Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1990, **24,** N° 3, 125-131.
Connaissance de la Vigne et du Vin.

DÉTERMINATION QUANTITATIVE DES POPULATIONS DE MOISISSURES : ASPECTS ÉCOLOGIQUES

Ljubica VRBAŠKI

Faculté de Technologie, 21000 Novi Sad, Yougoslavie.

Résumé : *Nos résultats antérieurs montrent que les Botryticides augmentent la fréquence d'apparition des souches du genre* Cladosporium *dont la synthèse de la laccase est plus importante que chez les souches de* Botrytis cinerea.

En 1988, nous avons observé la présence de moisissures sur des baies de quatre cépages : le Traminer, le Sirmium, le Riesling et le Neoplanta. A l'exception du Traminer, nous constatons que 40 à 50 p. cent de la population totale des moisissures appartient à l'espèce Botrytis. *Le* Cladosporium *est présent dans 10 à 13 p. cent des cas ; ce qui montre malgré son cosmopolitisme, sa faible capacité biologique à se développer en présence de* Botrytis cinerea. *Inaperçue auparavant, l'*Aternaria *est actuellement présent dans 20 à 25 p. cent des cas. La fréquence de certaines espèces du groupe Deuteromycotine est également plus forte. L'observation systématique de la présence de populations dominantes de moisissures devrait permettre de limiter l'utilisation de produits chimiques favorables au développement de souches résistantes. Ces produits n'offrent pas de protection, mais par contre augmentent la pollution du milieu naturel.*

INTRODUCTION

Il est aujourd'hui manifeste que la destruction rapide de l'équilibre biologique est due à une action anthropogène. Les produits chimiques, connus sous la dénomination générale de pesticides et utilisés de façon intense au cours de ces dernières décennies en agriculture en vue d'une production plus sûre et plus économique, y contribuent amplement. Le nombre et la quantité de ce type de produits augmentent sans cesse, et il est difficile de déterminer pour beaucoup d'entre eux les conséquences secondaires de leur application ; c'est-à-dire leur influence sur la santé humaine, leur action sur les microorganismes de fermentation et les rapports de ces populations dans le milieu naturel.

Les pesticides, produits artificiels apparus dans la nature à un certain moment, ont interrompu l'évolution normale du cycle de la matière. Beaucoup de ces produits ne sont pas des substrats pour microorganismes ; ils ne sont alors pas métabolisés, et s'accumulent en polluant le milieu naturel. Il faut mentionner que de nombreux pesticides se dégradent sous l'action de conditions physiques du milieu, mais que les sous-produits de leur décomposition sont souvent plus toxiques que les produits eux-mêmes ou que les porteurs de substances actives deviennent plus toxiques dans le processus de dégradation (SANIN et GRAPOV, 1985 ; IŠČENKO et NEGARE, 1984).

Les pesticides appliqués contre certains groupes d'organismes détruisent des maillons de la chaîne alimentaire et entraînent ainsi la destruction de l'équilibre écologique. Dans la protection du vignoble, on utilise diverses préparations pour lutter contre *Botrytis cinerea,* pourriture essentielle du raisin.

Botrytis cinerea attaque la vigne et le raisin à différentes phases du développement; le plus souvent au moment de la maturation du raisin, en raison des conditions climatiques favorables ou des modifications de la structure des pellicules (KOVAČ, 1975).

Les conséquences d'une contamination plus importante du raisin se manifestent par une détermination du rendement pouvant aller jusqu'à 50 p. cent ainsi que par une diminution de la qualité du moût et du vin produit avec ces raisins (KOVAČ et VRBAŠKI, 1983).

La médiocrité de la qualité du moût et du vin est essentiellement due aux processus oxydatifs accrus qui entraînent la dégradation du moût et du vin. Ce processus est connu sous le nom de "casse brune ou casse oxydasique" et est causé par les enzymes oxydatifs du type laccase, secrétés par *Botrytis cinerea* (DUBERNET, 1974; KOVAČ, 1975; KOVAČ et VRBAŠKI, 1983; ZOUARI et *al.,* 1987).

L'étude de la microflore de la pellicule de raisin provenant du vignoble de Vojvodine, protégé intensivement par les botryticides montre une action efficace sur le *Botrytis cinerea,* par contre, les moisissures du genre *Cladosporium* (KOVAČ et VRBAŠKI, 1981 et 1983) sont stimulées.

En testant 79 prélèvement du genre *Cladosporium,* nous avons constaté de grandes différences dans la rapidité du développement ainsi que dans la capacité de synthèse de la laccase. Parmi ces souches, certaines produisent de faibles quantités de laccase, alors que d'autres en fabriquent plus que *Botrytis cinerea.* Il a été démontré expérimentalement que leur fréquence sur le raisin est dûe à l'action sélective des produits appliqués pour la protection du vignoble (KOVAČ et VRBAŠKI, 1983; VRBAŠKI et KOVAČ, 1985). Cela ouvre de nouvelles perspectives d'avenir pour résoudre ces problèmes.

Pendant cinq ans, l'état mycologique du raisin et l'éventuel déplacement des populations dominantes n'ont pas été suivis. Le but de cette étude est d'obtenir des données pouvant indiquer dans quelle mesure les moyens de protection ont agi sur la microflore totale du raisin et de préciser quels genres de moisissures ont réussi à se maintenir face à la protection intensive et constante du vignoble.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les moisissures ont été isolées sur la pellicule des baies de raisins sains pendant la phase de maturation. L'essai a été réalisé sur les quatre cépages suivants : Traminer, Sirmium, Riesling, Neoplanta.

Cette étude a été réalisée dans la parcelle d'essai de la Faculté d'Agronomie de Novi Sad (Yougoslavie), dans le vignoble de Sremski Karlovci. Le Sirmium et le Neo-

planta sont des cépages relativement nouveaux dont la production commerciale a commencé au début des années 70 (JAZIĆ, 1979).

Le dénombrement des moisissures a été obtenu par ensemencement sur le Malt agar et sur le milieu de Czapek (DAVENPORT, 1976, 1976a) à partir d'une solution de lavage des baies. Pour l'identification des moisissures, les clés de détermination de *Deuteromycotina* (ELLIS, 1971, 1976), de *Penicillium* (RAPER et *al.,* 1949) et d'*Aspergillus* (THOM et RAPPER, 1945) ont été utilisées.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont présentés dans le Tableau I.

TABLEAU I

Nombre total de colonies et nombre total de moisissures par gramme de cépage examiné.

CÉPAGES	MALT AGAR		
	Nbre de colonies	Nbre de moisissures	% de moisissures
TRAMINER	360	240	66
SIRMIUM	2200	530	24
RIESLING	28000	18000	64
NEOPLANTA	30000	2100	7
CÉPAGES	AGAR DE CZAPEK		
	Nbre de colonies	Nbre de moisissures	% de moisissures
TRAMINER	860	420	49
SIRMIUM	540	130	24
RIESLING	20000	16000	80
NEOPLANTA	18000	5000	28

Au moment de la planification des premiers essais, nous savions qu'il n'existait pas de procédure standard pour le prélèvement et l'examen en laboratoire de nos échantillons. Considérant les procédures possibles, nous avons estimé que la microflore présente sur le raisin avait une chance égale de développement pour un raisin apparemment sain à l'œil. Bien que la méthode de lavage présente des inconvénients de ne refléter que l'état momentané de l'échantillon et de ne se rapporter qu'à un seul échantillon, nous avons adopté cette technique. DAVENPORT (1976, 1976a) indique que la méthode de lavage donne des résultats par défauts car la surface extérieure

d'un organe végétal n'est jamais homogène; il y a toujours un risque de fixation de microorganismes dans des sites bien protégés.

Dans tout examen écologique, la composition du milieu de culture joue un rôle important dans le dénombrement et dans l'identification des différentes espèces en présence. Dans nos expériences précédentes, nous avons donc utilisé diverses variantes du milieu de culture avec des sources différentes de carbone ou en présence d'antibiotiques (KOVAČ et VRBAŠKI, 1981). Les résultats ont montré que pour des déterminations quantitatives, il fallait à côté des limitations citées, utiliséer le Malt agar et le milieu de Czapeck. Nous n'avons pas pris en compte la température d'incubation; toutefois, vue la température extérieure au moment de la maturation du raisin, on peut penser qu'il aurait été préférable de la baisser.

Les résultats du tableau I indiquent que le nombre total des microorganismes et la présence en pourcentage de moisissures diffèrent en fonction des cépages examinés. A première vue, il semble que les échantillons ne sont pas accessibles de la même façon aux vecteurs de l'infection. Ces résultats confirment nos expériences précédentes (KOVAČ et VRBAŠKI, 1981) ainsi que celles de BOLAY et ROCHAIX (1975). La raison de cette différence n'est pas encore très claire.

Le tableau II présente les rapports entre les différents genres de moisissures et le nombre total de microorganismes. Dans le cas du Traminer, *Botrytis* n'est présent que dans 7 p. cent des cas. Pour les trois autres sortes de raisins, *Botrytis cinerea* est présent dans 40 à 53 p. cent des cas. Le retour de ce genre peut s'expliquer par l'adaptation ou la mutation (ELAD et *al.,* 1988) (CHIBA et NORTHOVER, 1988).

TABLEAU II

Rapport entre le nombre de genres de moisissures et le nombre total de microorganismes.

CÉPAGES	*Botrytis*	*Cladosporium*	*Penicillium*
TRAMINER	7	12	20
SIRMIUM	40	10	10
RIESLING	51	13	8
NEOPLANTA	53	13	10
CÉPAGES	*Aspergillus*	*Alternaria*	NON DÉTERMINÉ
TRAMINER	27	25	9
SIRMIUM	5	25	10
RIESLING	5	13	10
NEOPLANTA	8	11	5

Cladosporium, microorganisme que nous craignons particulièrement car secréteur de laccase est présent dans 10 à 13 p. cent des cas; ceci indique sa faible capacité biologique en compagnie de *Botrytis cinerea,* malgré son cosmopolitisme (ELLIS, 1971).

Les genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont présents à peu près dans les mêmes proportions, mais avec une plus grande fréquence par rapport à leur présence normale (KOVAČ et VRBAŠKI, 1981). Il faut également souligner que *Penicillium* (KOVAČ, 1979) et *Aspergillus* (KOVAČ et VRBAŠKI, 1979) favorisent la synthèse de laccase chez *Botrytis cinerea,* et de ce fait provoquent l'oxydation du moût et du vin. Toutefois, ces champignons ne produisent pas de laccase en culture pure.

La présence des espèces du genre *Alternaria,* de 11 à 25 p. cent est manifeste. La présence accrue de *Alternaria* est remarquée également dans les vignobles espagnols (BOUBALS et MURS, 1980; DALLAS, 1981).

A côté de ces moisissures sont présentes celles du groupe Deutoromycotine dont la détermination est en cours.

CONCLUSION

En conclusion, nous pouvons dire que les examens effectués dans cette étude devraient devenir des examens de routine afin que soit évitée l'utilisation de moyens favorisant l'apparition de souches résistantes. Les produits utilisés n'offrent pas de protection mais augmentent la pollution du milieu naturel et sont la cause d'une mauvaise qualité technologique de la matière première. Cependant, il est certain que dans la production agricole contemporaine, il est impossible d'éviter l'emploi de tels produits.

Manuscrit reçu le 18 décembre 1990; accepté pour publication le 9 janvier 1991.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOLAY A. et ROCHAIX, M., 1975. Advantages and disavantages of systemic fungicides in combating grey mould of grapes. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture,* **7,** 137-147.

BOUBALS O. et MUR G., 1980. L'Alternariose nouvelle maladie de la vigne dans les vignobles méditerranéens. *Progrès Agricole et Viticole,* **97,** 24, 115-117.

CHIBA M. et NORTHOVER, J., 1988. Efficacy of new benzimidazole fungicides against sensitive and benomyl-rezistant *Botrytis cinerea, Phytopathology,* **78,** 5, 613-618.

DALLAS J.P., 1981. Étude *in vitro* de l'action de quelques fongicides sur les champignons du genre *Alternaria. Progrès Agricole et Viticole,* 518-528.

DAVENPORT, R.R., 1976. Ecological concepts in studies of microorganisms on aerial plant surfaces, pp 199-215, in (Ed) Dickinson, C.H., Preese, T.F. : Microbiology of Aerial Plant Surfaces, Academic Press, London.

DAVENPORT, R.R., 1976a. Distribution of yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes, pp. 325-359, in (Ed.) Dickinson, C.H., Preese, T.F. : Microbiology of Aerial Plant Surfaces, Academic Press, London.

DUBERNET, M. 1974. Recherches sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea.* Applications technologiques. *Thèse Doctorat ès Sciences.* Université Bordeaux II.

ELAD, Y., SHABI E., et KATAN T., 1988. Negative cross resistance between benzimidazole and N-phenylcarbamate fungicides and control *Botrytis cinerea* on grapes. *Plant. Pathol.,* **37,** 1, 141-147.

ELLIS, M.B., 1971. Dematiaceous hyphomycetes, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

ELLIS, M.B. 1976. More Dematiaceous hyphomycetes, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

ISCENKO, N.F. et NEGARE S.G., 1984. Mutagenaja aktivnost pesticidov, Vzaimodejstvie pesticidov s mikroorganizmami, Akademi ja nauk Moldavskoj SSR, Kisinev, "Stisica", 31-47.

JAZIĆ L.J., 1979. La production du vin blanc en RSF de Yougoslavie, *Symposium International sur la Technologie du vin,* Kisinev, 40-48.

KOVAČ V., 1975. Contribution à l'étude des oxydases dans la technologie du vin. *Thèse Doctorat ès-Sciences,* Université Novi Sad, Yougoslavie.

KOVAČ V., 1979. Les moisissures du raisin et la casse oxydasique. *Ann. Technol. agri.,* **28,** 3, 345-355.

KOVAČ V., et VRBAŠKI L.J. 1979. Influence de certains facteurs sur le développement de *Botrytis cinerea* et sur l'activité laccasique du milieu de culture. C.R. Assemblée annuelle du Groupe Polyphénols, Logrono, Espagne, 221-232.

KOVAČ V., VRBAŠKI L.J., 1981. Moulds of *Cladosporium* genus as the potential carriers of browning capacity, (in serbo-croatian). Proceedings from 4th Congress of Yugoslav Microbiologists, Beograd, 22-25 09, 95-96.

KOVAČ V., VRBAŠKI L.J. 1983. Quelques moisissures présentant un intérêt œnologique : *Penicillium* et *Clasdosporium. Bull. O.I.V.,* **56,** 628, 420-432.

SANIN V., et GRAPOV A.F., 1985. Spravocnik pesticidy, Tehnika, Kiev.

RAPER K.B., THOM C., et FENNEL D.I., 1949. A manual of the *Penicillia.* The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

THOM C., RAPER K.B., 1945. A manual of the *Aspergilli.* The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

VRBAŠKI L.J., KOVAČ V., 1985. Materials for Plant Projection and their Effects in Biotechnology, (in serbo-croatian), Proceedings of the papers : "Protection of the Living and Working Environment". Naftahem, Novi Sad, 10, 11.04, 46-55.

ZOUARI N., ROMETTE J.L. et THOMAS D., 1987. Purification and properties of two laccase isoenzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **15,** 3, 213-226.