 constitue en majeure partie le rendement en fruits vendables alors que la catégorie #2 est plutôt négligeable. Les tendances observées au niveau du rendement en fruits vendables reflètent donc les tendances observées au niveau du rendement en fruits de catégorie #1.

Une différence de rendement en fruits vendables de 20 % lors du premier essai et 26 % lors du deuxième essai entre les différents traitements sont considérables pour un producteur. Ainsi, si tous les biofongicides en pulvérisation ont permis des rendements en fruits vendables supérieurs à celui obtenu avec le témoin, les rendements vendables obtenus avec Prestop en pulvérisation se sont avérés être les plus élevés. Si la différence entre le rendement obtenu avec le témoin et le rendement obtenu avec chacun des traitements en pulvérisation est traduite en pourcentage, Prestop a permis un gain de 16,5 et 14,4 % alors que le traitement MAUL-20 a permis un gain de 9,7 et 8,3 % et RootShield un gain de 1,3 et 5,2 % lors du premier et du deuxième essai. La tendance à la hausse du rendement en fruits vendables obtenu avec le biofongicide Prestop en pulvérisation est d'ailleurs confirmée par une différence significative au niveau du nombre de fruits de catégorie #1 par rapport au témoin lors du premier essai et par une différence significative au niveau du poids moyen par fruit de catégorie #1 par rapport au témoin lors du deuxième essai en serre expérimentale. Par ailleurs, le rendement en fruits vendables obtenu avec Prestop en pulvérisation s'est avéré supérieur au rendement en fruits vendables obtenu avec les fongicides en pulvérisation. En effet, les fongicides en pulvérisation ont permis une hausse de 15,4 % par rapport au témoin lors du premier essai, mais ont entraîné une perte de 3,4 % en comparaison avec le témoin lors du deuxième essai. Il s'agit toutefois d'une différence de 0,52 kg ou environ quatre fruits. Il apparaît donc que le biofongicide Prestop a permis une hausse du rendement vendable en comparaison avec les fongicides peu importe le niveau de maladie en plus de permettre une répression du chancre de la tige supérieure à celle des fongicides sous forte pression de maladie.

Au cours de l'essai mené par Utkhede et Mathur (2002), le rendement total issu des plants traités avec Prestop en pulvérisation s'était avéré similaire au rendement issu des plants traités avec le fenhexamide (Decree) en pulvérisation et supérieur au témoin. Au cours de trois des quatre essais menés par Utkhede *et*

al. (2001) et Utkhede et Mathur (2002), le rendement total obtenu avec RootShield en pulvérisation s'était avéré supérieur au témoin et équivalent ou supérieur à l'iprodione (Rovral) en pulvérisation. En ce qui concerne le rendement des plants traités avec MAUL-20 en pulvérisation lors des essais menés par Caron *et al.* (1994b, 1995a, 1995b, 1996a, 1997), il était soit supérieur, similaire ou inférieur au rendement des plants traités avec les fongicides en pulvérisation.

Quant aux traitements en badigeonnage, les rendements se sont avérés moins constants d'un essai à l'autre. Le vinaigre en badigeonnage a permis des rendements en fruits vendables supérieurs au témoin de 15,3 et 5,4%. Les rendements obtenus avec MAUL-20 en badigeonnage lors du premier essai correspondaient à un gain de 9,7 % en comparaison avec le témoin. Toutefois, lors du deuxième essai, les pertes de rendement associées à MAUL-20 en badigeonnage étaient de l'ordre de 2,4 %. Il s'agit cependant d'une différence de 0,37 kg ou environ trois fruits. Lors du premier essai, les rendements obtenus avec le traitement Prestop en badigeonnage correspondaient à des pertes de rendement de l'ordre de 6,3 % en comparaison avec le témoin. Le rendement obtenu avec Prestop en badigeonnage pourrait peut-être s'expliquer par le nombre élevé de chancres badigeonnés en comparaison avec les autres traitements en badigeonnage. Bien que les chancres éliminés soient traités avec un agent de lutte biologique, il n'en demeure pas moins que la blessure ainsi créée a un impact sur le transport de la sève et donc, sur la vigueur du plant. Si dans certains cas les tissus prélevés sont superficiels, il arrive que les chancres soient profonds et que les vaisseaux soient endommagés par le retrait du chancre. Lors du deuxième essai, les gains avec Prestop en badigeonnage étaient de l'ordre de 7,1 % en comparaison avec le témoin. Quant aux rendements obtenus avec RootShield en badigeonnage, ils se sont avérés inférieurs au témoin, correspondant à des pertes de l'ordre de 5,5 et 15,8 %. L'explication fournie pour Prestop en badigeonnage lors du premier essai n'est pas valide puisqu'un seul chancre a été éliminé et badigeonné et ce, pour les trois répétitions destinées à ce traitement. Ce traitement était donc comparable au témoin quant aux manipulations effectuées. La différence de 5,5 % est peut-être attribuable à la position des parcelles dans la serre. Dans le cas du deuxième essai, il s'agit d'une perte nettement plus importante de 2,4 kg. À la lumière de ces informations, il apparaît que si l'efficacité du biofongicide MAUL-20 en badigeonnage se veut similaire à celle de Prestop et RootShield en badigeonnage, il se distingue de Prestop par l'aspect visuel des chancres badigeonnés et de RootShield par l'absence d'impact sur les rendements.

Lors du premier essai en serre, le déclassement des fruits a été moins important avec les fongicides en pulvérisation, mais le déclassement avec les biofongicides en pulvérisation et en badigeonnage a été moindre que pour le témoin. Lors du deuxième essai en serre, le déclassement avec les biofongicides MAUL-20 et RootShield en pulvérisation a été moindre qu'avec les fongicides en pulvérisation et le témoin. Par contre, le déclassement avec Prestop en pulvérisation s'est avéré légèrement plus important. De même, le déclassement avec le vinaigre et MAUL-20 en badigeonnage a été moindre qu'avec le témoin alors que le déclassement avec Prestop en badigeonnage s'est avéré légèrement supérieur et que le déclassement avec RootShield en badigeonnage s'est avéré nettement plus important. Le déclassement irrégulier des fruits en serre expérimentale peut être attribuable à plusieurs facteurs. D'abord, la pollinisation est effectuée mécaniquement plutôt que par les bourdons pollinisateurs, ce qui augmente les risques de malformation des fruits. Par ailleurs, les conditions climatiques telles que la température et l'humidité ainsi que les conditions culturales telles que la fertigation peuvent avoir un impact sur la pourriture apicale et la face de chat. Il devient donc intéressant d'effectuer ces observations en serre commerciale où la pollinisation et les conditions climatiques et culturales sont optimales.

En conclusion, il apparaît que les biofongicides ont permis une répression du chancre de la tige causé par *B. cinerea* similaire à celle offerte par les fongicides en pulvérisation. En comparant les biofongicides entre eux, il apparaît que le biofongicide RootShield a permis un niveau de répression constant d'un essai à l'autre en comparaison avec les fongicides en pulvérisation. Quant au biofongicide Prestop en pulvérisation, il a permis une répression de la maladie supérieure à celle offerte par les fongicides en pulvérisation sous forte pression de maladie. Le rendement des plants traités avec Prestop en pulvérisation s'est avéré supérieur au rendement des plants traités avec les fongicides en pulvérisation lors des deux essais en serre expérimentale.

Il serait donc intéressant pour les producteurs d'inclure Prestop comme traitement en pulvérisation. De même, le rendement des plants traités avec RootShield et MAUL-20 en pulvérisation s'est avéré supérieur au témoin lors des deux essais et supérieur au rendement des plants traités avec les fongicides en pulvérisation lors du deuxième essai. En ce qui concerne le biofongicide MAUL-20 en badigeonnage, il s'est démarqué par son efficacité, l'apparence des chancres badigeonnés et l'absence d'impact sur les rendements.

#### 5.4.2.1 ACTIVITÉ 3. Expérience #1 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Pythium* sur la tomate de serre et la célosie plumeuse

##### Célosie plumeuse

Lorsque des symptômes de fonte de semis étaient observés en cours d'expérience, les plantules étaient prélevées et mis sur milieu de culture Solution Nutrient Agar avec antibiotiques (SNA++) et milieu CV8, milieu favorisant la croissance de *Pythium*. Après 2 à 3 jours de croissance, les observations microscopiques étaient faites. Le tableau 79 résume les résultats obtenus.

Chez la **célosie**, 5 plantules ont été prélevées et parmi celles-ci, 2 étaient porteuses de la maladie (*Pythium*), 2 étaient sans système racinaire et une était avec système racinaire et sans *Pythium* mais avec présence de *Trichoderma* (soit une contamination ou présence naturelle dans le substrat Bx). L'absence de système racinaire peut s'expliquer par l'action de *Pythium* sur celui-ci ou par le haut taux d'humidité du sol (saturation), ce qui a amené l'asphyxie racinaire. Le traitement 4 (Prestop + *Pythium*) est celui qui a causé le plus de dommages à la célosie. Dans ce système, il semble que Prestop protège moins bien les racines.

Chez la **tomate**, trois plantules ont été récoltées et dans les trois cas, c'est l'absence de racines qui est la cause de la mortalité. Les traitements visés comprenaient tous la présence de *Pythium* (2, 4 et 6).

**Tableau 79.** Détection de la présence de *Pythium* et des agents de lutte biologique *Trichoderma* et *Gliocladium* sur les racines des plants de tomate et de célosie en cours de production

Date de prélèvement	Traitement	Tomate	Célosie	Observations
20 juillet	3 (rep 2)	---	2 plantules	1 plantule <b>sans</b> racine 1 plantule avec racines et présence de <i>Trichoderma</i>
	4 (rep 3)	---	1 plantule	1 plantule <b>sans</b> racine
	2 (rep 2)	1 plantule	---	1 plantule <b>sans</b> racine
	4 (rep 3)	1 plantule	---	1 plantule <b>sans</b> racine
	6 (rep 1)	1 plantule	---	1 plantule <b>sans</b> racine
03 août	4 (rep 4)	---	1 plantule	Présence de <i>Pythium</i>
11 août	4 (rep 1)	---	1 plantule	Présence de <i>Pythium</i>

Remarque :

- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| 1. Témoin plante seule      | 5. <i>Trichoderma</i> MAUL-20 seul             |
| 2. Témoin <i>Pythium</i>    | 6. <i>Trichoderma</i> MAUL-20 + <i>Pythium</i> |
| 3. Prestop seul             | 7. RootShield seul                             |
| 4. Prestop + <i>Pythium</i> | 8. RootShield + <i>Pythium</i>                 |

Lors de la récolte des plants, des morceaux du système racinaire de chaque traitement et de chaque répétition ont été échantillonnés et placés sur milieu de culture PDA (traitements 1, 3, 5 et 7) et CV8 (traitements 2, 4, 6 et 8) afin de vérifier la présence de *Pythium* et des agents biologiques. Trois Pétri par traitement ont été faits. Les observations ont été réalisées après 3 et 5 jours de croissance. Le tableau 80 montre les résultats. Tous les agents biologiques introduits ont été observés sur les racines des plantes concernées et *Pythium* a également été noté dans tous les traitements comprenant *Pythium*. Il est à noter que la présence de *Trichoderma* a encore été observée dans le traitement Prestop seul (T3) en plus de l'observation de *Gliocladium*, matière active de Prestop. Les résultats sont identiques pour la célosie et la tomate. En général, les agents biologiques ont bien protégé les systèmes racinaires lorsque *Pythium* était présent. Seul le traitement 4 (Prestop + *Pythium*) n'a pas permis de retracer *Gliocladium* au niveau des racines.

**Tableau 80.** Détection de la présence de *Pythium* et des agents de lutte biologique *Trichoderma* et *Gliocladium* sur les racines des plants de tomate et de célosie lors de la récolte des plants

Date de prélèvement	Traitement	Célosie	Tomate
26 août	1	---	---
	2	<i>Pythium</i>	<i>Pythium</i>
	3	<i>Trichoderma</i> <i>Gliocladium</i>	<i>Trichoderma</i> <i>Gliocladium</i>
	4	<i>Pythium</i>	<i>Pythium</i>
	5	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i>
	6	<i>Pythium</i> <i>Trichoderma</i>	<i>Pythium</i> <i>Trichoderma</i>
	7	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i>
	8	<i>Pythium</i> <i>Trichoderma</i>	<i>Pythium</i> <i>Trichoderma</i>

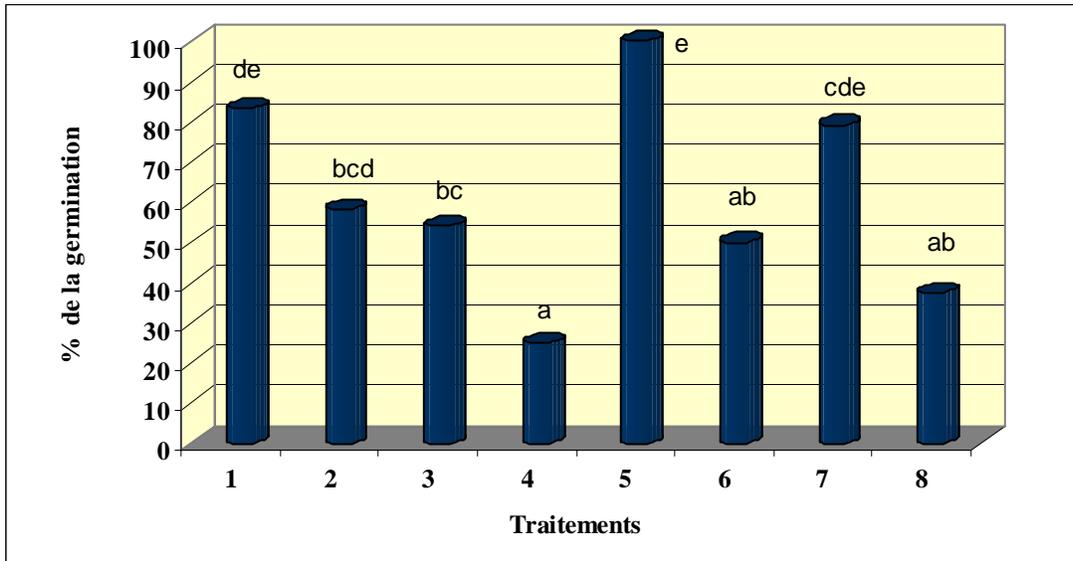
**Remarque :**

- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| 1. Témoin plante seule      | 5. <i>Trichoderma</i> MAUL-20 seul             |
| 2. Témoin <i>Pythium</i>    | 6. <i>Trichoderma</i> MAUL-20 + <i>Pythium</i> |
| 3. Prestop seul             | 7. RootShield seul                             |
| 4. Prestop + <i>Pythium</i> | 8. RootShield + <i>Pythium</i>                 |

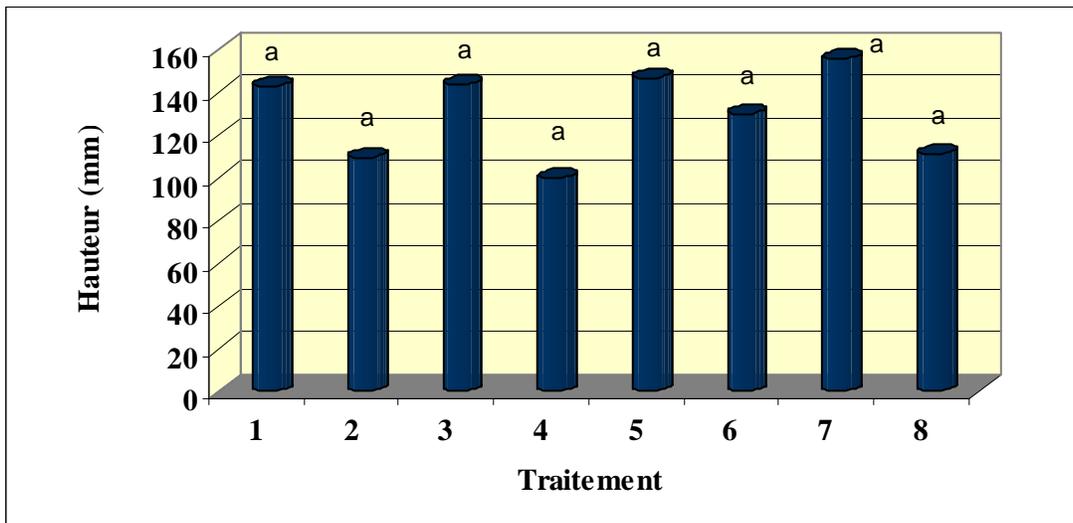
Les annexes 11 et 12 montrent les données moyennes obtenues pour la célosie et la tomate. Les figures 3 à 7 schématisent les résultats obtenus et présentent les résultats de l'analyse statistique pour la **célosie** tandis que les figures 21 à 25 sont pour la tomate.

Pour la **germination** des graines (fig. 24), les traitements biologiques alimentés de *Pythium* (4, 6 et 8) sont les plus affectés et seulement devancés par le traitement Prestop seul (4). Ce dernier traitement et MAUL-20 (5) sont les deux seuls traitements qui sont significativement différent du témoin *Pythium* (2). Le premier étant le pire et le dernier le meilleur. Tous les traitements biologiques (3, 5 et 7) sont significativement différents de leur homologue alimenté de *Pythium* (4, 6 et 8). Aucune différence significative n'a été enregistrée pour la **hauteur** (fig. 25). **La longueur du système racinaire** ne semble pas trop affectée par les différents traitements (fig. 26). Les plantes traitées avec les agents biologiques (3, 5 et 7) sont seulement différentes du traitement Prestop + *Pythium* (4) mais pas différentes des plantes non traitées (1). Pour le **poids frais de la masse aérienne** (fig. 27) et **racinaire** (fig. 28), les traitements avec présence de *Pythium* (2, 4, 6 et 8) sont moins performants que ceux qui contiennent un agent biologique (3, 5 et 7) ou sans traitement (1). Tous les traitements biologiques (3, 5 et 7) sont significativement différents de leur homologue alimenté de *Pythium* (4, 6 et 8) sauf pour le traitement 7 pour le poids frais de la masse racinaire.

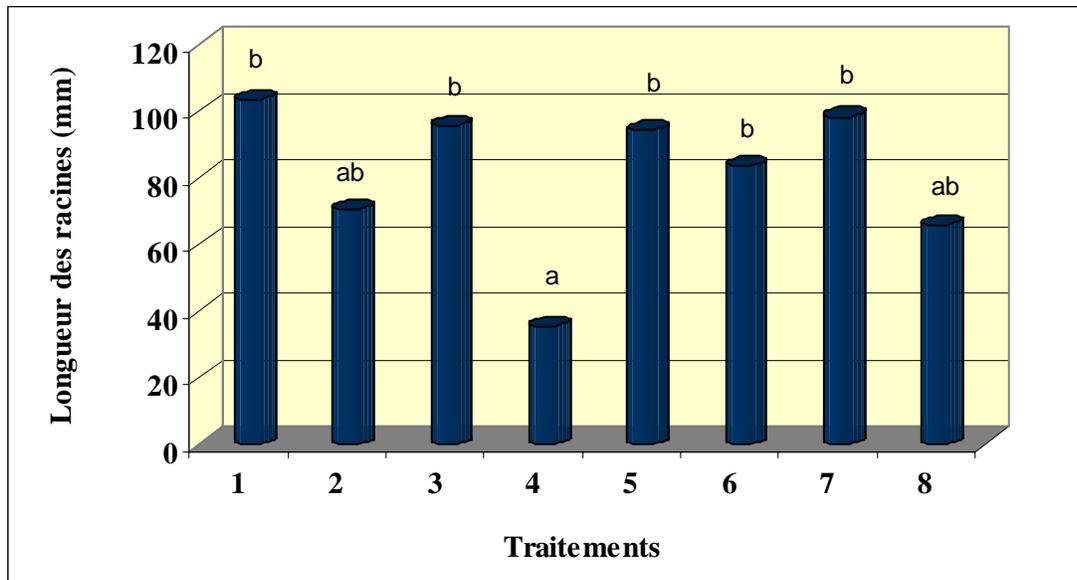
En général, aucun des traitements biologiques ne s'est démarqué des autres mais ils sont tous plus efficaces que lorsque *Pythium* est présent dans le sol.



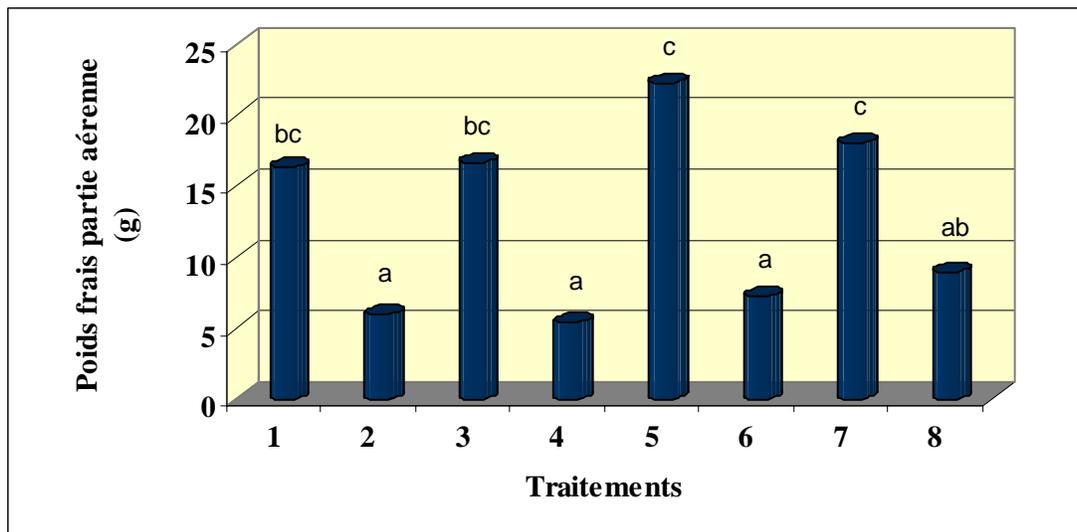
**Figure 24.** Pourcentage de germination de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



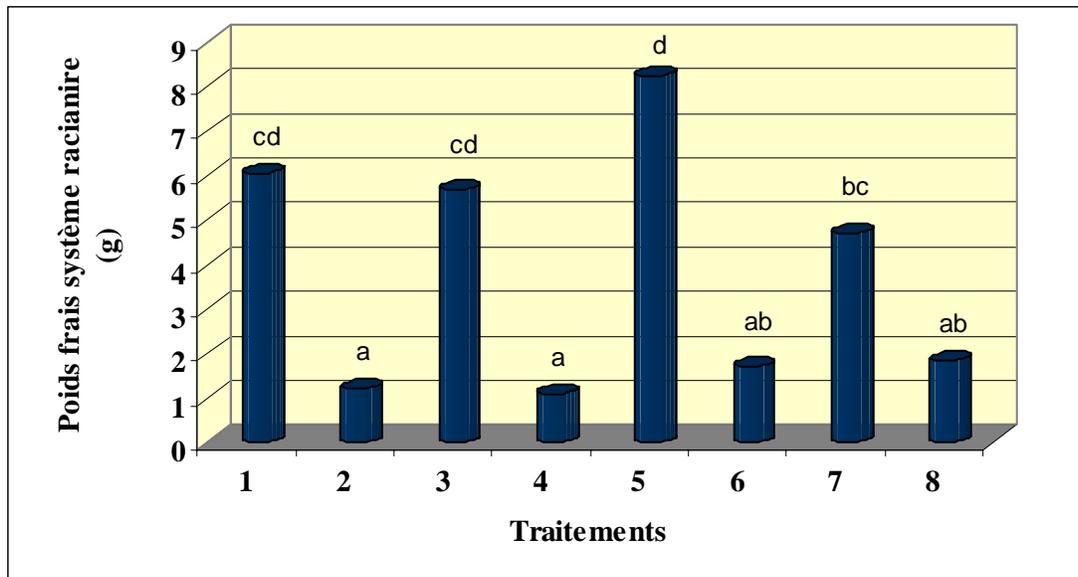
**Figure 25.** Hauteur moyenne (mm) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



**Figure 26.** Longueur moyenne des racines (mm) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



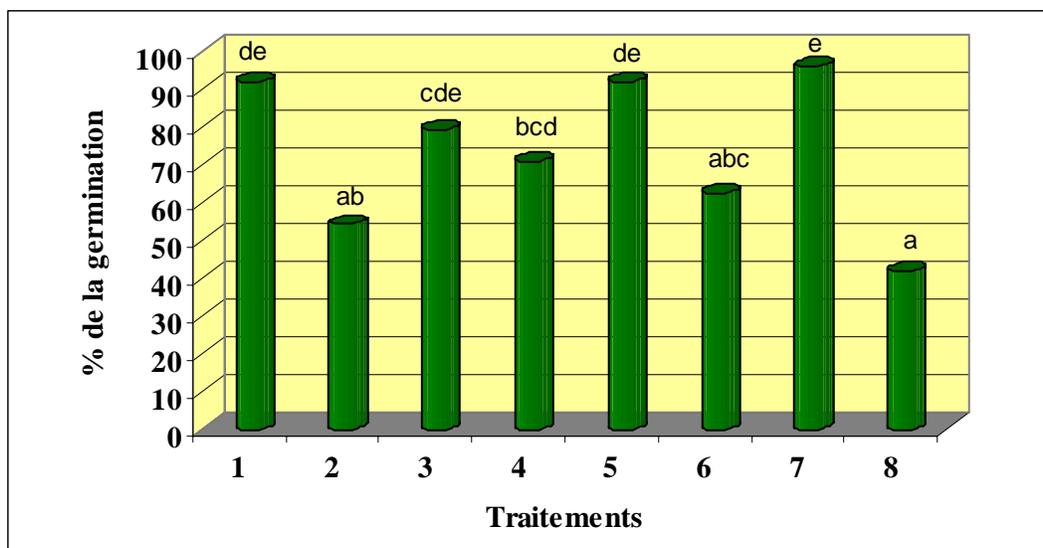
**Figure 27.** Poids frais de la partie aérienne (g) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



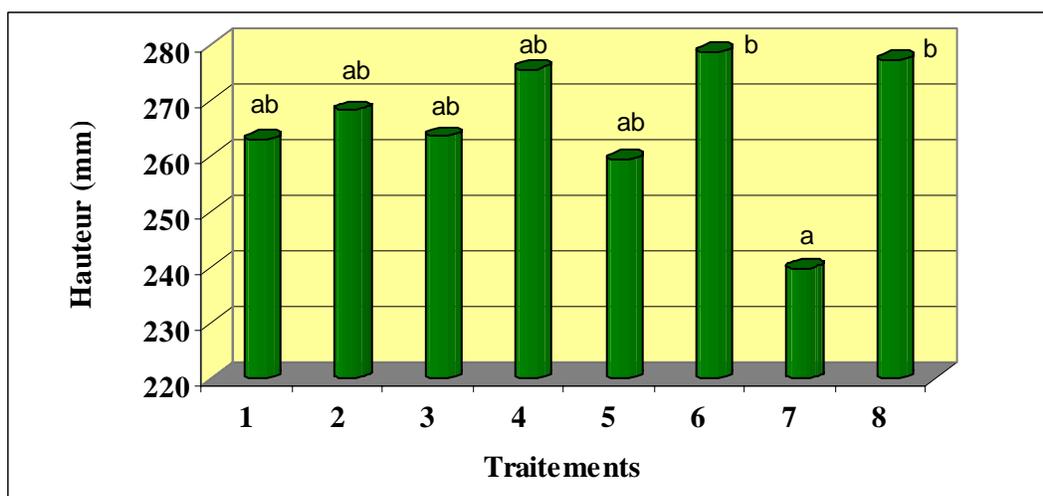
**Figure 28.** Poids frais du système racinaire (g) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)

### Tomate de serre

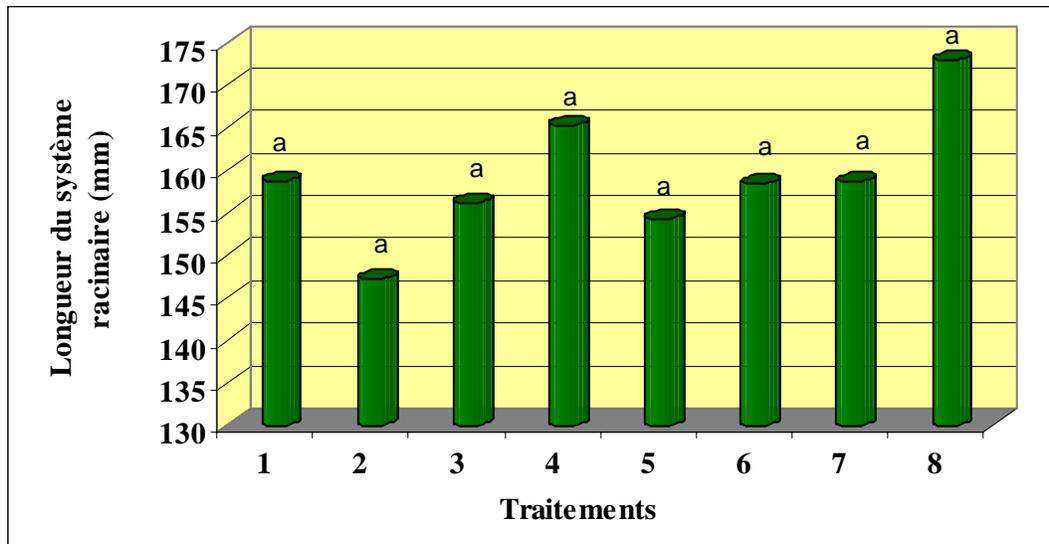
Pour la **germination** des graines de tomate (fig. 29), les traitements biologiques alimentés de *Pythium* (4, 6 et 8) et le témoin *Pythium* (2) ont été les plus affectés. Aucune différence significative n'a été notée entre les traitements biologiques et le témoin. Les traitements biologiques MAUL-20 et RootShield (5 et 7) sont les seuls significativement différents du même traitement mais alimenté de *Pythium* (6 et 8 respectivement). Peu de différence significative ont été enregistrées pour la **hauteur** des plantes (fig. 30). Seul le traitement RootShield (7) est significativement différent de son homologue avec *Pythium* (8). Aucune différence significative n'a été notée pour la **longueur du système racinaire** (fig. 31). Pour le **poids frais de la masse aérienne** (fig. 32), les traitements *Pythium* (2) et RootShield + *Pythium* (8) sont significativement différents des traitements biologiques (3, 5 et 7) mais pas différents des autres traitements avec *Pythium* (4 et 6). Pour la **masse fraîche racinaire** (fig. 33), les traitements *Pythium* (2) et RootShield + *Pythium* (8) sont significativement différents des traitements biologiques (5 et 7) mais pas différents des autres traitements avec *Pythium* (4 et 6). Les traitements biologiques (5 et 7) sont significativement différents de leur homologue alimenté de *Pythium* (6 et 8). En général, les traitements RootShield + *Pythium* (8) et *Pythium* (2) sont les moins efficaces. Aucun des traitements biologiques ne s'est réellement démarqué des autres mais ils sont tous plus efficaces que lorsque *Pythium* est présent dans le sol.



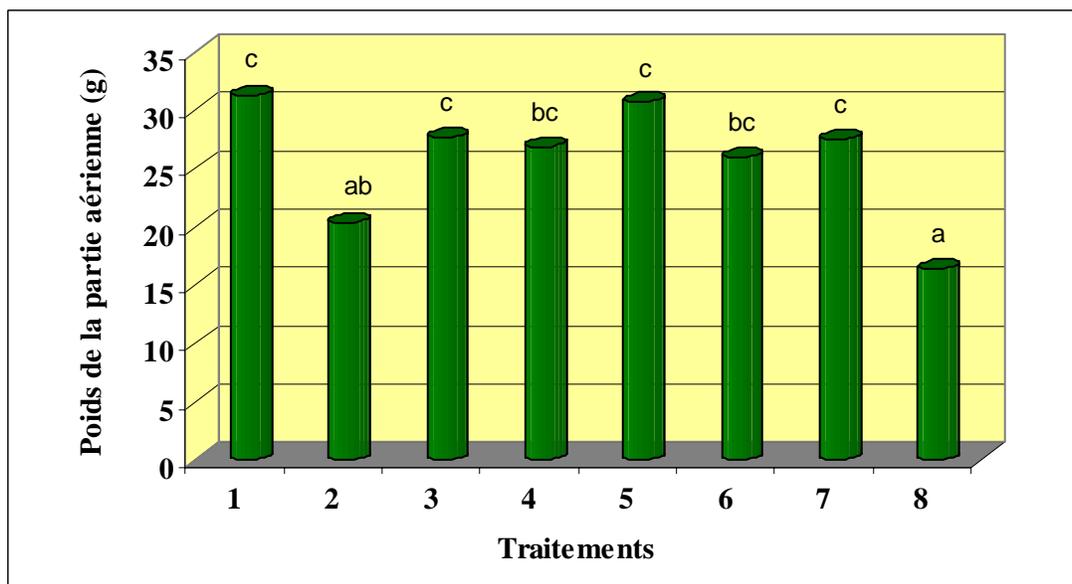
**Figure 29.** Pourcentage de germination de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



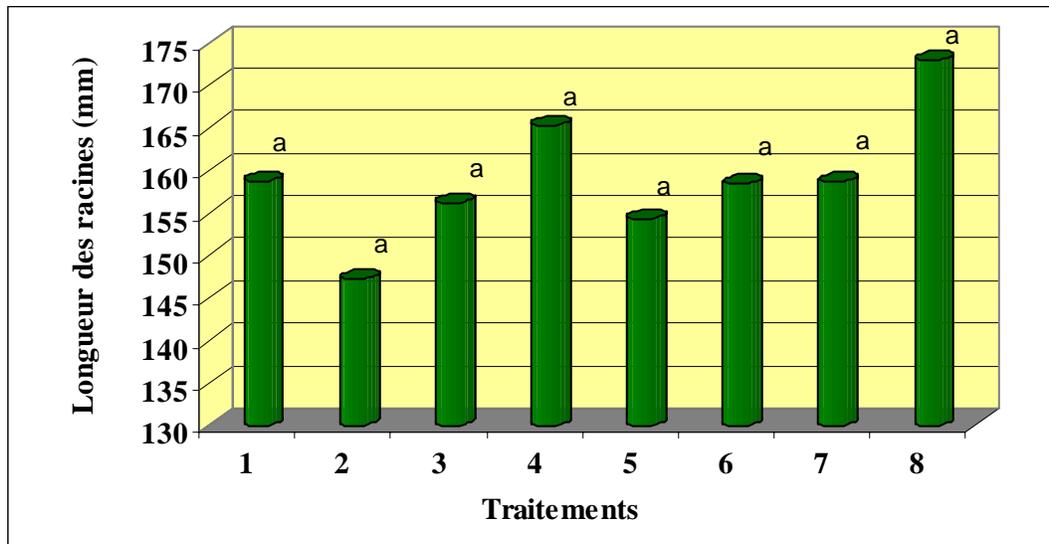
**Figure 30.** Hauteur moyenne (mm) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



**Figure 31.** Longueur moyenne des racines (mm) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



**Figure 32.** Poids frais de la partie aérienne (g) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



**Figure 33.** Poids frais du système racinaire (g) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)

#### 5.4.2.2 ACTIVITÉ 4. Expérience #2 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Pythium* sur la tomate de serre et la célosie plumeuse

##### Célosie plumeuse

Lorsque des symptômes de fonte de semis étaient observés en cours d'expérience, les plantules étaient prélevées et mis sur milieu de culture Solution Nutrient Agar avec antibiotiques (SNA++) et milieu CV8, milieu favorisant la croissance de *Pythium*. Après 3 à 5 jours de croissance, les observations microscopiques étaient faites. Le tableau 81 résume les résultats obtenus.

Chez la **célosie**, 9 plantules ont été prélevées et parmi celles-ci, 8 étaient porteuses de la maladie (*Pythium*). Six cas positifs ont été notés lorsque *Pythium* était en présence soit avec *Trichoderma* MAUL-20 ou Rootshield, avec 3 cas observés pour chaque traitement. Un cas a été observé dans le témoin *Pythium* et un autre avec Prestop.

Chez la **tomate**, deux plantules ont été récoltées et la présence de *Pythium* n'a pas été confirmée au niveau du collet. C'est l'absence de racines qui est la cause de la mortalité, probablement imputable au haut taux d'humidité du sol (saturation), ce qui a amené l'asphyxie racinaire.

**Tableau 81.** Détection de la présence de *Pythium* et des agents de lutte biologique *Trichoderma* et *Gliocladium* sur les racines des plants de tomate et de célosie en cours de production

Date de prélèvement	Traitement	Tomate	Célosie	Observations
23 novembre	5 (rep 2)	1 plantule	---	1 plantule <b>sans</b> racine collet semble atteint <b>Résultat : <i>Pythium</i> négatif</b> Présence de <i>Trichoderma</i>
	4 (rep2)	---	1 plantule	1 plantule <b>avec</b> racines <b>Résultat : <i>Pythium</i> positif</b>
29 novembre	8 (rep 3)	---	1 plantule	1 plantule <b>avec</b> racines <b>Résultat : <i>Pythium</i> positif</b>
	3 (rep 4)	---	1 plantule	1 plantule <b>avec</b> racines <b>Résultat : <i>Pythium</i> négatif</b> Présence de <i>Gliocladium</i>
20 décembre	8 (rep 4)	1 plantule	---	1 plantule <b>sans</b> racine collet semble atteint <b>Résultat : <i>Pythium</i> négatif</b>
	2 (rep 4)	---	1 plantule	1 plantule <b>avec</b> racines <b>Résultat : <i>Pythium</i> positif</b>
	6 (rep 3)	---	2 plantules	2 plantules <b>avec</b> racines <b>Résultat : <i>Pythium</i> positif</b> Présence de <i>Trichoderma</i>
	6 (rep 1)	---	1 plantule	1 plantule <b>avec</b> racines <b>Résultat : <i>Pythium</i> positif</b> Présence de <i>Trichoderma</i>
	8 (rep 2)	---	2 plantules	2 plantules <b>avec</b> racines <b>Résultat : <i>Pythium</i> positif</b> Présence de <i>Trichoderma</i>

**Remarque :**

- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| 1. Témoin plante seule      | 5. <i>Trichoderma</i> MAUL-20 seul             |
| 2. Témoin <i>Pythium</i>    | 6. <i>Trichoderma</i> MAUL-20 + <i>Pythium</i> |
| 3. Prestop seul             | 7. RootShield seul                             |
| 4. Prestop + <i>Pythium</i> | 8. RootShield + <i>Pythium</i>                 |

Lors de la récolte des plants, des morceaux du système racinaire de chaque traitement et de chaque répétition ont été échantillonnés et placés sur milieu de culture PDA (traitements 1, 3, 5 et 7) et CV8 (traitements 2, 4, 6 et 8) afin de vérifier la présence de *Pythium* et des agents biologiques. Trois Pétri par traitement ont été faits. Les observations ont été réalisées après 3 et 5 jours de croissance. Le tableau 82 montre les résultats. Tous les agents biologiques introduits ont été observés sur les racines des plantes concernées et *Pythium* a également été noté dans tous les traitements comprenant *Pythium*. Les résultats sont identiques pour la célosie et la tomate. En général, les agents biologiques ont bien protégé les systèmes racinaires lorsque *Pythium* était présent. Seul le traitement 4 (Prestop + *Pythium*) n'a pas permis de retracer *Gliocladium* au niveau des racines.

**Tableau 82.** Détection de la présence de *Pythium* et des agents de lutte biologique *Trichoderma* et *Gliocladium* sur les racines des plants de tomate et de célosie lors de la récolte des plants

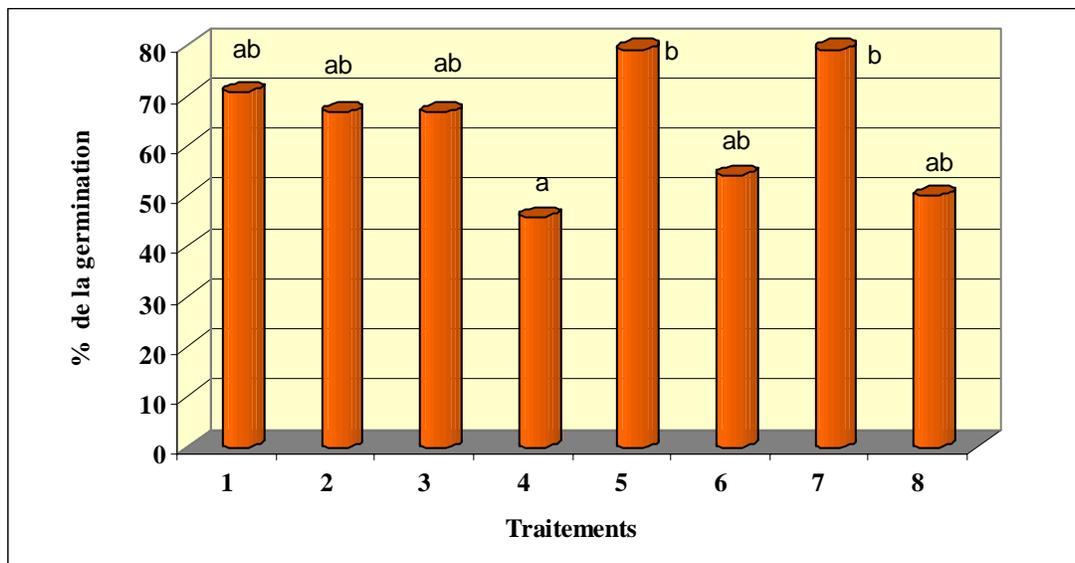
Date de prélèvement	Traitement	Célosie	Tomate
10 janvier 2005	1	---	---
	2	<i>Pythium</i>	<i>Pythium</i>
	3	<i>Gliocladium</i>	<i>Gliocladium</i>
	4	<i>Pythium</i>	<i>Pythium</i>
	5	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i>
	6	<i>Pythium</i> <i>Trichoderma</i>	<i>Pythium</i> <i>Trichoderma</i>
	7	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i>
	8	<i>Pythium</i> <i>Trichoderma</i>	<i>Pythium</i> <i>Trichoderma</i>

**Remarque :**

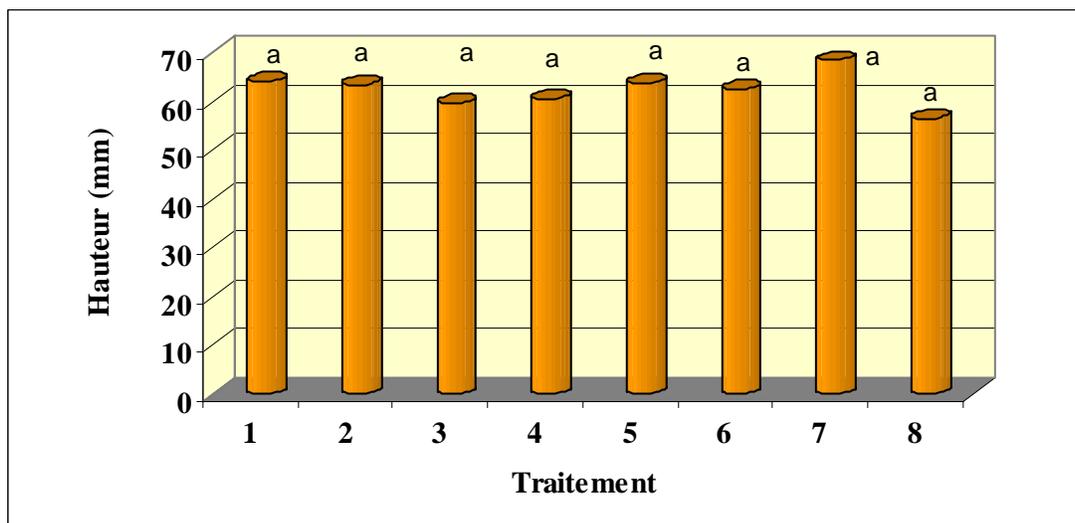
- |                              |   |
|------------------------------|---|
| 9. Témoin plante seule       | 13. <i>Trichoderma</i> MAUL-20 seul             |
| 10. Témoin <i>Pythium</i>    | 14. <i>Trichoderma</i> MAUL-20 + <i>Pythium</i> |
| 11. Prestop seul             | 15. RootShield seul                             |
| 12. Prestop + <i>Pythium</i> | 16. RootShield + <i>Pythium</i>                 |

Les annexes 13 et 14 montrent les données moyennes obtenues pour la célosie et la tomate. Les figures 34 à 38 schématisent les résultats obtenus et présentent les résultats de l'analyse statistique pour la **célosie** tandis que les figures 39 à 43 sont pour la tomate.

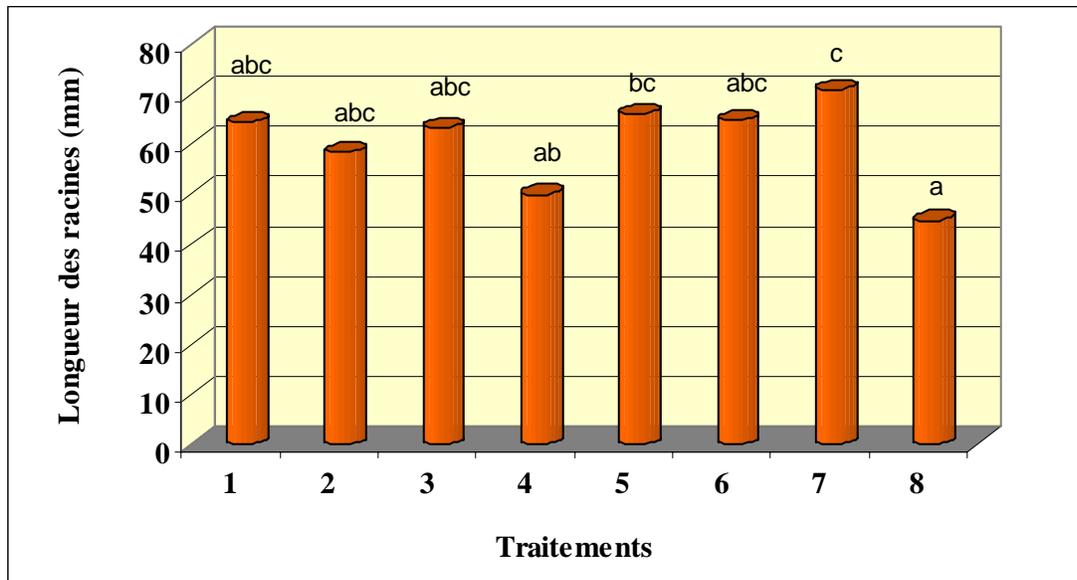
Pour la **germination** des graines (fig. 34), seuls les traitements biologiques 5 et 7 présentent une différence significative avec le traitement 4 (Prestop + *Pythium*). Aucune différence significative n'a été enregistrée pour la **hauteur** (fig. 35). **La longueur du système racinaire** ne semble pas trop affectée par les différents traitements (fig. 36). Les plantes traitées avec Rootshield seul (7) est significativement différente des traitements Prestop + *Pythium* (4) et Rootshield + *Pythium* (8) mais pas différentes des plantes non traitées (1). Le traitement *Trichoderma* MAUL-20 (5) permet d'obtenir une différence avec le traitement Rootshield + *Pythium* (8). Pour le **pois frais de la masse aérienne** (fig. 37) les traitements biologiques *Trichoderma* MAUL-20 (5), Rootshield (7) et le témoin n'ont pas de différences significatives entre eux. Seul le traitement Rootshield (7) est différent des autres traitements. Sensiblement les mêmes observations ont été enregistrées avec les racines (fig. 38). En général, aucun des traitements biologiques ne s'est démarqué des autres.



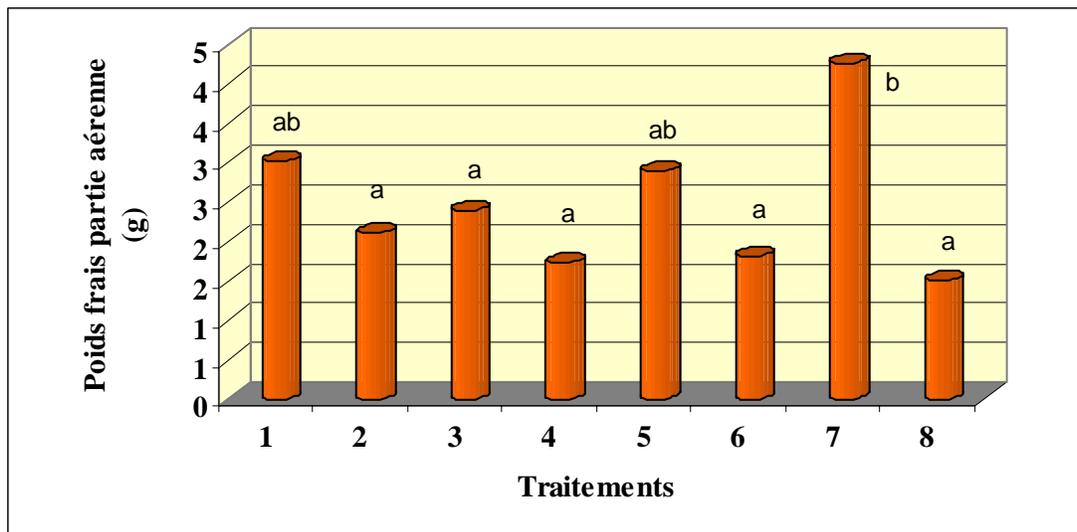
**Figure 34.** Pourcentage de germination de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



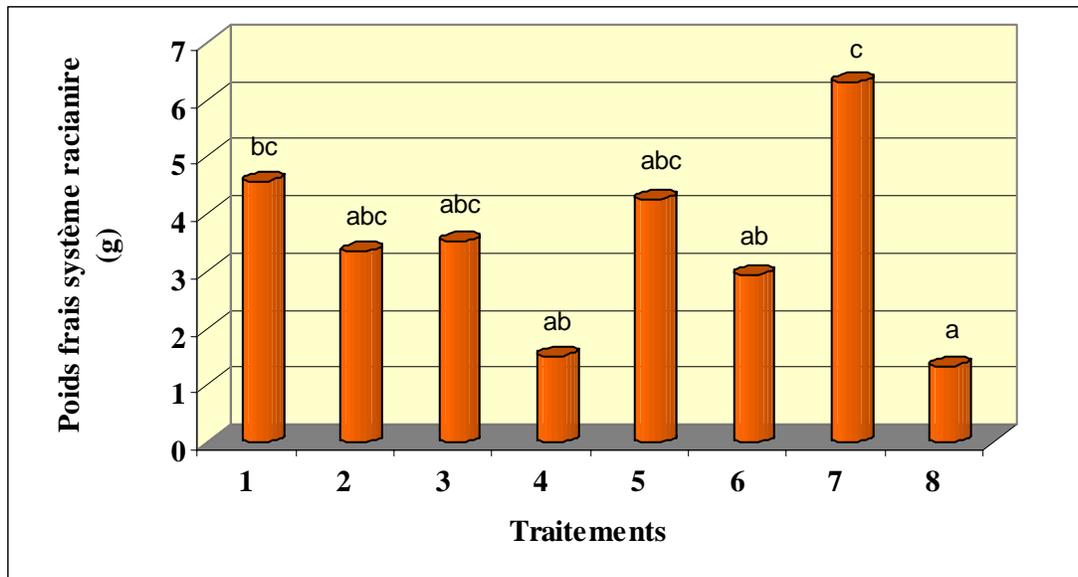
**Figure 35.** Hauteur moyenne (mm) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



**Figure 36.** Longueur moyenne des racines (mm) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



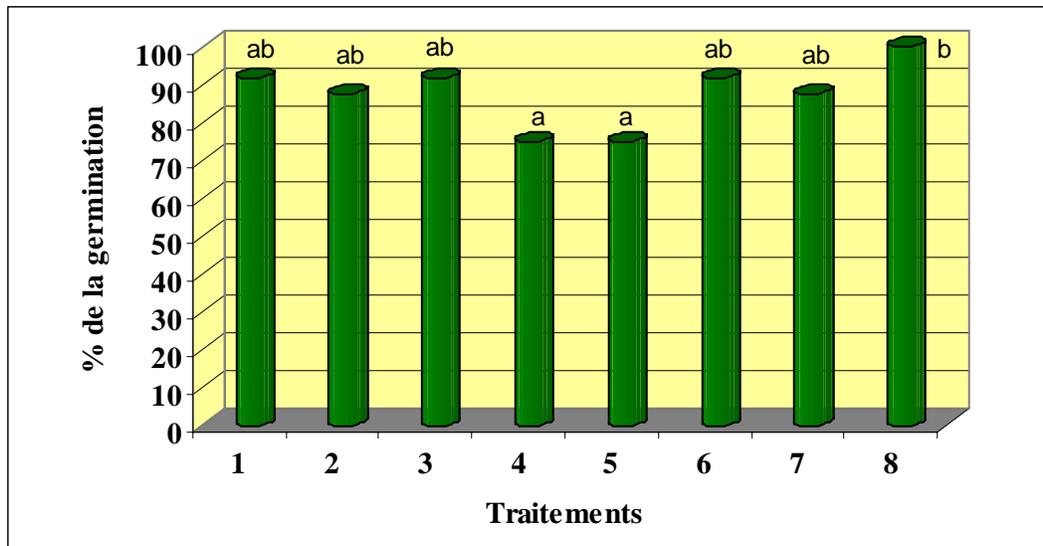
**Figure 37.** Poids frais de la partie aérienne (g) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



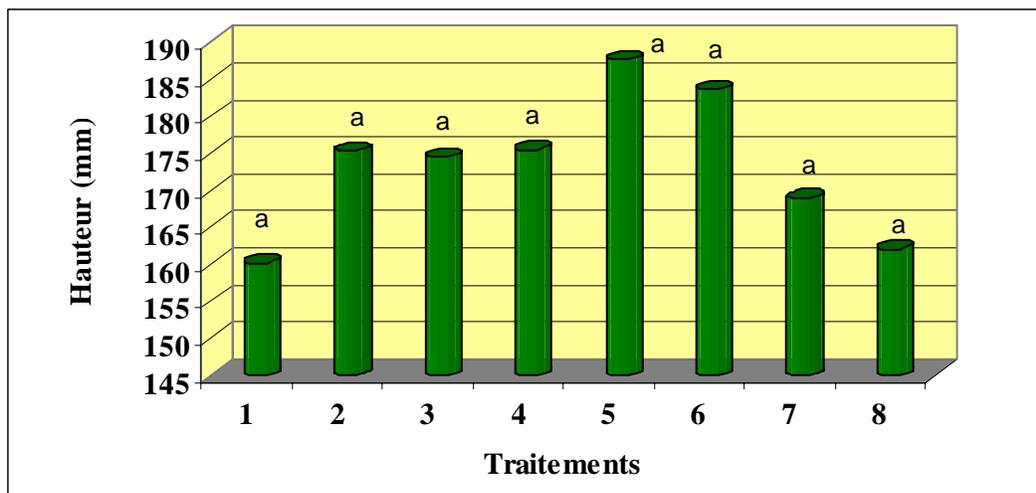
**Figure 38.** Poids frais du système racinaire (g) de la célosie après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)

### Tomate de serre

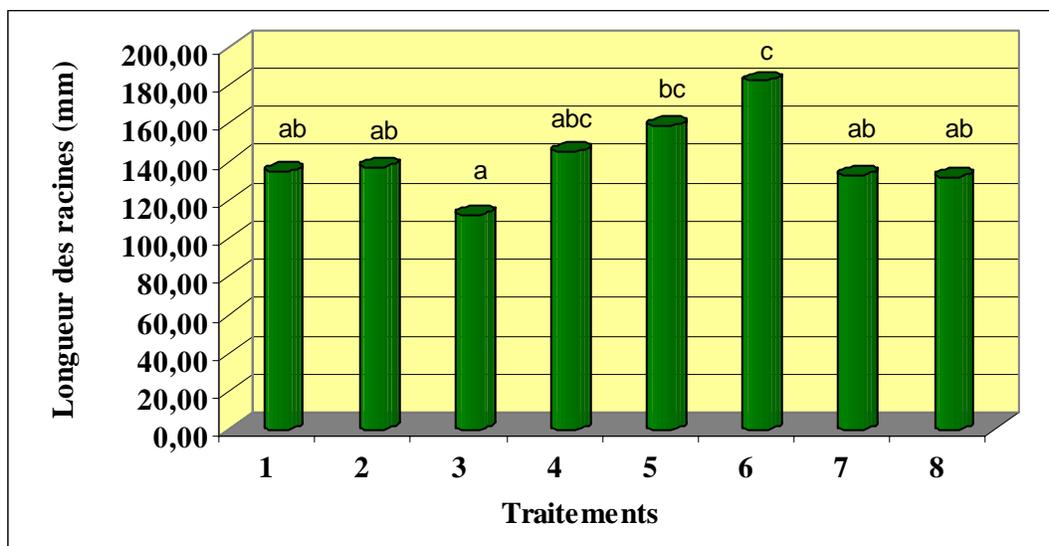
Pour la **germination** des graines de tomate (fig. 39), la seule différence significative se situe au niveau du traitement Rootshield + *Pythium* (8) qui est significativement différent des traitements Prestop + *Pythium* (4) et *Trichoderma* MAUL-20 (5), qui ont eu les pires taux de germination. Aucune différence significative n'a été enregistrée pour la **hauteur** des plantes (fig. 40) et pour le **poids frais de la masse aérienne** (fig. 42). Pour la **longueur du système racinaire** (fig. 41), le traitement *Trichoderma* MAUL-20 permet un bon contrôle de *Pythium* puisque des différences significatives ont été observées par rapport aux autres traitements (sauf pour Prestop+*Pythium* (4) et *Trichoderma* MAUL-20 (5)). Pour la **masse fraîche racinaire** (fig. 43), les résultats ressemblent à ceux obtenus pour la longueur des racines. En général, aucun des traitements biologiques ne s'est réellement démarqué des autres sauf que *Trichoderma* MAUL-20 semble mieux protéger le système racinaire que les autres produits biologiques.



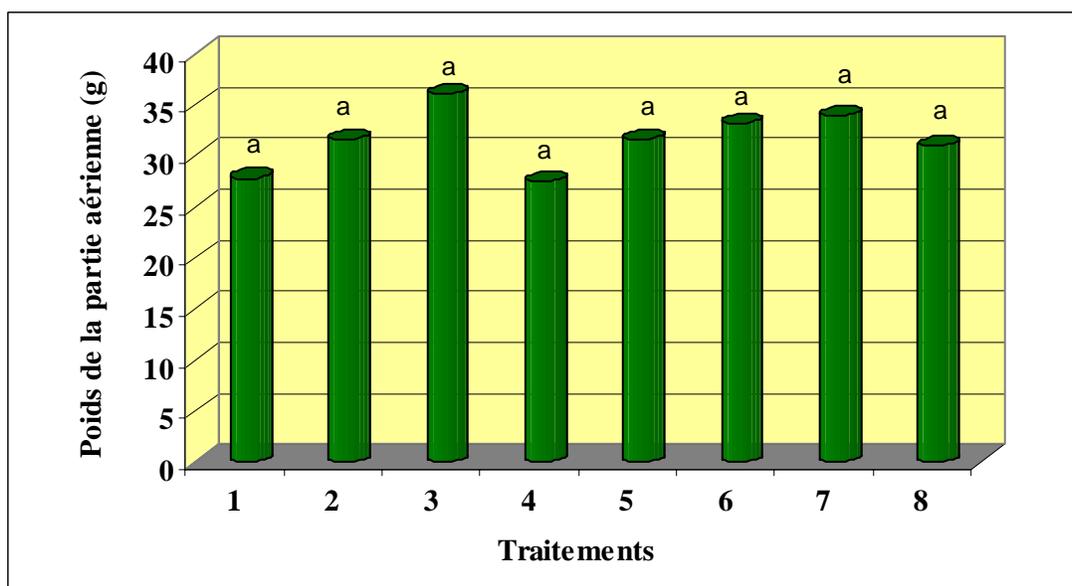
**Figure 39.** Pourcentage de germination de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



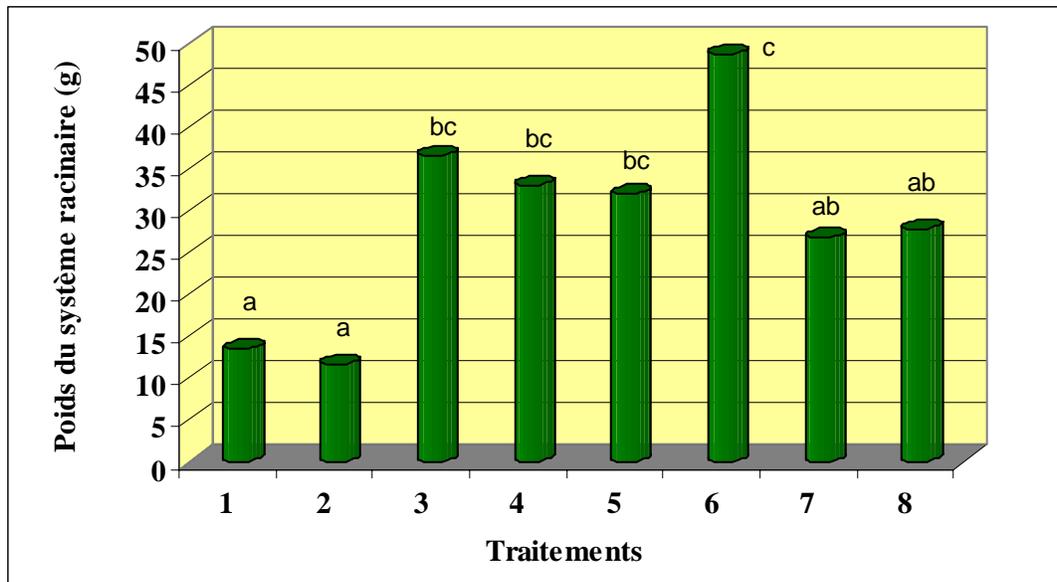
**Figure 40.** Hauteur moyenne (mm) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



**Figure 41.** Longueur moyenne des racines (mm) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



**Figure 42.** Poids frais de la partie aérienne (g) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)



**Figure 43.** Poids frais du système racinaire (g) de la tomate après 8 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Pythium* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Pythium*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Pythium*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Pythium*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Pythium*)

#### 5.4.2.3 **ACTIVITÉ 5.** Expérience #1 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Rhizoctonia solani* sur trois légumes en semis (haricot nain, céleri et tomate de serre) et trois plantes ornementales (célosie plumeuse, giroflée et zinnia)

Pour toutes les plantes, 2 mesures de hauteur ont été réalisées à intervalle de 2 semaines sauf dans le cas du haricot où trois mesures ont été prises. La dernière hauteur des plantes a été évaluée la journée de la récolte. Le dénombrement des plants a débuté au stade cotylédon et s'est poursuivi tout au long de l'expérience. Au total, trois dénombrements ont été effectués (sauf pour le céleri, 2 dénombrements). Les stades de croissance des plantes ont été déterminés selon le système de code BBCH utilisé internationalement. Ils sont placés à la suite de chaque tableau résumant les différents paramètres observés (annexe 15).

À la récolte, la masse fraîche de la partie aérienne a été déterminée. Les plants ont ensuite été déposés dans un sac de papier brun (sac de 7 lbs) et placés dans un séchoir à 70°C pendant au moins 48 heures. Le poids sec a ensuite été mesuré. L'apparence du système racinaire a été notée selon deux systèmes de cotes, un pour l'aspect quantitatif et l'autre pour l'aspect qualitatif.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SuperAnova et le test de Tukey a été choisi puisque l'ARLA exige que nous prenions les tests les plus sévères pour trouver les différences significatives.

#### **Cote quantitative**

- 1 - système racinaire sain
- 2 - présence de nécroses sur 1 - 25% du système racinaire
- 3 - présence de nécroses sur 25 - 50% du système racinaire
- 4 - présence de nécroses sur 50-75% du système racinaire

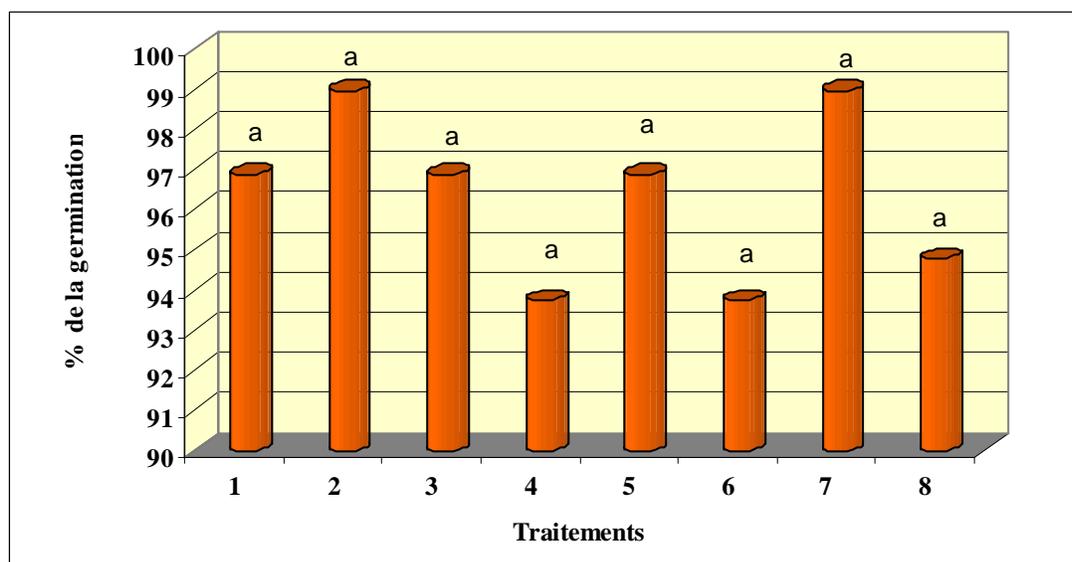
5 - présence de nécroses sur plus de 75% du système racinaire

### Cote qualitative

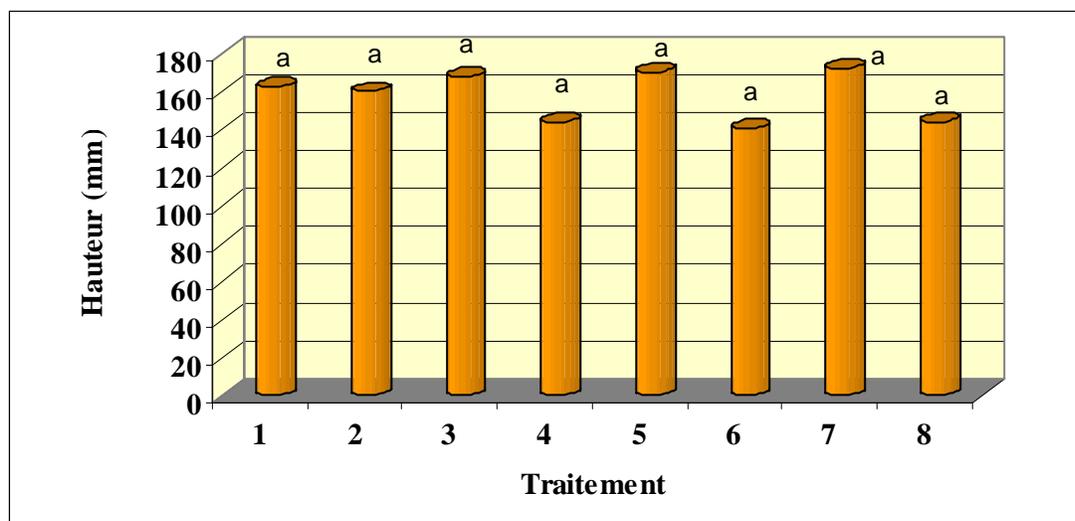
- 1 - système racinaire sain (comme témoin)
- 2 - système racinaire légèrement aéré
- 3 - système racinaire moyennement aéré
- 4 - système racinaire fortement aéré
- 5 - absence de racines

## Haricot

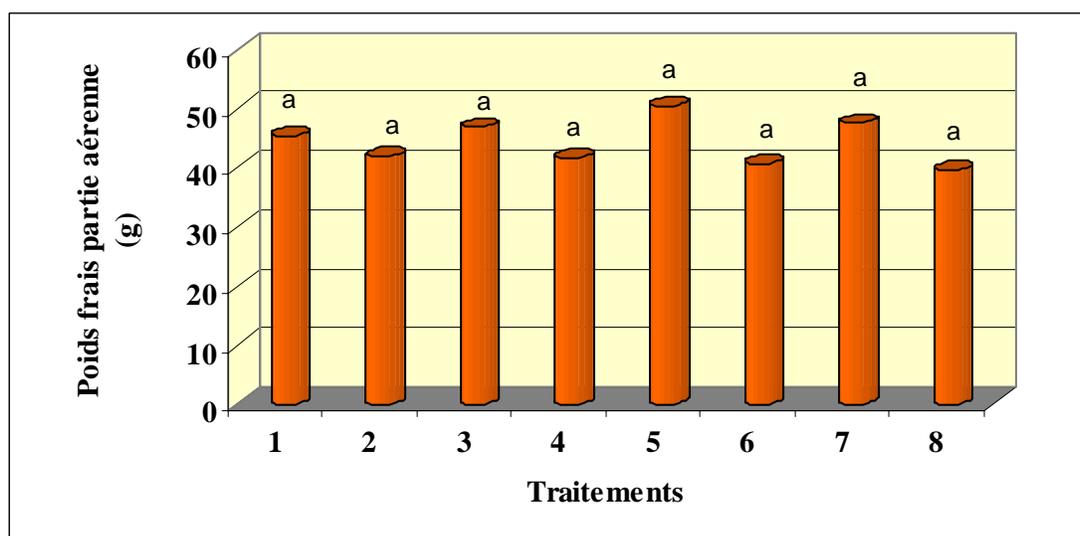
Le haricot a germé 4 jours après le semis. Aucun symptôme de fonte de semis n'a été observé au collet des plants, ni en pré-émergence. Le pourcentage de germination du haricot nain est de 90%. Le pourcentage de germination de tous les traitements est supérieur à 90%. La présence de *Rhizoctonia* dans le substrat n'affecte pas la germination des graines de haricot nain (fig. 44), ni le développement de la plante (fig. 45 à 47) puisque aucune différence significative n'a été observée. La qualité du système racinaire est identique pour tous les traitements (cote 1 - système racinaire sain (comme témoin)) mais quelques différences ont été notées pour l'aspect quantitatif (fig. 48). Ainsi le traitement 6 (MAUL-20 + *R. solani*) est significativement différent de tous les traitements sauf du traitement 7 (Rootshield). Le traitement 7 (Rootshield) est significativement de tous les traitements sauf de 6 (MAUL-20 + *R. solani*) et de 8 (Rootshield + *R. solani*) tandis que le traitement 8 est seulement différent du traitement 6 (MAUL-20 + *R. solani*). Pour ces traitements, le système racinaire présent parfois quelques nécroses qui peuvent couvrir jusqu'à 25% du système racinaire. Les traitements MAUL-20 et Rootshield en présence de l'agent pathogène semblent légèrement plus sensibles que les autres traitements.



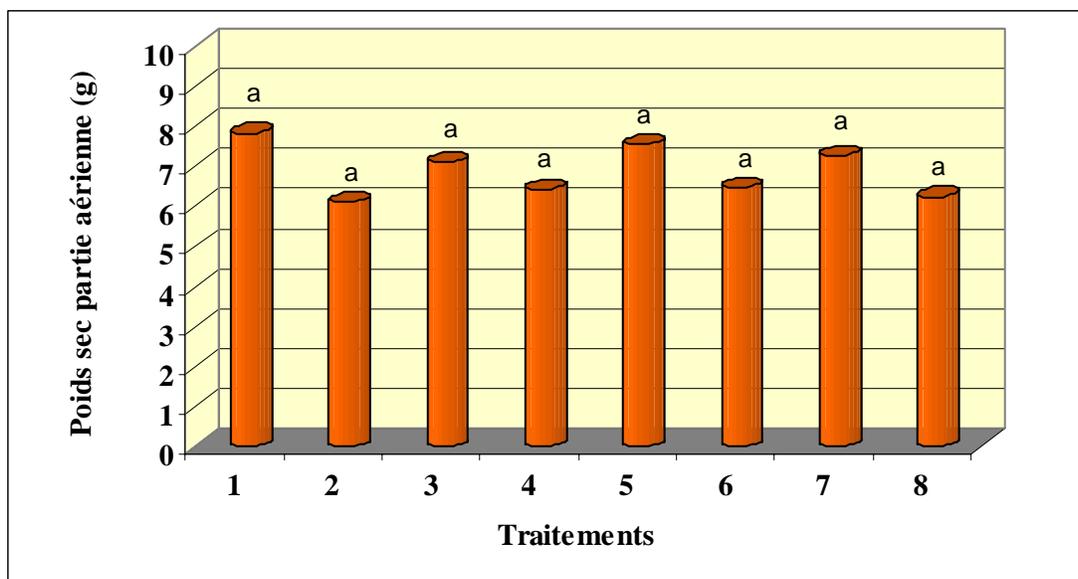
**Figure 44.** Pourcentage de germination du haricot nain après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



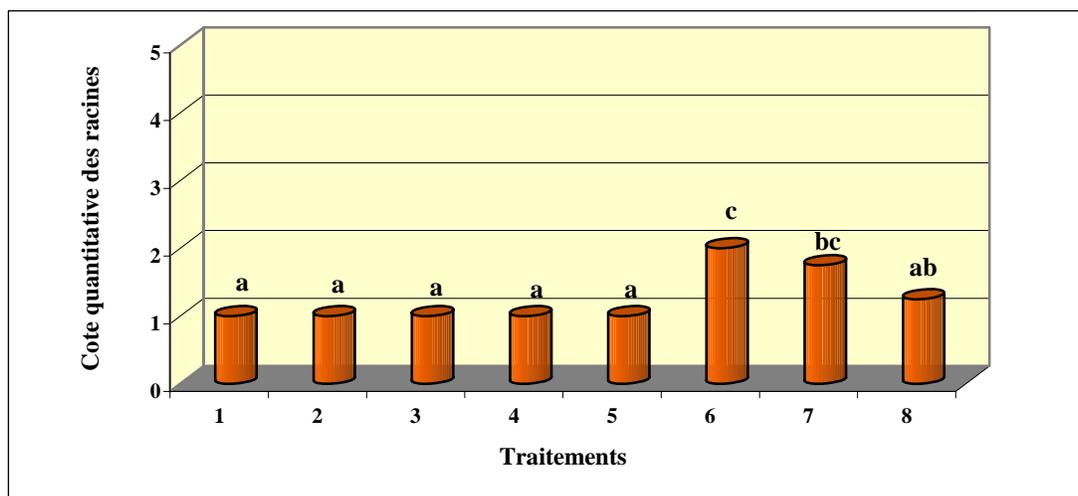
**Figure 45.** Hauteur moyenne (mm) du haricot nain après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 46.** Poids frais de la partie aérienne (g) du haricot nain après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 47.** Poids sec de la partie aérienne (g) du haricot nain après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 48.** Cote quantitative des racines du haricot nain après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

## Tomate

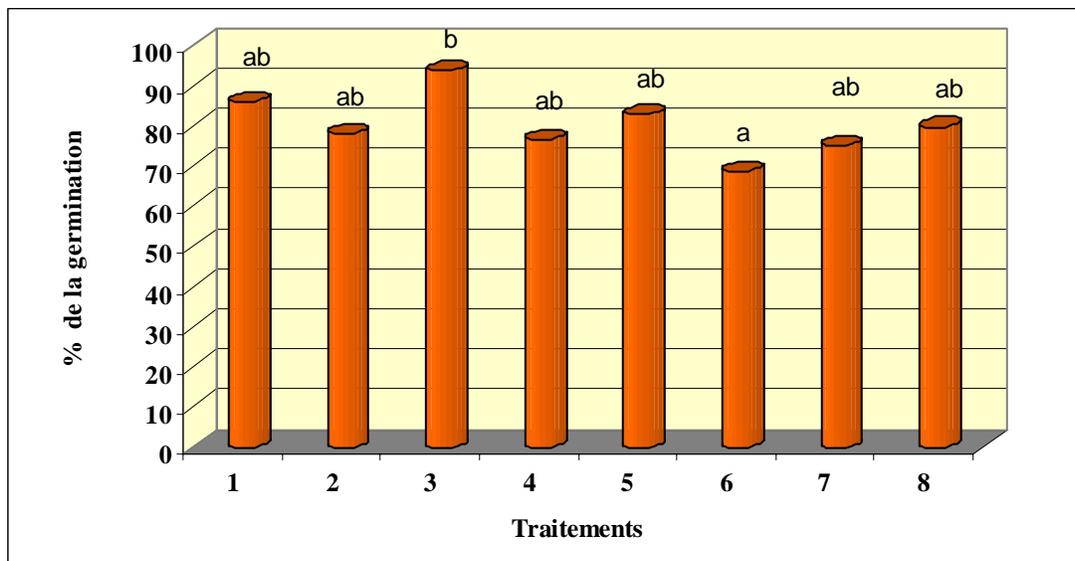
L'émergence de la tomate a eu lieu 4 jours après le semis. Des symptômes de fontes de semis ont été observés au collet de certains plants. Des symptômes sévères ont été observés sur certaines plantules, causant le dessèchement de la plante. Au total, 32 plants ont été prélevés et mis sur milieu de culture SNA<sup>++</sup> afin de confirmer la présence de *Rhizoctonia* (tab. 83). Tous les isollements effectués se sont avérés positifs sauf dans le traitement 7 (Rootshield) où une croissance bactérienne a été observée sur les géloses. Ce sont dans les traitements 6 (*Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*) et 8 (Rootshield + *Rhizoctonia solani*) que la maladie a été observée avec 13 (40%) et 12 (38%) des plants respectivement.

Le pourcentage de germination de la tomate est de 88%. Seul le traitement 3 (Prestop) a eu une meilleure germination (fig. 49). Malgré ce fait, la seule différence significative enregistrée est celle entre le Prestop (3) et le MAUL-20 + *Rhizoctonia solani* (6). Ce dernier obtenant le plus faible taux de germination.

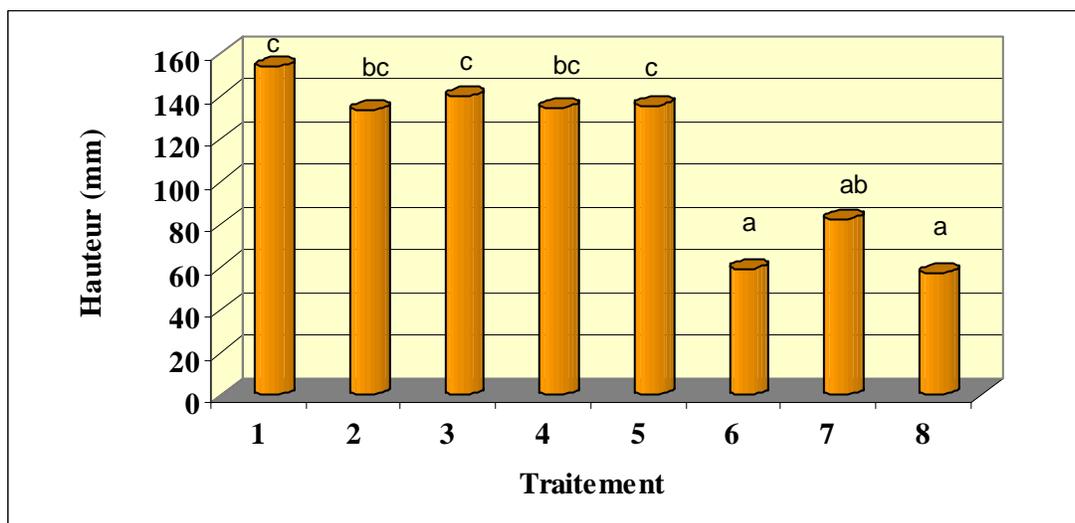
Des différences significatives ont été obtenues pour la hauteur (fig. 50), les masses fraîches (fig. 51) et sèches (fig. 52) de la partie aérienne. Pour ces paramètres, les meilleurs traitements sont ceux qui contenaient les agents biologiques (sauf Rootshield) et celui qui combinait Prestop + *Rhizoctonia solani* (4). Par contre, pour les aspects quantitatifs et qualitatifs du système racinaire, aucune différence significative n'a été trouvée.

**Tableau 83.** Fontes de semis observées au collet de la tomate cultivée dans le substrat Pro-Mix BX en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani*

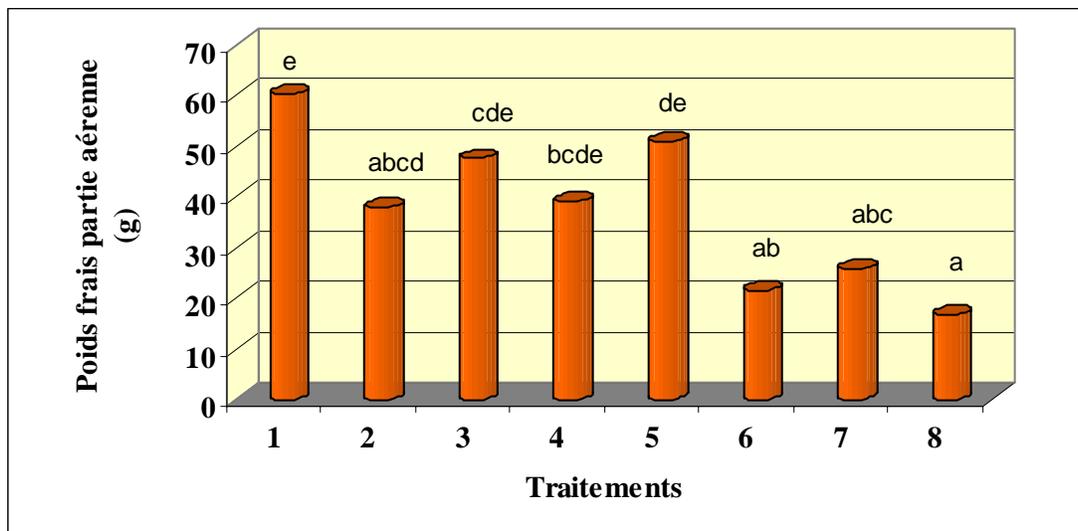
Date	Plante	Anomalies observées	Résultats	Traitements – rep - plants
15-04-05	Tomate	28 fontes de semis	+++	F - #1 - 1, 2, 6, 7, 8 F - #2 - 1, 5, 8 F - #3 - 3, 7 F - #4 - 2
			---	G - #1 - 2, 3, 5, 6, 7, 8 G - #4 - 3
			+++	H - #1 - 5 H - #2 - 3, 6 H - #3 - 2, 3, 4, 8 H - #4 - 2, 3, 8
20-04-05	Tomate	2 fontes de semis	+++	F - #2 - 3
			+++	H - #1 - 6
27-04-05	Tomate	2 fontes de semis	+++	F - #3 - 6
			+++	H - #3 - 6



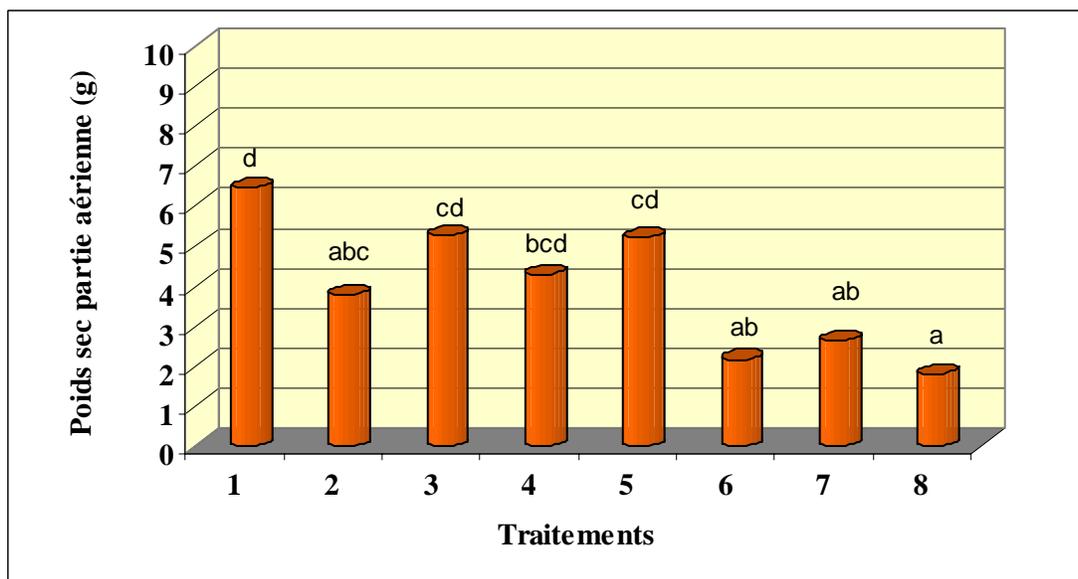
**Figure 49.** Pourcentage de germination de la tomate après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 50.** Hauteur moyenne (mm) de la tomate après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 51.** Poids frais de la partie aérienne (g) de la tomate après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 52.** Poids sec de la partie aérienne (g) de la tomate après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

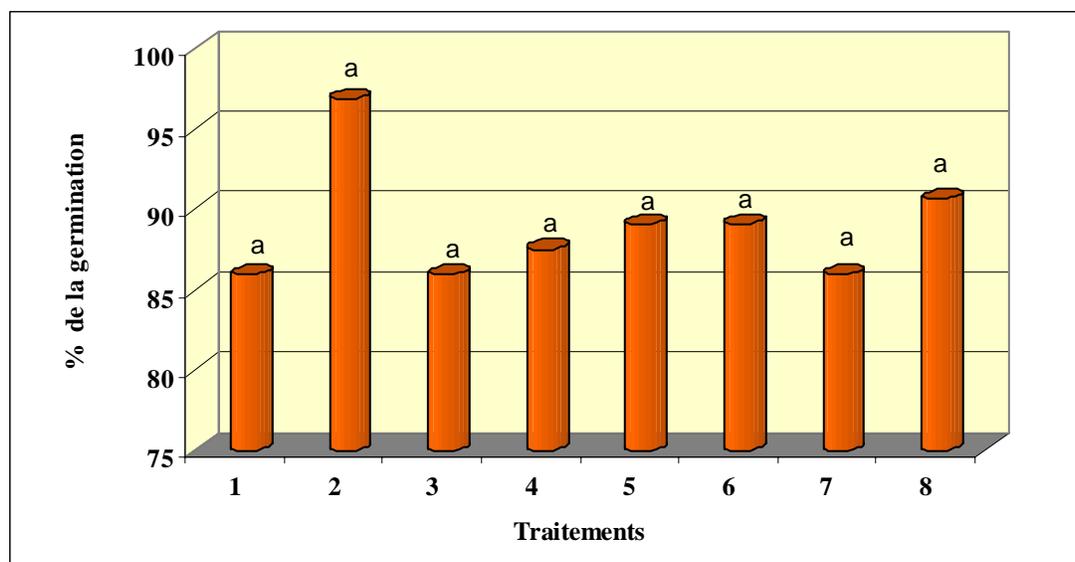
## Céleri

L'émergence du céleri a eu lieu 15 jours après le semis. Des symptômes de fontes de semis ont été observés au collet de deux plants seulement. Les plants ont été prélevés et mis sur milieu de culture SNA<sup>++</sup> afin de confirmer la présence de *Rhizoctonia* (tab. 84). Les isollements effectués se sont avérés positifs. Les deux cas ont été notés dans le traitement 8 (Rootshield + *Rhizoctonia solani*).

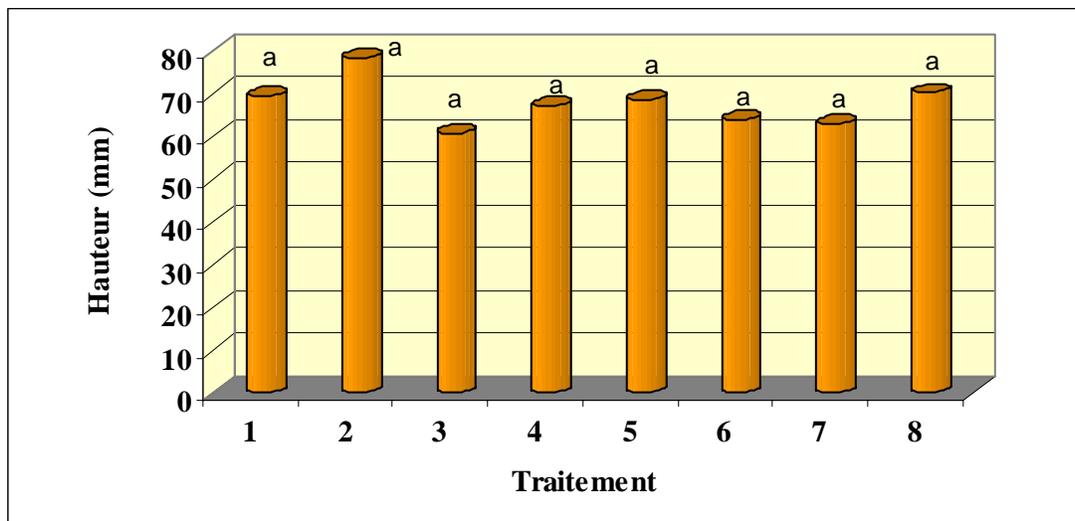
Le pourcentage de germination du céleri est de 97%. Seul le traitement 2 (MAUL-20) a eu une germination similaire à celui mentionné sur l'étiquette (fig. 53). Malgré ce fait, aucune différence significative n'a été enregistrée. Aucune différence significative n'a été obtenue pour la hauteur (fig. 54), la masse fraîche de la partie aérienne (fig. 55) et les cotes quantitatives et qualitatives (données non montrées). Une différence a été trouvée pour la masse sèche (fig. 56) et les traitements 2 et 7. Le traitement *Trichoderma* (2) étant supérieur à Rootshield + *R. solani* (7).

**Tableau 84.** Fontes de semis observées au collet du céleri cultivé dans le substrat Pro-Mix BX en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani*

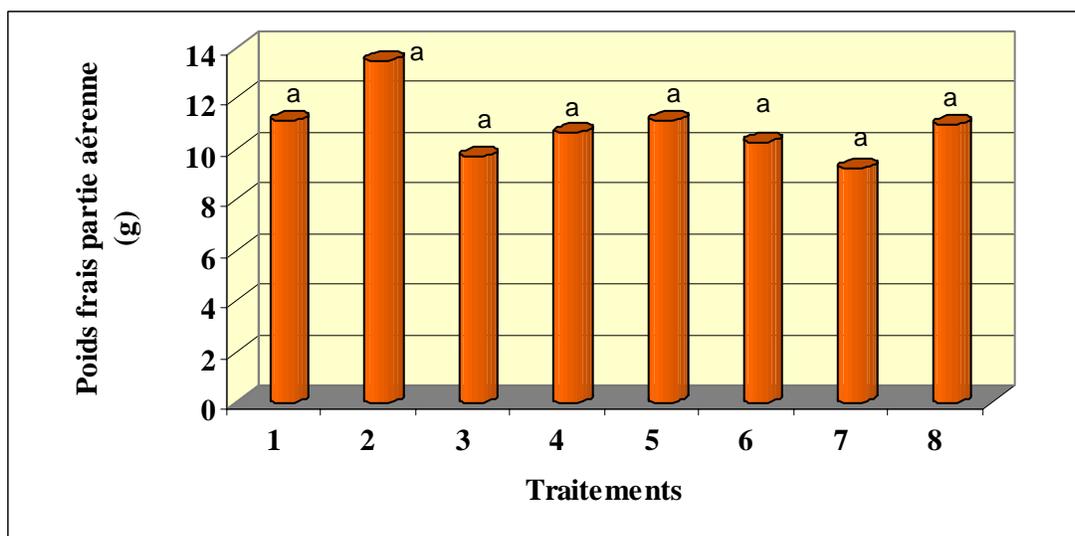
Date	Plante	Anomalies observées	Résultats	Traitements – rep - plants
15-04-05	Céleri	1 fonte de semis	+++	H - #3 - 6
20-04-05	Céleri	1 fonte de semis	+++	H - #3 - 1



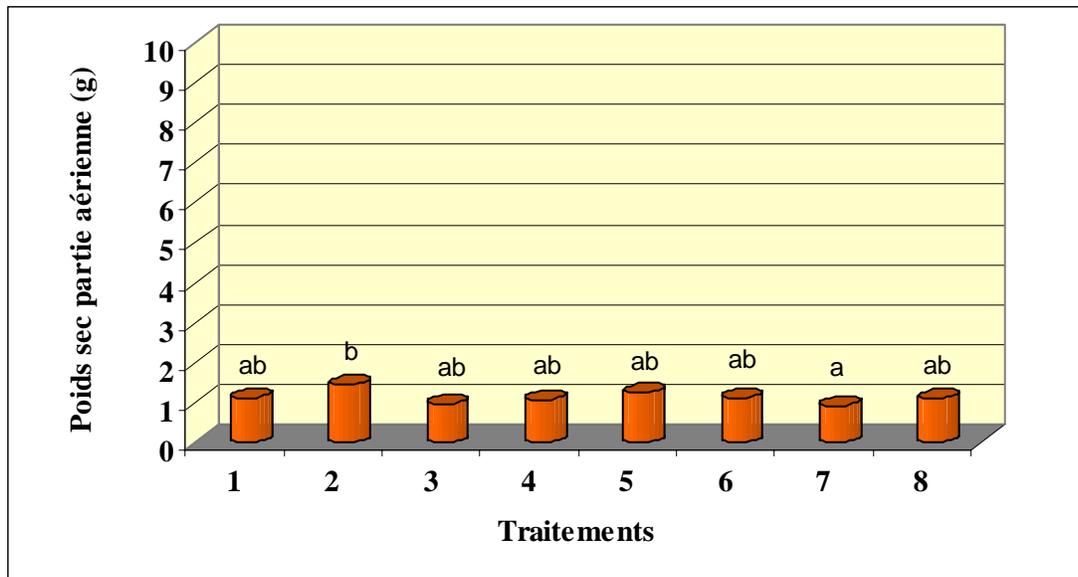
**Figure 53.** Pourcentage de germination du céleri après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 54.** Hauteur moyenne (mm) du céleri après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



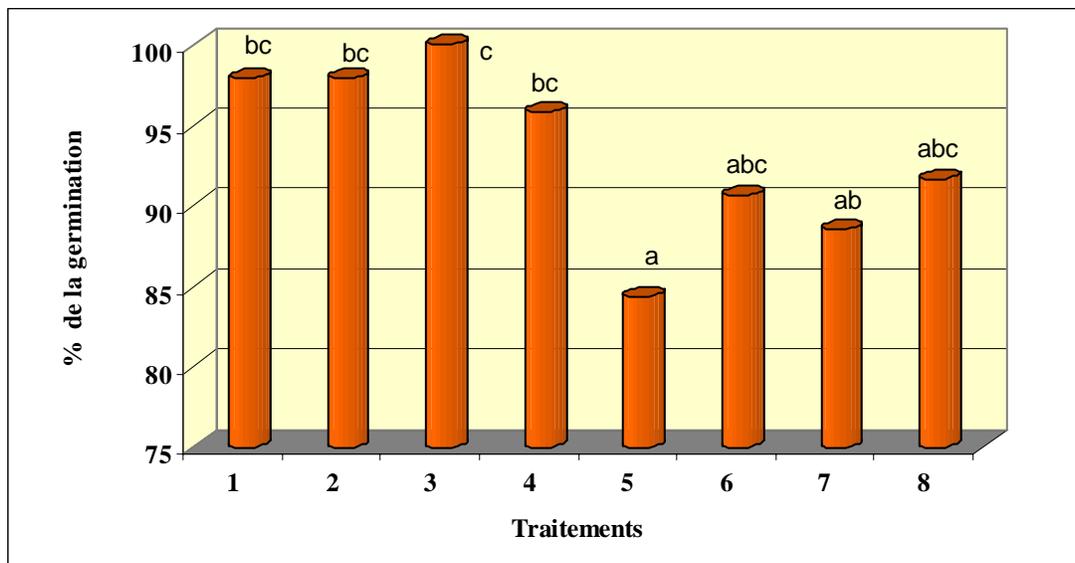
**Figure 55.** Poids frais de la partie aérienne (g) du céleri après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



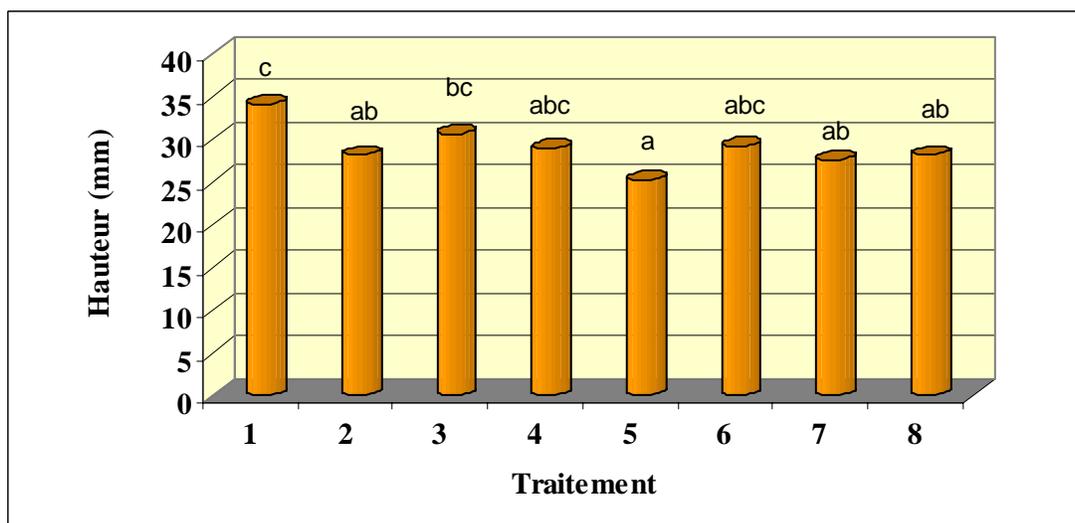
**Figure 56.** Poids sec de la partie aérienne (g) du céleri après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

### Célosie plumeuse

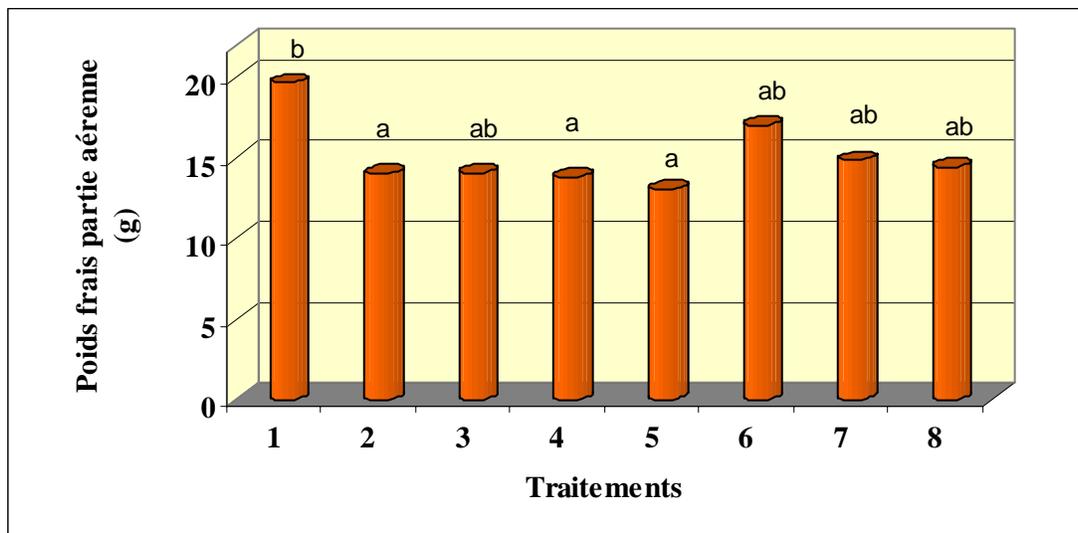
L'émergence de la célosie plumeuse a eu lieu 4 jours après le semis. Aucun symptôme de fontes de semis n'a été observé. Le pourcentage de germination de la célosie varie entre 85-95%. Tous les traitements ont permis un taux de germination compris dans l'écart proposé par l'étiquette. Des différences significatives ont été enregistrées entre les traitements (fig. 57). Les traitements Rootshield sans *R. solani* (3) et témoin inoculé (5) étant différents entre eux. Pour la hauteur (fig. 58), le traitement témoin non inoculé (1) est significativement différent du témoin inoculé (5). La masse fraîche du témoin (1) est significativement différente des traitements Maul-20 (2), Prestop (4) et témoin inoculé (5), ces derniers ayant des masses fraîches inférieures au témoin (fig. 59). Pour la masse sèche (fig. 60), le témoin (1) et MAUL-20 + *R. solani* (6) sont significativement différents des autres traitements. Pour la qualité des racines, le traitement témoin (1) est significativement différent des traitements Maul-20 (2) et Rootshield + *R. solani* (7) (fig. 61). Aucune différence n'a été observée pour l'aspect quantitatif des systèmes racinaires (données non montrées).



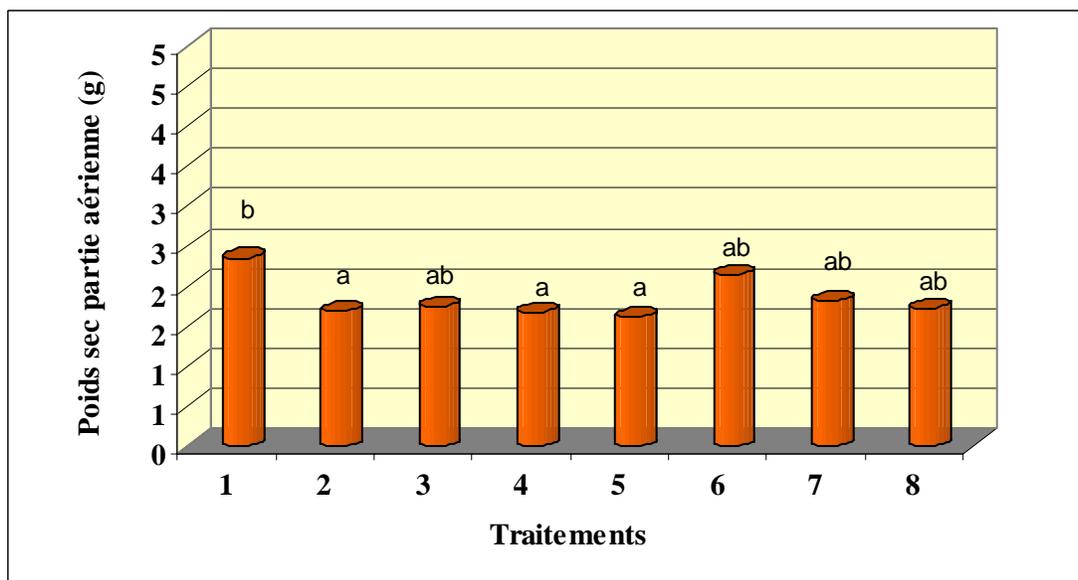
**Figure 57.** Pourcentage de germination de la célosie plumeuse après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



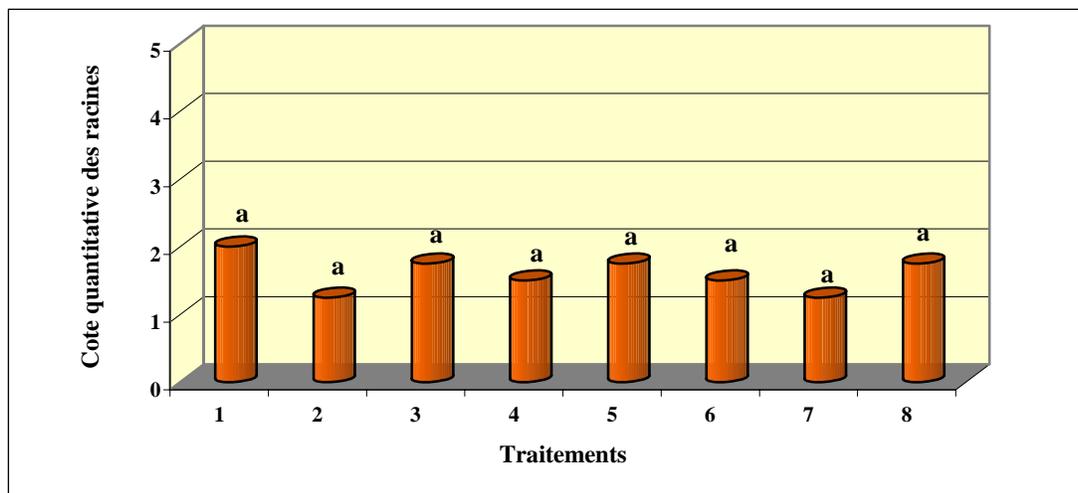
**Figure 58.** Hauteur moyenne (mm) de la célosie plumeuse après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 59.** Poids frais de la partie aérienne (g) de la célosie plumeuse après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



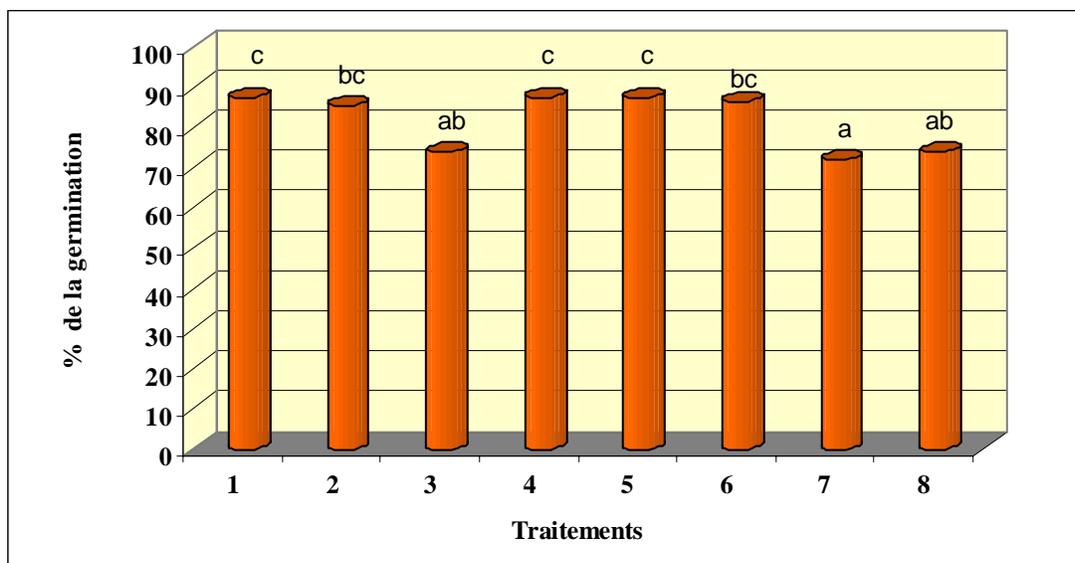
**Figure 60.** Poids sec de la partie aérienne (g) de la célosie plumeuse après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



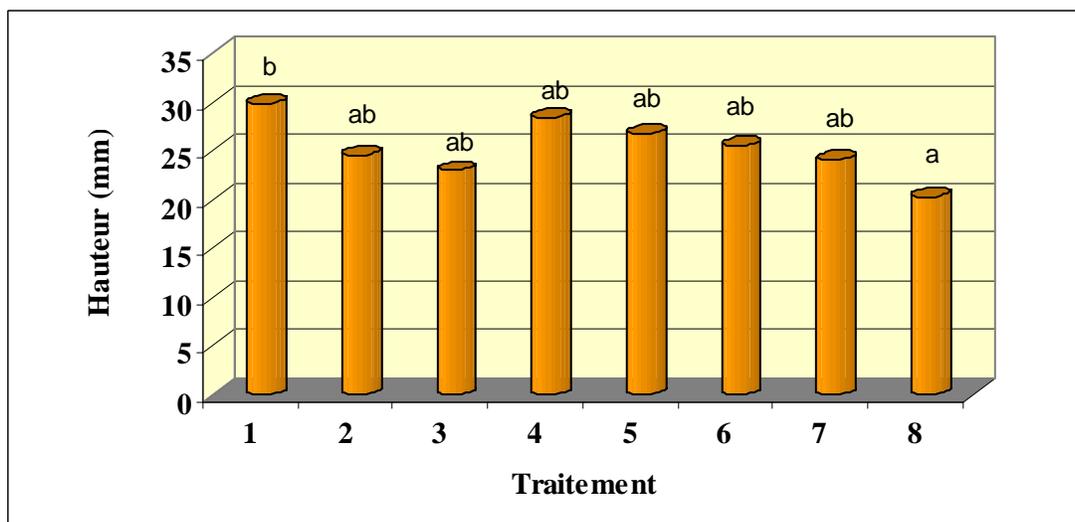
**Figure 61.** Cote qualitative des racines de la tomate après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

## Giroflée

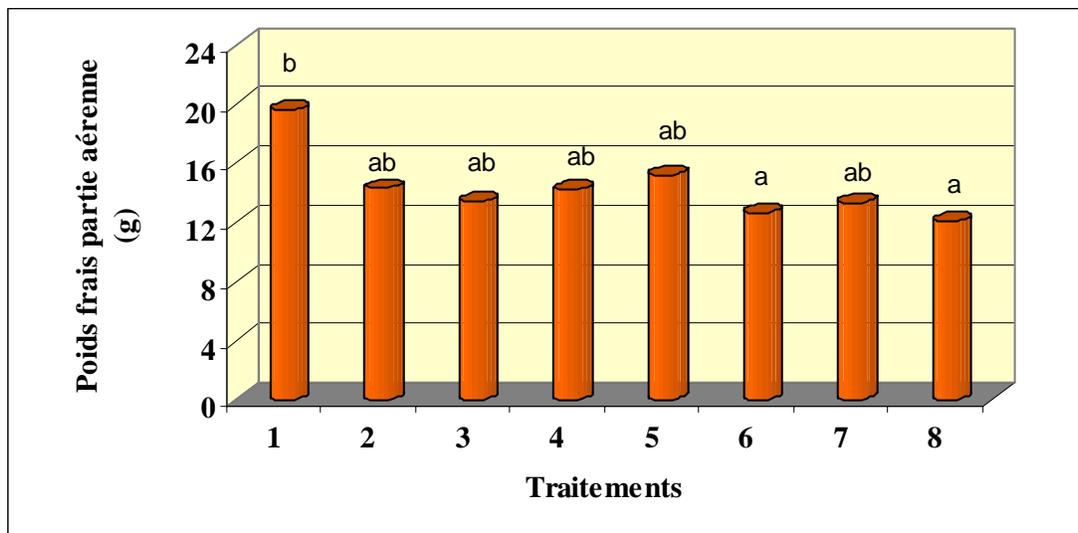
L'émergence de la giroflée a eu lieu 4 jours après le semis. Aucun symptôme de fontes de semis n'a été observé. Le pourcentage de germination de la giroflée varie entre 85-90%. Tous les traitements ont permis un taux de germination compris dans l'écart proposé par l'étiquette sauf pour les traitements Rootshield (3), Rootshield + *R. solani* (7) et Prestop + *R. solani* (8). D'ailleurs une différence statistique a été notée entre tous les traitements et ces trois derniers (fig. 62). Pour la hauteur (fig. 63), le traitement témoin non inoculé (1) est significativement différent du Prestop inoculé (8). Pour la masse fraîche, le témoin (1) est significativement différent de tous les autres traitements (fig. 64). Pour la masse sèche (fig. 65), le témoin (1) est significativement différent de tous les traitements sauf du Prestop (4) et témoin inoculé (5). Pour la qualité (fig. 66) et quantité des racines (données non montrées), aucune différence n'a été observée.



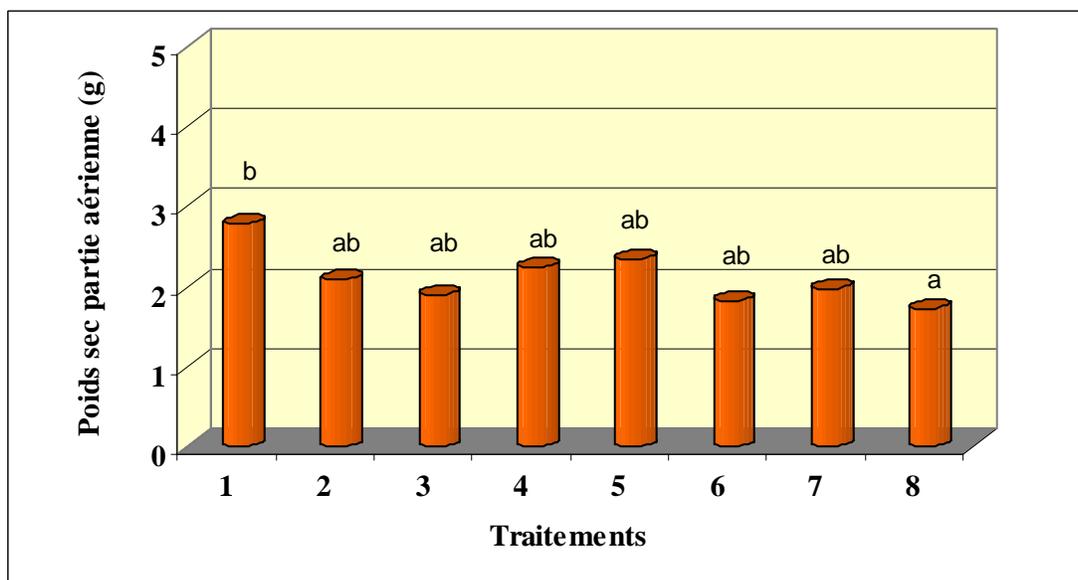
**Figure 62.** Pourcentage de germination de la giroflée après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



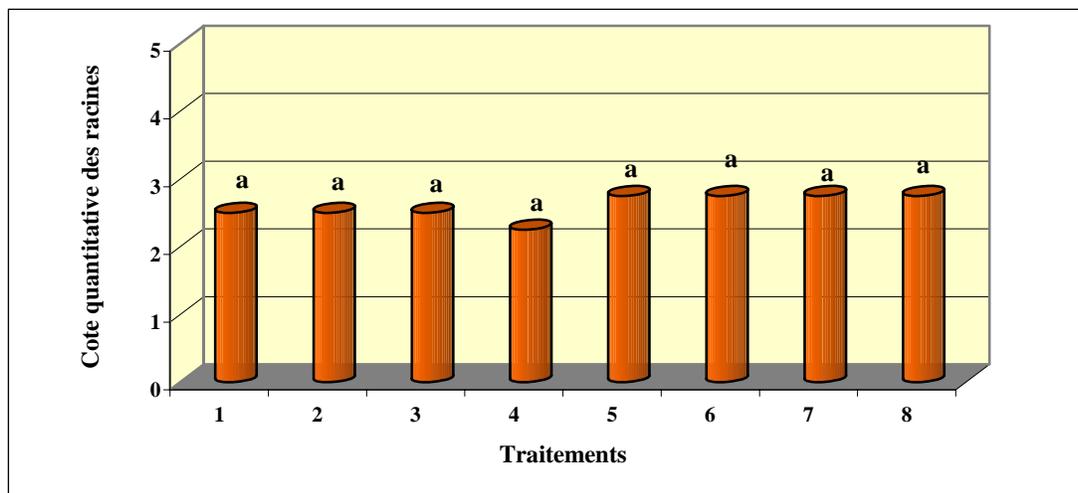
**Figure 63.** Hauteur moyenne (mm) de la giroflée après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 64.** Poids frais de la partie aérienne (g) de la giroflée après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 65.** Poids sec de la partie aérienne (g) de la giroflée après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 66.** Cote qualitative des racines de la giroflée après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

## Zinnia

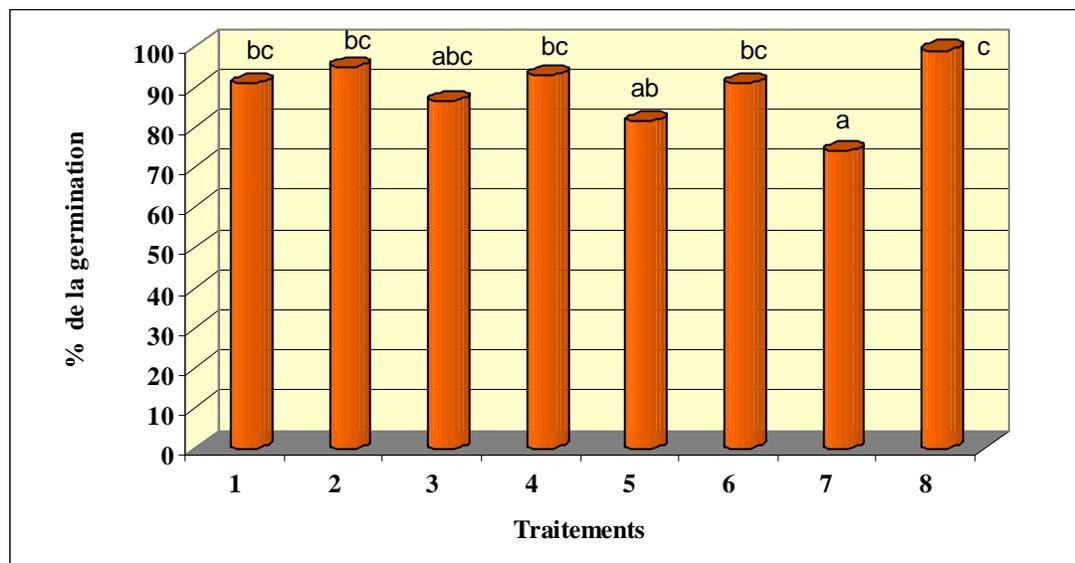
L'émergence du zinnia a eu lieu 4 jours après le semis. Des symptômes de fontes de semis ont été observés au collet de certains plants. Des symptômes sévères ont été observés sur certaines plantules, causant le dessèchement de la plante. Au total, 18 plants ont été prélevés et mis sur milieu de culture SNA<sup>++</sup> afin de confirmer la présence de *Rhizoctonia* (tab. 85). Tous les isollements effectués se sont avérés négatifs. C'est la présence de *Fusarium* qui a été observée sur les géloses. La contamination venait peut-être de semences puisqu'aucune trace de *Fusarium* n'a été notée avec les autres plantes travaillées avec le même substrat.

Le pourcentage de germination du zinnia est de 85-90%. Hormis les traitements témoin inoculé (5) et Rootshield inoculé (7), le pourcentage de germination a été respecté. Des différences significatives ont d'ailleurs été enregistrées entre ces deux traitements et tous les autres (fig. 67).

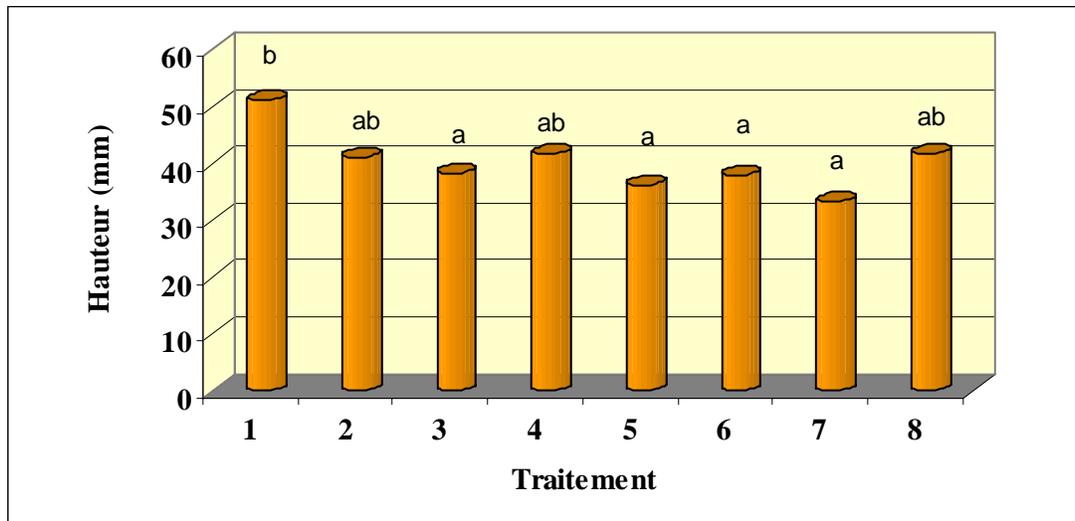
Des différences significatives ont été obtenues pour la hauteur (fig. 68). Il n'y a pas de différence entre le témoin (1) et Maul-20 (2), Prestop (4) et Prestop inoculé (8) mais le témoin est significativement différent des autres traitements. Il n'y a pas de différence significative entre les traitements pour la masse fraîche (fig. 69) et la cote quantitative des racines. Pour la masse sèche, le témoin (1) est significativement différent de tous les traitements sauf du Prestop inoculé (8) (fig. 70).

**Tableau 85.** Fontes de semis observées au collet du zinnia cultivée dans le substrat Pro-Mix BX en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani*

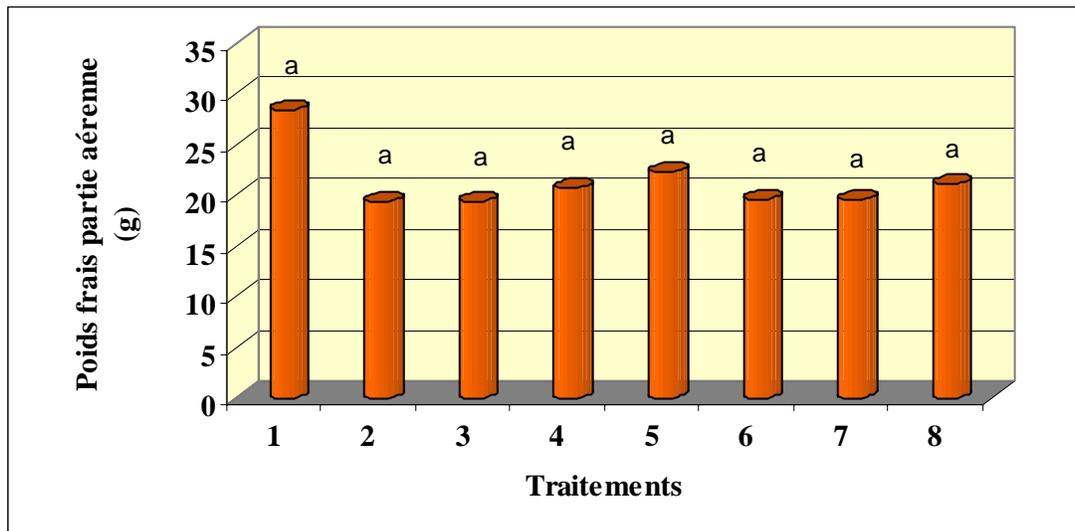
Date	Plante	Anomalies observées	Résultats	Traitements – rep - plants
20-04-05	Zinnia	12 fontes de semis	---	B - #2 - 3 B - #3 - 2, 5 C - #1 - 5 C - #3 - 7 C - #4 - 7 D - #2 - 1 E - #1 - 5 E - #2 - 3 E - #4 - 1 G - #3 - 3 H - #3 - 5
27-04-05	Zinnia	6 fontes de semis	---	A - #1 - 4 C - #4 - 8 F - #3 - 4 G - #4 - 5 H - #2 - 8 H - #3 - 7



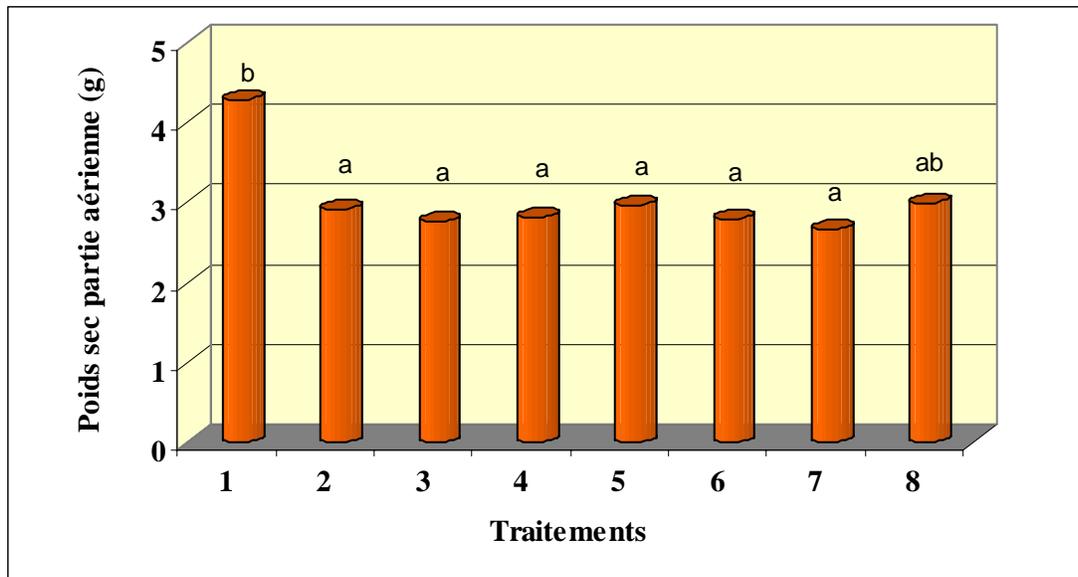
**Figure 67.** Pourcentage de germination du zinnia après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 68.** Hauteur moyenne (mm) du zinnia après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 69.** Poids frais de la partie aérienne (g) du zinnia après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 70.** Poids sec de la partie aérienne (g) du zinnia après 6 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

### En général,

*Rhizoctonia* n'affecte pas le haricot ni le céleri. Chez la tomate, le pourcentage de germination, la hauteur et les masses fraîches et sèches sont favorisés lorsque des agents biologiques seuls sont présents dans le substrat. Chez les plantes ornementales, les conclusions sont moins évidentes. Peu de différences ont été observées et lorsqu'elles sont présentes, elles se retrouvent essentiellement au niveau des témoins inoculé et non inoculé. Chez la giroflée, Prestop ne semble pas très performant. Pour toutes les plantes, il n'y a pas de différence significative tant qu'à la qualité et quantité du système racinaire.

#### 5.4.2.4 **ACTIVITÉ 6. Expérience #2 avec *Trichoderma* MAUL-20, RootShield et Prestop contre *Rhizoctonia solani* sur trois légumes en semis (haricot nain, céleri et tomate de serre) et trois plantes ornementales (célosie plumeuse, giroflée et zinnia)**

*Primo*, pour ce second essai, les mêmes plantes qu'à l'expérience #1 ont fait l'objet de l'étude. Par contre, au cours de l'expérimentation, une hausse de température est survenue dans la serre le 23 juillet 2005, provoquant la mort des plants de zinnia. Aucune donnée ne sera présentée pour cette plante.

*Secundo*, le témoin *Rhizoctonia solani* n'a pas très bien fonctionné. Dans la majorité des analyses, il a «joué» le même rôle que le témoin non inoculé. Par contre, lorsque les agents biologiques étaient présents dans le substrat, il semble avoir agi sur le développement de la plante puisque dans la majorité des cas, les résultats obtenus dans les traitements inoculés avec *R. solani* étaient inférieurs à ceux non inoculé.

*Tertio*, l'analyse des systèmes racinaires (cotes qualitative et quantitative) a été identique pour tous les traitements et plantes. Aucune analyse statistique n'a été réalisée sur cet aspect. Les systèmes racinaires étaient sains.

*Quadros*, en cours d'expérimentation, il est apparu évident que les températures chaudes que nous avons connu cet été a affecté le développement de *Rhizoctonia*. Nous avons essayé d'abaisser la température et de plus ventiler les serres mais malgré cela, il n'a pu se développer adéquatement. À la lumière de ce constat, les essais réalisés avec *Rhizoctonia* devraient se tenir plus au printemps ou à l'automne.

Pour toutes les plantes, deux mesures de hauteur ont été réalisées à intervalle de 2 semaines. La dernière hauteur des plantes a été évaluée la journée de la récolte. Le dénombrement des plants a débuté au stade cotylédon et s'est poursuivi tout au long de l'expérience. Au total, deux dénombrements ont été effectués. Les stades de croissance des plantes ont été déterminés selon le système de code BBCH utilisé internationalement. Ils sont placés en annexe 16 à la suite de chaque tableau résumant les différents paramètres observés.

À la récolte, la masse fraîche de la partie aérienne a été déterminée. Les plants ont ensuite été déposés dans un sac de papier brun (sac de 7 lbs) et placés dans un séchoir à 70°C pendant au moins 48 heures. Le poids sec a ensuite été mesuré. L'apparence du système racinaire a été notée selon deux systèmes de cotes, un pour l'aspect quantitatif et l'autre pour l'aspect qualitatif.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SuperAnova et le test de Tukey a été choisi puisque l'ARLA exige que nous prenions les tests les plus sévères pour trouver les différences significatives.

#### **Cote quantitative**

- 1 - système racinaire sain
- 2 - présence de nécroses sur 1 - 25% du système racinaire
- 3 - présence de nécroses sur 25 - 50% du système racinaire
- 4 - présence de nécroses sur 50-75% du système racinaire
- 5 - présence de nécroses sur plus de 75% du système racinaire

#### **Cote qualitative**

- 1 - système racinaire sain (comme témoin)

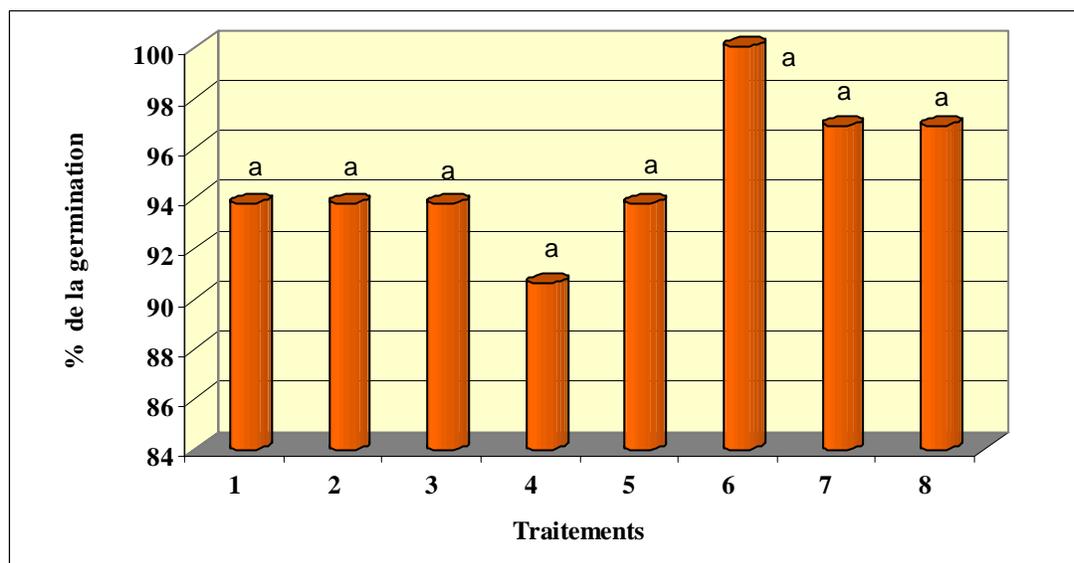
- 2 - système racinaire légèrement aéré
- 3 - système racinaire moyennement aéré
- 4 - système racinaire fortement aéré
- 5 - absence de racines

## Haricot

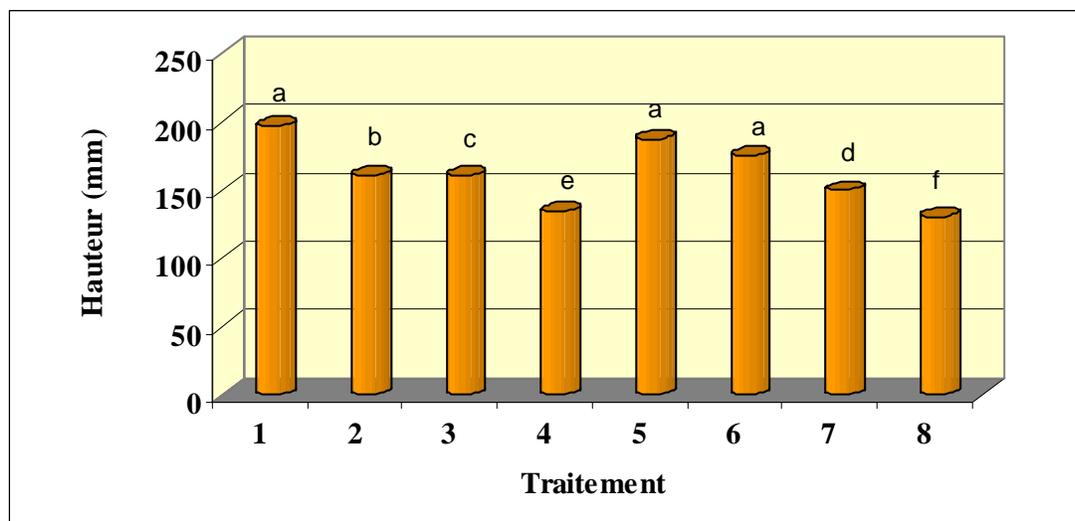
Le haricot a germé 4 jours après le semis. Aucun symptôme de fonte de semis n'a été observé au collet des plants, ni en pré-émergence. Le pourcentage de germination du haricot nain est de 90%. Le pourcentage de germination de tous les traitements est supérieur à 90%, sauf dans le cas du Rootshield inoculé avec *R. solani*. L'analyse statistique ne révèle aucune différence entre les traitements. La présence de *Rhizoctonia* dans le substrat n'affecte pas la germination des graines de haricot nain (fig. 71).

L'analyse statistique de la hauteur ne montre pas de différence entre les deux témoins et MAUL-20 + *R. solani* (fig. 72). Ces trois traitements sont significativement différents des autres qui sont également tous différents entre eux. Les traitements biologiques étant dans la majorité des cas, supérieurs à leur homologue inoculé (sauf pour Prestop).

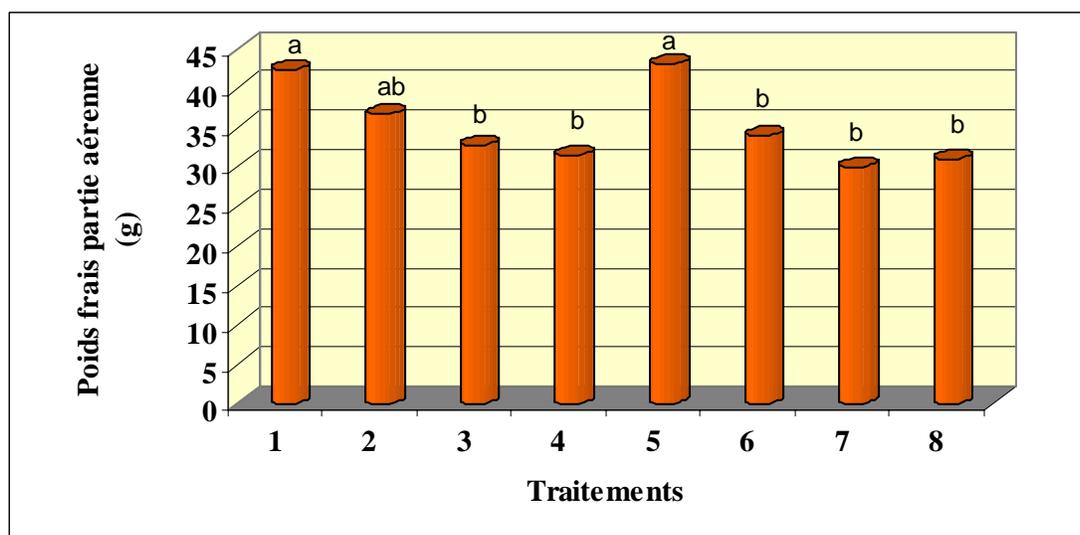
L'analyse des poids frais et sec indique que les deux témoins sont similaires et différents des autres traitements sauf pour Maul-20 (poids frais) et Rootshield (poids sec) où les résultats sont similaires aux témoins (fig. 73 et 74). Tous les autres traitements ne sont pas significativement différent l'un de l'autre.



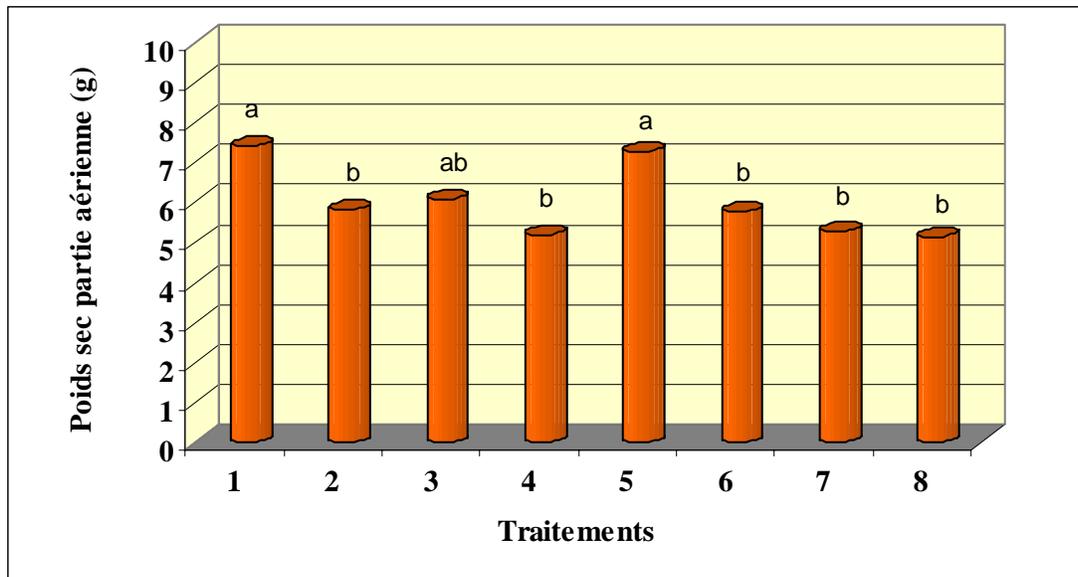
**Figure 71.** Pourcentage de germination du haricot nain après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 72.** Hauteur moyenne (mm) du haricot nain après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 73.** Poids frais de la partie aérienne (g) du haricot nain après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

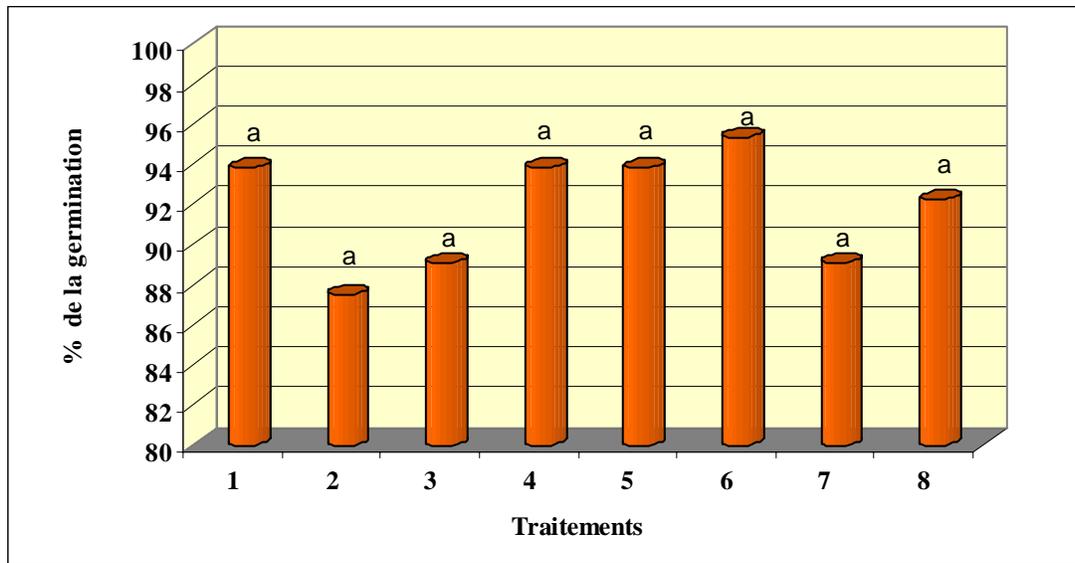


**Figure 74.** Poids sec de la partie aérienne (g) du haricot nain après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

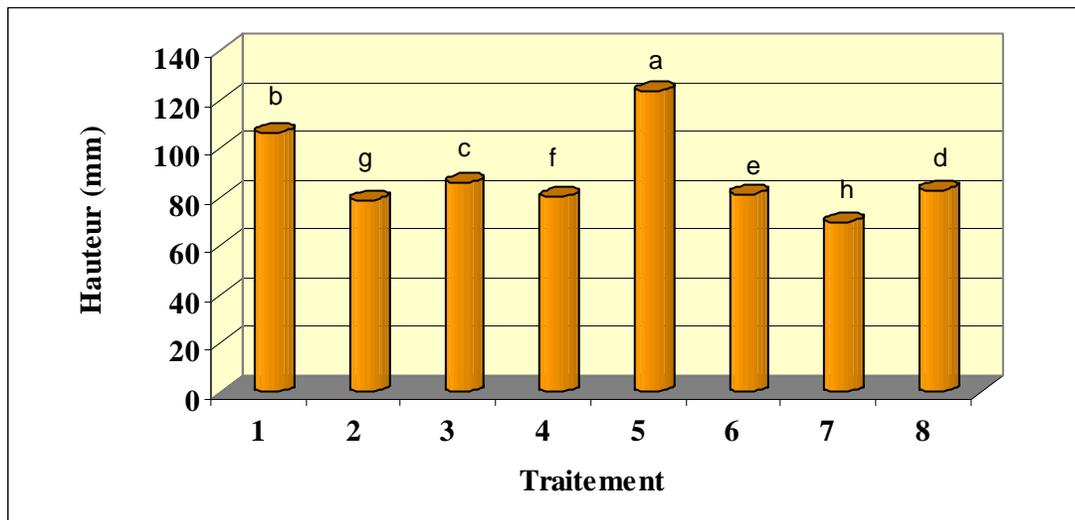
## Tomate

L'émergence de la tomate a eu lieu 4 jours après le semis. Aucun symptôme de fonte de semis n'a été observé au collet des plants, ni en pré-émergence. Le pourcentage de germination de la tomate est de 88%. Tous les traitements ont eu une bonne germination (fig. 75) et aucune différence significative n'a été enregistrée.

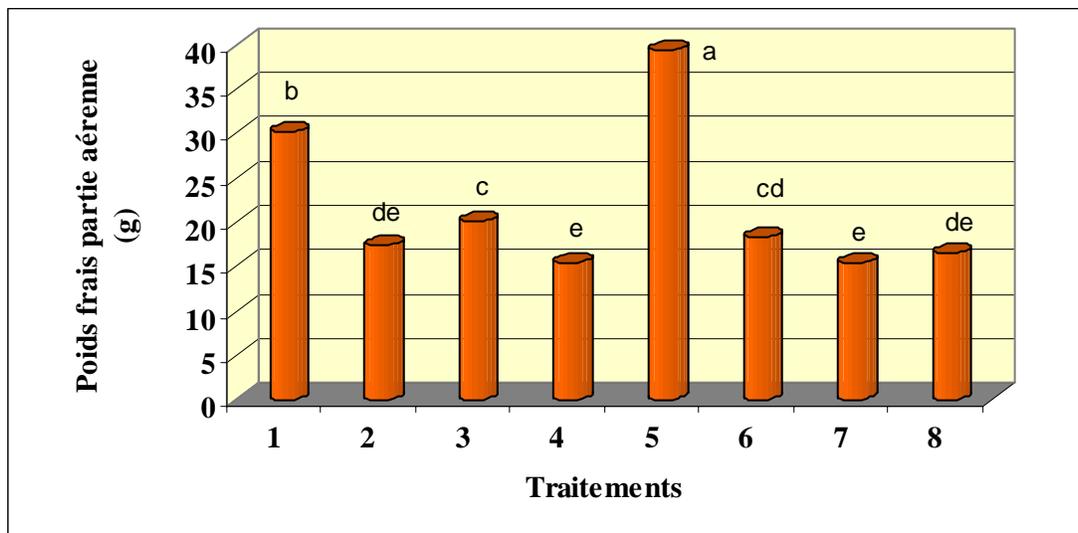
Des différences significatives ont été obtenues pour la hauteur (fig. 76), les masses fraîches (fig. 77) et sèches (fig. 78) de la partie aérienne. Pour la hauteur, tous les traitements sont significativement différents entre eux. Les traitements biologiques sont légèrement supérieurs aux traitements biologiques inoculés. Lorsque seul dans le substrat, Rootshield semble légèrement supérieur aux deux autres. Dans les traitements inoculés avec la maladie, Prestop et MAUL-20 protègent mieux la plante. Pour les masses fraîches et sèches, il n'y a pas de différences significatives entre les traitements biologiques et les traitements bios en présence de *Rhizoctonia* sauf pour Rootshield. Dans le cas de l'évaluation des masses, Rootshield seul est significativement supérieur aux deux autres ou égal à MAUL-20 et significativement inférieur à MAUL-20 lorsque *Rhizoctonia* est présent.



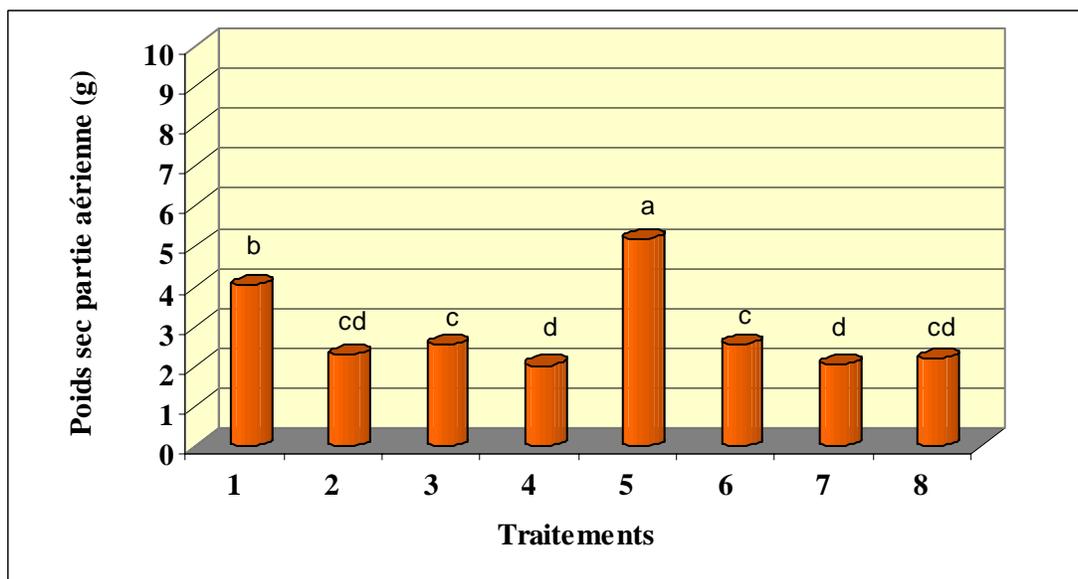
**Figure 75.** Pourcentage de germination de la tomate après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 76.** Hauteur moyenne (mm) de la tomate après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



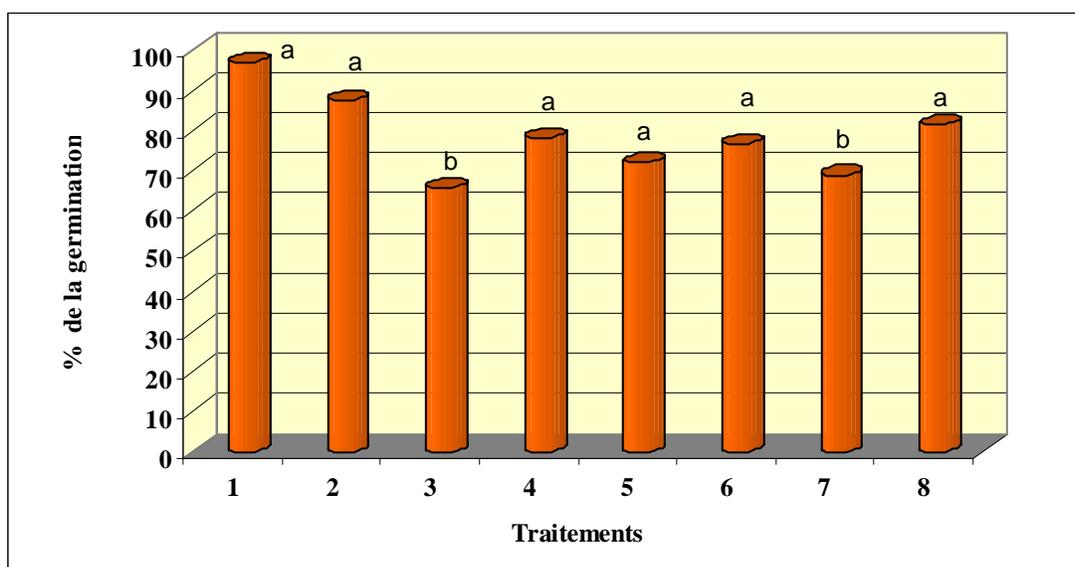
**Figure 77.** Poids frais de la partie aérienne (g) de la tomate après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



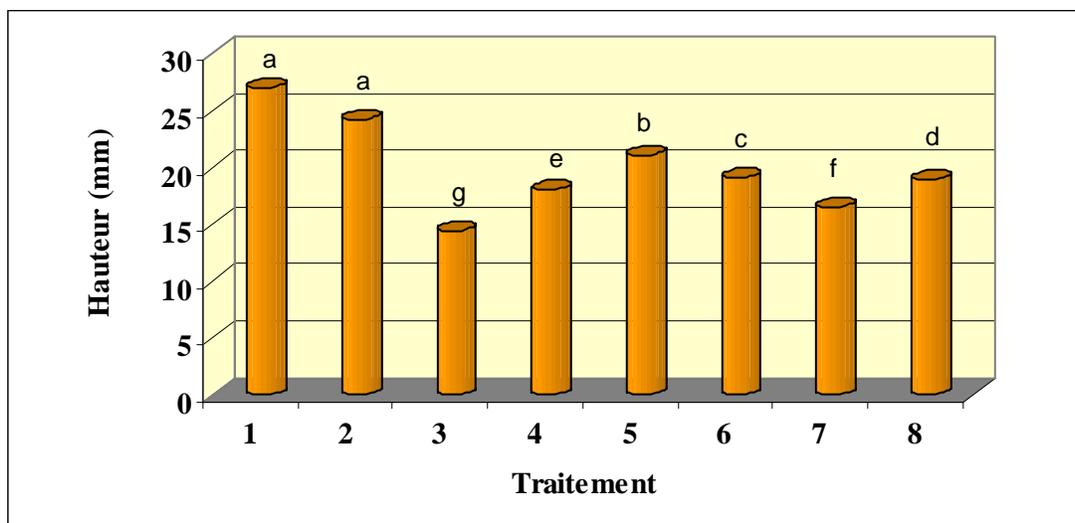
**Figure 78.** Poids sec de la partie aérienne (g) de la tomate après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

## Céleri

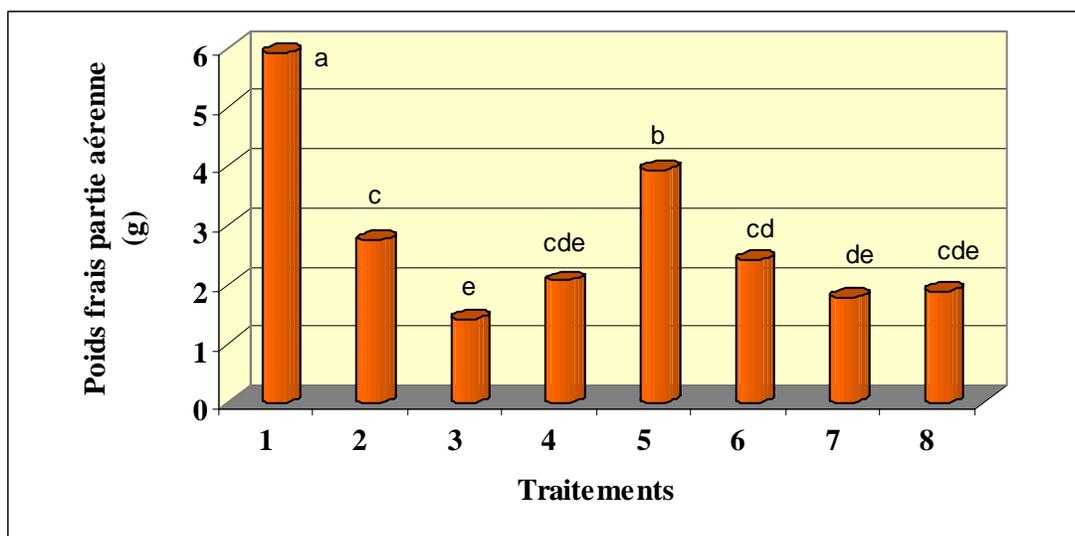
L'émergence du céleri a eu lieu 9 jours après le semis. Aucun symptôme de fonte de semis n'a été observé au collet des plants, ni en pré-émergence. Le pourcentage de germination du céleri est de 97%. Seul le témoin non inoculé a eu une germination similaire à celui mentionné sur l'étiquette (fig. 79). Les plus faibles pourcentages de germination ont été obtenus avec Rootshield seul et inoculé avec la maladie. Ces deux traitements sont significativement différents des autres. Pour la hauteur (fig. 80), le témoin non inoculé et MAUL-20 ont des hauteurs similaires et sont significativement différents des autres traitements. Ces derniers sont tous significativement différents entre eux. Le pire traitement étant Rootshield. Pour les masses fraîches et sèches (fig. 81 et 82), les deux témoins sont significativement différents entre eux et des autres traitements, sauf dans le cas de MAUL-20 pour la masse sèche. Il n'y a pas de différences significatives entre les traitements biologiques et les traitements bios en présence de *Rhizoctonia*. Entre les traitements biologiques, MAUL-20 est significativement différent de Rootshield mais pas de Prestop. En présence de la maladie, aucun des agents de lutte ne se démarque.



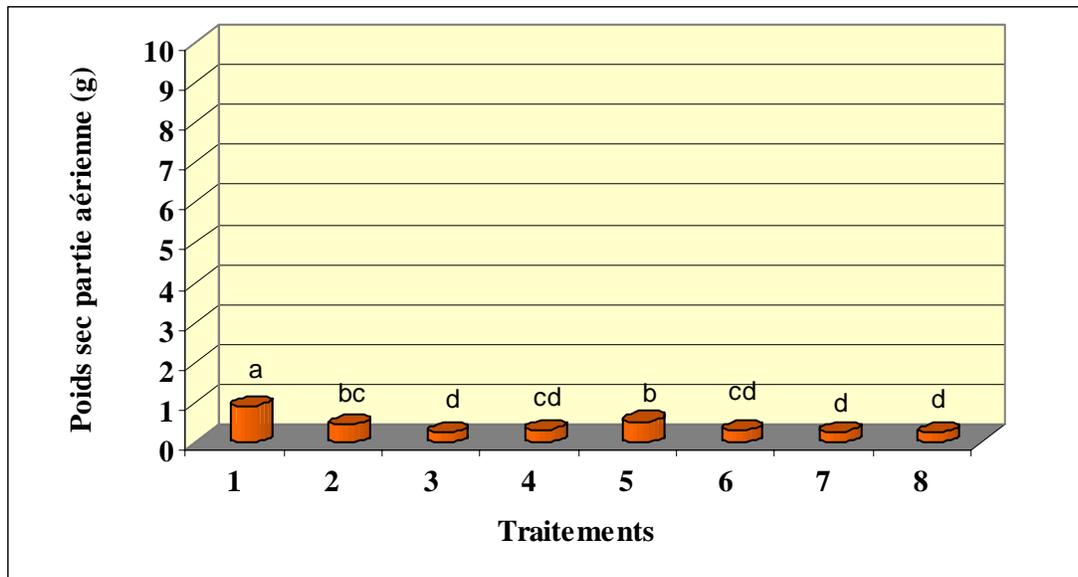
**Figure 79.** Pourcentage de germination du céleri après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 80.** Hauteur moyenne (mm) du céleri après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 81.** Poids frais de la partie aérienne (g) du céleri après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



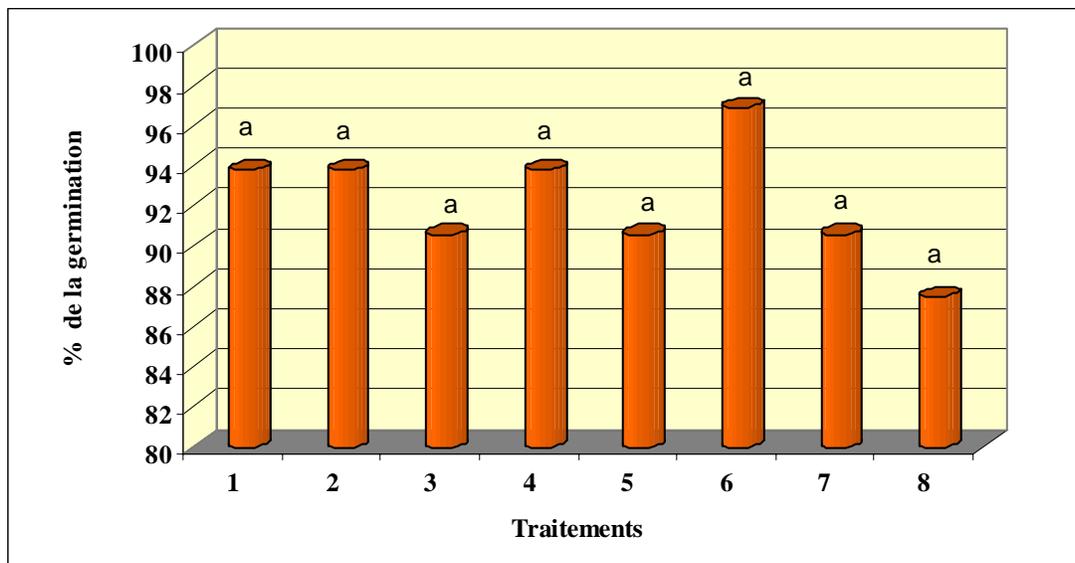
**Figure 82.** Poids sec de la partie aérienne (g) du céleri après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

### Célosie plumeuse

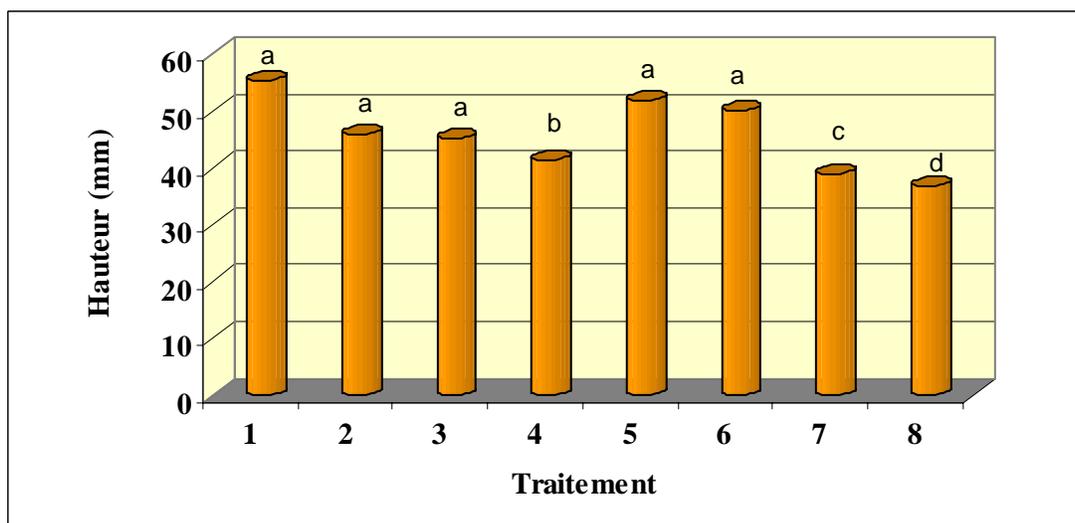
L'émergence de la célosie plumeuse a eu lieu 4 jours après le semis. Aucun symptôme de fontes de semis n'a été observé. Le pourcentage de germination de la célosie varie entre 85-95%. Tous les traitements ont permis un taux de germination compris dans l'écart proposé par l'étiquette. Aucune différence significative n'a été enregistrée entre les traitements (fig. 83).

Pour la hauteur (fig. 84), le traitement Prestop, inoculé ou non, Rootshield + *R. solani* sont significativement différents et inférieurs aux autres traitements. Les agents de lutte ont permis une meilleure croissance des plants lorsque comparé à leur homologue inoculé sauf dans le cas de MAUL-20.

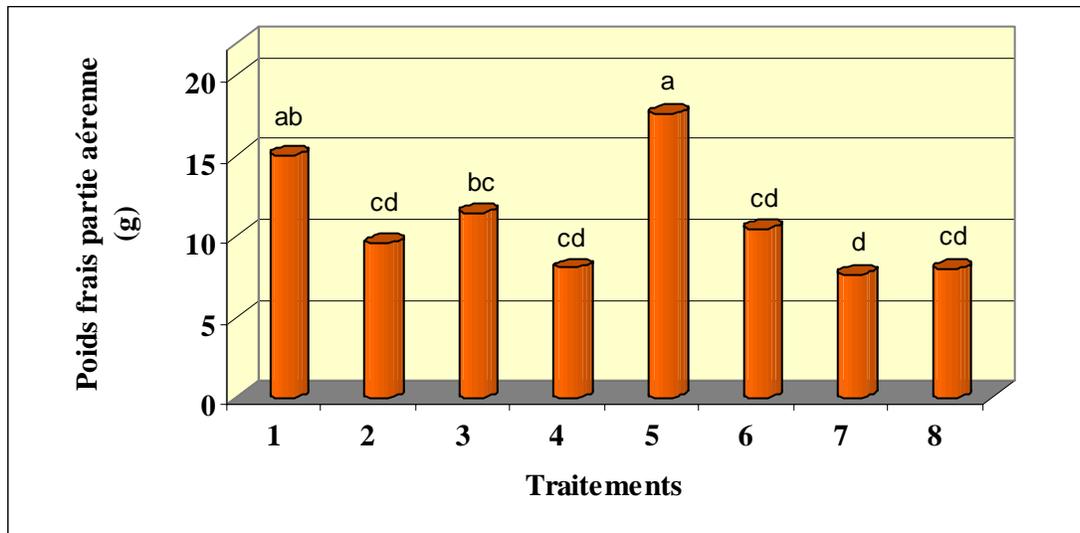
Pour les masses fraîches et sèches (fig. 85 et 86), les traitements non inoculés ne sont pas significativement différents des traitements équivalents inoculés sauf dans le cas de Rootshield. De plus, les agents biologiques seuls ou inoculés, ne sont pas significativement différents entre eux.



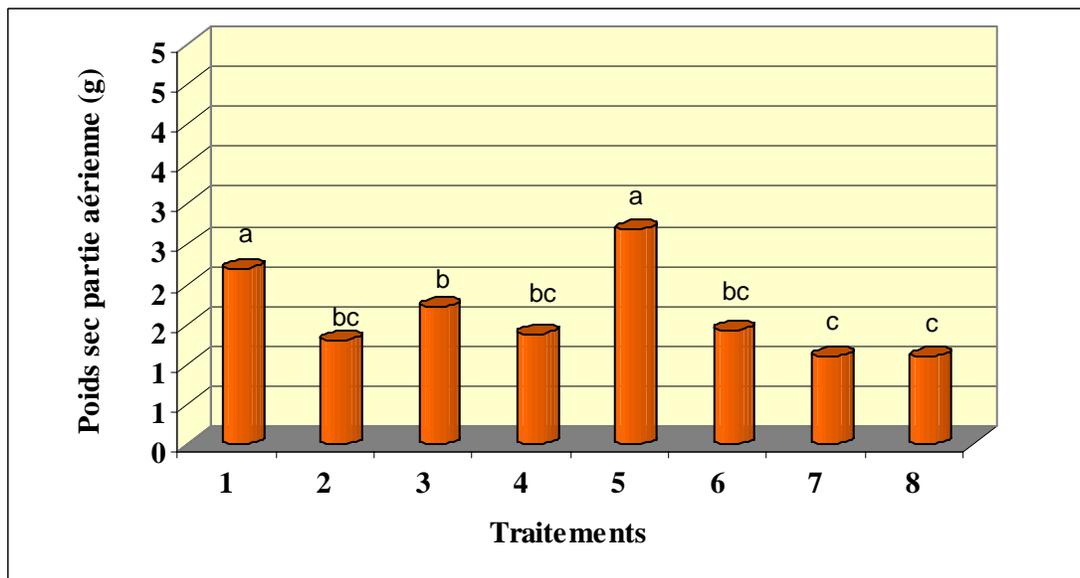
**Figure 83.** Pourcentage de germination de la célosie plumeuse après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 84.** Hauteur moyenne (mm) de la célosie plumeuse après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 85.** Poids frais de la partie aérienne (g) de la célosie plumeuse après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

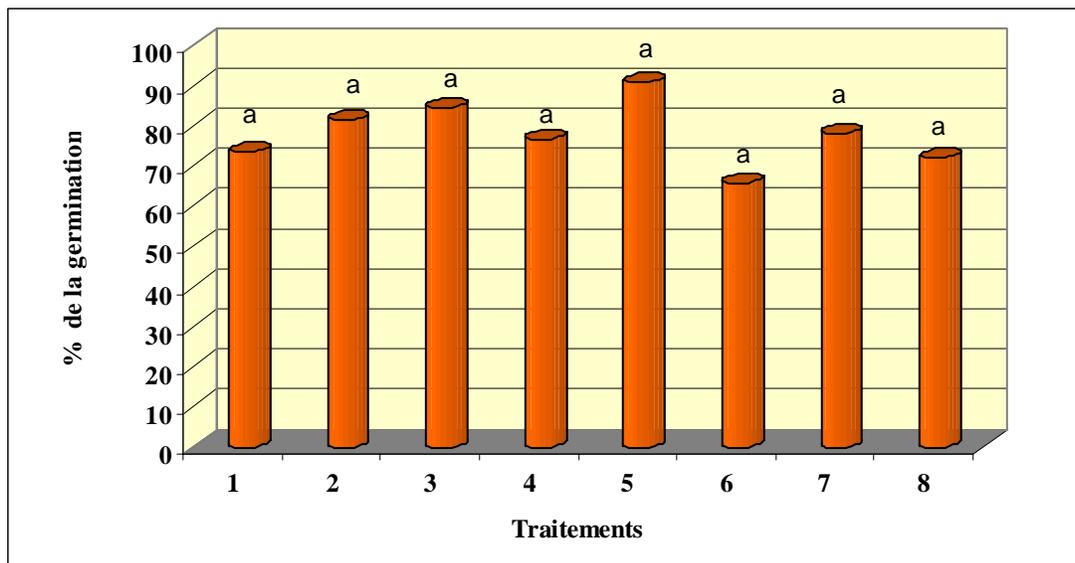


**Figure 86.** Poids sec de la partie aérienne (g) de la célosie plumeuse après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

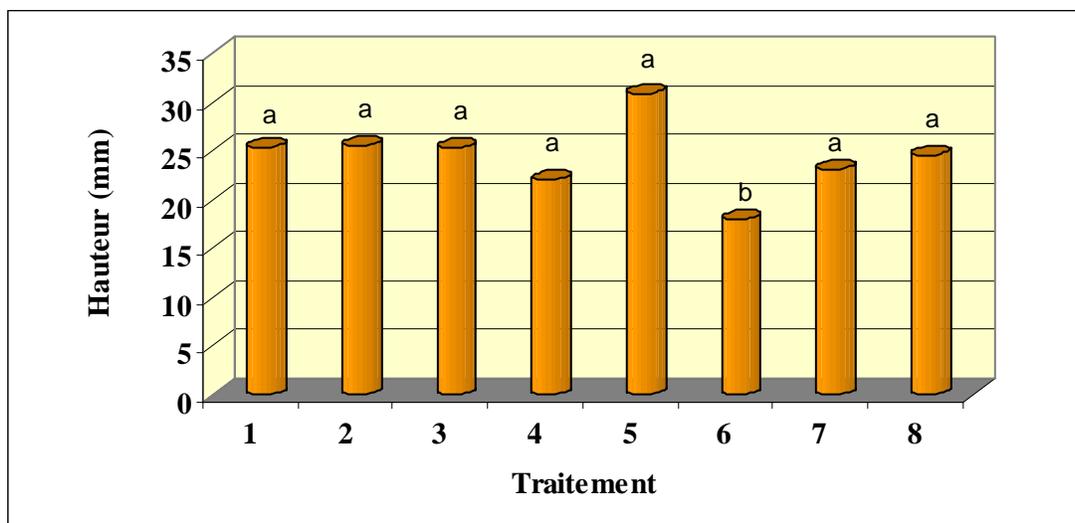
## Giroflée

L'émergence de la giroflée a eu lieu 4 jours après le semis. Aucun symptôme de fontes de semis n'a été observé. Le pourcentage de germination de la giroflée varie entre 85-90%. Hormis les traitements Rootshield et le témoin inoculé, tous les autres traitements ont eu un pourcentage de germination inférieur à celui de l'étiquette. Malgré cet aspect, aucune différence statistique n'a été notée entre les traitements (fig. 87). Pour la hauteur (fig. 88), seul le traitement MAUL-20 + *Rhizoctonia* a eu une faible croissance et est significativement différent de tous les autres traitements.

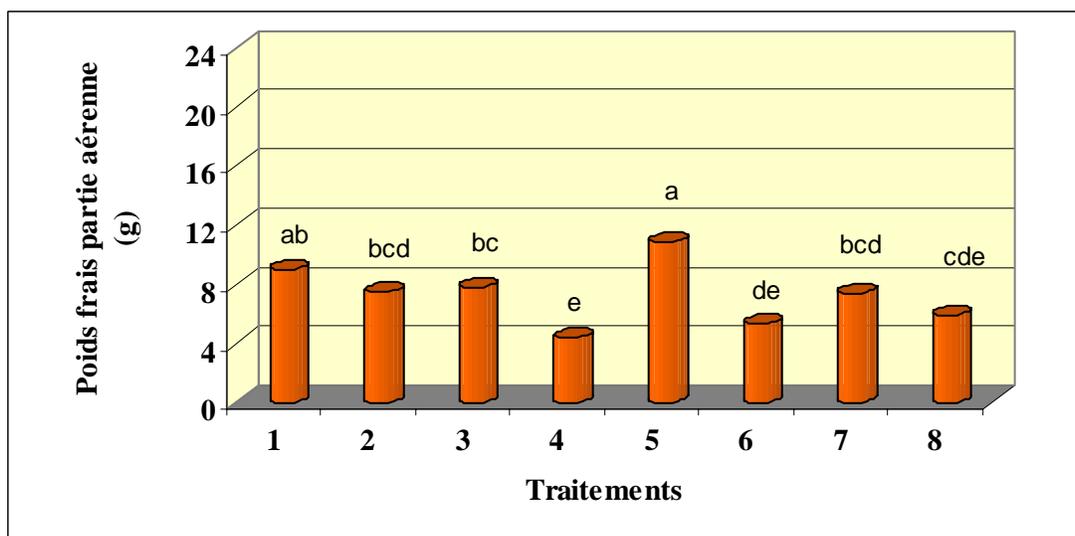
Pour les masses fraîches (fig. 89), les traitements non inoculés ne sont pas significativement différents des traitements équivalents inoculés. Pour la masse sèche (fig. 90), les deux témoins et les traitements touchants MAUL-20 sont significativement différents entre eux. Pour Rootshield et Prestop, il n'y a pas de différence que *Rhizoctonia* soit présent ou non. Pour les deux types de masses, les agents biologiques seuls ou inoculés, ne sont pas significativement différents entre eux sauf dans le cas de Prestop seul qui est significativement inférieur aux deux autres traitements.



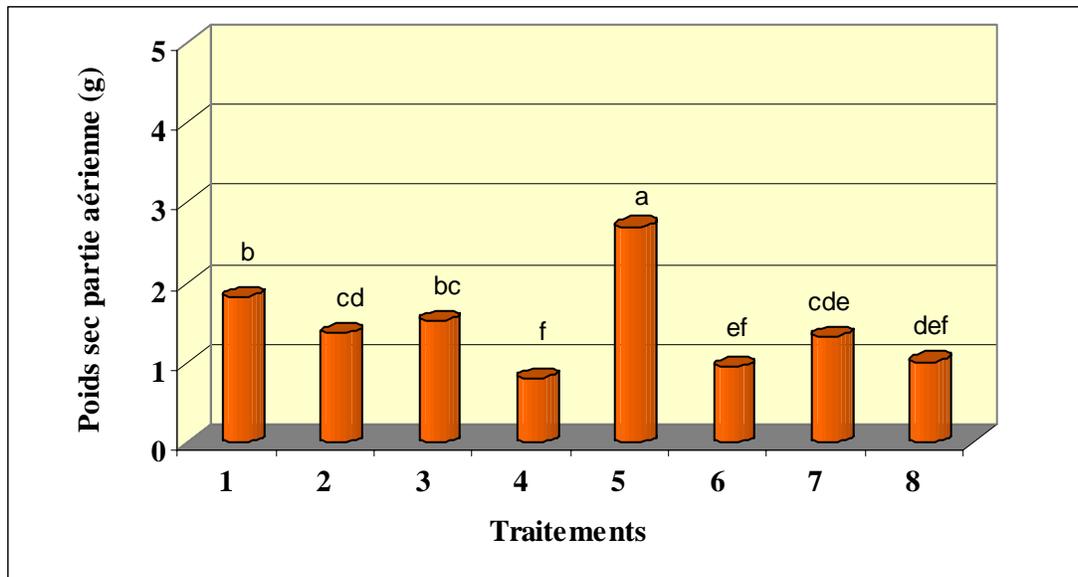
**Figure 87.** Pourcentage de germination de la giroflée après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologique (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 88.** Hauteur moyenne (mm) de la giroflée après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 89.** Poids frais de la partie aérienne (g) de la giroflée après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)



**Figure 90.** Poids sec de la partie aérienne (g) de la giroflée après 5 semaines de croissance en serre lorsque cultivée en présence ou non de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et/ou d'agents de lutte biologiques (1 = témoin, 2 = *Rhizoctonia solani*, 3 = Prestop, 4 = Prestop + *Rhizoctonia solani*, 5 = *Trichoderma* MAUL-20, 6 = *Trichoderma* MAUL-20 + *Rhizoctonia solani*, 7 = RootShield, 8 = RootShield + *Rhizoctonia solani*)

### En général,

*Rhizoctonia* n'affecte pas la germination du haricot, de la tomate, de la célosie plumeuse et de la giroflée. Chez toutes les plantes, la hauteur des plants a été favorisée par la présence d'un agent de lutte biologique dans le substrat, confirmant du même coup l'effet stimulateur de tels agents de lutte. Par contre, nous pouvons dire que *Trichoderma* MAUL-20 favorise le développement de la tomate et du céleri mais affecte celui de la giroflée. Rootshield tant qu'à lui, affecte le développement du céleri mais stimule la tomate et la célosie tandis que Prestop stimule la tomate mais entrave le développement de la célosie. Il n'y a pas de différences significatives entre les agents biologiques seuls et lorsqu'ils sont couplés avec *Rhizoctonia*. Comme mentionné précédemment, la cause probable vient des conditions très chaudes observées dans les serres au cours de cet essai.

### 5.4.3 ACTIVITÉ 7. Expérience avec Prestop et *Trichoderma* MAUL-20 contre *Botrytis cinerea* sur la tomate de serre à l'échelle commerciale

#### Vérification de la présence de *Gliocladium catenulatum* sur les tiges

La première application de Prestop a été faite en date du 1<sup>er</sup> octobre 2004. Toutefois, la présence de *G. catenulatum* n'a pas été détectée lors des mises en culture faites une et trois semaines après ce traitement. Ce n'est que suite au traitement du 22 octobre 2004 que *G. catenulatum* a été détecté. Par la suite, les mises en culture sur PDA de blessures d'effeuillage cicatrisées prélevées sur les tiges traitées avec l'alternance Prestop / fongicides ont permis de vérifier la présence de *G. catenulatum* une et trois semaines après la pulvérisation de Prestop. En ce qui concerne les mises en culture effectuées pour les blessures d'effeuillage prélevées dans les chapelles traitées avec les fongicides en pulvérisation (chapelles 4 et 5), aucune trace de *G. catenulatum* n'a été décelée.

#### Efficacité des traitements en pulvérisation

Dans le cadre de cette expérience, deux traitements en pulvérisation ont été comparés soit, les fongicides en pulvérisation (chapelles 4 et 5) et l'alternance Prestop / fongicides (chapelle 10). Un suivi hebdomadaire de l'apparition des chancre a permis de détecter un total de 17 chancre sur les 40 plants identifiés dans la chapelle traitée avec les fongicides en pulvérisation et le Thiram en badigeonnage (chapelle 5). Dans la chapelle traitée avec les fongicides en pulvérisation et les biofongicides en badigeonnage (chapelle 4), une moyenne de 14 chancre sur 40 plants a été observée soit, 18 sur les 40 plants destinés au badigeonnage avec Prestop et 10 sur les 40 plants destinés au badigeonnage avec MAUL-20. Ces résultats forment donc un intervalle pour le traitement fongicide en pulvérisation de 14 à 17 chancre sur 40 plants. Quant au traitement alternance Prestop / fongicides en pulvérisation, un total de 15 chancre a été observé sur les 40 plants identifiés (chapelle 10).

En ce qui concerne le nombre de plants morts, un plant a été cassé au niveau du chancre éliminé et badigeonné dans la chapelle traitée avec les fongicides en pulvérisation et le Thiram en badigeonnage (chapelle 5). Dans la chapelle 4, sur les 40 plants destinés au badigeonnage avec Prestop, deux plants sont morts, car les chancre n'ont pas été éliminés à temps. Quant aux plants destinés au badigeonnage avec MAUL-20, aucun n'est mort des suites d'un chancre. Sur les 80 plants identifiés dans la chapelle 4, deux plants sont donc morts des suites d'un chancre causé par *B. cinerea*. Pour le traitement alternance Prestop / fongicides (chapelle 10), un plant est mort cassé au niveau du chancre. Le taux de mortalité causé par *B. cinerea* a donc été équivalent pour chaque traitement.

#### Efficacité des traitements en badigeonnage

Dans le cadre de cette expérience, trois traitements en badigeonnage ont été comparés soit le Thiram (chapelles 5 et 10), le Prestop et le MAUL-20 (chapelle 4). Dans la chapelle 5 (fongicides en pulvérisation et Thiram en badigeonnage), 15 chancre ont été badigeonnés et deux ont repris. Dans la chapelle 10 (alternance Prestop / fongicides et Thiram en badigeonnage), 12 chancre ont été badigeonnés et aucun n'a repris. Au total, 27 chancre ont été badigeonnés au Thiram et deux ont repris, soit un taux d'efficacité de 93 %. Dans la chapelle 4, 16 chancre ont été badigeonnés avec Prestop et cinq ont repris, soit un taux d'efficacité de 69 %. Quant à MAUL-20, neuf chancre ont été badigeonnés et aucun n'a repris, soit un taux d'efficacité de 100 %.

## Rendements

Dans un premier temps, le rendement total pour la durée de l'expérience a été évalué. Ainsi, un rendement total de 2 260,9 kg a été prélevé dans la chapelle traitée avec les fongicides en pulvérisation et le Thiram en badigeonnage (chapelle 5). Un rendement de 2 148,9 kg a été mesuré dans la chapelle traitée avec les fongicides en pulvérisation et les biofongicides en badigeonnage (chapelle 4). Un intervalle de 2 148,9 à 2 260,9 kg a donc été établi pour le traitement fongicide en pulvérisation. Un rendement de 2 184 kg a été prélevé dans la chapelle traitée avec l'alternance Prestop / fongicides et le Thiram en badigeonnage (chapelle 10), se situant ainsi dans l'intervalle créé par les rendements obtenus avec le traitement fongicide.

Deuxièmement, une classification mensuelle des fruits a permis de déterminer le pourcentage de fruits vendables et ainsi calculer le rendement en fruits vendables pour chacun des traitements. Les rendements vendables des semaines soumises à la classification ont été totalisés pour la durée de l'expérience (catégories #1, 2 et 3). Ainsi, le rendement vendable et le rendement en fruits de catégorie #1 obtenus dans la chapelle traitée avec l'alternance Prestop / fongicides se situent dans l'intervalle créé par les rendements obtenus dans les deux chapelles traitées avec les fongicides en pulvérisation (tableau 86). En ce qui concerne le rendement en fruits de catégorie #2 obtenu avec l'alternance Prestop / fongicides, il est légèrement inférieur aux rendements obtenus avec les fongicides en pulvérisation. Le rendement en fruits de catégorie #3, soit la partie du rendement vendable directement aux serres, était supérieur avec l'alternance Prestop / fongicides en comparaison avec les fongicides en pulvérisation. Quant au rendement en fruits non-vendables, il était inférieur avec l'alternance Prestop / fongicides.

**Tableau 86.** Rendement et classification des fruits de tomate pour le traitement alternance Prestop / fongicides en comparaison avec le traitement fongicide en pulvérisation – Serres du St-Laurent div. Danville, Québec

	Fongicides en pulvérisation Thiram en badigeonnage	Fongicides en pulvérisation Biofongicides en badigeonnage	Alternance Prestop / fongicides	Comparaison de Prestop / fongicides avec les fongicides
Cat #1 (kg)	602,6	552,7	569,8	=
Cat #2 (kg)	46,8	41,3	39,7	-
Cat #1+2 (kg)	649,5	594,1	609,6	=
Cat #3 (kg)	11,8	11,8	23,4	+
Vendable (kg)	661,3	606,0	633,0	=
Cat #4 (kg)	18,0	9,6	7,3	-

L'essai en serre commerciale mené aux Serres du St-Laurent div. Danville a permis de vérifier que l'alternance Prestop / fongicides en pulvérisation comme traitement préventif permettait une répression du chancre de la tige équivalente à celle offerte par les fongicides conventionnels utilisés par les producteurs. Le rendement issu des plants traités avec l'alternance Prestop / fongicides s'est avéré similaire au rendement issu des plants traités avec les fongicides. Par ailleurs, l'efficacité du biofongicide MAUL-20 en badigeonnage à empêcher la reprise du développement de l'agent pathogène *B. cinerea* s'est avérée similaire à l'efficacité du Thiram en badigeonnage.

Dans un premier temps, la présence de *G. catenulatum* sur les tiges de tomate traitées avec Prestop démontre que les conditions climatiques qui prévalent dans les serres favorisent le développement et la persistance de l'agent de lutte biologique. L'utilisation de *G. catenulatum* dans un contexte d'alternance Prestop / fongicides a permis de constater que le développement et la persistance de l'agent de lutte était possible et

ce, malgré l'application de nombreuses matières actives. Ces résultats confirment les informations fournies par la compagnie Verdera quant à la compatibilité du biofongicide Prestop avec l'iprodione et le soufre (Maiju Heith, Verdera, communication personnelle). Bien qu'aucune information n'ait été fournie par la compagnie quant à la compatibilité du biofongicide Prestop avec le dichloran et le captane, la présence de *G. catenulatum* a été constatée suite à l'application de ces deux matières actives.

Selon les observations effectuées lors de l'essai en serre commerciale mené aux Serres du St-Laurent div. Danville, l'alternance Prestop / fongicides en pulvérisation comme traitement préventif a permis une répression du chancre de la tige similaire à celle offerte par les fongicides en pulvérisation tels qu'utilisés par les producteurs. Ces observations confirment les résultats obtenus lors des deux essais en serre expérimentale menés à l'Université Laval. En effet, le biofongicide Prestop en pulvérisation a permis une répression équivalente à celle offerte par les fongicides en pulvérisation lors du premier essai en serre expérimentale alors qu'il a permis une répression similaire voire supérieure à celle offerte par les fongicides en pulvérisation au cours du deuxième essai sous forte pression de maladie. Utkhede et Mathur (2002) avaient aussi constaté que la répression offerte avec Prestop en pulvérisation était similaire à celle obtenue avec le fenhexamide (Decree). Il devient alors intéressant d'inclure le biofongicide Prestop dans la rotation de produits phytosanitaires utilisés en production commerciale de tomate de serre. Ainsi, la quantité de matières actives appliquée dans les serres serait réduite, diminuant les risques environnementaux, l'impact sur la santé des travailleurs et les risques de résistance aux différentes matières actives par *B. cinerea*.

Lors de cet essai en serre commerciale, la pression de maladie était plutôt faible en comparaison avec certaines années précédentes. Il serait donc intéressant de répéter l'expérience sous plus forte pression de maladie. En effet, aux Serres du St-Laurent div. Danville, le pourcentage de plants morts à cause de *B. cinerea* peut atteindre jusqu'à 20 % lorsque la luminosité est faible (automne et hiver) et que la pression de maladie est forte. Lors de l'essai mené en serre commerciale au cours de l'hiver 2004-2005, le nombre moyen de chancres par rang s'élevait à 54 en comparaison avec 123 chancres par rang au cours de l'hiver précédent (2003-2004). Puisque l'alternance Prestop / fongicides en pulvérisation a permis une répression du chancre de la tige similaire à celle offerte par les fongicides lors de l'essai en serre commerciale et que Prestop en pulvérisation a permis une répression similaire voire supérieure à celle offerte par les fongicides lors des essais en serre expérimentale, il serait intéressant de vérifier l'efficacité du biofongicide Prestop seul en pulvérisation en serre commerciale afin de réduire de façon plus importante la quantité de matières actives appliquée dans la production de tomate de serre.

En ce qui concerne les traitements curatifs en badigeonnage, l'efficacité du biofongicide MAUL-20 s'est avérée similaire à celle du Thiram ce qui confirme les résultats obtenus lors des essais en serre expérimentale menés à l'Université Laval. De plus, comme pour les essais en serre expérimentale, les chancres badigeonnés avec MAUL-20 en serre commerciale étaient de belle apparence, l'argile recouvrant les plaies. L'utilisation de ce biofongicide comme traitement curatif permettrait de réduire la quantité de thirame appliquée dans les serres commerciales et ce, sans modifier la manière de faire des producteurs puisqu'il s'agit aussi d'une pâte à badigeonner. L'efficacité du biofongicide Prestop en badigeonnage s'est avérée moindre que l'efficacité du Thiram. L'efficacité du Prestop en badigeonnage en serre commerciale s'est avérée plus faible qu'en serre expérimentale. Comme pour les essais en serre expérimentale, l'aspect des chancres badigeonnés avec Prestop en serre commerciale était douteux. Les plaies traitées prenaient une couleur brun-beige, les tissus s'affaissaient légèrement et des cloques beiges apparaissaient sur le pourtour des plaies (voir figure 1). Si ces chancres badigeonnés s'étaient trouvés sur des plants de tomate extérieurs aux chapelles d'essais, les travailleurs les auraient rapidement éliminés. Un travail de la part de la compagnie Verdera s'impose donc afin d'améliorer l'apparence des chancres badigeonnés avec Prestop.

Le rendement total et le rendement vendable issus des plants traités avec l'alternance Prestop / fongicides en pulvérisation se sont avérés similaires aux rendements issus des plants traités avec les fongicides conventionnels en pulvérisation lors de l'essai en serre commerciale. Lors des essais en serre expérimentale,

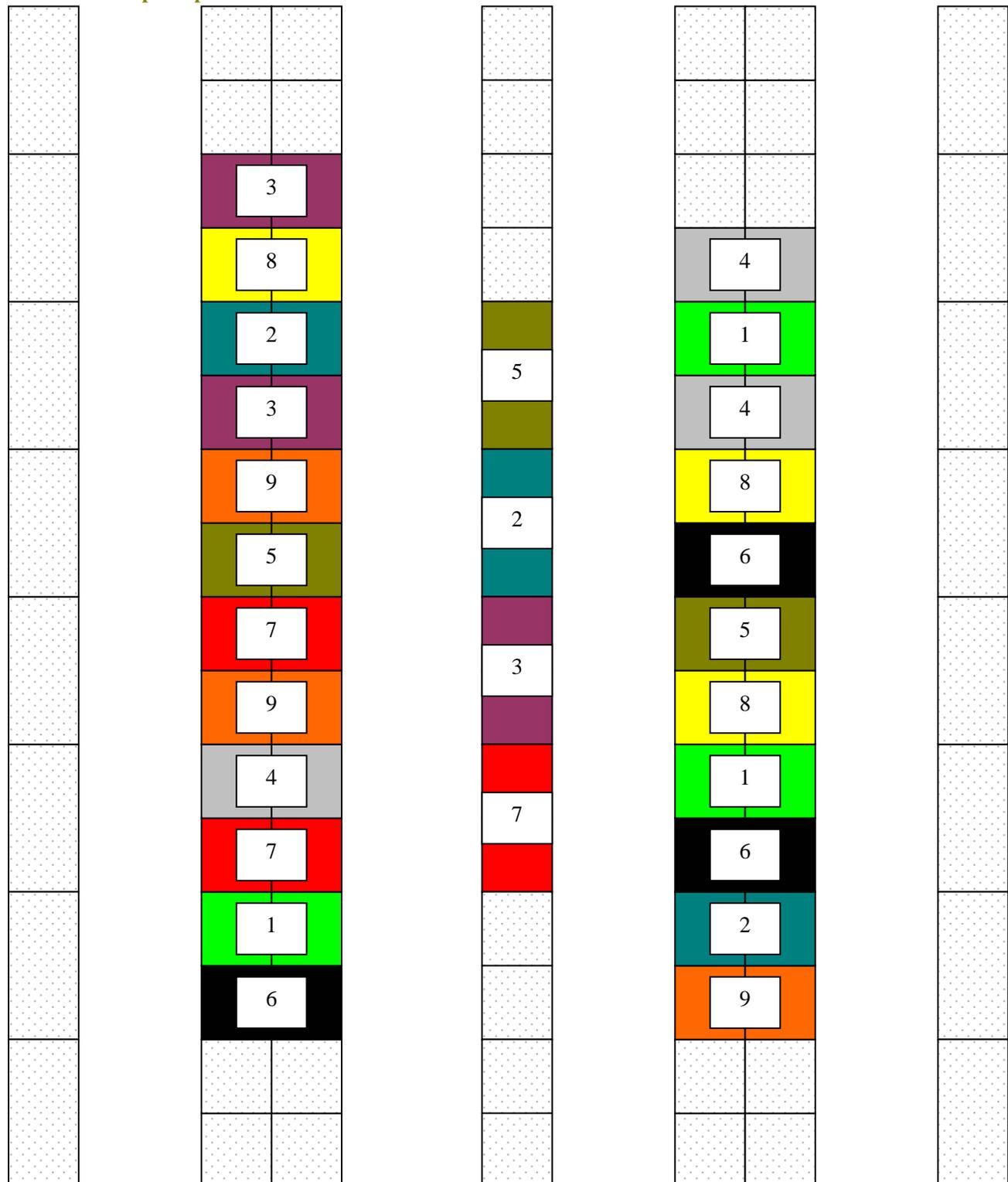
une tendance à la hausse avait été observée pour le rendement vendable issu des plants traités avec Prestop en pulvérisation en comparaison avec le rendement vendable issu des plants traités avec les fongicides en pulvérisation. Cette tendance n'a sans doute pu être observée lors de l'essai en serre commerciale puisque le Prestop était utilisé en alternance avec les fongicides. Il serait donc intéressant d'évaluer les rendements lors d'un essai subséquent avec Prestop comme seul traitement en pulvérisation. Quant à Utkhede et Mathur (2002), ils avaient obtenu un rendement issu des plants traités avec Prestop en pulvérisation équivalent à celui issu des plants traités avec le fenhexamide (Decree). En ce qui concerne le rendement en fruits non-vendables, il s'est avéré moindre pour les plants traités avec l'alternance Prestop / fongicides que pour les plants traités avec les fongicides conventionnels en pulvérisation. Lors des essais en serre expérimentale, la proportion du rendement total associée au rendement non-vendable s'était avérée légèrement supérieure avec Prestop en comparaison avec les fongicides en pulvérisation. En serre commerciale, la pollinisation est faite par des bourdons pollinisateurs alors qu'en serre expérimentale, la pollinisation était faite mécaniquement avec un pollinisateur. Ceci explique peut-être qu'il y ait plus de fruits déformés en serre expérimentale. De même, la régie de culture est optimale en serre commerciale (température, irrigation, fertilisation). Les fruits sont donc moins à risque en ce qui concerne la pourriture apicale et la face de chat qu'en serre expérimentale.

En bref, l'alternance Prestop / fongicides en pulvérisation a permis une répression du chancre de la tige causé par *B. cinerea* similaire à celle offerte par les fongicides couramment utilisés par les producteurs avec des rendements vendables équivalents. De même, l'efficacité du biofongicide MAUL-20 comme traitement curatif en badigeonnage s'est avérée similaire à celle du Thiram, fongicide normalement utilisé par les producteurs en badigeonnage.

Annexe I. Dispositif expérimental utilisé en serre expérimentale pour l'expérience #1 – Université Laval

- 1. Témoin avec présence de *Botrytis*
- 2. Conventionnel avec fongicides
- 3. Vinaigre en badigeonnage
- 4. Prestop® en badigeonnage
- 5. Prestop® en pulvérisation

- 6. MAUL-20 en badigeonnage
- 7. MAUL-20 en pulvérisation
- 8. RootShield® en badigeonnage
- 9. RootShield® en pulvérisation



**Annexe 2.** Dispositif expérimental utilisé en serre expérimentale pour l'expérience #2 – Université Laval

- |  |                                 |
|--|---------------------------------|
| 1. Témoin avec présence de <i>Botrytis</i> | 6. MAUL-20 en badigeonnage      |
| 2. Conventionnel avec fongicides           | 7. MAUL-20 en pulvérisation     |
| 3. Vinaigre en badigeonnage                | 8. RootShield® en badigeonnage  |
| 4. Prestop® en badigeonnage                | 9. RootShield® en pulvérisation |
| 5. Prestop® en pulvérisation               |                                 |

Garde		Garde		Garde		Garde		Garde
Garde		1		3		9		Garde
Garde								Garde
Garde		8		7		2		4
Garde								Garde
Garde		2		9		3		1
Garde								Garde
Garde		6		5		4		3
Garde								Garde
Garde		7		6		5		8
Garde								Garde
Garde		6		5		7		4
Garde								Garde
Garde		2		9		8		1
Garde								Garde
Garde		Garde		Garde		Garde		Garde

**Annexe 3.** Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience portant sur la fonte de semis causé par *Pythium* sur la tomate et la célosie – première expérience

### Célosie

Reps			
4	3	2	1
7	5	5	8
2	1	8	4
1	2	2	7
4	3	7	6
8	6	4	5
5	4	6	2
6	7	3	3
3	8	1	1

### Tomate

Reps			
4	3	2	1
5	4	6	3
6	5	4	1
1	3	2	5
3	7	7	6
7	6	8	7
8	8	3	4
2	1	5	8
4	2	1	2

### Traitements

1. PRO-MIX BX témoin (sans *Rhizoctonia solani*)
2. PRO-MIX BX avec *Trichoderma* MAUL-20 (sans *R. solani*)
3. PRO-MIX BX avec Rootshield (sans *R. solani*)
4. PRO-MIX BX avec Prestop (sans *R. solani*)
  
5. PRO-MIX BX témoin (**avec** *R. solani*)
6. PRO-MIX BX avec *Trichoderma* MAUL-20 (**avec** *R. solani*)
7. PRO-MIX BX avec Rootshield (**avec** *R. solani*)
8. PRO-MIX BX avec Prestop (**avec** *R. solani*)

**Annexe 4.** Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience portant sur la fonte de semis causé par *Pythium* sur la tomate et la célosie – deuxième expérience

### Célosie

Reps			
4	3	2	1
2	1	7	4
4	2	6	5
1	6	2	8
3	8	1	1
5	4	4	2
8	5	8	6
6	3	5	7
7	7	3	3

### Tomate

Reps			
4	3	2	1
8	1	5	1
2	5	2	8
6	8	3	5
5	3	1	4
1	2	6	6
3	7	7	2
4	4	8	3
7	6	4	7

### Traitements

1. PRO-MIX BX témoin (sans *Rhizoctonia solani*)
2. PRO-MIX BX avec *Trichoderma* MAUL-20 (sans *R. solani*)
3. PRO-MIX BX avec Rootshield (sans *R. solani*)
4. PRO-MIX BX avec Prestop (sans *R. solani*)
  
5. PRO-MIX BX témoin (**avec** *R. solani*)
6. PRO-MIX BX avec *Trichoderma* MAUL-20 (**avec** *R. solani*)
7. PRO-MIX BX avec Rootshield (**avec** *R. solani*)
8. PRO-MIX BX avec Prestop (**avec** *R. solani*)

**Annexe 5.** Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience portant sur la fonte de semis causé par *Rhizoctonia solani* de légumes et plantes ornementales – première expérience

**Tomate**

4	3	2	1
C	H	G	C
G	F	A	A
E	A	E	B
F	C	B	E
B	D	D	G
D	B	C	D
A	E	H	F
H	G	F	H

**Céleri**

4	3	2	1
E	E	F	D
B	H	B	F
F	C	E	C
G	G	H	G
C	F	A	E
A	B	D	B
D	D	C	H
H	A	G	A

**Haricot nain**

4	3	2	1
C	E	H	A
D	C	E	G
E	D	G	C
F	G	C	B
A	H	D	D
H	B	B	F
B	A	A	E
G	F	F	H

**Célosie**

4	3	2	1
F	B	F	C
E	H	E	E
H	A	A	F
A	E	H	A
D	F	C	G
C	G	B	B
G	D	G	D
B	C	D	H

**Annexe 5 (suite).** Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience portant sur la fonte de semis causé par *Rhizoctonia solani* de légumes et plantes ornementales – première expérience

**Zinnia**

4	3	2	1
F	F	H	B
G	A	G	F
D	G	A	E
A	H	C	C
C	D	E	H
B	E	D	G
E	C	F	A
H	B	B	D

**Giroflée**

4	3	2	1
F	E	E	A
E	H	D	B
H	D	B	E
B	B	C	D
D	G	H	H
G	A	G	G
C	C	F	C
A	F	A	F

**Annexe 6.** Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience portant sur la fonte de semis causé par *Rhizoctonia solani* de légumes et plantes ornementales – deuxième expérience

### Tomate

4	3	2	1
C	H	G	C
G	F	A	A
E	A	E	B
F	C	B	E
B	D	D	G
D	B	C	D
A	E	H	F
H	G	F	H

### Céleri

4	3	2	1
E	E	F	D
B	H	B	F
F	C	E	C
G	G	H	G
C	F	A	E
A	B	D	B
D	D	C	H
H	A	G	A

### Haricot nain

4	3	2	1
C	E	H	A
D	C	E	G
E	D	G	C
F	G	C	B
A	H	D	D
H	B	B	F
B	A	A	E
G	F	F	H

### Célosie

4	3	2	1
F	B	F	C
E	H	E	E
H	A	A	F
A	E	H	A
D	F	C	G
C	G	B	B
G	D	G	D
B	C	D	H

Annexe 6 (suite). Dispositif expérimental utilisé pour l'expérience portant sur la fonte de semis causé par *Rhizoctonia solani* de légumes et plantes ornementales – deuxième expérience

### Zinnia

4	3	2	1
F	F	H	B
G	A	G	F
D	G	A	E
A	H	C	C
C	D	E	H
B	E	D	G
E	C	F	A
H	B	B	D

### Giroflée

4	3	2	1
F	E	E	A
E	H	D	B
H	D	B	E
B	B	C	D
D	G	H	H
G	A	G	G
C	C	F	C
A	F	A	F

**Annexe 7.** Pourcentage de germination des spores de *Trichoderma* estimé lors des observations effectuées pour l'établissement de la charte de compatibilité de *Trichoderma* avec les pesticides chimiques utilisés dans les serres

Fongicides	Pourcentage de germination des spores de <i>Trichoderma</i>			
	Concentration (ppm)			
	0	1	10	100
Aliette 80 WDG	97	98	99	99,7
Botran 75 WP	98,2	99	99,7	99,3
Captan 50 WP	97	96,7	25	0
Captan 80 WP	98,2	99,7	24,7	0
Cuivre fixe 50%	98,2	98	99,7	99,7
Decree 50 WDG	94,2	95,3	97,7	97,7
Ferbam 76 WDG	99,5	16	38,3	0
Folpan 50 WP	94,2	72,7	0	0
Manzate 200 DF	98,2	96,7	0	0
Meastro 80 DF	98,2	99,7	62	0
Meltatox 42,6%	97	95,7	93	0
No Damp 2,5%	99,5	96,7	42	0
Nova 40 WP	99,5	100	82,3	0
Rovral 50 WP	98,2	99	84,3	83,3
Senator 70 WP	98,2	94,3	100	100
Soufre microfin 92%	98,2	98,7	100	95,7
Supra Captan 80 WDG	98,2	98	79,3	0
Thiram 80 WP	98,2	43	96,7	0
Truban 25 EC	97	99,7	99,3	82,3
Truban 30 WP	99,5	97,3	99,7	60,7
Insecticides et acaricides				
Ambush 50 EC	100	98	99	100
Avid 1,9%	99	100	100	79
Decis 5%	97	99	100	100
Diazinon 500	99	100	100	99
Dyno-Mite 75%	99	98	99	100
Enstar II 65%	99	100	100	100
Orthène T et O spray 75%	100	100	100	99
Pirliss 50 DF	100	00	99	99
Savon insecticide 25%	97	98	99	96
Thiodan 50 WP	100	99	99	99
Trumpet 80	100	97	100	99
Kelthane 50 WP	100	99	98	97

**Annexe 8.** Barème de pondération employé lors de l'évaluation de l'activité antagoniste de *Trichoderma* vis-à-vis les agents pathogènes.

**Critères de décision**

**1. Temps requis pour obtenir la zone de contact**

<b>Temps (jours)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>Poids associé</b>	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

**2. Mesure (mm) de la zone de contact \***

<b>Mesure (mm)</b>	<b>0-10</b>	<b>11-20</b>	<b>21-30</b>	<b>31-40</b>	<b>41-50</b>	<b>51-60</b>	<b>61-70</b>	<b>71-80</b>	<b>81-90</b>
<b>Poids associé</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9

**3. Zone d'inhibition (intensité de la coloration)\*\***

<b>Coloration</b>	<b>Poids</b>
aucune	0
jaune très pâle - pâle	1
+	2
++	3
+++	4
++++	5

**4. Sporulation dense et/ou différente au contact \*\*\***

<b>Sporulation</b>	<b>Poids</b>
aucune	0
sporulation dense ou différente	1
sporulation dense et différente	2

**5. Présence ou absence de zone claire au contact**

<b>Zone claire</b>	<b>Poids</b>
aucune	0
présence	1

## 6. Envahissement de *Trichoderma* sur l'agent pathogène ou vice et versa

Envahissement	Poids
aucun	0
par les côtés	1
direct mais limité	2
direct mais intense	3
direct mais total	4

## 7. Intensité de sporulation de *Trichoderma* sur l'agent pathogène \*\*\*\*

Intensité	Poids
aucune	0
faible	1
moyen	2
fort	3

\* La croissance radiale mesurée (mm) à partir du centre de la pastille de gélose de *Trichoderma* jusqu'à la zone de contact entre les deux champignons (*Trichoderma* et l'agent pathogène). Le diamètre d'un boîte de Pétri étant de 85 mm.

\*\* La présence de la zone d'inhibition entre les deux champignons (*Trichoderma* et l'agent pathogène) à l'étude est notée par l'intensité de la coloration à la zone de contact (aucune coloration à orange en passant par différentes intensités de jaune).

\*\*\* La sporulation différente au contact se manifeste par un aspect floconneux des hyphes de *Trichoderma*.

\*\*\*\* Le poids associé est négatif lorsque l'agent pathogène envahit *Trichoderma*.

**Annexe 9.** Suivie phytosanitaire et traitements réalisés dans la serre de l'Université Laval – expérience #1

Date	Lutte aux insectes	Traitements en pulvérisation	Traitements en badigeonnage	Traitements chimiques	Introduction de <i>Botrytis</i>
17-12-03	<i>Encarsia formosa</i>				
29-12-04	<i>Encarsia formosa</i>				
07-01-04		oui		Rovral	
14-01-04					oui
22-01-04					oui
23-01-04	<i>Encarsia formosa</i>				
27-01-04		oui		Botran	
07-02-04				Soufre microfin	
10-02-04		oui		Decree	
12-02-04	<i>Encarsia formosa</i>				oui
24-02-04		oui		Rovral	oui
09-03-04		oui	oui	Botran	
18-03-04	<i>Encarsia formosa</i>				
23-03-04		oui	oui	Decree	
26-03-04				Enstar + Safer's	
06-04-04		oui	oui	Rovral	
08-04-04	<i>Encarsia formosa</i>				oui
20-04-04		oui	oui	Botran	
22-04-04					oui
04-05-04		oui	oui	Decree	
06-05-04	<i>Encarsia formosa</i>				
07-05-04				Soufre microfin	

**Remarque :**

***Encarsia formosa* est utilisé contre la mouche blanche (aleurodes)**

Enstar + Safer's ont été employés en mélange pour lutter contre une infestation sévère de mouches blanches (aleurodes)  
 Soufre microfin a été employé pour lutter contre le blanc sur le feuillage (2 traitements)

**Annexe 10.** Rendement total et rendement en fruits de catégorie #1 pour les différents traitements - 30 récoltes

Traitement	Répétition	Rendement total	Rendement en fruits de catégorie #1
Témoin	1	8,809	8,348
	2	8,349	8,197
	3	7,798	7,481
Fongicides en pulvérisation	1	8,756	8,574
	2	9,757	9,610
	3	9,877	9,645
Vinaigre en badigeonnage	1	8,697	8,248
	2	8,308	7,881
	3	8,696	8,317
Prestop en badigeonnage	1	8,072	7,868
	2	7,736	7,556
	3	7,740	7,564
Prestop en pulvérisation	1	8,711	8,530
	2	9,519	9,333
	3	8,013	7,584
MAUL-20 en badigeonnage	1	8,915	8,728
	2	9,800	9,152
	3	7,992	7,668
MAUL-20 en pulvérisation	1	8,087	7,807
	2	7,592	7,288
	3	10,370	9,682
RootShield en badigeonnage	1	7,550	7,380
	2	7,347	7,121
	3	7,876	7,661
RootShield en pulvérisation	1	8,326	7,850
	2	7,413	7,047
	3	7,819	7,611

**Annexe 10 (suite).** Rendement moyen total et rendement moyen en fruits de catégorie #1 pour les différents traitements - 30 récoltes

Traitement	Rendement total (kg)	Rendement en fruits de catégorie #1 (kg)
Témoin	8,319	8,009
Fongicides en pulvérisation	9,463	9,276
Vinaigre en badigeonnage	8,567	8,149
Prestop en badigeonnage	7,849	7,663
Prestop en pulvérisation	8,748	8,482
MAUL-20 en badigeonnage	8,902	8,516
MAUL-20 en pulvérisation	8,683	8,259
RootShield en badigeonnage	7,591	7,387
RootShield en pulvérisation	7,853	7,503

**Annexe 10 (suite).** Poids moyen par fruit de catégorie #1 par répétition pour les différents traitements - 30 récoltes

Traitement	Répétition	Poids frais par fruit (g)
Témoin	1	194
	2	170
	3	169
Fongicides en pulvérisation	1	171
	2	177
	3	168
Vinaigre en badigeonnage	1	165
	2	167
	3	165
Prestop en badigeonnage	1	170
	2	156
	3	162
Prestop en pulvérisation	1	162
	2	180
	3	167
MAUL-20 en badigeonnage	1	178
	2	173
	3	157
MAUL-20 en pulvérisation	1	164
	2	159
	3	183
RootShield en badigeonnage	1	177
	2	154
	3	166
RootShield en pulvérisation	1	169
	2	160
	3	151

**Annexe 10 (suite).** Poids moyen par fruit de catégorie #1 pour les différents traitements - 30 récoltes

Traitement	Poids frais par fruit (g)
Témoin	177,67
Fongicides en pulvérisation	172,00
Vinaigre en badigeonnage	165,67
Prestop en badigeonnage	162,67
Prestop en pulvérisation	169,67
MAUL-20 en badigeonnage	169,33
MAUL-20 en pulvérisation	168,67
RootShield en badigeonnage	165,67
RootShield en pulvérisation	160,00

**Annexe 11.** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de célosie – première expérience

Traitement	Plants de célosie		Hauteur (mm)	Racine (mm)	Poids (g) frais masse aérienne	Poids (g) frais masse racinaire
	nombre	% de germination				
1	5,00	83,33	143,12	103,43	16,30	6,05
2	3,50	58,34	109,73	70,54	5,99	1,20
3	3,25	54,17	143,56	95,54	16,65	5,67
4	1,50	25,00	99,75	35,38	5,40	1,08
5	6,00	100,00	146,88	94,09	22,29	8,25
6	3,00	50,00	129,95	83,40	7,25	1,69
7	4,75	79,17	155,59	98,17	18,02	4,69
8	2,25	37,50	110,98	65,81	8,96	1,83

**Annexe 12.** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de tomate – première expérience

Traitement	Plants de tomate		Hauteur (mm)	Racine (mm)	Poids (g) frais masse aérienne	Poids (g) frais masse racinaire
	nombre	% de germination				
1	5,50	91,67	263,03	158,79	31,22	7,82
2	3,25	54,17	268,27	147,23	20,39	4,33
3	4,75	79,17	263,60	156,13	27,59	6,52
4	4,25	70,83	275,78	165,25	26,84	6,70
5	5,50	91,67	259,42	154,27	30,65	8,69
6	3,75	62,50	278,81	158,40	25,92	6,18
7	5,50	91,67	263,03	158,79	31,22	7,82
8	3,25	54,17	268,27	147,23	20,39	4,33

Annexe 13. Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de célosie – deuxième expérience

Traitement	Plante		Hauteur (mm)	Racine (mm)	Poids (g) frais masse aérienne	Poids (g) frais masse racinaire
	nombre	% germination				
1	4,25	70,83	63,97	64,30	3,01	4,57
2	4	66,67	63,37	58,38	2,10	3,33
3	4	66,67	59,63	63,39	2,40	3,51
4	2,75	45,83	60,59	49,96	1,73	1,51
5	4,75	79,17	63,61	66,18	2,89	4,26
6	3,25	54,17	62,46	64,83	1,81	2,94
7	4,75	79,17	68,43	70,83	4,26	6,29
8	3	50,00	56,60	44,77	1,50	1,33

Annexe 14. Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de tomate – deuxième expérience

Traitement	Plante		Hauteur (mm)	Racine (mm)	Poids (g) frais masse aérienne	Poids (g) frais masse racinaire
	nombre	% germination				
1	5,50	91,67	160,15	134,33	27,79	13,43
2	5,25	87,50	175,27	137,37	31,62	11,64
3	5,50	91,67	174,50	112,42	36,04	36,55
4	4,50	75,00	175,45	144,72	27,49	33,06
5	4,50	75,00	187,67	158,56	31,61	32,01
6	5,50	91,67	183,67	182,06	33,18	48,73
7	5,25	87,50	168,96	133,22	33,89	26,72
8	6,00	100,00	162,00	131,79	30,93	27,81

**Annexe 15.** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de haricot nain avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance du **haricot nain** – première expérience

Traitement	% de germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote quantitative des racines	Cote qualitative des racines
1	96,88	162,55	45,42	7,83	1,00	1,00
2	98,96	160,25	41,90	6,10	1,00	1,00
3	96,88	167,90	46,79	7,09	1,00	1,00
4	93,75	144,16	41,62	6,42	1,00	1,00
5	96,88	170,28	50,41	7,55	1,00	1,00
6	93,75	140,74	40,61	6,48	2,00	1,00
7	98,96	172,41	47,46	7,28	1,75	1,00
8	94,79	144,36	39,48	6,24	1,25	1,00

**Stade de croissance du haricot selon BBCH**

31 mars 2005 = semis

4 avril 2005 = code 09 = émergence : cotylédons émergent à la surface du sol

7 avril 2005 = code 10= cotylédons

12 avril 2005 = code 10 = cotylédons

19 avril 2005 = code 10 = cotylédons

25 avril 2005 = code 11 = formation de la première vraie feuille

03 mai 2005 = code 12 = formation de la deuxième vraie feuille

**Annexe 15 (suite).** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de la tomate avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance de la **tomate** – première expérience

Traitement	% de germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote quantitative des racines	Cote qualitative des racines
1	85,94	154,03	60,14	6,45	1,00	1,00
2	78,12	133,26	37,82	3,80	1,00	1,00
3	93,75	139,89	47,52	5,26	1,00	1,00
4	76,56	134,92	39,08	4,30	1,00	1,00
5	82,81	135,79	50,72	5,21	1,25	1,00
6	68,75	59,43	21,49	2,17	1,50	1,00
7	75,00	82,76	25,74	2,62	1,50	1,00
8	79,69	56,74	16,62	1,80	1,50	1,00

**Stade de croissance selon BBCH**

31 mars 2005 = semis

4 avril 2005 = code 09 = émergence : cotylédons émergent à la surface du sol

7 avril 2005 = code 10= cotylédons

12 avril 2005 = code 11= formation de la première vraie feuille

19 avril 2005 = code 12= formation de la deuxième vraie feuille

22 avril 2005 = code 12= formation de la deuxième vraie feuille

22 avril 2005 = code 13= formation de la troisième vraie feuille

09 mai 2005 = code 15 formation de la cinquième vraie feuille

**Annexe 15 (suite).** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de la tomate avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance du **céleri**– première expérience

Traitement	% de germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote quantitative des racines
1	85,94	69,41	11,10	1,10	1,00
2	96,88	78,24	13,49	1,43	1,00
3	85,94	60,81	9,70	0,97	1,00
4	87,50	67,26	10,64	1,05	1,00
5	89,06	68,61	11,11	1,23	1,00
6	89,06	63,80	10,27	1,11	1,00
7	85,94	63,01	9,23	0,91	1,00
8	90,62	70,28	10,93	1,09	1,00

**Stade de croissance selon BBCH**

31 mars 2005 = semis

15 avril 2005 = code 09 = émergence : cotylédons émergent à la surface du sol

19 avril 2005 = code 10= cotylédons

25 avril 2005 = code 11= formation de la première vraie feuille

02 mai 2005 = code 12= formation de la deuxième vraie feuille

10 mai 2005 = code 14= formation de la quatrième vraie feuille

**Annexe 15 (suite).** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de la tomate avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance de la **célosie plumeuse** – première expérience

Traitement	% germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote qualitative des racines
1	97,92	34,20	19,62	2,35	2,00
2	97,92	28,16	14,01	1,69	1,25
3	100,00	30,64	14,07	1,75	1,75
4	95,83	28,96	13,80	1,67	1,50
5	84,38	25,15	12,99	1,61	1,75
6	90,62	29,17	16,98	2,15	1,50
7	88,54	27,62	14,82	1,81	1,25
8	91,67	28,15	14,39	1,72	1,75

**Stade de croissance selon BBCH**

4 avril 2005 = semis

8 avril 2005 = code 09 = émergence : cotylédons émergent à la surface du sol

12 avril 2005 = code 10 = cotylédons

19 avril 2005 = code 11= formation de la première vraie feuille

22 avril 2005 = code 11= formation de la première vraie feuille

06 mai 2005 = code 16 = formation de la sixième vraie feuille

**Annexe 15 (suite).** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de la tomate avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance de la **giroflée** – première expérience

Traitement	% germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote qualitative des racines
1	87,50	29,89	19,58	2,78	2,50
2	85,42	24,62	14,28	2,08	2,50
3	73,96	23,00	13,38	1,90	2,50
4	87,50	28,46	14,20	2,23	2,25
5	87,50	26,70	15,19	2,34	2,75
6	86,46	25,49	12,62	1,82	2,75
7	71,88	24,10	13,30	1,97	2,75
8	73,96	20,30	12,02	1,72	2,75

**Stade de croissance selon BBCH**

4 avril 2005 = semis  
8 avril 2005 = code 09 = émergence : cotylédons émergent à la surface du sol  
12 avril 2005 = code 10 = cotylédons  
19 avril 2005 = code 11= formation de la première vraie feuille  
22 avril 2005 = code 12= formation de la deuxième vraie feuille  
25 avril 2005 = code 13 = formation de la troisième vraie feuille  
06 mai 2005 = code 19 = formation de la neuvième vraie feuille

**Annexe 15 (suite).** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de la tomate avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance du **zinnia**– première expérience

Traitement	% germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote qualitative des racines
1	90,62	51,08	28,39	4,28	1,00
2	94,79	41,14	19,39	2,92	1,00
3	86,46	38,37	19,37	2,76	1,00
4	92,71	41,69	20,67	2,81	1,00
5	81,25	36,26	22,27	2,97	1,00
6	90,62	37,91	19,57	2,79	1,00
7	73,96	33,20	19,47	2,66	1,00
8	98,96	41,68	21,05	2,99	1,00

**Stade de croissance selon BBCH**

4 avril 2005 = semis  
8 avril 2005 = code 09 = émergence : cotylédons émergent à la surface du sol  
12 avril 2005 = code 10 = cotylédons  
19 avril 2005 = code 11= formation de la première vraie feuille  
22 avril 2005 = code 12= formation de la deuxième vraie feuille  
25 avril 2005 = code 13 = formation de la troisième vraie feuille  
06 mai 2005 = code 14 = formation de la quatrième vraie feuille

**Annexe 16.** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de haricot nain avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance du **haricot nain** – deuxième expérience

Traitement	% germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote qualitative des racines
1	93,80	196,78	42,36	7,39	1,00
2	93,80	160,64	36,68	5,81	1,00
3	90,60	160,23	32,74	6,08	1,00
4	93,80	134,11	31,48	5,19	1,00
5	90,60	187,21	42,91	7,28	1,00
6	96,90	174,74	33,89	5,75	2,00
7	90,60	149,79	30,04	5,26	1,75
8	87,50	130,26	30,98	5,13	1,25

**Stade de croissance du haricot selon BBCH**

14 juillet 2005 = semis

18 juillet 005 = code 10 = cotylédons à la surface du sol

20 juillet 005 = code 11 = formation de la première paire de feuille

1 août 005 = code 11 = formation de la première paire de feuille

15 août 005 = code 13 = formation de la troisième de feuille

**Annexe 16 (suite).** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de haricot nain avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance de la **tomate de serre** – deuxième expérience

Traitement	% germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote qualitative des racines
1	93,80	106,60	30,14	4,03	1,00
2	87,50	78,80	17,38	2,29	1,00
3	89,10	85,90	20,03	2,54	1,00
4	93,80	79,90	15,45	2,02	1,00
5	93,80	123,40	39,29	5,18	1,00
6	95,30	81,10	18,26	2,55	1,00
7	89,10	69,90	15,34	2,03	1,00
8	92,20	82,80	16,49	2,19	1,00

**Stade de croissance du haricot selon BBCH**

14 juillet 2005 = semis

18 juillet 005 = code 09 = émergence : cotylédons émergent à la surface du sol

20 juillet 005 = code 10 = cotylédons à la surface du sol

1 août 005 = code 12= formation de la deuxième feuille, sauf A et E, troisième

15 août 005=code 15=formation de la cinquième feuille

**Annexe 16 (suite).** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de haricot nain avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance du **céleri** – deuxième expérience

Traitement	% germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote qualitative des racines
1	96,90	27,00	5,90	0,91	1,00
2	87,50	24,20	2,74	0,44	1,00
3	65,60	14,40	1,41	0,24	1,00
4	78,10	18,00	2,06	0,31	1,00
5	71,90	21,10	3,93	0,53	1,00
6	76,60	19,10	2,41	0,30	1,00
7	68,80	16,50	1,77	0,26	1,00
8	81,30	18,90	1,89	0,24	1,00

**Stade de croissance du haricot selon BBCH**

14 juillet 2005 = semis

18 juillet 005 = aucune croissance

20 juillet 005 = aucune croissance

23 juillet 005 = code 09 = émergence : cotylédons émergent à la surface du sol

1 août 005 = code 11 = début de la formation de la première feuille

18 août 005 = code 11 = début de la formation de la quatrième feuille

**Annexe 16 (suite).** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de haricot nain avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance de la **célosie plumeuse** – deuxième expérience

Traitement	% germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote qualitative des racines
1	93,80	55,50	15,05	2,20	1,00
2	93,80	45,80	9,54	1,30	1,00
3	90,60	45,10	11,46	1,71	1,00
4	93,80	41,50	8,05	1,38	1,00
5	90,60	51,80	17,53	2,68	1,00
6	96,90	50,00	10,49	1,43	1,00
7	90,60	39,00	7,67	1,09	1,00
8	87,50	36,80	7,94	1,09	1,00

**Stade de croissance du haricot selon BBCH**

14 juillet 2005 = semis

18 juillet 005 = code 09 = émergence : cotylédons émergent à la surface du sol

20 juillet 005 = code 10 = cotylédons à la surface du sol

1 août 005 = code 11 = formation de la première paire de feuilles, sauf A & E, deuxième

18 août 005 = code 15 = formation de la cinquième paire de feuilles, sauf A & E, deuxième

**Annexe 16 (suite).** Observations moyennes enregistrées lors de la récolte des plants de haricot nain avec *Rhizoctonia solani* et stade de croissance de la **giroflée** – deuxième expérience

Traitement	% germination	Hauteur (mm)	Poids frais (g)	Poids sec (g)	Cote qualitative des racines
1	73,40	25,40	9,04	1,82	1,00
2	81,30	25,50	7,50	1,36	1,00
3	84,40	25,30	7,81	1,52	1,00
4	76,60	22,00	4,39	0,80	1,00
5	90,60	30,90	10,81	2,70	1,00
6	65,60	18,00	5,33	0,94	1,00
7	78,10	23,20	7,42	1,32	1,00
8	71,90	24,60	5,91	1,01	1,00

**Stade de croissance du haricot selon BBCH**

14 juillet 2005 = semis

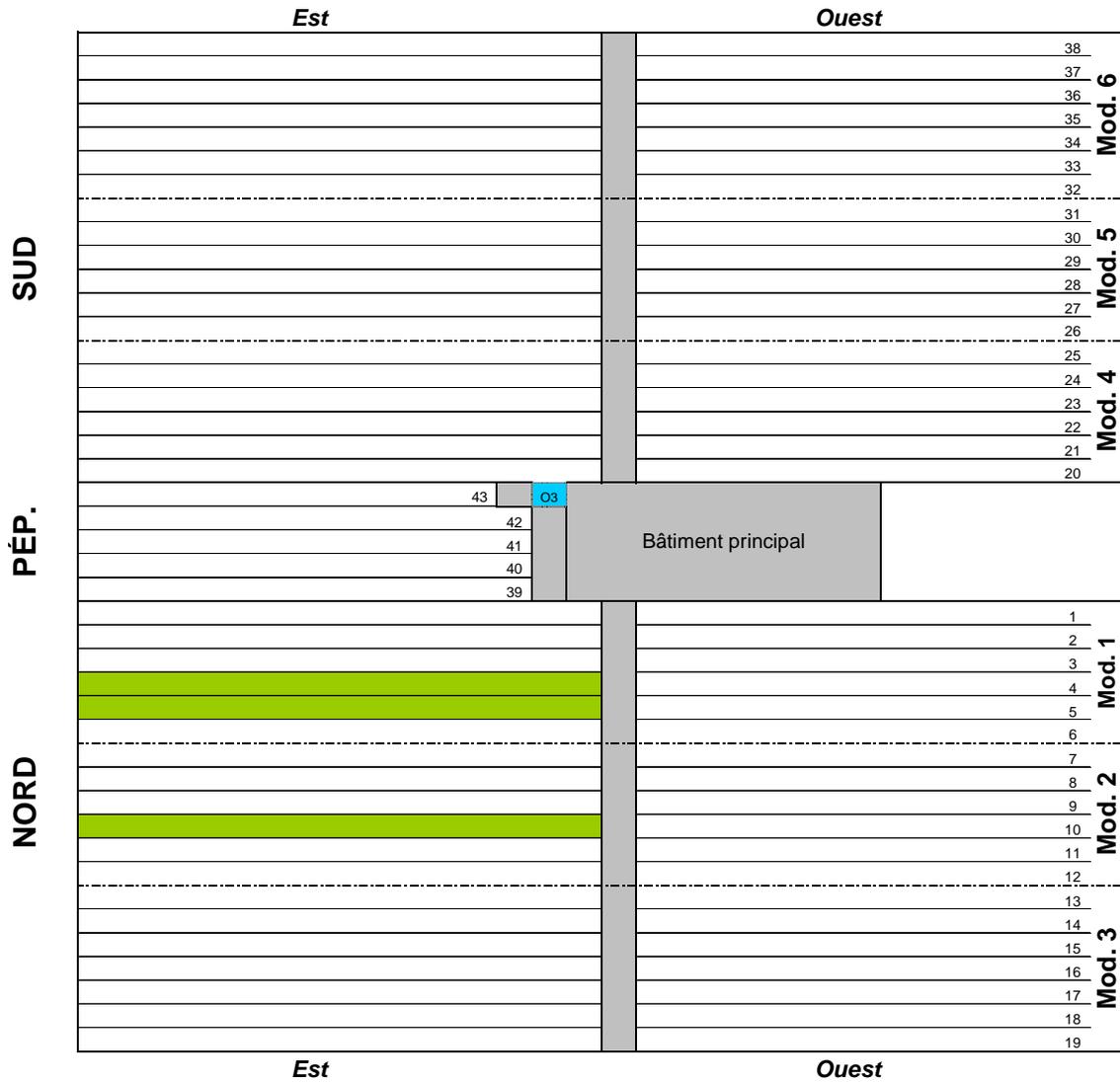
18 juillet 005 = code 09 = émergence : cotylédons émergent à la surface du sol

20 juillet 005 = code 10 = cotylédons à la surface du sol

1 août 005 = code 12 = formation de la deuxième paire de feuilles

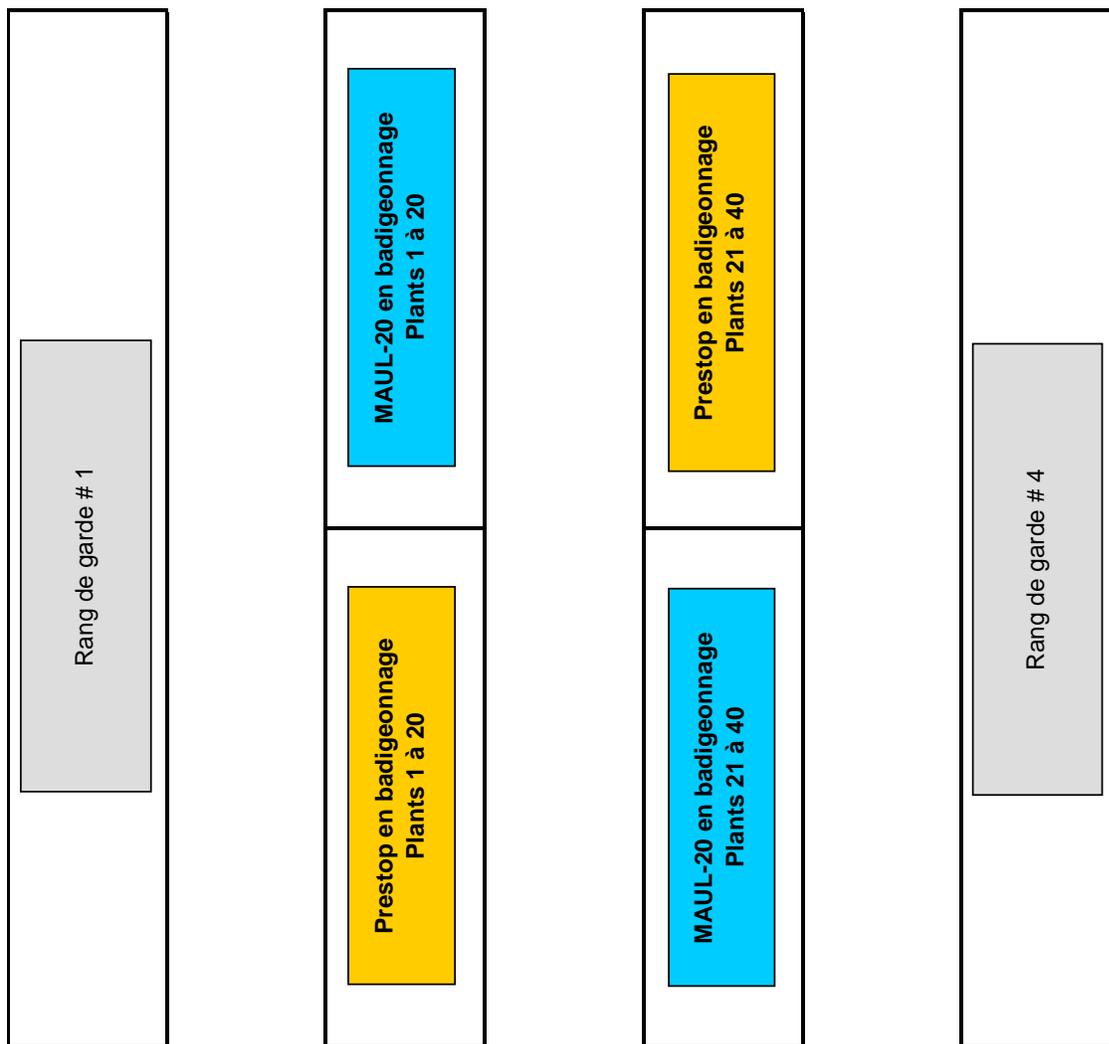
18 août 005 = code 15 = formation de la cinquième paire de feuilles

Annexe 17. Plan de la serre commerciale – Serres du St-Laurent div. Danville



Source : Serres du St-Laurent

**Chapelle 4**  
**Fongicides en pulvérisation**  
**Biofongicides Prestop et MAUL-20 en badigeonnage**



**Chapelle 5**  
**Fongicides en pulvérisation**  
**Thiram en badigeonnage**

**Chapelle 10**  
**Alternance Prestop / fongicides**  
**Thiram en badigeonnage**

