

**LES CHAMPIGNONS ASSOCIES AUX MALADIES DU BOIS
ET LA PEPINIERE
- RESULTATS PRELIMINAIRES -**

*Auteurs : Virginie Viguès⁽¹⁾, Eric Serrano⁽¹⁾, Claire Dumas⁽²⁾
Morvan Coarer⁽³⁾, Olivier Yobregat⁽⁴⁾, Philippe Larignon⁽⁵⁾,*

Contacts : ⁽¹⁾ ITV France Midi-Pyrénées - Vinnopôle – BP 22 – 81310 Lisle sur Tarn

⁽²⁾ Stagiaire ingénieur ENITAB

⁽³⁾ ITV France Nantes – Château de la Frémoire – 44120 Vertou

⁽⁴⁾ Sicarex Sud-Ouest – Abbaye St-Michel – 81600 Gaillac

⁽⁵⁾ ITV France Rhône-Méditerranée – Dne de Donadille – 30230 Rodilhan

Travaux effectués avec la collaboration de Nelly Estrade et Flora Dias (ITV France Midi-Pyrénées), et du Syndicat Midi-Pyrénées des Producteurs de Plants

SOMMAIRE

1 – INTRODUCTION	3
2 - METHODOLOGIE	3
2.1 – Enquête	3
<i>2.1.1 – Echantillonnage</i>	<i>3</i>
<i>2.1.2 – Isolement</i>	<i>3</i>
2.2 – Identification des étapes à risque lors de l’élaboration des plants en pépinières	4
3 – RESULTATS DE L’ENQUETE	5
3.1 – Identification de champignons dans les greffés-soudés	5
3.2 – Localisation des champignons dans les greffés boutures	6
4 – IDENTIFICATION DES ETAPES A RISQUE LORS DU PROCESS DE FABRICATION	8
4.1 – Analyses microbiologiques	8
4.2 – Analyses biomoléculaires	10
5 – CONCLUSION	10

Les champignons associés aux maladies du bois et la pépinière

1 - INTRODUCTION

Les maladies du bois, Esca, Black Dead Arm et Eutypiose, touchent la charpente de la vigne et entraînent à plus ou moins long terme la mort des cepes atteints.

Depuis la suppression de l'arsénite de sodium, l'extériorisation des symptômes et la mortalité des souches augmentent régulièrement.

L'année 2004 a été particulièrement marquante en terme d'extériorisation de la maladie. Une enquête menée en Midi-Pyrénées (SERRANO, 2004 communication personnelle), montre que les parcelles les plus atteintes ont généralement entre 10 et 15 ans, mais il apparaît de façon très nette, que les jeunes vignes sont également touchées par ces maladies : plus de 10 % des parcelles atteintes ont moins de 10 ans. Des symptômes sont même observés sur des jeunes vignes de 4 à 5 ans, posant des interrogations quant à une présence possible des champignons dans le matériel végétal destiné à la pépinière ou en sortie de pépinière.

Une étude récente démontre qu'en ne tenant compte que du taux de contamination dans le porte-greffe, seuls quelques plants devraient être infectés par *Phaeoconiella chlamyospora* et *Phaeoacremonium aleophilum* (LARIGNON et al., 2005). Parallèlement, en Afrique du Sud, des travaux ont montré la présence de *Phaeoconiella chlamyospora* à toutes les étapes de préparation du plant, mais aussi dans les bains de réhydratation (RETIEF et al., 2005).

Le travail présenté dans cet article porte sur les champignons associés aux maladies du bois : *Phaeoconiella chlamyospora* (Pch), *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Fomitiporia mediterranea*, *Eutypa lata* et *Botryosphaeria* spp. Ces champignons, dont le rôle dans l'expression des symptômes n'est, pour la plupart, pas connu, passent par une phase saprophytique au cours de leur évolution, et peuvent devenir parasites de la vigne dans des conditions défavorisantes pour la plante et entraîner ainsi la mort du cep.

Le programme mené en 2005 a pour objectif :

- d'évaluer l'importance de ces micro-organismes dans les plants en sortie de pépinières par le biais d'une enquête
- d'identifier les étapes au cours desquelles pourraient s'effectuer d'éventuelles contaminations lors de l'élaboration de plants afin d'apporter des solutions adaptées au problème

2 – METHODOLOGIE

2.1 – Enquête

2.1.1 - Echantillonnage

Les deux principaux types de plants de vigne disponibles sont utilisés dans cette étude : plants traditionnels et plants en pot.

Huit pépiniéristes représentant plus de 80% des plants vendus en Midi-Pyrénées ont collaboré à cette étude en fournissant le matériel végétal nécessaire. L'enquête a porté sur 900 plants traditionnels et 1000 plants en pot.

Afin de limiter le nombre de facteurs de variation, un seul cépage (Merlot) et un seul porte-greffe (SO4) ont été retenus.

2.1.2 - Isolement

Les plants traditionnels et en pot sont préparés de façon à éliminer les feuilles, racines, terre et paraffine. Des prélèvements ont lieu à 7 niveaux du plant :

- Greffon (G)
- Soudure (S)

- Porte-greffe : 1 cm sous la soudure (PG1)
- Au centre du porte-greffe (PG2)
- 5 mm au-dessus de la plaie d'éborgnage (PG3)
- Plaie d'éborgnage (Pe)
- Talon (PG4)

A chaque niveau, l'écorce est enlevée et une rondelle de bois est découpée au sécateur. Chaque rondelle est elle-même découpée en morceaux d'environ 1 mm³ et cinq morceaux sont pris au hasard. Sous une hotte à flux laminaire, ils sont ensuite déposés en quinconce sur un milieu de culture malté-gélosé après désinfection dans un bain d'hypochlorite de calcium (3g pour 100 mL). Le milieu de culture composé d'agar agar (20g/L), de cristo-malt (15g/L) et d'un antibiotique (le chloramphénicol à raison de 250mg/L) est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20min. Une fois les boîtes de Petriensemencées et clairement identifiées, elles sont mises en incubation à température ambiante (20°C). Un mois plus tard au minimum, la lecture est réalisée. La présence des champignons est notifiée visuellement dans chaque boîte de Petri. Le niveau de prélèvement est jugé contaminé par l'un des champignons si ces derniers se développent sur au moins un des 5 morceaux de bois.

2.2 – Identification des étapes à risque lors de l'élaboration des plants en pépinière

Sept étapes à risque ont été définies (tableau I). Des prélèvements de matériel végétal sont effectués à chacune de ces phases afin de procéder à l'isolement et l'identification des différents champignons (analyses microbiologiques). Au cours du process de fabrication des greffés-soudés, des prélèvements d'eaux sont réalisés :

- eaux de rinçage des outils utilisés pour l'éborgnage et le greffage
- eaux de rinçage de la surface des greffons obtenues par agitation dans de l'eau stérile (30 ml)
- eaux de réhydratation
- eaux de fin de stratification.

Ces échantillons sont ensuite analysés par des méthodes biomoléculaires.

Etapes	Analyses microbiologiques	Analyses biomoléculaires
Prélèvements dans les vignes mères	200 greffons 200 porte-greffes	/
Eborgnage-débitage	/	Eau de rinçage des outils
Réhydratation	200 greffons 200 porte-greffes	Eau de trempage
Greffage-paraffinage	200 greffes-boutures	Eau de rinçage des outils
Stratification à la sciure	50 greffes-boutures	Sciure post-stratification
Fin de stratification à l'eau	60 greffes-boutures	Eau de fin de stratification
Mise à la vente	100 greffés-soudés en pot	/

Tableau I : Protocole d'échantillonnage tout au long du process de fabrication d'un greffé-soudé

Les analyses microbiologiques suivent le même mode opératoire que précédemment à la différence près qu'avant greffage (prélèvements dans les vignes-mères et trempage), les isolements ne sont réalisés que sur un seul niveau : au milieu des greffons et des porte-greffes. Les 7 niveaux décrits précédemment sont conservés pour l'analyse des greffés-soudés.

Les analyses biomoléculaires consistent en la détection (ou non) de *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) par la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction). Les amorces, PCL1/PCL2 (GROENEWALD et al., 2000) et PCH1/PCH2 (TEGLI et al., 2000) sont utilisées après optimisation des conditions d'extraction et d'amplification (COARER, 2004 communication personnelle).

3 – RESULTATS DE L'ENQUETE

3.1 – Identification de champignons dans les greffés-soudés

De manière globale, à la vente 11% des plants traditionnels et 7 % des plants en pot sont porteurs de *Pch* et/ou *Pal*. De la même manière, 15% des plants traditionnels et 29% des plants en pot sont porteurs de *Botryosphaeria* spp. (Figure 1).

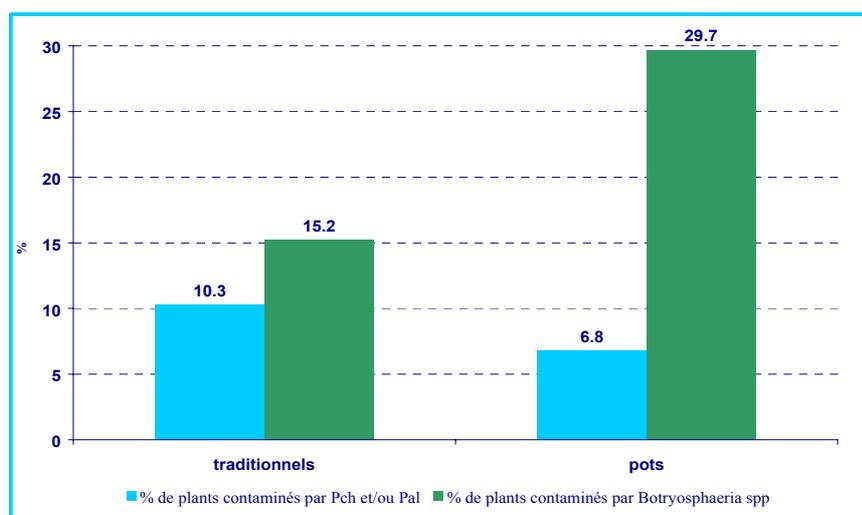


Figure 1 : Pourcentage de plants contaminés en sortie de pépinières suivant leur mode de production

Quel que soit leur itinéraire de fabrication, les plants semblent être porteurs de *Botryosphaeria* spp. Le taux de plants contaminés est variable selon le lot étudié. Il varie entre 6 et 31 % pour les plants traditionnels et entre 6,4 et 70 % pour les plants en pot (tableau II).

Pch (un des champignons pionniers) est le microorganisme le plus souvent isolé dans les plants mis à la vente (tableau II). Le pourcentage de plants contaminés par *Pch* à la sortie de la pépinière est variable selon le lot étudié. Il est compris entre 0 et 28% pour les plants traditionnels et de 0,7 à 11% pour les plants en pots.

Concernant *Pal*, il est moins souvent isolé. Son pourcentage d'isolement varie entre 1 et 3,5% pour les plants traditionnels et de 0 à 6,4% pour les plants en pots.

Il est important de noter que *Pal* et *Pch* sont rarement présents simultanément dans le même plant : entre 0 et 2% pour les plants traditionnels et entre 0 et 1% pour les plants en pots.

	Lots (effectif)	<i>Pch</i> uniquement	<i>Pal</i> uniquement	<i>Pch</i> et <i>Pal</i> simultanément	<i>Botryosphaeria</i> spp
Traditionnels	1 (200)	5%	3,5%	0,5%	6%
	2 (200)	5%	2,5%	0,5%	13%
	3 (200)	0%	1,5%	0%	17,5%
	4 (100)	27,7%	2%	2%	21,8%
	5 (100)	4%	1%	0%	31%
	6 (100)	14%	3%	2%	11%
Pots	2 (200)	11,1%	1,5%	1%	8,6%
	3 (300)	2,7%	3,7%	0%	19%
	7 (200)	3,9%	5,9%	0%	6,4%
	8 (300)	0,7%	0%	0%	70%

Tableau II : Pourcentage de plants contaminés par les différents champignons associés aux maladies du bois en fonction des lots

Les différences observées entre les lots étudiés peuvent être dues soit au matériel végétal d'origine (à l'entrée de la pépinière), soit à des processus de fabrication différents chez les pépiniéristes, voire les deux. Il est à noter que les deux lots de plants traditionnels présentant le plus grand nombre de plantes contaminées par *Pch* et le lot de plants en pots comptant de nombreuses plantes infectées par *Botryosphaeria* n'avaient subi aucune désinfection contrairement à tous les autres lots.

Comme cela avait déjà été décrit (LARIGNON *et al.*, 2005), *Fomitiporia mediterranea*, microorganisme responsable de la dégradation du bois caractéristique de l'esca et *Eutypa lata*, champignon responsable de l'eutypiose ne sont pas isolés en sortie de pépinière. Ce résultat a deux interprétations, soit ces microorganismes ne sont pas présents dans les plants, soit la méthode décrite précédemment ne permet pas de les isoler.

3.2 – Localisation des champignons dans les greffés boutures

Quatre-vingt-cinq pour-cent des plants sont indemnes de champignons. Sur les 15% atteints, les trois-quarts ne sont touchés que sur un seul niveau de prélèvement et 18% sur deux simultanément. Aucun plant n'est contaminé sur les sept niveaux (Figure 2).

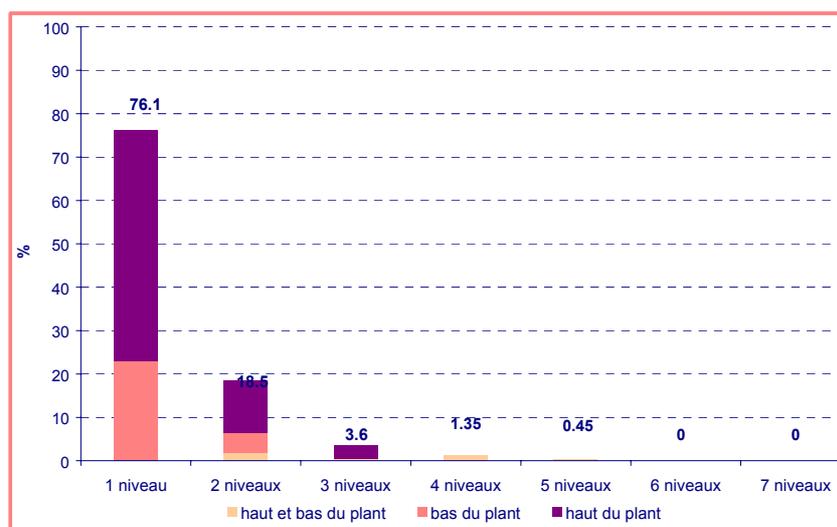


Figure 2 : Répartition des plants contaminés suivant le nombre de niveaux d'analyse où un champignon lié aux maladies du bois a été isolé

Lorsqu'un plant est contaminé sur un seul niveau de prélèvement, dans environ 70% des cas, il l'est en haut du plant (niveaux S, G et PG1) et en majorité au niveau de la soudure (43%). Lorsqu'un plant est contaminé simultanément sur deux niveaux, il s'agit majoritairement de niveaux se trouvant tous deux en haut du plant (G et S : 24%, G et PG1 : 22%, S et PG1 : 20%). Lorsqu'un plant est contaminé de manière simultanée sur 3 niveaux de prélèvements, dans 87% des cas, il l'est sur G, S et PG1.

Lors de notre enquête, les champignons sont préférentiellement isolés à deux niveaux (Figure 3) :

- la zone de soudure qui semble être prépondérante
- et la base du plant (plaie d'éborgnage et talon) plus mineure.

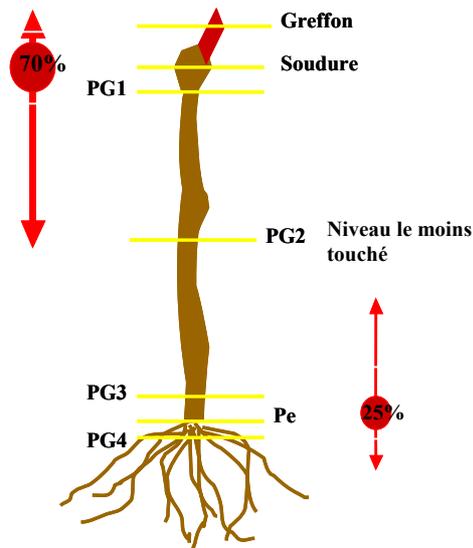


Figure 3 : Principales localisations des champignons associés aux maladies du bois

La même tendance est observée pour chacun des champignons (Figure 4) :

- Les *Botryosphaeria* spp se trouvent dans 79% des cas en haut des plants et plus particulièrement au niveau de la soudure (52,4%).
- *Pch* et *Pal* sont, de la même manière, isolés dans 70% des cas dans la partie haute. *Pch* est plus précisément localisé au niveau du greffon (24%) et de PG1 (25%) et *Pal* au niveau de PG1 (40,7%).

PG2 est en moyenne le niveau le moins souvent contaminé (3% pour *Botryosphaeria*, 9% pour *Pch* et 7,4% pour *Pal*). *Pal* et *Botryosphaeria* sont aussi isolés, mais dans une moindre mesure (10%) , en bas du plant, au niveau de la plaie d'éborgnage.

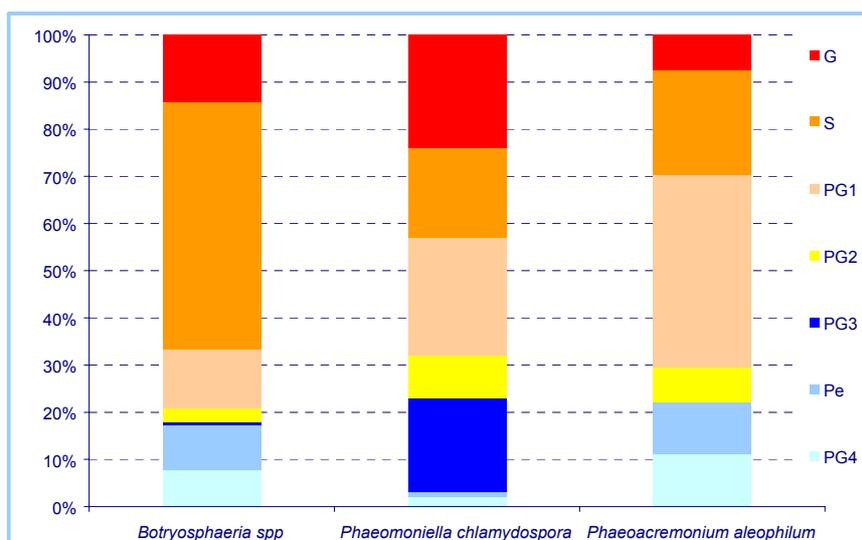


Figure 4 : Localisation des différents champignons

Ces résultats confirment ceux de Larignon (communication personnelle) concernant la pénétration de *Pal* et des *Botryosphaeria* par le haut du plant mais remet en cause l’hypothèse selon laquelle *Pch* pénétrerait essentiellement par le bas du plant. Ces différences de résultats peuvent avoir deux origines : le matériel végétal utilisé et le processus de fabrication.

4 – IDENTIFICATION DES ETAPES A RISQUE LORS DU PROCESS DE FABRICATION

Pour les besoins de l’expérimentation et dans un souci d’identifier au mieux les étapes à risques, les greffons sont issus d’une parcelle fortement atteinte par les maladies du bois.

4.1 - Analyses microbiologiques

Seul *Pch* a été isolé au cours du process de fabrication. Il n’apparaît qu’au moment de la fin de stratification (1,7% des greffes-boutures sont touchés) mais devient plus important lors de la mise en vente : 8%. Une contamination semblerait donc se produire lors de la fin de stratification à l’eau.

Malgré l’origine des greffons, ces derniers se révèlent non contaminés par les *Botryosphaeria* au départ de l’étude. De la même façon, les *Botryosphaeria* sont faiblement isolés dans les porte-greffes (de 0,5 à 2%). Une hausse du pourcentage d’isolement de ces champignons se produit au moment du greffage 16,5 % des plants sont alors porteurs de *Botryosphaeria* . Ce pourcentage atteint 33% au moment de la vente (Figure 5).

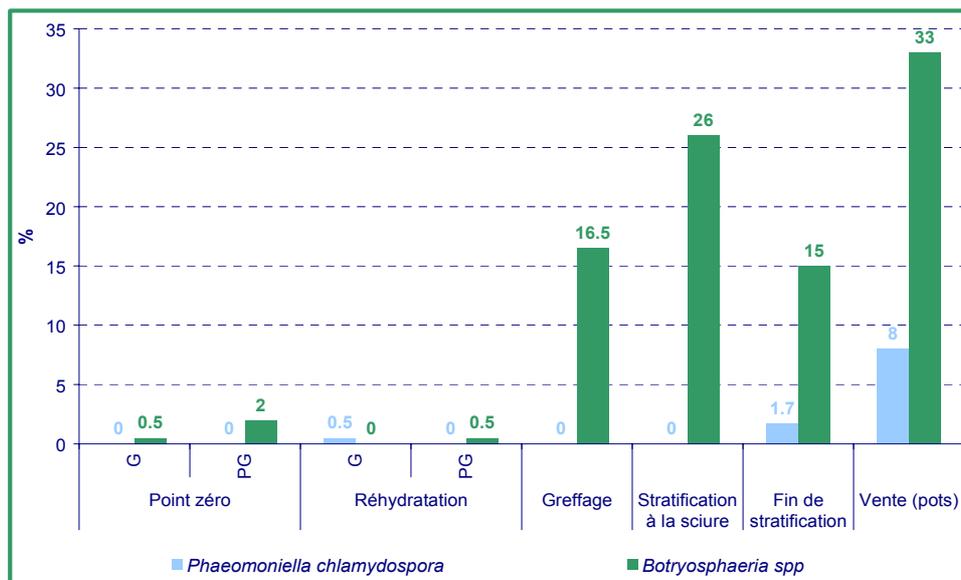


Figure 5 : Evolution du pourcentage de plants atteints au cours du process de fabrication d'un greffé-soudé

L'augmentation de l'isolement de *Botryosphaeria* au moment du greffage n'est pas connue. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- pollution des outils de greffage par les *Botryosphaeria*,
- contamination lors du trempage ne s'exprimant qu'au moment de l'analyse suivante de part le temps de latence (environ 45 jours) entre la réalisation des différentes opérations et l'analyse microbiologique.

L'hypothèse d'une contamination lors du greffage semble peu probable car la majorité des *Botryosphaeria* se trouve à ce moment-là au niveau de la plaie d'ébournage (51,4%) et non au niveau de la soudure (Figure 6).

Il semblerait donc que la contamination ait eu lieu au moment de la réhydratation.

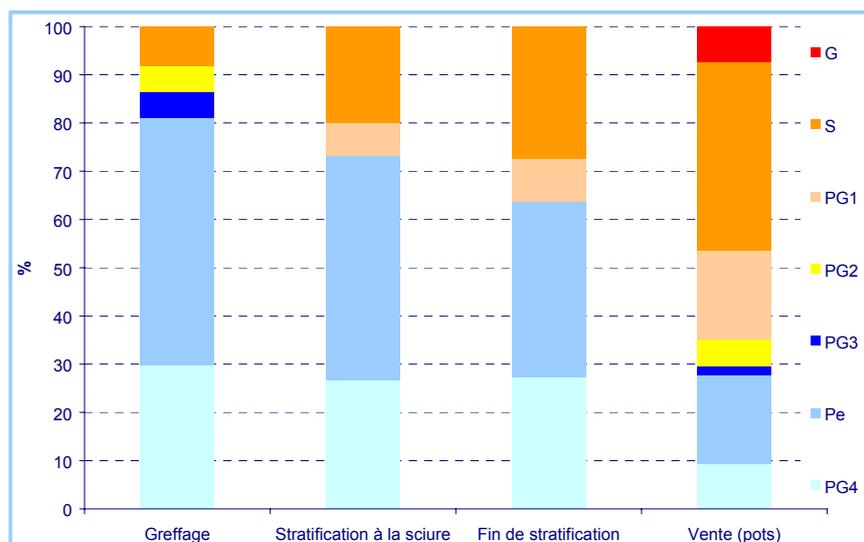


Figure 6 : Localisation des *Botryosphaeria* spp au cours du process de fabrication

Tout au long du process de fabrication, la quantité de plants contaminés par les *Botryosphaeria* augmente et la localisation de ces champignons s'inverse : tout d'abord majoritairement présents en

bas du plant, ces champignons se retrouvent en proportions plus importantes en haut du plant au moment de la mise en vente. Une nouvelle contamination s'est donc produite, cette fois par le haut du plant, sûrement de la stratification.

4.2 – Analyses biomoléculaires

L'analyse PCR, portant uniquement sur *Pch*, montre la présence du champignon dans l'eau de trempage et les eaux de stratification. Aucun *Pch* n'a été détecté dans l'eau de rinçage de la surface des greffons. Les outils ne semblent pas non plus être incriminés dans les processus de contaminations par *Pch*.

Cette nouvelle approche met de nouveau en lumière le rôle des différents bains dans la transmission des champignons d'un plant à l'autre. Le champignon serait apporté par le matériel végétal. Il a été montré par d'autres études que la surface du matériel végétal sur laquelle se trouverait *Pch* (sous forme de spores, de mycélium, voire les deux), constituerait la ou une des sources d'inoculum à l'origine des contaminations observées en pépinières (LARIGNON et COARER, communication personnelle).

5 – CONCLUSION

Le travail réalisé a permis d'évaluer l'importance des champignons associés aux maladies du bois à la sortie de la pépinière. Il est important de rappeler qu'aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la présence de champignons en sortie de pépinière et l'extériorisation des symptômes dans le vignoble. Dans notre étude, *Pch* et *Botryosphaeria* spp. sont les microorganismes les plus présents. Leur présence est variable selon l'origine des plants et/ou leur processus de fabrication. *Pal* est moins isolé dans les plants à la sortie de la pépinière.

Pch et *Pal* sont rarement présents dans le même plant. Or, les deux champignons doivent agir de concert pour initier le processus de dégradation du bois caractéristique de l'esca.

Les champignons ayant un rôle connu dans les maladies du bois sont *Fomitiporia mediterranea*, responsable du bois dégradé en amadou caractéristique de l'esca et *Eutypa lata*, responsable de l'eutypiose. Ils ne sont pas isolés dans les plants à la sortie de la pépinière.

Cette étude met en évidence la présence de champignons au niveau de la soudure et des plaies de la base du plant. Ces niveaux sont suspectés d'être des voies de contamination.

Les étapes au cours desquelles ont eu lieu les contaminations ont été en partie identifiées. Il s'agirait de la réhydratation et/ou de la stratification pour les *Botryosphaeria*. Les bains de fin de stratification constituent des étapes au cours desquelles auraient lieu des pollutions du matériel végétal par *Pch*.

Il est aujourd'hui nécessaire de poursuivre ces études, notamment :

- d'identifier plus précisément les étapes au cours desquelles peuvent avoir lieu les contaminations
- de rechercher la source d'inoculum à chacune des étapes par PCR, notamment pour *Pch* mais aussi pour *Pal* et pour les *Botryosphaeria*
- de trouver des méthodes de désinfection de la surface du matériel végétal arrivant en pépinière lors de la réhydratation des bois. Cette désinfection pourrait aussi cibler les deux zones « à risque » que représentent la plaie d'éborgnage et la soudure.

Action réalisée avec le soutien financier de l'ONIVINS Midi-Pyrénées et de la Région Midi-Pyrénées

- FOURIE P.H., HALLEEN F., 2002. **Investigation of occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines.** *Australasian Plant Pathology*, 31, 425-426
- FOURIE P.H., HALLEEN F., 2004. **Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plant in South Africa.** *Australasian Plant Pathology*, 33, 313-315
- GROENEWALD M., BELLSTEDT D.U. et CROUS P.W., 2000. **A PCR-based method for the detection of *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevines.** *South African Journal of Science*, 96, 43-46.
- HALLEEN F., CROUS P.W. et PETRINI O., 2004. **Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines.** *Australian Plant Pathology*, 32, 47-52
- LARIGNON P., 2004. **Réflexions sur l'esca.** *Phytoma*, 576, 28-31.
- LARIGNON P., 2005. **Maladies du bois : aspects pépinières et protection des plaie de tailles.** *Progrès Agricole et Viticole*, Vol 122 10, 229-233
- LARIGNON P. BERUD F., DUBOS B., et GIRARDON K. 2005. **Les maladies du bois de la vigne : quelques éléments sur le cycle biologique des champignons qui y sont associés en pépinières.** *Phytoma* (soumis)
- LARIGNON P. et DUBOS B., 2001. **Le Black Dead Arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca.** *Phytoma*, 538, 26-29
- LARIGNON P., DUPONT J. et DUBOS B., 2000. **L'esca de la vigne : quelques éléments sur la biologie de deux des agents associés, *Phaeoacremonium aleophilum* et de *Phaeomoniella chlamydospora*,** *Phytoma*, 527, 30-35
- LARIGNON P., PULCHIC R., CERE L., et DUBOS B., 2001. **Observation of Black Dead Arm in french vineyards.** *Phytopathologia Mediterranea*, 40, S336-S342
- LEHOCZKY J. 1974. **Necrosis of nurseried grapevine grafts of *Botryosphaeria stevensii* infection.** *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum hungaricae*, 9, 329-331
- RETIEL E., DAMM U., Mc LEODA et FOURIE P.H., 2005. **Petri disease : potential inoculum sources in South African grapevine nurseries.** *4th International Workshop on grapevine Trunk Diseases*. 20-21 janvier 2005, Stellenbosch, Afrique du Sud.
- RIDGWAY H.J., SLEIGHT B.E. et STEWART A., 2002. **Molecular evidence for the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR.** *Australasian Plant Pathology*. 31, 267-271.
- TEGLI S., BERTELLI E. et SURICO G. 2000. **Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue.** *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 134-149.