
Réduction de l'utilisation du cuivre dans le contrôle du mildiou de la vigne en viticulture biologique : Utilisation de la bourdaine et de la rhubarbe

Marc CHOVELON et Carine SCHMITT (GRAB)

Introduction

Afin de déterminer quels produits « naturels » peuvent remplacer le cuivre en viticulture, un projet européen dénommé « REPCO » (2003-2006) a été mis en place au sein duquel le GRAB a participé pour la partie sur le mildiou de la vigne. Au terme de ce projet, l'effet satisfaisant des éliciteurs, ou « SDP » (*i.e.* des produits induisant une réaction de défense de la plante), seuls ou combinés à de faibles doses de cuivre a été mis en avant (Gomez, 2009). D'autres projets tels que Co-free (« *Innovative strategies for copper-free low input and organic farming systems* » ; 2012-2016) ou RELACS (« *Replacement of Contentious Inputs in organic farming Systems* » ; 2018-2022) s'intéressent aussi à la question de la réduction des intrants cuivreux en agriculture. Au niveau national, le projet CASDAR 4P (2010-2012), auquel le GRAB a aussi pris part, reprend ce thème. Celui-ci a montré que des solutions à base de plantes peuvent être efficaces pour lutter contre certains champignons. Dès lors, dans la continuité de ces recherches, notre étude entre dans le cadre d'un programme régional de la région PACA sur la recherche d'alternatives au cuivre. La section « viticulture » du GRAB travaille ainsi depuis 2003 sur cette recherche. Ces dernières années, les recherches du GRAB se sont centrées sur des essais à base de bourdaine (*Frangula alnus* ou *Rhamnus frangula*) et de rhubarbe (*Rheum officinale*), en modifiant chaque année certaines modalités de préparation.

En effet, la racine de rhubarbe et l'écorce de bourdaine se sont montrées plutôt efficaces pour activer les mécanismes de défense de la vigne empêchant le développement du mildiou (Gindro et al., 2007 ; Kast et Bleyer, 2006 ; Gomez et al., n.d.). Ces végétaux contiennent des composés phénoliques et notamment des anthraquinones (dérivés de l'antracène) comme la rhéine, l'émodine, l'aloé-émodine, le chrysophanol ou encore le physcion (Godard et al., 2009 ; Maleš et al., 2010) qui activent la production de phytoalexines stilbéniques de la vigne (resvératrol, viniférines ϵ et δ , etc.). Ces derniers déclenchent ou renforcent les mécanismes de défense de la vigne afin de bloquer le développement du mildiou (Viret, 2009 ; Gindro et al., 2007 ; Godard et al., 2009). Contrairement au cuivre (ITAB, 2009), ces produits auraient donc l'avantage d'avoir un effet systémique.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui cherche à préciser les réponses apportées par les précédents essais : les macérations et décoctions de racine de rhubarbe et d'écorce de bourdaine peuvent-elles constituer une solution en complément de faibles doses de cuivre, si ce n'est une alternative complète à celui-ci, pour prévenir du mildiou de la vigne ? Qui d'entre la rhubarbe et la bourdaine est plus efficace pour déclencher les mécanismes de défense de la vigne ? Doit-on les extraire séparément ou les mélanger pour accroître leur efficacité ? Quelle modalité d'extraction est la plus efficace, macération ou décoction ? Un temps d'extraction plus long permet-il d'obtenir davantage d'efficacité ? Existe-t-il un effet de synergie plantes-cuivre qui serait plus efficace que le cuivre seul ? Pour répondre à ces interrogations, nous avons mis en place un essai sur la station expérimentale du GRAB.

Matériels et méthodes

Conditions de l'expérimentation

L'expérimentation se déroule sous une ombrière abritant des vignes en pot sur la station expérimentale du GRAB à Avignon, en région PACA. Cette région est généralement peu touchée par le mildiou car son climat très chaud et sec l'été, souvent accompagné de mistral (vent sec en provenance du Nord), n'est pas favorable à l'expansion du mildiou qui apprécie les zones humides dont les températures sont comprises entre 11 et 30°C (Blancard, 2017). C'est pourquoi l'ombrière est équipée d'un système d'aspersion permettant de maintenir une humidité optimale sur les vignes. En plus de créer de l'ombre, l'ombrière sert aussi de brisevent pour que le vent ne participe pas à la déshumidification de l'environnement proche des vignes et de celles-ci (Photo 1). Concernant sa localisation, l'ombrière est située sur une plaine. Elle est longée par une serre du côté Ouest et par une rangée d'arbres du côté Est. Au Nord, on retrouve une rangée d'arbres, et le Sud est dégagé (Figure 2). La serre ne crée pas plus d'ombre sur les vignes contrairement à la rangée d'arbres. Ainsi, selon le moment de la journée, une partie des vignes se trouve à l'ombre.



Image 1 : prise de vue du dispositif d'expérimentation, vue du Nord.

Matériel végétal

L'essai comprend 216 vignes, âgées de deux ans, placées en pot individuel et irriguées par un système de goutte-à-goutte. La moitié de ces vignes sont du grenache blanc (raisin de cuve). L'autre moitié est composée de muscat de Hambourg (raisin de table). Ces cépages ont été choisis car ils sont tous deux très sensibles au mildiou (Dubos, 1999). Chaque cépage est disposé en 3 rangs de 36 pots orientés Nord-Sud (Photo 1). Le grenache blanc est situé du côté Ouest de l'ombrière et le muscat de Hambourg du côté Est (Fig. 1).

Enfin, on considèrera que deux pots côte-à-côte forment une unité expérimentale, dit aussi « parcelle élémentaire » : ils reçoivent donc le même traitement.

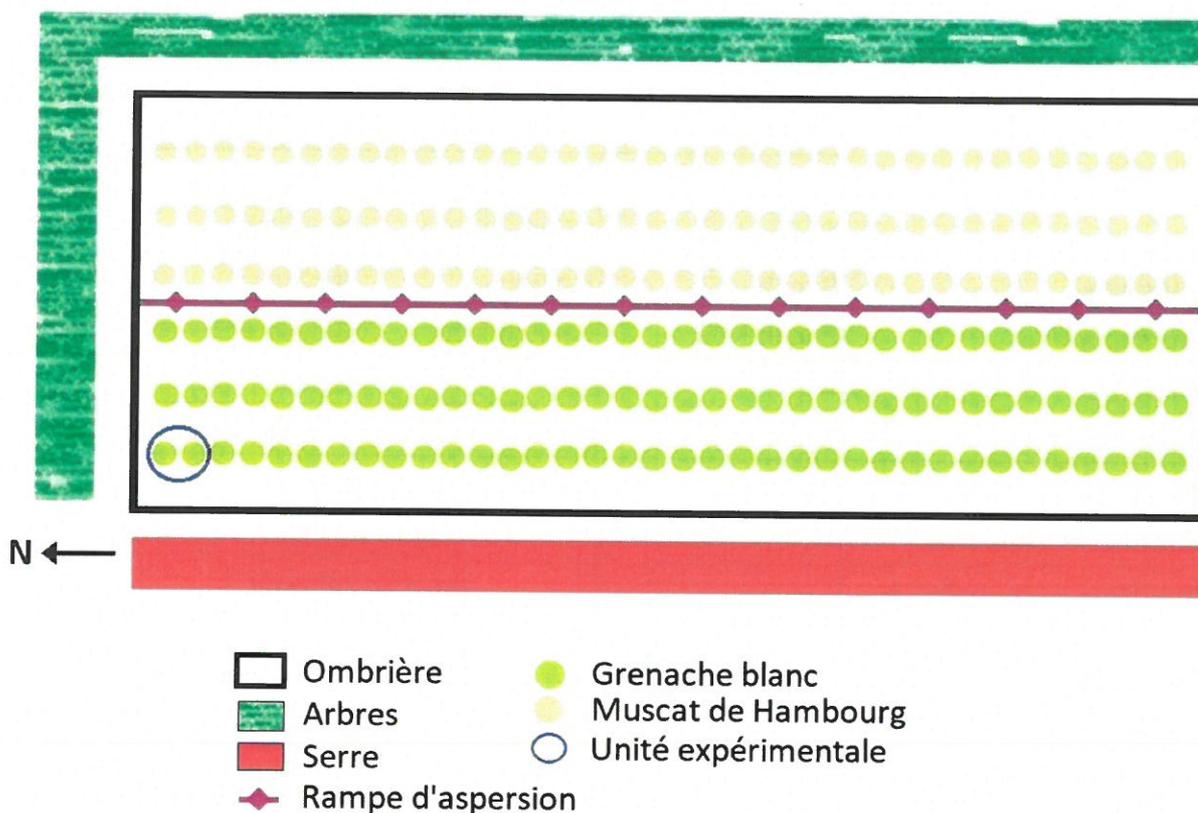


Figure 1 : Schéma de la disposition de l'expérimentation

Dispositif expérimental

Notre essai est composé de 18 modalités répétées 3 fois sur chaque cépage soit 6 fois au total. La disposition des modalités a été déterminée aléatoirement grâce au logiciel Statbox®, en imposant cependant la condition que chaque rangée de vigne doit comprendre une seule fois chaque modalité afin d'obtenir 3 blocs par cépage (Annexe 2). Ces blocs permettent de contrecarrer l'hétérogénéité de l'espace dans lequel s'intègre l'essai : ombre différente, influence du vent, mais aussi humidité car la rampe d'aspersion se trouve au milieu des 2 rangs au centre (Figure 1).

Parmi les 18 modalités, on retrouve une modalité témoin « TNT » qui correspond aux pots non traités capables de témoigner de la réussite de l'inoculation du mildiou ainsi que sa fréquence et son intensité sans traitement. Deux modalités, « Cu 600 » et « Cu 100 », concernent les pots traités uniquement avec du Champ® Flo Ampli, un produit contenant 360 grammes d'hydroxyde de cuivre par litre et utilisé en AB pour lutter contre *P. viticola* (Agrileader, n.d.). Dans le premier cas, l'application correspond à 600 g/ha soit 1,66mL de produit par litre d'eau, c'est la référence qui permet de confirmer que l'essai a bien été mené : si cette modalité comprend plus de mildiou que les autres, l'essai n'est pas valide. Le second cas correspond à un traitement à base de 100 g/ha soit 0,277mL de produit par litre. Cette modalité permet de comparer l'efficacité d'une simple application de cuivre à faible dose à des traitements mêlant extraits de plantes et cuivre. Elle permet ainsi d'étudier un potentiel effet synergique cuivreplantes qui permettrait à ce mélange d'être plus efficace que du simple cuivre. Les 15 autres modalités comprennent soit de la bourdaine, soit de la rhubarbe, soit un mélange des deux, infusés pendant 4 heures ou 24 heures, en macération ou en décoction. Pour 7 modalités, ces extraits sont accompagnés d'une dose de cuivre correspondant à 100g/ha. Enfin, 3 des mélanges (« B+R m4h », « B+R m24h » et « B+R d24h ») ont été mêlés lors de l'extraction. Les 2 autres mélanges (« Bm + Rd 24h » et « Bm + Rd 24h + Cu ») ont été réalisés après l'extraction, juste avant l'application. Nous avons choisi de faire ces deux derniers mélanges en raison des résultats présentés dans l'étude de l'année dernière qui

mettaient en avant une certaine efficacité de la macération de bourdaine et de la décoction de rhubarbe. Nous souhaitons donc voir si en mêlant les deux on peut obtenir une plus grande efficacité que lorsqu'elles sont séparées. Le détail des modalités se trouve dans le tableau 1.

	4h	24h	
	Macération	Macération	Décoction
Bourdaine	B m4h	B m24h	B d24h
Bourdaine + Cu	B m4h + Cu	B m24h + Cu	B d24h + Cu
Rhubarbe	R m4h		R d24h
Rhubarbe + Cu	R m4h + Cu		R d24h + Cu
Bourdaine + Rhubarbe	B+R m4h	B + R m24h	B+R d24h
Bourdaine + Rhubarbe*		Bm + Rd 24h	
Bourdaine + Rhubarbe* + Cu		Bm + Rd 24h + Cu	
Cuivre 600	Cu 600		
Cuivre 100	Cu 100		
Témoin non traité	Témoin		

* : macération de bourdaine et décoction de rhubarbe

Tableau 1 : modalités testées dans le cadre de cette expérimentation. B : bourdaine ; R : rhubarbe ; m : macération ; d : décoction ; 4h : 4 heures de contact eau-plantes ; 24h : 24 heures de contact eau-plantes ; Cu : cuivre.

Il est à noter que tous les traitements ont été réalisés en utilisant de l'eau de forage et ils comprennent tous 2mL/L d'Héliosol®, un adjuvant qui améliore la rétention et le pouvoir mouillant du produit auquel il est ajouté. Lors d'une précédente expérimentation réalisée au GRAB par Tarico J. et Chovelon M. (2016, rapport non publié), il a été conclu que l'effet de l'Héliosol® sur le développement du mildiou était négligeable.

Préparation et application des traitements

Les traitements aux extraits de plantes infusées 24 heures ont été préparés le 5 juin et ceux infusés 4 heures ont été préparés le 6 juin afin que tous soient prêts au même moment, le 6 juin à 14h. Pour les décoctions, la température de l'eau a été portée à 80°C avant d'y plonger les végétaux. On a ensuite laissé refroidir les extraits pendant le temps indiqué selon la modalité. Pour les traitements à base de plante seule, on a laissé infuser 1g/L d'écorce de bourdaine ou de racine de rhubarbe broyée juste avant l'infusion. Pour les traitements à base de bourdaine et de rhubarbe infusées ensemble, nous avons utilisé 0,5g/L de chaque plante broyée. On a choisi de limiter les traitements à 1g de plante par litre car au-delà de cette quantité le coût du traitement serait trop important et l'approvisionnement trop difficile pour les viticulteurs.

Une fois prêts, les extraits ont été filtrés à l'aide d'un tamis fin (type filtre à café) et placés dans des bouteilles en plastique. Il était prévu que les traitements soient appliqués directement après la filtration, cependant, avec de fortes pluies annoncées ce jour-là, nous avons décidé de reporter les applications au lendemain matin et avons placé les traitements au réfrigérateur pour la nuit.

Chaque traitement (17 modalités) a été appliqué jusqu'à la limite du ruissellement sur les feuilles des vignes ce qui correspond à une application de 1000L/ha. Cette quantité est conséquente si on la compare aux 150 ou 200L/ha appliqués habituellement en plein champs avec un pulvérisateur

pneumatique (Viret et *al.*, 2007). Cependant, ici on cherche à optimiser les applications pour obtenir une efficacité élevée afin de pouvoir comparer l'effet préventif des différents traitements.

Inoculation

Plasmopara viticola est un parasite qui est difficilement conservable et impossible à cultiver en milieu synthétique à l'heure actuelle (Blancard, 2017). Ainsi, pour pouvoir l'inoculer à nos ceps, nous avons récupéré des feuilles touchées par le mildiou dans un vignoble de la région. Avec des pluies quasi-quotidiennes au mois de mai, le mildiou est apparu tôt. Dès le 30 mai nous avons pu récupérer des feuilles et les placer dans des sachets hermétiques accompagnées de 4 feuilles de papier absorbant humide. Ces sachets ont été placés dans une chambre climatique réglée à une température de 25°C et à une alternance luminosité/obscurité de 16h/8h. Le 11 juin, nous avons récupéré les spores sur ces feuilles dans de l'eau déminéralisée (Annexe 3). À l'aide de l'hématimètre de Malassez nous avons mesuré une concentration équivalente à 226 666 spores/mL de solution, ce qui représente une concentration très satisfaisante pour l'inoculation. Le même jour, soit 4 jours après les traitements, grâce à un pulvérisateur manuel, nous avons appliqué 4mL de cette solution par pot, avec un pulvérisateur manuel orienté vers la face inférieure des feuilles.

Pour créer les conditions favorables au développement du mildiou, l'aspersion a été réglée pour fonctionner 5 minutes toutes les 30 minutes, et ce durant toute la durée de l'essai.

Méthode de mesure

Dans le but de mesurer les attaques de mildiou, nous avons réalisé des comptages consistant à observer 5 feuilles prises au hasard sur chaque cep, soit 10 feuilles par unité expérimentale. Pour chaque feuille, il s'agit de reconnaître la présence de *Plasmopara viticola* (Annexe 1 – Images A, B, C et D) ou son absence. En cas de présence de la maladie, il faut estimer à l'œil nu la taille de la surface touchée (de 0 à 100% de la feuille).

On obtient ainsi la fréquence d'attaque (nombre de feuilles touchées sur les 10 qui composent l'échantillon par unité expérimentale) et l'intensité de l'attaque (proportion du limbe affectée par les symptômes).

Ces mesures ont été réalisées 3 fois par semaine (lundi, mercredi, vendredi) entre le 15 juin, soit 4 jours après l'inoculation de *Plasmopara viticola*, et le 6 juillet, date à laquelle nous avons estimé que le développement du mildiou atteignait un palier maximal.

Traitements statistiques

Une fois les mesures d'intensité et de fréquence faites, nous avons calculé les AUDPC (Area Under the Disease Progression Curve) ce qui correspond au calcul de l'aire sous la courbe de progression d'attaque du mildiou. On calcule cette aire de la manière suivante (The American Phytopathological Society, n.d.) :

$$\text{AUDPC}_k = \sum_{i=0}^{N_i-1} \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

Avec y_i = y -ième niveau d'intensité/fréquence d'attaque de la maladie ; t_i = t -ième jour depuis l'inoculation du mildiou avec t_0 = jour d'inoculation du mildiou.

L'AUDPC permet de prendre en compte l'ensemble des mesures effectuées sur la période d'essai et de les rassembler dans une seule valeur qui va permettre de comparer l'évolution du mildiou selon le traitement. Une AUDPC élevée indiquera une progression importante de la maladie alors qu'une AUDPC faible indiquera une progression lente.

Les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel de statistique StatBox®. Pour répondre aux questions posées dans l'introduction, nous avons réalisé des analyses de variance à 1 et 2 facteurs (avec $\alpha = 0,05$), après avoir vérifié les hypothèses de normalité (observation de l'histogramme des résidus et calcul du coefficient de K.Pearson), d'homoscédasticité (test de Bartlett) et d'indépendance (contrôle visuel de la cartographie des résidus). Si l'ANOVA révèle des différences significatives ($p\text{-value} < \alpha$), on procède alors à un test de comparaison de moyenne : le test de Newman-Keuls (avec $\alpha = 0,05$). Ce test permet de créer des groupes homogènes en fonction des moyennes des AUDPC des différents traitements. Les traitements se trouvant dans deux groupes n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différents l'un de l'autre.

Résultats

Dans cette partie nous allons exposer les résultats qui sont apparus après les analyses de données. On décomposera les résultats en différentes parties afin qu'ils soient plus intelligibles. Ainsi, après avoir présenté les corrections apportées aux données, on répondra aux questions posées dans l'introduction une à une.

Il est à noter que pour tous les histogrammes présentés ci-dessous, les barres des erreur-types sont représentés et au-dessus de chaque barre se trouve la/les lettre(s) désignant le groupe auquel la modalité appartient (A, B, C ou D).

Correction des données

Lors de l'étude des résultats, nous avons relevé des problèmes au niveau des résultats du bloc 6. Celui-ci apparaît bien moins sensible aux attaques de mildiou que les deux autres blocs de muscat de Hambourg, et ce notamment sur les ceps témoins (Fig. 2 et Fig. 3). Nous avons donc réalisé une analyse de données sur l'ensemble des blocs de muscat de Hambourg qui a déterminé qu'il y avait une interaction traitements-blocs. Une seconde analyse ne prenant pas le bloc 6 en compte n'a pas fait apparaître d'interaction. Nous avons donc déterminé que le bloc 6 était problématique et l'avons retiré de nos analyses.

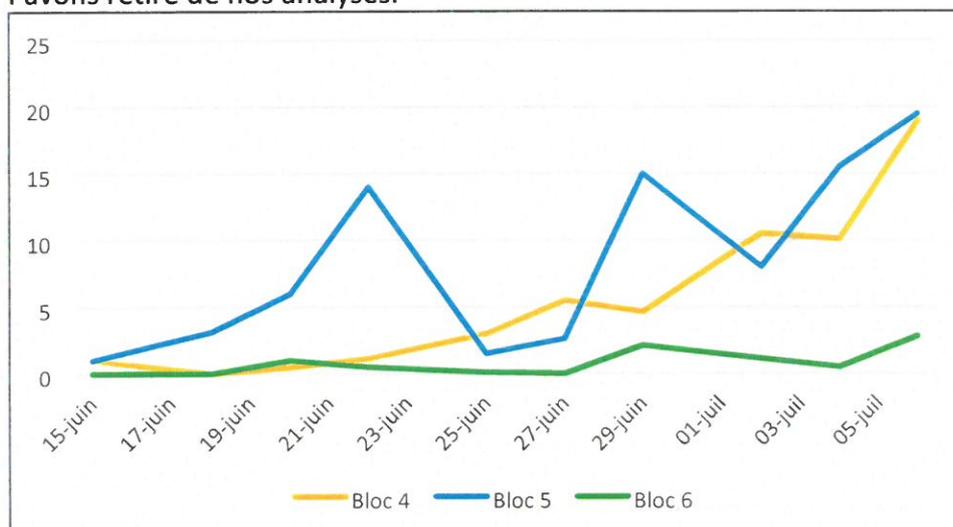


Figure 2 : Evolution de l'intensité d'attaque du mildiou sur témoins de muscat de Hambourg

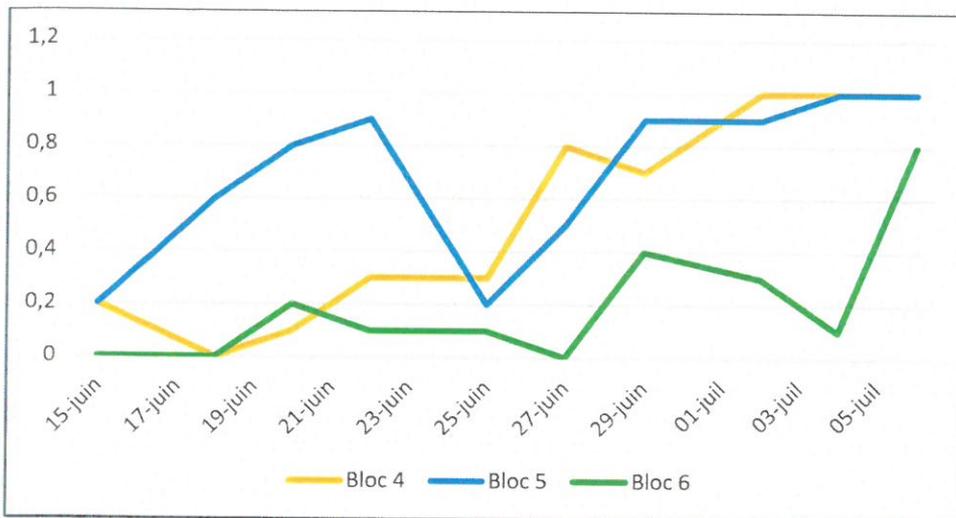


Figure 3 : Evolution de la fréquence d'attaque du mildiou sur témoins de muscat de Hambourg

De même, il est très vite apparu que les mesures relevées le 25 juin étaient très différentes des autres. On remarque effectivement une chute généralisée des attaques de mildiou ce jour-là (Fig. 4).

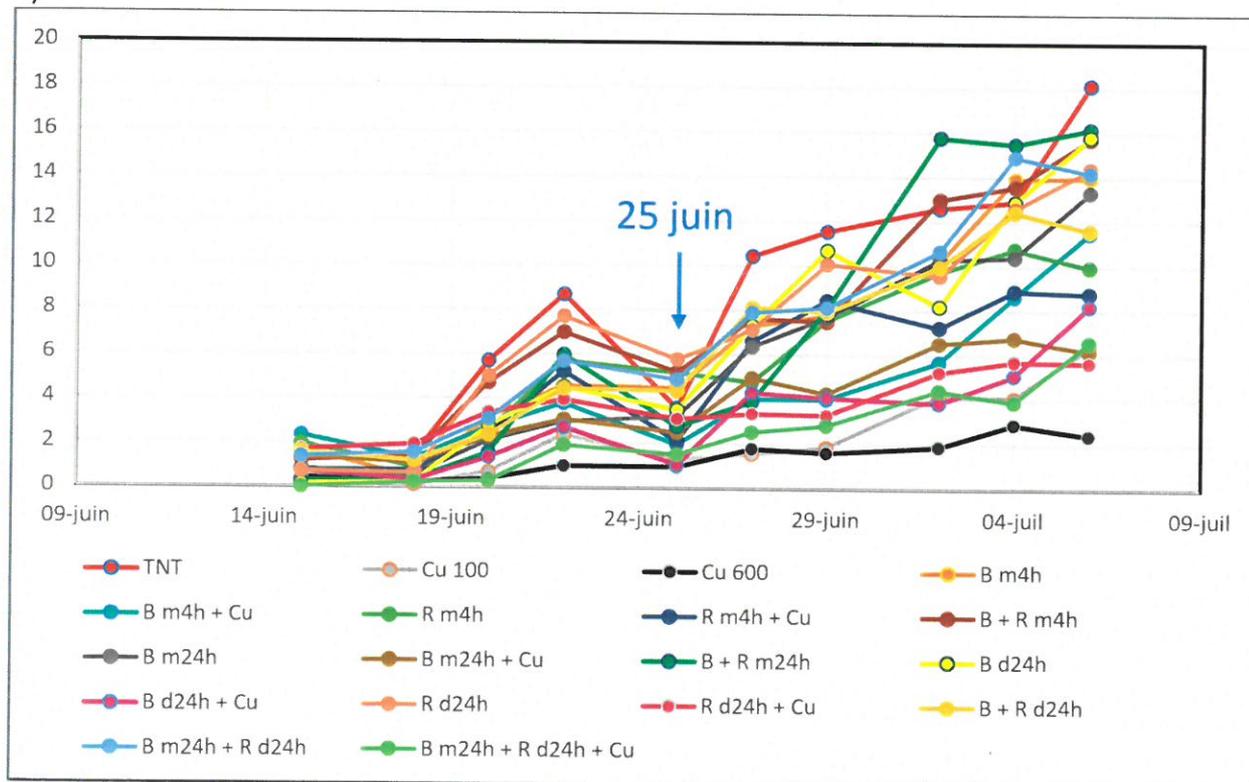


Figure 4 : Intensité d'attaque moyenne du mildiou par modalité sur l'ensemble de la période de mesure

Celle-ci peut être expliquée par le fait qu'il y a eu un changement d'observateur ce jour-ci. Nous avons donc cherché à savoir s'il fallait ignorer les données de cette journée pour ne pas biaiser nos résultats. Pour cela, nous avons comparé deux analyses statistiques faites avec et sans les mesures du 25 juin. Les groupes homogènes qui ont été mis en avant sont exactement les mêmes dans les deux analyses. Effectivement, étant donné que l'observateur a réalisé l'ensemble des comptages, il a sous-estimé la progression de l'ensemble des modalités. L'efficacité d'un traitement par rapport à un autre ne se voit donc pas modifiée. On conservera donc les données du 25 juin dans nos analyses.

Comparaison des résultats des deux cépages

Les génotypes répondent-ils de manière différente aux traitements ? Il est apparu assez rapidement que les deux cépages ne réagissaient pas de la même manière à l'inoculation de la maladie. En effet, le muscat de Hambourg semble moins sensible au mildiou que le grenache blanc. Cela se perçoit en particulier quand on observe les courbes d'intensité moyenne d'attaque du mildiou sur l'ensemble des modalités (Fig. 5) qui, pour celle décrivant l'évolution de la maladie sur muscat, est toujours en-dessous de celle du grenache. On le voit aussi sur le graphique des courbes de fréquence d'attaque (Fig. 6) où celle du muscat est la plupart du temps sous celle du grenache.

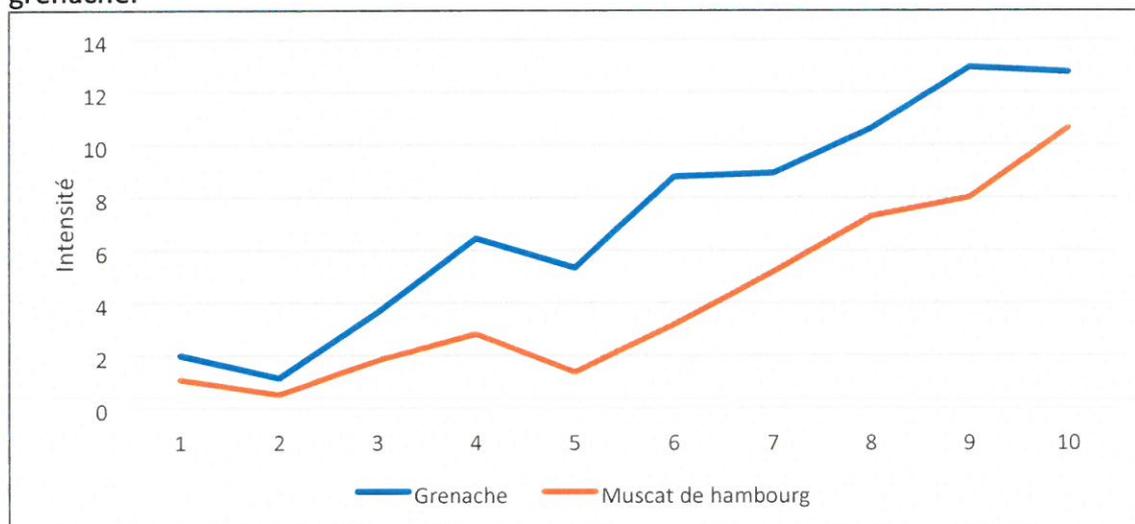


Figure 5 : Evolution de l'intensité (%) moyenne d'attaque du mildiou sur l'ensemble des modalités par cépage du 15 juin au 6 juillet (p -value < 0,001)

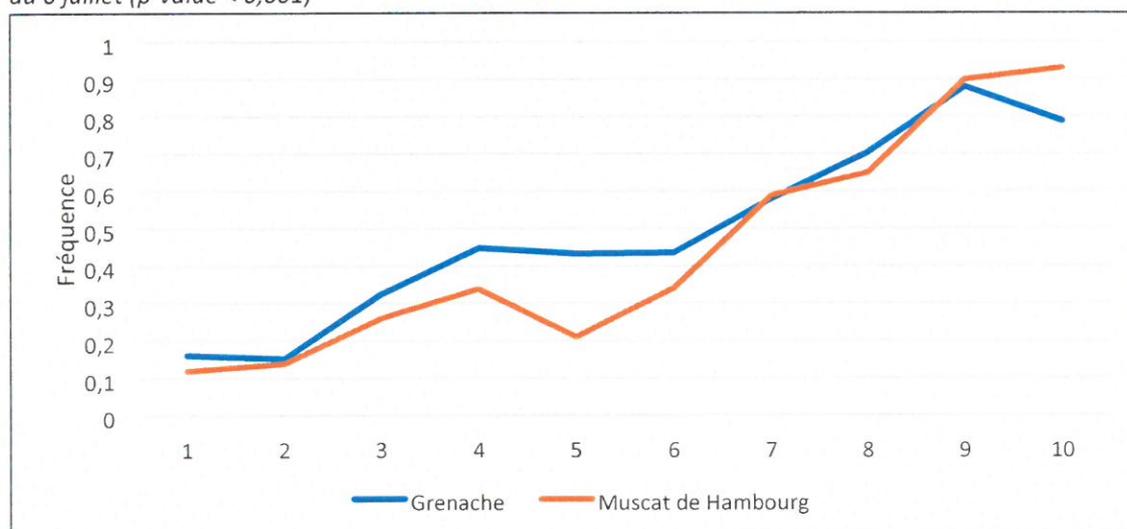


Figure 6 : Evolution de la fréquence moyenne d'attaque du mildiou sur l'ensemble des modalités par cépage du 15 juin au 6 juillet (p -value < 0,001)

L'analyse statistique a montré qu'effectivement les deux cépages sont sensibles de manière significativement différente à *Plasmopara viticola*, en termes d'intensité tout comme de fréquence (p -value < 0,001 ; test de Newman-Keuls : grenache blanc = groupe A et muscat de Hambourg = groupe B). Dans notre essai, il apparaît donc que le muscat de Hambourg est moins sensible aux attaques de mildiou.

On peut alors se demander si cette différence de sensibilité entre les deux cépages va entraîner des réactions différentes aux traitements. Certains traitements pourraient-ils être plus efficaces sur un cépage que sur l'autre ?

Lorsqu'on s'intéresse aux valeurs des AUDPC d'intensité et de fréquence d'attaque du mildiou par cépage, on peut voir clairement que la quasi-totalité des traitements ne sont pas classés dans le même ordre (*i.e.* ne sont pas efficaces de la même manière selon le cépage). Les figures 7 à 10 nous présentent ces efficacités différentes. Les modalités références ont été mises en avant (« TNT » en rouge, « Cu 100 » en gris et « Cu 600 » en noir) ainsi qu'une modalité aléatoire (« R d24h + Cu » en jaune) qui, comme on peut le voir, change de rang selon le cépage, passant du traitement le plus efficace (Fig. 10) au 12^{ème} traitement le plus efficace (Fig. 9) en termes de fréquence d'attaque. De même, lorsqu'il s'agit d'intensité d'attaque cette modalité passe du 2^{ème} traitement le plus efficace sur le muscat (Fig. 8) au 6^{ème} sur le grenache (Fig. 7). L'intensité d'attaque sur le témoin varie aussi en fonction du cépage : c'est la plus attaquée sur grenache (Fig. 7) alors que sur muscat elle n'est que la 5^{ème} modalité la plus attaquée (Fig. 8). L'efficacité de toutes les autres modalités varie aussi beaucoup selon le cépage.

Cependant, après avoir réalisé une analyse statistique des AUDPC des différentes modalités pour chacun des cépages, la non-significativité de ces différences a été mise en avant. Nous continuerons donc notre analyse en étudiant les résultats des deux cépages simultanément.

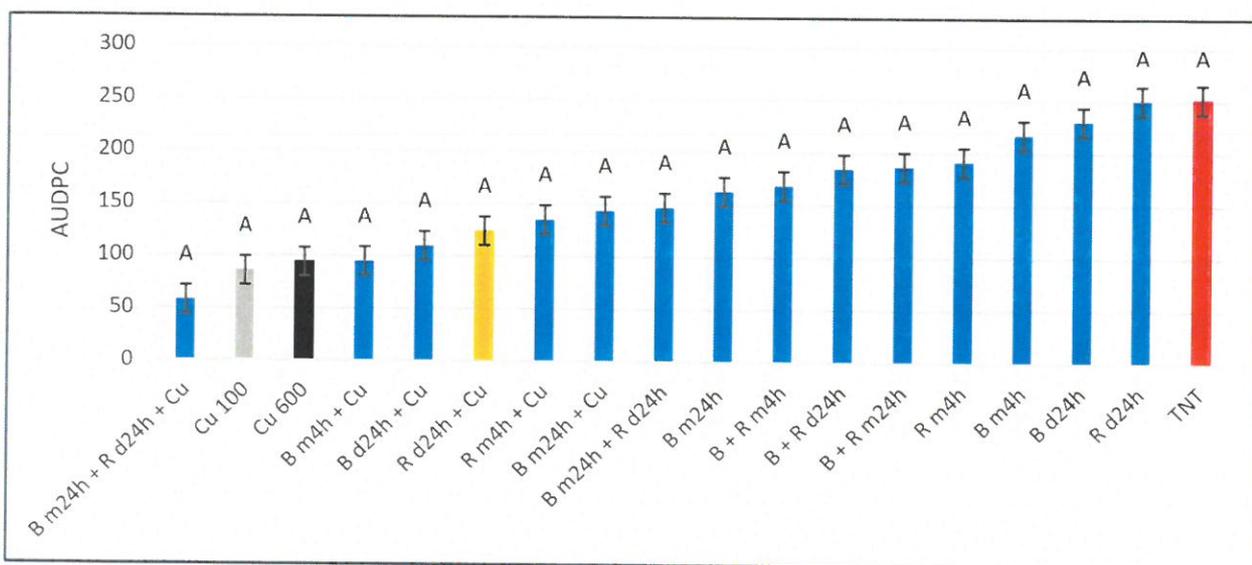


Figure 7 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou sur grenache blanc (p -value = 0,013)

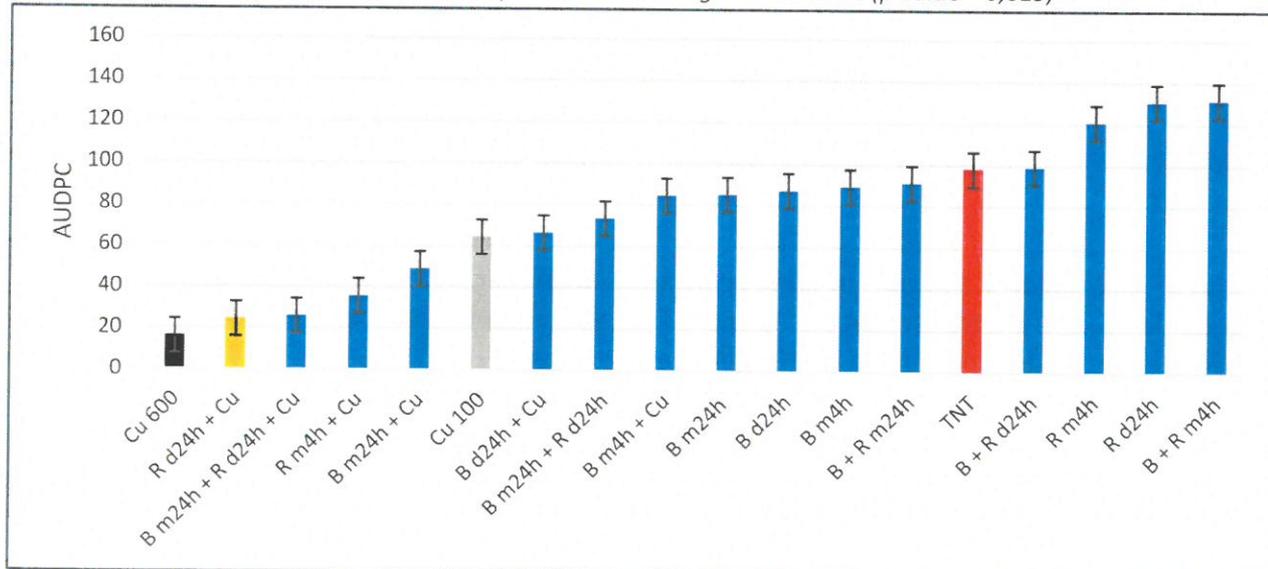


Figure 8 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou sur muscat de Hambourg (p -value = 0,098 donc on rejette l'hypothèse « les moyennes sont significativement différentes »)

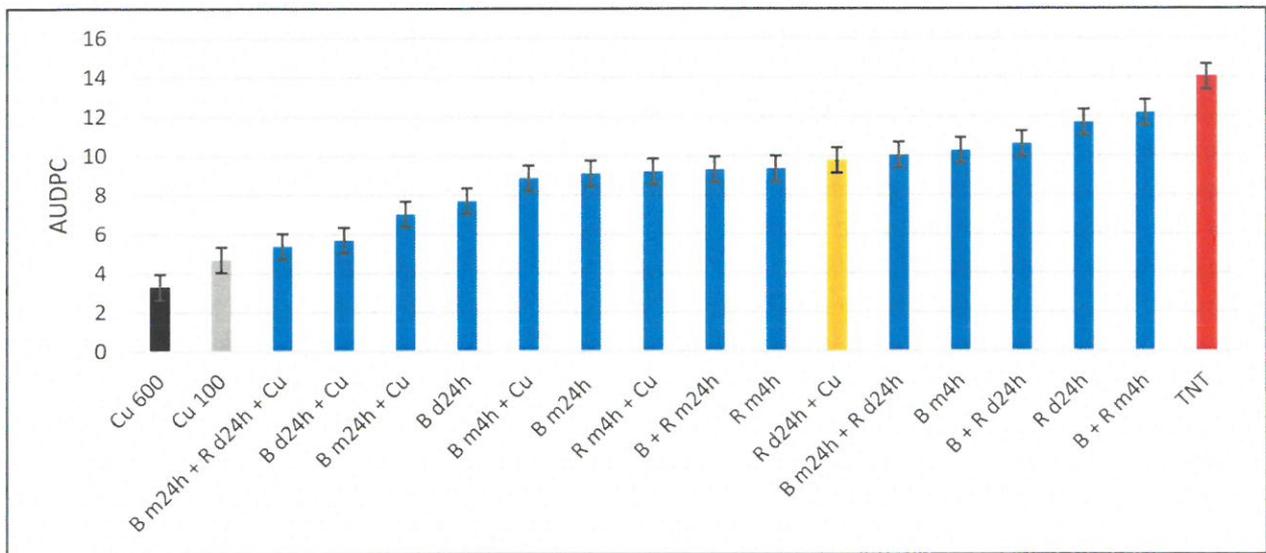


Figure 9 : AUDPC totale de la fréquence d'attaque du mildiou sur grenache blanc (p -value = 0,057 donc on rejette l'hypothèse « les moyennes sont significativement différentes »)

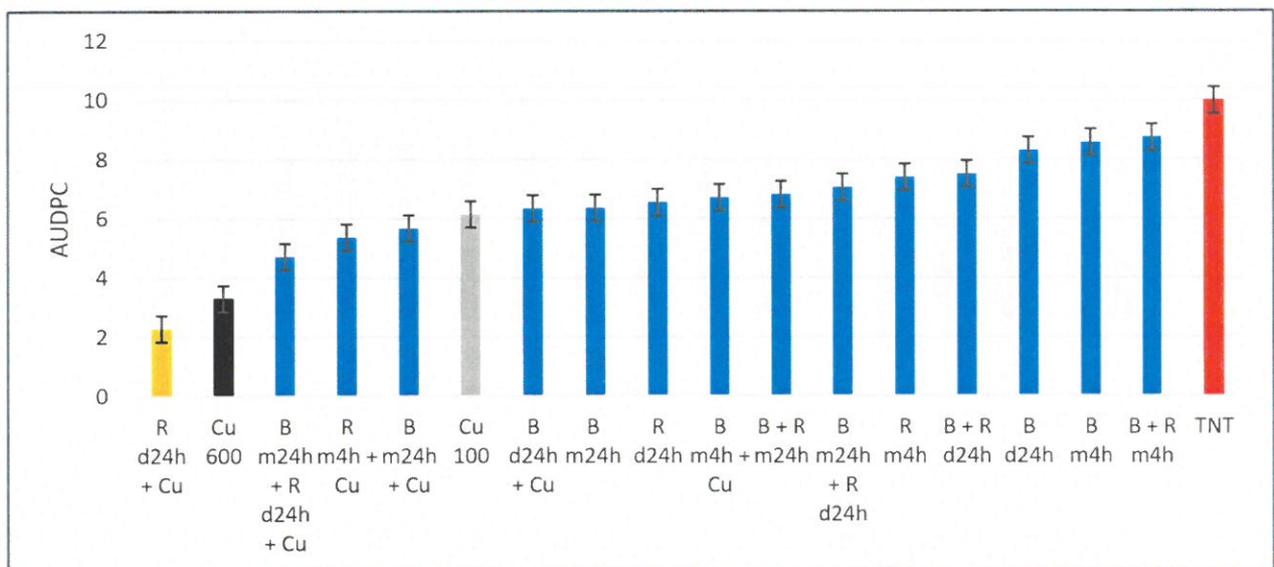


Figure 10 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque du mildiou sur muscat de Hambourg (p -value = 0,086 donc on rejette l'hypothèse « les moyennes sont significativement différentes »)

Comparaison de l'effet du cuivre, des extraits de plante seule et de l'association cuivre-plantes

On cherche ici à savoir s'il existe un effet de synergie plantes-cuivre qui induirait une plus grande efficacité de ce type de traitement par rapport à un traitement à base de plante seule mais aussi par rapport à un traitement à base de 100g/ha de cuivre seul.

Pour cela, on compare tout d'abord les traitements aux extraits de plantes aux mêmes traitements mais additionnés de cuivre, ce qui correspond en fait à une comparaison de la totalité des modalités. Afin de faciliter l'analyse statistique, les résultats des traitements en décoction et des traitements en macération seront étudiés séparément.

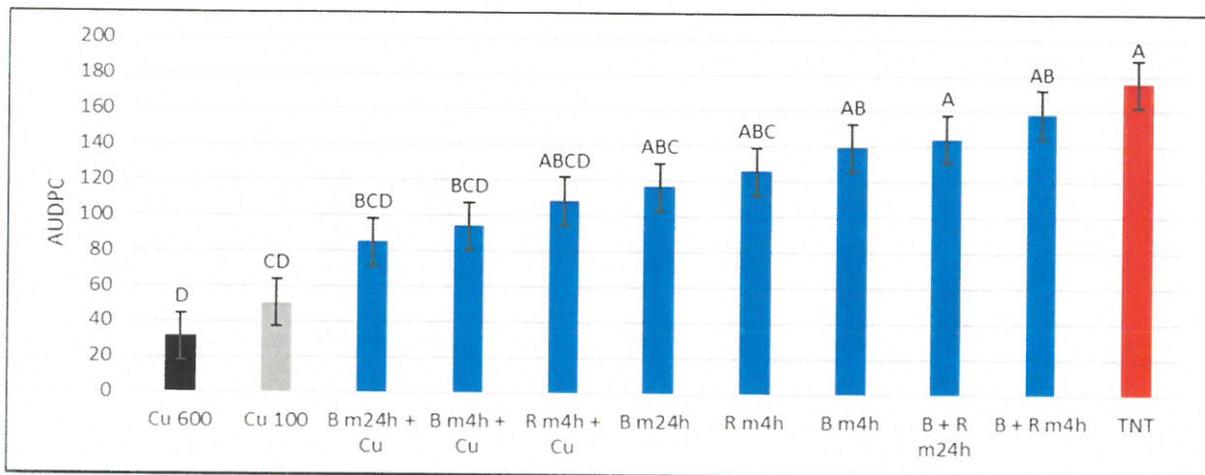


Figure 11 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou pour les extraits en macération (p -value < 0,001)

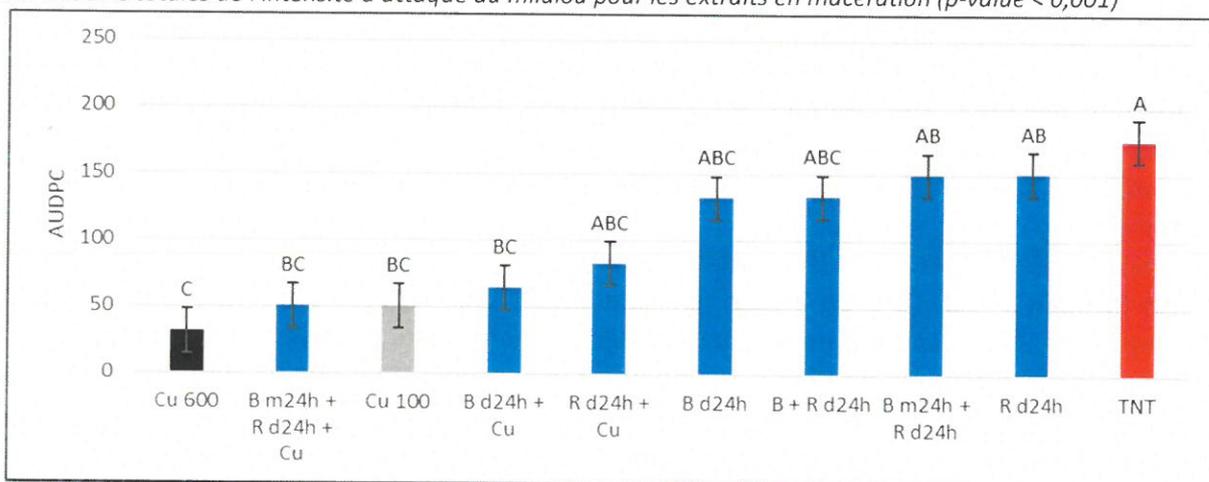


Figure 12 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou pour les extraits en décoction (p -value = 0,001)

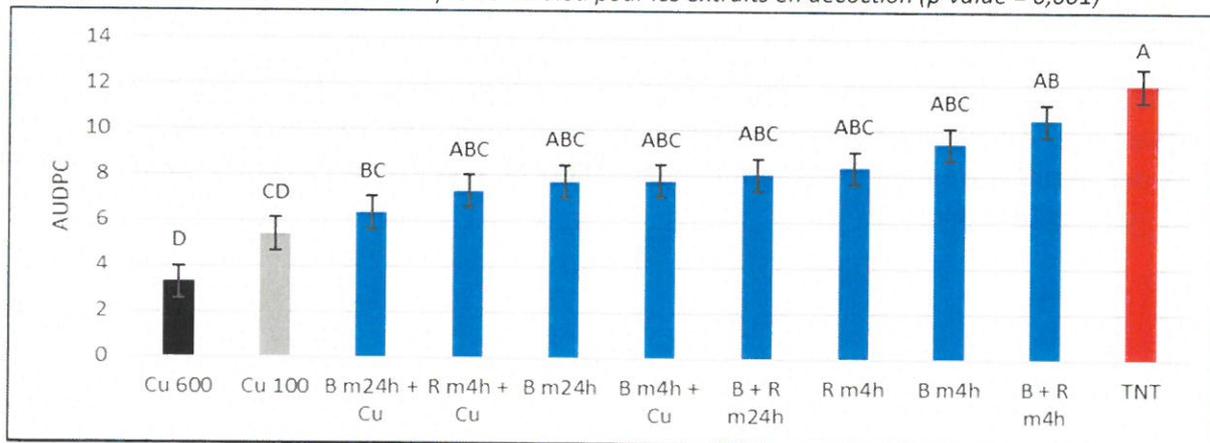


Figure 13 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque du mildiou pour les extraits en macération (p -value < 0,001)

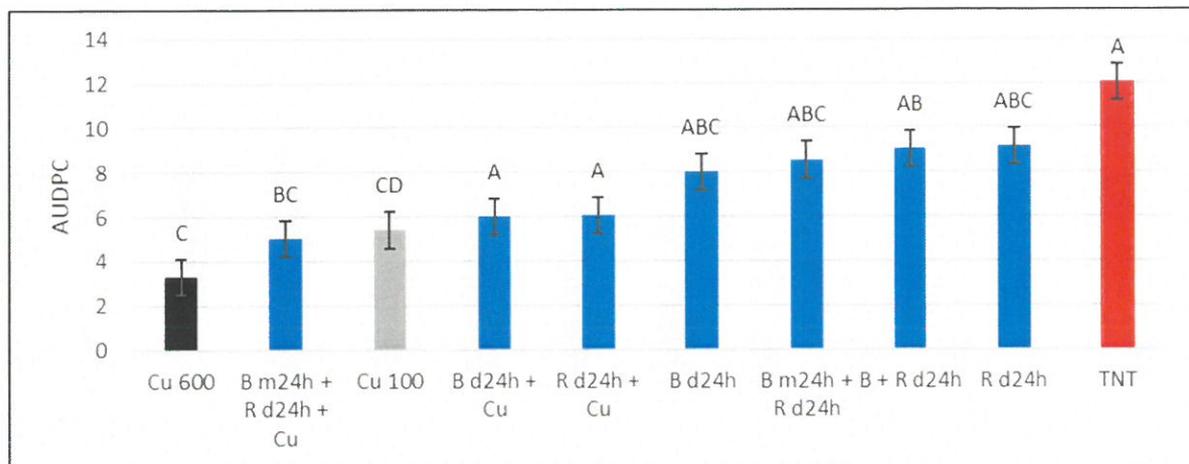


Figure 14 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque du mildiou pour les extraits en décoction (p -value = 0,001)

Il apparaît que les extraits mêlant cuivre et plantes sont toujours plus efficaces que les extraits aux plantes seules (Fig. 11, 12 et 14), sauf dans le cas de la fréquence d'attaque du mildiou où la bourdaine macérée 24h semble légèrement plus efficace que la bourdaine macérée 4h additionnée de cuivre (mais « B m24h » reste moins efficace que « B m24h + Cu ») (Fig. 13). Cependant, l'analyse statistique ne montre pas de significativité de ces différences entre traitements.

Dès lors, si l'on compare tous les traitements à base de cuivre seulement, on se rend compte que seul « B m24h + R d24h + Cu » apparaît légèrement plus efficace que « Cu 100 » en intensité d'attaque (Fig. 15) mais aussi en fréquence (Fig. 16). Cependant, l'analyse statistique des résultats pour l'intensité d'attaque ne révèle pas de différence significative des traitements entre eux. Les modalités « B m24h + R d24h + Cu » et « B d24h + Cu » sont significativement différentes du témoin, mais ne sont pas significativement différentes de « Cu 600 » ou « Cu 100 » (Fig. 15). On ne peut donc pas savoir si c'est l'effet des plantes associées au cuivre qui agit ici ou si c'est le simple effet de la dose de cuivre.

En ce qui concerne les résultats sur la fréquence d'attaque, aucun traitement n'est significativement différent d'un autre non plus, et seul le traitement à base de plantes « B m24h + R d24h + Cu » est significativement différent du témoin (Fig. 16). Toutefois, là aussi cette modalité n'est pas significativement différente des modalités de cuivre seul et l'on ne peut conclure à un effet de synergie plante-cuivre.

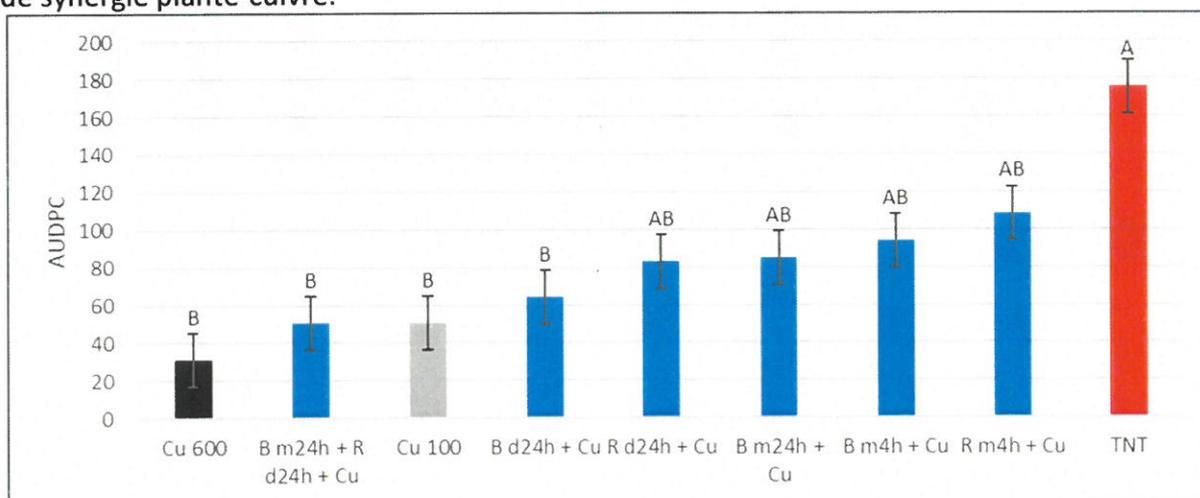


Figure 15 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou pour les extraits à base de cuivre (p -value < 0,001)

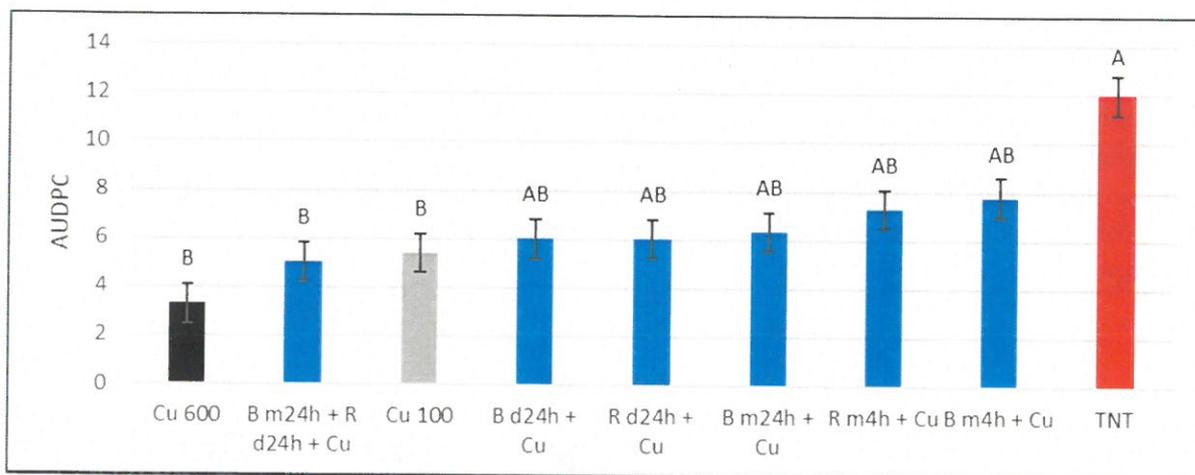


Figure 16 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque du mildiou pour les extraits à base de cuivre (p -value = 0,008)

Comparaison de l'effet des extraits de plante seule et des mélanges

On veut ici déterminer si les extraits à base de mélange de plantes peuvent être plus efficaces que des extraits de plante seule.

Quand on observe les résultats bruts des différentes AUDPC qui nous intéressent ici, on remarque que pour les macérations de 4h sans cuivre, le mélange apparaît moins efficace que les plantes seules puisqu'il est davantage impacté pour ce qui est de l'intensité de l'attaque (Fig. 17) mais aussi de la fréquence (Fig. 18). De plus, la rhubarbe en macération semble plus efficace que la bourdaine (Fig. 17 et Fig. 18). Cependant, les résultats de ces traitements ne sont pas significativement différents les uns des autres. Ils sont seulement significativement différents des traitements cupriques.

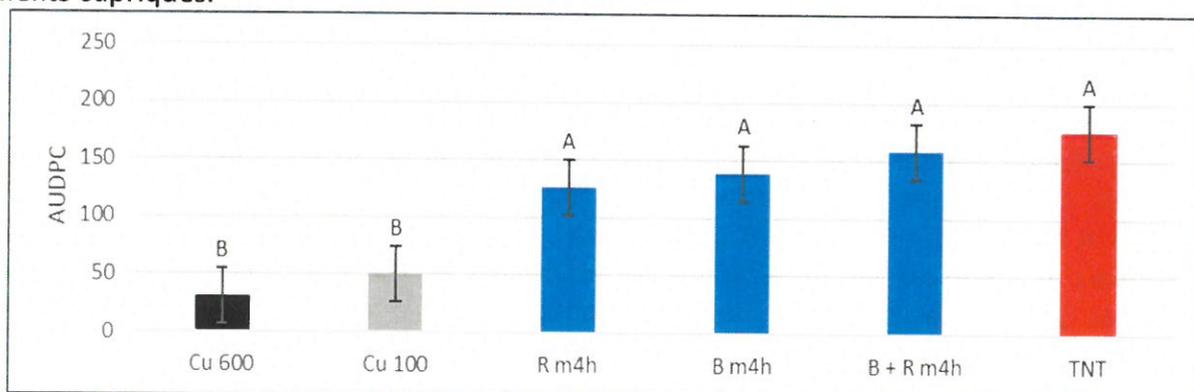


Figure 17 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque sur les traitements en macération 4h sans cuivre (p -value < 0,001)

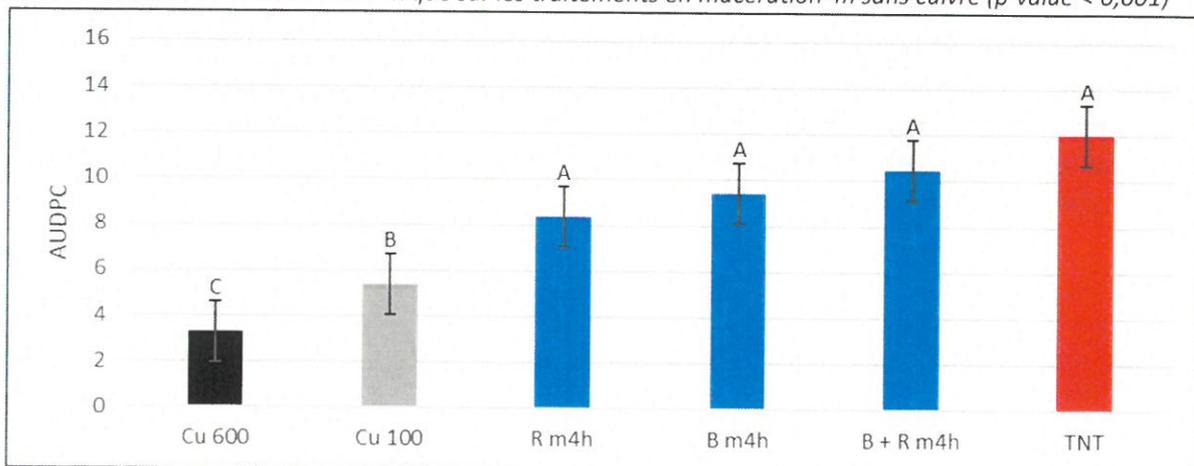


Figure 18 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque sur les traitements en macération 4h sans cuivre (p -value < 0,001)

Si l'on s'intéresse aux décoctions de 24h, il semble que la décoction de bourdaine soit la plus efficace, et celle de rhubarbe la moins efficace. L'efficacité du mélange se situe entre celle des deux extraits seuls (Fig. 19 et 20). Néanmoins, ces différences apparaissent très légères et ne sont pas significatives d'après le test de Newman-Keuls.

Il est à noter que la macération apparaît plus efficace pour extraire les anthraquinones de la rhubarbe, et la décoction plus efficace sur la bourdaine (mais ce résultat n'est pas confirmé par la statistique).

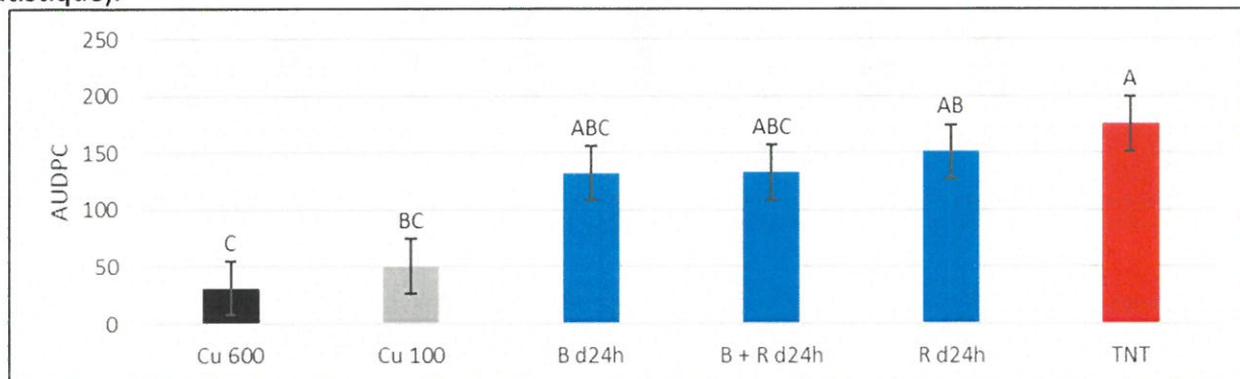


Figure 19 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque sur les traitements en décoction 24h sans cuivre (p -value = 0,005)

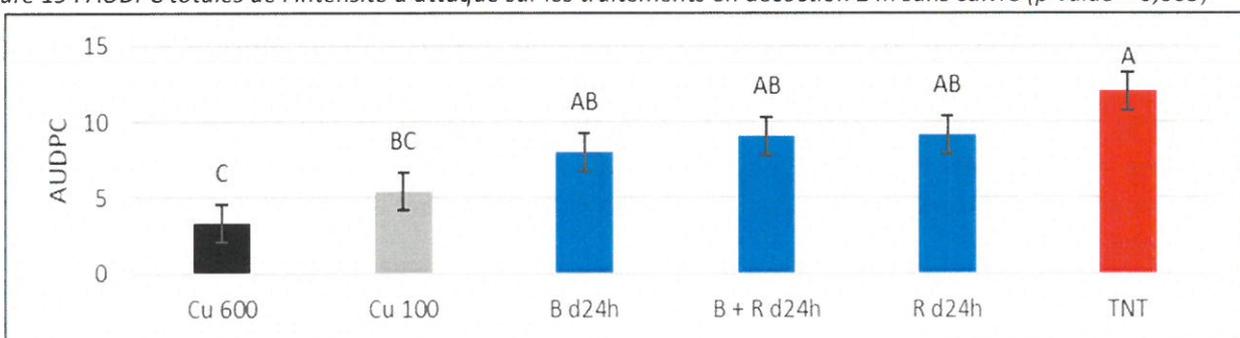


Figure 20 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque sur les traitements en décoction 24h sans cuivre (p -value = 0,001)

Si les mélanges réalisés pendant le processus d'extraction ne se révèlent pas significativement efficaces, il reste à étudier l'efficacité des mélanges réalisés après le processus d'extraction (« B m24h + R d24h » et « B m24h + R d24h + Cu »). Ces mélanges étaient, en effet, supposés être davantage efficace car les macérations de bourdaine et les décoctions de rhubarbe étaient apparues plus efficaces l'année dernière (contrairement à ce qui a été souligné cidessus). Cependant, on voit sur les figures 21 et 22 que ce mélange ne semble pas plus efficace que la bourdaine en macération, même s'il paraît plus efficace que la rhubarbe en décoction. Après analyse statistique, ces différences ne sont pas significatives.

Néanmoins, si l'on se penche sur ce même mélange mais additionné de cuivre, il semble alors plus efficace que les plantes seules et même que le traitement de cuivre 100g/ha seul (Fig. 23 et 24), mais là encore, pas de différence significative.

Les mélanges n'apparaissent donc pas plus efficaces que les extraits de plante seule, même pour ce qui est du mélange a posteriori.

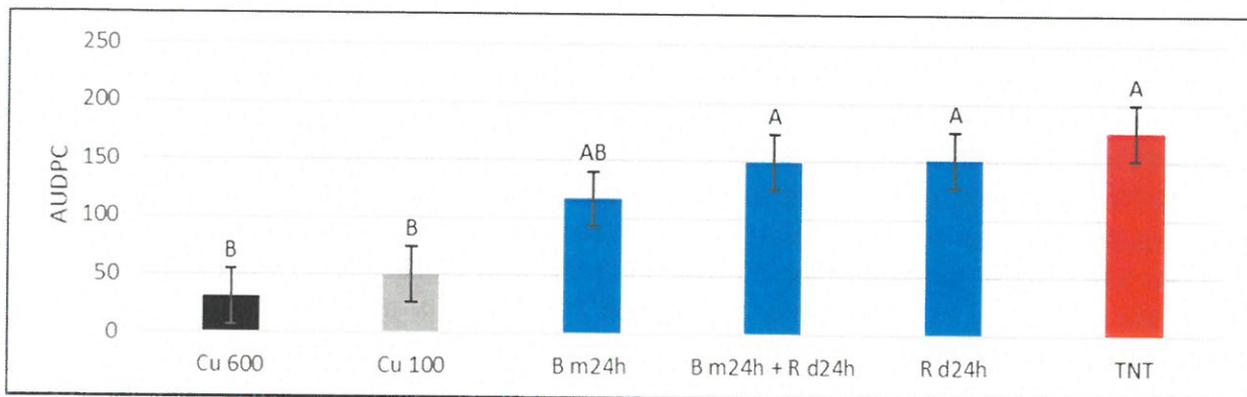


Figure 21 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou sur des ceps traités avec les modalités "B m24h + R d24h", "R d24h" et "B m24h" (p -value = 0,002)

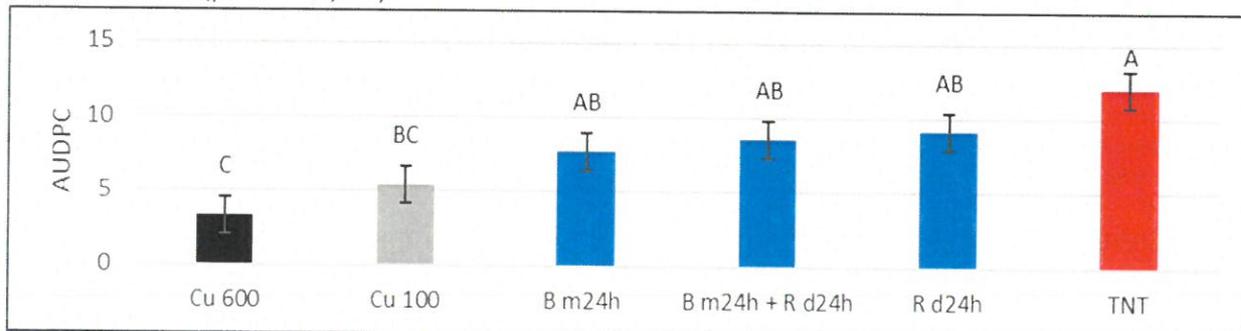


Figure 22 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque du mildiou sur des ceps traités avec les modalités "B m24h + R d24h", "R d24h" et "B m24h" (p -value = 0,001)

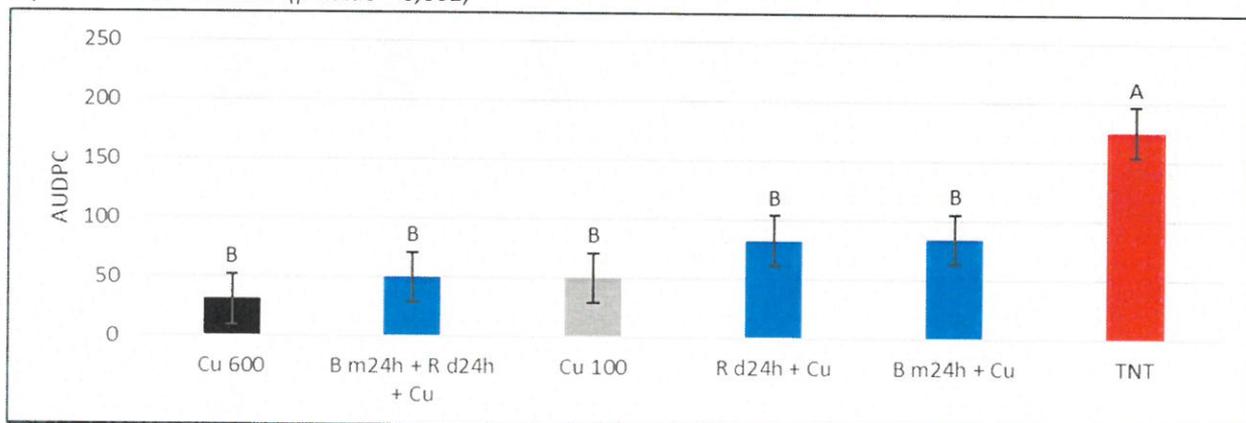


Figure 23 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou sur des ceps traités avec les modalités "B m24h + R d24h + Cu", "R d24h + Cu" et "B m24h + Cu" (p -value = 0,001)

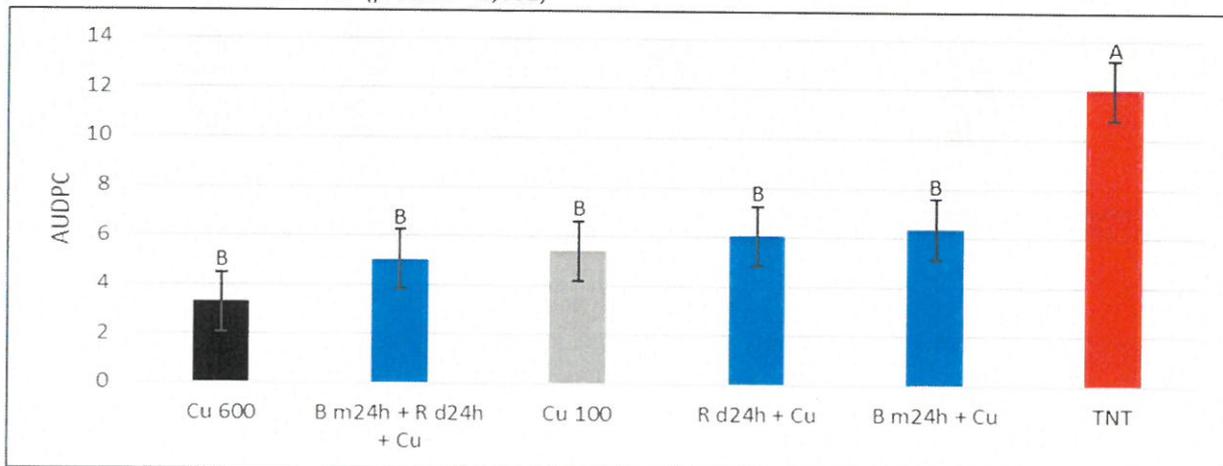


Figure 24 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque du mildiou sur des ceps traités avec les modalités "B m24h + R d24h + Cu", "R d24h + Cu" et "B m24h + Cu" (p -value = 0,003)

Comparaison de l'effet des décoctions et des macérations

Afin de déterminer si l'une ou l'autre méthode d'extraction est plus efficace, on compare les traitements à base de bourdaine et ceux à base de mélange des plantes qui ont subi un processus d'extraction de 24h afin de ne pas biaiser le résultat par le temps d'extraction. En ce qui concerne la rhubarbe, nous avons effectué des extractions avec des durées différentes. Nous sommes donc contraints de comparer ces traitements avec ce biais. Quand on observe les figures 25 à 28, on se rend très vite compte qu'aucun type d'extraction n'est plus efficace que l'autre puisque tantôt la macération se trouve avant la décoction, tantôt l'inverse : la décoction de rhubarbe en 24h additionnée de cuivre paraît plus efficace que la macération de rhubarbe en 4h additionnée de cuivre, mais c'est l'inverse qui apparaît lorsqu'on retire le cuivre (Fig. 25 et 26). Ce schéma est le même pour la bourdaine : en décoction 24h avec du cuivre elle semble plus efficace qu'en macération 24h avec du cuivre, mais quand on retire le cuivre c'est l'inverse (Fig. 27 et 28). De plus, après analyse statistique, aucun de ces traitements n'est significativement différent d'un autre.

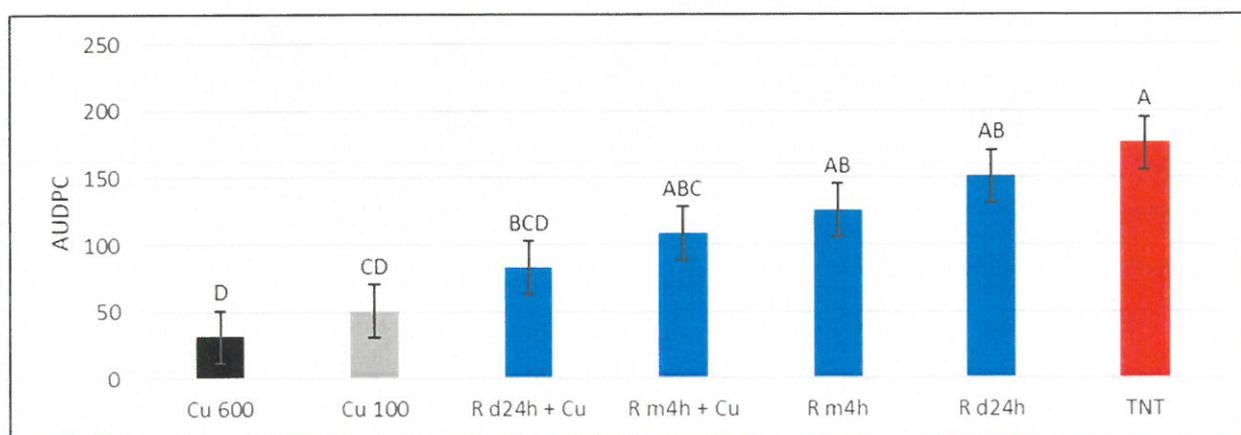


Figure 25 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou sur des traitements à base de rhubarbe (p -value < 0,001)

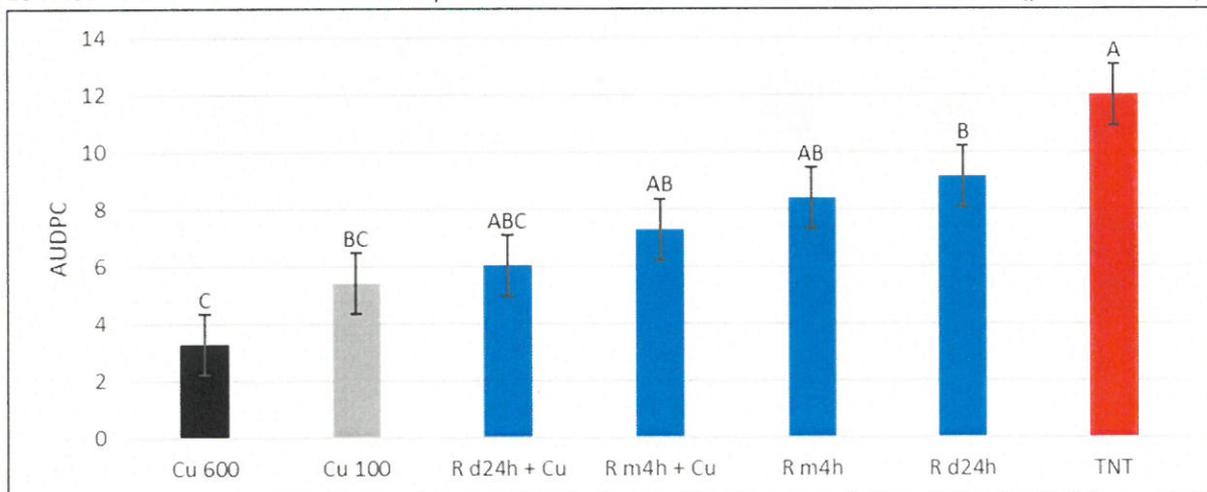


Figure 26 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque du mildiou sur des traitements à base de rhubarbe (p -value = 0,002)

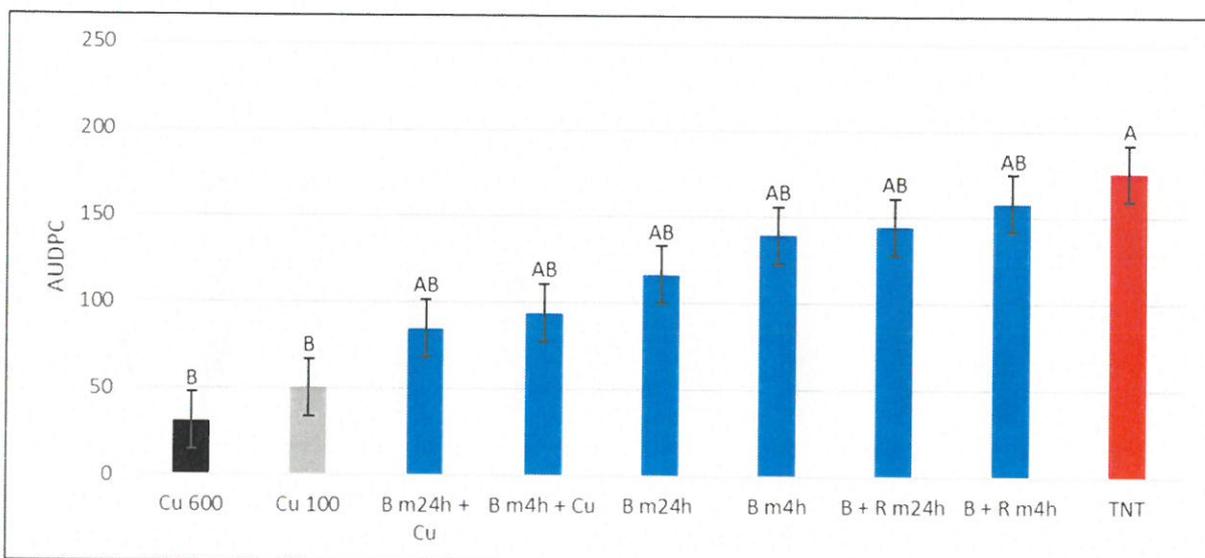


Figure 27 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou sur des traitements à base de bourdaine (p -value = 0,004)

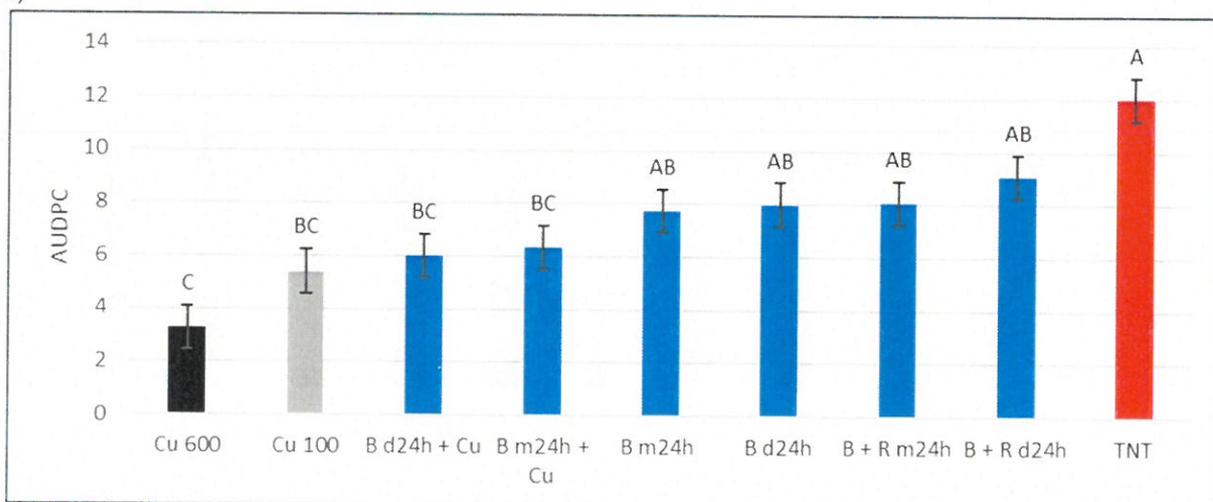


Figure 28 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque du mildiou sur des traitements à base de bourdaine (p -value < 0,001)

Comparaison de l'effet de la bourdaine et de la rhubarbe

Une des deux plantes est-elle plus efficace que l'autre ? Pour s'en rendre compte, on étudie les décoctions de 24h et les macérations de 4h, seules modalités d'extraction impliquant les deux plantes séparément, qui permettent ainsi la comparaison de l'efficacité de ces deux plantes. Pour ce qui est de l'intensité d'attaque, il semble que les modalités à base de bourdaine en décoction 24h avec et sans cuivre, en macération 4h sans cuivre soient plus efficaces que les mêmes modalités à base de rhubarbe (Fig. 29). Cependant, la rhubarbe en macération 4h apparaît légèrement plus efficace que la bourdaine en macération 4h (Fig. 29). En ce qui concerne la fréquence d'attaque, les résultats sont davantage partagés puisque les décoctions de bourdaine en 24h avec et sans cuivre ont l'air plus efficaces que celles de rhubarbe, mais les macérations de rhubarbe en 4h avec et sans cuivre apparaissent plus efficaces que celle de bourdaine (Fig. 30). Il est donc difficile de distinguer une réelle différence d'efficacité entre les deux plantes, d'autant plus que ces résultats ne sont pas significatifs d'après le test de Newman-Keuls.

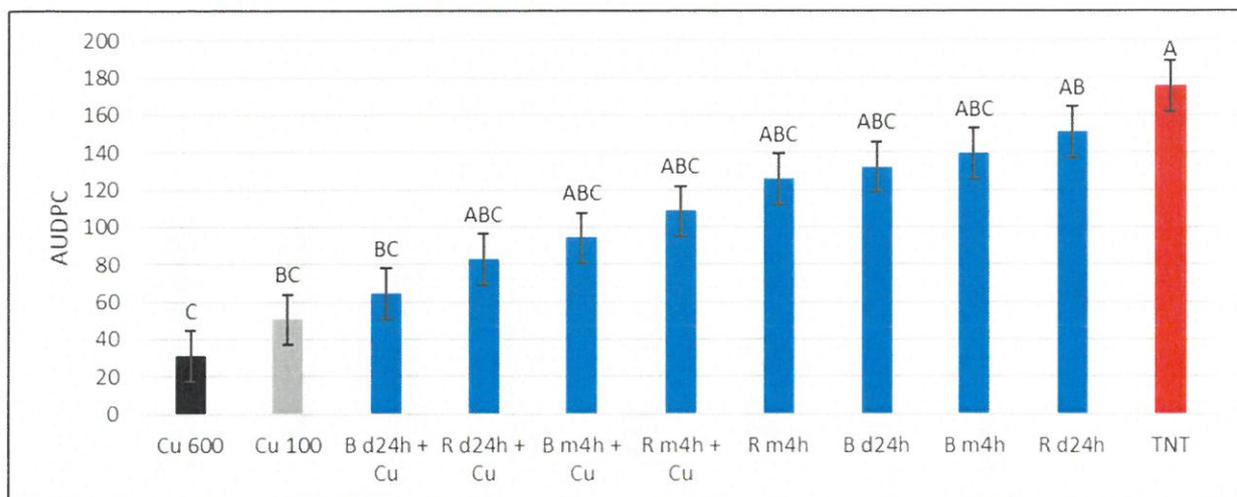


Figure 29 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou sur les macérations de 4h et les décoctions de 24h (p -value = 0,001)

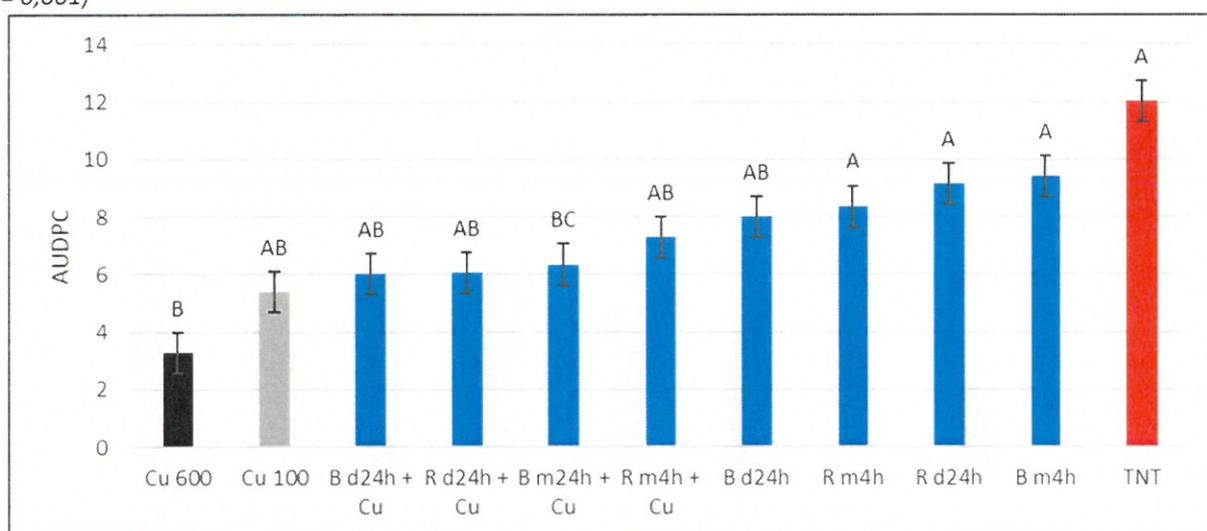


Figure 30 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque du mildiou sur les macérations de 4h et les décoctions de 24h (p -value = 0,004)

Comparaison des temps d'extraction

On souhaite ici déterminer si un temps d'extraction long (24h) permet d'extraire davantage de molécules élicitrices qu'un temps court (4h). Pour ce qui est de l'intensité, on remarque que « B m24h + Cu » est plus efficace que « B m4h + Cu », « B m24h » est plus efficace que « B m4h » et « B + R m24h » est plus efficace que « B + R m4h » (Fig. 31). C'est exactement le même schéma pour la fréquence d'attaque (Fig. 32). Les temps plus longs d'extraction apparaissent donc plus efficaces. Néanmoins, encore une fois ces différences ne sont pas significatives lors du test de Newman-Keuls.

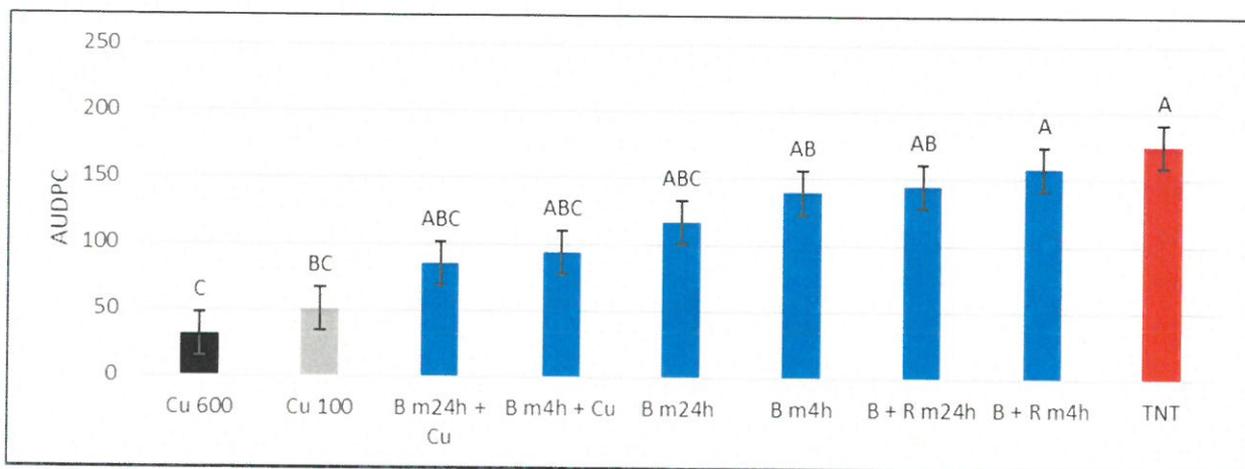


Figure 31 : AUDPC totales de l'intensité d'attaque du mildiou sur des ceps traités à base de macération de bourdaine et de mélange bourdaine-rhubarbe (p -value < 0,001)

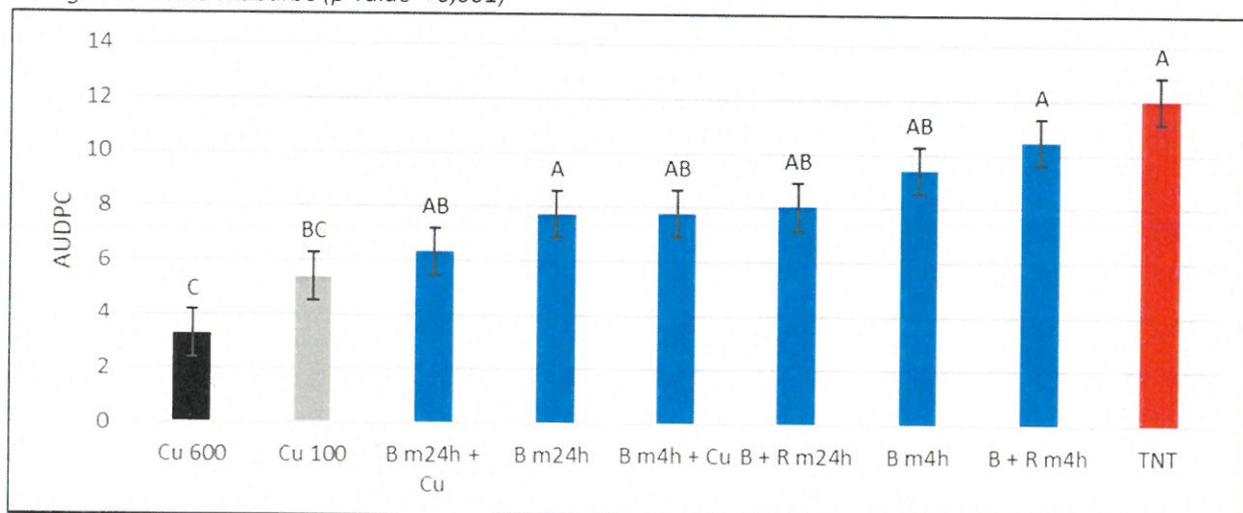


Figure 32 : AUDPC totales de la fréquence d'attaque du mildiou sur des ceps traités à base de macération de bourdaine et de mélange bourdaine-rhubarbe (p -value < 0,001)

Relation intensité-fréquence

Enfin, on s'intéresse à la relation intensité-fréquence afin de déterminer si l'action élicitrice des traitements provoquerait une surréaction de la plante lorsqu'elle est attaquée par *Plasmopara viticola*, ce qui se traduirait dans nos données par une fréquence qui augmente plus vite que l'intensité. En étudiant les valeurs moyennes des intensités et des fréquences par journée de comptage et par bloc (tous traitements confondus), il est apparu que les courbes de tendance des blocs 1, 2 et 3 progressaient à un rythme différent de celles des blocs 4 et 5. Nous les avons donc moyennés et il est apparu que pour les blocs 4 et 5 (muscat de Hambourg) la hausse dans les fréquences était plus rapide que pour les blocs 1 à 3 (grenache blanc) (Fig. 33 et 34). De plus, pour les blocs 4 et 5, les points sont davantage groupés vers les valeurs faibles de fréquence et d'intensité (Fig. 34). Cela pourrait justement traduire une réaction de la vigne qui a bloqué la progression du mildiou. Cette réaction semble différente de celle des blocs 1, 2 et 3 (Fig. 33), ce qui peut encore être interprété comme une réponse différente des deux génotypes sélectionnés dans le cadre de cet essai.

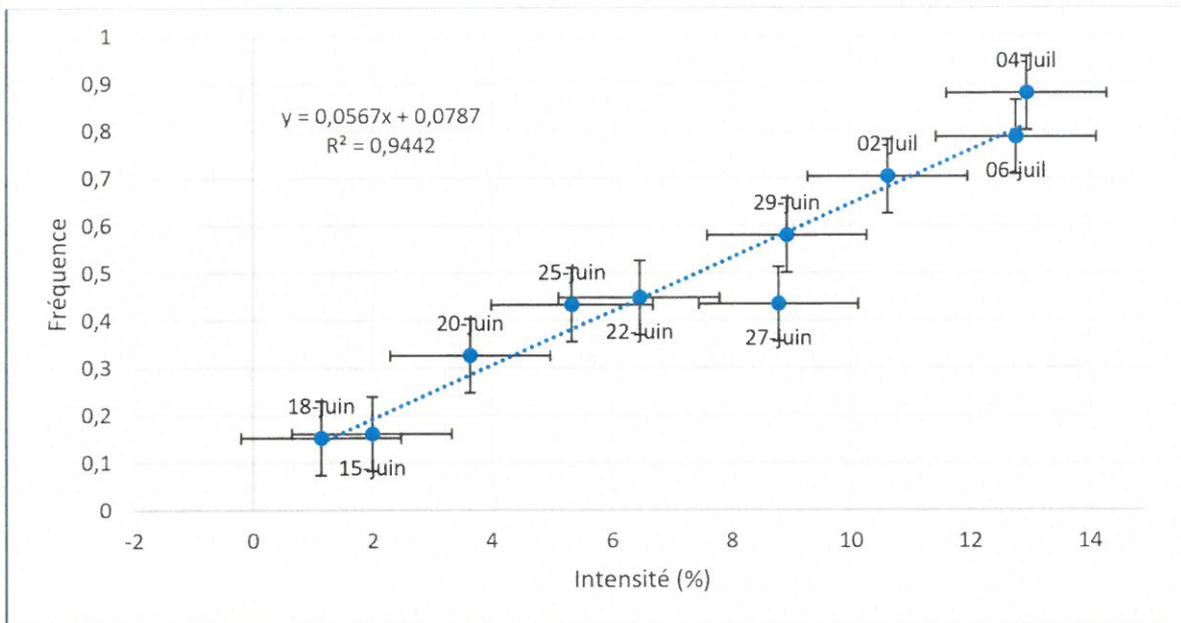


Figure 33 : Rapport intensité/fréquence moyen des blocs 1 à 3

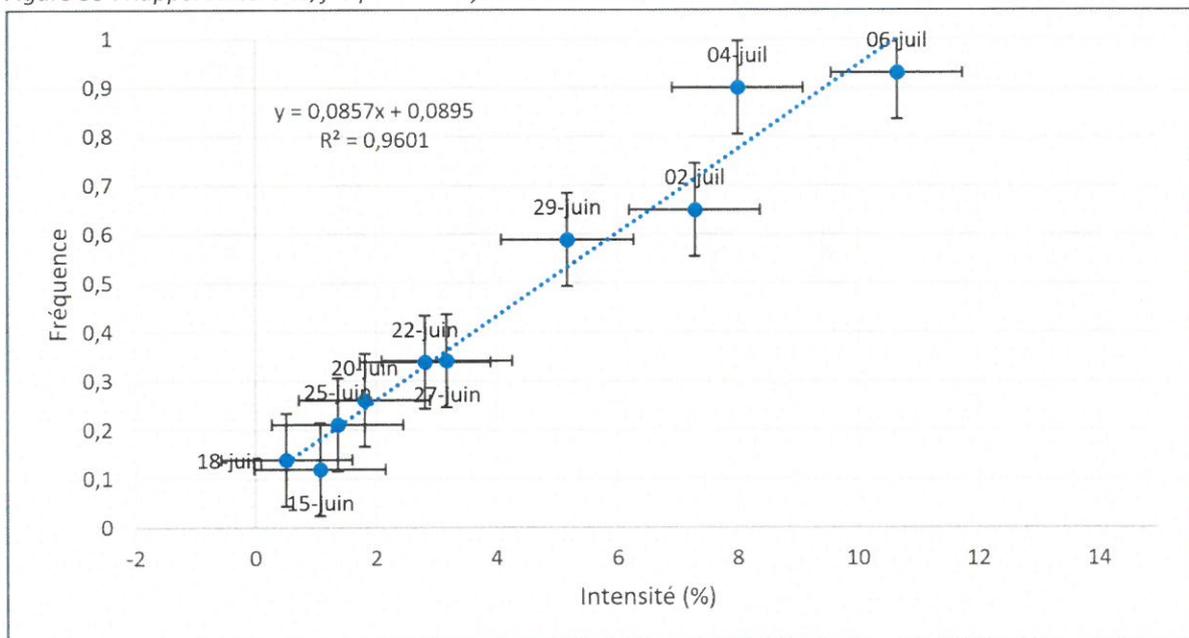


Figure 34 : Rapport intensité/fréquence moyen des blocs 4 et 5

Discussion

Notre étude portait donc sur l'évaluation de l'efficacité de diverses infusions à base de bourdaine et de rhubarbe supposées inhiber le développement du mildiou de la vigne. Ces plantes avaient effectivement été présentées comme des sources importantes d'anthraquinones dans plusieurs études (Gindro *et al.*, 2007 ; Kast et Bleyer, 2006 ; Gomez *et al.*, n.d.). Ces études ne précisait cependant pas les méthodes permettant d'extraire au mieux ces molécules. Dans un souci de reproductibilité de l'extraction de ces molécules par les viticulteurs, nous nous sommes intéressés aux infusions et avons mis plusieurs hypothèses en avant concernant les modalités permettant à ces infusions d'être efficaces. Malheureusement, la statistique n'a pas permis de valider ces hypothèses. On a pu néanmoins voir que certaines modalités permettaient probablement d'extraire

davantage d'antraquinones que d'autres, telles qu'un temps d'extraction long ou le fait d'infuser les plantes seules (détails en conclusion).

Des essais menés au GRAB lors des années précédentes ont permis de déterminer une efficacité significative de ces deux plantes (rapports non publiés). Ainsi, il est intéressant de se pencher sur les limites rencontrées cette année qui ont pu induire cette non significativité de nos résultats. Plusieurs éléments peuvent expliquer cela.

On peut notamment évoquer le fait que nos données ont pu être biaisées lors des relevés d'attaque de mildiou car nous étions la plupart du temps deux observateurs/trices, ce qui peut impliquer des évaluations différentes des attaques de mildiou qui se répercutent sur nos résultats. Il aurait été judicieux de n'employer qu'une seule et même personne tout au long des mesures, mais cela aurait pris beaucoup de temps pour cette personne, et par manque de temps justement, il a été impossible de mettre cela en place.

Soulignons aussi que du fait de la proximité des ceps entre eux sous l'ombrière, les pulvérisations de traitement destinés à une unité expérimentale ont éventuellement pu se retrouver sur les unités voisines. Des espacements plus grands auraient été préférables mais le manque de place sous l'ombrière et sous la rampe d'aspersion a empêché cela.

Les pluies s'étant abattues sur Avignon tout le mois de mai, le mildiou s'est très rapidement développé dans la région. Nous en avons ainsi retrouvé sur un de nos ceps avant l'inoculation artificielle de *Plasmopara viticola*. Nous avons immédiatement retiré le cep de l'essai, mais il n'est pas impossible que d'autres ceps aient été contaminés sans pour autant en avoir les symptômes, la période d'incubation s'étendant jusqu'à 10 jours (Dubos B., 1999). Si c'est le cas, l'efficacité des traitements a pu apparaître moins efficace que lors d'une application avant attaque du mildiou, même si ces applications ont probablement permis de ralentir le développement du mildiou dans ce cas.

Enfin, à cause de la météo défavorable, les traitements ont dû être conservés une nuit au réfrigérateur avant d'être appliqués. On peut alors s'interroger sur une possible attaque bactérienne des extraits aqueux durant la nuit qui pourrait réduire l'efficacité de nos traitements. Ces limites peuvent donc expliquer la non-significativité des résultats de cette année. On ne peut donc pas conclure à la non-efficacité de ces extraits, on ne peut seulement pas affirmer qu'ils sont efficaces au regard des analyses de données.

On peut aussi se pencher sur la question de l'amélioration de l'extraction qui permettrait d'obtenir une concentration en anthraquinones plus élevée. On pourrait ainsi utiliser d'autres méthodes plus efficaces que les infusions. En effet, les extractions utilisant l'éthanol, le méthanol, le CO₂, les ondes ultrasoniques ou encore les micro-ondes semblent plutôt efficaces pour extraire les anthraquinones (Genovese et al. 2010 ; Duval et al., 2016). Cependant, rappelons que l'on cherche à ce que nos manipulations soient facilement reproductibles par les producteurs. Ces techniques nécessitant du matériel et des coûts supplémentaires sont donc exclues des recherches du GRAB. De même, il serait intéressant d'analyser la composition en anthraquinones des extraits. D'après Godard et al. (2009), l'émodine serait le plus efficace pour activer la production de phytoalexines stilbéniques. Trouver les modalités permettant d'extraire celui-ci en particulier pourrait permettre une plus grande efficacité des traitements.

On l'a noté, lors de nos applications de traitements, nous sommes allés jusqu'à la limite du ruissellement sur les feuilles. Cela correspond à de très importantes applications en plein champs qui seraient trop coûteuses. Il serait donc intéressant d'étudier les résultats qui apparaîtraient avec des applications plus faibles, mais aussi avec des essais en plein champ. En effet, ici on s'intéresse à la réaction de vignes qui sont en pot, dans un milieu semi-contrôlé.

Il serait pertinent de voir comment les conditions climatiques ou pédologiques peuvent influencer ces réactions. D'autant plus que de tels essais ont déjà été menés par ADABio (réseau pour l'agriculture biologique en Auvergne-Rhône-Alpes) dans un vignoble de Chignin

(en Savoie) et ont montré une efficacité significative de la bourdaine mêlée à du cuivre (Conférence Tech&Bio, n.d.). L'expérimentation en plein champs est donc à poursuivre. Enfin, on l'a vu, les cépages semblent réagir de manière différente aux traitements, même si ces différences n'apparaissent pas significatives. Une étude approfondie de ces réactions différentes en fonction du génotype pourrait être intéressante. Certains traitements seraient peut-être à préconiser pour un génotype précis et non pour un autre. Il reste donc encore des questions à élucider.

Conclusion

Notre étude a pu mettre en avant plusieurs choses, malgré la non-significativité de nombreux résultats. On peut dans un premier temps souligner la constatation d'une réponse différente au mildiou de la part des deux cépages utilisés avec une probable réaction plus rapide des mécanismes de défense du muscat de Hambourg par rapport au grenache blanc. Ainsi, il pourrait être intéressant par la suite de tout de même étudier séparément les réponses des deux cépages aux traitements. Nous avons aussi pu mettre en lumière que le temps d'extraction semblait être un facteur jouant sur l'efficacité : il semble qu'un temps de contact plus long entre l'eau et les plantes (24h) permette d'extraire davantage de molécules élicitrices qu'un temps court (4h). Le fait d'extraire les plantes seules plutôt que lors d'une infusion dans laquelle elles sont mêlées semble permettre une meilleure efficacité de ces extraits. En revanche, mélanger les deux plantes a posteriori ne semble pas être un problème étant donné que ce type de mélange, lorsqu'il est associé à du cuivre, apparaît plutôt efficace par rapport aux autres. Il ne paraît pas qu'une des plantes soit plus efficace que l'autre (bourdaine ou rhubarbe), ni qu'une des méthodes d'extraction le soit plus que l'autre (décoction ou macération). Finalement, le seul facteur qui a une influence significative est l'ajout de 100g/ha de cuivre dans les traitements. Certains traitements à base de cuivre sont effectivement significativement plus efficaces que le non-traitement. Nous ne pouvons donc pas conclure que ces extraits de bourdaine et rhubarbe soient efficaces pour lutter contre le mildiou de la vigne. En revanche, on ne peut pas non plus conclure qu'ils soient inefficaces. Il s'agirait donc de reprendre les modalités qui semblent avoir marché lors de cette étude et les tester à nouveau en essayant de supprimer les biais rencontrés lors de l'essai de cette année.

Avec la baisse de la limite des doses de cuivre autorisées en viticulture qui est de plus en plus évoquée, notamment par le Ministre de l'Agriculture français (Abellan, 2018), la recherche d'alternatives au cuivre est toujours une nécessité. Cette année 2018 en est la preuve même, puisque la pression mildiou a été particulièrement forte, notamment dans le Sud-Est qui est généralement plutôt épargnée par cette maladie grâce à son climat (Montaignac, 2018 ; Stef, 2018). Ainsi, des viticulteurs AB de la région PACA rencontrés lors d'une réunion concernant la gestion de la pression mildiou ont expliqué avoir appliqué des doses de cuivre bien plus fortes qu'à l'ordinaire, avoisinant les 6kg/ha/an réglementaires, et redoutent désormais la répétition de ce type d'épisode en raison du changement climatique. Les vignobles plus au Nord du pays, en Champagne notamment, dépassent déjà régulièrement la limite des 6kg/ha/an lors d'années à forte pression mildiou (Berthier et Chovelon, 2013). Il est donc nécessaire et urgent de continuer à étudier les produits complémentaires au cuivre, si ce n'est alternatifs, pour contrôler le mildiou de la vigne.

Bibliographie

- Abellan A. 2018. « La France prend la défense du cuivre... à 4 kg/ha ». Vitisphere. La Vigne.
- Agence Bio, n.d. « L'agriculture biologique, un accélérateur économique, à la résonance sociale et sociétale ». Dossier de presse de l'Agence pour le Développement et la Promotion de l'Agriculture Biologique. 44 p.
- Agrileader, n.d. « Champ Flo Ampli ». Fiche produit. Disponible sur : <https://www.agrileader.fr/fongicides/1267-0399100-champ-flo-ampli.html> (consulté le 16/07/2018)
- Andrивon D., Bardin M., Bertrand C., Brun L., Daire X., Fabre F., Gary C., Montarry J., Nicot P., Reignault P., Tamm L., Savini I. 2017. « Peut-on se passer du cuivre en protection des cultures biologiques ? Synthèse du rapport d'expertise scientifique collective ». INRA, 66 p.
- Ambiaud E. et Grosman J. 2012. « Pratiques phytosanitaires dans la viticulture en 2010 ». Agreste Primeur, numéro 289. 8 p.
- Berthier C. et Chovelon M. 2013. « Argumentaire pour le maintien d'une dose efficace de cuivre en viticulture ». IFV et ITAB, 30 p.
- Blancard D. 2017. « Mildiou (*Plasmopara viticola*) ». Disponible sur : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/6094/Vigne-Mildiou-Plasmopara-viticola> (consulté le 15/05/2018)
- Conférence Tech&Bio, n.d. « Le besoin d'alternatives au cuivre ».
- Dubos B. 1999. « Les maladies cryptogamiques de la vigne : champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne ». Ed. Féret, Bordeaux. 174 p.
- Duval, Johanna, Virginie Pecher, Marion Pujol, et Eric Lesellier. 2016. « Research Advances for the Extraction, Analysis and Uses of Anthraquinones: A Review ». *Industrial Crops and Products* 94 (décembre): 812-33.
- Genovese S., Tammaro F., L. Menghini, G. Carlucci, F. Epifano, et M. Locatelli. 2010. « Comparison of Three Different Extraction Methods and HPLC Determination of the Anthraquinones Aloe-Emodine, Emodine, Rheine, Chrysophanol and Physcione in the Bark of *Rhamnus Alpinus* L. (Rhamnaceae) ». *Phytochemical Analysis* 21 (3): 261-67.
- Gindro K., Godard S., De Groote I., Viret O. 2007. « Peut-on stimuler les mécanismes de défense de la vigne? ». *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* Vol. 39 (6): 377-383
- Godard S., Slacanin I., Viret O., et Gindro K. 2009. « Induction of Defence Mechanisms in Grapevine Leaves by Emodin- and Anthraquinone-Rich Plant Extracts and Their Conferred Resistance to Downy Mildew ». *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (9) pp. 827-837.
- Gomez C. 2009. « Bilan du projet européen REPCO 2004-2007 : alternatives au cuivre dans la maîtrise du mildiou de la vigne ». *Alter agri* n°94, p. 15-17.
- Gomez C., Parveaud C-E., Chovelon M., Furet A., Bidaut F. et Aveline N., n.d. « Evaluation de solutions alternatives dans la maîtrise du mildiou de la vigne afin de réduire l'utilisation du cuivre : synthèse de 3 années d'essai sur 5 sites en France ». GRAB, ADABio, CA71, IFV. Journées substances naturelles en protection des cultures : réglementation, expérimentation, usage. ITAB et GRAB.
- Institut Français de la Vigne et du Vin, n.d. « La viticulture biologique ». Disponible sur :

<https://www.vignevin-sudouest.com/publications/fiches-pratiques/viticulturebiologique.php#ancre6> (consulté le 16/07/2018)

ITAB. 2009. « Usage du cuivre pour la production de vins, fruits et légumes biologiques ». Dossier réalisé par l'Institut Technique de l'Agriculture Biologique. 122 p.

Kast W. K. et Bleyer K. 2006. « Effects of plant extracts on downy mildew of vine ». Integrated Protection in Viticulture. IOBC/wprs Bulletin Vol. 29(11) pp. 37-40

Maleš, Željko, Dario Kremer, Zita Randić, Marko Randić, Kroata Pilepić, et Mirza Bojić. 2010. « Quantitative Analysis of Glucofrangulins and Phenolic Compounds in Croatian Rhamnus and Frangula Species ». *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 52 (2).

Montaignac H. 2018. « Attaque virulente de mildiou dans le Gard ». Vitisphere. La Vigne.

Représentation permanente de la France au sein de l'Union Européenne. 2016. « L'agriculture française en quelques chiffres ». Disponible sur : <https://ue.delegfrance.org/l-agriculturefrancaise-en-3038> (consulté le 22/06/2018)

Stef C. 2018. « L'explosion du mildiou provoque déjà des pertes de récolte ». Vitisphere. La Vigne.

Tarico J. et Chovelon M. 2016. « Essai de traitements alternatifs au cuivre en viticulture biologique pour lutter contre le mildiou de la vigne en conditions contrôlées ». GRAB. Non publié. 40 p.

The American Phytopathological Society, n.d. « Calculating the area under the disease progress curve to quantify disease progress ». Disponible sur :

<http://www.apsnet.org/EDCENTER/ADVANCED/TOPICS/ECOLOGIANDEPIDEMIOLOGYINR/DISEASEPROGRESS/Pages/AUDPC.aspx> (consulté le 10/07/2018)

Viret O. 2009. « La recherche travaille pour une viticulture écologique ». Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. Vol. 41 (2): 85

Viret O., Siegfried W., Bloesch B. 2007. « Adaptation du dosage des fongicides aux surfaces foliaires ». Euroviti. Cahier technique. pp. 153-155

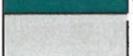
Annexes

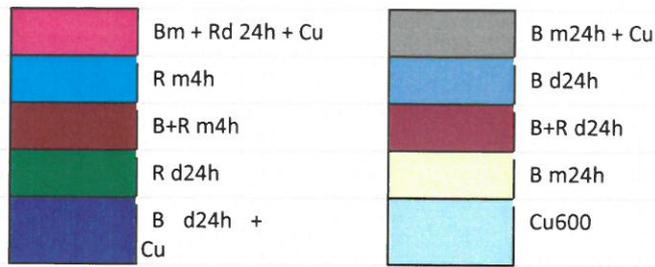
Annexe 1 - Plan du dispositif expérimental

B = bourdaine ; R = rhubarbe ; m = macération ; d = décoction ; 4h = 4 heures ; 24h = 24 heures ;
Cu = cuivre ; b1, b2, (...) = bloc 1, bloc 2, (...)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
L1	117 Bm + Rd 24h b1	207 R m4h + Cu b2	317 Bm + Rd 24h b3	405 B m4h + Cu b4	516 B+R d24h b5	614 R d24h b6
L2	104 B m4h b1	206 R m4h b2	302 Cu 100 b3	410 B m24h + Cu b4	509 B m24h b5	607 R m4h + Cu b6
L3	111 B+R m24h b1	217 Bm + Rd 24h b2	303 Cu600 b3	408 B+R m4h b4	505 B m4h + Cu b5	615 R d24h + Cu b6
L4	101 Témoïn b1	218 Bm + Rd 24h + Cu b2	301 Témoïn b3	402 Cu 100 b4	511 B+R m24h b5	616 B+R d24h b6
L5	118 Bm + Rd 24h + Cu b1	216 B+R d24h b2	318 Bm + Rd 24h + Cu b3	403 Cu600 b4	504 B m4h b5	606 R m4h b6
L6	106 R m4h b1	215 R d24h + Cu b2	312 B d24h b3	417 Bm + Rd 24h b4	518 Bm + Rd 24h + Cu b5	617 Bm + Rd 24h b6
L7	108 B+R m4h b1	201 Témoïn b2	313 B d24h + Cu b3	416 B+R d24h b4	514 R d24h b5	601 Témoïn b6
L8	114 R d24h b1	210 B m24h + Cu b2	316 B+R d24h b3	407 R m4h + Cu b4	507 R m4h + Cu b5	613 B d24h + Cu b6
L9	113 B d24h + Cu b1	212 B d24h b2	310 B m24h + Cu b3	415 R d24h + Cu b4	508 B+R m4h b5	610 B m24h + Cu b6

L10	105 B m4h + Cu b1	208 B+R m4h b2	309 B m24h b3	414 R d24h b4	513 B d24h + Cu b5	602 Cu 100 b6
L11	102 Cu 100 b1	209 B m24h b2	306 R m4h b3	406 R m4h b4	510 B m24h + Cu b5	609 B m24h b6
L12	115 R d24h + Cu b1	203 Cu600 b2	304 B m4h b3	404 B m4h b4	506 R m4h b5	618 Bm + Rd 24h + Cu b6
L13	107 R m4h + Cu b1	211 B+R m24h b2	307 R m4h + Cu b3	412 B d24h b4	512 B d24h b5	608 B+R m4h b6
L14	110 B m24h + Cu b1	202 Cu 100 b2	315 R d24h + Cu b3	409 B m24h b4	517 Bm + Rd 24h b5	611 B+R m24h b6
L15	112 B d24h b1	214 R d24h b2	311 B+R m24h b3	401 Témoïn b4	501 Témoïn b5	603 Cu600 b6
L16	116 B+R d24h b1	213 B d24h + Cu b2	305 B m4h + Cu b3	418 Bm + Rd 24h + Cu b4	503 Cu600 b5	612 B d24h b6
L17	109 B m24h b1	205 B m4h + Cu b2	314 R d24h b3	411 B+R m24h b4	502 Cu 100 b5	604 B m4h b6
L18	103 Cu600 b1	204 B m4h b2	308 B+R m4h b3	413 B d24h + Cu b4	515 R d24h + Cu b5	605 B m4h + Cu b6

	Bm + Rd 24h		B m4h + Cu
	B m4h		Cu 100
	B+R m24h		R d24h + Cu
	Témoïn		R m4h + Cu



Annexe 2 - Protocole de mise en culture du mildiou in vitro

Mode opératoire de la multiplication in vitro du mildiou

- Prendre des feuilles saines indemnes de tous traitements, de préférence jeunes (3 à 5^{ème} feuilles à partir de l'apex)
- Bien rincer les feuilles à l'eau distillée (minimum 2 fois)
- Sécher les feuilles sur du papier absorbant
- Préparer les boîtes de Pétri :
 - Mettre un papier filtre dans la boîte
 - L'imbiber de 1,5 ml d'eau distillée
 - Y placer les feuilles ou disques foliaires (environ 1,5 cm de diamètre)
- Préparer une solution de spores de mildiou :
 - Prendre des feuilles présentant des symptômes de mildiou sporulé, indemnes de traitements
 - Ou prendre des feuilles in vitro sporulées
 - Avec un pinceau et un peu d'eau distillée, récupérer délicatement les sporanges et sporangiophores sur la surface inférieure de la feuille
 - Rincer le pinceau dans une très petite quantité d'eau, où va se concentrer les spores de mildiou.
 - Cette étape doit être assez rapide, les zoospores, une fois libérées des sporanges ont une durée de vie de moins d'une heure. Pour retarder ce phénomène, il est préférable de garder la solution dans de la glace, le temps de la préparation de la solution et de l'inoculation.
 - Une fois tout le mildiou récupéré, calculer la concentration en spores à l'aide d'une cellule de Malassez (idéalement il faudrait 15000 à 40000 sporanges/ml)
- Inoculation :
 - Une fois la concentration déterminée, à l'aide d'une pipette, on prélève des gouttes de 10µl.
 - Soit on injecte 1 goutte de 10 µl par disque foliaire
 - Soit on injecte 15 gouttes de 10µl par feuille
 - Il faut penser à remuer régulièrement la solution de spores pour l'homogénéiser, les spores ont tendance à se déposer au fond.
- Bien fermer les boîtes de Pétri hermétiquement à l'aide de Parafilm® ou de papier cellophane pour garder le milieu humide.
- Entreposer les boîtes dans une enceinte climatique à 25°C maximum à l'obscurité pendant 6 à 24 heures maximum.
- Aspirer les gouttes une par une avec une pipette ou à l'aide d'un papier filtre.
- Entreposer les boîtes de Pétri dans une enceinte climatique à 25°C avec une alternance lumière/obscurité de 12 heures. 16h 8h
- Au bout de 5 à 6 jours, on commence à voir apparaître des sporulations

