

# NS CONTROL : Solutions de biocontrôle à base de levures non-*Saccharomyces*

**Morvan Coarer**

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

**G. Delanoue, J. Beguin et L. Fernandes**

IFV Pôle Val de Loire - Centre (site d'Amboise)

## EN QUELQUES MOTS

Le projet consistait à extraire de la collection de souches de levures non-*Saccharomyces*, conservées dans le Centre de Ressources Biologiques (CRB) de l'IFV, des candidats au biocontrôle, d'évaluer *in vitro* leur potentiel antifongique contre différents bioagresseurs de la vigne et d'autres cultures pour lesquels peu d'alternatives sont actuellement proposées au vigneron, notamment : *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum* et *Aspergillus carbonarius*.

Certains de ces éventuels candidats au biocontrôle ont ensuite été testés *in planta*. Outre l'efficacité directe sur les symptômes et/ou les pathogènes, ont aussi été estimés les capacités d'implantation des souches présélectionnées.

## OBJECTIF

La réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques et le retrait probable pour leur dangerosité avérée ou supposée de certaines solutions commerciales est susceptible d'handicaper la filière. Les stratégies alternatives sont rares et limitées quant à leur efficacité. La baisse de la dose maximale annuelle de cuivre à l'hectare rend la problématique de la transition agricole encore plus tendue pour la filière vin.

Compte tenu de la diversité des microorganismes présents sur la vigne, de nombreuses interactions directes ou indirectes existent qui se traduisent par un développement privilégié de certaines espèces au détriment d'autres. Ces différences révèlent les nombreux antagonismes observés sur baies.

La connaissance de ces antagonismes a permis d'envisager des stratégies de biocontrôle nécessitant de sélectionner des microorganismes ayant une capacité de colonisation rapide du milieu, une tolérance à une faible disponibilité en nutriments, une résistance aux conditions extérieures, notamment les UV et les variations de températures.

L'objectif de ce projet est de passer en revue quelques dizaines d'espèces de levures non-*Saccharomyces* conservées dans le CRB de l'IFV afin d'estimer leurs potentialités en matière de biocontrôle des principaux pathogènes cryptogamiques de la vigne.

## MÉTHODE

### ACTION 1 : SÉLECTION DE NOUVELLES SOUCHES NON-SACCHAROMYCES APTES AU BIOCONTRÔLE

Des souches de levures non-*Saccharomyces* ont été recherchées et identifiées à partir de la collection du CRB de l'IFV. Les potentialités antifongiques ou antagonistes de ces souches sont testées contre différents bioagresseurs de la vigne : mildiou, champignons pionniers des maladies du bois, organismes producteurs d'ochratoxine A, et dans une moindre mesure *Botrytis*, ... Ces tests ont été réalisés contre différentes souches de ces bioagresseurs isolées sur baies et conservées au CRB de l'IFV *Botrytis cinerea* (pourriture grise), *Aspergillus carbonarius* (OTA), *Diplodia seriata* (ESCA), *Neofusicoccum parvum* (Black Dead Arm).

Parallèlement, des tests foliaires *in vitro* sont mis en œuvre avec pour but d'évaluer l'efficacité des extraits vis-à-vis du mildiou. Sur des feuilles provenant de plants en serre, indemne de mildiou, des disques de feuilles sont prélevés et maintenus en survie en boîte de Pétri, grâce à un milieu gélosé. Les extraits testés sont pulvérisés sur ces disques de feuilles, une répétition étant constituée de 10 disques de feuilles. L'inoculum nécessaire aux tests est réalisé à partir de feuilles contaminées achetées au laboratoire Staphyt de Bordeaux. Après une nuit, la goutte d'inoculum est retirée afin que les tissus sous-jacents puissent respirer, et les boîtes stockées en chambre climatique régulée à 24°C avec une photopériode 12h/12h. Après 7 jours, un premier comptage est réalisé. Pour chaque disque, une note est donnée, traduisant l'intensité de la sporulation de mildiou. Un second comptage est réalisé 15 jours après l'inoculation. L'efficacité des souches vis-à-vis du mildiou est estimée à travers le calcul de la « Disease Severity » (DS%) selon la formule de Townsend-Heuberger, puis avec la formule de Abbott.

Les souches testées ont été au nombre de 78 pour les cocultures et de 21 pour les tests foliaires pour l'activité anti-mildiou.

## ACTION 2 : ESSAIS TERRAINS

### Lutte contre les champignons associés aux maladies du bois

6 souches précédemment repérées pour leurs efficacités in vitro contre les champignons filamenteux associés aux maladies du bois, ont été testées sur rameaux. Ceux-ci ont préalablement été contaminés au stade nouaison par *Neofusicoccum parvum* en inoculant des plaies réalisées au scalpel. La plaie était badigeonnée avec la souche antagoniste supposée à l'aide d'une lame de scalpel stérile sur laquelle était déposé un implant mycélien. Les rameaux étaient ensuite prélevés et la longueur de la nécrose (points noirs) était alors mesurée.

### Lutte contre l'agent du mildiou

La parcelle d'essai est située à proximité du Lycée Viticole d'Amboise. Elle est plantée de Chenin taillé en Guyot simple avec l'inter rang enherbé. Les candidats au biocontrôle sont comparés à un traitement au cuivre et à un témoin non traité. Les applications ont été effectuées face par face à l'aide d'un pulvérisateur pneumatique à dos. Afin de créer un environnement favorable au développement du mildiou, nous avons dû recourir à la brumisation installée sur la parcelle.

## ACTION 3 : CONTRÔLES DES CAPACITÉS D'IMPLANTATION

Afin de vérifier la bonne implantation du ou des agents de biocontrôle et leur réelle capacité à coloniser la baie, il a été jugé pertinent de s'inspirer des travaux de l'IFV ayant mis en évidence la capacité des amorces PCR, B15, L15 et A2 à discriminer au niveau infraspécifique l'espèce *Aureobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea* et les *Botryosphaeriaceae*.

Les amorces A2 (5' TGC CGA GCT G 3'), B15 (5' GGA GGG TGT T 3') D03 (5' GTC GCC GTA C 3'), F16 (GGA GTA CTG G 3') et L15 (5' GAG GGT GGC GGC TAG 3') ont donc été testées sur différentes souches des espèces candidates.

Dans le cadre des essais de terrain, les souches de levures présentes à la surface des baies ont été analysées avant ensemencement par pulvérisation, puis 7j après. Afin de récolter de manière non destructive la flore uvale et foliaire, il a été 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 ».

## RÉSULTATS

### ACTION 1 : SÉLECTION DE NOUVELLES SOUCHES NON-SACCHAROMYCES APTES AU BIOCONTRÔLE

#### Cocultures

26 souches semblent avoir un effet plus ou moins important sur l'un ou l'autre des bioagresseurs. Seule la souche NSC 34 de *Papiliotrema flavescens* semble dresser une barrière efficace stoppant la progression de l'ensemble de ces derniers.

À la vue du tableau 1 (ci-dessous), il apparaît nettement que de nombreuses espèces (13) ont un effet clairement inhibiteur contre *A. carbonarius*. C'est beaucoup moins vrai en ce qui concerne les champignons précurseurs des maladies du bois puisque seules 5 espèces ont un effet net sur leur croissance.

#### Tests foliaires

Parmi les 21 souches testées, les modalités NSC 3 (*Vishniacozyma victoriae*) et 16 (*Metschnikowia pulcherrima*) présentent une efficacité intéressante située entre 77% et 81%. Enfin la meilleure souche présentant une efficacité légèrement supérieure à 90% est la souche NSC 29 (*Vishniacozyma heimaeyensis*).

## ACTION 2 : ESSAIS TERRAINS

### Lutte contre les champignons associés aux maladies du bois

Aucune des souches testées ne semble en mesure de

| Espèce                                | D. seriata | N. parvum | A. carbonarius | B. cinerea |
|---------------------------------------|------------|-----------|----------------|------------|
| <i>Cryptococcus albidus</i>           | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Cryptococcus laurentii</i>         | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Cryptococcus tephrensii</i>        | +          | -         | -              |            |
| <i>Cyberlindera misumaiensis</i>      | +          | +         |                |            |
| <i>Cystofilobasidium macerans</i>     | +          | --        | +              |            |
| <i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i> | +++        | +++       | ---            |            |
| <i>Filobasidium steposum</i>          | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Hanseniaspora mrakii</i>           | +++        | +++       | ---            |            |
| <i>Hanseniaspora opuntiae</i>         | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Hyphopichia pseudobartonii</i>     | +++        | +++       | ---            |            |
| <i>Kluyveromyces dobzhankii</i>       | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Kwoniella europaea</i>             | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Milleromyces farinosa</i>          | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Papiliotrema flavescens</i>        | +++        | ++        | ++             | +++        |
| <i>Pichia galeiformis</i>             | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Pichia kluyveri</i>                | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Pichia membranifaciens</i>         | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Pichia quercuum</i>                | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Rhodotorula babjevae</i>           | -          | -         | +              |            |
| <i>Rhodotorula glutinis</i>           | +          | +         | +              |            |
| <i>Rhodotorula subericoala</i>        | -          | -         | +              |            |
| <i>Trichosporon akiyoshidainum</i>    | +          | +         |                |            |
| <i>Trichosporon beigellii</i>         | ---        | ---       | +++            |            |
| <i>Vishniacozyma carnescens</i>       | +++        | +++       | ---            |            |
| <i>Vishniacozyma Heimaeyensis</i>     | ---        | ---       | ++             | ---        |
| <i>Zygoascus hellenicus</i>           | ---        | ---       | +++            |            |

TABLEAU 1

limiter de manière importante la production de nécrose par *N. parvum*, si ce n'est la souche NL 22290 de l'espèce *V. carnescens* qui réduit la taille de la nécrose de 50%.

### Lutte en plein champ contre l'agent du mildiou

Les Degré d'infection (« Disease Severity ») et les efficacités sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous :

| Modalités               | D.S. (%) | Efficacité |
|-------------------------|----------|------------|
| TNT - Témoin non traité | 21,5%    |            |
| Référence Cuivre        | 14,5%    | 32,7%      |
| NSC 3                   | 24,1%    | 0%         |
| NSC 16                  | 19,9%    | 7,6%       |
| NSC 29                  | 24,0%    | 0%         |

**TABEAU 2 : Degré d'infection (Townsend-Heuberger) et efficacité selon Abott sur feuilles.**

La modalité NSC 16, appartenant à l'espèce *Metschnikowia pulcherrima*, montre une efficacité modérément intéressante, mais réelle, de 7.6%. Les deux autres candidats au biocontrôle n'ont aucune efficacité constatée.

### ACTION 3 : CONTRÔLES DES CAPACITÉS D'IMPLANTATION

Les trois amorces A2, B15 et L 15 ont fourni de manière concordante des profils polymorphes facilement analysables et reproductibles différenciant les souches de *Vishniacozyma heimaeyensis* et de *Papiliotrema flavescens*. De même, les cinq amorces A2, B15, D03, F16 et L 15 ont fourni des profils polymorphes différenciant les différentes souches de *M. pulcherrima* et *Vishniacozyma victoriae*.

Lors de l'essai de terrain, des prélèvements ont été effectués 2 jours après le dernier traitement. L'appartenance taxonomique des souches de levures isolées a été caractérisée pour chaque modalité à des fins de contrôle d'implantation. Dans les trois modalités NSC3, NSC16 et NSC29, la structure de la population est similaire, avec une dominance classique d'*Aureobasidium pullulans*. L'espèce inoculée ne se retrouve que dans les modalités NSC16 (*Metschnikowia pulcherrima*) et NSC29 (*Vishniacozyma heimaeyensis*) et dans les deux cas dans des proportions similaires ( $\leq 10\%$ ). *Vishniacozyma victoriae* n'a pas été du tout retrouvée.

La comparaison de la souche de *M. pulcherrima* retrouvée sur le terrain avec la référence NSC16 à l'aide des amorces A2, F16 et L15 a montré que les deux souches étaient différenciées par une seule amorce (F16). Parallèlement, la comparaison de la souche de *V. heimaeyensis* retrouvée sur le terrain avec la référence NSC29 à l'aide des amorces A2, B15 et L15 a montré que les deux souches étaient différentes.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les souches NSC 1, NSC 3, NSC 13, NSC 16, NSC 24, NSC 29 présentait des efficacités contre le mildiou in vitro intéressantes. Ces levures paraissent de bons candidats pour la suite du projet. La troisième année, 3 souches semblaient devoir être présélectionnées de manière prioritaire pour la suite des tests anti-mildiou : NSC 3 *Vishniacozyma victoriae* NM 8542, NSC 16 *Metschnikowia pulcherrima* et NSC 29 *Vishniacozyma heimaeyensis* NM 9762. L'essai sur parcelle expérimentale intégré à un dispositif de lutte contre le mildiou a permis de constater que la souche NSC 16 est la plus intéressante avec une efficacité de 7.6 %, ce qui est loin d'être ridicule pour un produit de biocontrôle non formulé et testé dans le cadre d'un essai contaminé et brumisé au cours d'un millésime particulièrement difficile au niveau climatique. Ce candidat au biocontrôle pourrait permettre, à tout le moins, de remplacer un ou plusieurs traitements au cuivre, participant ainsi à la réduction de l'usage de ce produit. Parallèlement, il conviendrait aussi de tester au champ les souches NSC1, NSC13 et NSC 24 avec la souche NSC 16 en témoin.

Un certain nombre de candidats (14) ont été repérés in vitro pour leur intérêt éventuel dans le biocontrôle d'*A. carbonarius* (OTA) et dans une moindre mesure (4), des Botryosphaeriaceae. A l'avenir, elles devront aussi être testées sur disques foliaires et contre *B. cinerea*. Les souches ayant une efficacité relative in vitro contre les champignons des maladies du bois pourront être inoculées sur sarments afin d'estimer leur impact sur le développement de nécroses. Les amorces validées serviront au contrôle d'implantation des souches testées.

Enfin, un certain nombre d'incertitudes et d'obstacles devront être levés afin d'aboutir à des solutions de biocontrôle robustes à partir de ces essais liminaires :

- Exploration de l'effet souche au sein de chaque espèces d'intérêt,
- Compréhension des facteurs abiotiques impactant l'efficacité du biocontrôle,
- Identification des caractéristiques physiologiques des candidats et définition de leur formulation optimale,
- Définition des rythmes et périodes de traitement adaptées aux espèces utilisées,
- Expérimentation des itinéraires synergiques combinant, en simultané ou en séquentiel, plusieurs solutions de biocontrôle.

Pour ce faire, la mobilisation des partenaires académiques et économiques sera indispensable.