



**ASSOCIATION FRANÇAISE DE PROTECTION DES
PLANTES – COMMISSION DES ESSAIS
BIOLOGIQUES
&
RESEAU MIXTE TECHNOLOGIQUE
FERTILISATION ET ENVIRONNEMENT**

PRINCIPES GÉNÉRAUX D'EXPÉRIMENTATION DES BIOSTIMULANTS DES PLANTES

General principles for the testing of plant biostimulants

MÉTHODE GÉNÉRALE N° MG 15

1^{ère} édition : 2017

La méthode ci-après, a été établie par des membres de la Commission des Essais Biologiques de l'Association Française de Protection des Plantes et des membres du Réseau Mixte Technologique Fertilisation et Environnement

Ces organisations regroupent des spécialistes :

- ayant pour tutelle le Ministère chargé de l'Agriculture : INRA, Service de la Protection des Végétaux, Anses ;
- des Organismes professionnels de l'agriculture ;
- de l'Industrie de la fertilisation et de la nutrition des plantes
- de l'Industrie des produits phytopharmaceutiques

Cette méthode peut être révisée par ces organisations, compte tenu de l'évolution des méthodes d'expérimentation et des techniques agricoles.

Dans son état actuel, elle doit être considérée comme une méthode recommandée pour étudier les propriétés d'une préparation.

Animateurs : **L. THEVENIN METZGER / G. VINCENT**

Rapporteurs : **M-E. SAINT-MACARY / A. BERNARDON-MERY**

Texte élaboré en collaboration et avec le concours de : **C. ALABOUVETTE, P. BECID, A. BERNARDON-MERY, G. CHAUVEL, A. CHIARADIA-SOULARUE, J-P. COHAN, C. DURIEU, B. ESCALE, P. EVEILLARD, L. GORSES, U. HEILIG, E. LASCAUX, J. LAVILLE, C. LEGALL, N. LEHNING, P. MARCHAND, C. MONNIER, N. NASSR, M. PONCHET, Q. PROTSENKO, A. RIOU, M-E. SAINT-MACARY, N. SCHMITT, L. THEVENIN METZGER, L. THIBAUT, J. THIBIERGE, M. TURNER, C. VASTEL, G. VINCENT.**

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| 1. OBJET DE LA METHODE | 2 |
| 2. CONTEXTE DE MISE EN ŒUVRE DE LA CARACTERISATION DE LA PREPARATION ETUDIÉE | 2 |
| 3. CONDITIONS EXPERIMENTALES | 3 |
| 3.1. <i>Choix de la région</i> | 3 |
| 3.2 <i>Choix du lieu d'implantation</i> | 3 |
| 3.3. <i>Choix de la culture</i> | 4 |
| 3.4 <i>Témoins</i> | 4 |
| 3.5 <i>Dispositif expérimental</i> | 4 |
| 3.6 <i>Dimensions des parcelles</i> | 5 |
| 3.7 <i>Disposition des parcelles</i> | 5 |
| 4. APPORTS (TRAITEMENTS) | 5 |
| 4.1 <i>Terme de comparaison</i> | 5 |
| 4.2 <i>Doses à expérimenter</i> | 5 |
| 4.3 <i>Epoques d'apport</i> | 5 |
| 4.4 <i>Réalisation des apports</i> | 5 |
| 4.5 <i>Traitements d'entretien et conduite de la culture</i> | 6 |
| 5. OBSERVATIONS ET NOTATIONS | 6 |
| 5.1 <i>Observations préalables</i> | 6 |
| 5.2 <i>Observations principales</i> | 6 |
| 5.2.1 <i>Organes et variables observés</i> | 6 |
| 5.2.2 <i>Epoques et cadences d'observations</i> | 7 |
| 5.3 <i>Observation de la phytotoxicité</i> | 7 |
| 5.4 <i>Observation de l'effet des apports en conditions pratiques</i> | 7 |
| 5.5. <i>Observation des effets non intentionnels des apports</i> | 8 |
| 5.6. <i>Enregistrement des données agronomiques et météorologiques</i> | 8 |
| 6. ANALYSES STATISTIQUES DES VARIABLES ET INTERPRETATION DES RESULTATS | 8 |
| 6.1. <i>Élaboration des variables</i> | 8 |
| 6.2. <i>Analyses statistiques</i> | 8 |
| 6.2.1. <i>Pour un essai individuel</i> | 8 |
| 6.2.2. <i>Pour un regroupement d'essais</i> | 9 |
| 7. PRESENTATION DES RESULTATS | 9 |
| 7.1. <i>Pour un essai individuel</i> | 9 |
| 7.2. <i>Pour un regroupement d'essais</i> | 9 |
| ANNEXE 1 | 10 |
| ANNEXE 2 | 12 |
| ANNEXE 3 | 13 |
| ANNEXE 4 | 14 |

INTRODUCTION

Dans ce document, la définition d'un biostimulant a été inspirée du projet européen 2016/0084 (COD) (annexe 4) :
[http://www.europarl.europa.eu/oeil-mobile/fiche-procedure/2016/0084\(COD\)](http://www.europarl.europa.eu/oeil-mobile/fiche-procedure/2016/0084(COD))

Le terme « Biostimulant des plantes » définit toute substance (chimiques, extraits naturels, microorganismes...) ou toute combinaison de telles substances, appliquées sur les plantes (parties aériennes ou graines ou environnement racinaire), sur le sol cultivé ou sur tout support de culture, avec l'intention de stimuler les processus naturels des plantes ou de leur environnement, en vue d'améliorer l'une ou l'autre des caractéristiques suivantes et cela indépendamment de la teneur en éléments nutritifs du biostimulant :

- la biodisponibilité, l'absorption,
- la valorisation des éléments nutritifs dans la plante,
- la croissance et le développement des plantes,
- la tolérance aux stress abiotiques,
- la qualité des cultures et de leurs productions.

Exemples de catégories de biostimulants recensées dans le cadre d'une étude pour le MAAF¹ selon leurs natures et origines (non exhaustif) :

- les extraits de végétaux et d'algues,
- les micro-organismes et leurs extraits et dérivés,
- les acides aminés et protéines hydrolysées,
- les substances humiques ou assimilées (ex : acides humiques, acides fulviques, lignosulfonates),
- les substances minérales non nutritives,
- les biomolécules (ex : enzymes, vitamines, antioxydants).

Ce document ne porte que sur l'étude des effets biostimulants. Les principaux effets revendiqués par catégorie de stimulateurs sont détaillés en Annexe 1.

Dans ce document, le terme de biostimulant est réservé aux produits qui ne revendiquent pas d'effet sur les bioagresseurs. Une préparation biostimulante doit démontrer une activité stimulatrice (son mode d'action).

D'un point de vue scientifique, certaines substances peuvent à la fois induire une résistance aux bioagresseurs et une meilleure tolérance aux stress abiotiques. Même s'il est indéniable qu'il existe clairement un *continuum* entre SDP^{2,3} et biostimulants, il est nécessaire de bien séparer ces deux notions. La question de l'expérimentation des produits appelés SDP, induisant chez la plante des réactions aux stress biotiques est traitée dans un autre document de la CEB, Méthode Générale N° 14 (MG 14).

¹ Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt

² Stimulateur de Défense des Plantes

³ Les éliciteurs ou Stimulateur des Défenses des Plantes (SDP) induisent chez la plante des réactions de défense face aux stress biotiques

Au plan réglementaire, la mise sur le marché d'un biostimulant relève de la réglementation relative aux matières fertilisantes et supports de cultures, et non de la réglementation phytopharmaceutique.

Par ailleurs, les substances et régulateurs de croissance sont des produits avec « une action sur les processus vitaux des végétaux, autres que les substances nutritives, exerçant une action sur leur croissance ». A ce titre, ils dépendent du règlement (CE) n° 1107/2009. Il s'agit principalement de produits dont les substances actives sont des phytohormones (naturelles ou de synthèse). Les préparations revendiquant cet usage font l'objet de méthodes CEB distinctes (MG10...).

1. OBJET DE LA METHODE

Ce document a pour objet de préciser les conditions d'expérimentation (contrôlées, semi-contrôlées ou au champ) pour l'étude d'un biostimulant revendiquant les points tels que définis ci-dessus, sur une culture ou un groupe donné de cultures. Cette méthode est recommandée tant pour des essais de R&D que pour des essais pour la procédure de mise en marché.

L'expérimentation est réalisée dans des essais permettant :

- de caractériser l'activité stimulatrice de la préparation,
- de définir l'efficacité intrinsèque de la préparation,
- de préciser et de justifier les revendications d'emploi de la préparation.

D'autres études peuvent concourir à l'évaluation complète de l'efficacité pratique d'une préparation biostimulant :

- l'étude de la sensibilité de la culture,
- les effets non intentionnels de la préparation et les impacts potentiels des biostimulants sur la qualité des végétaux ou des produits végétaux traités,
- les effets secondaires indésirables ou non recherchés.

Ces études font l'objet de méthodes particulières et ne sont pas prises en compte dans cette méthode. Se reporter aux documents de la CEB et méthodes normées (XPU44-166 et 167).

2. CONTEXTE DE MISE EN ŒUVRE DE LA CARACTERISATION DE LA PREPARATION ETUDIÉE

Dans un contexte où les attentes sociétales sur la durabilité des systèmes agricoles sont de plus en plus fortes, les produits de stimulation suscitent un intérêt grandissant auprès des acteurs du monde agricole.

De par leurs modes d'action originaux, les « biostimulants » visent à améliorer le fonctionnement du sol, de la plante ou les interactions sol-plante à travers la stimulation de processus biologiques. Les biostimulants peuvent apparaître comme un moyen pour promouvoir ou maintenir une agriculture performante en améliorant la nutrition des plantes, donc en limitant les apports en engrais.

L'activité de stimulation de la préparation doit être démontrée pour justifier la (les) catégorie(s) de revendications détaillée(s) en Annexe 1.

L'activité de stimulation peut être démontrée en conditions contrôlées ou au champ. Les conditions contrôlées regroupent tout mode de culture (serre, chambre climatique, enceinte climatisée) permettant de simplifier et miniaturiser les conditions de production d'une plante d'intérêt agronomique. Il est impératif de préciser les conditions utilisées : *in vitro/in planta*, espèces végétales, organes, température, éclairage (durée, intensité), hygrométrie, nutriments... Ces essais peuvent permettre de connaître le (les) mode(s) d'action.

Il est conseillé de confirmer la (les) revendication(s) de la préparation dans des essais au champ et/ou en conditions contrôlées, dont la méthodologie figure dans le chapitre 3.

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

L'objectif des essais d'efficacité est de démontrer l'intérêt du biostimulant en apportant les données en fonction des activités revendiquées.

L'étude des biostimulants est conduite dans différents types d'essais. Il est conseillé de réaliser des essais en conditions contrôlées, préalablement à l'expérimentation de plein champ, pour caractériser le type d'activité de la préparation étudiée et faire la démonstration de son activité de stimulation des plantes. Ces essais permettent de connaître le (les) mode(s) d'action, les doses efficaces, les modes et périodes d'apport recommandés, éventuellement les formulations ou associations de biostimulants les mieux adaptées.

Se reporter à l'annexe 2 des exemples de paramètres analysables pour la mise en évidence des effets revendiqués (liste non exhaustive).

Selon la catégorie de revendication, les conditions expérimentales doivent être adaptées afin d'améliorer la mise en évidence des effets.

Se reporter au tableau de l'annexe 3

Le choix de la plante ou de l'organe de la plante utilisée en conditions contrôlées doit être justifié et en cohérence avec l'effet attendu.

3.1. Choix de la région

Ce choix est indifférent en conditions contrôlées.

Pour l'expérimentation au champ, se placer dans les régions où les conditions pédo-climatiques favorisent l'expression des effets revendiqués et où les cultures visées sont représentatives.

3.2 Choix du lieu d'implantation

Il est recommandé d'implanter l'essai sur un site ou un lot de plantes, traité de manière homogène.

Pour l'expérimentation au champ, il est souhaitable de connaître et de tenir compte de l'historique du sol de la parcelle où est implanté l'essai. Il peut être nécessaire de répéter

l'expérimentation sur plusieurs cycles de culture sur une même parcelle, notamment lorsque l'effet revendiqué ne se manifeste qu'à long terme et si les cultures entrant dans la rotation le permettent.

Dans le cas de l'évaluation des stress abiotiques en champs, la nature du stress (hydrique, thermique, pH, salinité...) doit être définie ainsi que son intensité, sa durée et sa période d'application en rapport avec les stades phénologiques de la culture. L'exposition à ces stress peut nécessiter une expérimentation en conditions contrôlées.

3.3. Choix de la culture

Il est proposé de réaliser les expérimentations d'efficacité sur des cultures représentatives des catégories de revendications. Le pétitionnaire choisit la culture et la variété qui lui paraît la plus pertinente et mesurera les paramètres qui démontrent le mieux les effets biostimulants revendiqués. Si la culture n'est pas représentative, justifier ce choix.

3.4 Témoins

Pour la disposition des témoins dans le dispositif, se reporter à la méthode DT n° 4 de la CEB.

Un témoin non traité est nécessaire.

Dans certains cas [(biostimulant renfermant un (plusieurs) élément(s) fertilisant(s)], un niveau d'apport équivalent doit être appliqué sur le témoin afin de juger spécifiquement de l'effet biostimulant.

Remarque : un apport 100 % minéral en quantité équivalente à des molécules organiques n'aura pas une efficacité comparable. En effet, la mise à disposition des éléments nutritifs à partir de molécules organiques prend du temps et atteint rarement 100 % sur une saison.

Lorsqu'il y a revendication d'un effet biostimulant vis à vis d'un stress, il conviendra d'appliquer au(x) témoin(s) et plus généralement à l'ensemble des modalités le même stress qu'à la modalité expérimentale. Dans le cas où le dispositif contient une modalité traitée non stressée, il est conseillé d'ajouter une modalité non traitée non stressée.

Pour l'expérimentation au champ, généralement le témoin non traité est inclus. Mais selon le niveau d'hétérogénéité de la parcelle ou le type de biostimulant (notamment les microorganismes), le(s) témoin(s) peu(ven)t être exclu(s), imbriqués(s) ou adjacents(s).

A titre d'exemple :

- exclus pour les micro-organismes du fait de risque de diffusion,
- imbriqués pour les préparations anti-stress (abiotique),
- adjacents pour les préparations de la stimulation de la croissance.

Dans le cadre de l'évaluation sous stress hydrique, il est conseillé d'ajouter un témoin traité eau. Est entendu « témoin traité eau », un témoin qui reçoit la même quantité d'eau totale apportée par la bouillie de la modalité traitée, afin de juger de l'impact de l'apport hydrique sur l'effet revendiqué.

3.5 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est adapté à l'objectif de l'étude et à la catégorie de revendication et doit être justifié. Il est conseillé d'adapter le nombre de blocs au degré de liberté cohérent. Il doit être conçu pour permettre une analyse statistique des données.

Il est conseillé d'atteindre un minimum de degrés de liberté = 12 (puissance statistique suffisante). Se reporter à la méthode DT n° 6 de la CEB et autres documents relatifs aux analyses statistiques des expérimentations agronomiques.

A titre d'exemple :

- pour 1 site : 4 blocs et minimum de 5 modalités OU 3 blocs et un minimum de 7 modalités,
- pour 4 sites : 3 blocs et 3 modalités.

Pour l'expérimentation au champ, choisir des parcelles aussi homogènes que possible et/ou utiliser des dispositifs expérimentaux adéquates (carré latin, split-plot...)

A titre d'exemple : le split-plot est particulièrement adapté pour des essais sur les biostimulants impliquant différents niveaux de fertilisation (prise en compte du gradient de fertilisation comme contrainte technique).

3.6 Dimensions des parcelles

Il est conseillé d'adapter la taille des parcelles et l'échantillonnage au type de culture et de la préparation, en prenant en compte le nombre d'observations, la taille des échantillons (destructifs ou non), le rendement et les effets de bordure.

3.7 Disposition des parcelles

Aucune spécificité particulière.

4. APPORTS (TRAITEMENTS)

4.1 Terme de comparaison

Il est conseillé de choisir un terme de comparaison ayant le même type d'effet revendiqué que la préparation étudiée.

4.2 Doses à expérimenter

Les doses à étudier sont déterminées dans des essais préliminaires.

Il est conseillé de choisir une gamme de doses incluant la dose supposée efficace.

4.3 Epoques d'apport

Les périodes et les conditions d'application sont déterminées dans des essais préliminaires.

Il est conseillé d'étudier avec précision le (les) paramètre(s) de la culture qui permettent la meilleure expression de l'efficacité en fonction de l'effet revendiqué : le stade phénologique de la plante, son état physiologique, son exposition à des stress et tout autre paramètre pouvant influencer sur l'efficacité de la préparation.

4.4 Réalisation des apports

Les modes d'application sont précisés en fonction des caractéristiques du biostimulant.

A titre d'exemple : pour l'évaluation de microorganismes, veiller au maintien de l'intégrité/viabilité de la population.

Pour se faire :

- en cas d'application par pulvérisation, choisir des buses et une pression adaptées,
- en cas d'application au sol, veiller aux modalités d'apport (localisation, incorporation...),
- considérer certains paramètres biologiques et chimiques qui conditionnent la survie des souches microbiennes : le pH et le statut organique du sol, les teneurs en éléments nutritifs, la sensibilité aux produits phytosanitaires, photosensibilité...

4.5 Traitements d'entretien et conduite de la culture

Choisir un itinéraire cultural adapté à l'expression de l'efficacité des biostimulants (cf. Annexe 3).

Certains fertilisants, régulateurs de croissance ou traitements phytosanitaires peuvent interférer avec l'efficacité des biostimulants et notamment des micro-organismes. Il est important de noter tous les traitements et les dates de traitements pour en tenir compte dans l'analyse des résultats. Toute intervention et apport d'intrants doivent être strictement identiques sur l'ensemble des parcelles.

5. OBSERVATIONS ET NOTATIONS

5.1 Observations préalables

Ces observations réalisées avant la mise en place de l'essai sont destinées à s'assurer de l'homogénéité de la culture.

5.2 Observations principales

Il appartient au pétitionnaire de déterminer les variables observées les plus pertinentes pour démontrer l'effet revendiqué. Dans le cas de la mise en place d'un réseau d'essais, ces mêmes variables seront observées sur toutes les parcelles de tous les essais du réseau.

5.2.1 Organes et variables observés

Selon les effets revendiqués, il peut être utile d'observer les paramètres suivants :
(Liste non exhaustive, cf. Annexes 1 et 2)

5.2.1.1 Au niveau des plantes

- La levée et l'implantation de la culture.
- La densité, le tallage de la culture...
- Les effets quantitatifs et qualitatifs sur le développement aérien :
 - taille et dimension des organes et/ou des plantes,
 - biomasse (matière fraîche et/ou sèche selon une méthodologie normalisée pour toute l'expérimentation),
 - composition minérale,
 - port de la plante (culture),
 - couleur et aspect (carence ...) du feuillage, surface foliaire...,
 - composantes du rendement.

- Les effets quantitatifs et qualitatifs sur le développement racinaire :

- biomasse (matière fraîche et/ou sèche),
- ramification, longueur...,
- aspect des racines.

- L'indice de nutrition / vitalité de la plante (index chlorophyllien, etc.).

- La vitesse de développement de la plante aux stades phénologiques pertinents pour la culture considérée (germination, floraison...).

5.2.1.2 Au niveau de la récolte / production

Selon les catégories de revendication, il peut être utile d'enregistrer les composantes quantitatives et/ou qualitatives de la récolte et/ou post-récolte : poids, calibre, nombre, qualité organoleptique, et/ou nutritionnelle, et/ou selon critères commerciaux, aptitude à la conservation et/ou à la transformation...

5.2.2 Epoque et cadences d'observations

La cadence et l'époque des observations sont choisies en fonction des cultures, des effets revendiqués et des objectifs de l'expérimentation.

5.3 Observation de la phytotoxicité

Une première approche de la sensibilité de la culture est obtenue à partir d'observations complémentaires réalisées dans les essais d'efficacité. Cette approche doit néanmoins être complétée par des essais spécifiques de sensibilité de la culture, lorsqu'il apparaît des symptômes de phytotoxicité dans les essais d'efficacité. Au laboratoire, il est possible d'évaluer la phytotoxicité selon les normes XPU 44-166 et XPU 44-167. Au champ, se reporter à la méthode générale CEB "Principes généraux d'étude de la sensibilité des cultures" – AFPP n° MG 12.

5.4 Observation de l'effet des apports en conditions pratiques

En raison de la diversité des préparations biostimulantes et de leurs modes d'action, l'efficacité des produits de stimulation est parfois difficile à démontrer, en particulier lors d'essais d'efficacité intrinsèque de la préparation réalisée en plein champ. Ainsi, il apparaît essentiel de favoriser des approches permettant l'intégration des biostimulants dans des programmes complets de production agricole.

Ces essais complètent les essais d'efficacité en prenant en compte toutes les implications techniques et éventuellement technico-économiques d'une préparation utilisée dans les conditions proches de ses futures applications agronomiques.

Ils ont pour but de :

- valider leur intérêt pratique, si cette démonstration n'est pas complètement faite dans les essais d'efficacité au champ,
- préciser les modalités d'utilisation de la préparation jusqu'à la récolte éventuellement en justifiant les revendications d'emploi.

A cet effet, il peut être utile :

- de définir des programmes,
- d'affiner les conditions d'utilisation et/ou d'application,
- de proposer des associations de biostimulants entre eux ou avec d'autres intrants (cf. Annexes 2 et 3).

Pour la réalisation de ces essais, se reporter à la méthode générale CEB "Principes généraux d'étude de la valeur pratique » – AFPP N° MG 13.

5.5. Observation des effets non intentionnels des apports

L'évaluation des effets non intentionnels, incluant les effets sur les organismes non cibles ainsi que l'incidence des préparations biostimulantes sur la qualité des végétaux ou produits végétaux, font l'objet de méthodologies spécifiques (voir liste des méthodes CEB régulièrement mises à jour).

Pas de spécificité propre à cette méthode.

5.6. Enregistrement des données agronomiques et météorologiques

Il est souhaitable, au cours de l'essai, d'acquérir le plus de renseignements possibles pour ensuite utiliser ces données comme co-variables explicatives des efficacités observées. On pourra par exemple estimer les stress et leur intensité, noter les symptômes de retard de végétation ou toute anomalie de culture.

Pour l'expérimentation au champ, effectuer toute mesure pertinente (relevés climatiques, profil de sol, analyses de sol...) servant à caractériser l'intensité et la durée des stress.

A titre d'exemple, dans le cas des céréales à paille, les stress principaux à surveiller sont les stress hydriques et azotés.

6. ANALYSES STATISTIQUES DES VARIABLES ET INTERPRETATION DES RESULTATS

6.1. Élaboration des variables

Préciser le mode d'obtention des variables calculées à partir des variables observées

6.2. Analyses statistiques

6.2.1. Pour un essai individuel

La séquence de l'analyse se déroule comme suit :

- L'essai est-il réaliste, c'est-à-dire capable de fournir des données utiles ?
- Les résultats sont-ils cohérents ?
- Pour cela, il faut que par comparaison au(x) témoin(x), le terme de référence donne des résultats attendus.
- Si ces 2 conditions sont remplies, et après une transformation éventuelle, les variables qui résultent d'une mesure ou d'une estimation visuelle sont soumises à une analyse de variance. Cette analyse peut être suivie de deux tests :

- Test de DUNNETT pour comparer les modalités étudiées au terme de comparaison (et/ou témoin non traité),
- Test de NEWMAN et KEULS pour comparer les modalités étudiées entre elles.

Lorsque les observations ne permettent qu'un classement des parcelles ou qu'une notation, on réalise un test non paramétrique, test de FRIEDMAN dans le cas d'un dispositif blocs, suivi d'un test de comparaison multiple basé sur les rangs.

6.2.2. Pour un regroupement d'essais

Il peut être intéressant d'effectuer un regroupement en fonction de critères comparables. Le type d'analyse statistique à réaliser est à adapter en fonction du réseau d'essais.

7. PRESENTATION DES RESULTATS

7.1. Pour un essai individuel

Elle est adaptée aux observations principales réalisées.

Pour les observations portant sur les aspects quantitatifs et qualitatifs de la récolte, les résultats du témoin sont présentés en valeur absolue et les résultats des parcelles traitées sont présentés en valeur relative (pourcentage d'efficacité) ou en valeur absolue.

Dans le cas où plusieurs dates d'observation sont réalisées, une représentation graphique est souhaitable.

7.2. Pour un regroupement d'essais

Les résultats peuvent être présentés sous forme de tableaux ou graphiques en mentionnant par exemple :

- l'époque d'observation,
- le stade de la culture, l'organe observé,
- le nombre d'essais, le nombre d'applications.

Les résultats du (ou des) témoin(s) sont présentés en valeur absolue.

Les résultats des modalités sont présentés en valeur relative ou en valeur absolue moyenne en indiquant la dispersion.

ANNEXE 1

Détail des revendications agronomiques associées aux produits de stimulation d'après le rapport final : Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes. BIO by Deloitte (BIO) et RITTMO Agroenvironnement (RITTMO)- Décembre 2014).

Liste non exhaustive et expurgée des revendications phytosanitaires (PPP)

| Revendications | Détails des effets revendiqués |
|--|--|
| Résistance aux stress abiotiques | <ul style="list-style-type: none"> - Tolérance accrue au froid (y compris gel) ou au chaud - Tolérance à la salinité - Tolérance aux stress oxydatifs (dont UV, ozone) - Tolérance accrue à la sécheresse ou à l'excès d'eau |
| Croissance et développement | <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation du taux de germination - Précocité accrue de la germination - Action positive sur le tallage et le grossissement des grains - Stimulation du nombre d'inflorescences - Développement favorisé des bourgeons - Stimulation de la croissance végétative - Stimulation de la production d'hormones végétales bénéfiques à la croissance - Augmentation de la biomasse foliaire - Stimulation du développement racinaire en densité et profondeur - Renforcement du système racinaire - Amélioration de l'efficacité photosynthétique - Augmentation de la teneur en chlorophylle |
| Meilleure absorption des éléments nutritifs | <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de la nutrition des plantes - Augmentation de la biodisponibilité des éléments minéraux - Solubilisation des éléments minéraux - Amélioration de l'absorption de l'azote - Renforcement de la capacité d'absorption de l'eau et des nutriments - Optimisation de la libération des éléments nutritifs - Amélioration de la structure physique des sols - Formation de mycorhizes - Stimulation de la nitrate réductase - Production d'auxines par la microflore - Stimulation de l'activité microbienne du sol - Stimulation de la dégradation de la matière organique - Augmentation de la diversité et de l'activité microbiologique des sols |
| Meilleure qualité des récoltes | <ul style="list-style-type: none"> - Organoleptique (teneur en sucre et autres molécules) - Nutritionnelle (teneur en vitamines, protéines, nutriments, sucres, etc.) - Visuelle (couleur des fruits) - Technique (meilleure tolérance au stockage ou à la manipulation) - Amélioration de la fermeté des fruits pour le stockage |

| Revendications (suite) | Détails des effets revendiqués |
|---|---|
| Produits de stimulation : | |
| Gain économique (dont augmentation des rendements) | <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration du calibre des fruits - Augmentation de la quantité de graines - Augmentation de la quantité de fruits - Amélioration de l'efficacité des engrais pour en réduire la quantité |
| Gain environnemental | <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de l'efficacité des engrais pour en réduire la quantité - Augmentation de la diversité microbologique des sols - Diminution de l'utilisation d'eau |

ANNEXE 2

Exemples de paramètres analysables pour la mise en évidence des effets revendiqués (liste non exhaustive):

| Essais en conditions contrôlées | Essais au champ |
|--|---|
| Evaluation des paramètres techniques, organoleptiques et/ou nutritionnels majeurs propres à la culture concernée | Evaluation des paramètres techniques, organoleptiques et/ou nutritionnels majeurs propres à la culture concernée |
| | Evaluation d'une baisse éventuelle d'intrants fertilisants |
| Analyses des formes solubles assimilables selon les méthodes disponibles au laboratoire N P K S | Analyses des formes solubles assimilables Azote Pas de méthode pour les autres éléments Méthodes disponibles pour les éléments majeurs Analyses de teneurs d'éléments minéraux + mesures de biomasse Méthodes des isotopes |
| Estimation de la vigueur, couleur, comportement des plantes | Estimation de la vigueur, couleur, comportement des plantes |
| Evaluation des biomasses aérienne et/ou racinaire (matière fraîche et sèche) Evaluation de l'architecture racinaire (ramification, longueur, ...) Evaluation de l'architecture aérienne (taille et dimension des organes, port de la plante ...) | Evaluation des biomasses aérienne et/ou racinaire (matière fraîche et sèche) La préparation des échantillons en vue des analyses de matière sèche des analyses des éléments minéraux doit être soignée. (*) |

(*) A cet effet débarrasser les végétaux de la terre adhérente, laver les parties à analyser. **Le lavage est réalisé avec de l'eau distillée ou déminéralisée.**

ANNEXE 3

Conseils pour la mise en évidence des effets des biostimulants

| catégorie de revendication | | Conseils |
|--|---------------------|---|
| Effet nutritionnel indirect (biodisponibilité / absorption / mobilisation) | | <ul style="list-style-type: none"> ○ Favoriser la maîtrise des éléments majeurs et mineurs pour éviter des conditions expérimentales ne permettant pas le discernement de l'effet recherché (au minimum pour les éléments N, P et K). Gestion globale et intégrée du programme de fertilisation selon la culture cible. ○ Se placer dans des conditions d'apport de fertilisants (comme dans un itinéraire technique) à des doses sub-optimales, optimales et en excès de fertilisation par rapport aux besoins des cultures. En effet, ces substances vont stimuler la croissance ou rendre disponible certains éléments nutritifs mais pas nourrir directement la plante. En l'occurrence, un certain niveau de fertilisation est nécessaire, tout en évitant que celui-ci ne provoque des états de surnutrition préjudiciables à la mise en évidence de l'effet du produit testé. L'imprécision des méthodes de détermination <i>a priori</i> des doses d'éléments majeurs rend nécessaire l'utilisation d'une gamme d'apport (ou courbe de réponse) pour être sûr de ne pas se situer dans des cas de sur-fertilisation. ○ Pour les analyses liées à l'évaluation des teneurs en éléments minéraux dans la plante, s'assurer que les données mesurées ne sont pas faussées par la présence de ces éléments restant à la surface des organes étudiés. |
| Tolérance au Stress abiotique | Stress hydrique | <ul style="list-style-type: none"> ○ Préférer les conditions hydriques contrôlées (modulation possible des volumes et/ou des périodes d'apport). Apporter une attention particulière à la nature et la profondeur du sol qui est à relier au niveau de réserve hydrique. ○ Prévoir un diagnostic <i>a posteriori</i> de la disponibilité en eau pour diagnostiquer le stress hydrique du site (a minima un bilan correctement paramétré, voire la mise en place de capteurs de l'état hydrique du sol (tensiomètres, sondes capacitives)... ○ Témoin traité eau (quantité d'eau apportée par la bouillie de la modalité traitée, afin de juger de l'impact de l'apport hydrique du volume appliqué sur les modalités) |
| | Stress salin | <ul style="list-style-type: none"> ○ Favoriser les sites avec aspersion ou irrigation (accentue le stress) |
| | Stress thermique | <ul style="list-style-type: none"> ○ Témoin traité eau (et non un témoin sans application) |
| Qualité de la production : critères d'impact sur la qualité de la production (entre autre facteurs de rendement, caractères organoleptiques, etc) | | Cf. méthodes et référentiels adaptés si disponibles |

ANNEXE 4

Définitions et références relatives au document

Définition officielle des biostimulants des plantes selon projet européen 2016/0084 (COD) :

A plant biostimulant shall be a EU fertilising product the function of which is to stimulate plant nutrition processes independently of the product's nutrient content with the sole aim of improving one or more of the following characteristics of the plant:

- a) nutrient use efficiency,
- b) tolerance to abiotic stress, or
- c) quality traits.

Un biostimulant des végétaux est un produit qui stimule les processus de nutrition des végétaux indépendamment des éléments nutritifs qu'il contient, dans le seul but d'améliorer une ou plusieurs des caractéristiques suivantes des végétaux :

- a) l'efficacité d'utilisation des éléments nutritifs,
- b) la tolérance au stress abiotique, ou
- c) les caractéristiques qualitatives du végétal cultivé.

Références :

- CEB : Expérimentation des préparations naturelles stimulatrices de la vitalité des plantes - AFPP N° **DT 20**.
- OEPP : Design and analysis of efficacy evaluation trials – PP1/152 (4)
- Rapport final : Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes. BIO by Deloitte (BIO) et RITTMO Agroenvironnement (RITTMO). Rapport final-décembre 2014.
- 2016/0084 draft reference