

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

BIOCONTROLE D'UNE MALADIE DU BOIS DE LA VIGNE, L'ESCA, A L'AIDE DE BACTERIES

A. REZGUI^{1,2,3}, A. BEN GHNAYA-CHAKROUN^{1,2,3}, J. VALLANCE^{2,3}, E. BRUEZ^{2,3}, M.R. HAJLAOUI⁴, P. REY^{2,3}
and N. SADFI-ZOUAOU¹

¹ Laboratoire des Microorganismes et Biomolécules Actives, Département de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis. Campus Universitaire, 2092 Tunis, Tunisie.

² Université de Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, ISVV, UMR1065 SAVE, F-33140 Villenave d'Ornon, France.

³ INRA, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), ISVV, F-33140 Villenave d'Ornon, France.

⁴ Laboratoire de Protection des végétaux, Institut National de la recherche Agronomique de Tunisie (INRAT) 2049, Ariana Tunisie

E-mail : foufarezgui07@gmail.com

RESUME

Les maladies du bois de la vigne (MDBs) et plus particulièrement l'esca, sont devenues en l'espace de deux décennies l'objet de préoccupations majeures puisqu'elles mettent en danger la pérennité de nombreux vignobles de part le monde. En Tunisie, ces maladies sont peu connues mais en pleine expansion et en France, environ 13% du vignoble est improductif à cause des dépérissements qu'elles provoquent. Pour lutter contre les MDBs, les filières viticoles française et tunisienne sont actuellement dans une impasse technique car elles ne disposent d'aucune méthode de lutte chimique «curative». Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était de comparer la microflore bactérienne colonisant le bois de ceps de vignes échantillonnés dans différentes régions de Tunisie et qui étaient asymptomatiques et symptomatiques de l'esca. Seize souches bactériennes, appartenant aux genres *Bacillus*, *Pantoea* et *Pseudomonas*, ont été isolées de tissus apparemment sains et nécrosés, et caractérisées par des méthodes pasteurienues et moléculaires (e.g. séquençage ADNr 16S). Des tests de sélection contre le pathogène fongique *Neofusicoccum parvum* ont été effectués suite auxquels, une souche de *Bacillus* spp. a été sélectionnée pour des essais de protection en serre.

Mots clés: Bactéries, esca, lutte biologique, *Neofusicoccum parvum*, vigne.

ABSTRACT

Grapevine trunk diseases (GTDs) such as esca are of major concern for viticulture worldwide. In Tunisia, little is known about these diseases but they are on the increase, in France around 13% of the whole vineyard is unproductive because of GTDs, and no effective treatment currently exists. Our study aimed at comparing the bacterial microflora that colonized the wood tissues of Esca-leaf symptomatic and asymptomatic vines sampled in different regions of Tunisia using microbiological and molecular approaches. Sixteen Bacterial strains were isolated from necrotic and non-necrotic tissues. Biochemical, physiological and molecular criteria were used to characterized those strains. Sequencing of the 16S rDNA gene led to the identification of three genera: *Bacillus*, *Pantoea*, and *Pseudomonas*. The strains were also screened against the fungal pathogen *Neofusicoccum parvum*. The most interesting strain, a *Bacillus* spp., was selected from those screening tests and is currently being used in a greenhouse assay in order to protect vines inoculated by *N. parvum*.

Keywords: Bacteria, biological control, esca, *Neofusicoccum parvum*, grapevine.

1. INTRODUCTION

En Tunisie, comme dans beaucoup d'autres pays du bassin méditerranéen, la viticulture est issue d'une longue tradition qui a débuté dans l'antiquité grâce aux Phéniciens. Cette culture est d'une importance réelle dans l'économie actuelle du pays, puisqu'elle apporte sa contribution non seulement à la recette fiscale de l'Etat mais également au marché de l'emploi et à l'exportation. La vigne est cependant une plante sensible aux maladies qui peut être infectée et colonisée par une grande variété de bactéries, virus, insectes et de champignons pathogènes. Ces bioagresseurs peuvent avoir des effets très importants sur le développement de la plante hôte, des baies, mais également sur la qualité des vins (Gouadec *et al.* 2007), entraînant des pertes économiques pour les viticulteurs (Van Helden, 2008). Concernant les maladies fongiques, dans la présente étude, on s'est intéressé à celles attaquant le bois de la vigne car elles sont actuellement en émergence, ces pathologies provoquent en effet le dépérissement des ceps affectant ainsi la longévité des vignobles ainsi que la qualité des récoltes (Lorrain *et al.* 2012). Les plus fréquentes sont l'eutypiose, l'esca et les dépérissements à *Botryosphaeria* (Bertsch *et al.* 2013). Concernant l'esca, qui est la maladie du bois de la vigne la plus fréquente en Europe, la situation est d'autant plus préoccupante qu'aucune méthode de lutte chimique n'est actuellement disponible. Depuis le début des années 2000, elle est en progression en France (Bruez *et al.* 2013) mais également dans les vignobles de nombreux pays européens. En Tunisie, cette maladie est peu connue mais en pleine expansion, et là aussi, aucun moyen de lutte efficace n'existe actuellement. En effet, à l'inverse des autres maladies de la vigne telles que l'oïdium, le mildiou ou la pourriture grise, il n'existe aucun produit phytosanitaire qui permet de lutter contre l'esca depuis le retrait en 2001 de l'arsénite de sodium. Aucune tentative de protection chimique des ceps de vigne avec des préparations commerciales à base de carbendazime ou de benomyl, par injection dans le tronc, par badigeonnage ou pulvérisation des plaies de taille (Bester *et al.*, 2007 ; Sosnowski *et al.*, 2008 ; Gramaje et Armengol, 2011 ; Bertsch *et al.*, 2013), n'a été couronnée de succès. De plus ces molécules étant toxiques pour l'homme (effet cancérigène) et l'environnement (Fourie et Halleen, 2005, 2006; Sosnowski *et al.*, 2008 ; Pitt *et al.*, Rolshausen *et al.* 2010; Bertsch *et al.* 2013) leur usage n'est pas autorisé.

A l'heure actuelle, les méthodes de lutte préconisées sont des méthodes alternatives et/ou prophylactiques qui concernent les pratiques culturales telles que le mode de taille et l'élimination des bois morts des parcelles (Di Marco *et al.*, 2000 ; Lecomte *et al.*, 2004 ; Weber *et al.*, 2007). De ce fait, la prise de conscience des effets néfastes des produits chimiques sur la santé humaine et l'environnement ainsi que la volonté politique d'en minimiser l'usage abusif créent la nécessité de développer de nouvelles alternatives de lutte telles que la lutte biologique (ou biocontrôle) à l'aide de micro-organismes. Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux étaient de (i) caractériser les communautés bactériennes colonisant les parties ligneuses de ceps sélectionnés en Tunisie, atteints ou non par l'esca, et (ii) d'identifier et caractériser les bactéries isolées par des méthodes pasteurisées et moléculaires pour sélectionner des candidats au biocontrôle afin de les tester en protection sur plante entière contre *Neofusicoccum parvum*.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Deux types de plants de vigne ont été échantillonnés et analysés dans cette étude : (i) des ceps asymptomatiques et symptomatiques de l'esca prélevés dans des vignobles Tunisiens (régions codées 1 et 2) et (ii) des jeunes plants de variété Cabernet Sauvignon cultivés sous serre qui ont été inoculés avec *N. parvum* et une souche bactérienne sélectionnée pour son potentiel antagoniste, *Bacillus* spp. Les plants ont été prélevés pour être analysés 4 mois après inoculations par ces micro-organismes.

2.2. Isolement des micro-organismes à partir du bois de la vigne

A partir des ceps tunisiens, différents échantillons de bois ont été prélevés : bois sains et nécrosés des bras et du tronc. Une partie des échantillons a été déposée sur du milieu R2A (milieu de culture des bactéries, sigma ALDRICH) additionné de cycloheximide afin d'isoler les bactéries et l'autre partie a été conservée à -20°C en vue d'extractions d'ADN ultérieures.

2.3. Identification et caractérisation des souches bactériennes isolées de différents types de tissus de bois de vigne :

2.3.1. Tests biochimiques :

Les différentes colonies bactériennes obtenues ont été repiquées jusqu'à l'obtention de souches pures, avant d'être caractérisées par 3 tests biochimiques : Test à la potasse, test catalase et test oxydase. Suite à ces tests, 16 souches bactériennes ont été sélectionnées et fixées sur des cryobilles (Protect Bacterial Preservers, Technical Service Consultant Limited, Dutscher) et conservées à -20°C pour des analyses ultérieures.

2.3.2. Identification moléculaire :

Les ADNs des 16 souches sélectionnées ont été amplifiés en utilisant le couple d'amorce 799f (AACMGGATTAGATACCKG) et 1492r (GTTACCTTGTTACGACTT) afin d'être identifiés par séquençage de l'ADNr 16S.

2.4. Test de confrontations *in vitro* entre les bactéries et *N. parvum*

Des tests de confrontation *in vitro* ont été effectués contre le pathogène *N. parvum*. Une strie de culture bactérienne âgée de 48h a été placée au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu PDA. Deux disques du pathogène de 5 mm de diamètre (culture de 7 jours) ont été placés à 2.5 cm de part et d'autre de la strie bactérienne à tester. Les boîtes ont ensuite été incubées à 25°C pendant 5 jours. Le pourcentage d'inhibition du mycélium des pathogènes fongiques testés a été calculé selon la formule : $I (\%) = 100 \times (R2 - R1/R1)$ avec (R1) : le rayon le plus long du mycélium fongique en direction de l'antagoniste (valeur témoin). (R2) : la distance relative à la croissance du mycélium (mm) sur la ligne séparant les deux positions d'inoculation (Whipps, 1987).

2.5. Essais de protection sous serre

Ce test a été réalisé sur des boutures de Cabernet Sauvignon dans des conditions contrôlées sous serre à l'INRA de Villenave d'Ornon. Cinq modalités de 30 boutures chacune constituaient l'expérimentation : des plants témoins, des plants témoins percés (dans la partie centrale de chaque tige et sous le bourgeon supérieur, une blessure artificielle a été réalisée en perçant un trou de 4 mm à l'aide d'une perceuse) inoculés avec le milieu de culture TSB, des plants inoculés par *N. parvum* (témoins positifs), des plants inoculés par l'antagoniste B11 et des plants inoculés par le pathogène et l'antagoniste (*N. parvum*+B11). Les tiges des plants ont été inoculées avec une suspension bactérienne ajustée à 10⁸CFU /ml puis par un disque de culture fongique sporulant de *N. parvum*. La modalité témoin a uniquement été inoculée avec du milieu TSB.

3. RESULTATS

3.1. Caractérisation des souches bactériennes isolées des différents échantillons de bois :

Dans cet essai, 16 souches bactériennes différentes ont pu être isolées et identifiées à partir des bûchettes de bois déposées sur le milieu R2A. Le Tableau I présente la répartition de ces souches en fonction du type de tissus et de la région d'origine des ceps échantillonnés.

3.2. Confrontations *in vitro* entre les bactéries et *N. parvum*

Les tests de confrontation sur milieu PDA ont montré que seulement 10 bactéries sur les 16 testées, étaient capables de réduire la croissance mycélienne du phytopathogène *N. parvum* avec des pourcentages d'inhibition variant de 12,8 à 81,5%. Les souches B6 et B11 étaient les plus efficaces, avec des taux d'inhibition respectivement de 71.23% et 81.5 % (Figure 1).

3.3. Essai de protection des plants de vigne sous serre contre *N. parvum*

L'objectif de cet essai était d'étudier le potentiel antagoniste *in planta* de la souche bactérienne sélectionnée lors des tests de confrontation *in vitro*, i.e. *Bacillus* sp. B11, contre le pathogène *N. parvum*. Les résultats ont montré que 4 mois après la co-inoculation, la souche B11 a réduit la taille des nécroses dues à *N. parvum* de 20%. Les plants témoins inoculés seulement par le pathogène présentaient quant à eux, des taux de nécrose de 90% en moyenne (Figure 2).

Tableau I. Caractérisation biochimique et moléculaire des souches bactériennes isolées de la région 1 et 2 du vignoble Tunisien.

Table I. Biochemical and molecular characterizations of the bacterial strains isolated from wood of vines sampled in regions 1 and 2 of Tunisia

Souches	Régions	Type de tissus	ADNr 16S	Gram	Oxydase	Catalase
B1	1	BS	<i>Curtobacterium</i>	-	-	-
B3	1	BS	<i>Bacillus</i> spp.	+	+	+
B5	2	BN	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	+	+
B6	2	BN	<i>Bacillus</i> spp.	+	+	+
B7	2	BS	<i>Bacillus</i> spp.	+	+	+
B8	2	BS	<i>Bacillus</i> spp.	+	-	-
B9	2	BS	<i>Bacillus</i> spp.	+	+	-
B10	1	BN	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-	+
B11	1	BN	<i>Bacillus</i> spp.	+	+	+
B12	1	BN	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-	+
B13	1	BN	<i>Bacillus</i> spp.	+	+	+
B15	1	BN	<i>Bacillus</i> spp.	+	+	+
B16	1	BN	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	+	+
B17	1	BS	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-	+
B18	1	BS	<i>Bacillus</i> spp.	+	+	+
B19	1	BS	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-	+

NB. BS (bois sain) et BN (Bois nécrosé)

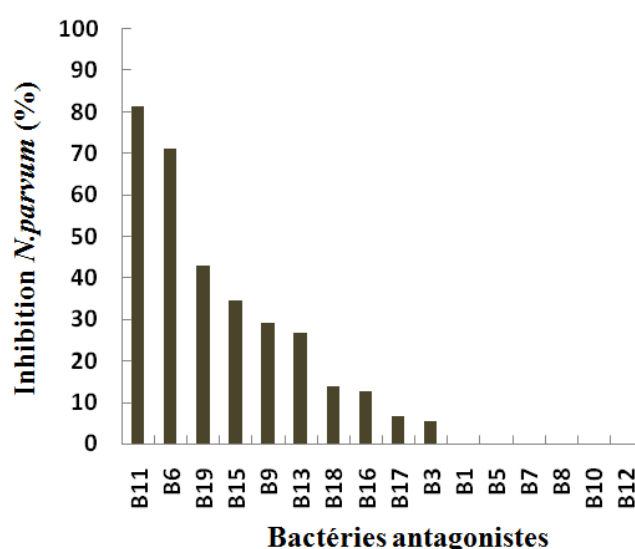


Figure1. Pourcentage d'inhibition de *N. parvum* confrontées aux 16 bactéries sélectionnées

Figure1. Percentage of inhibition of *N. parvum* confronted with the 16 selected bacterial strains

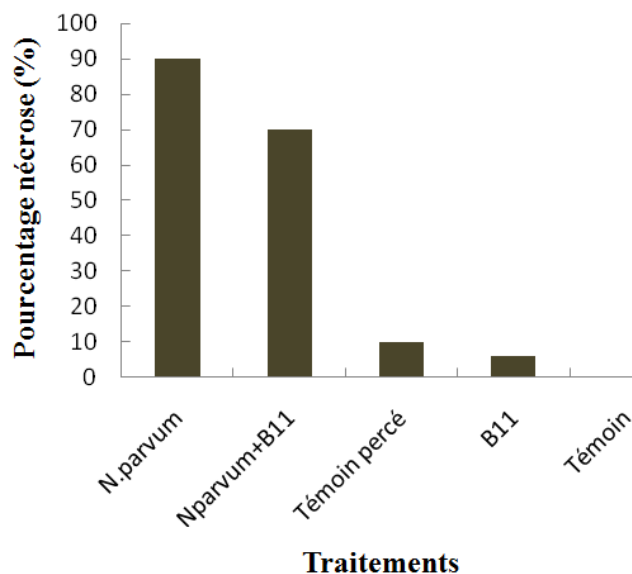


Figure2. Evaluation des nécroses dans le tronc des boutures de Cabernet Sauvignon. Les valeurs reportées sont les moyennes des taux de nécroses (en %) mesurés sur 30 plants par modalité et prélevés 4 mois après infection par *N. parvum*.

Figure2. Necrosis assessment in the trunk of the young Cabernet Sauvignon vines. Values are the average of the necrosis rates (%) measured for 30 plants per modality and sampled 4 months after infection by *N. parvum*.

4. DISCUSSION

Dans cette étude, 2 types de tissus ont été analysés : le bois nécrosé et le bois « apparemment sain » provenant du tronc de ceps de vigne prélevés en Tunisie et présentant ou non des symptômes foliaires d'esca. Les isollements réalisés par microbiologie classique à partir des 2 types de bois a permis de caractériser 16 souches bactériennes différentes : 7 à Gram négatif et 9 à Gram positif. Les espèces majoritaires étaient *Bacillus* sp. (8 souches) et *P. agglomerans* (4 souches). Ce résultat est en accord avec les travaux effectués par Bruez (2013) sur des ceps de la variété Cabernet sauvignon prélevés en France. Des publications récentes ont d'ailleurs rapporté que le genre *Bacillus* semblait être un colonisateur fréquent et commun de divers organes de la vigne (West et al., 2010 ; Compant et al., 2011). La deuxième partie du travail effectué a été d'évaluer le pouvoir protecteur de ces souches à l'égard du pathogène *N. parvum* par des confrontations directes sur milieu PDA, ainsi qu'*in vivo* sur des plants de vigne sous serre. Les résultats obtenus ont montré que la souche *Bacillus* sp. B11 semblait être la plus performante pour être utilisée en serre. Plusieurs études ont en effet montré le potentiel de *Bacillus* spp. comme agents de lutte biologique (Guelldner et al., 1988 ; Toure et al., 2004 ; Lee et al., 2006), et notamment contre des pathogènes impliqués dans les MDBs comme *Eutypa lata* (Schmidt et al., 2001) et *Phaeomoniella chlamydospora* (Alfonzo et al., 2009). Des espèces de *Bacillus* sont également impliquées dans le contrôle d'autres pathogènes de la vigne tels que *Botrytis cinerea* et *Agrobacterium vitis*. Dans notre essai, la souche B11 *Bacillus* sp., a été co-inoculée avec *N. parvum* dans le tronc de boutures de Cabernet Sauvignon afin d'évaluer sa capacité à réduire la taille des nécroses induites par ce dernier. Ce processus de co-inoculation a montré la capacité de la souche B11 à réduire la longueur des nécroses de 20% par comparaison avec les témoins positifs inoculés seulement avec *N. parvum*. Il serait également intéressant d'effectuer des essais complémentaires contre d'autres champignons impliqués dans l'esca, e.g. *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeacremonium aleophilum*, *P. chlamydospora*, afin d'évaluer le potentiel de ces bactéries comme agents de biocontrôle.

5. CONCLUSION

En conclusion, les travaux réalisés dans le cadre de cette étude ont montré que le bois des ceps de vigne, nécrosé ou non, était colonisé par divers genres bactériens, les méthodes que nous avons utilisées indiquaient principalement la présence de *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans*. Ces deux espèces représentent une piste intéressante pour développer une stratégie de lutte contre l'esca de la vigne, puisque plusieurs espèces sont actuellement utilisées en lutte biologique sur d'autres cultures.

6. REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été financés par le programme PHC-Utique France-Tunisie géré par le CMCU (projet 13G0924) ainsi que par le programme Casdar du Ministère français en charge de l'Agriculture et le CNIV (projet V 1302).

7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alfonzo A, Conigliaro G, Torta L, Burruano S, Moschetti G (2009) Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG against vine wood fungal pathogens. *Phytopathol Mediterr* 48: 155-158.
- Bertsch C, Ramirez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, et al (2013) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathol* 62: 243-265.
- Bester W, Crous PW, Fourie PH (2007) Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Austral Plant Pathol* 36:73-77.
- Bruez E (2013). Etude comparative des communautés fongiques et bactériennes colonisant le bois de ceps de vigne ayant exprimé ou non des symptômes d'esca. Université de Bordeaux Segalen (269 pages).
- Bruez E, Lecomte P, Grosman J, Doublet B, Bertsch C, Fontaine F, Da Costa Jp, Ugaglia A, Teissedre PL, Guerin-Dubrana L, Rey P (2013) Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathol Mediterr* 52: 262-275.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H, Sessitsch A (2011) Endophytes of Grapevine Flowers, Berries, and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria, Comparison with Other Plant Parts, and Visualization of Niches of Colonization. *Microb Ecol* 62: 188-197.
- Di Marco S, Calzarano F, Gams W, Cesari A (2000) A new wood decay of kiwifruit in Italy. *NZ J Crop Hortic Sci* 28:69-72.
- Fourie PH, Halleen, F (2005) Integrated strategies for proactive management of grapevine trunk diseases in nurseries. *Phytopathol Mediterr* 44:111.
- Fourie PH, Halleen F (2006) Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. Gouadec D, Blouin J (2007). Les parasites de la vigne. Stratégies de protection raisonnée. Dunod, France.
- Gramaje D, Armengol J (2011) Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation.
- Gueldner RC, Reilly CC, Pusey PL, Costello CE, Arrendale RF, Cox RH, Himmelsbach DS, Crumley FG, Cutler HG (1988) Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological-control of peach brown rot with *Bacillus-subtilis*. *J Agric Food Chem* 36: 366-370.
- Lecomte P, Cardon, Bastien N, Giry Laterriere S (2004) Risques D'infection Par L'eutypiose Au Printemps. *Phytoma* 576:22-27.
- Lee JP, Lee SW, Kim CS, Son JH, Song JH, Lee KY, Kim HJ, Jung SJ, Moon BJ (2006) Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol Control* 37: 329-337.
- Lorrain B, Ky I, Pasquier G, Jourdes M, Dubrana LG, Geny L, Rey P, Donèche B, Teissedre PL (2012) Effect of esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines. *Aust J Grape Wine Res* 18:64-72.

- Pitt WM, Sosnowski MR, Taylor A, Huang R, Quirk L, Hackett S, Somers A, Steel CC, Savocchia S (2010) Management of Botryosphaeria canker of grapevines. *Aus Viti Prac Vine Mana* 14:52-56.
- Rolshausen PE, Urbez-Torres JR, Rooney-Latham S, Eskalen A, Smith RJ, Gubler WD (2010) Evaluation of Pruning Wound Susceptibility and Protection Against Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. *Am J Enol Vitic* 61:113-119.
- Schmidt CS, Lorenz D, Wolf GA (2001) Biological control of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* I: Screening of bacterial antagonists. *J Phytopathol* 149: 427-435.
- Sosnowski MR, Creaser ML, Wicks TJ, Lardner R, Scott ES (2008) Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Aus J Grape Wine Res* 14:134-142.
- Toure Y, Ongena M, Jacques P, Guirio A, Thonart P (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol* 96: 1151-1160.
- Van Helden M (2008) Protection intégrée: La protection intégrée vis-à-vis des ravageurs de la vigne. In: Kreiter S (ed) *Ravageurs de la vigne*. Féret, France, pp 321–335.
- Weber EA, Trouillas FP, Gubler WD (2007). Double pruning of grapevines: A cultural practice to reduce infections by *Eutypa lata*. *Am J Enol Vitic* 58:61-66.
- West ER, Cother EJ, Steel CC, Ash GJ (2010) The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Can J Microbiol* 56: 209-216. d4
- Whipps JM. (1987) Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytology* 107: 127-142.