

NIVEAUX de SENSIBILITE au CUIVRE de la BACTERIOSE du NOYER (*Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*)

ETUDE 2012

Résumé

La bactériose du noyer (*Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*) est une maladie grave qui sévit dans la noyeraie française et dont la lutte est réalisée grâce à des applications à base de cuivre, seule substance autorisée pour cet usage. Or depuis quelques années, ces traitements paraissent ne pas avoir une aussi bonne efficacité.

Une étude a été menée sur un essai mis en place par la SENUA avec, pour objectif, de comparer l'impact des traitements cupriques (pleine dose et dose réduite) sur le taux de contamination des bourgeons par la bactérie et le niveau de sensibilité au cuivre des bactéries isolées. En parallèle, un verger jamais traité au cuivre, pris comme référence dans la même région de la Noix de Grenoble, a été suivi selon ces deux mêmes critères (taux de contamination des bourgeons et sensibilité au cuivre des bactéries isolées).

Les résultats de l'essai 2012 confirment le fait déjà relevé en 2011 dans les vergers recevant régulièrement des traitements cuivre : les taux de contamination des bourgeons par la bactérie peuvent atteindre, dans les parcelles traitées, des taux égaux (voire plus élevés) que dans les parcelles non traitées. Par contre, sur l'essai 2012, il est difficile d'interpréter les données obtenues, le taux d'infection plus élevé des bourgeons dans les parcelles traitées étant en lien avec des proportions de bactéries résistantes identiques au témoin dans la parcelle à 12,5 kg/ha et significativement plus élevées dans la parcelle à 3,75 kg/ha.

Enfin, il faut noter le maintien de la bonne qualité sanitaire du verger de référence qui présente un taux de contamination des bourgeons par la bactérie extrêmement bas, ainsi que l'absence de bactéries résistantes dans la population de *X. a. pv juglandis* présente dans ce verger.

Mots-clés : Bactériose du noyer, *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*, cuivre, résistance

I. PRÉSENTATION – CONTEXTE

La bactériose du noyer (*Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*) est une maladie grave qui sévit dans la noyeraie française. La lutte contre ce pathogène est réalisée uniquement grâce à l'utilisation de traitements à base de cuivre, seule substance autorisée sur cet usage.

Depuis quelques années, l'efficacité de ces traitements semble moins bonne dans certaines parcelles, ce qui a conduit les professionnels à s'interroger sur une éventuelle évolution de la prévalence de la résistance au cuivre chez cette bactérie (GARDAN *et al.*, 1993). Cette éventualité pose d'autant plus problème que l'usage du cuivre étant en cours de révision dans le cadre de la réglementation européenne, il pourrait n'être autorisé, dans l'avenir, qu'à des doses beaucoup plus faibles que celles actuellement homologuées.

L'étude menée en 2011, à la fois sur des vergers commerciaux et sur un essai de comparaison de doses mis en place par la Station d'Expérimentation Nucicole Rhône-Alpes (SENuRA), a permis de montrer que certains vergers régulièrement traités au cuivre présentaient, en fin de saison, des taux importants de contamination des bourgeons avec une fréquence de bactéries résistantes significativement plus élevée que celle des vergers non traités. Mais, par contre, le probable manque de puissance de l'essai n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives dans les taux de contamination, ni dans les profils de sensibilité au cuivre, quelle que soit la dose appliquée.

Aussi, en 2012, il a été décidé par les différentes parties prenantes (SENuRA/Ctifl, INRA, Anses) de poursuivre cette étude en la focalisant sur l'essai de comparaison de doses de cuivre de la SENuRA, avec un protocole adapté pour tenter d'améliorer la puissance de l'essai.

En parallèle, des analyses ont également été effectuées dans le verger non traité au cuivre (et considéré comme sensible) qui sert de référence depuis la première année de mise en place de cette étude (verger BB.09S).

II. MATERIEL ET METHODE

Dispositif expérimental

Une parcelle producteur est traitée selon différentes modalités de dose de Cuivre et est suivie tout au long de la saison pour les chutes de noix (cf CR à la fin de ce document).

Par ailleurs, la parcelle BB.09S, non traitée depuis longtemps, sert de référence (témoin exclu).

Echantillonnage des bourgeons

Les prélèvements, effectués par la station régionale de la SENuRA, sont constitués de bourgeons prélevés le 21 août 2013 (bourgeons néoformés). Pour chaque modalité, 130 bourgeons ont été échantillonnés, à raison de 5 x 26 bourgeons par modalité. Pour la parcelle BB.09S, il s'agit de 130 bourgeons prélevés sur 10 arbres. Chaque bourgeon a été placé en sachet individuel.

Isolement et détermination de *X. a. pv juglandis* (réalisés par l'INRA d'Angers)

Chaque bourgeon prélevé est conditionné individuellement et l'isolement des bactéries présentes est effectué bourgeon par bourgeon.

Après broyage de chaque bourgeon dans de l'eau stérile, un étalement est réalisé sur milieu sélectif (LPGA + cycloheximide + cephalexine) permettant de sélectionner majoritairement les souches bactériennes du genre *Xanthomonas* (colonies à aspect jaune).

Cinq colonies par bourgeon sont ensuite prélevées et leur détermination est effectuée par PCR. La technique de PCR permet de distinguer les bactéries recherchées (*X. a. pv juglandis*) des autres bactéries du type *X. arboricola*. Si cette analyse ne permet pas de déterminer au moins une colonie de *X. a. pv juglandis*, 5 nouvelles colonies sont reprises de l'isolement initial (issu du bourgeon) et soumises à leur tour à détermination.

Pour chaque bourgeon dans lequel *X. a. pv juglandis* a pu être déterminée, une de ces colonies est sélectionnée et repiquée sur milieu LPGa pour la réalisation du test de sensibilité au cuivre.

Test de sensibilité au cuivre (réalisé par l'unité RPP de l'Anses-Lyon)

A la réception des cultures de *X. a. pv juglandis*, un repiquage sur milieu LPGa est effectué pour régénérer la culture.

La sensibilité est évaluée par la méthode d'inoculation sur boîte de Petri (milieu CYE : Casitone - Extrait de levure – Glycerol – Agar) avec différentes concentrations de sulfate de cuivre.

La gamme de doses utilisée pour ces tests est la suivante :

0 – 8 – 16 – 32 – 64 et 128 mg Cu⁺⁺/L de milieu.

Chaque colonie à tester est mise en suspension dans 1 mL d'eau stérile et déposée dans les boîtes de test à raison de 50 µL de suspension bactérienne. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 6 jours.

La lecture consiste à noter l'existence (ou non) d'un développement de la bactérie testée, aux différentes doses. Cette lecture permet de définir, pour chaque colonie bactérienne, la Concentration Minimale d'Inhibition (CMI), qui correspond à la dose pour laquelle il n'y a plus de croissance bactérienne sur le milieu gélosé (absence de colonie).

Ce critère permet de discriminer les souches sensibles des souches résistantes grâce au seuil défini comme suit (M. MENARD, non daté) :

Souches sensibles : CMI ≤ 16 mg/L Cu⁺⁺ (croissance à 8 mg/L au maximum)

Souches résistantes : CMI ≥ 32 mg/L Cu⁺⁺ (croissance à 16 mg/L au minimum).

Analyses statistiques

Des analyses statistiques sont réalisées pour déterminer les facteurs influençant d'une part, le taux de contamination des bourgeons prélevés (défini comme le nombre de bourgeons présentant au moins une colonie de *X. a. pv juglandis* sur le nombre de bourgeons prélevés) et, d'autre part, le taux de colonies *X. a. pv juglandis* analysées comme résistantes au cuivre.

Une régression logistique est réalisée pour étudier les facteurs associés à la contamination des bourgeons. La variable réponse est le statut (contaminé/non contaminé) du bourgeon et le facteur étudié est le traitement (non traité, 12.5 kg/ha de Cu et 3.75 kg/ha de Cu). Un intercept aléatoire est introduit dans le modèle pour prendre en compte les corrélations entre les bourgeons d'un même arbre. Une autre régression logistique avec les mêmes variables est mise en œuvre à partir des bourgeons pour lesquels un isolement de *X. a. pv juglandis* a été réalisé afin d'étudier les facteurs associés à la résistance des bactéries.

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>).

III. DESCRIPTION DES VERGERS ETUDIÉS

Verger non traité

Il s'agit de la parcelle BB.09S (St Hilaire du Rosier – 38), déjà analysée en 2009, 2010 et 2011. Situé dans la zone de culture de la Noix de Grenoble, ce verger est considéré comme un verger non traité de référence.

Essai Doses de cuivre S.E.Nu.R.A. 2012 (St Romans)

Des prélèvements ont été réalisés sur l'essai mis en place par la Station de la SENUA. Cet essai comportait les trois modalités de traitement suivantes :

- Modalité M1 : témoin non traité (TNT depuis 2011),
- Modalité M2 : traitement cuivre (Bouillie Bordelaise RSR, base 1000 L/ha) à la dose de 12,5 kg/ha (dose homologuée : 1,25 kg/hL), soit 2,5 kg de cuivre métal par traitement,

- **Modalité M3** : traitement cuivre (Bouillie Bordelaise RSR, base 1000 L/ha) à la dose de 3,75 kg/ha, soit 0,75 kg de cuivre métal par traitement.

Les traitements cuivre sont intervenus entre fin-avril (30/04) et fin-mai 2012 (31/05), aux dates suivantes : 30/04, 07/05, 15/05, 24/05 et 31/05.

Les prélèvements ont été effectués à la mi-août, donc après les traitements.

L'essai a été suivi, sur le terrain, durant toute la saison jusqu'à la récolte par un comptage des fruits chutés. Ces résultats seront à relier aux résultats d'analyses des bourgeons. Le compte-rendu complet de la phase terrain est joint en Annexe.

IV. RESULTATS

En premier lieu, il est important de noter que, contrairement à l'étude réalisée durant l'année 2011, tous les prélèvements ont été effectués à la même date (21 août 2012), c'est-à-dire 3 mois après le dernier traitement cuivre réalisés sur l'essai. Tous les résultats décrits ci-dessous ont donc été obtenus à partir de populations de bactéries ayant subi une pression de sélection et non à partir de l'inoculum de printemps. Par ailleurs, le nombre d'arbres échantillonnés a été deux fois plus important dans le verger non traité cuivre (10 arbres) que dans chaque modalité de l'essai (5 arbres). Cependant, le nombre de bourgeons prélevés a été identique sur toutes les parcelles prélevées (130), en conformité avec les conclusions de l'étude 2011.

1 – TAUX DE CONTAMINATION DES BOURGEONS PAR LA BACTERIE

La synthèse des résultats d'isollements (effectués bourgeon par bourgeon) montre que le nombre de colonies de *X. a. pv juglandis* isolées, et donc, le taux de bourgeons contaminés par au moins une colonie, se sont révélés fort différents selon la parcelle considérée (Tableau I).

- **Pour le verger non traité de référence BB.09S**, ce taux est faible (5% à partir de 130 bourgeons prélevés sur 10 arbres) et bien plus faible que les taux enregistrés dans ce même verger en juillet 2011 (42%, à partir de 50 bourgeons sur un nombre équivalent d'arbres), puis fin septembre 2011 (56%, à partir de 25 bourgeons sur un nombre équivalent d'arbres).
- **Sur l'essai**, le témoin non traité présente un taux nettement plus bas que ceux des modalités traitées, les taux de contamination de ces dernières s'avérant 2 fois (modalité M3) voire environ 3 fois (modalité M2) supérieurs au taux du témoin.

L'analyse statistique portant sur ces données montre :

- un taux de contamination non significativement différent entre le verger non traité de référence (BB.09S) et le témoin non traité de l'essai ($p = 0,18$),
- et dans l'essai, par rapport au témoin non traité, des taux de contamination significativement plus élevés dans les modalités traitées (différences significative pour la modalité traitée à 3,75 kg/ha ($p = 0,04$) et très hautement significative pour la modalité traitée à 12,5 kg/ha ($p < 0,0001$)).
- Par contre, entre les deux modalités traitées, il n'a pas été possible, dans les conditions de l'essai, de mettre en évidence une différence significative du taux de contamination ($p = 0,07$).

Tableau I : TAUX DE CONTAMINATION DES BOURGEONS

Référence des vergers ou modalités	date prélèvement	Nb total bourgeons prélevés / (nb arbres)	Nb bourgeons ayant, au moins, 1 colonie <i>X. a. pv juglandis</i> isolée	Taux de bourgeons contaminés par au moins une colonie <i>X. a. pv juglandis</i>
Verger non traité cuivre de Référence				
BB.09S St Hilaire du Rosier (38)	août 2012	130 / (10)	7	5%
ESSAI				
M1 TNT	août 2012	130/(5)	17	13%
M2 Cu 12,5 kg/ha	août 2012	130/(5)	47	36%
M3 Cu 3,75 kg/ha	août 2012	130/(5)	33	25%

2 - RESULTATS DES TESTS DE SENSIBILITE

Les résultats des tests de sensibilité au cuivre réalisés sur les colonies isolées dans chaque parcelle sont synthétisés dans le tableau II, ci-dessous.

Tableau II : Résultats des TESTS DE SENSIBILITE

Référence des vergers ou modalités	Date prélèvement	Nb colonies <i>X. a. pv juglandis</i> testées / sensibilité Cu	Nb colonies à CMI ≤ 16 mg/L	Nb colonies à CMI = 32 mg/L	Nb colonies à CMI = 64 mg/L	% colonies <i>X. a. pv juglandis</i> R au cuivre
Verger non traité cuivre de Référence						
BB.09S St Hilaire du Rosier (38)	août 2012	7	7	0	0	0%
ESSAI						
M1 TNT	août 2012	17	8	8	1	53%
M2 Cu 12,5 kg/ha	août 2012	47	22	15	10	53%
M3 Cu 3,75 kg/ha	août 2012	33	3	10	20	91%

- **Pour le verger non traité de référence BB.09S**, aucune des colonies de *X. a. pv juglandis* isolée ne s'est avérée résistante au cuivre (contrairement aux données obtenues en 2011 sur ce même verger).

➤ **Sur l'essai**, par contre, les tests de résistance ont donné les résultats suivants :

- sur les 17 colonies de *X. a. pv juglandis* issues du témoin non traité et soumises au test, environ la moitié se sont avérées résistantes (dont une colonie avec une CMI égale à 64 mg/L),
- sur les 47 colonies de *X. a. pv juglandis* issues de la modalité M2 (traitement 12,5 kg/ha), le pourcentage de colonies résistantes est équivalent à celui du témoin non traité (53%) ; mais avec 10 colonies (sur les 25 définies comme résistantes) ayant une CMI égale à 64 mg/L,
- sur les 33 colonies de *X. a. pv juglandis* issues de la modalité M3 (traitement 3,75 kg/ha), le pourcentage de colonies résistantes s'avère supérieur à celui du témoin non traité et à celui de la modalité à 12,5 kg/ha (91%) avec 2/3 des colonies résistantes présentant une CMI égale à 64 mg/L.

L'analyse statistique portant sur ces données montre :

- une différence significative ($p = 0,025$) du taux de colonies résistantes entre le verger non traité de référence (BB.09S) et le témoin non traité de l'essai.
 - sur l'essai, aucune différence significative entre le témoin non traité et la modalité M2 pour le pourcentage global de colonies résistantes ($p = 0,83$). De plus, sur l'ensemble des colonies résistantes, la distribution entre les colonies présentant une CMI de 32 mg/L et celles présentant une CMI de 64 mg/L ne montre aucune différence significative ($p = 0,21$) entre les deux modalités.
 - Mais, pour la modalité M3, par rapport à la modalité témoin non traité (M1), ont pu être mises en évidence : une différence significative sur le taux global de colonies résistantes ($p = 0,05$) et une différence hautement significative entre le taux de colonies résistantes présentant une CMI de 32 mg/L et celui des colonies à CMI de 64 mg/L ($p = 0,006$).
 - Par contre, l'analyse statistique n'a pas montré de différence significative entre la modalité M3 (traitement à 3,25 kg/ha) et la modalité M2 (traitement à 12,5 kg/ha) pour le taux global de colonies résistantes ($p = 0,06$) comme pour le taux de colonies résistantes présentant une CMI de 32 mg/L *versus* le taux de colonies à CMI de 64 mg/L ($p = 0,06$). Mais, dans les deux cas, on se trouve en limite de significativité.
- Cette absence de différence entre les modalités M2 et M3 en matière de taux de résistance peut s'expliquer soit par une absence de différence entre ces deux modalités, soit par un manque de puissance de l'essai.

V. DISCUSSION

1 - VERGER NON TRAITE DE REFERENCE (BB.09S)

Ce verger, suivi depuis 2009 et choisi pour son historique avec absence de traitements contre *X. a. pv juglandis* a montré en 2012 un faible taux de contamination par la bactérie et une absence de résistance pour la totalité des colonies isolées et testées.

Il faut noter que ces résultats diffèrent de ceux de 2011, aussi bien au niveau du taux de contamination qu'au niveau du pourcentage de colonies résistantes (peut-être à relier, suite à un problème d'irrigation subi par les arbres de cette parcelle en 2012, à une moindre turgescence des cellules et donc un nombre plus faible de portes d'entrée pour la bactérie). Il reste cependant difficile de faire une véritable comparaison dans la mesure où, en 2012, le nombre de bourgeons analysés était bien supérieur à celui de 2011.

2 - ESSAI DOSES DE CUIVRE (S.E.NU.R.A.)

- **Concernant le taux de contamination**, le plus faible taux se situe sur le témoin non traité, (taux statistiquement non différent de celui du verger de référence).
Quant aux deux modalités traitées, elles sont significativement plus contaminées que le témoin. Par contre, il n'a pas été possible de mettre en évidence une véritable différence significative entre les deux modalités traitées M2 et M3.
- **Quant aux tests de sensibilité**, ils démontrent que :
 - le témoin non traité présente un taux de colonies résistantes significativement supérieur à celui du verger de référence,
 - la modalité M2 traitée à 12,5 kg/ha, bien que la plus contaminée, présente un pourcentage de colonies résistantes équivalent à celui du témoin,
 - la modalité M3 traitée à 3,75 kg/ha montre le plus fort pourcentage de colonies résistantes avec, de plus, environ 2/3 des colonies résistantes avec une CMI égale à 64 mg/L, ce qui la différencie significativement de la modalité témoin, mais pas de la modalité M2.

Ainsi, grâce à l'augmentation du nombre de bourgeons prélevés par parcelle, les résultats obtenus en 2012 ont permis de mettre en évidence l'effet des traitements dans les parcelles traitées de l'essai : les taux de contamination des bourgeons par la bactérie *X. a. pv juglandis* sont plus forts dans les parcelles traitées que dans le témoin non traité, preuve que les traitements réalisés en Mai n'ont pas arrêté le développement des bactéries.

Par ailleurs, la proportion de bactéries résistantes, observée trois mois après les traitements s'avère équivalente dans le témoin non traité et dans la modalité traitée à 12,5 kg/ha (soit, environ, une bactérie résistante sur 2) tandis que, dans la modalité traitée à 3,75 kg/ha, le taux de bactéries résistantes apparaît comme significativement supérieur au taux observé dans le témoin (avec, en sus, un plus fort pourcentage de bactéries à forte CMI dans cette modalité M3). Cependant un probable manque de puissance de l'essai n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les deux modalités traitées M2 et M3.

Il est intéressant de rapprocher ces données de laboratoire des notations réalisées au terrain sur l'importance des dégâts observés. Parmi les diverses mesures effectuées sur l'essai, deux d'entre elles sont à retenir (le détail des résultats est en annexe) :

- le rendement qui s'avère meilleur sur le témoin et sur la modalité à 3,75 kg/ha de cuivre par rapport à la modalité pleine dose, ce qui peut être rapproché des résultats obtenus sur les taux d'infection des bourgeons par la bactérie dans les trois modalités,
- le pourcentage de perte qui est équivalent entre le témoin et la faible dose et supérieur sur la modalité à la dose homologuée. Mais, dans la mesure où dans ce pourcentage de perte, la bactériose et les problèmes fongiques n'ont pas pu être différenciés, il est plus difficile d'interpréter cette notation.

VI. CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

Les résultats de l'essai 2012 confirment le fait déjà relevé en 2011 dans les vergers recevant régulièrement des traitements cuivre : les taux de contamination des bourgeons par la bactérie peuvent atteindre, dans les parcelles traitées, des taux égaux, voire plus élevés que dans les parcelles non traitées.

Par contre, sur l'essai 2012, il est difficile d'interpréter les données obtenues, le taux d'infection plus élevé des bourgeons dans les parcelles traitées étant en lien avec des proportions de

bactéries résistantes identiques au témoin dans la parcelle à 12,5 kg/ha et significativement plus élevées dans la parcelle à 3,75 kg/ha, par rapport au témoin.

L'interprétation de ces données de laboratoire au regard des notations du terrain est également peu aisée.

Enfin, les résultats 2012 montrent la bonne qualité sanitaire du verger de référence BB.09S qui, bien que situé dans une zone proche du verger portant l'essai, présente un taux de contamination des bourgeons par la bactérie extrêmement bas, et surtout l'absence de bactéries résistantes dans la population de *X. a. pv juglandis* présente. Ces bons résultats peuvent-ils être liés aux différences de sol et de moindre densité en noyers dans la zone dans laquelle se situe la parcelle BB.09S ?

VII. BIBLIOGRAPHIE

- Ménard M. (document non daté) : La bactériose du noyer et la sensibilité au cuivre de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Note INRA.
- Gardan L., Brault T., Germain E., 1993. Copper resistance of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in French Walnut orchards and its association conjugative plasmids. Acta Horticulturae 311.

VIII. PARTENARIAT

Cette étude a été réalisée grâce au partenariat étroit établi entre les différentes structures participantes :

- Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) – Centre d'Angers-Nantes – UMR 1345
- Station Expérimentale Nucicole Rhône-Alpes (SENuRA)
- Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (Ctifl)
- Anses-Lyon – unité Résistance aux Produits Phytosanitaires (RPP)

et à la participation financière de :

- Association d'Organisation de Producteurs Nationale Dynamic Noix (AOPN Dynamic Noix) en 2012



Compte-rendu d'essai

**Noyer
2012**

Evaluation de l'efficacité de différentes doses de bouillie bordelaise sur la bactériose et détermination des effets sur les populations de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*.

Date : 08/01/2013

Suivi de l'essai : Amélie de Gervillier / S.E.Nu.R.A.

Responsable technique : Agnès Verhaeghe / Ctifl - S.E.Nu.R.A.

1. Thème de l'essai

La bactériose nécrose est la principale cause de perte de récolte pour les producteurs de noix en France. Il s'agit d'une maladie bactérienne causée par *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* (Xaj). Cette maladie affecte tous les organes en croissance : rameaux, feuilles, fruits et elle provoque la chute de fruits si l'attaque est précoce ou les rend non commercialisables (coque tachée, cerneau noirci).

Aujourd'hui seuls les produits à base de cuivre sont utilisés et homologués pour lutter contre cette maladie. Ceux-ci sont en cours d'examen dans le cadre de leur ré-homologation en 2014. Par ailleurs, il semblerait qu'on assiste à une diminution de l'efficacité du cuivre dans la lutte contre la bactériose. Dans le cadre d'essais officiellement reconnus (EOR) menés par les stations d'expérimentations nucicoles il n'est pas rare d'obtenir des niveaux de pertes équivalents sur le témoin non traité et sur la référence chimique (cuivre à pleine dose). A cela s'ajoute la volonté au niveau européen de limiter les doses de cuivre utilisables en agriculture. Or on sait que les apparitions des résistances sont amplifiées par l'usage répété d'une même matière active et généralement favorisées par la diminution des doses. Un gène chromosomique de résistance des bactéries Xaj au cuivre a été mis en évidence par Lee et al en 1994.

Des travaux préliminaires ont été engagés en 2008 par la SENURA, le Ctifl et l'ANSES pour faire un état des lieux de la résistance des souches pathogènes au cuivre sur les parcelles supports d'essais EOR. Ce travail a permis de dégager certaines questions. Aujourd'hui le travail est conduit au sein d'un partenariat entre les stations de la SENURA et de Creysse avec le Ctifl, l'ANSES de Lyon et l'INRA d'Angers et plusieurs financeurs (AOP Dynamique noix, France Agri Mer).

2. But de l'essai

L'objectif de cet essai est d'évaluer au champ l'efficacité de différentes doses de cuivre contre la bactériose du noyer. De plus, le but est de créer une pression de sélection afin d'étudier l'incidence de ces applications sur les populations bactériennes ; le nombre de souches de Xaj qui se développe ainsi que leur pathogénicité sont déterminés en laboratoire (Inra d'Angers). Dans un dernier temps la résistance des bactéries pathogènes, sélectionnées préalablement, est testée en laboratoire pour différentes dose de cuivre (Anses de Lyon)

3. Facteurs et modalités étudiés

Le dispositif expérimental est constitué de trois modalités.

- M1 : Témoin non traité (TNT).
- M2 : Bouillie bordelaise RSR, 12,5 kg/ha / traitement (soit 2,5 kg/ha de Cu métal / traitement)
- M3 : Bouillie bordelaise RSR, 3.75 kg/ha / traitement (soit 0,75 kg/ha de Cu métal / traitement)

4. Matériel et Méthodes

– Matériel Végétal

L'expérimentation s'effectue dans ce cas dans un verger de noyer en production. Les arbres suivis sont de variété franquette.

– Site d'implantation

L'essai est, pour la 2ème année consécutive, mis en place sur une parcelle de producteur sur la commune de Saint Romans (38).

La parcelle a les caractéristiques suivantes :

- Année de plantation : 1996
- Densité de plantation : 10 x 11 m
- Type d'irrigation : aspersion 1 ligne sur 2
- Surface totale de la parcelle : 2.53ha

– Dispositif expérimental

La parcelle est considérée comme homogène du point de vue de la répartition de la bactériose nécrose du noyer. Il a été mis en place un dispositif en bloc de Fisher. Soit :

- 5 blocs (= 5 répétitions) (ils ont été définis selon l'agencement de l'essai de 2009),
- 3 modalités : 2 doses de bouillie testées plus le témoin non traité

Chaque micro parcelle élémentaire est constitué de 3 arbres traités. Seul l'arbre central est suivi lors des notations.

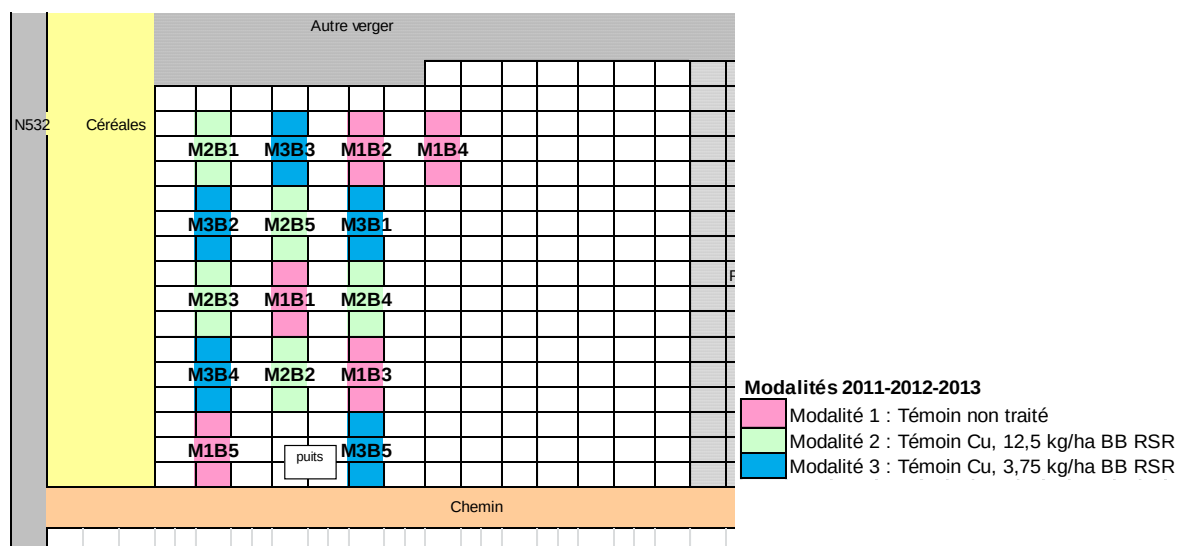


Figure 1 : dispositif expérimental sur la parcelle de JM Lyonne en 2012

– Observations et mesures

- Durant la saison

Durant la saison (de mai à septembre) des notations sur « filet » sont effectuées. Cela consiste à comptabiliser les noix qui tombent au sol sur le filet. Celui-ci est placé sur la ligne de plantation, sous chaque arbre suivi, sur une largeur d'environ 2 m sous toute la frondaison de l'arbre. Les noix tombant sur le filet sont représentatives de l'ensemble des noix de l'arbre en terme de proportion de noix malades sur saines (vérification de cette hypothèse sur des essais de la station en 2003). Les noix ramassées sont classées suivant leur état : « saine », position de la nécrose (« apicale », « basale », « latérale »...), autres ravageurs et dégâts.

Ces relevés sont utiles afin de connaître la dynamique des chutes de noix saines et malades dans le temps. De plus cela permet de définir le potentiel initial de l'arbre.

Durant l'année 2012, 6 notations ont été réalisées du 16 juillet au 25 septembre.

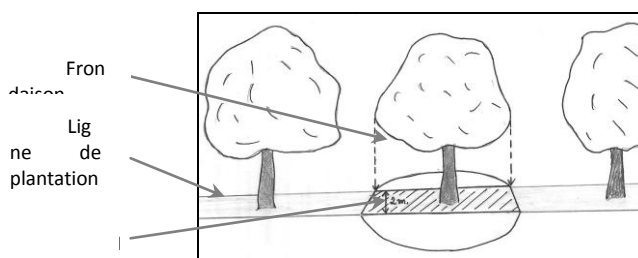


Figure 2 : représentation de l'installation d'un filet

- A la récolte

Les noix sont récoltées manuellement, arbre par arbre, afin de comptabiliser :

- le nombre de noix malade sur le filet,
- le poids des noix saines du filet,
- le poids des noix saines à l'extérieur du filet.

Ces mesures permettent de définir le pourcentage de noix malade par arbre ainsi que son rendement.

En même temps, pour chaque modalité, 3 échantillons de 100 noix sont réalisés sur la récolte principale afin de déterminer le calibre des noix. 1 échantillon de 100 noix, par modalité, est prélevé sur la récolte secondaire.

— Conduite de l'essai

5 traitements ont été réalisés sur les modalités M 2 et M 3. Les traitements ont eu lieu les : 30/04, 07/05, 15/05, 24/05 et 31/05/2012. Seule la modalité M 1 est non traitée. Les arbres de bordures des micro-parcelles ne sont pas traités au cuivre (les arbres sont assimilables à M1). Les traitements cupriques sont réalisés par la station pour la parcelle d'essai.

Les autres traitements ont lieu de manière homogène sur l'ensemble de la parcelle. Ils sont définis et réalisés par le producteur.

Les principaux traitements réalisés sur l'ensemble de la parcelle sont :

- La fertilisation : 3 apports (13/03, 11/05 et 26/05) avec une dose totale de 111u d'azote/ha,
- 1 chaulage : 14/02,
- Fongicide : 2 dithane à 1.2 kg/ha (appliqué avec 300 L d'eau/ha) (les 08 et 23/05),
- Insecticide : 1 contre la cochenille, 3 contre le carpo et la mouche du brou,
- Foliaires : 2 apport d'un mélange de zinc, manganèse et calcium (25/05 et 15/06).

3 irrigations de 12h ont été réalisées (16-17 juillet, 30-31 juillet et 17-18 août).
Les stades phénologiques du graphique suivant ont été définis selon les observations sur plusieurs parcelles de franquette d'âge adulte en 2012 par la station de Chatte. Sur la parcelle d'essai le stade Bf/Cf a été observé le 17/04/2012.

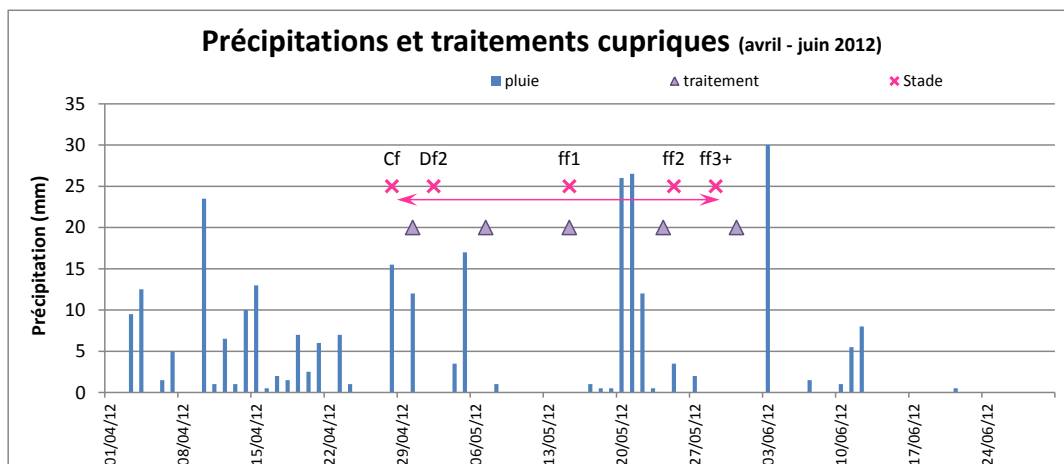


Figure 3 : précipitations et positionnement des traitements cuivre durant la période à risque de la bactériose

– Traitement statistique des résultats

Les résultats obtenus seront analysés grâce au logiciel StatBox (v6.5). Conformément à la méthode CEB n° 244, une analyse de variance sera effectuée pour chaque variable étudiée (avec un risque alpha de 5%). Un test de Dunnett permettra de compléter l'analyse afin de comparer les modalités traitements à la référence ; « témoin non traitée ». Un test de Newman et Keuls permettra de comparer les traitements entre eux. Au besoin une transformation des données est réalisée (en $\arcsin(\sqrt{x})$).

5. Résultats détaillés

Dans un premier temps nous allons nous intéresser au rendement sec obtenu pour chaque modalité de l'essai, ensuite nous nous pencherons sur les dégâts causés par la bactériose nécrose.

a. Rendement

Cette année 3 passages de récolte ont été effectués sur la parcelle (les : 02/10/12, 04/10/12, 17/10/12). Les arbres ont été secoués lors des deuxième et troisième passages. 1 échantillon de 100 noix a été prélevé par modalité lors de la récolte du 02/10, contre 3 échantillons de 100 noix, par modalité, pour le 04/10. Afin de calculer le rendement sec et la répartition par calibre des arbres, les échantillons du 04/10 ont été aussi associés à la récolte du 17/10.

Après calcul nous obtenons les résultats suivants :

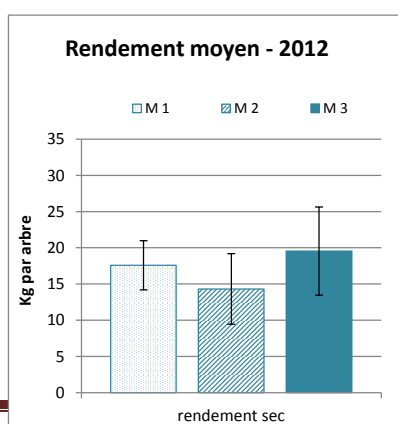


Tableau 1 : rendement moyen et écart type 2012

Modalité	Rendement sec par arbre (kg)	
	Moyenne	Ecart type
M 1	17.6	3.4
M 2	14.3	4.9
M 3	19.5	6.1

Figure 4 : rendement moyen 2012 par modalité

Nous remarquons que le rendement sec est en moyenne plus important pour la modalité M3 que pour les autres modalités.

Cependant quand nous réalisons une anova sur cette variable, nous remarquons qu'il n'y a pas de différence significative entre les modalités (p-value de 0.346). Il faut toutefois noter que la puissance a posteriori de l'essai pour un risque de 1^{ère} espèce de 5% est faible : 20%. De plus, d'après le test de Tukey il y a pas de différence significative dans les interactions bloc/traitements (p-value de 0.893).

Même avec la transformation des valeurs en Arc sin $\sqrt{x}$, les différences entre modalités ne sont pas significatives.

b. Dégâts causés par la bactériose

Pour commencer nous regardons le nombre de noix récoltées sur les filets par catégorie ;

- noix physiologiques,
- noix saines,
- noix nécrosées (= noix bactériosées et touchées par les champignons de type Colletotrichum),
- et les noix classées dans aucune des catégories précédentes (= noix autres).

Tableau 2 : nombres moyens de noix récoltées sur les filets par modalité et leurs écarts types

		M 1		M 2		M 3	
		moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type
saison	nbr noix physio	0,40	0,55	0,20	0,45	0,20	0,45
	nbr noix saine	24,60	6,47	23,00	10,15	21,00	10,07
	nbr noix nécrosée	40,60	33,97	71,80	26,09	70,40	55,92
	nbr noix autre	46,80	23,50	46,80	12,79	49,80	15,94
récolte	nbr noix saine	240,72	81,76	225,73	64,83	333,86	78,10
	nbr noix nécrosée	46,80	23,50	46,80	12,79	49,80	15,94
saison + récolte	nbr noix saine	267,32	85,07	249,33	72,79	356,06	84,69
	nbr noix nécrosée	87,40	54,72	118,60	37,61	120,20	71,17

On remarque que le nombre moyen de noix nécrosées sur les filets, est en général plus important durant la saison que lors de la récolte.

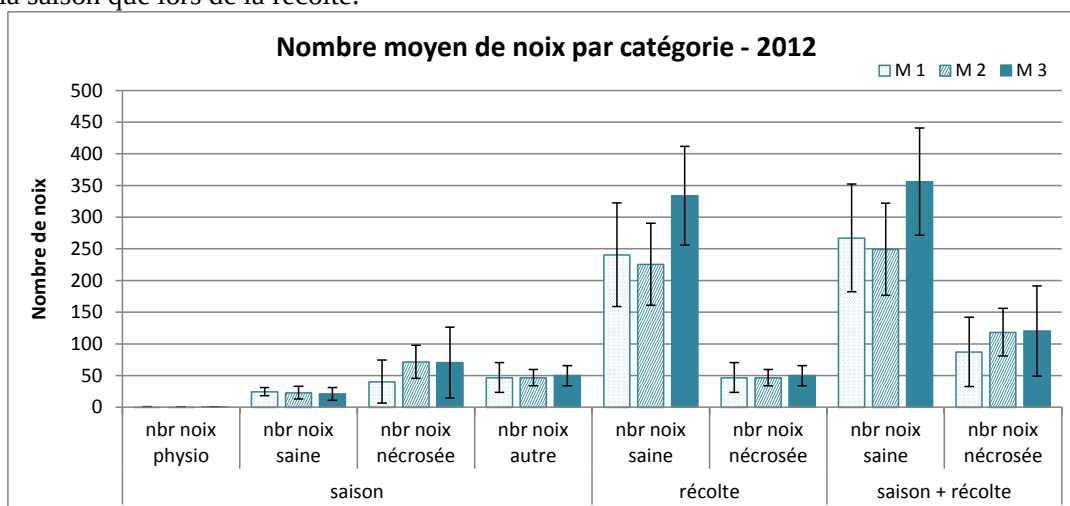


Figure 5 : nombre moyen de noix par catégories et périodes selon chaque modalité

Pour rappel, il faut garder en mémoire que les comptages ont commencé tardivement sur cet essai (16 juillet 2012). Des noix sont donc déjà tombées et notamment des noix dites « physiologiques » (inférieures à 1 cm).

Grâce aux comptages filets et en extrapolant les poids de récolte, nous obtenons le nombre total de noix collectées par filet (durant la saison et la récolte). Nous remarquons qu'il est plus important sur la dernière modalité, avec en moyenne 355 noix par filet pour M1, 368 pour M2 et 476 pour M3. L'écart-type calculé pour M3 est relativement élevé (144), cela peut révéler une hétérogénéité des arbres suivis.

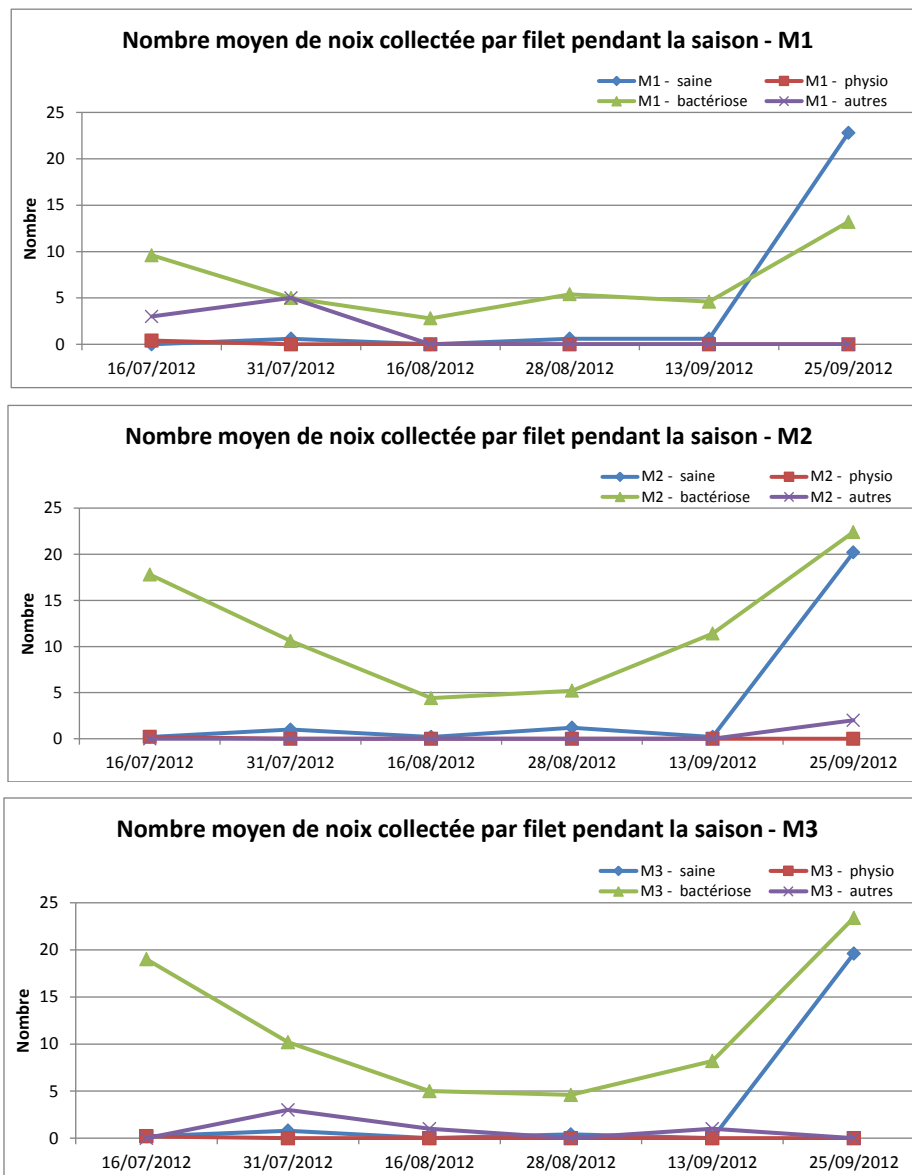


Figure 6 : Evolution du nombre de noix collectées par catégorie durant la saison 2012

D'après les graphiques précédents, on peut observer que le nombre moyen de noix récoltées sur les filets pendant la saison est important en début de saison (juillet) et au plus près de la récolte (25 septembre). Cela mettrait en évidence une attaque précoce et une contamination secondaire plus tardive.

Si l'on regarde maintenant les pourcentages de noix collectées durant la saison et la récolte par catégorie, on remarque que le pourcentage de noix nécrosées sur la modalité M1 (témoin) est supérieur à 20% sur l'ensemble de l'année. L'essai est donc considéré comme réaliste au vu de la méthode CEB N°244.

Les pourcentages, pour une période donnée, sont calculés par exemple pour les noix nécrosées (touchées par la bactériose et champignons), de la manière suivante :

$$\% \text{ noix nécrosées} = \frac{\text{nombre de noix nécrosée}}{\text{nombre de noix total}} \times 100$$

Le nombre de noix total correspond à l'ensemble des noix collectées sur le filet (sauf les noix physiologiques) pendant la période considérée.

Tableau 3 : pourcentages moyens de noix récoltées sur les filets par modalité et leurs écarts types

		M 1		M 2		M 3	
		moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type
saison	% noix nécrosée	55,0	15,7	74,7	11,0	73,3	7,7
	% noix autre	1,5	1,2	0,4	0,5	0,8	0,7
récolte	% noix nécrosée	15,7	3,1	17,8	5,9	13,1	3,3
saison + récolte	% noix nécrosée	23,6	7,0	32,7	10,4	24,2	7,8
	% noix physio	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1

Remarque : seule le pourcentage de noix physio est déterminé par rapport à l'ensemble des noix physio + saine + nécrosée + autres

Cependant, si l'on observe les valeurs obtenues pour la modalité 2, les résultats ne semblent pas cohérents. En effet, on remarque que, quelle que soit la période étudiée, si l'on traite à pleine dose de cuivre, le pourcentage de noix nécrosée, est plus important que dans le témoin non traité (33% pour M2 contre 24% pour M1 sur tout 2012). Cela mettrait en avant une non efficacité du cuivre et/ou une augmentation de la résistance des bactéries face aux traitements cupriques.

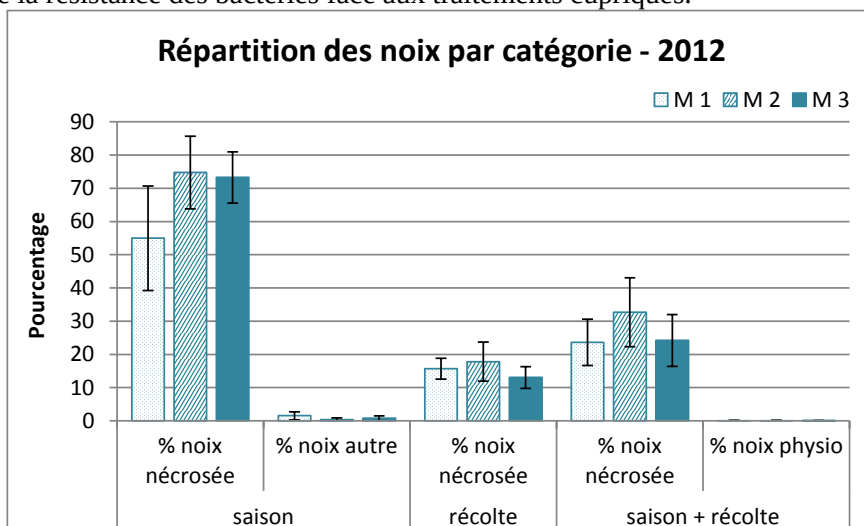


Figure 7 : pourcentage moyen de noix par catégories et périodes selon chaque modalité

D'après les notations effectuées durant la saison et la récolte, on remarque que la proportion de noix nécrosée est plus importante dans la modalité M2 que dans les autres modalités. Par ailleurs, nous pouvons voir sur le graphique précédent que le pourcentage de noix nécrosée lors de la récolte est moindre pour M3 que pour M1. Cela peut s'expliquer, notamment, par les plus fortes chutes de noix nécrosée, au cours de la saison pour la modalité 3.

Il est important de noter que cette année a été sujette au développement de champignons. Les noix comptabilisées comme bactériosées ne prennent donc pas seulement en compte la bactériose mais aussi les noix touchées par ces champignons (notamment de type Colletotrichum).

D'un point de vue statistique (test de l'anova), les variables :

- pourcentage de noix bactériosées durant la saison,
- pourcentage de noix bactériosées de la récolte,
- pourcentage de noix bactériosées sur l'ensemble de l'année 2012 (saison+récolte),

ne présentent aucune différence significative entre les trois modalités étudiées (que ce soit avec les valeurs transformées ou non).

Tableau 4 : P-value et puissances des tests statistiques réalisés (Anova)

Variable	P-value	Puissance*
% noix bactériosée saison	0.060	63 %
% noix bactériosée récolte	0.340	20 %
% noix bactériosée 2012	0.288	23 %

* puissance a posteriori au seuil alpha de 5%

Le tableau précédent nous apprend que les tests statistiques réalisés ont une faible puissance, l'essai devrait donc être conforté afin d'obtenir plus de valeurs et ainsi pouvoir mettre en avant une potentielle différence statistique entre les modalités.

c. Calibre des noix

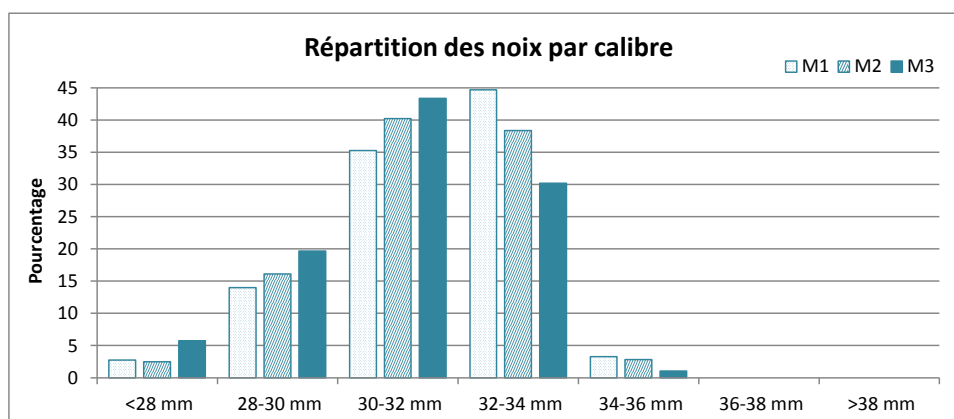


Figure 8 : répartition des noix selon leur calibre, par modalité

La répartition des noix par calibre est déterminée par les poids de récoltes et les échantillons prélevés sur la parcelle. Si l'on considère les noix de plus de 32 mm, on remarque que la modalité 1 est celle qui possède le pourcentage de noix le plus important (M1 : 48%, M2 : 41.2%, M3 : 31.2%).

Même si les calibres sont importants cette année, cette étude nous montre que la modalité 1 possède les noix les plus grosses. Cependant son rendement est le plus faible des 3 modalités. Cette relation calibre/rendement peut s'expliquer facilement par le fait que les alimentations hydrique et minérale de la modalité M1 sont dirigées dans moins de fruits, donc ils ont une meilleure croissance.

6. Conclusions de l'essai

Même si cet essai a été mis tardivement en place, tout du moins pour la partie comptage sur filet, de grandes tendances sont dégagées. D'après les résultats obtenus on remarque que la modalité 3 obtient un rendement moyen plus élevé que les autres modalités, mais avec des noix de calibre plus faible que les autres modalités.

En outre, les pourcentages de noix nécrosées sont moindres (que ce soit durant la saison et/ou la récolte) sur la modalité témoin (excepté pour M2 durant la récolte). L'utilisation de cuivre pour limiter les attaques de bactérioses serait donc inefficace dans le cas de notre essai. Les pertes engendrées par la bactériose, sur M2 et M3, ne sont toutefois pas suffisantes pour impacter négativement sur le rendement final des arbres. En effet même avec des pourcentages de bactériose plus fort que sur M1, les rendements restent supérieurs sur M2 et M3. Attention cependant aux analyses statistiques qui révèlent une puissance des tests faibles. L'essai devrait peut-être être conforté par un nombre d'arbres suivis plus important.

Cet essai met donc bien le doigt sur la résistance potentielle des bactéries pathogènes (*Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis*) aux traitements cupriques. L'utilisation de cuivre à pleine dose aurait potentiellement un impact sur la résistance des bactéries ?

Afin de répondre à ces questions de bourgeons, 130 bourgeons par modalités (plus sur une parcelle jamais traitée : parcelle Boffard), ont été prélevés autour du 21 août 2012 puis envoyés à l'Inra d'Angers pour analyse. Cette étude permettra de déterminer la présence de bactéries pathogènes et non pathogènes dans les bourgeons. Par la suite, le laboratoire de l'Anses de Lyon étudiera la résistance au cuivre de ces bactéries.