

RAPPORT SCIENTIFIQUE

Nom et organisme : Ingrid Arnault, CETU Innophyt, Université François Rabelais de Tours

Ce rapport scientifique fait état des contextes et résultats de chaque tâche. Les méthodes expérimentales sont néanmoins peu détaillées avec la consigne de 15 pages mais sont bien décrites dans les rapports des partenaires. Une carte heuristique de synthèse des résultats figure en annexe.

Rappels des objectifs

Le projet se proposait de concevoir une stratégie de biocontrôle socialement et économiquement acceptable pour lutter contre deux bioagresseurs telluriques à enjeux économiques majeurs en culture de tomate en région tempérée et en Martinique : les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* et l'agent du flétrissement bactérien, *Ralstonia solanacearum*.

Le projet était structuré en 6 tâches.

- La première tâche consistait au choix, à la caractérisation des variétés et aux modalités d'utilisation de deux familles de plantes de services (PdS) à effet assainissant du sol : Alliées et Crotalaires.
- La tâche 2 a permis de tester en conditions contrôlées et au champ l'efficacité agronomique de la biodésinfection à base d'*Allium* et/ou de Crotalaires.
- La tâche 3 a évalué les ENI de la méthode de biodésinfection sur la biodiversité non cible du sol (Arthropodes du sol et micro-organismes).
- La tâche 4 a évalué les effets physiologiques de la biodésinfection sur la tomate.
- La tâche 5 consistait à vérifier l'acceptabilité sociale et économique de la méthode de biocontrôle auprès de l'ensemble des acteurs professionnels de la filière.
- Enfin, la tâche 6 était consacrée à la diffusion des résultats.

Tâche 1. Ressources végétales

Partenaires : CIRAD LSTM, CIRAD HortSys Airb, GRAB CETU Innophyt

L'objectif était de choisir et de caractériser **les différentes formulations et espèces de Fabacées du genre *Crotalaria* sp. et ou Alliées du genre *Allium* sp. en biodésinfection pour lutter contre deux pathogènes : l'agent du flétrissement bactérien et les nématodes.**

Les problématiques agronomiques sont différentes en Martinique et Métropole :

- en Martinique, l'agent du flétrissement bactérien cause les plus gros dégâts sur tomates et les problèmes de nématodes sont contournés avec la variété Headmaster (gène de résistance).
- en Métropole, l'agent du flétrissement bactérien n'est pas présent et les nématodes à galles constituent une problématique majeure en culture biologique malgré le greffage avec des plants résistants.

Les crotalaires et les *Allium* sont utilisés soit en précédent cultural suivi d'un mulch*, soit enfouis en engrais vert, soit en poudre ou en culture associée.

Un autre formulation d'utilisation des crotalaires dans le sol a été envisagée en poudre pour faciliter l'enfouissement dans le sol. Cette utilisation assez prometteuse contre les nématodes et l'agent du flétrissement bactérien a fait l'objet des études socio-économiques en tâche 5.

*Le mulch est une technique de couverture du sol avec différents matériaux. Ici, le mulch à partir de plantes désinfectantes permet de couvrir et de libérer les composés actifs au niveau sol.

1.1 CHOIX DES PLANTES ET MODE DE PRODUCTION DE BIOMASSE

⇒ Contre les nématodes à galles sous serre (CIRAD LSTM)

Deux espèces de crotalaires dans le sud de la France sont sélectionnées : *Crotalaria spectabilis* (Petits pois marrons) vs *Crotalaria juncea* (chanvre du Bengale) car elles ont déjà montré des résultats intéressants. Elles sont utilisées en précédent cultural, suivi d'un mulch puis d'un enfouissement dans le sol (Fig.2, p.5). La forme séchée en poudre ou broyats est également considérée dans les essais. En effet, un pré-test a montré que les poudres de *C. juncea* à 10 g/l mélangées au terreau font diminuer significativement le nombre de galles.



⇒ Contre les nématodes à galles sous tunnel (CIRAD LSTM, GRAB, CETU Innophyt)

Dans le sud de la France, notre choix se focalise sur *Allium sp.* riches en **DMDS = disulfure de diméthyle** et **DPDS (= disulfure de dipropyle)** pour leur potentiel nématicide. Les extraits d'ail riches en **allicine** puis en **DADS** sont également efficaces contre les nématodes à galles. Cependant les espèces comprenant du **DADS** et de l'**allicine** se reproduisent végétativement, il s'agit de l'ail et des aulx sauvages. Notre choix se focalise donc sur des variétés faciles à reproduire et proches chimiquement d'*A. fistulosum* comme la **ciboulette (*A. schoenaprasum*)** et l'**oignon (*A. cepa*)**.



⇒ Contre l'agent du flétrissement bactérien (CIRAD LSTM, CIRAD HortSys).

En Martinique, les deux espèces de crotalaires et d'*Allium sp.* sont utilisées en mulch/ précédent cultural et en culture associée. En Martinique, des extraits de cive antillaise appelée aussi oignon pays ou **ciboule (*Allium fistulosum*)** ont réduit de 50% environ l'incidence du flétrissement bactérien de la tomate en chambre climatique (Deberdt et al, 2012). La cive est cultivée en précédent et est récoltée. L'utilisation d'un mulch de cives n'est pas envisageable car cela constituerait une perte de matière première pour la cuisine antillaise.



2.2 CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET VARIATIONS DES COMPOSES ACTIFS

⇒ Les crotalaires (CIRAD LSTM, Akinao)

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont responsables des effets némostatiques. Les dosages des alcaloïdes ont été réalisés par Akinao en prestation selon la méthode Ji et coll. (2005). La sénécionine est uniquement présente chez *C. spectabilis* et, la monocrotaline est environ 160 fois plus importante chez *C. spectabilis* vs *C. juncea*. ***C. spectabilis* semble présenter le plus de composés connus** némostatiques, cependant le complexe d'alcaloïdes présent dans ces deux matrices végétales peut aussi être responsable des effets némostatiques/némostatiques.

⇒ Les *Allium* sp. (Innophyt)

La teneur en composés soufrés précurseurs d'arômes a été comparée à d'autres *Allium* sp. selon la méthode d'analyse chromatographique d'Arnault et coll. (2003). La ciboulette, la cive antillaise et l'oignon font partie du groupe de type « poireau oignon » avec peu de précurseurs de DMDS et une majorité de PeCSO, précurseur du DPDS dont les activités biologiques sont inférieures au DMDS et DADS. **La ciboulette semble plus concentrée** en composés soufrés que l'oignon et la cive antillaise.

Tâche 2. Tests d'efficacité de la méthode de biocontrôle

2. 1 LUTTE CONTRE *RALSTONIA SOLANACEARUM* EN REGION TROPICALE

Partenaires : CIRAD Hortsys (CAEC), CERTIS France

Des bioessais d'efficacité *in vitro* et *in vivo* ont permis d'évaluer l'effet antibactérien des extraits aqueux d'*A. fistulosum* et *Crotalaria* sp. et du DMDS pur et en formulation industrielle (Atomal©13). Le DMDS est le disulfure de diméthyle, un fumigant autorisé dans certains pays et en cours d'homologation en Europe. Parallèlement, des essais en conditions de productions avec différentes modalités d'utilisation des plantes de service ont été réalisés.

⇒ Bioessais *in vitro*

Évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* d'extraits d'*A. fistulosum* et *Crotalaria* sp. Les extraits aqueux à 100% et 50% ont été préparés selon le protocole de Deberdt et coll. (2012). Malgré de nombreux essais, l'effet inhibiteur des extraits frais d'*A. fistulosum*, de *C. juncea* et de *C. spectabilis* n'a pas pu être démontré dans nos conditions d'expérimentation.

Évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* du DMDS. Deux méthodes en milieu solide ont été utilisées : la méthode de diffusion (méthode des disques) et la méthode de fumigation. Une méthode en milieu liquide a permis de déterminer la cinétique de survie de *R. solanacearum* soumise à différentes concentrations d'Atomal©13. Ces résultats ont fait l'objet d'une communication orale au *IX International symposium on Soil and Substrate Disinfestation* (cf p. 15).

Méthode de diffusion. On observe une réduction forte de la croissance de *R. solanacearum* avec l'Atomal©13 pur et plus faible à 10% tandis que la croissance n'est pas inhibée aux concentrations plus faibles qui ont été testées. Après 48h d'incubation, une recolonisation progressive a été observée.

Méthode de fumigation. Les premières observations sont réalisées après 24h d'incubation. Les différents essais ne montrent pas d'inhibition de croissance pour l'Atomal©13 aux concentrations testées ainsi que pour le DMDS pur.

Méthode en milieu liquide. Les concentrations à 0.1% et 0.2% sont trop faibles pour empêcher la croissance de *R. solanacearum*. L'Atomal 13© à 1% agit dès 30 minutes. A 10%, l'activité inhibitrice a été observée dès 30 minutes par l'absence totale de pousse bactérienne.

⇒ Bioessais *in vivo*

Évaluation de l'effet antibactérien *in vivo*.

Les 2 essais ont été réalisés en serre et en chambre climatique. Les protocoles de traitement du sol ont été inspirés des articles de Deberdt et coll. (2012) et de Cardoso et coll. (2006).

Les analyses statistiques de l'essai 1 en serre ont montré qu'il n'y a pas eu d'effet antibactérien des broyats de *C. spectabilis*, aux deux concentrations testées, sur les populations de *R. solanacearum* dans le sol.

Un essai 2 a été réalisé en chambre climatique, dans un dispositif de bocaux en verre de 1L. Chaque broyat de *C. juncea*, *C. spectabilis* et *A. fistulosum* ont été incorporés à la concentration = 1 : 4 (poids broyat : poids sol) dans un sol préalablement inoculé avec *R. solanacearum*. La phase de décomposition a duré 30 jours puis des plants de tomates âgés de 15 jours ont été transplantés.

Le suivi du développement des symptômes de flétrissement bactérien sur les tomates est réalisé pendant 28 jours. L'incidence du flétrissement bactérien (IFB%) et l'indice de colonisation bactérienne (IC%) ont été calculés à la fin de l'expérimentation.

La progression de la maladie sur le témoin est très rapide et l'indice de flétrissement atteint 83% à J29 (Fig. 1). Par ailleurs, les progressions de la maladie au cours du temps sont similaires, quelle que soit l'amendement en crotalaires (*C. juncea* ou *C. spectabilis*). Aucun symptôme n'a été développé sur les tomates transplantées dans le sol amendé avec les broyats d'*A. fistulosum*.

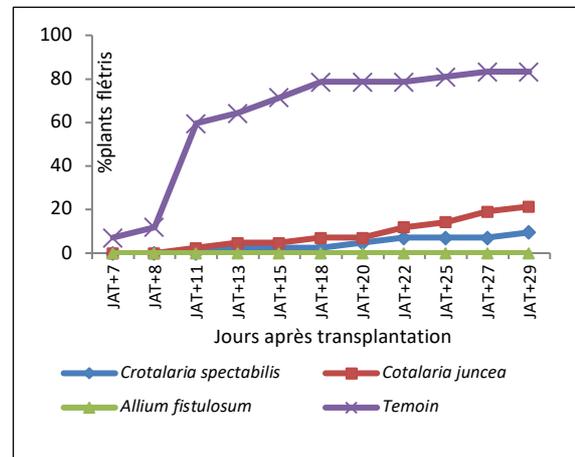


Figure 1. % de plants flétris sur 28 jours

Évaluation de l'activité antibactérienne *in vivo* du DMDS en fumigation de sol.

L'objectif est de tester l'effet du DMDS pur sur les populations de *R. solanacearum* dans le sol et sur la régulation du flétrissement bactérien de la tomate. Les essais ont été réalisés en chambre climatique et en serre. Les protocoles de traitement du sol ont été suivis de l'article d'Arnault et coll. (2013).

Essai 1. Le traitement avec le DMDS à 10^{-2} mol/L démontre un niveau de populations *R. solanacearum* dans le sol indétectable et ce même après trois jours d'aération du sol. Le traitement DMDS à 10^{-3} mol/L démontre une réduction significative. Enfin, après aération, la réduction des populations de *R. solanacearum* est significative.

Essai 2. Le traitement au DMDS montre un niveau de populations de *R. solanacearum* indétectable 27 jours après traitement. L'incidence de la maladie est quasi nulle avec 2% des plants exprimant des symptômes en fin d'essai en comparaison à 57% dans le témoin non traité.

Remarque : au cours de cet essai 2, nous avons observé que le DMDS à 10^{-2} mol/L exprimait un effet phytotoxique sur la tomate. D'autre part, le DMDS à 10^{-2} mol/L a eu un effet herbicide : les sols traités au DMDS sont restés « nus » durant toute la durée de l'expérimentation en comparaison aux sols non traités sur lesquels la germination des adventices a été largement observée.

⇒ Essais au champ en conditions de productions

4 essais en conditions de productions ont été mis en place dont 2 en station du CAEC (Campus Agro Environnementale des Caraïbes, Lamentin, Martinique) et 2 chez un agriculteur à Rivière Lizarde (Martinique). Malheureusement le premier essai sur la parcelle en station a subi une attaque de courtilières (*Gryllotalpa gryllotalpade*) ; plus de 40% des plants de tomates ont été décimés par ces attaques. La plantation de tomate a donc été reprogrammée le 16 février 2017 et a de nouveau subi des attaques. Un prolongement de 12 mois de la convention a donc été demandé afin de remettre en place un essai avec un dispositif anti-courtilières.

Essai sur la station expérimentale du CIRAD de Rivière Lizarde au Lamentin.

Cet essai est réalisé en conditions naturelles d'infestation de *R. solanacearum*. Deux précédents culturels des PdS = plantes de service (*A. fistulosum* et *C. spectabilis*) ont été évalués pour leur potentiel de biodésinfection du sol en comparaison à la pratique locale i.e. jachère spontanée (Ja). Des modalités basées sur des design spatio-temporels avec association ou non des deux espèces A.

fistulosum (Af) et *C. spectabilis* (Cs) précédant la mise en place de la culture de la tomate ont été testées. L'impact de chaque modalité devait être mesuré par l'observation des symptômes de flétrissement bactérien sur les tomates transplantées après les précédents culturaux. La parcelle d'essai a subi des attaques de courtilières les deux années consécutives malgré le dispositif mis en place suite à la première année d'attaque.

Traitements.

Traitement T1 : Cs + Mulch Cs (phase 1 + phase 2) + Tomate

Traitement T3 : Cs + Mulch Cs (phase 1) + Af*(phase 2) + Tomate

Traitement T4 : Af*(phase 1 + phase 2) + Tomate

Traitement T7 : Ja + Mulch Ja (phase 1 + phase 2) + Tomate

*Les cives antillaises sont récoltées en fin de phase.

Le dispositif est constitué de 3 phases culturales successives :

Phase 1 = phase végétative des PdS/jachère + /- mulch

Phase 2 = phase végétative des PdS/jachère + /- mulch

Phase 3 = phase végétative du bioindicateur « tomate » (cv. Heatmaster)

PdS = Plantes de services : *A. fistulosum* et *C. spectabilis* ; Jachère = traitement témoin.

Les rendements de *C. juncea* et *C. spectabilis* ne sont pas statistiquement différents au cours de la Phase 1, tandis qu'ils sont apparus significativement plus élevés chez *C. juncea* au cours de la phase 2. Les études des ENI sur les Arthropodes ont été mises en place sur cet essai (cf p.10).



Figure 2. A gauche : coupe de *C. spectabilis* ; A droite : mulch de *C. spectabilis*.

L'analyse statistique montre un effet traitement sur la sévérité de la maladie ($P=0,04715$). Le test post-hoc de Fisher LSD a montré que la sévérité du flétrissement bactérien était statistiquement plus élevée après un cycle de jachère suivant un bâchage qu'après un cycle long de *C. spectabilis*, un cycle court d'*A. fistulosum* suivant un cycle court de *C. spectabilis* ou après un cycle long d'*A. fistulosum*. Ces résultats ne permettent pas de différencier les plantes de service pour une même durée de cycle (cycle long/cycle court).

Essais chez un agriculteur

○ Essai 1.

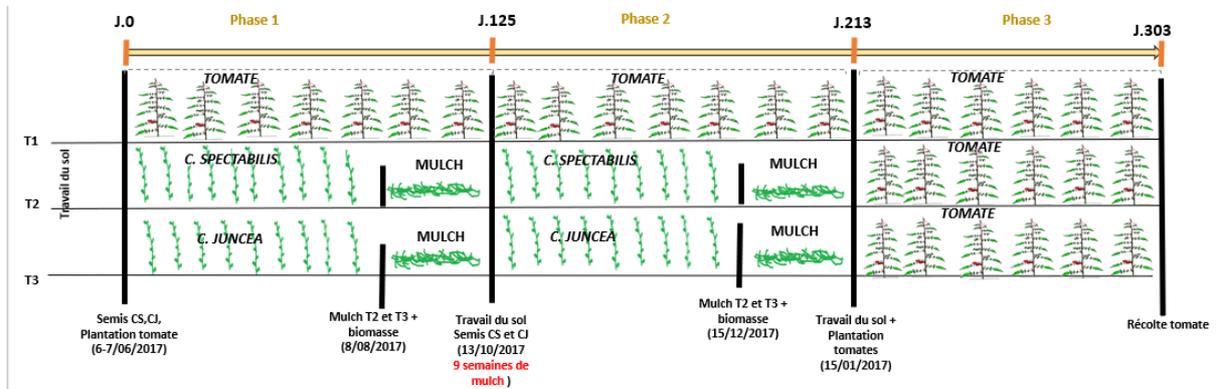
Deux précédents culturaux de *C. spectabilis* et *C. juncea* ont été évalués pour leur potentiel de biodésinfection du sol en comparaison à la pratique de l'agriculteur qui consiste à réaliser des cycles successifs de tomate sur cette même parcelle. L'impact de chaque modalité testée a été mesuré par l'observation des symptômes de flétrissement bactérien sur les tomates transplantées après les précédents culturaux. Ces tomates sont les bio-indicateurs du potentiel infectieux du sol.

Traitements. Le dispositif expérimental est décrit dans la figure 3.

T1. Trois cycles de tomates consécutifs sont conduits sur les trois phases.

T2. Un cycle végétatif de *C. spectabilis* est réalisé pendant la première phase. 63 jours plus tard, la biomasse aérienne fraîche est déposée en surface sous forme de mulch pendant 4 semaines. L'opération est répétée en phase 2 (réalisation du mulch à J70). Un cycle de tomate de 90 jours est ensuite conduit en phase 3.

T3. Un cycle végétatif de *C. juncea* est réalisé pendant la première phase. 70 jours plus tard, la biomasse aérienne fraîche est déposée en surface sous forme de mulch pendant 4 semaines. L'opération est répétée en phase 2 (réalisation du mulch à J70). Un cycle de tomate de 90 jours est ensuite conduit en phase 3.



Les valeurs AUDPC (Fig. 4) expriment la sévérité de la maladie sur la tomate (Fig. 5). Les résultats montrent un effet significatif du précédent cultural crotalaires. La sévérité de maladie observée sur la tomate sans précédent crotalaire est significativement supérieure à celle observée après un précédent crotalaire, quelle que soit l'espèce utilisée *C. spectabilis* et *C. juncea*.

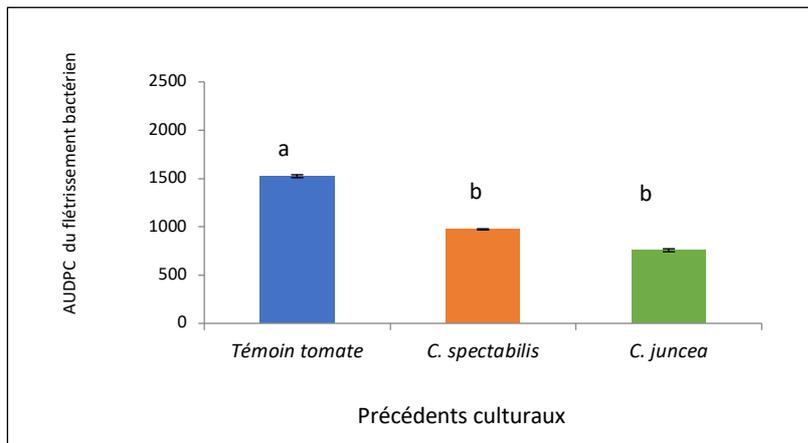


Figure 4. Sévérité du flétrissement bactérien de la tomate après deux cycles de crotalaires introduits en précédents culturaux.



Figure 5. Symptômes de flétrissement bactérien sur plant

L'espèce la plus prometteuse pour contrôler le flétrissement bactérien est *C. juncea*. Le développement d'un nouveau produit à base de broyats secs de *C. juncea* (sous forme de pellets-granulés) peut contribuer à la santé des systèmes de cultures maraîchers.

○ Essai 2

Après la mise en place d'un précédent cultural de *C. juncea* à potentiel assainissant sur toute la parcelle expérimentale, une association culturale [Tomate x Oignon-pays (= cive antillaise = *A. fistulosum*)] a été comparée à la tomate seule. L'efficacité de chaque modalité testée a été mesurée par l'observation des symptômes de flétrissement bactérien sur les tomates transplantées après les précédents culturaux.

Dispositif expérimental :

Deux traitements sont testés.

T1 : *C. juncea* + Mulch (Phase 1 : + Tomate (Phase 2) (Fig. 6).

T2 : *C. juncea* + Mulch (Phase 1) + [Oignon-pays X Tomate] (Phase 2)
 Le dispositif est constitué de 2 phases culturales successives : Phase 1-Phase 2 (Fig. 7)



Figure 6. Parcelle de *C. juncea* juste avant la coupe (à gauche) ; après la coupe, en phase de mulch (à droite)

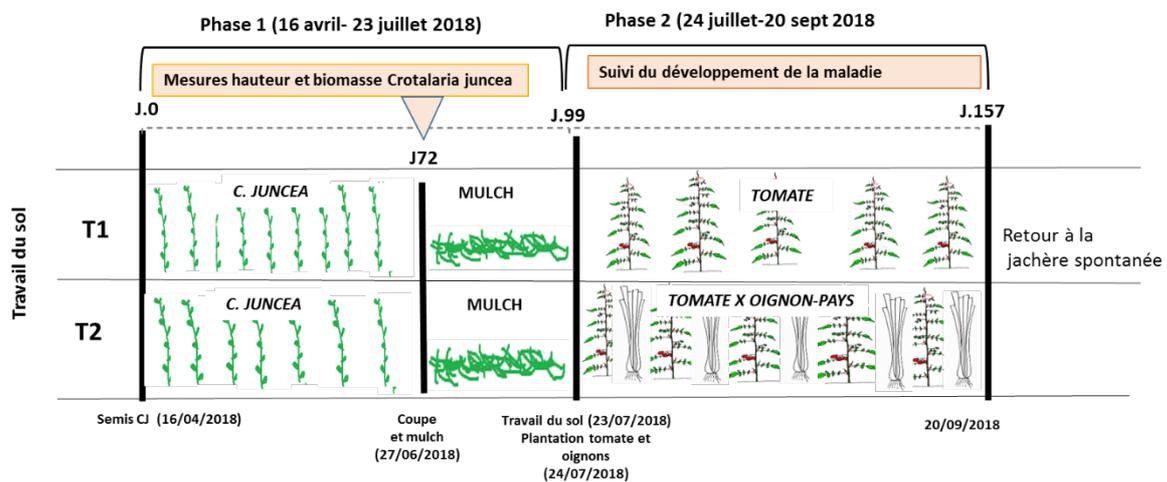


Figure 7. Dispositif avec les différents traitements – essai agriculteur

La sévérité de maladie observée dans la monoculture de tomate est supérieure à la sévérité observée dans l'association culturale [tomate x *A. fistulosum*]. Cette différence n'est cependant pas significative (Fig.8). Les incidences de maladie observées dans la monoculture de tomate sont supérieures à celles observées dans l'association culturale [tomate x *A. fistulosum*] mais cette différence n'est pas significative (Fig. 9).

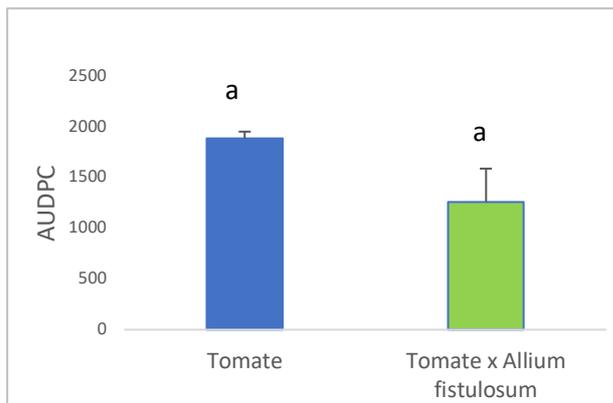


Figure 8. Sévérité du flétrissement bactérien de la tomate en association culturale avec l'oignon-pays après un cycle de *C. juncea*, en comparaison à la tomate seule (sans association culturale) cultivée après un cycle de *C. juncea*

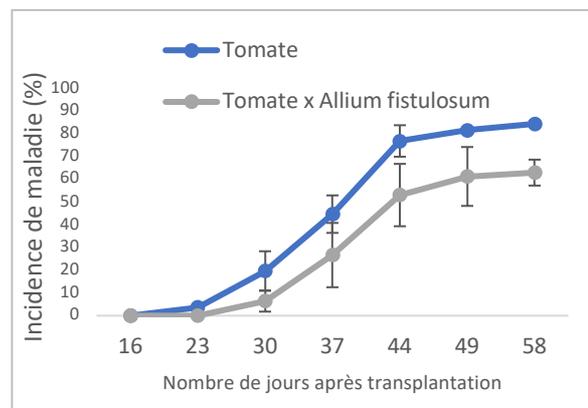


Figure 9. Cinétique d'incidence du flétrissement bactérien de la tomate en association culturale avec l'oignon-pays après un cycle de *C. juncea*, en comparaison à la tomate seule (sans association culturale) cultivée après un cycle de *C. juncea*

En conclusion, l'espèce retenue pour son potentiel assainissant et son potentiel de production élevée de biomasse est *Crotalaria juncea*. Il s'agit d'une plante de « jours longs » qui doit être cultivée préférentiellement entre les mois d'avril et de juillet dans les conditions environnementales de la Martinique.

Dans un sol présentant une pression de maladie très élevée (incidence de maladie sur tomate >80%) nous pouvons conclure que :

- i) au moins deux cycles successifs de *C. juncea* sont nécessaires pour réduire la sévérité de la maladie en priorisant l'effet « saison » (1^{er} cycle entre avril et juillet ; 2^e cycle entre août et novembre ; puis cycle de tomate) ;
- ii) un cycle de tomate en association culturale avec l'oignon-pays ne suffit pas pour réguler significativement la maladie
- et enfin : iii) la tomate doit être cultivée en dehors de la saison des pluies (saison hautement favorable à la maladie) c'est-à-dire au cours de la période de l'année la plus fraîche et la moins humide (entre décembre et mars).

En perspectives encourageantes, il serait intéressant de tester l'efficacité de biocontrôle d'apports ex-situ de crotalaires sous différentes formes (extrait liquide, pellet-granulés), afin de s'affranchir de la période d'implantation des crotalaires qui mobilisent la parcelle des agriculteurs et par conséquent représente le frein majeur pour l'adoption de l'innovation (cf Tâche 5). Ainsi, la solution de biocontrôle élaborée à base de *Crotalaria sp.* pourrait être appliquée au sol juste avant plantation de la tomate.

2. 1 LUTTE CONTRE LES NEMATODES A GALLES EN FRANCE METROPOLITAINE

Partenaires : CIRAD LSTM, GRAB, CERTIS France, DELBON SARL

⇒ Essais en conditions de production maraîchère sous serre (PMS)

Les nématodes phytoparasites dits nématodes à galles appartiennent au genre *Meloidogyne* comprenant plus de 60 espèces parmi lesquelles 4 sont les principaux nématodes phytoparasitaires au niveau du globe. Ces 4 espèces sont *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita* et *M. hapla*. Dans nos travaux de recherche, les nématodes utilisés appartiennent à l'espèce *Meloidogyne javanica*.

En zone tropicale, les légumineuses du genre *Crotalaria* sont utilisées comme engrais vert mais aussi, pour certaines d'entre elles, comme biopesticide à effet nématostatique. Les conditions de la PMS, reproduisant en Europe des conditions de type tropical (chaleur et humidité), favorisent le développement des *Meloidogyne* contre lesquels il existe peu de moyens de lutte.

Un essai en pots a été conduit à l'exploitation JF Dumas St Martin de Crau (13) pour tester les effets nématicides des broyats des deux espèces de crotalaires.

Des tomates ont été cultivées sur un sol infesté de nématodes avec ou sans traitement crotalaires séchées, broyées et stockées 6 mois à T° ambiante.

L'efficacité des broyats de crotalaires dans un sol infesté de nématodes a été mesurée sur le développement des plants de tomates (hauteur, feuilles, fleurs). Les résultats indiquent une meilleure croissance des plants de tomates avec les crotalaires (Fig. 10).

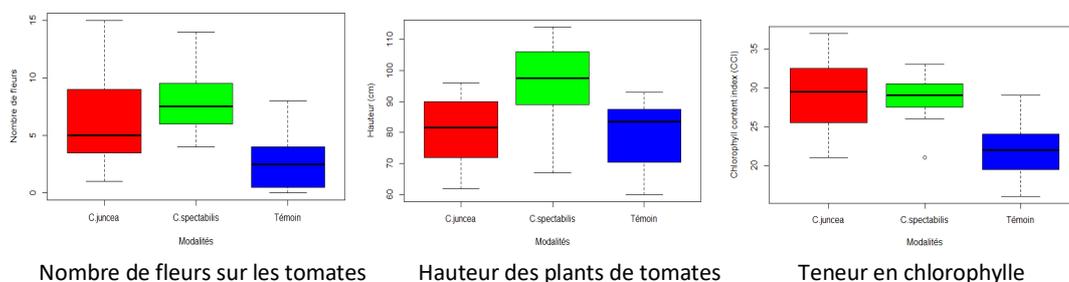


Figure 10. Croissance des tomates traitées ou non avec les crotalaires.

Les résultats montrent des indices de galles des tomates traitées avec les deux espèces de crotalaires *C. juncea* et *C. spectabilis* significativement inférieures par rapport au témoin respectivement 1,33 et 1,42 vs 3,58.

Des essais en PMS chez deux producteurs ont été conduits à St Martin de Crau (13). L'objectif était de tester en conditions de production l'effet des crotalaires en poudre ou en précédent cultural suivi d'un mulch, sur les infestations de nématodes.

- À l'EARL Pampalone en biodynamie, il s'agissait de tester l'effet de poudre de *C. Juncea* à 10 g/l. L'application se fait par enfouissement de 3 fois 50 g de ce mélange par pied de tomate. Les résultats ne montrent pas d'effet nématostatique des poudres de crotalaire, contrairement aux conditions contrôlées.

- A l'exploitation biologique de JF Dumas, il s'agissait de tester l'effet d'un précédent cultural de *C spectabilis* de 8 semaines en cultures de tomates (photo ci-dessous).



Malheureusement, les crotalaires ont eu un retard de croissance, et la saison ne permettant plus la mise en place de tomate et pour ne pas perdre l'essai, des salades var Donertie ont été plantées. Les crotalaires ont été broyées et enfouies.

Les résultats indiquent que l'effet du précédent crotalaire est particulièrement marqué (tableau 1)., malgré une densité de plantation de crotalaires extrêmement faible. La croissance des salades ne varie pas significativement selon l'espèce de crotalaire utilisée comme précédent cultural, même si la biomasse de *C. spectabilis* enfouie était significativement inférieure à celle de *C. juncea*.

Tableau 1 : indices de galle des salades post-jachères crotalaires ou spontanées

Salade (var Donertie)	Post <i>C. juncea</i>	Post <i>C. spectabilis</i>
Moyennes Indices de galle	1,51±1,4	2,31±1,59

En conclusion contre les nématodes à galles, *C spectabilis* en broyat semble être un moyen efficace de lutte contre les nématodes dans la production de légumes biologiques. *C juncea* semble moins active.

⇒ **Essais en conditions de production tunnel (GRAB)**

Nous avons testé l'intérêt de 2 espèces d'*Allium* utilisées en culture, *A. cepa* (oignon) et *A. schoenaprasum* (ciboulette) en tant que précédent cultural et en fumigation après broyage et incorporation au sol (libération de composés toxiques).

Essais préalables en pots avec sol naturellement infesté par *Meloidogyne spp*

La terre infestée par les nématodes *M. incognita* et *M. arenaria* a été prélevée dans le tunnel d'un producteur maraîcher en AB dans le Gard à la fin d'une culture de salade. Les terreaux ont été mélangés avec des broyats de ciboulette ou d'oignon (34 g/l et 80 g/l) ou du DMDS. Les pots ont ensuite été « bâchés » avec du film plastique alimentaire pendant 4 jours. Les plants de tomate (variété Saint Pierre) ont été transplantés début mai, à raison d'un plant/pot.

Les observations ont été réalisées après environ 2 mois de culture. La ciboulette, puis l'oignon, ont permis de limiter la formation de galles sur les racines de tomates en comparaison au témoin non traité. On observe donc **un effet positif significatif de la ciboulette à 30 g/l** (Fig.11). On peut noter que les effets ne sont optimisés car le bâchage a été réalisé avec un film plastique alimentaire perméable aux échanges gazeux.

La production de fruits est statistiquement plus importante avec la désinfection avec l'oignon et le DMDS.

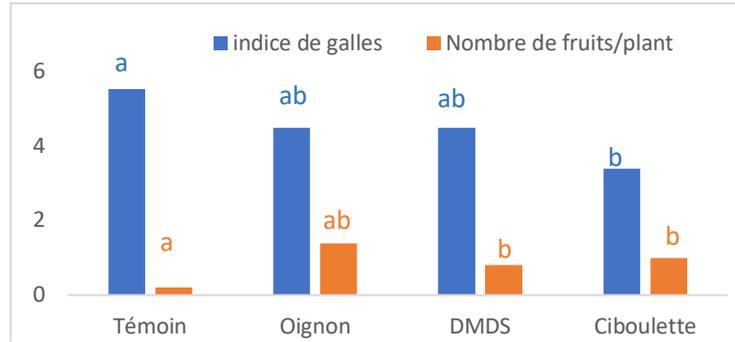


Figure 11. Indices de galles et production de fruits selon les modalités de désinfection.

L'analyse chimique montre 3 fois de précurseurs de produits soufrés considérés comme actifs, DMDS et DPDS, dans la ciboulette par rapport à l'oignon.

En 2017, l'essai n'est pas validé car il n'y a pas eu de développement de nématodes.

Essai en conditions de productions en agriculture biologique

Le dispositif expérimental est situé à Aureille (13), dans un tunnel infesté par des nématodes à galles de l'espèce *M. arenaria*. Les modalités testées sont soit des précédents culturaux de ciboulette et d'oignon soit des précédents suivis d'enfouissement total des *Allium* (Fig. 12). Un témoin persil a été mis en place. Un suivi du développement et de la vigueur pendant la période de culture a été réalisé.



Figure 12. Vue des parcelles oignon OF (à gauche) et ciboulette CF (à droite) avant broyage et incorporation

Le niveau de contamination important de la parcelle, et l'hétérogénéité du niveau d'infestation sur les différentes parcelles élémentaires de l'essai, n'ont pas permis de mettre en évidence de différences entre les traitements. Les 2 Alliées cultivées se sont avérées moins sensibles aux nématodes que le témoin persil, avec des indices de galles quasi nuls en fin d'hiver, mais ne semblent pas avoir limité la multiplication ultérieure sur la culture de tomate. Cet essai ne permet donc pas de conforter les résultats obtenus sur l'essai réalisé en pots. Le niveau de biomasse diffère : 5,3 kg/m² contre 3,5 kg/m² pour l'oignon, et 0,6 kg/m² contre 1,5 kg/m² pour la ciboulette dans les essais eau champ et en pots respectivement.

Tâche 3. Evaluation des effets non intentionnels de la méthode de biocontrôle

Partenaires : IRBI, Innophyt, CIRAD Hortsys, EBI

L'objectif était d'évaluer, *in vitro*, les effets non intentionnels positifs ou négatifs des méthodes de biodésinfection à base de crotalaires et d'*Allium* testées au champs sur les Arthropodes rampants du sol dits épigés (insectes, araignées), sur les cloportes et sur les micro-organismes du sol.

⇒ Arthropodes épigés (IRBI, Innophyt, CIRAD Hortsys)

Des pièges type Barber ont été installés sur les parcelles expérimentales du CIRAD en Martinique (T2) dont les modalités comportaient des *Allium* et crotalaires en précédent cultural + enfouissement (cf dispositif p.5). Le contenu de chaque piège a été rincé puis trié et enfin placé dans une solution d'EtOH à 95°. La détermination des morpho-espèces (Arnault et coll., 2015) d'arthropodes carnivores a été

réalisée sur 5 dates de piégeage et pendant une mission en juillet 2018 directement au CAEC par l'IRBI et Innophyt.

Les analyses ont porté sur l'abondance des ME arthropodes carnivores avant (effet des précédents culturaux) et après plantation des tomates sur les modalités traitées et le témoin.

Les ME carnivores recensées sont : les araignées, hyménoptères parasitoïdes, carabidés, coccinelles, staphylin, tachinaires, syrphes, pipunculides, sciomyzides, punaises et les forficules.

Les ME herbivores sont les orthoptères, cicadelles, mouches acalyptrates, Symphites, Tephritides, Cécidomyie, doryphores, pucerons, scarabés, papillons.

Parmi les 22 groupes d'Arthropodes épigés identifiés, seuls 6 sont fréquemment retrouvés (Fig. 13).

La courbe d'évolution (Fig.14) indique une diminution assez nette des abondances d'Arthropodes de toutes les modalités après la plantation de la tomate. Le travail du sol au moment de la plantation impacte plus les Arthropodes que les précédents culturaux.

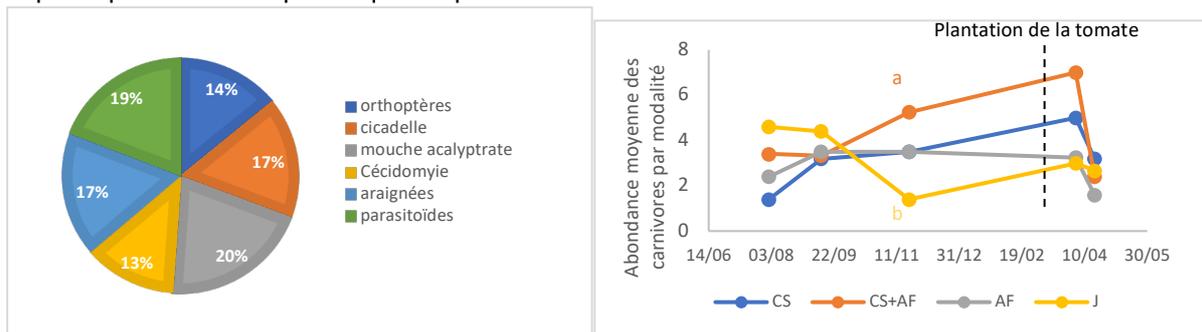


Figure 13 : Fréquence des principaux Arthropodes Figure 14. Evolution des abondances d'Arthropodes

Les tests statistiques de comparaison des abondances entre chaque modalité / date montre une seule différence au 21 novembre. Les abondances de carnivores dans la modalité jachère sont inférieures à celles de la modalité associant les deux PdS : Cs+Af. A cette même date, on retrouve également plus d'herbivores dans les modalités avec le précédent crotalaire.

Globalement, les résultats indiquent que les modalités de désinfection (mulch, précédents culturaux à base Crotalaires ou de cives) n'impactent pas ou très peu les abondances d'Arthropodes.

⇒ Cloportes (EBI)

Les isopodes terrestres sont des organismes détritvires dont la valeur bio-indicatrice est reconnue et des recherches récentes ont permis de montrer la sensibilité de ces derniers aux variations des facteurs environnementaux ainsi qu'aux pratiques agricoles. Nous proposons d'étudier l'impact sur le rendement d'assimilation ainsi que le taux de mortalité d'*Armadillidium vulgare* après contact par la nourriture et/ou par le sol avec des crotalaires ou du DMDS.

Tests de consommation et d'assimilation : mise en présence de litières de tilleul (nourriture) contaminées par une solution de biocontrôle : *C. juncea* ou *C. spectabilis* (2,5 et 5 g/L), *A. cepa* et *A. schoenaprasum* (8,6 et 30 g/L) et DMDS (10^{-4} et 10^{-3} mol/L).

Nos résultats ont montré qu'en 20 jours, il n'y avait pas de différence significative de consommation des feuilles de tilleul par les isopodes terrestres en fonction des traitements et avec le témoin.

Tests d'évitement : introduction d'animaux adultes dans des mésocosmes comportant un sol contaminé par des extraits de crotalaires ou DMDS (fortes doses ; Alliées non testées) ou sans extraits.

Les résultats montrent que les isopodes terrestres évitent de manière non aléatoire le sol traité par *C. juncea* et par le DMDS. Au champ, dans un milieu naturel, il est probable que les individus restent groupés et suivent un comportement d'évitement des sols contaminés, ce qui se traduirait par une répartition inégale des fonctions de décomposition associées à leur activité.

Tests de toxicité : injection ou application topique en fonction du cycle de mue ou de la gravidité (sur les femelles ou sur les jeunes libérés dans le milieu) avec différentes concentrations de broyats de feuilles de *C. juncea* ou de *C. spectabilis* et de DMDS à différentes concentrations.

Le suivi de mortalité des individus a montré que tous les isopodes étaient morts en présence de DMDS à forte dose puis le DMDS à faible dose, et *C. juncea* à faible et forte doses. La mortalité la plus faible a été trouvée en présence de sol contaminé par *C. spectabilis* à forte dose.

⇒ **Populations microbiennes (CIRAD Hortsys)**

Il s'agit ici d'évaluer, *in vitro*, les effets non intentionnels de cette méthode de biodésinfection à l'aide de broyats frais de *C. juncea* de *C. spectabilis*, DMDS et d'*A. fistulosum* sur les communautés microbiennes non cibles de deux sols de la Martinique.

La biomasse fraîchement broyée de chaque plante testée est incorporée au sol à raison de 25% du poids de sol. Les communautés microbiennes du sol sont extraites selon la méthode EL-FAME et quantifiées par CPG via le programme MIDI (Microbial ID, Newark). On constate :

- l'absence d'effet du DMDS sur les communautés microbiennes du sol tout au long de l'incubation et ce quel que soit le groupe microbien considéré,
- Un effet hautement significatif suite à l'ajout dans le sol des broyats des trois espèces de plantes et stimulant sur l'ensemble des communautés microbiennes.
- Cet effet est néanmoins dépendant de l'espèce végétale incorporée.
 - Les deux crotalaires présentent des accroissements des communautés microbiennes toujours supérieures à l'*A. fistulosum*
 - *C. juncea* stimule davantage les Gram- et les champignons alors que *C. spectabilis* montre un effet plus marqué sur les Gram+, les protozoaires
 - Seule *C. spectabilis* présente un effet significatif sur les actinomycètes et 1 jour seulement après incorporation du broyat.

Tâche 4. Etudes des mécanismes allélopathiques

Partenaires : EBI, IRBI

Il s'agissait de tester les effets de biostimulation d'extraits aqueux faiblement concentrés en *Allium*, crotalaires et DMDS sur la croissance et la résistance de la tomate.

Mise en place des cultures de tomates en serre, Var. St Pierre (Poitiers, EBI). Mise en place des traitements : incorporation des extraits de cives et de crotalaires dans les terres des plantes cultivées et injection de la solution de DMDS à deux concentrations différentes.

⇒ **Analyses phénotypiques : estimation de la croissance des plantes**

Nos résultats ont montré un effet stimulant sur la croissance des tiges des tomates après 21 jours de traitement pour les cinq modalités (crotalaires, oignon, ciboulette DMDS 10^{-4} mol/L et 10^{-2} mol/L).

Un effet stimulant sur la croissance (masse sèche des feuilles et des racines,) a été observé pour les tomates traitées 21 jours avec des crotalaires et l'injection de DMDS 10^{-4} mol/l. Les traitements avec les crotalaires indiquent une stimulation de la croissance globale de la plante avec une augmentation de la biomasse des feuilles et des racines et s'accompagnent d'une augmentation de la densité racinaire. Concernant modalité DMDS 10^{-4} mol/l, le traitement a stimulé préférentiellement la partie racinaire avec une augmentation de la biomasse.

⇒ **Analyses biochimiques**

Au niveau biochimique, les tomates qui se sont développées dans les modalités crotalaires et DMDS 10^{-4} mol/l présentent une biostimulation de la croissance racinaire associée à une teneur plus élevée en sucres solubles dans cet organe.

Concernant les traitements avec la ciboulette et le DMDS 10^{-2} mol/l, les résultats indiquent des teneurs en sucres solubles et en protéines plus élevées dans les racines.

⇒ **Analyses moléculaires**

Cette partie a étudié, dans les parties foliaires et racinaires, les gènes impliqués dans l'activité photosynthétique, dans le transport de sucre et de gènes de défense des plantes par dosage qRT-PCR de plantes traitées par *C. juncea* et par le DMDS (dose 10^{-4} mol/L) des 5 gènes de défense (marqueurs des voies de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène) et de 3 gènes

codant pour des transporteurs de saccharose (SUTs) et 2 gènes codant pour des facilitateurs de transport de saccharose (SWEETs, «Sugars Will Eventually be Exported Transporters»).

Les analyses montrent une surexpression des gènes dans les racines des plantes traitées au DMDS 10^4 mol/l. Pour les gènes codant pour les transporteurs de saccharose, les traitements DMDS et crotalaires ne stimulent que très légèrement certains gènes de transports et de facilitateurs de transports.

Tâche 5. Etudes socio-économiques

Partenaire : CIRAD Hortsys

La production de tomates en Martinique (1800 tonnes environ) ne couvre qu'un tiers de la demande locale, le solde est importé. Cette situation est symptomatique du secteur du maraîchage à l'échelle insulaire. La production locale ne couvre en effet que 40% par la production locale (AGRESTE 2012, 2013). La production de tomates est difficile dans les environnements humides comme en Martinique. Elle est par conséquent vulnérable au flétrissement bactérien. Les mesures prophylactiques actuelles sont insuffisantes.

La tâche 2 indique que les crotalaires présentent un potentiel assainissant du sol dans le cadre de la production de tomates, l'usage de broyat se justifie dans les situations de production intensives (sous serres par exemple) où les jachères ne sont pas envisageables. Dans ce cas-là, la production de plantes de services peut être réalisée à l'extérieur de l'exploitation. Dans les situations de production où des jachères (ou repos du sol) sont réalisées, il est possible de produire des crotalaires pendant ces périodes puis de les faucher. Enfin, les climats humides et ensoleillés permettent d'envisager une production de masse de crotalaires. Cette utilisation est conditionnée par une mise en place d'une filière dédiée à la production de broyats de crotalaires. La tâche 5 a permis d'identifier les indicateurs à prendre en considération pour cette démarche.

Cette tâche avait identifié deux approches : des analyses de filière et l'identification d'indicateurs clefs intervenants dans les réflexions d'une mise en place d'une réflexion à une échelle industrielle.

Ces indicateurs sont de nature technique (efficacité par exemple), économique (coûts exemple) et environnementale (impact).

Ces indicateurs mettent en évidence trois sous-filières interdépendantes pour la production, la transformation, et la commercialisation de broyats. Deux éléments apparaissent comme décisifs pour la mise en place d'une filière dédiée. Il s'agit du choix des sources d'énergie pour les processus de séchages. Ces choix énergétiques détermineront la structure de la sous-filière de transformation.

Ces indicateurs renvoient à des réflexions techniques (énergie, cinétique des produits), économiques (économie d'échelle, commercialisation, importations), et environnementale (impacts sur l'environnement des scénarios envisagés).

Un agenda de recherche est à envisager pour chacune des trois sous-filières, dans une démarche intégrée (technique, économique, et environnementale) et collective (approche pluri-acteurs) :

- **A l'échelle de la sous-filière de la production** de crotalaires, des études restent à réaliser pour comparer les conditions économiques et environnementales de production de crotalaires. Cette production peut en effet se faire chez chaque producteur. Il s'agit alors de comparer l'approche entre un apport de crotalaires en frais puis fauché, à un apport de crotalaires cultivés, fauchés, puis séchés. Des comparaisons d'économie d'échelle sont nécessaires : faut-il favoriser des démarches individuelles décentralisées et flexibles mais qui compliqueront une démarche qualité pour les produits ? Faut-il favoriser une production sur des surfaces agricoles dédiées proche des unités de séchage ?

- **A l'échelle de la sous-filière de la transformation**, la question des économies d'échelle et des seuils techniques reste à explorer : faut-il favoriser des démarches individuelles par agriculteur (broyage à la main), des petites structures semi artisanales de séchage plus flexibles dans leur fonctionnement, des structures plus grandes industrielles ou semi industrielles, ou des alliances avec des structures de séchages (de boue par exemple) déjà opérationnelles. Si un environnement humide

favorise la culture de crotalaires, c'est un handicap pour le séchage. Par ailleurs la dimension environnementale reste à intégrer dans les réflexions de déploiement industriel.

- **A l'échelle de la sous-filière de commercialisation et d'usage**, une étude sur les conditions de mise en marché de produits de biocontrôle reste à étudier. Les axes de réflexion sont les suivants : comparaison des prix au consommateur selon que les produits sont produits localement ou importés, calcul des coûts de revient au producteur.

Les résultats de cette tâche ont fait apparaître deux réflexions transversales à prendre en considération pour un agenda à moyen et long terme :

- L'analyse technique, économique et environnementale de l'emballage et de la cinétique des crotalaires en frais ou en sec reste à étudier, depuis la récolte, jusqu'aux différentes phases de stockage entre chacun des différents segments des sous-filières.
- A l'échelle macroéconomique, la question est de savoir s'il vaut mieux produire localement des tomates par des méthodes de biocontrôle ou de les importer. La question et l'arbitrage des réponses repose sur des considérations à la fois économiques (coût d'achat des tomates sur les différents marchés locaux et internationaux), environnementales (impact environnemental de la production dans les pays exportateurs, impact du transport par bateau, voire avion), et politiques (dépendance alimentaire sur les marchés internationaux).

CONCLUSION

Le projet a démontré un intérêt des plantes de services en désinfection de sol sur tomate sous trois angles différents de production et de problématiques.

- Contre **l'agent du flétrissement bactérien *Ralstonia solanacearum*** en culture tropicale, ***C. juncea*** positionnée en **précédent culturel de deux cycles suivi d'un mulch** permet de diminuer la sévérité de la maladie. Néanmoins, cette utilisation présente des inconvénients dans les itinéraires techniques. **Une utilisation de *C. juncea* en poudre ou broyat dans le sol constituerait la solution la plus réalisable.** Une filière de production de formes séchées de *C. juncea* devrait ainsi être mise en place pour une meilleure intégration dans les systèmes de culture. Concernant la cive antillaise qui présente des effets antibactériens intéressants, son utilisation en mulch n'est pas envisageable du fait de sa haute valeur ajoutée en cuisine.

- Contre **les nématodes à galles** du genre *Meloïdogyne* en métropole en **production maraichère sous serre**, ***C. spectabilis* en précédent culturel/mulch suivi d'un enfouissement dans le sol** semble réduire les galles sur salade. L'incorporation de poudre de crotalaire au sol présente aussi des résultats intéressants de réduction de galles sur tomate.

- Contre **les nématodes à galles** du genre *Meloïdogyne* en métropole **sous tunnel**, les essais dégagent timidement un intérêt **de la ciboulette et l'oignon en broyats dans le sol**. Il faut néanmoins poursuivre les recherches de design expérimental : dose optimales de broyat dans le sol associé à un bâchage de fumigant, utilisation en précédent culturel /mulch, association de PdS...

Lorsque les pressions parasitaires sont très élevées comme cela a été le cas dans les essais sur les nématodes et *R. solanacearum*, les PdS en précédent culturel/mulch ou en broyat dans le sol ne permettent pas toujours de sécuriser les productions. Il faudrait envisager **une stratégie avec les PdS en préventif en pré-culture de tomate et un pesticide en curatif pendant la phase culturale.**

Le projet a mis en évidence le caractère antibactérien du DMDS. Ce produit constitue une alternative prometteuse contre l'agent du flétrissement bactérien en région tropicale et potentiellement invasif pour les climats tempérés. L'avenir de l'usage avec le DMDS, actuellement orphelin, dépend aussi de la demande d'homologation en Europe.

Concernant les effets non intentionnels, des constats plutôt positifs des PdS ont pu être établis. Ces PdS stimulent les populations microbiennes du sol et la croissance sur la tomate. A des fortes doses qui ne représentent pas les conditions au champ, les extraits aqueux de *C. juncea* et le DMDS sont toxiques pour les cloportes. Au regard des résultats du projet, une transposition à d'autres cultures est délicate mais possible si et seulement si ce sont les mêmes conditions de production : tunnel, serre, plein champ et si ce sont les mêmes pathogènes.

Tâche 6. Valorisation et diffusion

Partenaires : CIRAD Hortsys Ecos et Airb, LSTM, Delbon, CERTIS France, GRAB, Innophyt, IRBI

⇒ **5 communications écrites et orales lors de congrès**

Biocontrol and Natural Products, 25-28 septembre 2018, Perpignan.

I. Arnault, P. Deberdt, G. Dubreuil, Y. Prin, P. Fernandes, H. Védie, P. Sunder, T. Fouillet, G. Dufretay, C. Souty-Grosset, N. Pourtau, M. Zimmermann, D. Giron. Biodésinfection des sols en culture de tomate.

Future IPM 3.0: towards a sustainable agriculture. 16-20 October 2017 Riva del Garda – Italy

G. Dubreuil, N. Pourtau, N. Moreau, C. Leboissetier, M. Piot, D. Giron, et I. Arnault. Allelopathic effects of *Crotalaria juncea* and dimethyldisulfide (DMDS) on tomato plants in the future development of a biocontrol method against root-knot nematodes.

13e Rencontres Plantes-Bactéries. 29 janvier-2 février 2019, Aussois

Y. Prin, F. Cussonneau, C. Le Roux, E. Tournier, B. Vincent, R. Duponnois, F. Deleuze, A. Galiana. Beneficial effect of the use of the tropical legume *Crotalaria* spp for organic greenhouse vegetable production in nematodes-infested soil of South of France

Séminaire intermédiaire PSPE 2 et pesticides 2014 14-15 décembre 2017.

Désinfection des sols en cultures maraichères. Ingrid Arnault.

IX International Symposium on Soil and Substrate Disinfestation (SD 2018) 9-13 September 2018, Heraklion, Crete

P. Deberdt, R. Coranson-Beaudu, C. Thibaut, N. Le Roch, T. Fouillet, P. Sunder and I. Arnault. Soil disinfestation with dimethyl disulfide (DMDS) to manage the bacterial wilt of tomato in the tropics.

Les travaux seront également discutés lors du 4^{ème} congrès de Biostimulants à Barcelone « Biostimulants World Congress on Agricultural Biostimulants » (18-21 novembre 2019).

⇒ **2 communications écrites**

Manuscrit soumis European Journal of Agronomy (depuis le 6 mars 2019)

Beneficial effect of the use of the tropical legume *Crotalaria* sp. for organic greenhouse vegetable production in nematodes-infested soil of South of France. Y. Prin, F. Cussonneau, C. Le Roux, E. Tournier, B. Vincent, R. Duponnois, F. Deleuze, A. Galiana

Proceedings of IX International Symposium on Soil and Substrate Disinfestation (SD 2018) 9-13 September 2018, Heraklion, Crete

Soil disinfestation with dimethyl disulfide (DMDS) to manage the bacterial wilt of tomato in the tropics. P. Deberdt, R. Coranson-Beaudu, C. Thibaut, N. Le Roch, T. Fouillet, P. Sunder and I. Arnault.

Références bibliographiques

Arnault I, Venturini G, Munier D, Dalino F, 2015. Method for classification and identification of morphological species. Patent WO 2015121599 A1

Arnault I, Fleurance C, Vey F, Dufretay G, Auger J, 2013. Use of Alliaceae residues to control soil-borne pathogens. *Industrial Crops and Products* 49, 265, DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.05.007

Arnault I, Christidès JP, Mandon N, Kahane R, Haffner T, Auger J, 2003. High performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV. *Journal of Chromatography A* 991: 69-75.

Deberdt P, Perrin B, Coranson-Beaudu R, Duyck PF, Wicker E, 2012. Effect of *Allium fistulosum* extract on *Ralstonia solanacearum* populations and tomato bacterial wilt. *Plant Disease* 96: 687-692.

Xiuhong Ji, Khan I, Mosjidis, JA, Wang Hui; Livant P. Variability for the presence of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria juncea* L. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* (60), 2005, pp. 620-622(3)

Annexe. Carte heuristique des résultats de SERUM.

