



**Deploy plant protection through biocontrol
Focus on qPFD[®] improvements
(Protect + project, 2018-2023)**
Jean-Philippe EUSTACHE & Nicolas MACAIGNE (TIMAB Magnésium – Groupe Roullier)
Marie-Noëlle BRISSET & Brice MAROLLEAU (INRAE/UMR IRHS)
Antoine MENIL & Klervi CRENN (Vegenov)

Founded and supported by



Protect + project

Project FUI AAP 25

- Project leader : TIMAB Magnésium
- Duration : 5 years (Sept 2018 – Sept 2023)
- Budget : 2 167 k€
- Founded : 886 k€



Partners



Combination of modes of action within an innovative product and tool to help choose the protection strategy with regard to environmental constraints

2 Achievements of the projects presented here :

- Development of a new qPFD[®] tool to study PRI (Plant Resistance Inducer) activity on rapeseed
- Development of a biosolution based on a magnesium product and PRI molecules

Development of a new qPFD[®] tool to study PRI activity on rapeseed

What is qPFD[®]?

- ◆ **Puce à Faible Densité quantitative** = Quantitative Low Density Chip
- ◆ INRAE patent (license held by Vegenov)
- ◆ Molecular tool to study the mode of action of a PRI product
 - ◆ 28 genes involved in plant immune responses + 3 control genes
 - ◆ Highlighting 2 types of PRI:

Direct effect



Pests

Potentiator













Table : Genes of the potato qPFD[®]

Defense classes and sub-classes		Code	Gene names
Chemical and/or Physical barriers	PR proteins	PR-1	Pathogenesis-related protein 1
		PR-2	Pathogenesis-related protein 2 (glucanases)
		PR-4	Pathogenesis-related protein 4 (hevein-like)
		PR-5	Pathogenesis-related protein 5 (thaumatin-like, osmotin)
		PR-8	Pathogenesis-related protein 8 (class III chitinase)
		PR-14	Pathogenesis-related protein 14 (lipid transfer protein)
		PR-15	Pathogenesis-related protein 15 (oxalate oxidase)
	Phenylpropanoid pathway	PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
		CHS	Chalcone synthase
		DFR	Dihydroflavonol reductase
		ANS	Anthocyanidin synthase
		PPO	Polyphenol oxidase
	Isoprenoid pathway	HMGR	Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase
		FPPS	Farnesyl pyrophosphate synthase
		Far	(E,E)-alpha-farnesene synthase
	Cysteine pathway	CSL	Cysteine lyase
	Oxydative stress	APOX	Ascorbate peroxidase
		GST	Glutathion S-transférase
		POX	Peroxidase
	Cell wall modification	CalS	Callose synthase
Pect		Pectin methyl esterase	
CAD		Cinnamyl alcool dehydrogenase	
Hormonal signaling	SA (Salicylic acid) pathway	EDS1	Disease resistance protein EDS1
		WRKY	WRKY transcription factor 30
	JA (Jasmonic acid) pathway	LOX2	Lipoxygenase AtLOX2
		JAR	Jasmonate resistant 1
	ET (Ethylene) pathway	ACCO	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
		EIN3	EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 1

Development of a new qPFD[®] tool to study PRI activity on rapeseed

qPFD[®] overview

	Apple	Tomato	Vine	Potato	Wheat	Carrot	Rapeseed
Already developed					 Improved in Protect+		 New
In progress		 Rose bush		 Sunflower		 Barley	

Development of a new qPFD[®] tool to study PRI activity on rapeseed

Strategy for a rapeseed qPFD[®] development

Samples :

- Aviron
- Axana
- Westar



PRIs or water



2 bioassays

RNAseq of 12 pools of samples
(PRIs vs. water)

Identification of « responsive » genes in qPFD[®] multigene families

Design of primers

qPFD v1

Development of a new qPFD® tool to study PRI activity on rapeseed

Validation of primers in sample library --> Creation of qPFD v1

		PR proteins										Secondary metabolism										Oxidative str.		Cell wall modification			SA		JA		ET	
		PR1	PR2	PR4	PR5	PR10	PR14	PR15	PDF1.2	PGIP2	PAL	FNS	MAM	PEN2	SOT16	CYP79B2	IGMT1	FPFS	TPS	APX	GST	CALS	PECT	CAD	EDS1	WRKY	LOX	AOS	ACCS	EIN3		
Westar	Adjuvant	-0,2	1,2	2,7	-0,4	0,0	1,4	0,5	-1,2	1,2	-0,3	-1,5	-1,3	-1,8	-0,4	-1,2	-1,4	-0,6	1,5	0,5	0,2	0,0	-0,1	0,0	-0,6	3,6	-0,6	-0,2	-0,4	-0,2		
		0,3	-0,4	1,7	-0,4	1,8	0,5	-0,7	-1,6	-1,8	0,4	1,3	2,1	-0,2	-0,6	-0,9	3,0	-0,1	0,9	0,0	0,0	-0,2	-0,9	-0,2	0,0	2,9	-0,4	-0,5	0,2	-0,2		
	Baba	0,4	1,7	3,1	0,1	-1,0	-0,6	0,2	-0,8	2,2	-0,5	0,6	-0,9	-1,6	-0,8	-0,9	-2,2	-0,5	3,6	0,2	0,5	0,0	0,2	-0,4	-0,4	2,6	-0,6	0,2	-0,8	0,0		
		4,8	6,8	10,6	4,2	1,2	-0,3	1,8	0,6	-1,2	1,7	2,6	1,4	-0,4	-0,3	-0,9	6,4	-0,4	1,6	0,9	4,6	0,4	0,3	0,1	0,6	7,2	0,2	-0,8	0,6	0,3		
	Bion	6,3	7,5	12,9	5,2	-2,8	-1,7	3,0	3,5	-2,4	3,0	1,4	-0,9	-1,9	-0,2	-0,5	2,5	-0,6	-1,3	2,5	5,6	1,3	2,2	0,2	2,3	8,4	-2,7	-0,2	1,4	0,6		
5,5		6,6	10,6	4,0	-0,9	-2,1	2,3	3,0	-2,3	1,9	2,7	3,3	-3,8	0,7	-0,6	5,4	-0,2	-0,1	0,5	4,2	0,5	1,3	-0,1	2,9	8,6	-0,2	-0,6	2,7	2,2			
Meja	1,3	2,3	5,7	0,5	-0,3	0,8	1,3	0,0	6,0	0,7	7,9	6,5	7,6	1,6	2,0	1,7	-0,7	9,4	1,3	1,2	-0,1	0,1	-0,2	-0,2	6,0	1,9	4,4	0,0	1,8			
	4,2	4,9	6,8	2,2	2,7	2,3	0,2	1,5	4,2	1,5	9,9	9,4	7,1	0,8	1,4	7,8	0,0	9,6	0,4	2,1	0,3	0,4	0,4	1,0	5,7	3,1	2,9	0,4	0,8			
Axana	Adjuvant	1,4	3,7	4,2	2,1	-0,2	-0,7	0,5	0,9	1,7	-0,1	-1,4	0,1	0,3	0,1	-0,1	1,5	-0,4	0,3	0,1	2,7	0,2	-0,2	0,0	0,2	3,4	0,5	0,3	-0,7	0,6		
		0,8	1,5	1,6	1,7	-0,2	1,8	0,0	-0,3	-0,3	-0,3	-0,3	-0,6	0,3	-0,2	-0,4	0,3	-0,2	0,2	0,0	2,3	0,1	0,2	0,2	0,2	2,7	0,5	-0,5	-0,5	0,0		
	Baba	-0,9	0,6	2,1	0,9	-0,6	1,9	-0,2	-0,3	0,0	-1,3	-1,7	0,6	-0,6	0,2	-0,3	0,4	-0,7	-1,2	0,5	1,2	1,1	-0,1	0,5	-0,2	2,8	-0,2	0,5	0,4	-0,5		
		4,1	5,1	5,8	3,1	-0,3	1,6	0,7	3,2	0,6	-0,9	0,5	-2,5	-1,1	-0,4	-0,1	0,3	-0,4	2,2	-0,8	2,5	-0,1	1,2	0,2	0,5	4,1	0,3	-0,6	0,6	0,5		
	Bion	4,4	6,8	13,4	4,6	-4,3	-3,0	3,1	3,2	-1,3	2,1	-0,5	-3,3	-2,5	1,8	1,5	4,7	0,0	-4,1	1,8	5,3	-0,6	1,1	-0,1	1,9	8,6	-1,2	-0,2	0,9	0,8		
6,7		7,9	10,0	6,7	-2,7	-2,7	2,5	5,4	-3,4	0,5	0,1	-3,1	-2,5	0,5	0,3	4,0	-0,2	2,0	0,8	6,0	0,2	2,4	0,2	3,2	7,4	-1,7	-1,7	0,5	0,2			
Meja	-1,1	1,5	2,5	-0,1	1,6	2,5	0,0	-2,7	6,4	0,0	9,9	6,5	9,4	1,1	2,1	2,6	-0,6	5,7	0,9	0,3	0,5	-0,6	0,4	-0,3	3,2	2,7	4,5	-0,4	0,7			
	5,2	5,6	7,0	4,0	1,9	2,9	1,2	4,3	4,3	0,3	12,2	4,8	8,1	1,9	2,6	3,7	-0,4	5,9	0,7	3,4	-0,9	0,4	-0,1	0,8	5,2	3,1	3,0	-0,6	0,5			
Aviron	Adjuvant	-1,3	-0,5	0,1	0,1	-0,7	-0,5	0,3	-1,0	1,2	0,0	0,2	-0,5	1,1	0,5	0,9	2,0	-0,1	2,6	0,2	2,1	0,2	0,6	0,2	-0,2	0,9	1,0	0,1	0,1	0,4		
		-2,2	-1,1	0,9	-0,8	0,3	-0,9	-0,6	-1,0	-0,2	1,0	0,7	0,4	-0,1	0,3	0,1	-1,7	0,0	-0,5	0,0	-2,2	-0,6	-1,0	-0,2	-0,1	-1,5	0,9	0,4	-0,4	0,0		
	Baba	0,2	2,7	10,5	1,6	-0,4	0,0	1,1	-0,8	0,1	0,9	1,8	-0,8	0,9	0,2	0,3	3,7	-0,1	1,4	0,3	4,4	-0,2	-0,3	-0,4	-0,1	5,9	-0,9	-1,0	0,2	-0,5		
		-4,2	-1,4	0,9	-0,1	0,6	0,7	-0,4	-1,2	1,0	1,2	0,5	0,0	0,3	0,3	0,4	0,6	0,2	1,1	0,5	0,4	-1,0	-1,3	-0,1	-0,5	1,2	1,1	0,8	-0,4	-0,2		
	Bion	3,7	6,3	12,3	4,2	-6,1	-1,8	3,2	1,8	-3,0	1,6	-0,2	-5,5	-4,3	2,7	0,7	6,7	0,2	0,9	1,1	5,9	0,7	3,0	0,1	2,3	9,6	-1,3	-2,8	1,0	0,6		
1,4		4,4	11,0	2,4	-2,5	-1,8	2,5	1,2	-1,9	2,5	4,8	-1,3	-1,1	2,9	1,9	4,3	0,4	-1,3	1,0	3,3	-0,3	1,2	-0,3	1,6	6,3	-0,2	0,6	0,4	0,5			
Meja	-0,4	1,5	2,2	-0,4	0,7	1,5	0,1	-1,5	3,9	1,2	10,4	1,9	7,8	0,7	1,2	3,3	-0,1	5,6	0,6	0,8	-0,5	-1,6	-0,2	-0,5	3,3	1,6	2,2	-0,3	0,5			
	-2,0	-1,7	3,7	-0,3	1,6	-0,5	-0,1	-1,9	2,7	0,6	8,1	1,4	4,9	-0,6	-0,1	1,5	-0,3	2,5	0,0	0,4	-0,2	-0,6	-0,2	-0,5	1,2	2,1	2,1	0,0	-0,1			

- ≠ patterns of expression according to the PRI applied
- ≠ responsiveness of the varieties tested

Development of a new qPFD[®] tool to study PRI activity on rapeseed

Validation of primers in sample library --> Creation of qPFD v1

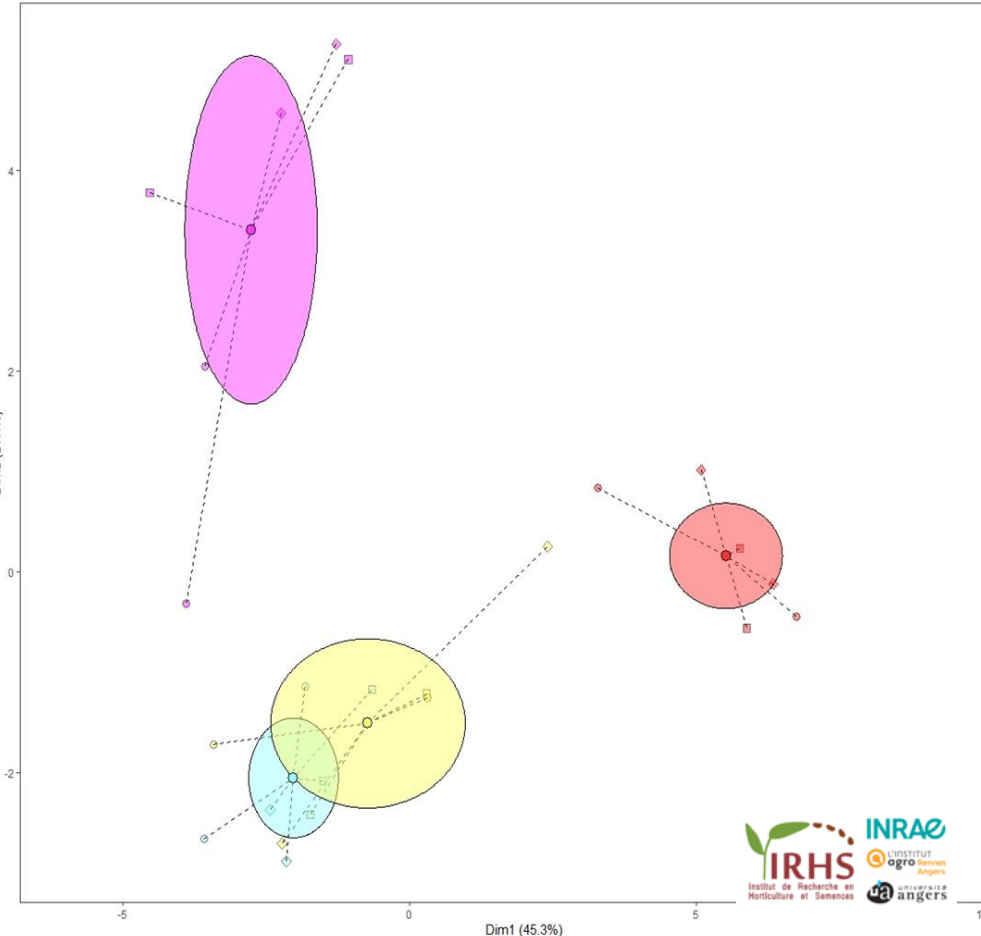
		PR proteins									Secor			
		PR1	PR2	PR4	PR5	PR10	PR14	PR15	PDF1.2	PGIP2	PAL	FNS	MAM	PEN2
Westar	Adjuvant	-0,2	1,2	2,7	-0,4	0,0	1,4	0,5	-1,2	1,2	-0,3	-1,5	-1,3	-1,8
		0,3	-0,4	1,7	-0,4	1,8	0,5	-0,7	-1,6	-1,8	0,4	1,3	2,1	-0,2
	Baba	0,4	1,7	3,1	0,1	-1,0	-0,6	0,2	-0,8	2,2	-0,5	0,6	-0,9	-1,6
		2,6	1,4	-0,4	1,4	-0,9	-1,9	2,7	3,3	-3,8	7,9	6,5	7,6	9,9
Bion	7,9	6,5	7,6	9,9	9,4	7,1	-1,4	0,1	0,3	-0,3	-0,6	0,3	-1,7	
Axana	Adjuvant	-1,4	0,1	0,3	-0,3	-0,6	0,3	0,5	-2,5	-1,1	-0,5	-3,3	-2,5	0,1
		0,1	-3,1	-2,5	9,9	6,5	9,4	2,2	4,8	8,1	0,2	-0,5	1,1	0,7
	Baba	1,8	-0,8	0,9	0,5	0,0	0,3	3,7	6,3	12,3	4,2	-6,1	-1,8	3,2
		1,8	-0,8	0,9	0,5	0,0	0,3	1,4	4,4	11,0	2,4	-2,5	-1,8	2,5
Aviron	Adjuvant	0,2	-0,5	1,1	0,7	0,4	-0,1	1,8	-0,8	0,9	0,5	0,0	0,3	1,6
		0,7	0,4	-0,1	1,8	-0,8	0,9	0,5	0,0	0,3	1,6	-0,2	-5,5	-4,3
	Baba	1,8	-0,8	0,9	0,5	0,0	0,3	1,2	-1,9	2,7	2,5	4,8	-1,3	-1,1
		1,2	10,4	1,9	7,8	0,6	8,1	1,4	4,9	-0,4	1,5	2,2	-0,4	0,7
Meja	-2,0	-1,7	3,7	-0,3	1,6	-0,5	-0,1	-1,9	2,7	0,6	8,1	1,4	4,9	

Varieties

- ◇ Westar
- Axana
- Aviron

Treatment

- Adjuvant
- Baba
- Bion
- Meja (Methyl jasmonate)



- ⦿ ≠ patterns of expression according to the PRI applied
- ⦿ ≠ responsiveness of the varieties tested

Development of a biosolution based on a magnesium product and/or PRI molecules

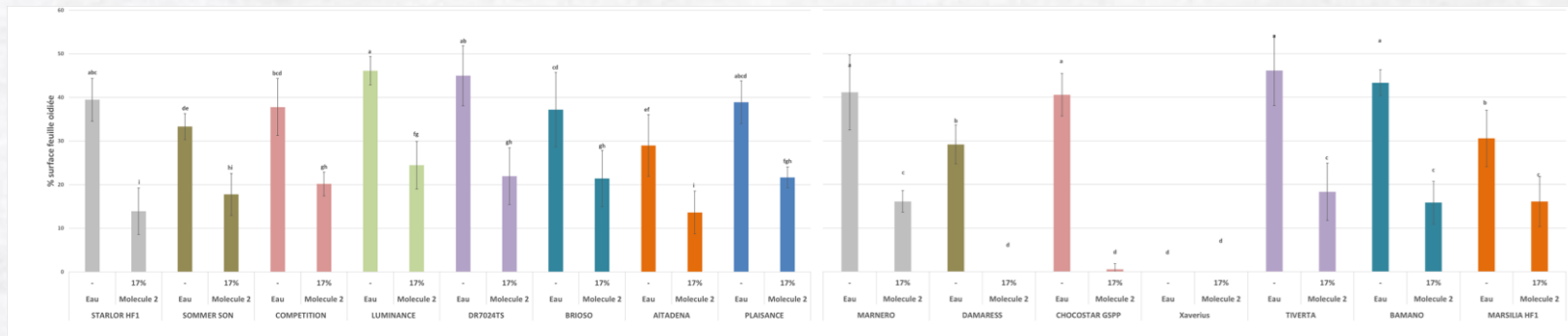
Screening of

- 7 PRI molecules (plant extracts)
- on 4 pathosystem (Apple tree/*Venturia inaequalis*, Tomato/*Oidium neolycopersici*, Rapeseed/*Sclerotinia sclerotiorum*, Wheat/*Septoria tritici*)
- Best biocontrol candidate regarding protection efficacy and elicitation (PRI activity) : Molecule 2

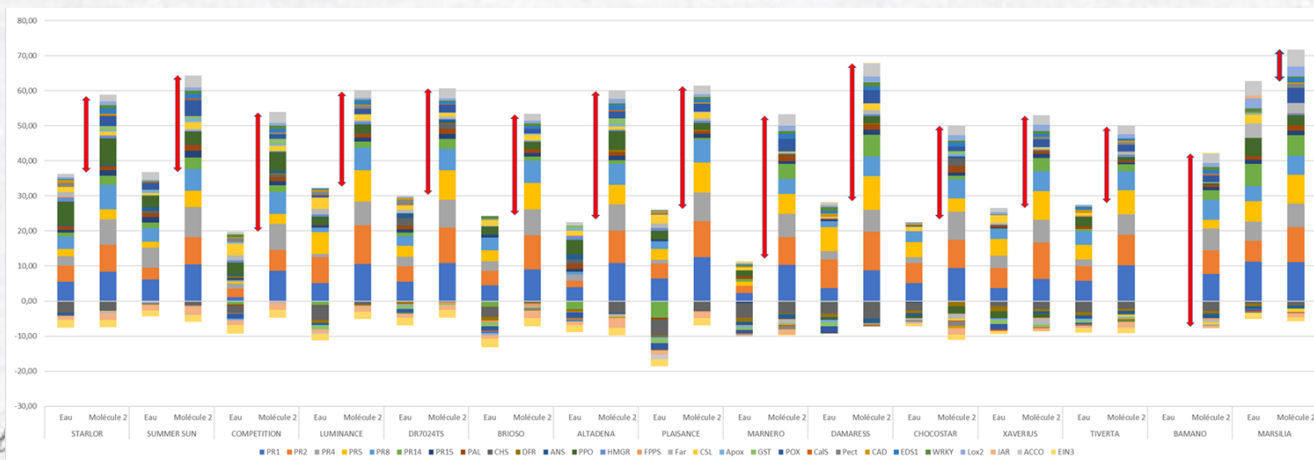
Development of a biosolution based on a magnesium product and/or PRI molecules

Results obtained on Molecule 2

- Efficacy against tomato powdery mildew (*Oïdium neolycopersici*) :
44 to 100% protection efficacy (depending on tomato varieties)



- PRI activity observed with qPFD® tool on all the 14 varieties tested :



Development of a biosolution based on a magnesium product and/or PRI molecules

Results obtained on Molecule 2

Other bioactivity tested

Pathogen agent	In vitro biocid activity
<i>Venturia inaequalis</i>	0
<i>Oidium neolycopersici</i>	+
<i>Botrytis cinerea</i>	0

Plant species	PRI activity (qPFD®)
Tomato	+++
Potato	+
Rapeseed	0
Apple tree	0

Effect of Molecule 2 + Magnesium

Plant species	Pathogen agent	In planta protection efficacy
Tomato	<i>Oidium neolycopersici</i>	30-70%
Tomato and Potato	<i>Phytophthora infestans</i>	61 and 65 %
Tomato	<i>Botrytis cinerea</i>	97 %
Tomato	<i>Passalora fulva</i>	0%
Cucumber	<i>Erysiphe cichoracearum</i>	10%
Rapeseed	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	15%
Apple tree	<i>Venturia inaequalis</i>	89%

Development of a biosolution based on a magnesium product and/or PRI molecules

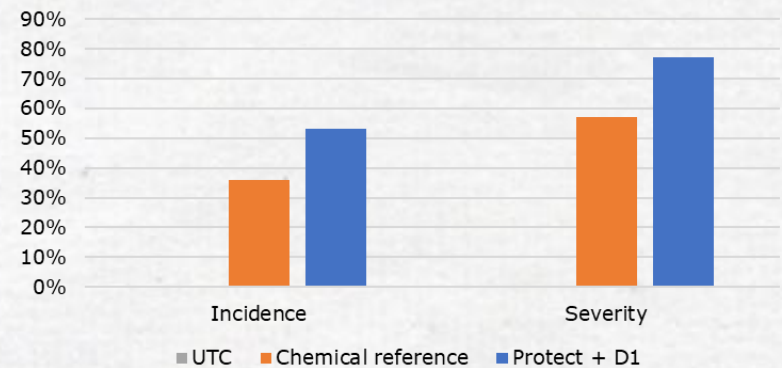
Results obtained on plant extract + magnesium

Sclerotinia on rapeseed

Key points:

- 2 applications at BBCH 65 and 69
- Higher efficacy of Protect+ modality in comparison with chemical reference and UTC
- Higher yield was obtained with Protect + and chemical reference with 30 dt/ha.

Efficacy on the incidence and severity of 3 treatments on rapeseed in 2019 (% of UTC)

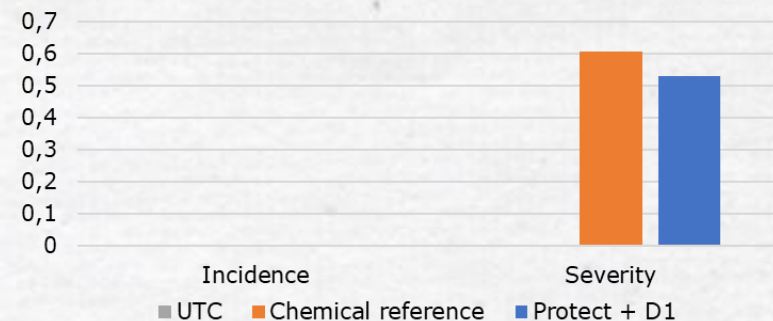


Septoria on winter wheat

Key points:

- 2 applications at stage "2 nodes" and "last leaf unfolded".
- Equivalent efficacy of Protect+ modality in comparison with chemical reference.
- An equivalent yield was obtained, and a dosage effect can be noticed.

Efficacy on the incidence and severity of 3 treatments on winter wheat in 2019 (% of UTC)



Development of a biosolution based on a magnesium product and/or PRI molecules

Focus on Magnesium



- An additive effect of the addition of molecules or plant extracts on the magnesium base can be noted.
- The magnesium compound was **magnesium hydroxide**



Thanks to several years of work by TIMAB Magnesium, the magnesium hydroxide is now recognized as **a basic substance**

A basic substance is a substance that can be used for **phytopharmaceutical purposes** even though this is not its primary purpose (Regulation EC 1107/2009). All details related to this approval can be found in the tables of the French institute, **ITAB**.



Summary of the pathosystems of approval

Septoria	Mildew	Powdery mildew	Other
Cereals	Vineyard	Vineyard	Black sigatoka (Banana)
	<i>Solanaceae</i>	Stone fruits	<i>Cyclonium</i> (Olive)
		Ornamental and rose-bush	Black rot (Vineyard)



Thank you for your attention



Klervi CRENN
crenn@vegenov.com



Marie-Noelle BRISSET
marie-noelle.brisset@inrae.fr



Jean-Philippe EUSTACHE
JeanPhilippe.Eustache@roullier.com



Le végétal sur mesure