

DIVANTIBOT : Impact sur la biodiversité fongique de différents itinéraires de lutte contre la pourriture grise

Morvan Coarer

IFV Pôle Val de Loire - Centre (site de Nantes) - morvan.coarer@vignevin.com

E. Fortin, G. Thomas, H. Lutelier

IFV Pôle Val de Loire - Centre (site de Montreuil-Bellay)

EN QUELQUES MOTS

Le projet consistait à utiliser les moyens de la biologie moléculaire et les indices mathématiques de biodiversité afin de mieux cerner, dans le cas de la lutte contre *Botrytis cinerea*, les moyens d'action de l'effeuillage et du biocontrôle via *Aureobasidium*. Il a permis de vérifier que cette dernière espèce pouvait bien s'implanter en début de campagne et que l'effeuillage n'a en fait que peu d'effet sur le microbiote fongique de la baie.



OBJECTIF

Ecophyto 2, le plan d'action de la filière pour réduire l'usage des pesticides et la baisse annoncée des doses hectares de cuivre rendent nécessaires l'utilisation par la viticulture de méthodes alternatives de lutte : moyens mécaniques, solutions de biocontrôle, simulateurs de défense naturelle (SDN). Pour autant les modes d'actions de celles-ci sont mal cernés, tout comme les causes de leurs efficacités aléatoires.

La Chambre d'Agriculture 44 avait conduit un essai Vign'effeuillage comparant notamment les potentialités anti-*Botrytis* de cette technique avec un itinéraire conventionnel et l'utilisation d'une solution de biocontrôle à base d'*Aureobasidium pullulans*. Les questions posées étaient : l'effeuillage modifie-t-il le microbiote ou bien freine-t-il physiquement (eau disponible, UV, vent,...) le développement de *Botrytis* ? Les souches de biocontrôle colonisent-elles la grappe ? Restent-elles dessus ? Le traitement est-il bien placé ? Les conditions météorologiques favorisent-elles la colonisation et le maintien de ces souches ? Le but de ce projet est d'étudier par biologie moléculaire l'impact réel sur la biodiversité fongique des solutions anti-*Botrytis* : effeuillage simple face, et Biocontrôle en une ou deux applications par rapport à un témoin non-traité non effeuillé. Vérifier la bonne implantation des souches d'*Aureobasidium pullulans* composant le produit de biocontrôle et leur maintien sur la baie. Déterminer la rémanence des impacts sur la biodiversité fongique des différentes situations. En fonction de ces résultats, seront proposées d'éventuelles

modifications d'agenda ou de préconisation. Il est prévu un test préalable de viabilité de la solution de biocontrôle, 32 prélèvements sur 6 dates avec isolement de 30 souches fongiques par prélèvement, soit l'analyse d'environ 960 souches. Le projet apportera un éclairage inédit sur les résultats de ses essais et permettra à l'IFV de valider une méthodologie d'évaluation des impacts des itinéraires de lutte anti-*Botrytis*.

MÉTHODE

L'étude se déroule sur le domaine expérimental de Montreuil Bellay sur cépage Grolleau N clone 366 greffé sur Riparia clone 1030 et planté en 2011. Le dispositif expérimental comprend 6 rangs de 56 pieds répartis en quatre modalités ; témoin non traité non effeuillé, effeuillé côté Est, 1 traitement *Aureobasidium*, 2 traitements *Aureobasidium* (figure 1).

Afin de récolter de manière non destructive la flore uvale, il est procédé à un rinçage des baies à l'aide d'une solution de lessivage dont l'efficacité a été validée par ailleurs dans le cadre du projet CASDAR « mycotoxines émergentes ». Ces rinçages ont été effectués à des moments clefs de l'essai selon la figure 1.

2020		TNT	EFF	Auréo 1	Auréo 2
04/06/2020	TO global				
12/06/2020	1 semaine après effeuillage				
29/06/2020	Bilan avant <i>Aureobasidium</i>				
08/07/2020	1 semaine après 1er traitement				
12/08/2020	1 semaine après 2ème traitement				
02/09/2020	Récolte				
2021		TNT	EFF	Auréo 1	Auréo 2
23/06/2021	TO global				
02/07/2021	1 semaine après effeuillage				
22/07/2021	Bilan avant <i>Aureobasidium</i>				
30/07/2021	1 semaine après 1er traitement				
23/08/2021	Bilan avant <i>Aureobasidium 2</i>				
30/08/2021	1 semaine après 2ème traitement				
14/09/2021	Récolte				
2022		TNT	EFF	Auréo 1	Auréo 2
30/05/2022	TO global				
16/06/2022	1 semaine après effeuillage				
08/07/2022	Bilan avant <i>Aureobasidium</i>				
20/07/2022	1 semaine après 1er traitement				
12/08/2022	1 semaine après 2ème traitement				
14/09/2021	Récolte				

FIGURE 1

Après étalement sur milieu MEA, tous les organismes fongiques (champignons filamenteux et levures) sont isolés et récoltés en fonction de leur abondance respective, sans que l'échantillonnage puisse être exhaustif. L'appartenance taxonomique de ces organismes est ensuite déterminée au moyen de la PCR ITS. Afin de caractériser la diversité infra-spécifique d'*Aureobasidium pullulans*, diverses amorces nucléotidiques ont été utilisées selon la technique de PCR-RAPD à partir d'un panel de souches préalablement isolées. Les amorces les plus adaptées à cette différenciation ont ensuite été testées sur des souches isolées à partir de la préparation commerciale utilisée pour cet essai avant d'être appliquées aux prélèvements de terrain.

Pour l'interprétation des données au niveau de la biodiversité ont été choisis des indices reconnus par la communauté scientifique : l'indice de Shannon-Wiener (H'), l'indice de Pielou (J') et l'indice dérivé de Simpson. L'indice de Shannon-Wiener est utilisé pour exprimer l'hétérogénéité de la diversité. Ainsi, plus celui-ci sera faible, plus la population sera dominée par une espèce. L'indice de Pielou exprime l'équitabilité ou l'équirépartition des espèces au sein de la population. Ainsi, plus il sera faible, plus une espèce sera importante en termes

d'effectif au sein de la population.

Les indices H' et J' ont été multipliés entre eux afin d'obtenir un seul indice (H' x J') qui exprime la codominance des espèces. Plus cet indice sera faible, plus le déséquilibre vers une population ultra-dominante à fort effectif sera important.

L'indice dérivé de Simpson exprime la diversité d'espèces au sein de la population et traduit donc la diversité alpha. Plus il est proche de zéro, plus faible est la diversité.

RÉSULTATS

IMPACT DU TRAITEMENT AVEC BOTECTOR® SUR LE MICROBIOTE DE LA BAIE

Les caractérisations génétiques à l'aide des amorces B15 et A2 ont montré la présence de deux souches différentes dans la préparation commerciale de **Botector®**.

Sur l'ensemble des trois années, les capacités d'implantation des deux souches constituant le mélange sont relativement semblables et nettement plus importantes en début de cycle végétatif. Le renouvellement de l'inoculation ne semble pas modifier cette érosion des souches de **Botector®** (tableau 1 et figure 2).

3 années	Botector + 1 semaine		Botector 2 + 1 semaine		Botector récolte	
	A	B	A	B	A	B
Souche	A	B	A	B	A	B
Moyenne	19,55%	16,31%	3,76%	6,03%	3,89%	2,17%
Moyenne Botector x 1	32,58%		1,12%		6,46%	
Moyenne Botector x 2	25,67%		15,47%		3,72%	
Moyenne Botector	29,13%		8,29%		5,09%	

TABEAU 1 : Proportions des souches de **Botector®** retrouvées au sein de la population endogène d'*Aureobasidium*, synthèse des trois années.

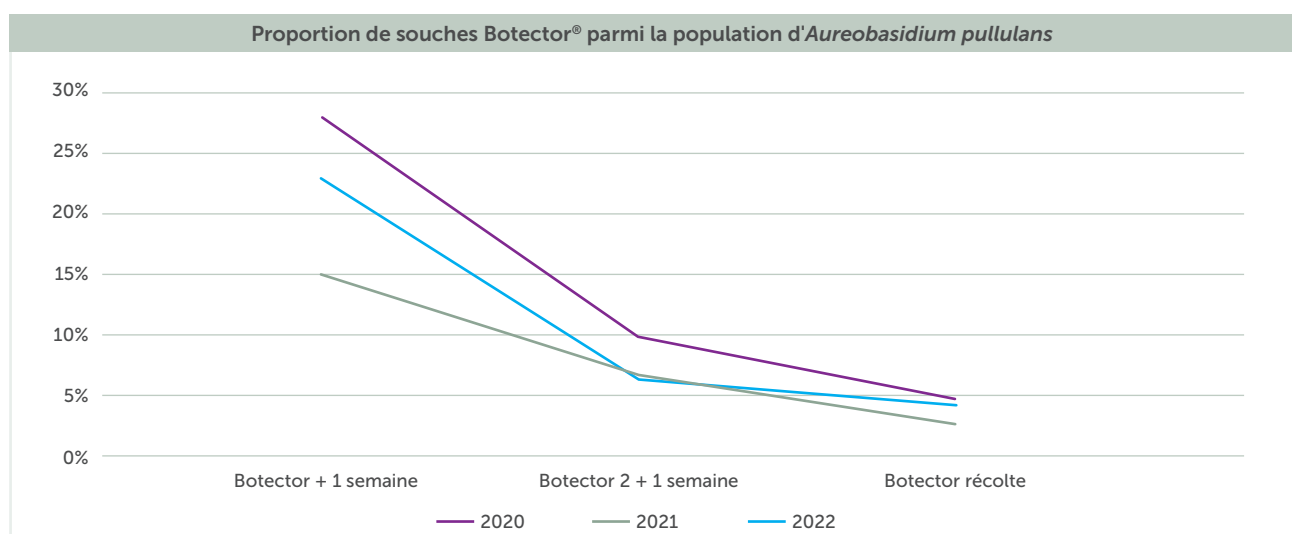


FIGURE 2 : Évolution au sein de la population d'*Aureobasidium* des souches composant **Botector®**.

En 2022, comme en 2021 et 2020, l'absence de pourriture grise mesurable n'a pas permis de mettre en parallèle les évolutions de population constatées et d'éventuelles efficacités des stratégies développées.

IMPACT DE L'EFFEUILLAGES SUR LE MICROBIOTE DE LA BAIE

Sur les trois années d'étude, c'est sur la modalité témoin à la récolte que la diversité levurienne est la plus importante, alors que c'est sur cette même modalité, mais en début de campagne, qu'elle est la plus réduite.

Tous stades confondus, on n'observe guère de différence de biodiversité levurienne entre les deux modalités. Il apparaît donc que la pratique de l'effeuillage n'induit pas de modification allant systématiquement dans le même sens en ce qui concerne cette diversité (tableau 2).

3 ans	TNT	EFF
H'	0,40	0,42
J'	0,45	0,53
H*J'	0,30	0,34
1-D	0,22	0,23

TABLEAU 2 : Récapitulatif des différents indices de diversité globaux selon les modalités, synthèse des trois années.

Au niveau des champignons filamenteux, on note très peu de différences entre les différentes modalités.

Sur l'ensemble des trois années, on ne voit que très peu de différence entre les deux modalités, les variations étant similaires qu'il y ait effeuillage ou pas. Il apparaît en revanche que les modifications constatées sont plus liées au stade de prélèvement et à la météorologie qu'à l'itinéraire technique mis en œuvre. Sauf en cas de sécheresse, *A. pullulans* et *Cladosporium* sont les deux espèces largement majoritaires tout au long du cycle végétatif.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le projet a permis de mettre au point une méthodologie de contrôle de l'implantation d'*A. pullulans* et d'étude de la diversité infraspécifique de cette espèce par PCR RAPD à l'aide des amorces A2 et B15.

Cette étude a permis de montrer que la solution de biocontrôle **Botector**® pouvait bien s'implanter et coloniser la baie, mais de manière aléatoire. On note l'influence notable des conditions météorologiques post-traitement, canicule ou sécheresse contrariant fortement la bonne implantation d'*A. pullulans*. Les

efficacités aléatoires constatées pour cette solution de biocontrôle sont donc à expliquer plus par une difficulté de positionnement des traitements et une susceptibilité aux aléas climatiques, que par une incapacité intrinsèque de la souche à coloniser le biotope.

Par ailleurs, sauf à démontrer un effet souche particulièrement prononcé dans l'antagonisme vis-à-vis de *Botrytis*, on peut s'interroger sur l'intérêt d'apporter en surplus une population déjà majoritaire sur baie et dont les conditions optimales de croissance recouvrent celles de l'agent de la pourriture grise (10-25 °C).

En ce qui concerne l'effeuillage, son action directe sur la structure du microbiote uval ne semble pas jouer un rôle majeur, sauf peut-être en situation de sécheresse et de canicule, cette pratique augmentant l'exposition des microorganismes à des conditions peu favorables au développement microbien. En termes de biodiversité, la synthèse des trois années d'étude montre que l'effeuillage ne modifie pas les indices mathématiques de diversité. L'impact de l'effeuillage ne semble donc jouer que sur l'abondance au sein de chaque espèce rencontrée. Par ailleurs, il semble que l'effeuillage n'ait un impact réel sur ce microbiote endogène que dans les jours suivant immédiatement cette intervention. Les différences s'estompent nettement à l'approche de la récolte, période où le risque *Botrytis* est particulièrement important.

Il nous semble donc que, compte tenu du caractère aléatoire de l'implantation d'*Aureobasidium* dans des conditions estivales normales, il conviendrait de limiter son utilisation aux stades précoces du développement végétatif, permettant, si nécessaire, de retarder le moment de l'effeuillage.