

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

**TRICHODERMA ATROVIRIDE I-1237 REDUIT LA PRESENCE DES CHAMPIGNONS PATHOGENES
RESPONSABLES DES MALADIES DU BOIS DE LA VIGNE DANS LES JEUNES PLANTS DE VIGNE**

E. MOUNIER⁽¹⁾, A. PIACIBELLO⁽¹⁾, M. CADIOU⁽¹⁾ et E. PAJOT⁽¹⁾

⁽¹⁾AGRAUXINE Lesaffre– 2 rue Henri Becquerel ; 49070 Beaucouzé – FRANCE –
emmanuelle.mounier@agrauxine.fr

RÉSUMÉ

Les maladies du bois de la vigne (MBV) causent de graves pertes dans les vignobles. Il est donc nécessaire d'empêcher ces agents pathogènes de pénétrer dans les jeunes plants de vigne en pépinière. Agrauxine a développé un produit, Tri-Wall[®], ayant comme substance active le *Trichoderma atroviride* souche I- 1237, pour protéger les plants contre les pathogènes responsables de l'ESCA, BDA et Eutypiose. L'efficacité de Tri- Wall[®] contre *Botryosphaeria obtusa*, *Phaeomoniella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum* a été étudiée en inoculant artificiellement les agents pathogènes sur les boutures de vigne, puis en évaluant la présence de nécroses dans le bois. Une analyse en Q-PCR a permis de démontrer que la présence de la souche I-1237 dans le bois réduit significativement la présence des pathogènes responsables des MBV.

Mots-clés : *Trichoderma atroviride*, Maladie du Bois de la Vigne, Q-PCR, Tri-Wall.

ABSTRACT

**TRICHODERMA ATROVIRIDE I-1237 REDUCES THE PATHOGEN DEVELOPMENT OF GRAPEVINE
TRUNK DISEASES IN THE NURSERY**

The benefits of the strain I-1237 of *Trichoderma atroviride* to provide protection against GTD have been shown in the laboratory by several public research institutes. Using this strain, Agrauxine conducted trials on young plants in the nursery to demonstrate the efficacy of I-1237 against the infection of *B.obtusa*, *P.chlamydospora* and *P.aleophilum*, 3 GTD fungi. Results showed that dipping young plants in a I-1237 treatment decreased the size of the necrosis produced by *B.obtusa* and *P.chlamydospora*. Furthermore, a molecular analysis revealed a significant decrease in the quantity of these 3 pathogens in the wood based on qPCR studies.

Keywords: *Trichoderma atroviride*, Grapevine Trunk Disease, Q-PCR, Tri-Wall.

INTRODUCTION

Les maladies du bois de la vigne (MBV) (Eutypiose, Esca et BDA) causent de graves dégâts dans les vignobles. Aucun moyen de lutte chimique n'est actuellement disponible depuis l'interdiction successive en 2001 des deux fongicides (arsénite de sodium et carbendazime) utilisés jusqu'alors. Aujourd'hui, une recrudescence des MBV est observée causant un problème auquel les viticulteurs doivent faire face pour optimiser la qualité et la pérennité de leur vignoble (Dossier Phytoma N° 609-2007).

Dans le but de réduire les champignons responsables des MBV dans les ceps, il est indispensable de s'intéresser aux plants dès la pépinière afin de réduire l'inoculum primaire au stade « jeunes plants » de vigne. Différentes techniques ont été étudiées. La plus connue est le traitement à l'eau chaude. Celle-ci a montré une efficacité à l'égard de certains champignons associés aux MBV (*Phaemoniella chlamydospora*, *Botryosphaeria obtusa*) et aucune vis-à-vis d'autres champignons tels que *Phaeoacremonium aleophilum* et *Neofusicoccum parvum* (Larignon *et al*, 2013a). Une autre technique peut être utilisée : la greffe-bouture herbacée. Celle-ci associe la simplicité de la technique *in vitro* aux avantages du travail des organes jeunes. Elle permet d'obtenir des plants dénués des champignons associés aux MBV, à l'exception de l'agent du pied noir qui est apporté par le substrat (Larignon *et al*, 2013b). Au niveau de la pépinière, on peut aussi citer les travaux initiés depuis plusieurs années déjà sur l'étude de l'apport précoce de microorganismes bénéfiques lors des étapes de fabrication des jeunes plants (Cordier et Romand, 2009) afin de limiter, dès leurs plus jeunes âges, les risques de multiplication des champignons pathogènes responsables de l'Esca-BDA, Eutypiose et maladie de Petrie.

Agrauxine développe un produit à base de *Trichoderma atroviride* I-1237, nommé Tri-Wall® WP, dans le but de réduire l'inoculum primaire dans les jeunes plants de vigne dès la pépinière.

Afin d'évaluer ce produit, une expérimentation a été réalisée sous serre avec des plants traités par Tri-Wall® WP en comparaison avec des plants témoin non traités. Une plaie de taille a été simulée à l'extrémité de chaque greffon, puis 24h après, un dépôt de 1 000 spores de champignons responsables des MBV a été réalisé. Les nécroses induites par ces différentes inoculations ont été mesurées et comparées entre les 2 modalités. Dans un deuxième temps, une analyse moléculaire est réalisée afin de déterminer la présence quantitative du champignon bénéfique, le *Trichoderma atroviride* I-1237, ainsi que des champignons pathogènes.

MATERIEL ET MÉTHODES

MATERIEL VEGETAL

Les plants utilisés sont des Sauvignon blanc greffés sur Fercal. Ces plants ont été choisis à partir d'un même lot de fabrication. Ainsi, ils proviennent tous d'un même clone et d'une même origine de bois. Le porte-greffe (PG) a été sélectionné en fonction de sa capacité à bien s'établir sur une gamme de sols assez large. Quant au cépage, il a été choisi en fonction de sa sensibilité envers les maladies du bois de la vigne.

Elaboration des plants

Le matériel végétal sera choisi le plus homogène possible : même diamètre de porte-greffe (PG) et greffon (G), état apparent des bois.

Le PG est assemblé au G par une greffe oméga à la machine à greffer. La partie supérieure du plant est recouverte de paraffine. Les greffés-soudés, ainsi obtenus, sont placés en stratification pendant environ 15 jours à 28°C, permettant le processus de soudure du cal.

La base des plants est ensuite trempée dans une solution rhizogène liquide à base d'hormone, favorisant l'enracinement de la bouture.

Les greffés-soudés sont ensuite plantés en serre en pots 9x9 cm de tourbe comprimée. Par la suite, la fertilisation utilisée contient de l'azote (Urée 46) appliquée une fois par mois jusqu'à la mi-juillet.

Traitement des plants

Les greffons sont immergés dans une solution de Tri-Wall® WP, à une concentration de 1g/L, lors de la phase de réhydratation durant 24 h. Les greffons ainsi traités sont conservés par la suite à 4°C. Après le greffage, dans la chambre de stratification, le porte-greffe est plongé sur 4 à 5 cm à sa base dans la même solution de Tri-Wall® WP pendant 48h.

MATERIEL FONGIQUE

Pour l'inoculation artificielle des jeunes plants de vigne, les 3 principaux champignons pathogènes responsables de l'Esca/BDA de la vigne ont été sélectionnés. Les souches de *Botryosphaeria obtusa* (Bot), *Phaemoniella chlamydospora* (Pch), *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal) (INRA UMR 1065 SAVE-France) sont mises en culture à partir d'explants mycéliens sur un milieu PDA (Potato Dextro Agar, Biokar Diagnostics). Les cultures sont incubées à 25°C pendant 31 jours pour Pal et Pch et 11 jours pour Bot. Les spores sont ensuite récupérées en versant du tampon TS (Tryptone sel, Biokar Diagnostics) puis dénombrées sur cellule de Malassez. L'inoculum est ensuite calibré à $1 \cdot 10^4$ spores/mL pour Pal et Pch et $4 \cdot 10^3$ spores/mL pour le Bot.

INOCULATION DES JEUNES PLANTS DE VIGNE

Pour chacun des plants, le haut du greffon a été coupé, à l'aide d'un sécateur, afin de réaliser une plaie. 24 heures après cette coupe, différents dépôts de 25 µL sont réalisés au niveau des plaies de taille. Ces 25 µL contiennent soit (i) 1 000 spores de champignons pathogènes des MBV, soit (ii) de l'eau pour le témoin. Après chaque inoculation, un sparadrap est déposé sur la plaie.

ANALYSE DE NECROSE

Afin de mesurer l'effet de l'inoculation des jeunes plants en pépinière par Tri-Wall® WP dans la protection contre les principaux pathogènes de l'Esca/BDA, des mesures de la taille des nécroses provoquées par les pathogènes sont réalisées. Cette étude est réalisée 8 mois après l'inoculation des champignons pathogènes. Pour cette analyse, un échantillon de 24 plantes par modalité est analysé. Sur chaque plant de vigne, le greffon est séparé du porte-greffe en dessous de la zone de greffage. Le greffon est ensuite coupé longitudinalement afin de mesurer la longueur de la nécrose.

ANALYSE MOLECULAIRE

Les échantillons de bois sont broyés manuellement puis au broyeur à billes (Bioreba). La méthode « phénol-chloroforme » est utilisée pour extraire l'ADN génomique total de l'échantillon. Les PCR quantitatives sont réalisées pour quantifier la quantité relative d'ADN génomique des champignons pathogènes des MBV mais aussi de l'antagoniste, *Trichoderma atroviride* I-1237.

ANALYSE STATISTIQUE

Le nombre d'échantillons utilisé pour les statistiques est de 24. Un test d'Anova a été réalisé sur les données suivant la loi normale afin de comparer les longueurs moyennes des nécroses et ainsi

déterminer s'il existait une différence statistiquement significative pour $P \leq 0.05$. Les tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel StatGraphics Centurion XVI.

RESULTATS

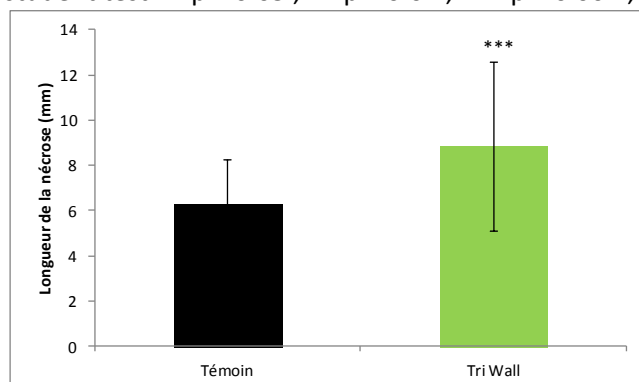
Afin de tester l'efficacité du traitement Tri-Wall contre les pathogènes responsables des MBV, 2 paramètres ont été analysés: (i) la réduction de la taille de la nécrose induite par ces champignons pathogènes et (ii) la diminution de la quantité de ces derniers dans le bois trichodermé en comparaison avec le témoin non traité.

ANALYSE DES NECROSES INDUITES PAR LES CHAMPIGNONS PATHOGENES DES MBV

La comparaison de la taille des nécroses induites par une plaie de taille a été comparée entre les jeunes plants témoin et ceux ayant subi en pépinière le traitement Tri-Wall WP (Figure 1). La longueur de la nécrose chez les sujets traités est significativement plus importante par rapport au témoin. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la présence du champignon bénéfique, le *Trichoderma atroviride* I-1237, induit dans un premier temps une réaction de défense et indirectement un cône de dessèchement plus important.

Figure 1 : Longueur moyenne des nécroses observée sur un échantillon de 24 greffons. Une analyse statistique T student test a été réalisée : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns : non significatif

Figure 1 : Mean necrosis length of a sample of 24 grafts. Statistical differences according to a T student test : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns : non significatif

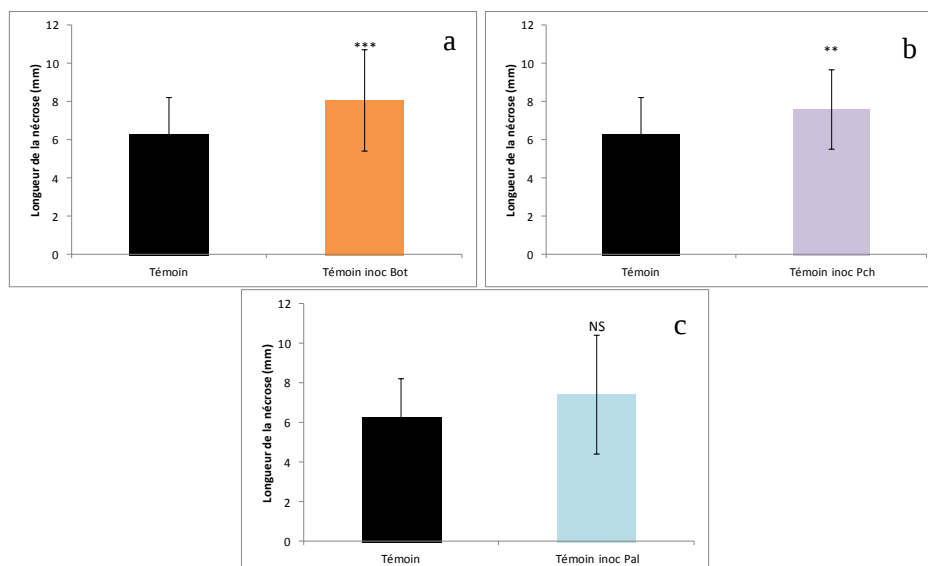


Analyse des nécroses induites par les agents pathogènes responsables des MBV

La vérification qu'un apport de spores de *Bot.*, *Pal.* ou *Pch.* sur une plaie de taille provoquerait une nécrose a été réalisée. Les plants non traités par Tri-Wall® WP et inoculés ou non avec 1 000 spores de *Bot.*, *Pal.* ou *Pch.* ont été comparés (Figure 2).

Figure 2 : Mesure moyenne de la longueur des nécroses chez les jeunes plants témoin comparés aux jeunes plants de vigne inoculés par *Botryosphaeria obtusa* (a), *Phaemoniella chlamydospora* (b) et *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal). Une analyse statistique T student test a été réalisée : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns : non significatif

Figure 2 : Mean necrosis length of a young plant control compare to young plant inoculate by *Botryosphaeria obtusa* (a), *Phaemoniella chlamydospora* (b) et *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal). Statistical differences according to a T student test : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns : non significatif



Chez les plants témoin, une nécrose est observée. Sa longueur moyenne est de 6 mm et traduit le cône de dessèchement provoqué par la plaie de taille. Chez les jeunes plants ayant subi une inoculation artificielle de *Bot.* et *Pch.*, la longueur moyenne des nécroses est significativement plus importante que chez les plants témoin non inoculés avec les pathogènes responsables des MBV. L'inoculation par *Bot.* et *Pal.* induit une augmentation de la nécrose respectivement de l'ordre de 20% $p=0,01$ et 15% $p=0,05$.

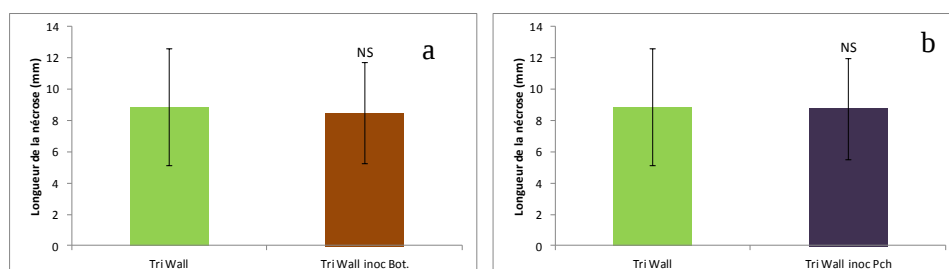
Par ailleurs, l'inoculation de 1000 spores de *Pal.* sur une plaie de taille ne provoque pas de nécrose. Ce paramètre ne peut donc pas être utilisé pour évaluer l'efficacité de Tri-Wall® WP contre ce champignon.

Mesure de l'efficacité du produit Tri-Wall® WP dans la réduction des nécroses induites par *Bot.* et *Pal.*

Après vérification qu'un apport de spores de *Bot.* et *Pch.* provoquait bien une nécrose, la comparaison entre les plants ayant subi un traitement avec Tri Wall sans inoculation de pathogènes et ceux avec inoculation de pathogènes a été réalisée. Aucune différence statistique n'a été observée entre ces différentes conditions que ce soit avec une inoculation par *Bot.* ou *Pch.* (Figure 3).

Figure 3 : Mesure moyenne de la longueur des nécroses chez les jeunes plants témoin traités par Tri Wall comparés aux jeunes plants de vigne inoculés par *Botryosphaeria obtusa* (a), *Phaemoniella chlamydospora* (b). Une analyse statistique T student test a été réalisée : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns : non significatif

Figure 3 : Mean necrosis length of a young plant Tri-Wall®WP compare to young plant inoculate by *Botryosphaeria obtusa* (a), *Phaemoniella chlamydospora* (b). Statistical differences according to a T student test : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns : non significatif



Les champignons pathogènes des MBV ne provoquent plus de nécrose en présence de *Trichoderma atroviride* I-1237 dans les jeunes plants de vigne.

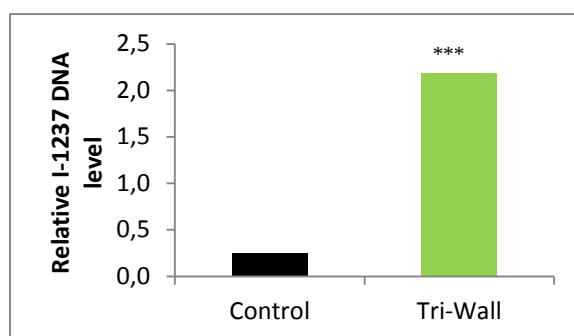
ANALYSE MOLECULAIRE

Une analyse quantitative de l'ADN génomique des champignons antagonistes et pathogènes a été réalisée dans les jeunes plants témoin non traités et les jeunes plants non trichodermés.

Tout d'abord, la validation du traitement par Tri-Wall® WP a été effectuée en quantifiant l'ADN génomique de *Trichoderma atroviride* I-1237 dans ces deux conditions (Figure 4).

Figure 4 : Quantification relative de l'ADN génomique de *Trichoderma atroviride* I-1237 dans les jeunes plants de vigne non traités (control) et traités par *Trichoderma atroviride* I-1237 (Tri-Wall). Une analyse statistique T student test a été réalisée : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns : non significatif

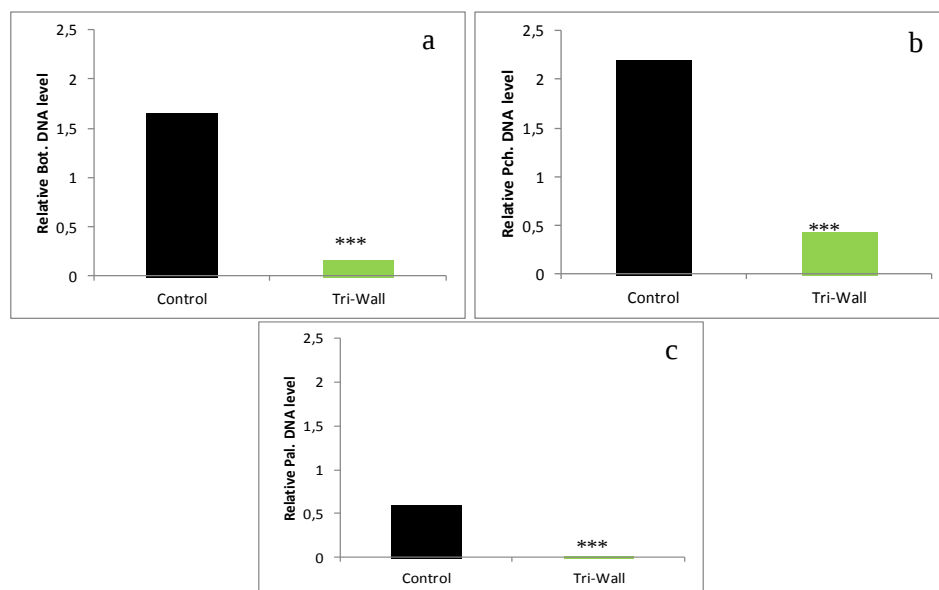
Figure 4 : Relative quantification of genomic ADN of *Trichoderma atroviride* I-1237 in young grapevine plants, treated or not with Tri-Wall. Statistical differences according to T-Student test : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns : non significatif



Le traitement par Tri-Wall® WP induit une augmentation significative du taux relatif d'ADNg du champignon antagoniste. Le traitement par trempage des greffons dans un bain contenant une solution de *Trichoderma atroviride* I-1237 permet bien une colonisation du bois des jeunes plants de vigne. Cette colonisation est-elle suffisante pour agir sur les pathogènes responsables des MBV ?

Figure 5 : Quantification relative de l'ADN génomique de *Botryosphaeria obtusa* (a), *Phaemoniella chlamydospora* (b) et *Phaeoacremonium aleophilum* (c) dans les jeunes plants de vigne non traités (control) et traités par *Trichoderma atroviride* I-1237 (Tri-Wall). Une analyse statistique T student test a été réalisée : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns : non significatif.

Figure 5 : Relative quantification of genomic ADN of *Botryosphaeria obtusa* (a), *Phaemoniella chlamydospora* (b) et *Phaeoacremonium aleophilum* (c) in young grapevine plants, treated or not with Tri-Wall. Statistical differences according to T-Student test : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns : non significatif.



Dans toutes les conditions, la présence de *Trichoderma atroviride* I-1237 permet de réduire significativement la présence des champignons pathogènes responsables des MBV dans les jeunes plants de vigne (Figure 5).

DISCUSSION

La plupart des champignons associés aux maladies du bois se propagent par le matériel végétal (Gramaje et Armengol, 2011). En pépinière, l'itinéraire technique du bois de *Vitis vinifera*, qu'il provienne des porte-greffes ou de greffons, de leur collecte au vignoble jusqu'à la vente des greffés-soudés ou des jeunes plants en pots est jalonnée d'étapes, i.e. stockage, réhydratation, greffage, paraffinage, stratification, puis l'élevage en pots ou au champ pouvant prédisposer les tissus de vigne à un développement précoce et rapide de nombreux parasites lignicoles (Ferreira *et al.*, 1999; Gramaje et Armengol, 2011; Gubler, 2006; Lecomte *et al.*, 2008; Stamp, 2001; Viguès *et al.*, 2009; Waite et Morton, 2007). Un jeune plant infecté n'est pas automatiquement condamné mais la qualité de la cicatrisation et de l'enracinement en pépinière va jouer un rôle essentiel pour la vie future du jeune plant. Une méthode curative disponible à l'heure actuelle est le traitement des bois de multiplication à l'eau chaude. Cette méthode consiste à immerger les sarments dans un bain d'eau à 50°C. Cette pratique semble être la plus efficace lorsqu'elle est réalisée sur les sarments avant greffage ou sur les plants greffés-soudés en dormance après leur élevage (Gramaje et Armengol, 2011). Néanmoins, son efficacité curative n'est que partielle et n'agit que sur quelques champignons responsables des MBV (*Phaemoniella chlamydospora*, *Botryosphaeria obtusa*) et aucune vis-à-vis d'autres champignons tels que *Phaeoacremonium aleophilum* et *Neofusicoccum parvum* (Larignon *et al.*, 2013a). Le contrôle chimique des maladies est aussi problématique. Les techniques traditionnelles de pulvérisation et de trempage utilisées pour la décontamination de surface ne permettent pas une pénétration des fongicides suffisante pour le contrôle des agents pathogènes présents au niveau des tissus du xylème et du phloème (Gramaje et Armengol, 2011). Les bains d'hydratation semblent être des étapes stratégiques pour le contrôle des agents pathogènes. La diminution des taux de contamination de *P. chlamydospora* et des *Botryosphaeriaceae* par une formulation de cyprodinile et de fludioxonile est aussi documentée (Rego *et al.*, 2009).

Les résultats obtenus avec le produit Tri-Wall® WP permettent de proposer une solution intéressante contre les principaux pathogènes des MBV. Associé à un tri en sortie de pépinière qui

doit être aussi sévère que possible, le pépiniériste viticole devrait pouvoir fournir prochainement un plant indemne de pathogènes responsables des MBV et vigoureux.

CONCLUSION

Les résultats obtenus lors de cette expérimentation en observant les longueurs de nécroses induites par les pathogènes des MBV et les données de biologie moléculaire, montrent que *Trichoderma atroviride* I-1237 présente de bonnes capacités de biocontrôle à l'encontre des principaux pathogènes des MBV dans le cadre de la production de jeunes plants greffés-soudés de vigne. Cette action antagoniste peut être attribuée à deux paramètres : la compétition spatiale et l'antibiose. Des analyses réalisées au laboratoire ont permis de caractériser le mode d'action de cette souche antagoniste vis-à-vis des champignons pathogènes. Le *Trichoderma atroviride* I-1237 agit comme un compétiteur spatial mais aussi sécrète des composés permettant le phénomène d'antibiose. Le nouveau produit Tri-Wall® WP, ayant comme substance active cette souche d'intérêt, peut à présent être intégré dans les itinéraires techniques, dans le cadre du développement d'une agriculture moins consommatrice d'intrants.

BIBLIOGRAPHIE

Cordier C. et Romand C. 2009. Maladie du bois de la vigne, vers la lutte biologique ? Phytoma, N°624-625.

Ferreira J.H.S., Matthee F.N. & Thomas A.C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonist strain of *Bacillus subtilis*. Phytopathology, 81, 283-287.

Gramaje D. & Armengol J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. Plant disease, 95, 1040-1055.

Lecomte *et al*, 2008 (I) Eutypiose et Esca- Eléments de réflexion pour mieux appréhender ce phénomène de dépérissement. (II) Esca de la vigne – vers une gestion raisonnée des maladies de dépérissement. Phytoma – LDV 615 : 43-48 et 616 : 37-41.

Vignes V., Serrano E., Dumas C., Coarer M., Yobregat O., Larignon P., 2007. Les maladies du bois peuvent commencer en pépinières. Contaminations des plants des vignes par les champignons associés aux maladies du bois, une enquête en Midi-Pyrénées. Phytoma, 609, 20–23.