

Impact des facteurs abiotiques sur l'efficacité du biocontrôle

Dans le cadre du projet ABA PIC, Vegenov, FN3PT/inov3PT, le CTIFL et l'IFV ont développé des outils et méthodes pour étudier l'influence de paramètres comme la température ou le lessivage sur l'efficacité des produits de biocontrôle.

 Klervi Crenn¹, Pauline Dewaegeneire², Nicolas Formez³, Caroline Gouttesoulard⁴, Émilie Hascoet¹, Mathilde Merrer¹ et Marie Turner¹ ¹Vegenov. ²inov3PT. ³CTIFL. ⁴IFV



Pour évaluer l'impact des facteurs abiotiques sur l'efficacité des produits de biocontrôle, différentes méthodologies ont été développées en conditions contrôlées ou semi-contrôlées, et validées sur plusieurs espèces végétales : les plants de tomate et pomme de terre, l'abricotier et la vigne. Mais elles pourraient être transposables à d'autres filières végétales.

Méthodologies d'évaluation en conditions contrôlées

Essai sur tomate : conditions d'efficacité variables

Il existe différents stress abiotiques (comme les aléas climatiques), qui peuvent avoir un impact négatif sur l'efficacité des produits de biocontrôle. Dans le cadre du projet ABA PIC⁽¹⁾ (encadré p. 25), Vegenov a développé des outils permettant d'évaluer l'impact de la température, du pH de la bouillie, de l'humidité relative, du lessivage ou encore des ultraviolets UVA et UVB. Des protocoles ont été validés pour évaluer l'efficacité de différents produits vis-à-vis du *Botrytis cinerea* de la tomate, modèle d'intérêt agronomique. Ces outils étant compatibles

avec de nombreuses cultures, il est prévu de développer dans un second temps des protocoles pour travailler d'autres maladies, notamment celles ayant un impact sur des cultures de plein champ qui sont plus soumises aux aléas climatiques que les cultures sous abri.

Plants de tomate subissant un lessivage (photo 1) ou un stress UVA (photo 2).
Photos : Vegenov

Dans le cadre d'ABA PIC, trois produits phytosanitaires ont été évalués dans différentes conditions de stress : deux produits de biocontrôle à base des

(1) Accélération du biocontrôle et des agroéquipements pour la protection intégrée des cultures.

RÉSUMÉ

CONTEXTE L'efficacité des produits de biocontrôle dépend très fortement d'une bonne maîtrise de leurs conditions d'utilisation. Des organismes vivants ou des substances au mode d'action très spécifique présentent des actions modulées par de nombreux facteurs : abiotiques (température, hygrométrie, pH des sols, etc.) et biotiques (organismes déjà présents dans l'agrosystème, état de la plante, génotype de la plante, génotype du bioagresseur, etc.).

ÉTUDE Vegenov, FN3PT/inov3PT, le CTIFL et l'IFV ont particulièrement travaillé, dans le cadre du projet ABA PIC (2021-2022), sur le développement de dispositifs et de méthodologies permettant d'évaluer l'influence des facteurs abiotiques sur l'efficacité de produits de biocontrôle. Ces méthodes ont été développées pour la tomate, la pomme de terre, l'abricotier et la vigne.

RÉSULTATS Les premiers tests réalisés ont confirmé l'influence de facteurs comme le lessivage,

les UV, la température ou l'humidité sur l'efficacité des produits. Ces premières approches vont servir de bases pour le développement des méthodologies sur d'autres maladies/ravageurs et également sur d'autres cultures, afin d'accompagner le déploiement des produits de biocontrôle.

MOTS-CLÉS Biocontrôle, micro-organismes, méthodologie, facteurs abiotiques, gènes, stimulateur de défense des plantes, SDP.

Tableau 1. Maintien (vert) ou perte (orange à rouge) d'efficacité de protection de trois produits phytopharmaceutiques en conditions optimales pour la plante et pour l'application du traitement ou après application de différents stress abiotiques, lorsqu'ils sont utilisés contre *Botrytis cinerea* sur la tomate

Les valeurs indiquées correspondent aux pourcentages d'efficacité des produits sur plants de tomate traités par rapport aux plants de tomate non traités.

	Conditions optimales	Stress thermique		pH bouillie		Humidité relative				Lessivage		UV	
		10-12 °C	30-32 °C	pH 5	pH 8	50 %	60 %	75 %	100 %	20 mm	100 mm	A	B
Produit conventionnel chimique	100	100	100	100	100	97,7	100	98,4	100	99,2	83,4	100	100
Produit de biocontrôle à base de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST 713 (Rhapsody)	96,8	99,2	95,7	92,5	97,0	93,6	99,0	59,2	87,2	13,1	-1,1	86,0	64,5
<i>Trichoderma atroviride</i> SC1 (Vintec)	98,6	73,0	100	89,1	91,1	87,8	74,9	79,2	98,3	98,3	98,3	75,1	0,0

micro-organismes *Bacillus amyloliquefaciens* QST 713 (Rhapsody) ou *Trichoderma atroviride* SC1 (Vintec) et un produit conventionnel chimique à base de pyriméthanol. Ces trois produits ont été sélectionnés car ils présentaient une bonne efficacité de protection en traitement préventif, dans les conditions expérimentales de Vegenov, lorsqu'aucun stress n'était appliqué. Les résultats des essais (Tableau 1) ont montré que le produit conventionnel chimique conserve une bonne efficacité de protection, peu importe le stress abiotique ou l'aléa climatiques appliqué (sauf avec un lessivage de 100 mm, où il commence à perdre en efficacité). Le produit de biocontrôle à base de *Bacillus* présente une sensibilité légère à modérée aux diminutions de pH de la bouillie, à une humidité relative inférieure ou égale à 50 % ou supérieure ou égale à 75 % et aux UVA, mais une sensibilité modérée à forte au lessivage et aux UVB, en conditions contrôlées. Le produit de biocontrôle à base de *Trichoderma* présente lui une sensibilité légère à modérée aux variations de pH (qu'il soit basique ou acide) et à une humidité relative inférieure ou égale à 75 %, mais une sensibilité modérée à forte aux stress thermiques froids (10-12 °C), ainsi qu'aux UVA et UVB, en conditions contrôlées. Sa résistance au lessivage est cependant très bonne.

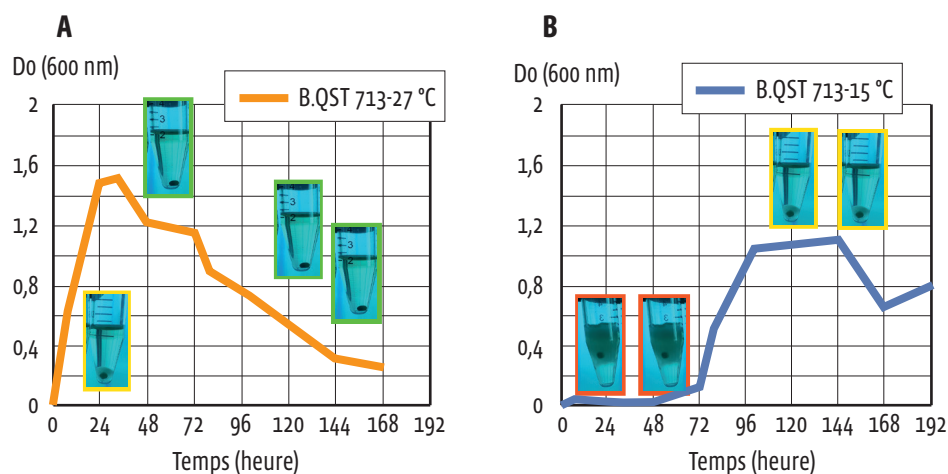
La variabilité d'efficacité des produits de biocontrôle, soumis à divers stress climatiques, peut être liée à plusieurs facteurs, notamment :

- la présence d'organismes vivants dans la composition du produit, leurs

Quelle que soit la température, *B. velezensis* QST 713 ne s'est pas installée dans la rhizosphère de la pomme de terre.

FIG. 1 : Cinétique de croissance de *Bacillus velezensis* QST 713 et efficacité à contrôler le champignon *Rhizoctonia solani* – A : à 27 °C ; B : à 15 °C

Courbe = croissance bactérienne de la bactérie. DO : densité optique mesurée à 600 nm. Les photographies représentent la croissance de *Rhizoctonia solani* en présence des métabolites secondaires de *B. velezensis* QST713 à différents temps de la cinétique de croissance de la bactérie (24 h, 48 h, 5 j et 7 j) ; rouge : aucune action de la bactérie sur *Rhizoctonia solani* ; jaune : activité fongistatique ; vert : activité fongicide.



multiplication et/ou production de métabolites pouvant évoluer ;
– la coformulation du produit, renforçant par exemple la résistance au lessivage.

Essai sur pomme de terre : effet de la température sur *Bacillus*
• **Étude du comportement *in vitro***
Bacillus velezensis QST 713 (anciennement *Bacillus amyloliquefaciens* QST 713) (Pandin *et al.*, 2018) est une souche bactérienne capable de coloniser les racines des plantes, favorisant leur croissance et une protection contre un large spectre d'agents pathogènes. Le produit à base de cette substance (nom commercial Rhapsody) est homologué sur pomme de terre au moment de la plantation et est décrit comme ayant une efficacité contre le rhizoctone brun *Rhizoctonia*

solani. La bactérie est formulée sous forme d'endospores (qui est une forme de conservation de la bactérie), additionnés des composés naturels qu'elle produit. Ce produit présente actuellement des efficacités limitées et aléatoires en parcelle, notamment du fait du manque d'informations disponibles sur ses conditions optimales d'utilisation et d'efficacité. L'objectif principal de l'étude visait à évaluer l'effet d'un facteur abiotique – la température – sur l'installation, la croissance de la bactérie, mais également sur sa capacité à réduire les symptômes du rhizoctone brun sur tubercules. Cette bactérie, isolée en Californie dans un sol de verger de pêchers, est plutôt adaptée à des conditions chaudes, très différentes de nos conditions de production en plants de pomme de terre.

Inov3PT a tout d'abord étudié le comportement *in vitro* de la bactérie à 15 °C (température moyenne du sol durant la culture de pomme de terre) et 27 °C (température optimale de croissance de la bactérie) : sa croissance, mais également sa capacité à inhiber la croissance de *Rhizoctonia solani* (Figures 1A et 1B). À 27 °C (Figure 1A), la croissance bactérienne est très rapide et une activité fongicide apparaît dès 48 h et ce, jusqu'à la fin de l'expérience (sept jours). À 15 °C (Figure 1B), la croissance de la bactérie est plus lente, sa concentration est moins importante et elle ne présente une activité fongistatique qu'à partir du quatrième jour. En conditions *in vitro*, en présence d'un milieu riche en éléments nutritifs, la croissance de *B. velezensis* QST 713 et sa production de composés naturels d'intérêt (action fongicide ou fongistatique) sont donc favorisées par des hautes températures.

• Étude du comportement dans le sol

Qu'en est-il dans le sol ? Des expérimentations en conditions contrôlées ont été mises en place dans deux chambres climatiques, à deux températures différentes (15 °C et 27 °C). Un suivi de la bactérie par q-PCR Taq Man⁽²⁾ (Mendis *et al.*, 2018) par prélèvements du sol rhizosphérique a été effectué tous les mois pendant quatre mois. En fin d'expérience, les tubercules ont été récoltés afin d'évaluer l'efficacité du traitement. *B. velezensis* QST 713 est retrouvé dans le sol dès son application, à environ

5 x 10⁵ UFC⁽³⁾/g de sol (Figure 2). Les niveaux de population ont tendance à être plus élevés dans la modalité 15 °C que dans la modalité 27 °C, et tendent à diminuer au cours du temps pour les deux températures. Quelle que soit la température, la bactérie n'a pas réussi à s'installer et à se multiplier dans la rhizosphère de la pomme de terre. À 90 jours, au moment de la récolte, le niveau de population est faible et proche de la limite de détection pour les deux modalités. En fin d'essai, aucune réduction significative du pourcentage de sclérotés n'est observée sur tubercules fils (Figure 3) pour la modalité traitée avec *B. velezensis* QST 713 par rapport au témoin non traité, quelle que soit la température. *A contrario*, la référence chimique permet de réduire efficacement les symptômes sur les tubercules. Ainsi, dans le sol, milieu vivant très complexe, la modification d'un seul facteur, comme la température, n'est pas la seule clé du succès de l'installation et de la bioprotection d'un produit de biocontrôle à base de bactéries. La population bactérienne n'a pas permis de protéger efficacement (mécanismes d'antibiose, de PGPR, et de compétition spatiale) les tubercules contre le rhizoctone brun : ce peut être dû à sa densité insuffisante ou à sa présence sous une forme peu active métaboliquement (endospores).

Méthodologies en conditions semi-contrôlées

Évaluer le lessivage et l'hygrométrie

Toujours dans le cadre du projet

Le projet ABA PIC en quelques mots

Le projet inter-ITA (instituts techniques agricoles) ABA PIC⁽¹⁾, financé dans le cadre du plan de relance, avait pour but de renforcer la capacité de la recherche appliquée des ITA à travailler les solutions innovantes de biocontrôle et leurs modalités d'application. Il a permis de consolider, pendant 18 mois (juin 2021 à décembre 2022), les partenariats entre douze ITA (Armefflor, Arvalis-Institut du végétal, Astredhor, CTIFL, FN3PT/Inov3PT, IFPC, IFV, IT2, Itab, ITB⁽²⁾, Iteipmai, Terres Inovia), une association (Contrat de solutions) et un centre de ressources technologiques CRT (Vegenov). Coordonné par l'Acta, le projet s'est articulé autour de quatre objectifs méthodologiques :

- développer et tester des outils de suivi des organismes et substances de biocontrôle dans l'agrosystème ;
- développer et tester des méthodes d'études des facteurs qui conditionnent le succès d'utilisation du biocontrôle (objectif 2) ;
- améliorer les capacités d'expérimentation sur les modes d'application des produits de biocontrôle (objectif 3) ;
- développer un savoir-faire de positionnement du biocontrôle sur la base du diagnostic, du monitoring et de la prévision des dynamiques des bioagresseurs et auxiliaires des cultures (objectif 4).

(1) Accélération du biocontrôle et des agroéquipements pour la protection intégrée des cultures.

(2) Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Fédération nationale des producteurs de plants de pommes de terre, Institut français des productions cidricoles, Institut français de la vigne et du vin, Institut technique tropical, Institut technique de l'agriculture et de l'alimentation biologiques, Institut technique de la betterave.

ABA PIC, un dispositif en conditions semi-contrôlées a été créé pour évaluer l'impact de l'hygrométrie et du lessivage sur l'efficacité de produits de biocontrôle. Ce travail a été réalisé conjointement par le Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes

(2) Technique de détection par PCR quantitative en temps réel à l'aide d'une sonde Taq Man.

(3) Unités formant colonies.

FIG. 2 : Cinétique de croissance de *Bacillus velezensis* QST 713 dans le sol en conditions contrôlées, selon deux modalités de température

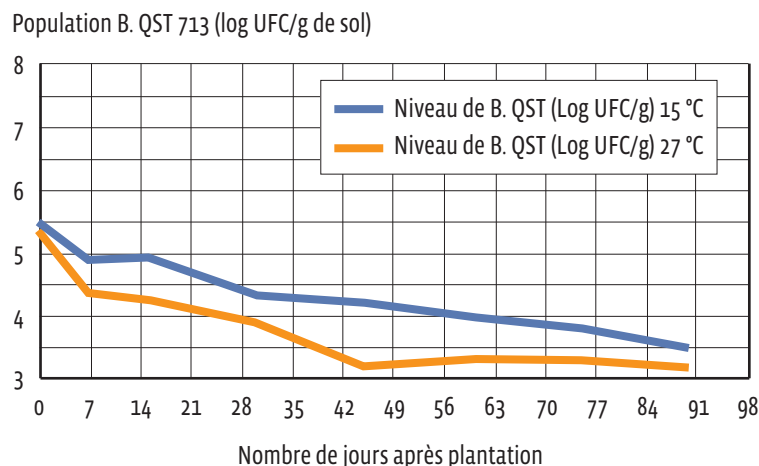
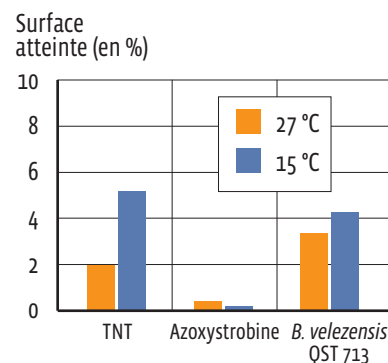


FIG. 3 : Pourcentage de sclérotés de rhizoctone brun à la surface des tubercules de pomme de terre fils récoltés en fin d'essai selon les modalités testées : témoin non traité (TNT), azoxystrobine, *Bacillus velezensis* QST 713 (Rhapsody)



(CTIFL) et l'Institut français de la vigne et du vin (IFV). Deux bitunnels présents sur le centre CTIFL de Balandran, équipés de manière identique, ont chacun été divisés en quatre compartiments séparés par des bâches épaisses : deux équipés avec des brumisateur pour la gestion de l'humidité relative et deux équipés par des asperseurs pour la gestion du lessivage. Des stations météorologiques installées dans chaque compartiment (température, hygrométrie, humectation foliaire, ensoleillement) permettent de valider la modification d'un paramètre unique entre deux compartiments.

Les deux compartiments « humidité relative » sont équipés d'un boîtier permettant un fonctionnement automatique de la brumisation, en fonction de différents paramètres : l'hygrométrie seuil (humidité en dessous de laquelle le système de brumisation se déclenche), l'heure de mise en marche et d'arrêt total de la brumisation, la durée d'une période de brumisation et l'intervalle entre deux périodes de brumisation. En amont des essais, des tests ont été réalisés pour vérifier le bon fonctionnement des brumisateur et tester différentes combinaisons des paramètres afin d'obtenir une forte stabilité des humidités relatives durant l'essai pour en étudier les effets. Une marge d'amélioration importante existe pour totalement maîtriser la méthodologie sur ce facteur. En effet, les tunnels froids subissent les variations extérieures de l'humidité au cours de la journée qui ont un impact sur les combinaisons des paramètres permettant de maintenir une HR constante pour les essais.

La méthodologie sur le lessivage est maîtrisée. L'aspersion est gérée manuellement mais il est possible d'automatiser son fonctionnement. Les tests réalisés ont permis de vérifier l'homogénéité de l'aspersion et de calculer un débit moyen par asperseur pour déterminer le temps d'aspersion correspondant à la quantité de lessivage souhaitée. D'autres modalités de lessivage pourront être étudiées, comme le fractionnement des apports ou la hausse/baisse du débit d'aspersion (pour simuler une intense et courte pluie, ou une longue et faible pluie).

Des résultats non exploitables sur abricotier

À la suite de la mise en place des deux dispositifs, le CTIFL a réalisé deux essais sur des abricotiers en pot :
– l'évaluation de l'impact de l'humidité

FIG. 4 : Induction de sept gènes de défense sur sauvignon blanc après deux traitements au COS-OGA (Messenger) (A) ou au *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24 (Taegro) (B), en conditions d'hygrométrie (H) minimale (60 %) et maximale (80 %)

Le niveau d'induction correspond au cumul de l'expression des gènes cités en légende (unité arbitraire 2delta Ct).

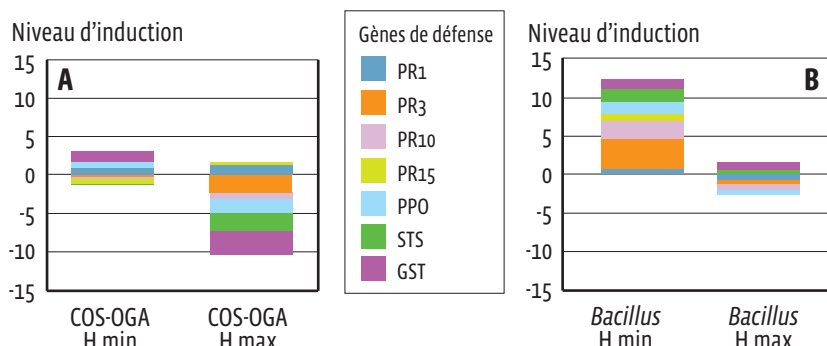
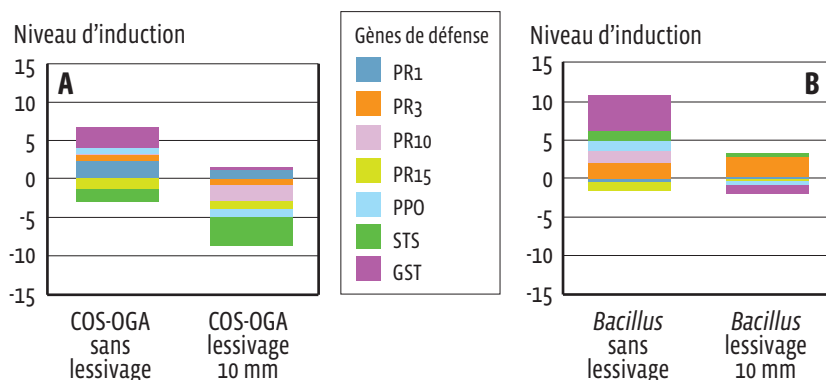


FIG. 5 : Induction de sept gènes de défense sur sauvignon blanc après deux traitements au COS-OGA (Messenger) (A) ou au *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24 (Taegro) (B), et un lessivage de 0 ou 10 mm après la première application

Le niveau d'induction correspond au cumul de l'expression des gènes cités en légendes (unité arbitraire 2delta Ct).



relative sur l'efficacité du *Bacillus subtilis* (Serenade Aso) sur les monilioses des fleurs ; dans le cadre de l'essai, le produit testé n'a pas eu d'efficacité, l'impact de l'humidité relative n'a donc pas pu être évalué ;

– l'évaluation de l'impact du lessivage sur l'efficacité de l'huile essentielle d'orange (Essen'ciel) sur l'oïdium ; malgré des inoculations sur les arbres, la maladie ne s'est pas développée, l'essai n'a donc pas été concluant.

Dispositifs sur vigne : impacts étudiés sur un SDP

L'IFV a, en parallèle du CTIFL, réalisé des essais sur vigne en pot. Les résultats ont été plus concluants. Les questions scientifiques étaient les suivantes : l'hygrométrie a-t-elle un impact sur l'efficacité et la rémanence d'un produit de type SDP (stimulateur de défense des plantes) ? Est-ce qu'un

lessivage modéré sur la première application (10 mm) influe sur l'efficacité et la rémanence d'un SDP ? Pour tenter de répondre à ces questions, en plus de la validation des dispositifs, une méthode d'analyse de gènes de défense à l'aide d'une puce qPFD (brevet Inrae) via un prélèvement par carte FTA (analyses réalisées par Vegepolys) a été utilisée. Cette analyse a ciblé sept des vingt-huit gènes de défense que propose la puce qPFD sur vigne. Les essais ont été conduits sur sauvignon blanc, avec deux produits de type SDP : un produit à base de COS-OGA (Messenger) à action SDP stricte et un produit à base de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24 (Taegro) à plusieurs modes d'action (SDP, compé-

L'efficacité des produits est la combinaison de multiples facteurs.



3



4

duits de biocontrôle, variable *in vitro*, *in vivo* et *in campo*. Les dispositifs et méthodologies d'évaluation mis en place et développés dans le cadre du projet ABA PIC sont opérationnels, malgré des limites quant à la gestion de certains facteurs abiotiques comme l'humidité relative. Ils pourront être utilisés par les centres de recherches dans le cadre de leurs programmes de recherches, et par les entreprises développant des intrants agricoles (comme les produits de biocontrôle) ou de nouvelles variétés *via* la mise en place de prestations de services. Il est important de continuer les travaux en ce sens, et d'évaluer également la combinaison des facteurs abiotiques ainsi que l'impact des génotypes/variétés. En effet, les facteurs ont été étudiés individuellement, or l'efficacité des produits est la résultante d'une combinaison de multiples facteurs, qu'il est important d'analyser pour optimiser l'usage et le déploiement des produits de biocontrôle sur le terrain. ▶

Dispositifs d'évaluation de produits de biocontrôle mis en place sous tunnel pour les abricotiers (photo 3) et pour la vigne (photo 4). Photos : 3. CTIFL 4. IFV

REMERCIEMENTS

Ce projet de recherche appliquée a été réalisé avec le soutien financier de France Relance, et plus spécifiquement du programme « Accélérateur des entreprises de l'agroéquipement et du biocontrôle ».



GOVERNEMENT
Liberté
Égalité
Fraternité



tion et action directe sur pathogène). Les deux produits ont été appliqués sur un matériel végétal *a priori* sain, exempt de toute maladie.

Pour la modalité hygrométrie, les deux SDP ont été appliqués à sept jours d'intervalle avec des conditions d'hygrométrie différentes au moment des applications (différence de 15 à 20 % d'hygrométrie 48 h avant et jusqu'à 24 h après application). Les prélèvements de feuilles pour analyse des gènes de défense ont été réalisés 24 h après la deuxième application. En hygrométrie minimale (ambiante au moment de l'application), une induction légère des gènes de défense est observée avec COS-OGA ; elle est plus élevée avec *Bacillus*. En hygrométrie forte, l'induction n'est plus détectée, une répression des gènes est visible (Figure 4). Il semble donc que de fortes hygrométries soient défavorables au mode d'action de stimulation du produit, car elles dimi-

nuent l'induction de gènes de défense. Pour la modalité lessivage, les deux SDP ont été appliqués deux fois à sept jours d'intervalle, avec ajout ou non d'un lessivage de 10 mm 4 heures après la première application. Quel que fut le produit, l'induction des gènes de défense n'était visible qu'en l'absence de lessivage (Figure 5).

Les dispositifs de variation des facteurs abiotiques ont été validés, et l'essai a mis en évidence l'influence de l'hygrométrie et du lessivage sur l'action des SDP. D'autres essais sont nécessaires pour renforcer les conclusions et évaluer l'impact sur l'efficacité biologique (sur oïdium), en parallèle de la stimulation des gènes.

Conclusion

L'influence des facteurs abiotiques est complexe à analyser. Les résultats du projet ont montré qu'ils avaient un impact sur l'efficacité des pro-



POUR EN SAVOIR PLUS



CONTACTS : crenn@vegenov.com ; pauline.dewaegeneire@inov3pt.fr ; nicolas.formez@ctifl.fr ; caroline.gouttesoulard@vignevin.com



BIBLIOGRAPHIE :

- Pandin C., Le Coq D., Deschamps J., Védie R., Rousseau T., Aymerich S., Briandet R., 2018. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713: A biocontrol agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould disease. *Journal of biotechnology*, vol. 278, p. 10-19.
- Mendis H. C., Thomas V. P., Schwientek P., Salamzade R., Chien J.-T., Waidyaratne P. et al., 2018. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLoS ONE* 13(2): e0193119.

Pour en savoir plus sur le projet ABA PIC, le replay des webinaires de présentation des résultats du projet est disponible sur le site de l'Acta :

