

**ÉVALUATION DE LA COMPATIBILITÉ DES BIOFONGICIDES DANS L'ÉLABORATION D'UNE  
STRATÉGIE DE LUTTE CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES EN VIGNOBLE.**

**20-034-CRAM**

DURÉE DU PROJET : AVRIL 2020 / FÉVRIER 2023

**RAPPORT FINAL**

Réalisé par :  
Caroline Provost, Ph.D. et Audrey-Anne Durand, Ph.D.



**CRAM**  
CENTRE DE RECHERCHE  
AGROALIMENTAIRE DE MIRABEL



Institut national  
de la recherche  
scientifique

1<sup>er</sup> février 2023

Les résultats, opinions et recommandations exprimés dans ce rapport émanent de l'auteur ou des auteurs et n'engagent aucunement le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

# ÉVALUATION DE LA COMPATIBILITÉ DES BIOFONGICIDES DANS L'ÉLABORATION D'UNE STRATÉGIE DE LUTTE CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES EN VIGNOBLE.

## 20-034-CRAM

### RÉSUMÉ DU PROJET ET DE SON AVANCEMENT

Plusieurs maladies foliaires et des baies sont présentes dans les vignobles et causent d'importantes pertes économiques. Les principales maladies sont la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), le mildiou (*Plasmopara viticola*), le blanc (*Erysiphe necator*), l'antracnose (*Elsinoe ampelina*) et la pourriture noire (*Guignardia bidwellii*). Depuis quelques années, plusieurs biofongicides ont été homologués pour lutter contre ces maladies. Cependant, les résultats au champ sont parfois inconstants et mitigés. L'efficacité de ces produits est actuellement sous étude dans le cadre d'un projet de la SPQA. Toutefois, la compatibilité au champ ou la meilleure stratégie pour les utiliser n'a pas été l'objet d'étude. Une meilleure connaissance de leur mode d'action et des effets les uns sur les autres est nécessaire afin de ne pas nuire à une application précédente et pour éviter l'application inutile de fongicides. L'objectif de ce projet est de déterminer la compatibilité au champ des fongicides à moindres risques (incluant les biofongicides) ainsi que de comprendre leurs effets respectifs afin de proposer une stratégie optimale d'utilisation pour lutter contre les principales maladies de la vigne. Pour ce faire, un premier volet a été réalisé en laboratoire pour comprendre le fonctionnement des biofongicides ainsi que pour établir la compatibilité des produits. La cinétique des populations a aussi été évaluée en champ pour les saisons 2021 et 2022. Les résultats de laboratoire démontrent que la matière active du Double Nickel 55 et de Serenade Opti est présente lors de l'application et qu'elle diminue rapidement dans les jours suivants ce qui n'est pas constant au champ. En laboratoire, le Botector voit sa population du microorganisme augmenter suite à l'application jusqu'à 6 jours après, puis une diminution est observée. Toutefois, sur le terrain, cette cinétique de population n'est pas observée, on voit plutôt une diminution exponentielle du microorganisme avec le temps. Le fongicide Oxidate 2.0 affecte grandement les trois microorganismes des biofongicides et cause une mortalité importante, contrairement aux Cosavet DF, Cuivre 53W et Milstop qui ont peu d'effet sur les microorganismes. Les différentes stratégies de lutte à base de biofongicides utilisées ont permis de contrôler efficacement les cinq principales maladies en vignoble, surtout le Botrytis sur les grappes. Ainsi, ces trois stratégies sont à recommander pour appliquer dans les vignobles biologiques, mais aussi dans la régie conventionnelle, car elles ont démontré une efficacité similaire, voir supérieure, dans certains cas, à une stratégie conventionnelle à risques réduits.

### OBJECTIFS ET APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE

L'objectif principal du projet est de déterminer la compatibilité au champ des fongicides à moindres risques (incluant les biofongicides) ainsi que de comprendre leurs effets respectifs afin de proposer une stratégie optimale d'utilisation pour lutter contre les principales maladies de la vigne.

Les objectifs secondaires sont:

- 1) comprendre le fonctionnement des biofongicides à base d'organismes vivants sur la plante
- 2) établir les effets (ou la compatibilité) des fongicides à moindres risques (incluant les biofongicides) les uns sur les autres évaluer des stratégies d'application des fongicides à moindres risques au champ
- 3) proposer une ou des stratégies d'application des fongicides à risques réduits et des biofongicides pour lutter contre les principales maladies en vignoble.

Le projet est divisé en deux volets:

- 1) un premier volet en laboratoire afin de comprendre et documenter l'action des biofongicides à base de microorganismes ainsi que de vérifier la compatibilité des biofongicides et des fongicides à risques réduit. Réalisé 2020.
- 2) un second volet en champ afin d'évaluer diverses stratégies de lutte sélectionnées à partir des résultats de laboratoire pour réprimer les principales maladies en vignoble. Réalisation durant les saisons de croissance 2021 et 2022.

Les biofongicides retenus dans le cadre du projet sont:

A) pour les biofongicides à base de microorganismes:

- 1- Double nickel 55 (m.a. *Bacillus amyloliquefaciens* (souche D747))(blanc, Botrytis), dose: 2.8 kg/ha
- 2-Serenade Opti (m.a. *Bacillus subtilis*) (blanc, Botrytis), dose: 4.5 kg/ha
- 3-Botector (m.a. *Aureobasidium pullulans* (souche DMS 14940 et DMS 14941)) (Botrytis), dose: 1.0 kg/ha

B) les fongicides à faibles risques autorisés en agriculture biologique:

- 1- Cuivre 53W (m.a. cuivre) (mildiou, pourriture noire, blanc), dose : 3.0 kg/1 000 L d'eau
- 2- Oxidate 2.0 (m.a. peroxyde d'hydrogène) (mildiou, blanc, pourriture noire), dose: 100 mL de produit dans 10 L d'eau, c.-à-d. 1,0 % (v/v)
- 3- Milstop (m.a. bicarbonate de potassium) (blanc), dose 4.2 kg/ha
- 4- Cosavet DF (m.a. soufre, ancien Kumulus DF) (blanc), dose 12.6 kg/ha  
(entre parenthèses: maladies contre lesquelles le produit est homologué)

### **Volet 1 : compatibilité des biofongicides en laboratoire**

Les essais en laboratoire ont été effectués afin de répondre à deux objectifs: 1) documenter le temps de colonisation de la feuille par les différents biofongicides; 2) vérifier la compatibilité des biofongicides et des fongicides à risques réduits. Les essais de laboratoire ont été effectués au sein du laboratoire de l'INRS-Armand-Frappier Santé Biotechnologie en collaboration avec Dr Claude Guertin et Dr Philippe Constant.

*Objectif 1 : Documenter le processus de colonisation de la feuille par les différents microorganismes de la matière active des biofongicides*

#### Volet laboratoire (2020)

Afin de suivre la colonisation des différents biofongicides sur les feuilles de vigne, une approche de biologie moléculaire a été préconisée. Pour ce faire, un disque de vigne de 10 cm de diamètre a été placé dans une boîte de Pétri contenant uniquement de l'agar à 15 g/L afin de maintenir la turgescence de la feuille pour la durée de l'expérience. Par la suite, un biofongicide (Double Nickel 55 - 2,8kg/ha; Serenade Opti - 4,5 kg/ha; ou Botector - 1kg/ha) a été ensemencé par vaporisation sur la feuille. Les boîtes de Pétri ont été scellées avec du parafilm et incubées à 20°C en présence d'humidité. Afin de faire un suivi temporel, les données ont été recueillies au temps 0, puis après 1, 2, 6, 11 et 14 jours d'incubation (voir détail de la méthodologie en Annexe). Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque combinaison de biofongicide et temps d'incubation.

Suite à l'incubation, chaque disque de vigne a été récupéré avec des pinces stériles et placé dans un tube Falcon de 50 mL contenant 40 mL de solution saline tamponnée au phosphate (PBS), additionnée de Triton X-100 à 0,1 %. Les microorganismes ont été détachés de la feuille par agitation à l'aide d'un vortex durant 1 minute. Les solutions contenant les microorganismes ont par la suite été concentrées par centrifugation à 5311 x g durant 15 minutes. Une extraction d'ADN génomique a été réalisée en utilisant la trousse commerciale «Dneasy Powerlyser Microbial Kit» de QIAGEN selon les recommandations du fabricant. La lyse cellulaire a été effectuée à l'aide du «Fastprep-24™» de MP Biomedicals à 5 m/s durant 50 secondes. Une PCR spécifique à chacun des microorganismes a ensuite été réalisée avec la trousse «Fast-Taq DNA polymerase» de BioBasic en ajoutant 10 µg de BSA, afin d'identifier leur présence dans les échantillons. Les différentes combinaisons d'amorces ainsi que les cycles d'amplification sont résumés dans le tableau 1 (Annexe). Un gel d'agarose 1,5 % coloré au «GelStain» et visualisé sous UV a été réalisé afin de confirmer l'amplification. L'intensité relative de la bande obtenue, par rapport à l'échelle de poids moléculaire, a été calculée pour chaque échantillon.

#### Volet terrain (2021 et 2022)

Suite aux résultats obtenus en laboratoire sur la colonisation des feuilles de vigne par les différents microorganismes de la matière active des biofongicides, la persistance de ces derniers en application au vignoble a été étudiée. Pour ce faire, des feuilles de vigne ont été récoltées sur un intervalle de temps fixe pour chacun des trois traitements contenant des biofongicides (T1 : Botector, T2 : Botector + Double nickel, T3 : Botector + Serenade opti). Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque combinaison de traitement et temps d'incubation. Les expériences ont été réalisées sur deux années d'échantillonnage consécutives (2021 et 2022).

Après une application du produit au champ, des feuilles de vigne ont été récupérées avec des pinces stériles et placées dans un tube Falcon de 50 mL contenant 40 mL de solution saline tamponnée au phosphate (PBS), additionnée de Triton X-100 à 0,1 %. Les feuilles ont été rapportées au laboratoire de l'INRS-AFSB pour analyse. Les microorganismes ont été détachés de la feuille par agitation à l'aide d'un vortex durant 1 minute. Les solutions contenant les microorganismes ont par la suite été concentrées par centrifugation à 5311 x g durant 15 minutes. Une extraction d'ADN génomique a été réalisée en utilisant la trousse commerciale «Dneasy Powerlyser Microbial Kit» de QIAGEN selon les recommandations du fabricant. La lyse cellulaire a été effectuée à l'aide du «Fastprep-24™» de MP Biomedicals à 5 m/s durant 50 secondes. Une PCR spécifique à chacun des microorganismes a ensuite été réalisée avec la trousse «Fast-Taq DNA polymerase» de BioBasic en ajoutant 10 µg de BSA, afin d'identifier leur présence dans les échantillons. Un gel d'agarose 1,5 % coloré au «GelStain» et visualisé sous UV a été réalisé afin de confirmer l'amplification. L'intensité relative de la bande obtenue, par rapport à l'échelle de poids moléculaire, a été calculée pour chaque échantillon. Cette quantification a par la suite été standardisée en utilisant le gène codant pour l'ARN 16S, quantifié de la même façon. Les données de quantification standardisées représentées dans ce rapport ont donc été calculées en suivant l'équation suivante :

$$Q_{stand-x} = \frac{Q_{relative-x}}{Q_{relative-16S}}$$

Où  $Q_{stand-x}$  représente la quantification standardisée du champignon  $x$ ,  $Q_{relative-x}$  représente la quantification relative du champignon  $x$  et  $Q_{relative-16S}$  représente la quantification relative de l'ARNr 16S des bactéries. Cette étape de standardisation vise à atténuer les biais du calcul de l'abondance des microorganismes ciblés qui pourraient être causés par des variations des rendements d'extraction de l'ADN génomique et de l'efficacité des PCR (e.g. présence de substances inhibitrices de la Taq Polymérase d'ADN dans les extraits d'ADN) entre les échantillons.

*Objectif 2 : Vérifier la compatibilité des biofongicides et des fongicides à risques réduits*

Afin de vérifier la compatibilité des différents fongicides, une approche de microbiologie classique a été préconisée. Pour ce faire, des géloses nutritives R2A agar (préparé selon les directives du fabricant) ont étéensemencées avec les différents biofongicides, aux mêmes concentrations que celles mentionnées précédemment. Ensuite, les fongicides à risques réduits préalablement stérilisés par filtration (Cuivre 53W - 0,003 kg/L; Oxidate 2.0 - 1,0 % v/v; Milstop - 4,2 kg/ha; Cosavet DF - 12,6 kg/ha) ont été vaporisés, ainsi que de l'eau stérile comme témoin négatif. Suite à une période de séchage de 10 minutes, les gélosesensemencées ont été scellées et incubées dans les mêmes conditions que celles mentionnées

précédemment pour une période de 2 jours. Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque combinaison de biofongicides et fongicides à risques réduits.

Suite à l'incubation, les unités formatrices de colonies (UFC) ont été dénombrées sur chaque gélose nutritive et le pourcentage de mortalité par rapport au témoin a ensuite été calculé. Une Anova à deux critères de classification a été calculée pour vérifier si le taux de mortalité variait en fonction du type de biofongicides et de fongicides à risques réduits.

## **Volet 2 : Essais de stratégies de lutte au champ**

*Objectif 3 : Évaluer des stratégies d'application des fongicides à moindres risques au champ*

*Objectif 4 : Proposer une ou des stratégies d'application des fongicides à risques réduits et des biofongicides pour lutter contre les principales maladies en vignoble*

Les essais en 2021 et 2022 ont été réalisés dans deux vignobles commerciaux ayant des antécédents de pourriture grise, blanc et mildiou. Les essais ont débuté en avril 2021 dans les deux vignobles (A et B), mais un gel printanier survenu à la mi-mai a endommagé les parcelles dans le vignoble B. En 2021, les essais ont été faits dans du Chardonnay au vignoble A et dans du Vandal Cliche dans le vignoble B. Toutefois, les essais ont cessé dans le vignoble B suite au gel printanier. En 2022, les essais ont été réalisés dans deux parcelles du vignoble A, soit dans du Chardonnay et du Muscat. Les stratégies de lutte ont été élaborées à partir des essais de laboratoire avec les sept fongicides évalués et en collaboration avec les agronomes partenaires au projet (Tab. I). Les stratégies visent à être complémentaires dans leur mode d'action et pour la lutte à diverses maladies. Un traitement témoin consiste en une stratégie utilisée en régie conventionnelle incluant des produits à risques réduits, où les traitements sélectionnés auront comme critère d'avoir un IRS et IRE inférieur à ceux du cuivre, et comme second critère, leur historique d'utilisation récente (les produits les plus utilisés et prometteurs dans les deux dernières années).

Tableau I : Stratégies de lutte évaluées en vignoble.

<b>Stratégie</b>	<b>produit</b>	<b>Moment application</b>
Stratégie 1	cuivre	1 application/sem à partir de 3-5 feuilles, (3-4 appl) selon pluie
	Botector /cuivre	Séparation inflorescence
	Botector	Nouaison (selon cépage)
	Kumulus /cuivre	Plomb
	Milstop/cuivre/Botector	Fermeture grappe
	Milstop/cuivre/	Selon la pression
	Milstop	
Stratégie 2	Cuivre	1 application/sem à partir de 3-5 feuilles, (3-4 appl) selon pluie
	Cuivre/Double-nickel /Botector	Séparation inflorescence
	Botector	nouaison
	Cuivre/Double-nickel	Plomb
	Cuivre/Double-nickel/Botector	Fermeture grappe
	Milstop/cuivre	Selon la pression
	Milstop	
Stratégie 3	Cuivre	1 application/sem à partir de 3-5 feuilles, (3-4 appl) selon pluie
	Cuivre/Serenade /Botector	Séparation inflorescence
	Botector	nouaison
	Cuivre/Serenade	Plomb
	Cuivre/Serenade/Botector	Fermeture grappe
	Milstop/cuivre	Selon la pression
	Milstop	
Témoin conventionnel	Phostrol/cuivre	3-5 feuilles (selon croissance et pluie, 3 appl)
	Soufre	Pré-floraison
	Revus, Luna	50% floraison
	Phostrol/Vivando	Plomb/pois
	Elevate/Luna	Fermeture grappe

### *Dispositif expérimental*

Deux dispositifs en blocs aléatoires complets ont été mis en place dans les vignobles selon la disponibilité des plants et la répartition dans la parcelle. Une parcelle expérimentale comprend 3 rangs de large sur une longueur de 10 plants de vigne. Il y a 4 réplicats pour chacune des stratégies évaluées.

Afin de couvrir une saison complète de traitement et pour viser les trois principales maladies, soit le blanc, le mildiou et la pourriture grise (*Botrytis*), chacune des parcelles a reçu 7 traitements fongicides durant la saison 2021 et 9 traitements pour la saison 2022 pour couvrir les plants à différents stades de vulnérabilité et diverses maladies (Tab. II, III). Les traitements ont été appliqués avec un pulvérisateur à dos de façon à réduire la dérive entre les traitements.

Tableau II. Détails des traitements appliqués au champ 2021

Date	Observation
2021-05-07	Installation du HOBO à 12h le 7 mai ( toute information enregistrée avant n'est pas valide)
2021-05-27	Premier traitement fongicide T1 3g/L cuivre T2: 3g/L cuivre T3: 3g/L cuivre T4: 0.94L Phostrol pour les 4 rep (volume d'eau pas noté)
2021-06-02	Dose de Phostrol trop élevé lors de la première application dans T4, phytotoxicité observée
2021-06-04	Deuxième traitement fongicide T1: 3g/L cuivre (8.5L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre (8.5L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre (8.5L d'eau pour les 4 rep) T4: 0.058ml/L phostrol (15L d'eau pour les 4 rep)
2021-06-10	Troisième traitement fongicide T1: 3g/L cuivre, 1g/L Botector (12L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre, 1g/L Botector, 1g/L Double-Nickel (12L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre, 1g/L Botector, 1,7g/L Serenade Opti (12L d'eau pour les 4 rep) T4: 4g/L soufre (12L d'eau pour les 4 rep)
2021-06-21	Quatrième traitement fongicide T1: 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T2: 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T3: 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T4: 1,2ml/L Luna, 5ml/L Revus (15L d'eau pour les 4 rep)
2021-06-28	Cinquième traitement fongicide T1: 3g/L cuivre, 4,2g/L Kumulus (17L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre, 1g/L Double-Nickel (17L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre, 1,7g/L Serenad Opti (17L d'eau pour les 4 rep) T4: 5,8ml/L Phostrol, 0,72ml/L Vivando(17L d'eau pour les 4 rep)
2021-07-12	sixième traitement fongicide (stade 77) T1: 3g/L cuivre, 5,6g/L Milstop, 1g/L Botector (17L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre, 1g/L Double-Nickel, 1g/L Botector (17L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre, 1,7g/L Serenad Opt, 1g/L Botector (17L d'eau pour les 4 rep) T4: 1,12g/L Elevate, 1,2 ml/L Luna (17L d'eau pour les 4 rep)
2021-07-28	septième traitement fongicide T1: 3g/L cuivre, 5,6g/L Milstop, 1g/L Botector (17L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre, 1g/L Double-Nickel, 1g/L Botector (17L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre, 1,7g/L Serenad Opt, 1g/L Botector (17L d'eau pour les 4 rep) T4: 1,12g/L Elevate, 1,2 ml/L Luna (17L d'eau pour les 4 rep)

Tableau III : Détails des traitements appliqués au champ 2022

Date	Observation
2022-04-28	Installation du HOBO et pluviomètre à 14h00
2022-05-07	gel d'hiver plus moins important, Présence d'une baissière transversale dans le champ qui traverse la parcelle 203, plusieurs plants manquants et le reste ont été remplacés récemment
2021-05-20	Premier traitement fongicide T1 3g/L cuivre (5 L pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre (5 L pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre (5 L pour les 4 rep) T4: 0.58L Phostrol(5 L pour les 4 rep)
2022-05-25	Deuxième traitement fongicide T1: 3g/L cuivre (8.5L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre (8.5L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre (8.5L d'eau pour les 4 rep) T4: 0.058ml/L phostrol (15L d'eau pour les 4 rep)
2022-05-31	Troisième traitement fongicide T1: 3g/L cuivre, 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre, 1g/L Botector, 1g/L Double-Nickel (15L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre, 1g/L Botector, 1,7g/L Serenade Opti (15L d'eau pour les 4 rep) T4: 4g/L soufre (15L d'eau pour les 4 rep)
2022-06-15	Quatrième traitement fongicide T1: 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T2: 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T3: 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T4: 1,2ml/L Luna, 5ml/L Revus (20L d'eau pour les 4 rep)
2022-06-21	Cinquième traitement fongicide T1: 3g/L cuivre, 4,2g/L Kumulus (17L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre, 1g/L Double-Nickel (17L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre, 1,7g/L Serenad Opti (17L d'eau pour les 4 rep) T4: 5,8ml/L Phostrol, 0,72ml/L Vivando(17L d'eau pour les 4 rep)
2022-06-30	sixième traitement fongicide (même traitement qu'au cinquième trop de pluie) T1: 3g/L cuivre, 4,2g/L Kumulus (15L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre, 1g/L Double-Nickel (15L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre, 1,7g/L Serenad Opti 15 d'eau pour les 4 rep) T4: 5,8ml/L Phostrol, 0,72ml/L Vivando(15L d'eau pour les 4 rep)
2022-07-11	septième traitement fongicide T1: 3g/L cuivre, 5,6g/L Milstop, 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre, 1g/L Double-Nickel, 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre, 1,7g/L Serenad Opt, 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T4: 1,12g/L Elevate, 1,2 ml/L Luna (15L d'eau pour les 4 rep)
2022-07-20	Huitième traitement fongicide T1: 3g/L cuivre, 5,6g/L Milstop, 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre, 1g/L Double-Nickel, 1g/L Botector 15L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre, 1,7g/L Serenad Opt, 1g/L Botector 15L d'eau pour les 4 rep) T4: 1,12g/L Elevate, 1,2 ml/L Luna (15L d'eau pour les 4 rep)
2022-08-05	Neuvième traitement fongicide T1: 3g/L cuivre, 5,6g/L Milstop, 1g/L Botector (15L d'eau pour les 4 rep) T2: 3g/L cuivre, 1g/L Double-Nickel, 1g/L Botector 15L d'eau pour les 4 rep) T3: 3g/L cuivre, 1,7g/L Serenad Opt, 1g/L Botector 15L d'eau pour les 4 rep) T4: 5 ml/L Revus, 1,2 ml/L Luna (15L d'eau pour les 4 rep)

### *Prise de données*

Les données ont été prises sur les 8 plants centraux des parcelles.

Les paramètres suivants ont été notés:

- Présence des maladies sur feuillage et baies: la présence des 3 principales maladies retrouvées en vignoble, soit la pourriture grise, le blanc et le mildiou, a été notée. Dans les cas où il y aurait une présence observable de l'anthracnose et de la pourriture noire, ces deux maladies ont aussi été l'objet d'une prise de données. Un dépistage à chaque deux semaines a été effectué de mai à la mi-septembre. La sévérité des maladies a été notée en observant le % de la surface foliaire infectée (ou de la grappe) et l'incidence des maladies a été déterminée par le nombre de feuilles infectées (ou le nombre de baies).
- Indice de coulure: prise de données à un moment dans la saison pour évaluer le pourcentage de coulure de la grappe (5 juillet 2021)
- Rendements: à la récolte, le nombre de grappes par plant et le poids total des grappes par plant ont été notés pour 5 plants par parcelle. Chacune des grappes a été classée selon sa qualité, soit en présence ou en absence de maladies fongiques. Le poids pour chacune des catégories a été noté.
- Présence des maladies sur grappe: à la récolte, le nombre de grappes avec présence de maladies fongiques (représentant l'incidence des maladies) a été noté, et pour chacune des grappes, le pourcentage de grappe affectée (représentant la sévérité d'infection) a été noté (Pertot et al. 2017).

Une analyse avec des modèles généralisés mixtes (GLIMM) a été utilisée pour déterminer l'effet des stratégies de lutte sur la sévérité et d'incidence des maladies durant la saison sur le feuillage et à la récolte. Des analyses de variances (ou modèles généralisés mixtes, selon la distribution des données) ont été utilisées pour déterminer l'effet des stratégies sur les paramètres de rendements à la récolte. Des analyses avec des tables de contingence ont été utilisées pour les cotes de coulure.

## **RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS**

*Objectif 1 : Documenter le processus de colonisation de la feuille par les différents microorganismes de la matière active des biofongicides*

### Volet laboratoire (2020)

Les résultats démontrent que les biofongicides Double Nickel et Serenade opti ne colonisent pas la feuille puisque leur abondance est à son maximum au temps zéro, représentant la vaporisation initiale (Fig. 1). Par la suite, celle-ci diminue, jusqu'à atteindre un plateau vers le 4<sup>e</sup> jour après inoculation. À l'inverse, Botector démontre une colonisation grandissante de la feuille jusqu'à 6 jours suite à l'inoculation, suivi d'une diminution de son abondance par la suite. La matière active de Botector étant constituée d'une levure (*A. pullulens*), il est probable que les conditions d'incubation aient été plus favorables à ce que ce type de

microorganismes colonise la feuille, contrairement aux deux souches de *Bacillus* présentes dans les autres produits testés, ce qui pourrait expliquer le résultat obtenu.

Des analyses PCR spécifiques supplémentaires ont été effectuées sur les feuilles de vigne traitées avec les différents biofongicides au jour 14 afin de voir la présence des champignons causant les principales maladies de la vigne (Fig. 2). Il n'y a eu aucune détection de *B. cinerea* dans les échantillons testés tandis que le blanc (*E. necator*) et la pourriture noire (*G. bidwellii*) se retrouvaient dans la plupart des échantillons et que le mildiou (*P. viticola* sp. *riparia*, sp. *aestivalis*, les deux sous-espèces) et l'anthracnose (*E. ampelina*) étaient détectés dans tous les essais. Les trois biofongicides évalués sont homologués contre le *Botrytis* et deux le sont contre le blanc. Les essais en laboratoire ne visaient pas à déterminer l'efficacité contre les maladies fongiques, mais il est possible de croire que les trois biofongicides ont eu une certaine efficacité contre ce champignon (toutefois, nous ne savons pas s'il y avait une présence de *Botrytis* au début des essais sur les feuilles).

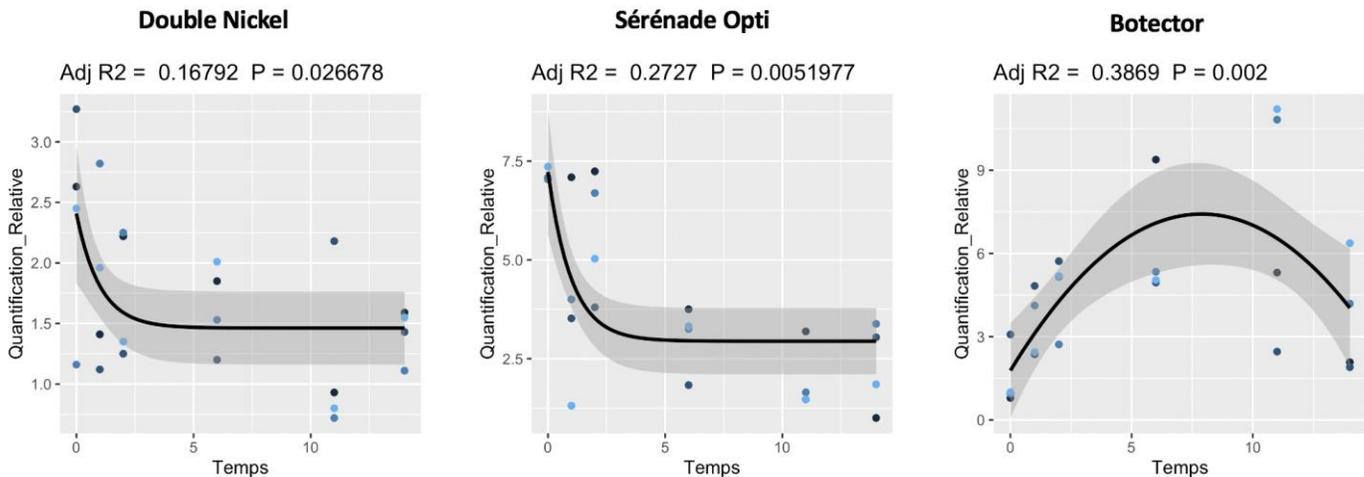


Figure 1. Quantification relative des microorganismes de la matière active des biofongicides sur une feuille de vigne en fonction du temps. Le temps zéro a été réalisé directement après l'inoculation et les prélèvements ont été réalisés jusqu'à 14 jours post inoculation.

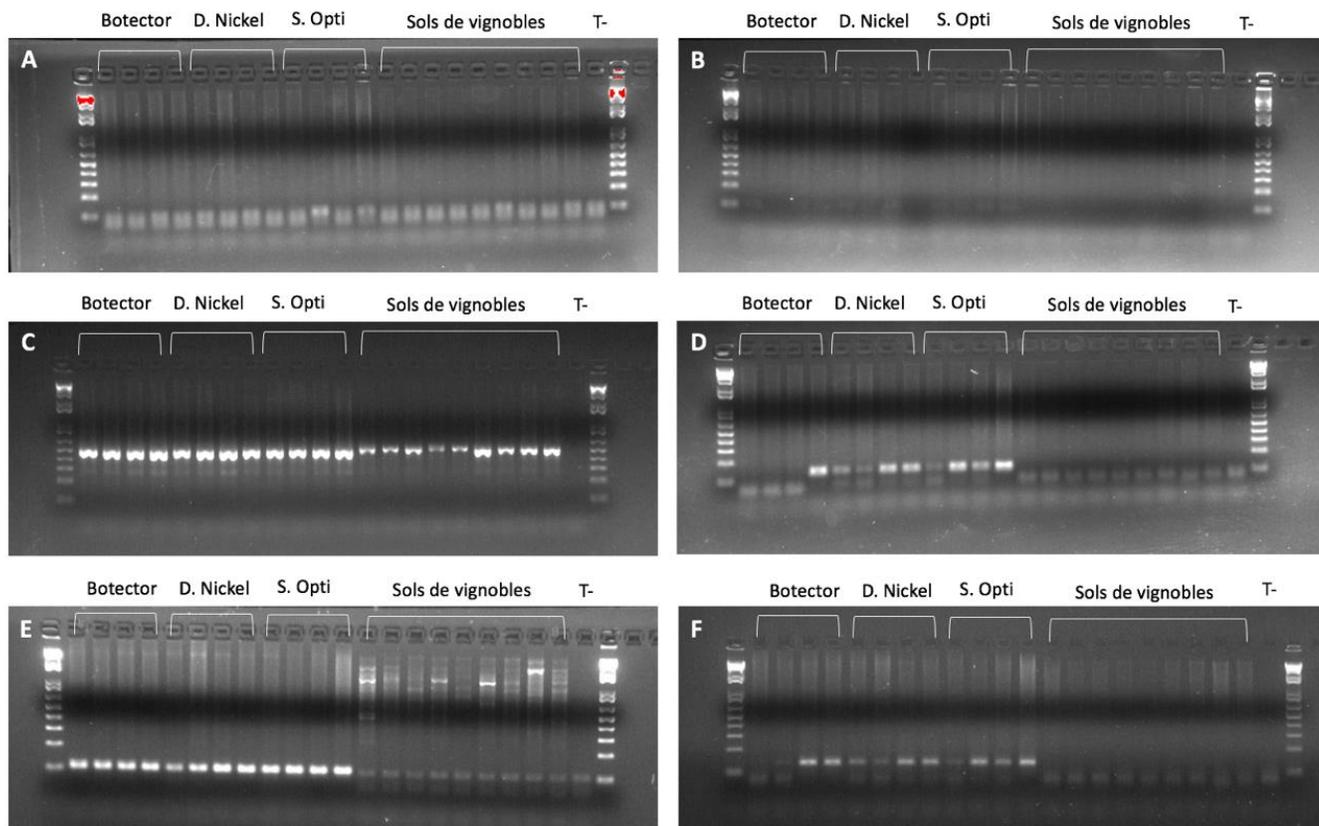


Figure 2. Détection des pathogènes causant les principales maladies de la vigne sur les feuilles traitées avec les différents biofongicides au jour 14. A : Le botrytis (*B. cinerea*); B : Le Blanc (*E. necator*); C : L'Anthracnose (*E. ampelina*); D : La pourriture noire (*G. bidwellii*); E : Le Mildiou (*P. viticola f. sp. riparia*); F : Le Mildiou (*P. viticola f. sp. aestivalis*). Différents sols provenant de vignobles ont servi de témoins positifs de l'amplification. La bande présente sous la plus petite échelle de poids moléculaire représente des dimères d'amorces ainsi que des produits résiduels de l'amplification.

Volet terrain (2021-2022)

Pour le premier échantillonnage de 2021, on observe un déclin exponentiel de détection de Botector en fonction du temps, peu importe que celui-ci soit combiné ou non avec d'autres biofongicides (Fig. 3). Cette même tendance est également observée pour Serenade opti. À l'opposé, on observe un gain exponentiel de détection pour le Double nickel au cours du temps. Aucune des tendances observées n'étaient significative au seuil de détection ( $p \leq 0,01$ ).

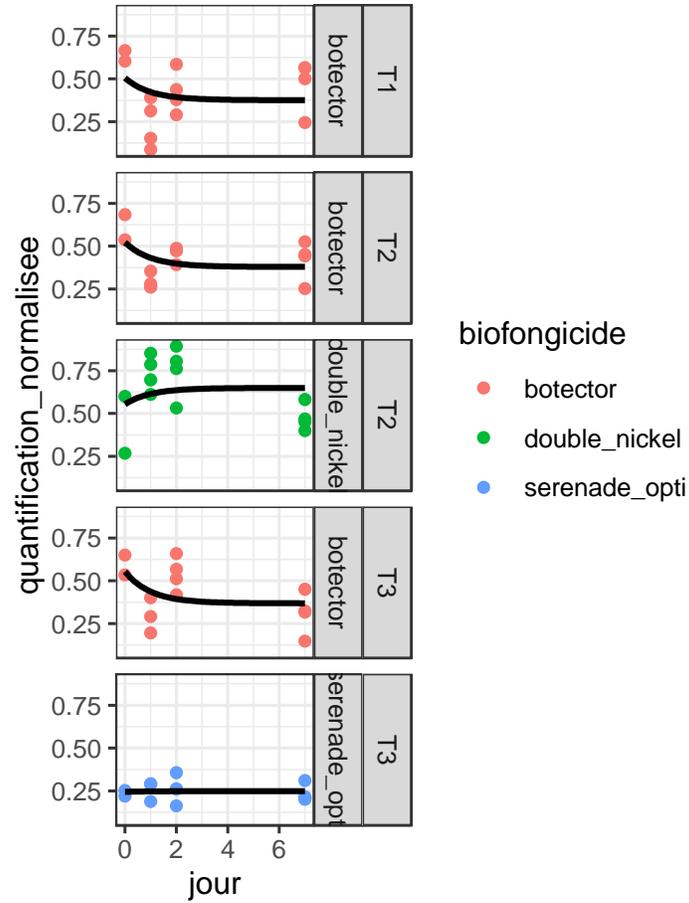


Figure 3. Quantification relative normalisée des microorganismes de la matière active des biofongicides sur une feuille de vigne en fonction du temps pour le premier échantillonnage de 2021. Le temps zéro a été réalisé directement après l'application des biofongicides et les prélèvements ont été réalisés jusqu'à 7 jours post traitement.

Encore une fois, on observe un déclin exponentiel de détection de Botector en fonction du temps, peu importe que celui-ci soit combiné ou non avec d'autres biofongicides pour le deuxième échantillonnage de 2021 (Fig. 4). Cette observation est significative dans le cas des traitements 2 et 3 ( $p = 0,0003$  et  $0,008$  respectivement). On observe également un déclin exponentiel significatif pour le Double nickel ( $p = 0,04$ ), ainsi qu'un déclin exponentiel pour Serenade opti.

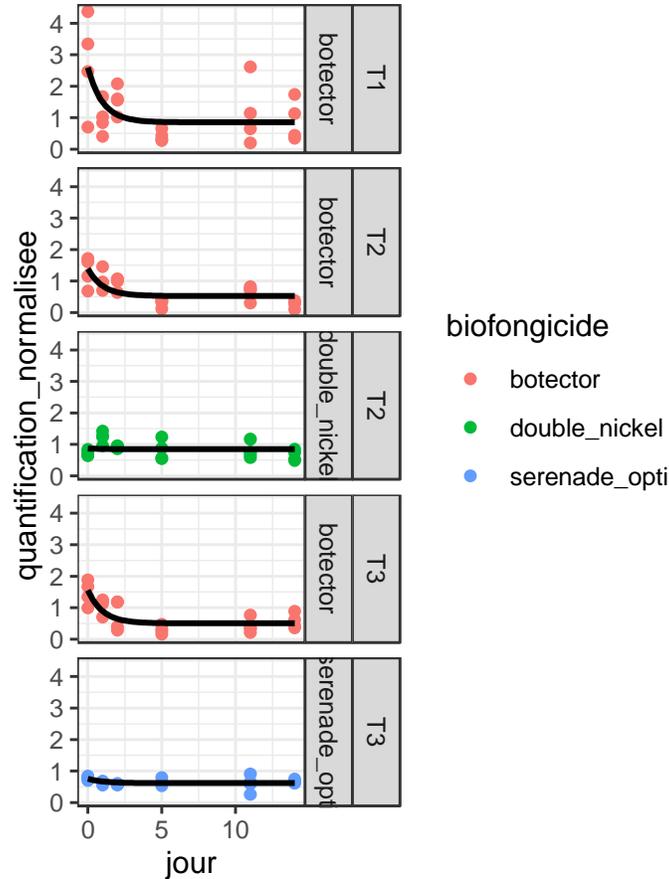


Figure 4. Quantification relative normalisée des microorganismes de la matière active des biofongicides sur une feuille de vigne en fonction du temps pour le deuxième échantillonnage de 2021. Le temps zéro a été réalisé directement après l'application des biofongicides et les prélèvements ont été réalisés jusqu'à 14 jours post traitement.

Pour l'année 2022, on observe un déclin exponentiel de détection de Botector en fonction du temps, peu importe que celui-ci soit combiné ou non avec d'autres biofongicides. Cette observation est significative dans le cas des traitements 1 et 3 ( $p = 0,05$  et  $0,01$  respectivement) (Fig. 5). On observe également un gain significatif de détection pour le Double nickel ( $p = 0,09$ ). Pour le Serenade opti, on observe une tendance stable de détection au cours du temps.

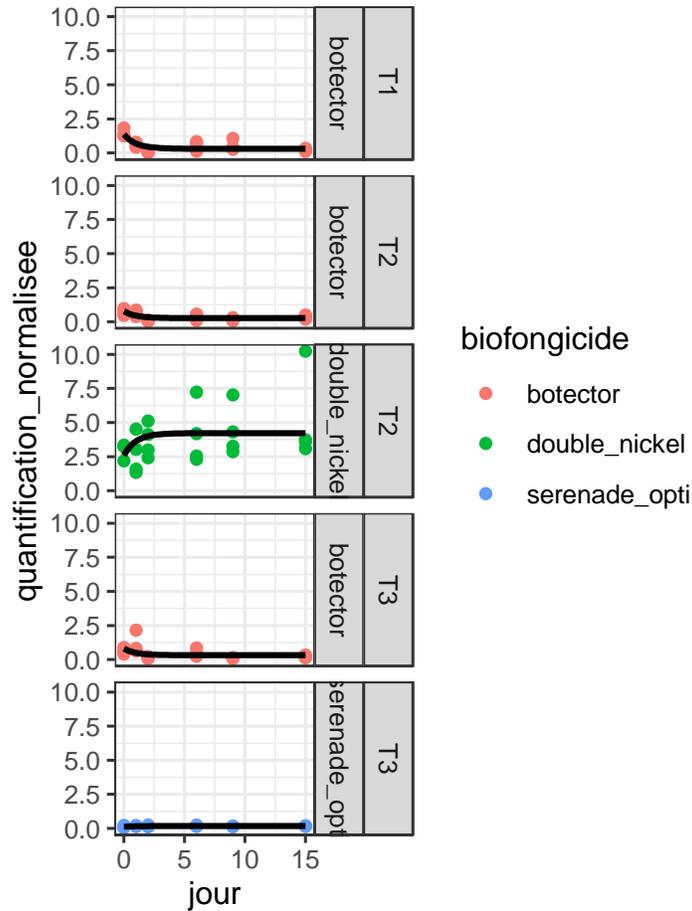


Figure 5. Quantification relative normalisée des microorganismes de la matière active des biofongicides sur une feuille de vigne en fonction du temps pour l'échantillonnage de 2022. Le temps zéro a été réalisé directement après l'application des biofongicides et les prélèvements ont été réalisés jusqu'à 14 jours post traitement.

*Objectif 2 : Vérifier la compatibilité des biofongicides et des fongicides à risques réduits*

Les biofongicides ont été appliqués sur le gel d'agar suivi d'une pulvérisation du fongicide à risques réduits au temps 0. Plusieurs prétests ont été effectués pour déterminer la meilleure procédure pour les essais. Comme les biofongicides sont présents sur une courte période temps sur la feuille (obj. 1), il n'était pas pertinent de faire des pulvérisations après 6 ou 10 jours. Un décompte des colonies des microorganismes de la matière active a été effectué 2

jours après l'inoculation, nous n'avons pas prolongé le délai, car l'effet de répression sera noté dans les premiers jours des essais. Les trois biofongicides affichaient le même niveau de mortalité pour chacun des fongicides à risques réduits ( $p = 0.98$ ) (Fig. 6). Trois fongicides à risques réduits se sont avérés causer une faible mortalité sur les biofongicides, soit le Cosavet DF, Cuivre 53 W et le Milstop, tandis que l'Oximate 2.0 a démontré le plus haut taux de mortalité avec les trois biofongicides ( $p < 0.0001$ ). Ainsi, seul l'Oximate 2.0 n'est pas compatible avec les biofongicides Botector, Double Nickel 55 et Serenade Opti.

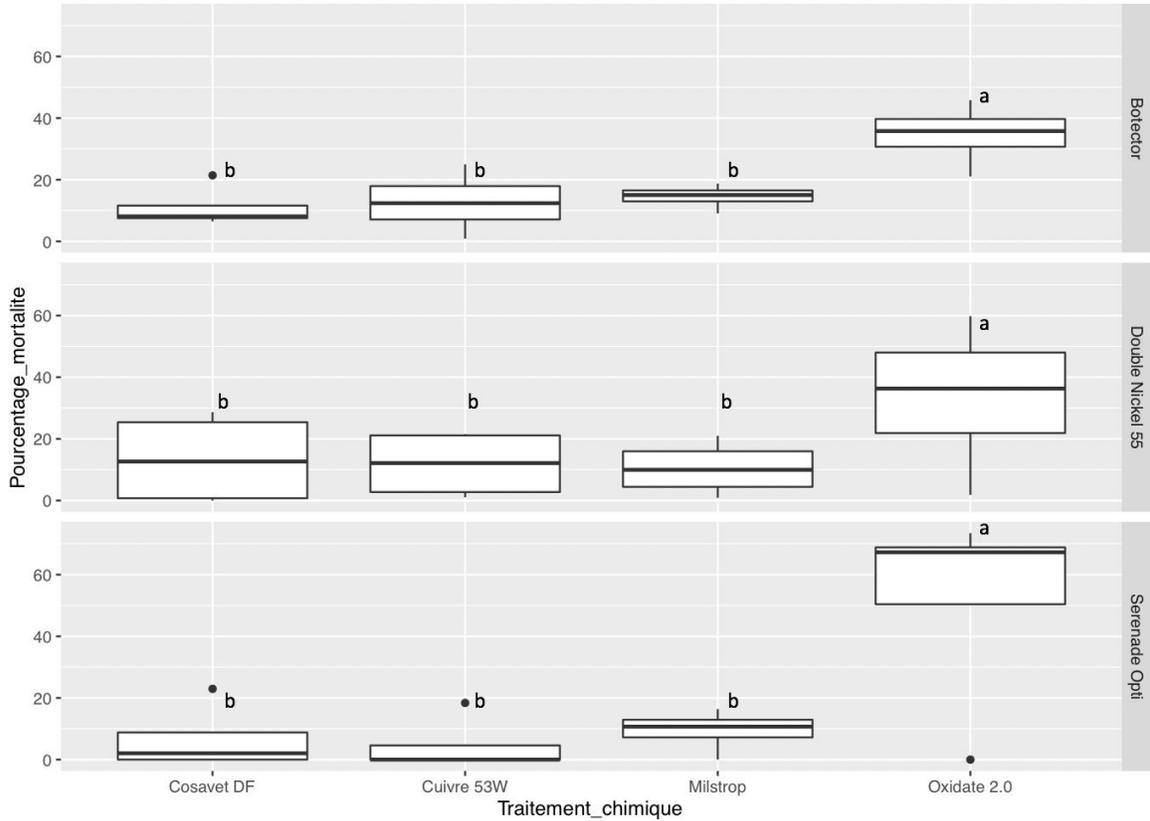


Figure 6. Pourcentage de mortalité des microorganismes de la matière active des biofongicides après un traitement par pulvérisation des différents fongicides à risques réduits. Les symboles différents indiquent une différence significative de la survie des biofongicides entre les combinaisons de traitements.

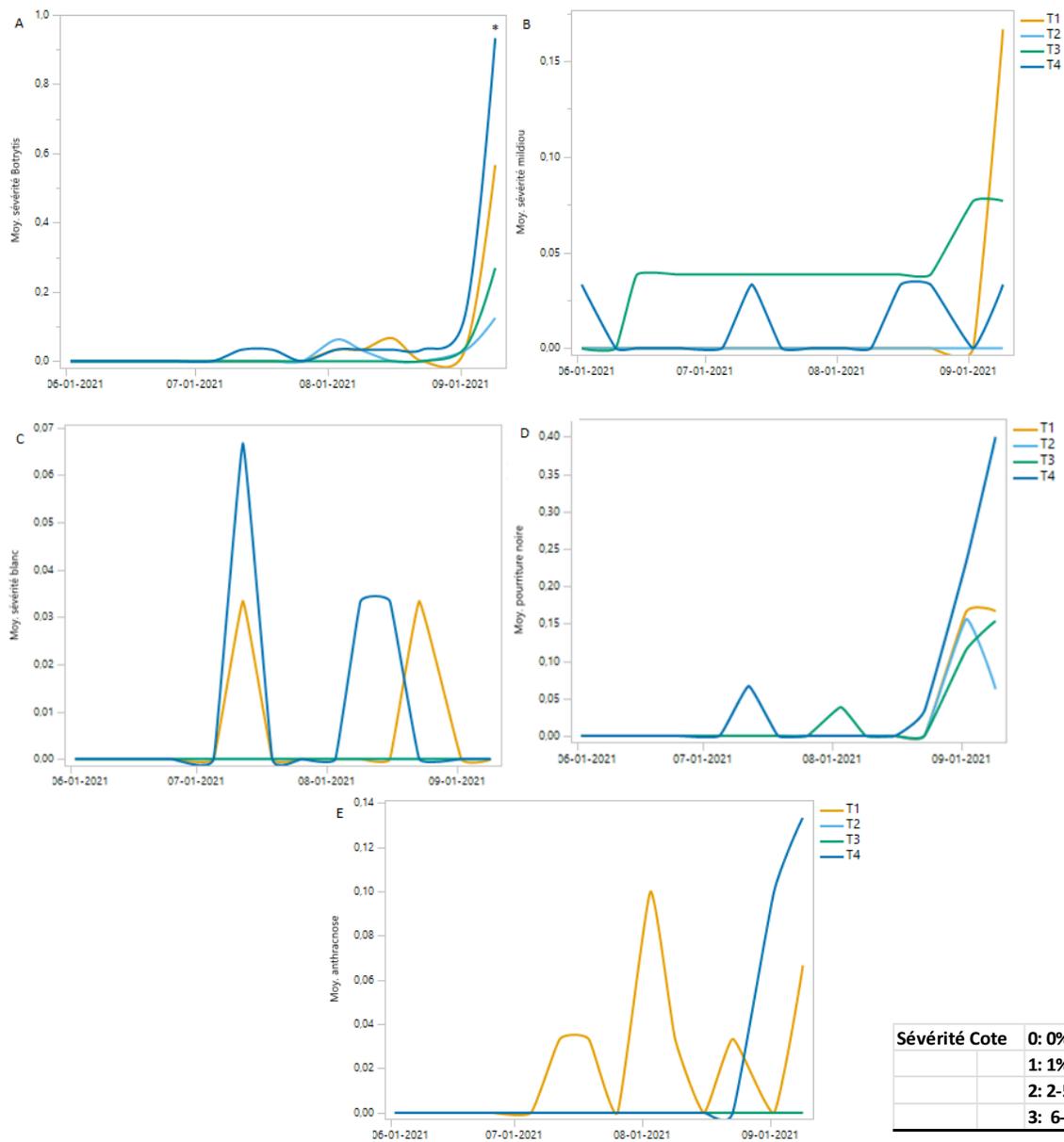
*Objectif 3 : Évaluer des stratégies d'application des fongicides à moindres risques au champ*

*Objectif 4 : Proposer une ou des stratégies d'application des fongicides à risques réduits et des biofongicides pour lutter contre les principales maladies en vignoble*

### **Saison 2021**

#### *Chardonnay*

L'observation des cinq maladies fongiques principales de la vigne, soit la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), le mildiou (*Plasmopara viticola*), le blanc (*Erysiphe necator*), l'anthracnose (*Elsinoe ampelina*) et la pourriture noire (*Guignardia bidwellii*), a été réalisée du début juin à la mi-septembre (Fig. 7). Peu de maladie a été observée en juin, seul le mildiou a été vu en faible sévérité, et surtout dans les traitements T3 (Serenade Opti) et le T4 (témoin régie risque réduit) (Fig. 7B). Les cinq maladies ont été notées en juillet à de faibles niveaux et aucune différence entre les traitements n'a été observée ( $p < 0.05$ ). Le blanc a été observé dans les parcelles avec les traitements T4 (témoin régie risque réduit) et T1 (Botector/cuivre) (Fig. 7C). La sévérité des maladies fongiques a été légèrement plus élevée en août. Le *Botrytis* a été observé de façon plus importante en fin de saison et il y avait significativement plus de *Botrytis* dans les parcelles T4 (témoin régie risque réduit) que dans les parcelles T2 (Double nickel) et T3 (Serenade Opti), puis dans T1 (Botector/cuivre) que dans le T2 (Double nickel) (Wilcoxon,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 7A). De la coulure a été notée en juillet, et la stratégie de traitements T1 (Botector/cuivre) avait significativement plus de coulure que dans le T3 (Serenade Opti) et T4 (témoin régie risque réduit) (Fig. 8).



Sévérité Cote	0: 0%	4: 16-25%
	1: 1%	5: 26-50%
	2: 2-5%	6: 51 et +%
	3: 6-15%	

Figure 7 : Cote moyenne de sévérité des différentes maladies fongiques durant la saison 2021, Chardonnay. A) Botrytis, B) mildiou, C) blanc, D) pourriture noire, E) anthracnose. Un astérisque indique une différence significative entre les traitements pour une date précise ( $p > 0,05$ ).

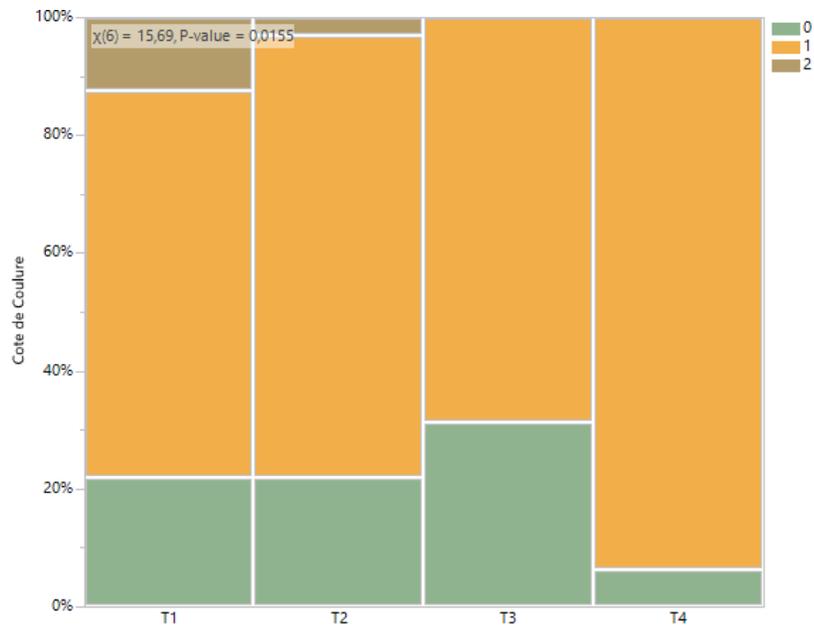


Figure 8 : Cote de coulture selon les stratégies de traitements évaluées. Saison 2021.

Certains paramètres de rendements ont été affectés par les stratégies de traitements (Fig.9). Le rendement par plant était significativement plus élevé dans le traitement T4 (témoin régie risque réduit) que pour les plants traités avec la stratégie T2 (Double nickel) et T3 (Serenade opti) (ANOVA,  $p = 0.0004$ ) (Fig. 9A). Le nombre de grappes par plant était aussi plus élevé sur les plants du T4 (témoin régie risque réduit) que dans le T2 (Double nickel) (ANOVA,  $p = 0.0039$ ) (Fig. 9C). Le poids d'une grappe et le poids des baies n'ont pas été affectés par les stratégies de traitements (ANOVA, poids grappe  $p = 0.2052$ ; poids baies  $p = 0.8341$ ).

Les stratégies de traitements ont affecté la présence de maladies sur les grappes à la récolte, principalement du *Botrytis* (Fig. 10). Le pourcentage de de grappes affectées sur un plant, en lien avec le nombre de grappes par plant avec maladies, était plus important dans la stratégie de traitement T3 (Serenade opti) et T4 (témoin régie risque réduit) que pour les plants traités avec la stratégie T1 (Botector/cuivre) (Wilcoxon, % grappes affectées  $p = 0.0075$ ; nbre grappes affectées  $p = 0.0125$ ) (Fig. 10A, 10C). En ce qui concerne le poids des grappes affectées par la maladie, il était significativement plus important dans les traitements T3 (Serenade opti) et T4 (témoin régie risque réduit) que dans le T1 (Botector/cuivre) (Wilcoxon, poids grappes affectées  $p = 0.0056$ ) (Fig. 10B).

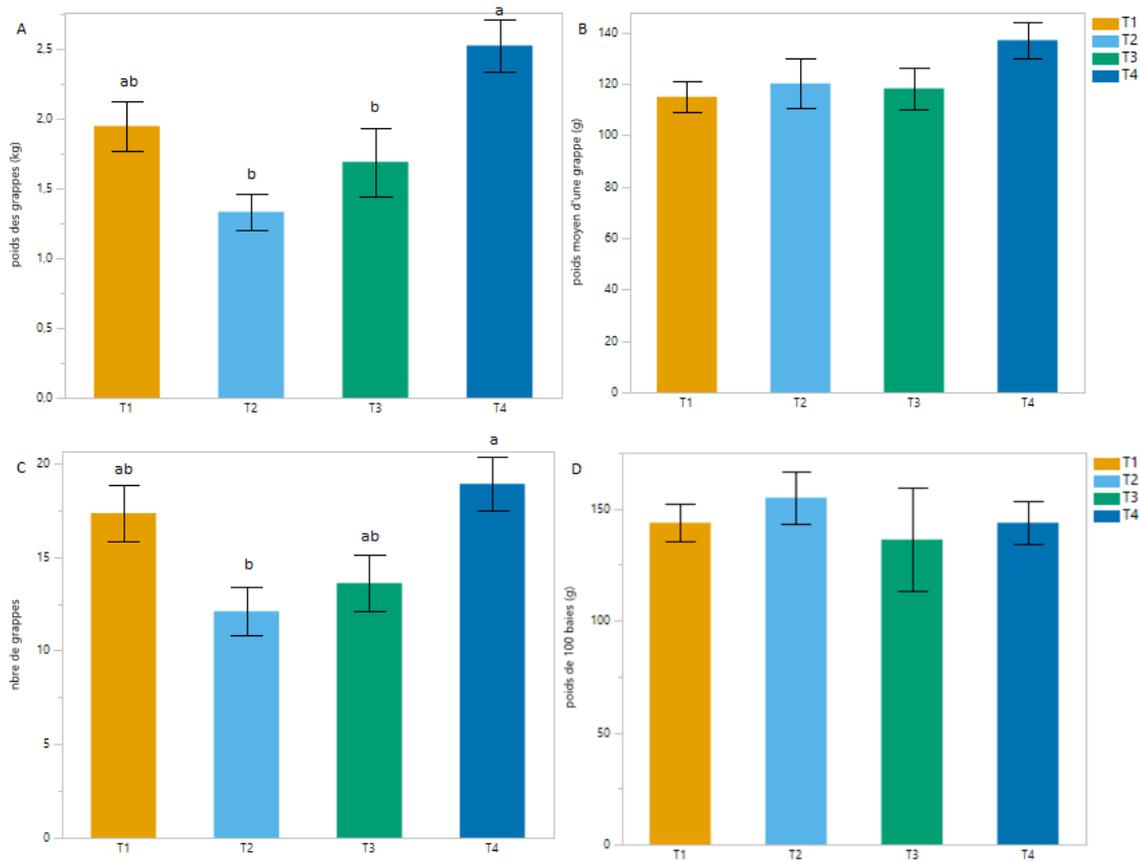


Figure 9 : Paramètres de rendement pour la récolte 2021 pour le Chardonnay. A) rendement par plant, B) poids moyen d'une grappe, C) nombre de grappes, D) poids des baies. Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements ( $p > 0.05$ )

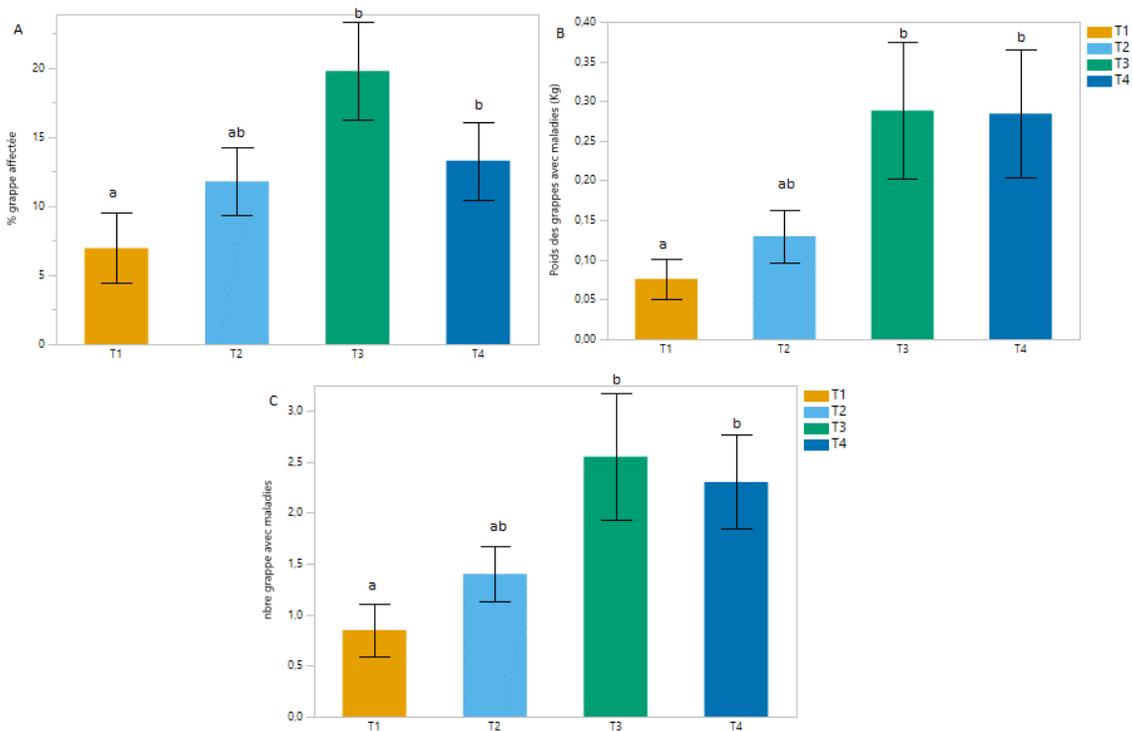


Figure 10 : Présence de maladies fongiques sur les grappes à la récolte 2021 pour le Chardonnay. A) pourcentage des grappes affectées sur le plant, B) poids des grappes affectées, C) nombre de grappes affectées. Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements ( $p > 0.05$ ).

## **Saison 2022**

Pour la saison 2022, les traitements ont été appliqués dans deux parcelles de vignoble pour deux cépages, soit le Chardonnay et le Muscat.

### *Chardonnay*

Les principales maladies de la vigne ont été suivies du 1<sup>er</sup> juin au 1<sup>er</sup> octobre 2022. L'incidence des maladies était plus faible en début de saison puis une augmentation a été notée, surtout en lien avec les mois pluvieux de juillet et août. Les deux principales maladies ont été le Botrytis (Fig. 11A) et le mildiou (Fig. 11B). Pour la saison de croissance complète, l'infection par le Botrytis dans le traitement T4 (témoin régie risque réduit) était supérieure que dans les parcelles T1 (Botector/cuivre), T2 (Double nickel) et T3 (Serenade opti) ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 11A). L'infection au mildiou a été plus faible dans les parcelles avec la stratégie T3 (Serenade opti) que dans les trois autres stratégies de traitements ( $p = 0.0071$ ) (Fig. 11B). La pourriture noire a aussi été affectée par les stratégies de traitements, son incidence était supérieure dans les parcelles avec les traitements T2 (Double nickel) que dans les parcelles avec les stratégies T1 (Botector/cuivre) et T3 (Serenade opti) ( $p = 0.0068$ ) (Fig. 11D). Il y a eu très peu de blanc et d'antracnose sur les plants de Chardonnay (Fig. 11C, 11E).

La coulure de grappes a été observée surtout dans les stratégies de traitements T2 (Double nickel) et T3 (Serenade opti) (Fig. 12). Les rendements des plants de vigne ont été affectés par les stratégies de traitements (Fig. 13). Le rendement par plant était inférieur pour les plants traités avec les stratégies T1 (Botector/cuivre) et T3 (Serenade opti) comparativement à une régie avec des produits à risques réduits (T4) ( $p = 0.0013$ ) (Fig. 13A). Ce rendement est en lien avec le nombre de grappes par plant qui suit les mêmes résultats ( $p = 0.0004$ ) (Fig. 13C). Le poids moyen d'une grappe (Fig. 13B) et le poids des baies (Fig. 13D) n'ont pas été affectés par les stratégies de traitements. L'incidence des maladies sur les grappes a aussi été affectée par les stratégies de traitements (Fig. 14). On observe un pourcentage de grappes affectées par les maladies plus faible dans le traitement T1 (Botector/cuivre) que dans les traitements T3 (Serenade opti) et T4 (témoin, risques réduits) (Fig. 14A). Le nombre de grappes affectées et le poids des grappes affectées étaient similaires pour les quatre stratégies de traitements (poids :  $p = 0.146$ ; nbre :  $p = 0.0736$ ) (Fig. 14B, 14C).

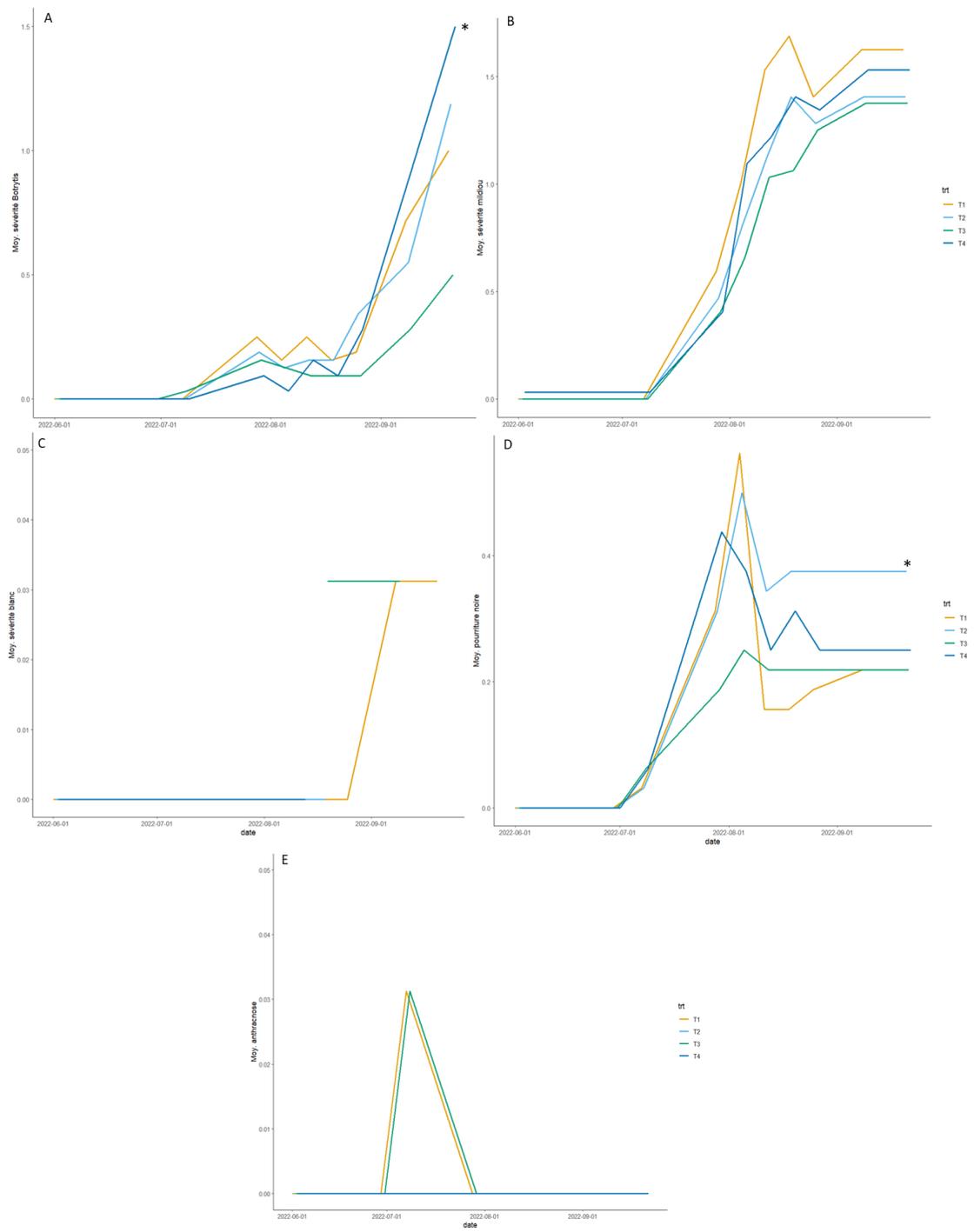


Figure 11 : Cote moyenne de sévérité des différentes maladies fongiques durant la saison 2022, Chardonnay. A) Botrytis, B) mildiou, C) blanc, D) pourriture noire, E) anthracnose. Un astérisque indique une différence significative entre les traitements pour une date précise ( $p > 0,05$ ).

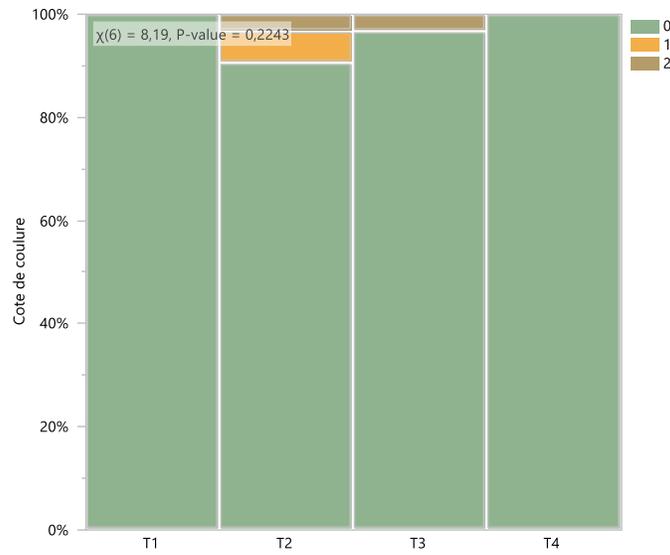


Figure 12 : Cote de coulure selon les stratégies de traitements évaluées. Saison 2022.

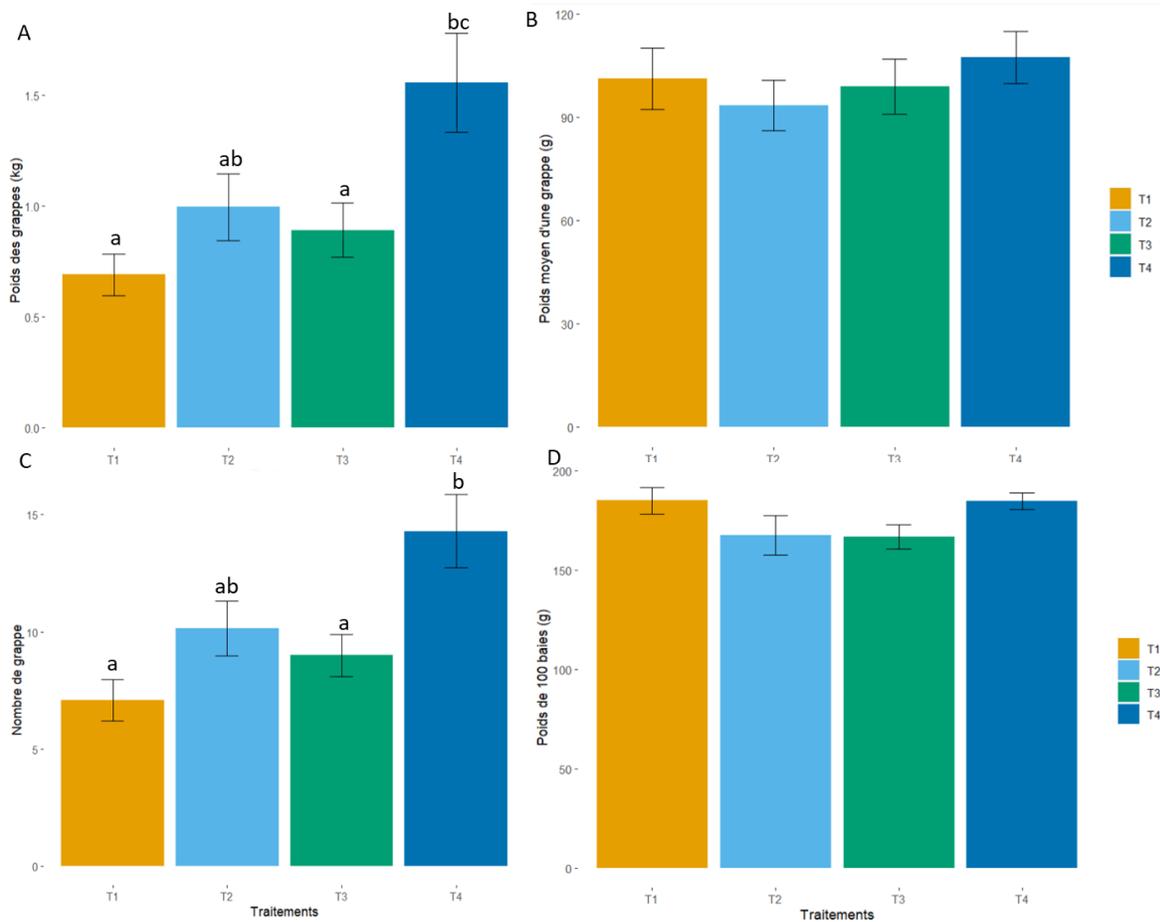


Figure 13 : Paramètres de rendement pour la récolte 2022 pour le Chardonnay. A) rendement par plant, B) poids moyen d'une grappe, C) nombre de grappes, D) poids des baies. Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements ( $p > 0.05$ )

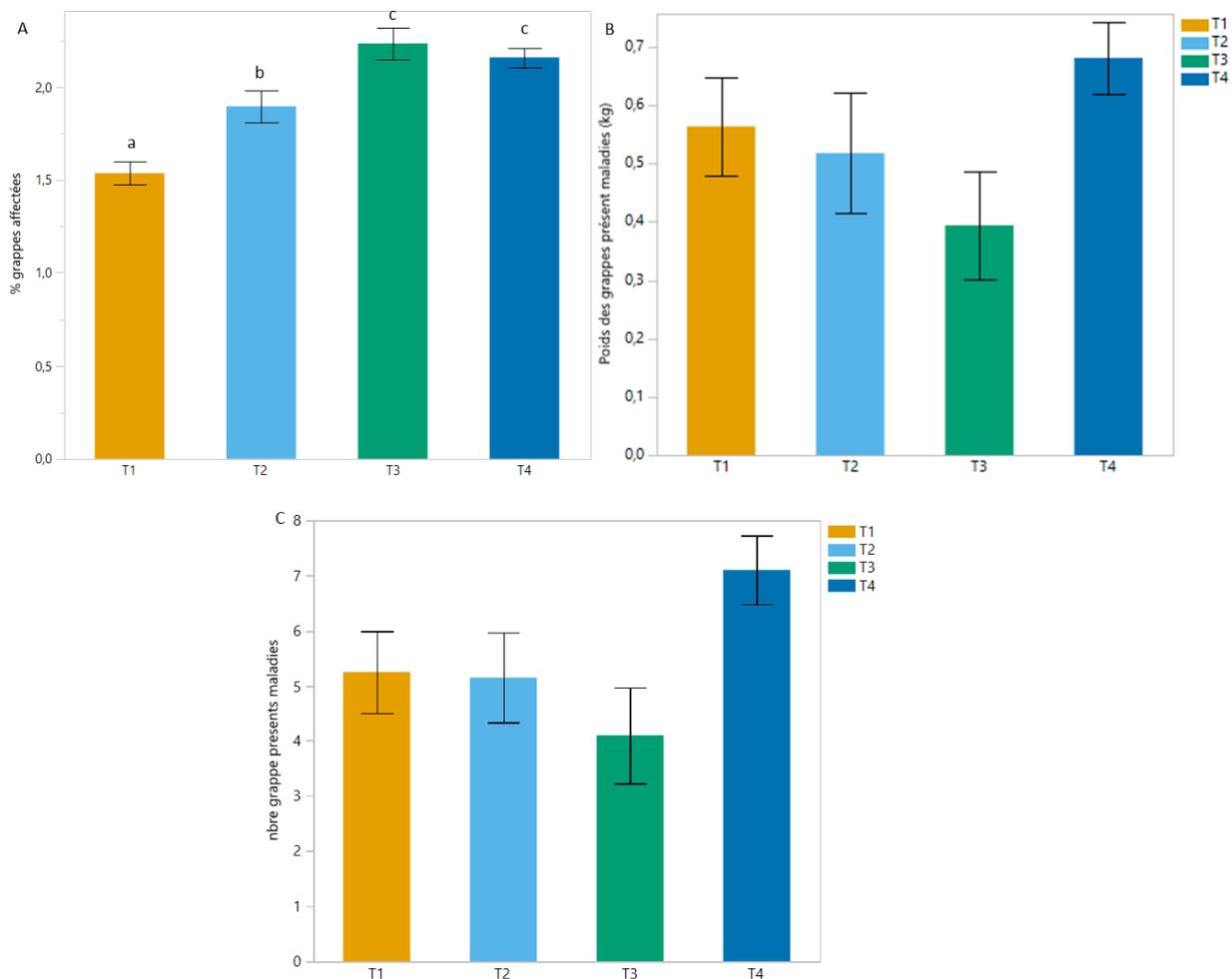


Figure 14 : Présence de maladies fongiques sur les grappes à la récolte 2022 pour le Chardonnay. A) pourcentage des grappes affectées sur le plant, B) poids des grappes affectées, C) nombre de grappes affectées. Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements ( $p > 0.05$ ).

### *Muscat*

Dans les parcelles de Muscat, la principale maladie observée a été le Botrytis, puis la pourriture noire, mais pratiquement pas de mildiou, blanc et anthracnose (Fig. 15). Les parcelles les plus affectées par le Botrytis étaient celles avec la stratégie de traitements T1 (Botector/cuivre), suivi par la stratégie T3 (Serenade opti), puis de niveau similaire pour T2 (Double nickel) et T4 (témoin, risques réduits) ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 15A). Malgré de très faibles niveaux, le mildiou était significativement plus présent dans le traitement T4 (témoin, risques réduits) que dans les autres traitements ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 15B). La coulure était un peu plus présente dans les stratégies T1 (Botector/cuivre) et T3 (Serenade opti) comparativement à la stratégie témoin, risques réduits (T4), mais de façon non significative ( $p = 0.2595$ ) (Fig. 16). Les paramètres de rendement pour le Muscat ont été peu affectés par les différentes stratégies de traitements avec les biofongicides (Fig. 17). Seul le nombre de grappes a été plus faible pour les plants traités avec la stratégie T3 (Serenade opti) comparativement au T4 (témoin, risques réduits) (rendement :  $p = 0.29$ ; poids 1 grappe :  $p = 0.471$ ; nbre grappes :  $p = 0.0484$ ;

pois baies :  $p = 0.47$ ) (Fig. 17). À la récolte, un niveau de grappes affectées par les maladies était légèrement inférieur pour les stratégies de traitements T1 (Botector/cuivre) et T3 (Serenade opti) ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 18A) comparativement aux deux autres stratégies. Le poids des grappes affectées et le nombre de grappes affectées étaient similaires pour tous les traitements (pois :  $p = 0.185$ , nre :  $p = 0.132$ ) (Fig. 18B, 18C).

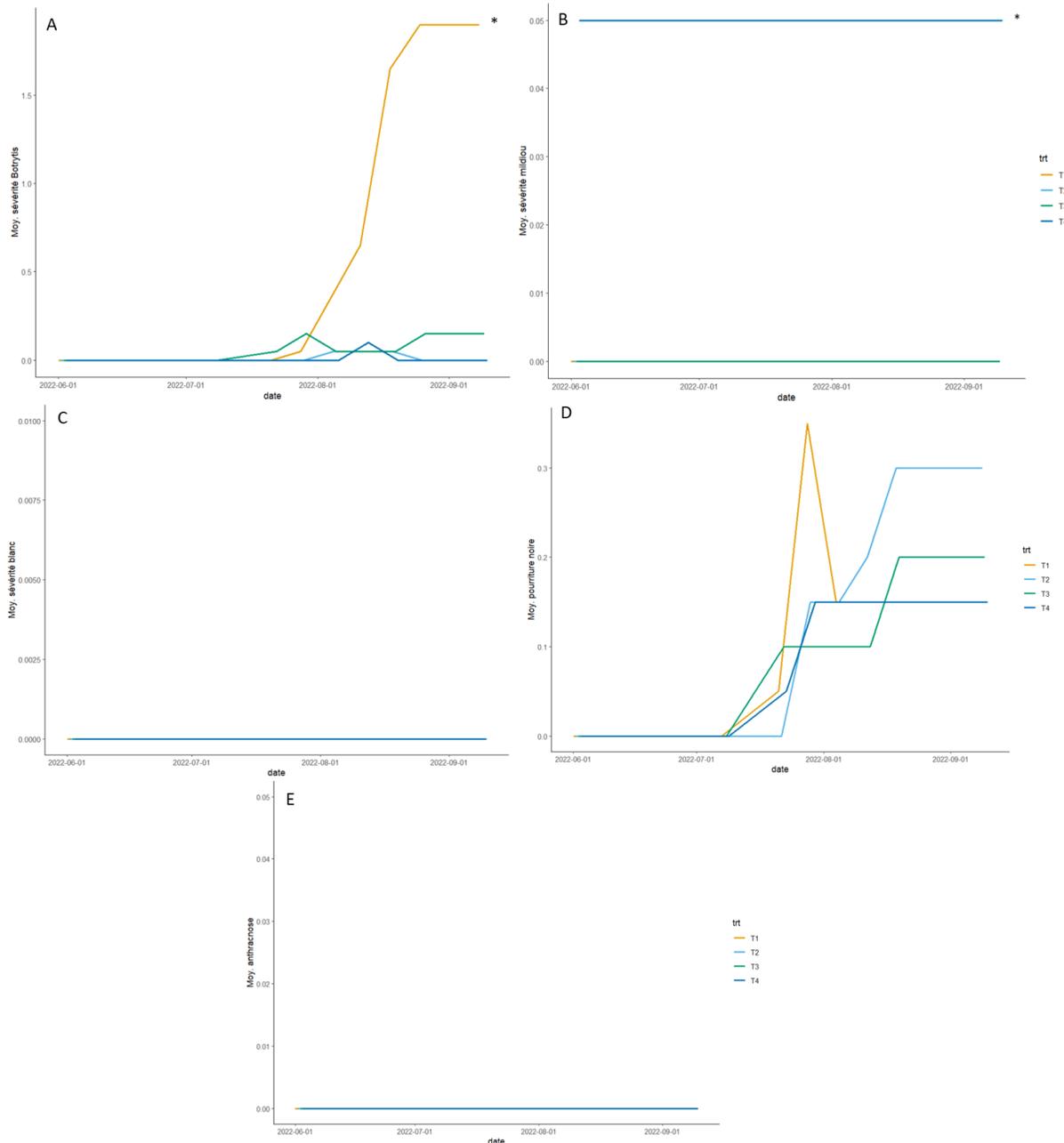


Figure 15 : Cote moyenne de sévérité des différentes maladies fongiques durant la saison 2022, Muscat. A) Botrytis, B) mildiou, C) blanc, D) pourriture noire, E) anthracnose. Un astérisque indique une différence significative entre les traitements pour une date précise ( $p > 0,05$ ).

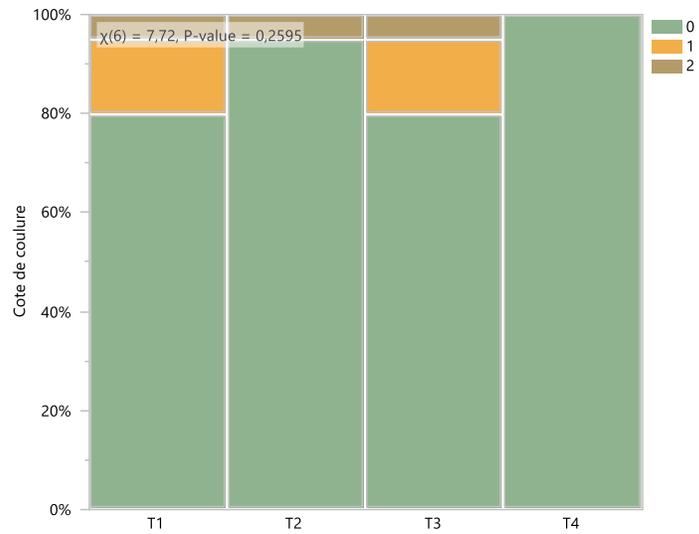


Figure 16 : Cote de coulure selon les stratégies de traitements évaluées. Saison 2022.

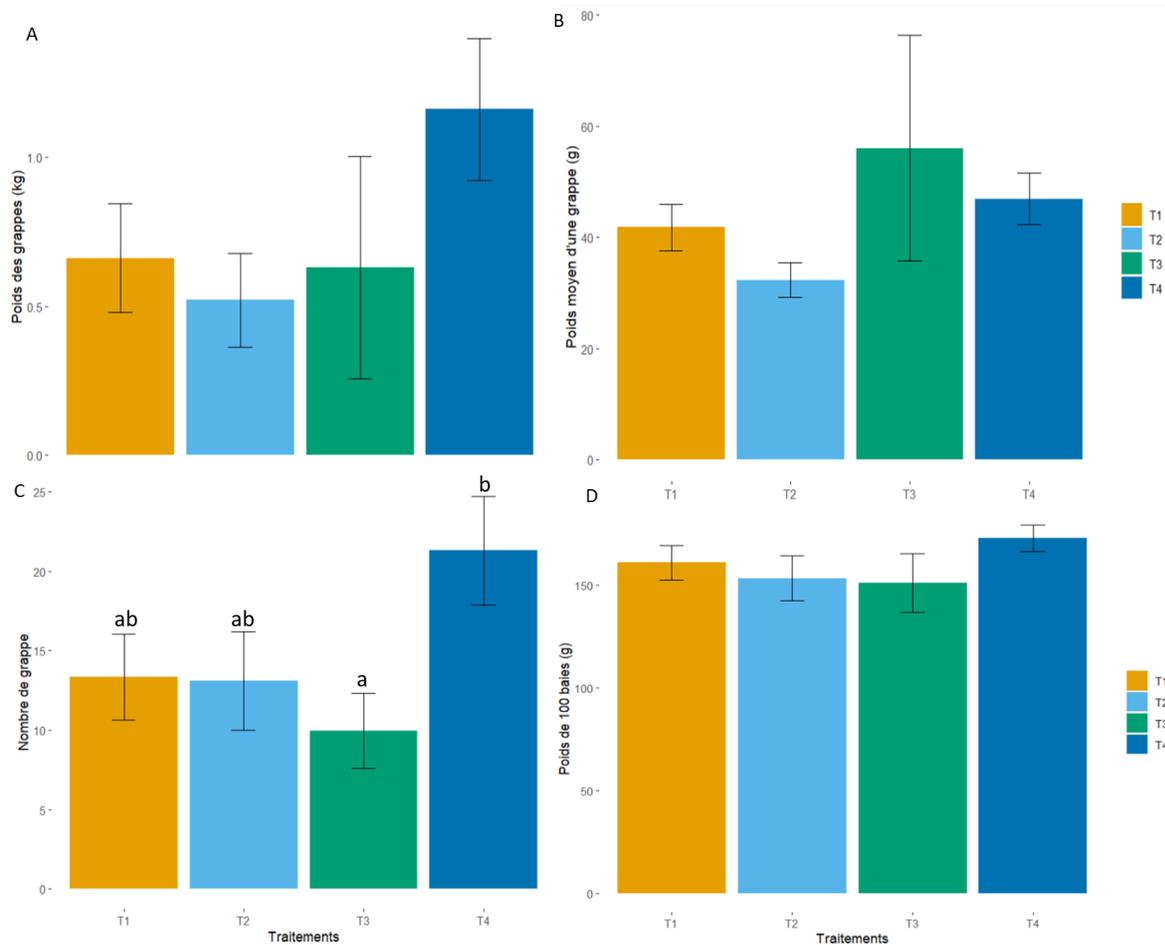


Figure 17 : Paramètres de rendement pour la récolte 2022 pour le Muscat. A) rendement par plant, B) poids moyen d'une grappe, C) nombre de grappes, D) poids des baies. Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements ( $p > 0.05$ )

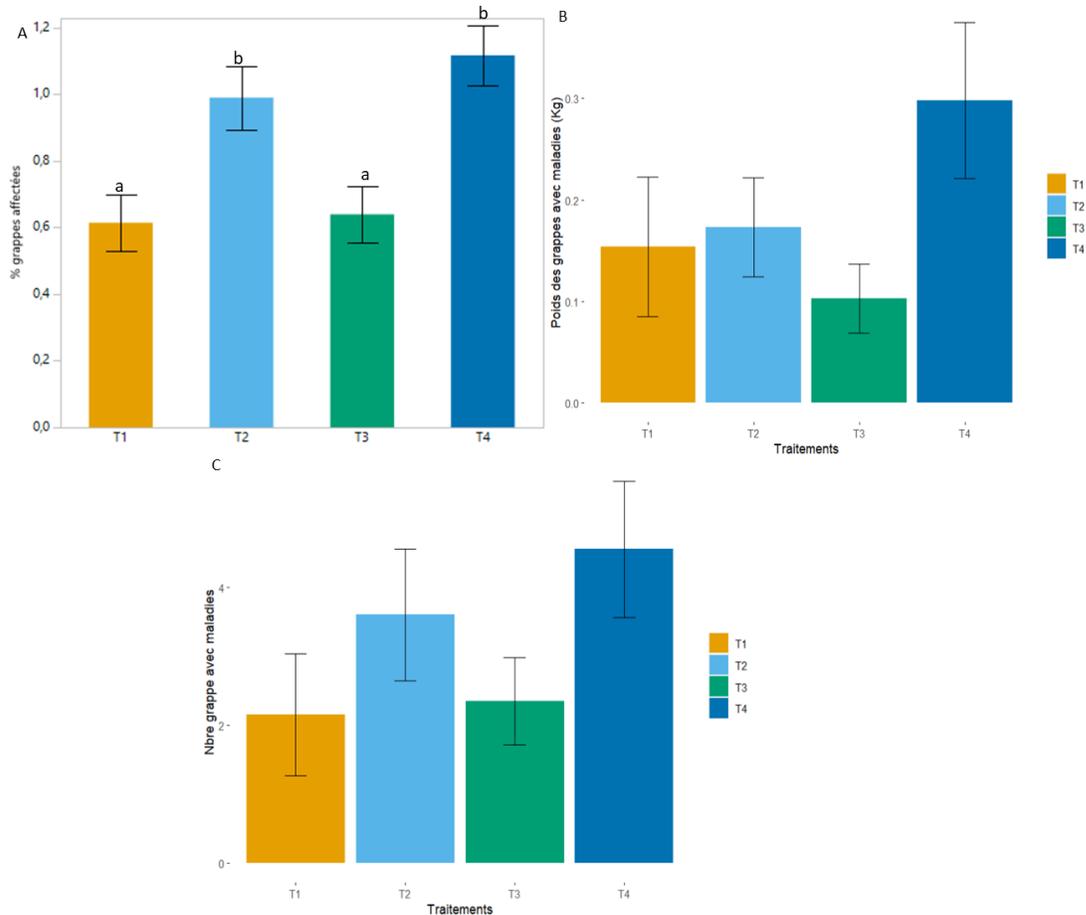


Figure 18 : Présence de maladies fongiques sur les grappes à la récolte 2022 pour le Muscat. A) pourcentage des grappes affectées sur le plant, B) poids des grappes affectées, C) nombre de grappes affectées. Les lettres indiquent une différence significative entre les traitements ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSSION

Les producteurs canadiens sont constamment sous pression pour réduire leur utilisation de pesticides. Cependant, pour assurer la compétitivité de l'industrie, il est essentiel de sécuriser les rendements en améliorant la gestion des maladies. Les viticulteurs sont menacés par plusieurs maladies foliaires et des baies, dont le Botrytis, le mildiou, le blanc, l'anthracnose et la pourriture noire. Par conséquent, prévenir et retarder le développement de ces maladies avec un minimum d'impacts sur l'environnement est un défi quotidien pour les producteurs et les spécialistes des cultures.

Le succès des stratégies de gestion durable repose sur un suivi constant des populations de pathogènes, principalement la densité de l'inoculum et la diversité génétique, y compris les profils de résistance aux fongicides. De plus, les avancées récentes en biologie moléculaire ont conduit au développement d'outils de pointe permettant une caractérisation et un suivi

rentables des populations de phytopathogènes (Carisse et al., 2009, 2016). Les problèmes associés avec les pesticides de synthèse et la demande pour des pratiques alternatives ayant des risques réduits sur la santé humaine et l'environnement ont stimulé la recherche et le développement de nouveaux outils pour lutter contre les maladies de la vigne, dont les biofongicides. Les compagnies ont développé plusieurs nouvelles matières actives avec un profil moins dommageable pour la santé humaine et l'environnement, dont des produits à base d'organismes microbiens et d'extrait de plante (Jacometti et al. 2010; Pertot et al. 2017). Plusieurs produits sont actuellement homologués au Canada pour lutter surtout contre la pourriture grise (*Botrytis*), le blanc et le mildiou (source Sage pesticides). Il est donc important que les informations de compatibilité soient acquises notamment sur les aspects concernant l'application dans l'espace et le temps des biofongicides et des fongicides de synthèse. Un manque de connaissances relativement à la compatibilité des produits peut contribuer à l'échec de la stratégie de lutte. En général, les biofongicides sont moins persistants et plus biodégradables comparativement aux fongicides de synthèse, d'où l'importance d'avoir une application qui tient compte de la méthode, du moment et de la partie de la plante si l'on veut obtenir une certaine efficacité du produit (Abbey et al. 2019).

Ce projet a permis de répondre à différents questionnements, notamment quels biofongicides sont compatibles entre eux, notamment ceux à base de microorganismes et d'autres à base d'autres matières actives. Les résultats de laboratoire ont démontré que les microorganismes du Double Nickel 55 (*Bacillus amyloliquefaciens*) et de Serenade Opti (*Bacillus subtilis*) sont présents lors de l'application et qu'ils diminuent rapidement dans les jours suivants. Le Botector (*Aureobasidium pullulans*) voit sa population du microorganisme augmenter suite à l'application jusqu'à 6 jours après, puis une diminution est observée. Le fongicide Oxidate 2.0 affecte grandement les microorganismes des trois biofongicides et cause une mortalité importante, contrairement aux Cosavet DF, Cuivre 53W et Milstop qui ont peu d'effet sur les microorganismes des biofongicides. Ainsi, la majorité des biofongicides sont compatibles entre eux, à l'exception de l'Oxidate 2.0 qui est un peroxyde d'hydrogène et qui tue les microorganismes présents dans les biofongicides.

Les suivis des populations des microorganismes réalisés sur le terrain ont permis d'amasser des informations intéressantes sur la persistance des produits sur les feuilles de vigne. À notre connaissance, ces informations n'ont jamais été collectées sur le terrain. Les résultats du suivi des populations en vignoble ont démontré un déclin exponentiel de détection de Botector en fonction du temps, qu'il soit employé seul ou encore en combinaison avec d'autres biofongicides, et ce pour les deux années d'échantillonnage réalisées. Cette observation va à l'encontre de ce qui avait été observé en laboratoire, soit que Botector colonisait d'abord la feuille, avant de diminuer par la suite. Dans le cas du Double nickel, on observe un gain exponentiel de détection lors de deux échantillonnages sur trois, représentant également une observation à l'encontre de ce qui avait été observé au laboratoire, soit un déclin de sa détection. Finalement, on observe un déclin de détection de Serenade opti dans le cas de deux

échantillonnages sur trois, représentant ce qu'on avait observé au laboratoire. La variation dans les résultats entre les années d'échantillonnages peut être expliquée par les conditions météorologiques qui sont changeantes et qui impactent la persistance des biofongicides sur les feuilles. En effet, la pluie peut lessiver les microorganismes présents sur les feuilles, amenant à un déclin dans la détection de ceux-ci. La présence des microorganismes de la matière active des biofongicides est toutefois détectable pour la durée complète des traitements, que ce soit 7 ou 14 jours, indiquant leur présence prolongée sur les feuilles de vigne.

Les différentes stratégies de lutte à base de biofongicides utilisées ont permis de contrôler efficacement les cinq principales maladies en vignoble. Dans les trois stratégies avec les biofongicides, un traitement au Botector a été appliqué à trois reprises dans une saison afin de lutter contre le Botrytis sur les grappes. Le Botector a déjà démontré son efficacité pour lutter contre le Botrytis dans la vigne (Bozoudi et Tsalta 2018; Carisse et al. 2021a, 2021b; Parafati et al. 2015). *Aureobasidium pullulans* est un champignon de type levure (yeast-like fungus) qui est oligotrophe, saprophyte et polymorphe naturellement présent en association avec les populations dans la phyllosphère (feuillage) et la carposphère (zone fruitière) de diverses espèces de plantes, y compris la vigne (Bozoudi et Tsalta 2018). La présence généralisée d'*A. pullulans* est attribuée à sa tolérance élevée à différents les stress écologiques et sa forte activité antagoniste contre les bactéries et les champignons. Le Botector n'était pas présent dans le traitement témoin avec des pesticides à risques réduits, cela peut être une explication à l'infection plus élevée par le Botrytis dans cette stratégie de traitement pour les deux saisons dans le Chardonnay. Il faut toutefois mentionner que dans la stratégie T3 (Serenade opti), la présence des maladies sur les grappes à la récolte était aussi un peu plus élevée. Les deux stratégies ayant permis un meilleur contrôle des maladies sur les grappes sont T1 avec du Botector, cuivre, Kumulus et Milstop, ainsi que T2 avec du Double nickel, Botector, cuivre et Milstop.

Le mildiou, le blanc et l'antracnose ont été très bien contrôlés par les quatre stratégies de traitements. On peut seulement mentionner que les faibles taux de mildiou étaient légèrement supérieurs dans la stratégie T1 (Botector, cuivre) pour les deux années dans le Chardonnay. En ce qui concerne la pourriture noire dans le Chardonnay, sa présence était plus élevée dans la stratégie témoin à risques réduits (T4) en 2021 et 2022, et dans la stratégie T2 (Double nickel) en 2022, tout comme pour le Muscat. Ainsi, la combinaison du Double nickel, cuivre, Botector et Milstop semble moins efficace pour contrôler la pourriture noire. Il faut mentionner que parmi les biofongicides évalués dans les 3 stratégies biofongicides, seul le cuivre démontre une bonne efficacité contre cette maladie (Campbell et Provost 2018). L'Oxidate a aussi démontré une efficacité comme biopesticide pour réprimer la pourriture noire, mais nous n'en avons pas intégré dans nos stratégies de traitement (Campbell et Provost 2018). Comme mentionné précédemment, l'application de l'Oxidate doit tenir compte des autres traitements biofongicides à base de microorganismes afin de ne pas tuer ce qui a déjà été appliqué.

L'impact des stratégies de traitement sur le rendement est difficilement explicable, mais deux hypothèses peuvent être avancées. Pour les deux années d'essais et les deux cépages, le nombre de grappes était supérieur dans le traitement témoin à risques réduits comparativement aux trois autres stratégies de lutte, ceci affectant généralement le rendement par plant des vignes. Nous pouvons relier partiellement ce nombre de grappes supérieur à l'indice de coulure où il n'y avait aucune coulure dans la stratégie de traitement témoin à risques réduits comparativement aux autres stratégies avec les biofongicides (mais la coulure était tout de même faible dans ces traitements). Il faut aussi mentionner qu'il y a eu des dommages de gel hivernal important dans les parcelles, et ce malgré une protection des vignes par buttage. Nous avons noté une grande hétérogénéité entre les parcelles expérimentales et cela pourrait affecter les résultats de rendement. Les dommages de gel sont suivis dans le cadre d'un autre projet dans ces parcelles et c'est actuellement le constat qu'il a été fait surtout à l'hiver 2022. Les différentes stratégies n'avaient pas d'effet sur le poids des grappes et le poids des baies.

Ainsi, ce projet a permis d'acquérir des informations spécifiques sur les biofongicides et les fongicides à moindres risques puis quatre stratégies ont été évaluées pour lutter contre les principales maladies en vignoble. La compréhension des modes d'action, des effets des produits les uns sur les autres ainsi que l'efficacité des stratégies permet une utilisation réfléchie des biofongicides en vignoble. L'utilisation des différentes stratégies selon les antécédents du vignoble, les conditions météorologiques ainsi que la rotation des produits, entre autres, maximisera l'efficacité des méthodes de lutte aux maladies et réduira le nombre de traitements appliqués annuellement tout en assurant une vigne et une récolte saine au producteur.

## **DIFFUSION DES RÉSULTATS**

Présentation aux utilisateurs (agronomes, conseillers et producteurs)

1. Provost. C. 2022. Gestion des ravageurs en vignoble: nouvelles pistes de solutions pour lutter contre le scarabée japonais, les maladies fongiques et les mauvaises herbes. Séance d'échange sur la recherche en viticulture et œnologie (SERVO), 7-8 avril 2022.
2. Provost. C. 2021. État des projets de recherche en phytoprotection et régie de culture en viticulture au CRAM. Séance d'échange sur la recherche en viticulture et œnologie (SERVO), 8-9 avril 2021.
3. Carisse, O.. 2021. Évaluation de biofongicides dans la lutte aux principales maladies de la vigne. Webinaire CRAAQ, série vigne et vin, 22 mars 2021.

Présentation à la communauté scientifique :

4. Provost, C. A-A. Durand, P. Constant, C. Guertin. 2021. Assessment of compatibility of biofungicides in the development of a strategy for the control of diseases in vineyards. Congrès conjoint Société Canadienne de phytopathologie, Société canadienne des sciences horticoles, Société canadienne agricole, 14 au 17 juin 2021, Canada (virtuel).
5. Carisse, O. et C. Provost. 2022. Biological fungicides: their effectiveness and integration in management programs. Vitinord, Burlington, Vermont, États-Unis. 4 au 7 décembre 2022.

La fiche synthèse et le rapport final seront diffusés sur le site internet du CRAM et dans la section vigne de AgriRéseau.

Estimer le nombre d'entreprises touchées par les résultats du projet	290 producteurs de raisin au Québec  Peut être utilisé dans la fraise pour le Botrytis avec Botector. 525 producteurs de fraises au Québec
--	--

#### **APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE**

Ce projet a permis dans un premier temps de caractériser comment les biofungicides à base de microorganismes colonisent les feuilles de vigne et de déterminer la compatibilité des biofungicides entre eux. Les résultats ont démontré que les microorganismes colonisent différemment les feuilles de vigne selon s'ils sont en laboratoire ou sur le terrain, démontrant ainsi que les conditions météorologiques ont sûrement un impact sur les microorganismes. Le fongicide Oxidate 2.0 affecte grandement les microorganismes des trois biofungicides et cause une mortalité importante, contrairement aux Cosavet DF, Cuivre 53W et Milstop qui ont peu d'effet sur les microorganismes des biofungicides. Ainsi, la majorité des biofungicides sont compatibles entre eux, à l'exception de l'Oxidate 2.0 qui est un peroxyde d'hydrogène et qui tue les microorganismes présents dans les biofungicides. Le moment d'application de l'Oxidate requiert donc que l'on considère s'il y a eu une utilisation des biofungicides à base de microorganismes dans les jours précédents ou qu'il y aura une application dans les jours suivants.

Les différentes stratégies de lutte à base de biofungicides utilisées ont permis de contrôler efficacement les cinq principales maladies en vignoble, surtout le Botrytis sur les grappes. Ainsi, ces trois stratégies sont à recommander pour appliquer dans les vignobles biologiques, mais aussi dans la régie conventionnelle, car elles ont démontré une efficacité similaire, voir supérieure, dans certains cas, à une stratégie conventionnelle à risques réduits. L'utilisation du Botector pour lutter contre le Botrytis continue de démontrer son efficacité et est un produit à privilégier pour lutter contre cette maladie.

## PERSONNE-RESSOURCE POUR INFORMATION

**Dr Caroline Provost, directrice-chercheur**

Téléphone : 450-434-8150 #6064

Courriel : [cprovost@cram-mirabel.com](mailto:cprovost@cram-mirabel.com)



## REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Nous tenons à remercier les producteurs qui ont participé au projet pour leur accès aux vignobles. Ce projet a été financé par le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec dans le cadre du volet 3 du programme Prime-Vert.

## RÉFÉRENCES

- Abbey, J. A., Percival, D., Abbey, L., Asiedu, S. K., Prithiviraj, B., & Schilder, A. (2019). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)—prospects and challenges. *Biocontrol science and technology*, 29(3), 207-228.
- Bozoudi, D. et D. Tsaltas. 2018. "The Multiple and Versatile Roles of *Aureobasidium pullulans* in the Vitivinicultural Sector" *Fermentation* 4, no. 4: 85.
- Campbell, A. et C. Provost. 2018. Affiche de production fruitière intégrée vigne. CRAM. 2p.
- Carisse, O., R. Bacon, J. Lasnier, A. Lefebvre, A. Levasseur, D. Rolland et T. Jobin. 2009. Gestion raisonnée des principales maladies de la vigne au Québec. Agriculture et Agroalimentaire Canada, publication 10372F, ISBN : 978-1-100-91897-6.
- Carisse, O., A. Lefebvre, C. Provost. 2021a. Évaluation de l'efficacité de biofungicides pour lutter contre différentes maladies fongiques dans la vigne. Rapport final CRAM-1-17-1853.
- Carisse, O., A. Lefebvre et C. Provost. 2021b. Fiche technique pour la gestion du *Botrytis* en vignoble. CRAM, 5p.
- Carisse O., Tremblay M., Lefebvre A., Van der Heyden H. 2016. Specific multiplex quantification and genotyping qPCR assay for monitoring airborne sporangia of *Plasmopara viticola* f. sp. *riparia*, *aestivalis* and *vinifera*. 2016 APS annual meeting.
- Jacometti, M. A., Wratten, S. D., & Walter, M. (2010). Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 154-172.
- Parafati, L., A. Vitale, C. Restuccia, et G. Cirvilleri. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* 47: 85–92.
- Pertot, I., Caffi, T., Rossi, V., Mugnai, L., Hoffmann, C., Grando, M. S., ... & Mazzoni, V. (2017a). A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Protection*, 97, 70-84.

## ANNEXE 1 : Détails méthodologique pour objectifs 1 et 2.

**Tableau 1. Amorces utilisées pour la détection de chacun des microorganismes de la matière active des biofongicides ainsi que les conditions d'amplification PCR**

Biofongicides	Amorces	Programmes PCR	Taille de l'amplification	Références
<b>Double Nickel 55</b> ( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> )	BamyF 5' AAATCTGCCCGTATCGTCTG GT 3'	95°-5m; 35 cycles de 95°-30s, 64°-30s, 72°-1m; 72°-10m; 4°-∞	747	Borshchevskaya et al., 2013
	BamyR 5' GTGAGCATTGGCGTCACGGCG CG 3'			
<b>Serenade Opti</b> ( <i>Bacillus subtilis</i> )	BS_yndJ-F 5'AATGACCGTGCTCCATCT GTAA 3'	95°-5m; 35 cycles de 95°-30s, 60°-30s, 72°-20s; 72°-10m; 4°-∞	74	Rotolo et al., 2016
	BS_yndJ-R 5' TTCCGATCTTTAACGGATTGCT CT 3'			
<b>Botector</b> ( <i>Aureobasidium pullulans</i> )	AP19F 5' TACGGTGAAGCTGCGTGAT GGCT 3'	95°-5m; 35 cycles de 95°-30s, 60°-30s, 72°-30s; 72°-10m; 4°-∞	368	Chan et al., 2011
	AP368F(R) 5' TGGGTAATTTGCGCGCCTGCT CT 3'			

### Références pour les amorces

BORSHCHEVSKAYA, L. N., KALININA, A. N., et SINEOKII, S. P. Design of a PCR test based on the *gyrA* gene sequence for the identification of closely related species of the *Bacillus subtilis* group. *Applied biochemistry and microbiology*, 2013, vol. 49, no 7, p. 646-655.

CHAN, Giek Far, PUAD, Mohamad Safwan Ahmad, CHIN, Chai Fung, et al. Emergence of *Aureobasidium pullulans* as human fungal pathogen and molecular assay for future medical diagnosis. *Folia microbiologica*, 2011, vol. 56, no 5, p. 459.

ROTOLO, Caterina, ANGELINI, Rita Milvia De Miccolis, POLLASTRO, Stefania, et al. A TaqMan-based qPCR assay for quantitative detection of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* strain QST713 and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain D747. *BioControl*, 2016, vol. 61, no 1, p. 91-101.

## Dispositif expérimental: Colonisation de la feuille par les microorganismes

JOUR	BOTECTOR						SERENADE OPTI					BOUBLE NICKEL								
0	T+P	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T+P	T	T	T	T	T		
	Récupération des microorganismes Extraction d'ADN		Pulvérisation du Biofongicide au jour 0 pour tous les traitements, par bloc						T+P											
1		P												P						
2		Récupération des microorganismes Extraction d'ADN		P							P					P				
3			Récupération des microorganismes Extraction d'ADN																	
4	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px;"> <b>Traitement des données après le 14<sup>e</sup> jour:</b>                      1. Amplification PCR en utilisant les amorces spécifiques à chacun des microorganismes de la matière active                      2. Gel d'agarose 1,5% coloré au GelStain                      3. Quantification de l'intensité de la bande au gel doc (intensité relative)                 </div>																			
5																				
6						P						P							P	
7					Récupération des microorganismes Extraction d'ADN															
8																				
9																				
10																				
11												P						P		
12			Récupération des microorganismes Extraction d'ADN																	
13																				
14														P				P		
														Récupération des microorganismes Extraction d'ADN						

## PCR spécifique à chacun des microorganismes (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *A. pullulens*)

Master Mix	X1 (ul)
H <sub>2</sub> O	38
Amorce sens (10 $\mu$ mol)	1
Amorce anti-sens (10 $\mu$ mol)	1
dNTPS(10mM)	1
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1
BSA (20 $\mu$ g/ml)	0,5
Buffer 10X	5
Taqpolymérase	0,5
Total:	48
ADN génomique extra	5

### Référence des amorces:

[1] ROTOLO, Caterina, ANGELINI, Rita Milvia De Miccolis, POLLASTRO, Stefania, et al. A TaqMan-based qPCR assay for quantitative detection of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* strain QST713 and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain D747. *BioControl*, 2016, vol. 61, no 1, p. 91-101.

[2] BORSHCHEVSKAYA, L. N., KALININA, A. N., et SINEOKII, S. P. Design of a PCR test based on the *gyrA* gene sequence for the identification of closely related species of the *Bacillus subtilis* group. *Applied biochemistry and microbiology*, 2013, vol. 49, no 7, p. 646-655.

[3] CHAN, Giek Far, PUAD, MohamadSafwan Ahmad, CHIN, Chai Fung, et al. Emergence of *Aureobasidium pullulans* as human fungal pathogen and molecular assay for future medical diagnosis. *Folia microbiologica*, 2011, vol. 56, no 5, p. 459.

### *B. subtilis*: BS\_yndJF & BS\_yndjR [1]

TM: 58 °C – 74pb

95°C	5 min	X 35 cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	20 sec	
72°C	10 min	
4°C	∞	

### *B. amyloliquefaciens*: BamyF & BamyR [2]

TM: 60 °C – 747pb

95°C	5 min	X 35 cycles
95°C	30 sec	
64°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

### *A. pullulens*: AP19F & AP368R [3]

TM: 60 °C – 368pb

95°C	5 min	X 35 cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	
4°C	∞	

5

# Méthodologie

## Objectif 1. Colonisation de la feuille par les microorganismes



### Jour 0: traitement avec le biofongicide (3)

Disque de feuille mis sur une gélose contenant uniquement de l'agar (15g/L) (pas de nutriments)  
Inoculation par pulvérisation (selon les concentrations de la demande de subvention- médiane lorsqu'il y avait plusieurs)

### Jour 0, 1, 2, 6, 11 et 14: Prise de données sur la colonisation de la feuille par les microorganismes

- Mettre le disque de vigne dans un Falcon de 50ml contenant du 40ml de PBS + Triton 0,1%
- Vortex 1 minute pour récupérer les microorganismes, puis retirer la feuille
- Concentration des microorganismes par centrifugation (5000rpm, 15 minutes)

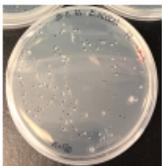
#### Traitement des données:

Extraction d'ADN à l'aide de la trousse commerciale QIAGEN «neasy Powerlyser MicrobialKit»  
Gel d'agarose 1% pour visualiser l'intégrité de l'ADN génomique  
Amplification PCR en utilisant les amorces spécifiques à chacun des microorganismes de la matière active  
Gel d'agarose 1,5% coloré auGelStain  
Quantification de l'intensité de la bande au gel doc (Intensité relative- référence échelle)

- Uniquement réalisé avec les biofongicides(3)
- Pour chaque répliqua, on a 6 temps de colonisation de la feuille par les microorganismes
- **Pour chaque répliqua, on a donc 18 pétis/extraction d'ADN**
- **Total de 4 réplicas seront effectués**
- **Total: 72 échantillons à traiter**

4

## Méthodologie Objectif 2



### Jour 0 : Traitement avec le biofongicide

Gélose R2A inoculée avec une dilution de la concentration mère de biofongicide afin d'avoir des colonies isolées

Botector: 10<sup>-4</sup>

Double Nickel et Serenade Opti: 10<sup>-5</sup>

### Jour 0 : Inoculation du traitement chimique (4 fongicides et de l'eau)

Vaporisation des fongicides chimiques sur les pétis, laisser sécher quelques minutes avant de retourner.

↓ Incubation à 20°C avec humidité

### Jour 2 : Décompte d'UFC sur les pétis

#### Traitement des données:

Décompte d'UFC après le traitement chimique et comparaison avec les pétis témoin (H<sub>2</sub>O):

Calcul du taux de mortalité:  $\frac{\text{nbr UFC H}_2\text{O} - \text{nbr de UFC traitement}}{\text{nbr UFC H}_2\text{O}} \times 100$

4 réplicas ont été réalisés pour chaque combinaison de traitements, sous forme de bloc.

12

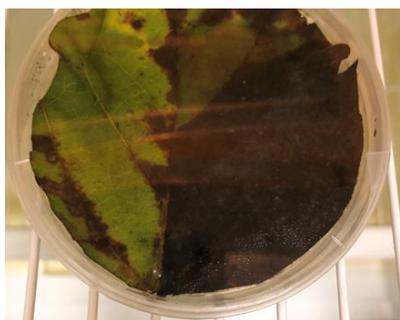


Photo prise au J11



Photo prise au J14