

➤ Sélection de solutions pour lutter contre les maladies du bois : premiers résultats sur les effets des produits

Résumé

Dans le contexte des maladies du bois de la vigne (MBV), et plus spécifiquement des dépérissements aux Botryosphaeriacées, différentes solutions (AD) ont été testées, seules ou en combinaison, afin d'évaluer leur potentiel en terme de protection préventive. Les neuf solutions candidates étaient des champignons (AD1, solution de référence Esquive® WP à base d'un champignon *Trichoderma*, solutions AD2, AD9), bactéries (AD3, AD5, AD6), dérivé de levure (AD4) ou des substances chimiques (AD7, AD8). Dans un premier temps, des tests *in vitro* ont été réalisés pour évaluer le potentiel antagoniste ou biocide des solutions. Puis, *in planta* et en conditions contrôlées, des boutures de Cabernet-Sauvignon âgées de 2 mois ont été traitées dans un premier temps individuellement par les solutions puis ensuite artificiellement infectées par *Diplodia seriata* ou *Neofusicoccum parvum*, puis, dans un second temps, par une combinaison 2 à 2 des solutions. La solution AD1 a été appliquée au niveau d'une blessure couplée à une application foliaire des solutions présentant les meilleurs résultats de protection d'après les essais des solutions seules (AD3, AD4, AD5, AD7 et AD9). Les mêmes essais ont été conduits au vignoble sur des ceps de Mourvèdre et Cabernet Franc. Enfin, les mêmes combinaisons de solutions ont été testées au vignoble sur des plaies de taille, en conditions artificielles d'infection par *Eutypa lata* et *Phaeoaniella chlamydospora*. En conclusion de ces différentes expériences, les deux combinaisons de solutions qui ont donné des résultats prometteurs sont AD1-AD4 et AD1-AD5. En continuité de ce travail, des essais ont été réalisés en conditions de production en pépinière et au vignoble sur 10 parcelles.

Introduction

Les Maladies du Bois de la Vigne (MBV) représentent aujourd'hui une problématique majeure pour la filière

viticole et regroupent principalement trois maladies : l'Esca, les dépérissements à Botryosphaeria (BDA) et l'Eutypiose. Ces maladies sont particulièrement complexes car de nombreux agents pathogènes en sont la cause, ils colonisent puis dégradent le bois des ceps qui est difficilement atteignable par les solutions de protection. Aujourd'hui, aucun moyen de protection efficace à 100% n'est disponible suite à l'interdiction en 2001 de l'arsénite de sodium. Depuis, l'épidémie des MBV progresse avec une incidence moyenne qui varie de 3 à 20% sur les pieds de vigne selon les régions françaises. Ces maladies engendrent des pertes économiques conséquentes pour la filière viticole régionale. FranceAgriMer avait permis de montrer qu'au-delà de la mise en évidence de l'effet millésime bien connu sur les rendements moyens de l'année, les bas rendements constatés sur une production moyenne régionale -point de départ de ce projet- se traduisent en réalité sur le terrain par de fortes disparités entre parcelles. Dans le contexte évolutif des MBV, et de déficit en moyens de lutte, le projet ADVANTAGE (2015-2019) avait pour objectif d'établir une stratégie de protection combinatoire, avec l'étude d'associations de solutions conventionnelles et de solutions de biocontrôle, tout au long de la chaîne de production d'un pied de vigne depuis la pépinière jusqu'au vignoble. Ainsi, 9 solutions candidates ont été testées avec une certaine diversité vis-à-vis de leur type et donc probablement de leur efficacité. Ces 9 solutions étaient soit des champignons (AD1, AD2, AD9), soit des bactéries (AD3, AD5, AD6), soit des dérivés de levure (AD4) ou soit des substances chimiques (AD7, AD8). Parmi les 9 solutions candidates, AD1 a été utilisée comme référence dans le projet, car elle correspond au produit Esquive® WP commercialisé par Agrauxine pour lutter contre les MBV ; ainsi les combinaisons testées comprenaient systématiquement AD1 dans un objectif d'optimiser son efficacité.

**Botryosphaeriacées
Biocontrôle
Protection
Plaie de taille
Solutions**

Florence Fontaine¹, Cindy Coppin¹, Patricia Letousey², Mickaël Cadiou², Pascal Lecomte³, Philippe Larignon⁴, Christophe Clément¹, Patrice Dubournet⁵, Nicolas Hyzy⁵, Marion Sineux⁶, Olivier Zekri⁶

¹ SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Reims Champagne Ardenne, Unité Recherche EA 4707 RIBP
Tel : 03 26 91 33 18 / 06 33 92 64 75 ; Email : florence.fontaine@univ-reims.fr

² Agrauxine by Lesaffre

³ UMR Santé et Agroécologie du vignoble, INRA Bordeaux Sciences Agro

⁴ Institut Français de la Vigne et du Vin

⁵ Bayer SAS

⁶ Mercier Frères SARL

La première étape dans ce projet ADVANTAGE a d'abord été de faire un état des lieux des méthodes d'évaluation de l'efficacité des solutions en conditions contrôlées et des critères associés, et de proposer des protocoles harmonisés pour ces méthodes. Ensuite, les premiers essais réalisés ont consisté à évaluer *in vitro* le potentiel antagoniste des solutions vis-à-vis des principaux champignons impliqués dans les MBV, *Eutypa lata*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Phaeoacremonium minimum* et *Phaeomoniella chlamydospora*. Pour cela, des tests de confrontations *in vitro* ont été réalisés. Puis, les 9 solutions ont été testées individuellement et, après une sélection des meilleures solutions, en combinaison par 2 incluant toujours AD1 *in planta* et en conditions contrôlées (en serre). La méthodologie a été initialement une application racinaire ou foliaire selon les solutions puis uniquement foliaire sauf pour AD1, une application à l'aide d'un pinceau sur la tige herbacée a été retenue, la finalité étant de cibler les contaminations annuelles dues aux Botryosphaeriacées. En parallèle, les mêmes combinaisons ont été évaluées au vignoble avec inoculation artificielle, d'une part en utilisant une méthodologie proche de celle utilisée en conditions contrôlées et d'autre part par une application au niveau des plaies de taille pour évaluer le potentiel des solutions à protéger les plaies des futures contaminations. Suite à ces différents essais, deux combinaisons de solutions, AD1-AD4 et AD1-AD5, ont été retenues pour des essais en pépinière et au vignoble en conditions de production.

Quel est le potentiel antagoniste ou biocide des solutions candidates vis-à-vis de 5 pathogènes impliqués dans les MBV ?

L'objectif de cette action est d'évaluer *in vitro* le potentiel antagoniste des solutions candidates vis-à-vis de 5 agents fongiques pathogènes impliqués dans les MBV. Pour les solutions biologiques (AD1, 2, 3, 5, 6, 9), des tests de confrontations ont été réalisés en boîtes de Petri ; pour les solutions chimiques (AD7 et 8), ce sont des tests biocides qui ont été réalisés en boîtes de Petri. Au vu des pourcentages d'inhibition de la croissance des pathogènes obtenus (Tableau 1 et Figure 1), les solutions les plus prometteuses sont AD1, AD3, AD5, AD7, AD8 et AD9.

		AD1	AD2	AD9
Ds	12°C	59	15	15
	25°C	56	6	14
Np	12°C	67	46	50
	25°C	73	13	20
El	12°C	44	5	8
	25°C	44	0	0
Pal	12°C	25	0	0
	25°C	79	25	40
Pch	12°C	75	16	19
	25°C	68	28	35

	AD7	AD8
Ds	56	47
Np	64	15
El	88	49
Pal	28	6
Pch	100	81

	AD3	AD5	AD6
Ds	33	30	22
Np	14	7	0
El	36	37	3
Pal	18	43	9
Pch	40	25	9

Tableau 1. Pourcentages d'inhibition de croissance des différents pathogènes étudiés, obtenus en tests de confrontation ou biocides avec les solutions. Ds = *Diplodia seriata*, Np = *Neofusicoccum parvum*, El = *Eutypa lata*, Pal = *Phaeoacremonium minimum* et Pch = *Phaeomoniella chlamydospora*.

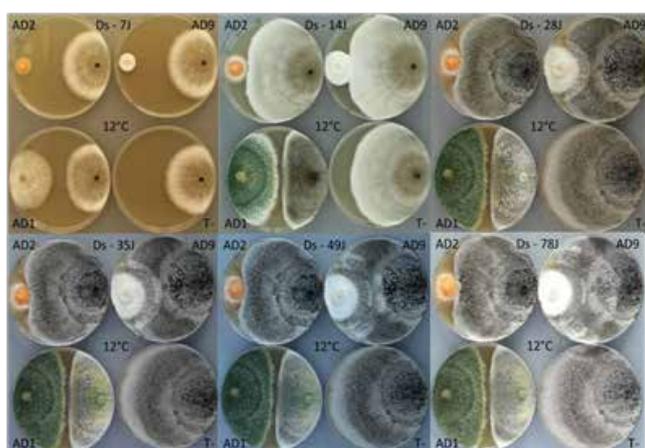


Figure 1. Exemples de tests de confrontation directe des trois solutions candidates fongiques avec *Diplodia seriata* (12°C) après 7, 14, 28, 35, 49 et 78 jours d'incubation. La modalité pathogène seule est toujours située en bas à droite (T-).

Parmi les solutions, lesquelles sont efficaces *in planta* sous serre pour protéger la vigne contre 2 champignons impliqués dans le dépérissement aux Botryosphaeriacées ?

Au démarrage du projet, nous avons évalué séparément l'effet de solutions en tant que protecteur préventif lors d'une infection par *Diplodia seriata* ou *Neofusicoccum parvum*, 2 agents pathogènes impliqués dans le dépérissement aux Botryosphaeriacées. Ces expérimentations ont été réalisées à l'aide de boutures de Cabernet-Sauvignon, décrit comme sensible aux maladies du bois, qui ont été traitées par applications foliaire ou racinaire selon les solutions puis infectées artificiellement par un agent pathogène. L'efficacité de la solution candidate a été évaluée en termes de taille des nécroses induites par l'agent pathogène, le ré-isolément du pathogène au niveau de la zone d'infection, le ré-isolément des solutions candidates vivantes (bactéries, champignons) ainsi que des réponses de la vigne par le suivi de l'expression de gènes de défense (PR protéines, voie des phénylpropanoïdes, détoxication) au niveau des feuilles 4 et 7 jours après l'infection et au niveau des tiges herbacées 7 jours après l'infection. Parmi les solutions, la solution AD9 (champignon) a montré des résultats très encourageants en termes de réduction de la taille des chancres externes par rapport aux boutures infectées par *Neofusicoccum parvum* (Figure 2) et de colonisation de la plante. Au niveau des réponses de défense de la plante, les solutions testées les induisent majoritairement sauf pour la solution AD4 (dérivé de levure) pour laquelle une inhibition a été observée. Dans nos conditions d'expérimentations, peu de différences sont à noter selon le pathogène considéré. Au final, les solutions AD3, AD4, AD5, AD7 et AD9 ont été retenues pour évaluer leurs effets en combinaison avec AD1 dans le but d'obtenir une meilleure efficacité par rapport à une application AD1 seul.

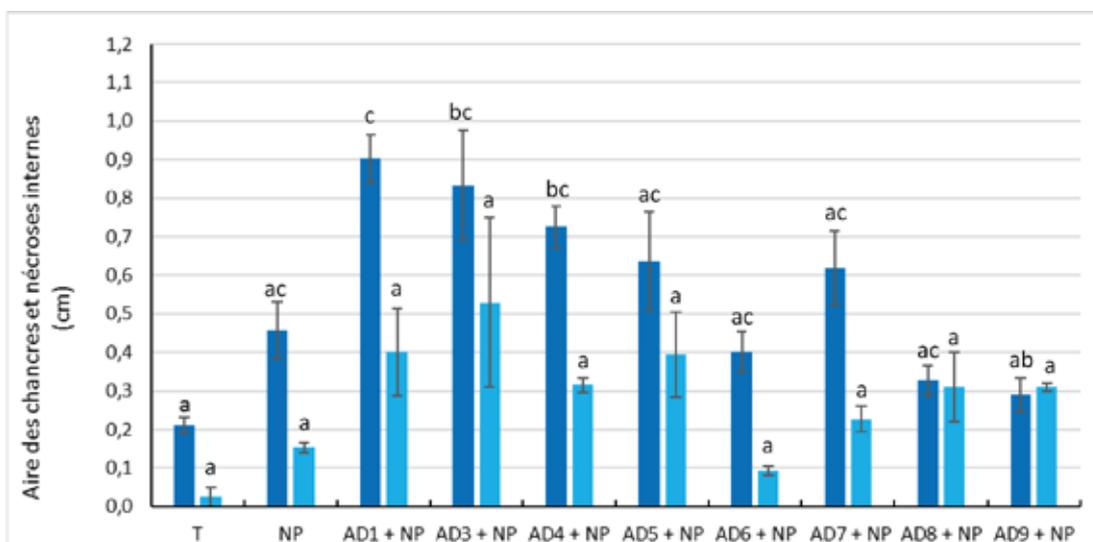


Figure 2. Aires des chancres externes (bleu foncé) et des nécroses internes (bleu clair) induites par *Neofusicoccum parvum* (NP) sur des boutures de *V. vinifera* cv Cabernet Sauvignon 2 mois post-inoculation selon les solutions testées individuellement (application racinaire).

Quelles sont les combinaisons de solutions qui ont donné des résultats intéressants sous serre ?

Pour la suite des expérimentations, la solution AD1 a été appliquée au pinceau au niveau de la tige herbacée de la bouture qui sera par la suite infectée par le pathogène. Les autres solutions retenues ont été appliquées au niveau des feuilles par pulvérisation 8 jours après l'application d'AD1 à l'exception de la solution AD9 qui a été appliquée en co-inoculation avec AD1. L'effet de ces traitements appliqués de façon préventive a été évalué selon les mêmes critères que précédemment. Les principaux résultats sont : une meilleure efficacité de la combinaison AD1-AD3 avec une forte réduction des nécroses induite par *N. parvum* probablement en lien avec sa faible croissance et une forte induction des réponses étudiées chez la vigne (Tableau 2, Figure 3). Les autres combinaisons réduisent également de manière significative la taille des nécroses comparativement à une application d'AD1 seul (AD1-5 > AD1-4 > AD1-7 > AD1-9 > AD1 seul) avec des réponses de défense majoritairement réprimées. Un point important à souligner est que AD1 est nettement moins ré-isolé dans toutes les combinaisons sauf pour AD1-AD4. Le temps d'application entre AD1 et les autres solutions, 8 jours, n'a peut-être pas été suffisant pour permettre un bon développement et une bonne installation d'AD1. A l'issue de ces résultats, il a été décidé de s'intéresser plus spécifiquement aux combinaisons AD1-AD4 et AD1-AD5. Aucune différence significative entre les différentes fréquences d'applications des solutions AD4 et AD5.

Il a ainsi été proposé de tester une application d'AD1 suivi d'une, deux ou trois applications d'AD4 ou AD5 réalisées à une semaine d'intervalle, comme cela a été testé au vignoble. En conditions contrôlées, ces essais ont confirmé le potentiel protecteur des 2 combinaisons AD1-AD4 et AD1-AD5 par une réduction significative de la taille des nécroses et un faible ré-isolement du pathogène inoculé. Les solutions AD1 (champignon) et AD5 (bactérie) ont été ré-isolées en fin d'expérimentation, soit 2 mois après leur application. Toutefois, nous n'avons observé aucune différence significative entre les différentes fréquences d'applications des solutions AD4 et AD5.

Modalités	Pourcentage réduction longueur nécroses internes	Pourcentage réduction aires nécroses internes
AD1	35%	51%
AD1-AD3	50%	76%
AD1-AD4	46%	66%
AD1-AD5	46%	69%
AD1-AD7	42%	58%
AD1-AD9	28%	45%

Tableau 2. Pourcentage de réduction des longueurs et aires des nécroses internes induites par *Neofusicoccum parvum* sur des boutures de *V. vinifera* cv Cabernet Sauvignon 2 mois post-inoculation selon les combinaisons de solutions testées.

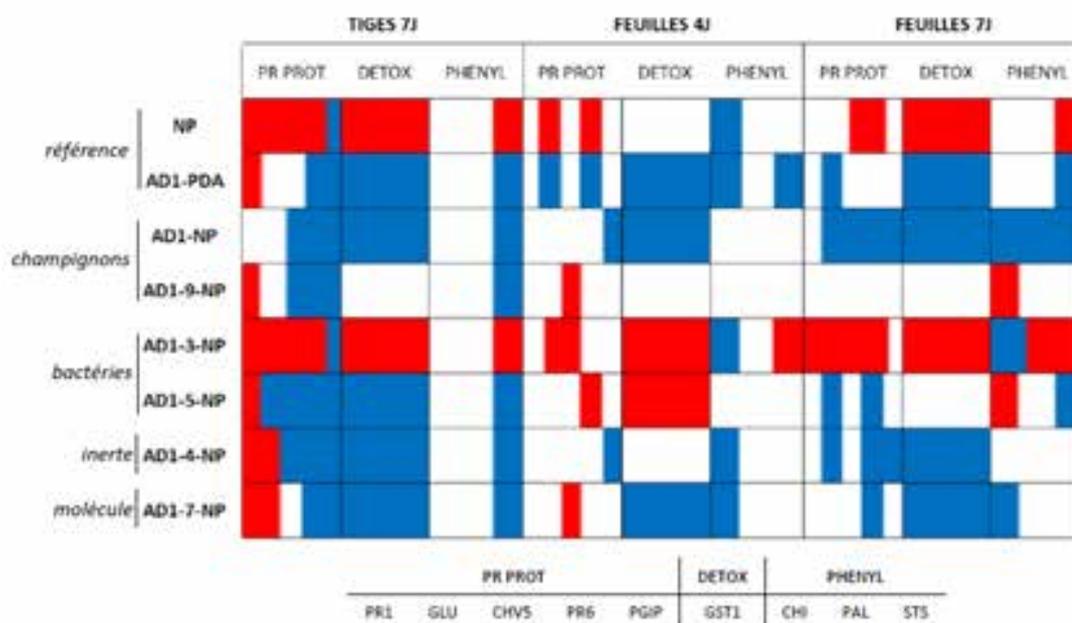


Figure 3. Récapitulatif des profils d'expressions obtenus pour les différentes modalités inoculées avec *Neofusicoccum parvum* (NP) au niveau des feuilles et des tiges herbacées sur des boutures de *V. vinifera* cv Cabernet-Sauvignon. PR PROT : PR protéines, DETOX : détoxification, PHENYL : phénylpropanoïdes, j : jours ; code couleur : bleu = inhibition, rouge = induction, blanc = pas de changement.

Quel est le potentiel de protection des solutions au vignoble en lien avec une contamination annuelle des Botryosphaeriaceae ?

Les solutions ont été évaluées en association ou non avec AD1 envers deux espèces de *Botryosphaeriaceae* (*Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*) dans le vignoble des Costières de Nîmes sur une parcelle de Mourvèdre (2016) et de Cabernet Franc (2017). Ces tests ont consisté à blesser un rameau au niveau du troisième mérithalle à l'aide d'une lame de scalpel, puis à appliquer sur cette blessure au moyen d'un pinceau la ou les solutions à tester, en fonction de l'année : test des solutions en solo en 2016, test des solutions en combinaison en 2017. En 2017, les solutions sélectionnées (voir ci-dessus question 2) ont en effet été testées en combinaison avec AD1. L'intervalle entre le traitement AD1 et le traitement avec AD3, AD4, AD5, AD7 ou AD9 a été d'une semaine. L'agent pathogène y a été apporté sous forme d'un implant mycélien le lendemain du 2ème traitement. La solution AD4, contrairement aux autres solutions, a été appliquée par pulvérisation sur le feuillage à deux reprises, environ une semaine après l'application d'AD1 et deux ou trois jours avant l'apport de l'agent pathogène. Tous ces essais ont été effectués autour du stade floraison sur huit ceps par agent pathogène.

Après quatre mois d'incubation, les rameaux ont été prélevés et coupés longitudinalement pour mesurer la longueur des nécroses provoquées par les deux agents pathogènes. Les résultats 2016 montrent que le développement de *Diplodia seriata* est inhibé suite au traitement avec les solutions AD2, AD5, AD6, AD7 et AD8 (Figure 4). En 2017, la combinaison AD1/autre solution n'a pas apporté d'amélioration sur l'efficacité d'AD1 envers les deux espèces de *Botryosphaeriaceae* (Figure 4 pour *Diplodia seriata*).

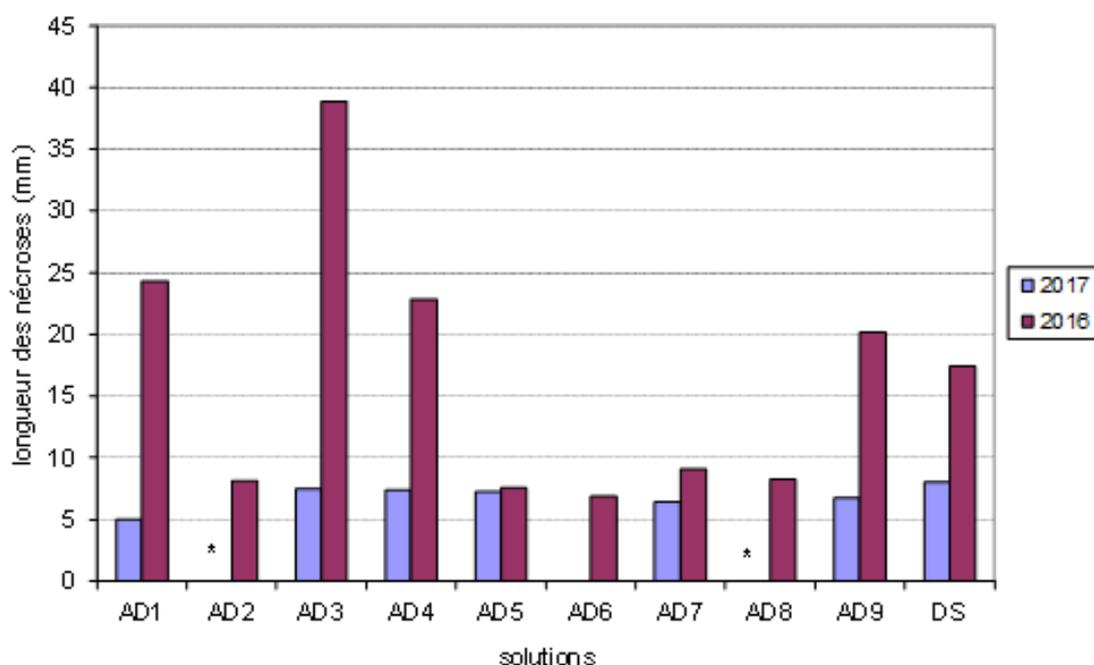


Figure 4. Effet des solutions en association (2017) ou non (2016) avec AD1 envers le développement de *Diplodia seriata* (DS) mesuré par la longueur des nécroses qu'il provoque. L'astérisque indique que ces tests n'ont pas été effectués en 2017. La modalité DS correspond au rameau inoculé par *Diplodia seriata* en absence de tout traitement.

Quel est le potentiel des solutions pour protéger les plaies de taille au vignoble ?

L'aptitude des solutions candidates à la protection des blessures de vigne a été évaluée pour partie par des tests réalisés au vignoble sur des plaies de taille, en conditions artificielles d'infection. La méthode suivie a été celle proposée par la Commission des Essais Biologiques (CEB, de l'Association 'Végéphyll' ex-AFPP), la méthode CEB n°155 « Eutyptiose » (révisée en 2006). Mis en place dans la région bordelaise deux années consécutives (2016 et 2017), le principe de ces tests a été le suivant : des sarments ont été taillés, traités préventivement avant d'être contaminés par le dépôt d'un inoculum préparé au laboratoire. Après 8 mois d'incubation, la présence des pathogènes inoculés a été vérifiée par ré-isolement au laboratoire dans les tissus sous-jacents (entre 0,5 à 4 cm) aux plaies de taille (au total 25 bûchettes de bois par sarment ont été examinées). Deux pathogènes parasites des blessures d'hiver ont été inoculés : *Eutypa lata* et *Phaeomoniella chlamydospora*. L'efficacité a été mesurée sur la base du nombre de sarments infectés sachant que l'isolement d'une colonie d'un champignon pathogène à partir d'une seule bûchette de bois suffit à déclarer le sarment infecté. En 2016, l'objectif était d'évaluer toutes les solutions candidates disponibles, soit 8 solutions. Leur efficacité était comprise entre 6 et 91% vis-à-vis d'*Eutypa lata* et entre 8 et 82 % vis-à-vis de *Phaeomoniella chlamydospora*. En 2017, l'objectif était de tester des combinaisons avec les meilleures solutions candidates, soit cinq combinaisons. Leur efficacité a varié de 25 à 75% vis-à-vis d'*Eutypa lata* et de 24 à 50 % vis-à-vis de *Phaeomoniella chlamydospora*. Les combinaisons les plus performantes ont été AD1-AD3 et AD1-AD4.

Conclusion

Ce qu'il faut retenir

Travail collaboratif entre différents partenaires/
complémentarité des compétences.

Homogénéisation des méthodologies.

Un travail progressif, allant de l'*in vitro* à l'*in planta*
en conditions contrôlées, pour terminer par des
applications au vignoble.

Le développement de stratégies de protection
combinant plusieurs solutions contre les MBV.

Au départ du projet 9 solutions, puis à l'arrivée 2
solutions sélectionnées pour être testées au vignoble
en combinaison avec Esquive® WP en conditions
de production.

Et après ?

Essais au champ sur 10 parcelles en 2018 et
2019 pour confirmer l'efficacité de protection contre
les MBV des 2 combinaisons de solutions
sélectionnées.

Si résultats positifs, deux nouveaux produits
phytosanitaires de biocontrôle pourraient être
disponibles sur le marché d'ici 3 à 5 ans pour
lutter contre les MBV en combinaison avec Esquive®
WP®.

Remerciements

Nous remercions tous les partenaires du projet ADVANTAGE (Agrauxine, Bayer, Bordeaux Sciences-Agro, Cybeletech, IFV, INRA-UMR SAVE, Mercier, Telespazio, URCA), les financeurs du projet (BPI France, le conseil régional des Pays de la Loire, le conseil régional Centre, le conseil régional de Nouvelle Aquitaine), ainsi que les pôles de compétitivité ayant co-labellisé le projet (Vegepolys Valley et Agri Sud-Ouest Innovation).

