

# "Bug-Network" - Partie expérimentale

**Une évaluation globale de l'impact des herbivores invertébrés et des champignons pathogènes sur les communautés végétales et les écosystèmes.**

## Principales questions de recherche

1. Les herbivores invertébrés, les mollusques et les champignons pathogènes ont-ils un impact différent sur les communautés végétales ? Interagissent-ils les uns avec les autres ?
2. Quand les herbivores invertébrés et les pathogènes fongiques ont-ils le plus d'impact sur les communautés végétales (productivité, composition, diversité et fonctionnement des communautés) ?

## Objectifs de BugNet

Les réseaux de recherche internationaux permettent de tester rigoureusement des modèles et des mécanismes généraux. Plusieurs d'entre eux, tels que NutNet ou Drought-Net, sont à l'origine d'avancées importantes. L'objectif de BugNet est d'étudier les communautés de consommateurs ainsi que des communautés de plantes dans différents sites, et de mettre en place des expériences identiques d'exclusion d'insectes herbivores, de mollusques et de champignons dans de nombreuses régions du monde.

BugNet vise à mettre en œuvre une étude intersites nécessitant un investissement minimal en temps et en ressources de la part de chaque chercheur. Il s'agit d'une étude expérimentale visant à quantifier les réponses des communautés végétales et des écosystèmes aux herbivores invertébrés et aux pathogènes fongiques dans un large éventail d'écosystèmes dominés par les herbacées, tels que les prairies désertiques, la toundra arctique, mais aussi les landes ou les arbustes méditerranéens.

## Protocole

### 1.1. Sélection du site

Le site doit être relativement homogène et dominé par une végétation herbacée ou arbustive. Il n'est pas nécessaire d'exclure les perturbations naturelles, telles que le feu ou le broutage par les ruminants, mais il est nécessaire d'enregistrer le régime de ces perturbations et, idéalement, de quantifier l'herbivorie par les ruminants. Il est préférable que le site ne soit

pas fortement pâturé par le bétail. Les sites pâturés peuvent être inclus si les parcelles sont clôturées. Dans ce cas, le site doit être fauché de temps en temps pour éviter l'établissement d'espèces ligneuses. Un pâturage léger par le bétail est acceptable et peut le rester.

Lors de l'expérimentation, le site doit être géré comme il l'est habituellement, c'est-à-dire que si la prairie est fauchée une ou deux fois par an, le site expérimental doit l'être également. Dans ce cas, veillez à planifier vos mesures de manière à ce qu'elles aient lieu au moment où la biomasse végétale est la plus élevée (généralement avant la fauche).

## **1.2. Mise en place de l'expérience**

L'expérience suit un plan en blocs aléatoires, avec trois blocs répétant 8 traitements (N = 24 parcelles expérimentales au total, Fig. 1). Chaque parcelle expérimentale mesure 5 x 5 m, et une allée de 1m la sépare des autres parcelles. Chaque parcelle de 25 m<sup>2</sup> est subdivisée en quatre sous-parcelles de 2,5 x 2,5 m (A, B, C, D sur la figure 1). L'une des sous parcelles est consacrée à l'échantillonnage principal, une autre à des études supplémentaires spécifiques au site et les deux dernières à des recherches futures au niveau du réseau (par exemple, exclusion des oomycètes, augmentation de la température, sécheresse...). La position des 8 traitements dans les trois blocs doit être attribuée de manière aléatoire, de même que les sous-parcelles doivent être attribuées de manière aléatoire aux différentes utilisations.

La sous-parcelle consacrée à l'échantillonnage principal sera ensuite divisée en quatre petites parcelles de 1m x 1m (i, ii, iii, iv sur la figure 1), celle située le plus près du centre (i) étant désignée pour l'évaluation du couvert végétal (composition des espèces). Les trois autres petites parcelles sont désignées pour un échantillonnage destructif tel que l'évaluation de la biomasse végétale ou les dommages causés par les herbivores et les pathogènes (uniquement la troisième année, voir Fig. 1).

Pour quantifier l'impact des différents groupes de consommateurs, ceux-ci seront exclus (tout au moins réduits) à l'aide de biocides. Les traitements permettront d'éliminer les groupes de consommateurs seuls ; soit les insectes, les mollusques et les champignons, leur combinaisons deux à deux, l'ensemble des trois groupes ensemble et un contrôle, ce qui donne un total de 8 traitements (Fig. 1).

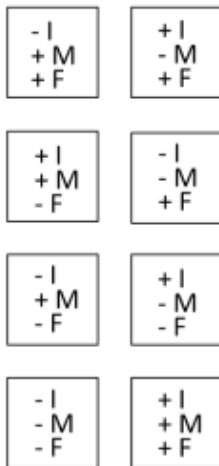
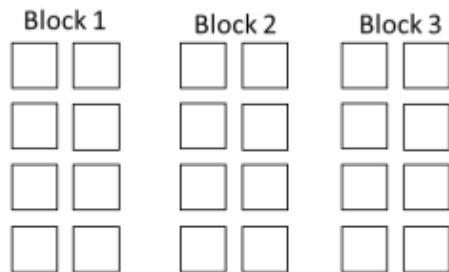
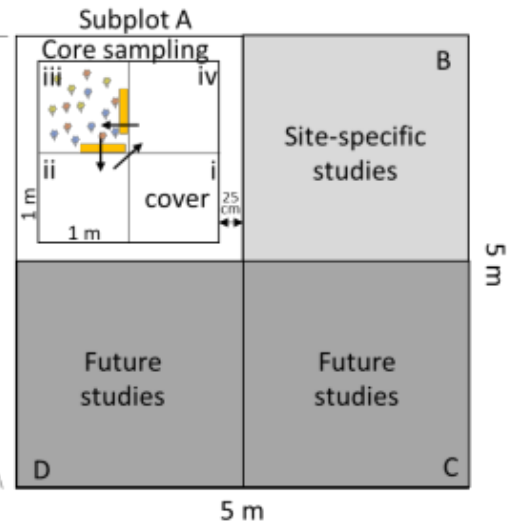
**A**

Figure 1 : A) Dans 8 grandes parcelles (5 x 5 m), huit traitements d'exclusion de consommateurs seront mis en place. Les insectes (I), les mollusques (M) et les champignons (F) seront exclus à l'aide de biocides, ainsi que toutes les combinaisons à deux voies, tous les groupes de consommateurs ensemble ou aucun consommateur. B) Ces 8 combinaisons de traitement seront répétées en trois blocs. C) Une parcelle expérimentale sera subdivisée en quatre sous-parcelles de 2,5 x 2,5 m (A, B, C, D), l'une étant consacrée à l'échantillonnage à long terme, l'autre à des projets spécifiques au site et les deux dernières à de futures études avec BugNet. La sous-parcelle d'échantillonnage principale sera divisée en quatre petites parcelles de 1 x 1 m (i, ii, iii, iv), celle située le plus près du centre étant désignée pour l'évaluation de la composition végétale (couvert, i). Les trois autres seront désignées pour la récolte de la biomasse (rectangles orange) et, au cours de la troisième année, pour l'évaluation des dommages causés par les herbivores et les agents pathogènes. La récolte de la biomasse se fera de manière à ce qu'il y ait une rotation chaque année.

**B****C**

### 1.3. Applications des traitements

Pour lutter contre les insectes herbivores, nous utiliserons la Lambda-Cyhalothrine (par exemple Karate Zeon, Syngenta), un insecticide non systémique à large spectre fréquemment utilisé dans les études d'exclusion des insectes herbivores et ayant peu d'effets non ciblés.

Pour lutter contre les champignons foliaires, nous utiliseront une combinaison d'Azoxystrobine et de Difénoconazole (l'azoxystrobine inhibe la respiration mitochondriale des champignons, le difénoconazole interrompt la synthèse de l'ergostérol, un composant de la membrane cellulaire des champignons ; par exemple avec un mélange de Score Profi et d'Ortiva, Syngenta). Les deux pesticides seront épanchés au début de la période de végétation, puis toutes les 4 à 6 semaines jusqu'à la fin de la période de végétation. Pour lutter contre les mollusques, nous utiliserons des granulés molluscicides à base d'acide ferrique.

Le phosphate ferrique ou phosphate de fer (par exemple Limax Ferro, Maag, ou tout autre produit à base de phosphate ferrique (par exemple Sluggo)) sera appliqué en même temps

que les autres pesticides. Le nombre d'applications sera plus important dans les régions où la période de végétation est très longue, dû au fait que les consommateurs sont actifs plus longtemps et nous voulons nous assurer de leur réduction en abondance.

Toutefois, vérifiez les réglementations locales en vigueur dans votre région et assurez-vous que vous n'appliquez pas plus de biocides que ce qui est autorisé. Il se peut également que certains biocides ne soient pas approuvés dans certains pays. Si c'est le cas, contactez-nous et nous discuterons des produits alternatifs qui peuvent être utilisés. Les biocides n'empêchent peut-être pas les infestations, mais ils réduisent considérablement les attaques des ennemis des plantes et constituent jusqu'à présent la seule approche expérimentale permettant d'évaluer l'importance des herbivores invertébrés et des agents pathogènes dans les communautés végétales naturelles. Consultez notre protocole détaillé sur l'application des pesticides.

Le dosage recommandé concerne la végétation basse (< 50 cm). Si vous vous trouvez dans un site productif, vous devez l'augmenter. N'oubliez pas de le signaler dans votre fiche technique.

#### **1.4. Mesures par site - Données de référence (avant l'application du traitement)**

Pour caractériser les différents sites dans le monde, plusieurs mesures des conditions du sol doivent être effectuées avant l'application des traitements. Cela nous permet de relier l'impact sur les consommateurs à plusieurs facteurs (latitude, altitude, fertilité du sol) et de mettre en lumière la dépendance des interactions biotiques par rapport au contexte.

##### Échantillons de sol

Des carottes de sol seront prélevées pour évaluer une série de caractéristiques du sol. Dans chacune des 24 parcelles, prélevez deux carottes de sol (carottier de 2,5 x 10 cm) et homogénéisez le sol en un seul échantillon par site. Veuillez tamiser le sol à travers une maille de 2 mm. Les sols doivent être séchés à l'air et envoyés aux coordinateurs du projet (voir le protocole de traitement, d'étiquetage et d'envoi des sols pour plus de détails). Les stocks de C organique total, de N et de P total, ainsi que le pH y seront mesurés et fourniront des informations sur les caractéristiques du sol au niveau du site.

##### Stockage à long terme dans le sol (non obligatoire)

En outre, nous aimerions obtenir des informations sur le microbiome du sol au niveau de la parcelle. Le microbiome du sol est susceptible de changer en réponse aux traitements pesticides. Pour pouvoir analyser ces changements, il est nécessaire de disposer d'informations sur les conditions précédant le traitement. Nous vous encourageons donc à conserver dans un congélateur des échantillons de sol **par parcelle** avant l'application des

traitements. Cependant, ce n'est pas obligatoire et vous pouvez également participer à la partie expérimentale sans stocker le sol à long terme.

Veillez prélever de manière aléatoire **cinq carottes** de sol (par exemple, 2,5 x 10 cm) par parcelle à l'aide d'une tarière et homogénéiser le sol en un seul échantillon par parcelle. Veillez à nettoyer soigneusement votre tarière entre les parcelles. Nous vous demandons de conserver **50 g** de sol par parcelle dans un sac congélation (type zip) étiqueté ou tout autre récipient à - 20 °C, et **5 g** de sol par parcelle à - 80 °C (si vous avez accès à un tel congélateur). N'oubliez pas de bien étiqueter vos sacs, car ils pourraient rester au congélateur pendant plusieurs années avant que nous n'analysions le microbiome à l'avenir.

## 1.5. Mesures annuelles par placette

Ces mesures doivent être effectuées chaque année, au moment où la biomasse est maximale.

### Composition des espèces végétales

Une fois par an, estimez le couvert végétal en donnant le pourcentage par espèce végétale dans chacune des 24 parcelles, dans la petite parcelle de l'échantillonnage principal, située le plus près du centre (voir Fig. 1, i, couvert).

Le couvert de chaque espèce végétale enracinée dans la placette sera estimé au 1 % le plus proche (jusqu'à une couverture de 20 %) et au 5 % le plus proche pour une couverture de 20 à 100 %. Attribuer 0,1 % ou 0,5 % aux espèces très rares dont la couverture est inférieure à 1 %. Estimez également le couvert de l'étage ligneux (en %), des bryophytes, des lichens, de la litière, du sol nu et des rochers s'ils sont présents (voir la fiche de données). La couverture totale sera généralement supérieure à 100 % car le couvert des espèces est estimé indépendamment pour chaque espèce.

Pour réduire les biais dans l'évaluation du couvert, il est utile de s'entraîner en plaçant des morceaux de papier de tailles différentes dans la petite parcelle : par exemple, 10 cm x 30 cm = 3 %, 10 cm x 10 cm = 1 %, 3,1 cm x 3,2 cm = 0,1 %, 31 cm x 32 cm = 10 %...

Dans les systèmes où la composition des espèces change fortement au cours de l'année ou qui ont un régime de fauche à deux passages, nous recommandons que le couvert soit évalué deux fois, une fois au printemps/début de l'été et une fois à la fin de l'été. Cela nous permet de prendre en compte les différences de phénologie et de capturer le couvert maximal de chaque espèce.

### Biomasse aérienne et souterraine

Pour quantifier l'impact des consommateurs sur la productivité (contrôle top-down), coupez la partie végétative des plantes à 2 cm au-dessus du sol, dans deux bandes de 10 cm x 50 cm

de chaque parcelle d'échantillonnage, dans l'une des petites parcelles utilisées pour l'échantillonnage destructif (ii, iii, iv). Si votre site est fauché, la récolte de biomasse doit être effectuée chaque année dans une petite parcelle différente (voir Figure 2).

Si vous travaillez dans des systèmes très peu productifs non fauchés et dans lesquels l'élimination de la biomasse peut encore être visible après trois ans, essayez de ne pas faire chevaucher les bandes d'échantillonnage de biomasse aussi longtemps que possible (voir l'exemple des positions de récolte, Figure 2).



Figure 2 : Dans les systèmes très peu productifs, à croissance lente, où l'élimination de la biomasse peut encore être visible après quelques années, essayez de ne pas faire chevaucher les bandes d'échantillonnage de biomasse, aussi

L'échantillonnage doit être effectué au moment du pic de production de biomasse (le moment du pic de biomasse varie d'un site à l'autre et est défini par les chercheurs locaux pour leur système). Si votre site est soumis à un régime de fauche à deux passages, la biomasse doit être collectée deux fois par an afin de mieux estimer la productivité du site (avant les coupes). Prélevez la biomasse aérienne totale, séchez-la et pesez-la (les deux bandes par parcelle peuvent être combinés). Envoyez chaque année aux coordinateurs du projet, un sous-échantillon (environ 20 g de poids sec par parcelle) de biomasse sèche (voir le protocole de traitement et d'étiquetage des échantillons). Si vous pouvez réduire la biomasse en poudre, ce serait l'idéal, sinon vous pouvez couper l'échantillon de biomasse en morceaux et nous envoyer un sous-échantillon bien mélangé.

Nous mesurerons ensuite plusieurs caractéristiques des feuilles (N et P des feuilles, teneur en fibres, etc.) et suivrons l'évolution de la qualité des plantes en fonction des traitements. Nous pourrions également examiner le microbiome de la phyllosphère à un moment donné.

Si vous travaillez dans des zones arbustives, la biomasse des espèces arbustives sera estimée à l'aide d'équations allométriques. Pour chaque espèce d'arbuste, mesurez la hauteur et le diamètre de la canopée de 20 individus de tailles différentes à l'extérieur de vos parcelles expérimentales. Coupez-les, séchez-les et pesez-les. Si vos arbustes forment de grandes parcelles et que les individus sont difficiles à isoler, prenez simplement 20 "unités

d'échantillonnage" dont la hauteur et le diamètre de la canopée sont connus, et collectez la biomasse de cette unité d'échantillonnage à la place (voir la fiche de données). Pour obtenir une mesure de la biomasse verte ou brune des arbustes, séparez les feuilles de la biomasse ligneuse. Pour certaines espèces, cela peut s'avérer plus efficace lorsque les feuilles sont sèches. Mesurez maintenant la hauteur et le diamètre de la canopée de tous les arbustes dans la sous-parcelle consacrée à l'échantillonnage principal, dans la petite parcelle dans laquelle vous évaluez également le couvert végétal (Fig. 1, couverture, i).

## **1.6 Mesure ponctuelle des caractéristiques des plantes**

Sur chaque site, plusieurs traits végétaux - hauteur de la plante, surface foliaire spécifique (SLA) et teneur en matière sèche des feuilles (LDMC) - seront mesurés pour caractériser les communautés végétales. Ces traits sont étroitement associés à deux axes majeurs de la variation fonctionnelle des plantes, la taille des plantes et de leurs organes, et le spectre économique des ressources (Wright et al. 2004, Díaz et al. 2016). Vous mesurerez les caractéristiques selon les protocoles de Garnier et al. 2001.

La hauteur, la SLA et la LDMC de toutes les espèces végétales d'un site doivent être mesurés. Ceci est important pour vérifier si la réponse des plantes aux exclusions d'ennemis suit les modèles prédits par les stratégies de déploiement de défense (par exemple, la croissance, la défense et le compromis). Pour chaque espèce végétale présente sur un site, cinq individus par site doivent être échantillonnés au hasard, et leur hauteur, leur SLA et leur LDMC doivent être évalués. La hauteur peut être mesurée directement sur le terrain ; pour la SLA et la LDMC, choisissez les cinq individus sélectionnés au hasard, mettez-les dans des sacs en plastique étiquetés et placez-les dans une glacière. Si possible, vos individus ont > 5 feuilles sans aucun symptôme d'attaque, les caractéristiques foliaires étant mesurées sur des feuilles non endommagées (voir le protocole détaillé sur la façon de mesurer la SLA et la LDMC). Ces mesures peuvent être effectuées à tout moment jusqu'à la quatrième année.

## **1.7. Campagnes spéciales d'échantillonnage par parcelle et mesures supplémentaires (Add-ons de mesure)**

À un moment donné, nous vous demanderons de mesurer quelques variables supplémentaires. Par exemple, au cours de la troisième année de votre expérience (troisième année d'application du traitement), nous vous demandons de mesurer les dégâts causés par les herbivores et l'infection par des agents pathogènes dans toutes les parcelles (voir ci-dessous). Au cours de la troisième ou de la quatrième année, nous vous demandons de mesurer la biomasse des racines (voir ci-dessous) et nous prévoyons d'évaluer les communautés d'invertébrés par parcelle. En outre, quelques modules de mesure ont déjà été

mis en place ou le seront à l'avenir (module de mesure des mollusques, module de mesure de la décomposition).

Il est également possible de proposer et de diriger soi-même des modules complémentaires de mesure et nous vous encourageons à le faire (voir proposition de module complémentaire). Nous organiserons plusieurs ateliers et groupes de discussion où nous pourrions développer des idées ensemble. Vous trouverez ci-dessous une brève description des mesures, ainsi qu'un lien vers les protocoles détaillés.

#### Dégâts causés par les herbivores et infection fongique

Au cours de la troisième année (troisième année d'application du traitement), nous vous demandons de mesurer les dégâts causés par les herbivores et les infections fongiques par parcelle. Si votre système est très productif et sera fauché régulièrement, les dommages et les maladies seront mesurés dans la petite parcelle dédiée à la couverture végétale (petite parcelle i). Si votre système est très improductif et que le prélèvement d'individus pour l'évaluation des dommages aura une forte influence sur la végétation, mesurez les dommages causés par les herbivores et les infections fongiques dans l'une des autres petites parcelles dédiées à l'échantillonnage destructif (ii, iii, iv), ou bien évaluez les dommages dans la petite parcelle de couverture sans prélever d'individus. Vous trouverez ici le protocole détaillé sur la manière d'évaluer les dommages causés par les herbivores et l'infection par des agents pathogènes.

#### Biomasse racinaire

Au cours de la troisième ou de la quatrième année de l'expérience, nous vous demandons de mesurer la biomasse des racines. Pour ce faire, prélevez une carotte de sol de 5 cm de diamètre, à 30 cm de profondeur, par parcelle, et triez-la pour séparer les racines. Séchez et pesez la biomasse racinaire et inscrivez les données dans votre fiche de données annuelle (voir fiche de données).

#### Complément sur la décomposition

Il y aura bientôt un protocole pour participer à une étude complémentaire sur la décomposition en utilisant l'approche des sachets de thé.

#### Add-on sur l'échantillonnage des mollusques

Il y aura bientôt un protocole pour participer à un module complémentaire d'échantillonnage des mollusques.