

DGER/SDI/BIPI/CASDAR

Année et N° du projet : V905

Recherche et évaluation de procédés permettant la production de plants indemnes de champignons associés aux maladies du bois

2010-2012

COMPTE RENDU DU PROJET

Organisme chef de file : Chambre d'Agriculture de la Gironde

Nom et organisme du chef de projet : Laurent BERNOS

A - Note synthétique

Une note synthétique est fournie en annexe pour être facilement extraite et diffusable.
Une version électronique est également disponible sur les sites internet des partenaires.

B - Compte-rendu technique détaillé

Introduction

Des études menées en pépinière ont montré que certains champignons responsables des trois principales maladies fongiques de dépérissement de la vigne que sont l'eutypiose, l'esca et le Black Dead Arm sont présents lors des étapes de production des plants. Certaines ont pu être identifiées, comme la réhydratation, la stratification (pour *Phaeomoniella chlamydospora* et certains *Botryosphaeriaceae*) et l'élevage au champ (pour *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phomopsis viticola* et certains *Botryosphaeriaceae*). A ce jour, aucun moyen efficace de désinfection n'existe quelle que soit l'étape de production des plants. Seul le traitement à l'eau chaude utilisé pour la lutte contre la flavescence dorée montre une efficacité partielle sur certains de ces champignons.

Ce projet a pour objectif d'améliorer la qualité de l'état sanitaire de plants par l'étude et la mise au point de processus optimisés de production.

L'évaluation de l'intérêt de méthodes nouvelles de production du matériel végétal nécessite la mise en œuvre d'outils de détection et d'identification des champignons inféodés aux maladies du bois. En effet, les méthodes microbiologiques actuellement disponibles sont basées sur des techniques d'isolement et d'identification phénotypique classiques. Elles permettent de qualifier mais non de quantifier la présence des champignons dans les tissus internes du bois. Elles sont cependant lourdes à mettre en œuvre et inefficaces pour rechercher la présence des champignons à la surface des plants et dans leur environnement. Ainsi, parallèlement à la mise en place d'essais visant à améliorer le processus de production des plants, ce projet vise à mettre au point des outils moléculaires d'identification et de quantification des champignons inféodés aux maladies du bois plus souples et plus performants

Le projet est découpé en plusieurs actions :

- Action 1 : Développer de nouveaux outils de diagnostic des champignons pour le contrôle de la qualité des plants : adaptation de la PCR quantitative.
- Action 2 : Définir des processus de multiplication des plants permettant de garantir la production d'un matériel indemne de champignons associés aux maladies du bois en sortie de pépinière.
- Action 3 : Etudier en plein champ l'intérêt du traitement à l'eau chaude des plants au cours de leur production
- Action 4 : Diffuser à l'ensemble de la profession les acquis scientifiques et avancées techniques obtenus

1 – Action 1 : Développer de nouveaux outils de diagnostic des champignons pour le contrôle de la qualité des plants : adaptation de la PCR quantitative

1.1 – Rappel des objectifs attendus

Cette action a pour objectif la mise au point d'outils PCR fiables, rapides et d'un coût économique faible pour identifier les champignons responsables des maladies du bois. L'élaboration de techniques spécifiques de détection des champignons impliqués dans les maladies du bois, a pour objectif d'utiliser et d'optimiser les techniques de multiplex ainsi que l'approche de PCR quantitative pour développer une méthode fiable, rapide et très sensible de détection des champignons des maladies du bois durant les étapes de production des plants et à la sortie de la pépinière. Cette méthodologie pourra à terme servir d'outil de diagnostic pour valider la qualité des plants à la sortie de la pépinière.

1.2 – Méthodes de travail utilisées

La PCR qualitative est une méthode de biologie moléculaire qui a pour but d'amplifier par voie enzymatique l'ADN spécifique que l'on cherche à détecter dans un échantillon. Or, pour réussir à amplifier cet ADN, il faut qu'il soit dans des conditions de milieu spécifique et qu'il subisse un traitement thermique adéquat afin de provoquer la dénaturation, d'hybridation, puis d'extension de la molécule d'ADN.

La PCR quantitative en temps réel ou qPCR, repose sur une méthode très sensible et très spécifique de détection des acides nucléiques. Cette méthode a été inventée en 1985, c'est une technique désormais répandue et maîtrisée dans le secteur de la recherche. Cette pratique repose sur la détection et la quantification de la fluorescence dans un échantillon. Cette fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons spécifiques générés lors de la réaction en chaîne induite par les cycles de température. Contrairement à la PCR qualitative, la PCR quantitative est difficile à maîtriser : en effet, la précision de la quantification repose sur beaucoup de facteurs, et c'est autant de sources de variations possibles. Du fait de la sensibilité de la qPCR, une légère variation peut considérablement amplifier une réaction. La méthode est la même que pour la PCR qualitative. La différence repose sur le fait que la fluorescence des échantillons est mesurée en temps réel ce qui permet d'obtenir une courbe représentant l'évolution de cette fluorescence au cours du temps et donc au cours des différents cycles du thermocycleur, ce qui permet de quantifier l'ADN de départ présent dans notre échantillon. Les résultats obtenus en qPCR doivent être analysés à partir de leur Ct. Il s'agit du "cycle threshold", c'est-à-dire le cycle à partir duquel la fluorescence croise la valeur seuil et sort donc du "bruit de fond". La qPCR se faisant sur 40 cycles, plus le Ct est élevé (entre 30 et 35 cycles), plus la quantité d'ADN en présence dans le milieu est faible car il faut plus de cycles pour détecter l'amplification de la fluorescence. Inversement, plus le Ct est faible (entre 10 et 15 cycles), plus l'ADN est en grande quantité. Afin de contrôler la pertinence des résultats, on utilise un contrôle endogène, dans notre expérience il s'agit de la vigne. Généralement, les Ct du contrôle endogène sont plus faibles que ceux des autres gènes. Il permet de calculer le $\Delta Ct = Ct$ du gène - Ct du contrôle endogène. Ce calcul permet de se rendre compte de l'expression relative du gène (IRIC, site internet). Cette technologie permet donc d'extrapoler la quantité d'un pathogène donné au sein d'un échantillon en quantifiant de manière absolue le nombre de copie de son génome.

1.3 – Résultats intermédiaires obtenus pour le CR intermédiaire de Mars 2011

Les possibilités de multiplexage pour les amorces précédemment développées en vue de la Q-PCR ont été réalisées en PCR classique, d'abord sur ADN fongique unique, puis sur des mélanges d'ADN (combinaisons d'ADN fongique pur + ADN de vigne pur). Afin de déterminer avec certitude l'absence de formation de produits aspécifiques lors du multiplexage l'analyse des courbes de fusions en système SYBR Green a été réalisée pour chacune des réactions. Parallèlement, la PCR multiplex classique a été optimisée et adaptée à la détection à l'intérieur des plants.

L'objectif du projet est de permettre à terme un transfert de cette technique vers le matériel végétal et ainsi accompagner les partenaires de cette étude dans le développement de solutions pour la production de plants.

1.4 – Résultats obtenus lors du projet

Rappel des essais :

Définir des processus de multiplication des plants permettant de garantir la production d'un matériel indemne de champignons associés aux maladies du bois en sortie de pépinières :

- Amélioration d'étapes du processus de production des plants
- Recherche de nouveaux moyens de désinfection

Application des outils de diagnostic moléculaire aux essais des partenaires du Lot2 :

1.5 – Objectifs

Tester pour la première fois en parallèle sur des échantillons identiques la détection des champignons par microbiologie, PCR qualitative et QPCR. Etudier les résultats obtenus par les 3 méthodes pour comparaison de fiabilité de lecture.

+ Evaluer par ces 3 moyens l'efficacité des traitements effectués sur les plants lors de leurs process d'obtention par les partenaires du projet.

1.6 – Protocole de l'essai

L'IFV a analysé des plants issus de pépinières qui ont été traités à l'aide de différents désinfectants lors de la stratification :

- L'Oxysan : un désinfectant liquide à base d'acides peracétique et octanoïque. Il a été testé dans un premier temps à 1 % pendant une heure (modalité "Oxysan 1"), puis à 1 % pendant deux heures (modalité "Oxysan 2").
- Le Vibafon : un désinfectant, bactéricide, fongicide, virucide, agréé maladies légalement contagieuses. Il s'agit d'un produit puissant, rémanent et à très large spectre d'action. Il a été testé à 2 % pendant une heure. Suite à ces essais, l'IFV s'est rendu compte que ce produit réduisait fortement le taux de reprise au champ, par conséquent, il ne présentait pas un grand intérêt pour cet essai. Il n'a donc pas été testé en biologie moléculaire.
- Le Switch : un fongicide à base de fludioxonil et de cyprodinil, testé à 100 g/hl pendant une heure. Ce produit avait montré des résultats encourageants lors de précédents tests et a donc été reconduit pour cette expérience.

Les plants traités à l'aide de ces différents produits seront comparés avec des plants témoins issus de la même pépinière.

Les plants récoltés ont donc été découpés à différents niveaux afin de récupérer un fragment au niveau du greffon, de la soudure, du haut, du milieu et du bas du porte-greffe et enfin du talon. Cinq buchettes appartenant à un même niveau ont été implantées sur une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif composé d'agar, de malt de biscuiterie et d'un produit à base de brome afin de réduire la prolifération des *Trichoderma*, champignon invasif très présent dans le laboratoire. Les boîtes sont généralement lues un mois après implantation.

Cette expérience a été réalisée sur 100 échantillons par modalité et répétée trois fois. Il nous a été fourni 20 échantillons de chaque modalité à l'exception du Vibafon. Les plants utilisés sont Sauvignon/SO4.

Le bois résiduel nous a été remis afin de prélever une rondelle à chaque extrémité des différents fragments. Ces différents prélèvements ont été poolés par plant : 1 plant correspond à un échantillon.

1.7 – Résultats

1.7.1 - Présence/absence dans les plants des 4 champignons par les 3 outils de détection

Résultats obtenus par les outils de diagnostic moléculaire (EIP), en comparaison des résultats obtenus par microbiologie (IFV). Les croix signifient la présence du champignon testé pour chaque plant. Pour les mesures effectuées en microbiologie, la présence des champignons a été estimée pour chaque niveau précisément par l'IFV. Néanmoins, ici, il s'agit de valider si à l'échelle du plant entier, le champignon a été comptabilisé. Pour la PCR qualitative nous notons la présence ou l'absence du champignon. Pour la QPCR, si une quantité de champignons est détectée, il est ici noté comme présent par une croix. Nous avons travaillé à l'échelle "plant entier" afin de permettre la comparaison entre les 3 techniques.

Nom	Ref ITV	Ref EIP	Pch			Bob			Pal			Bpv		
			µbio	PCR	Qpcr									
Témoin	31	1	X	X	X	X	X						X	
Témoin	32	2	X	X	X	X	X						X	
Témoin	33	3		X	X								X	
Témoin	34	4		X	X	X	X	X					X	
Témoin	35	5		X	X	X	X	X					X	
Témoin	36	6		X	X								X	
Témoin	37	7	X	X	X			X					X	
Témoin	38	8	X	X	X		X	X					X	
Témoin	39	9	X	X	X	X	X	X						
Témoin	40	10		X	X								X	X
Témoin	41	11		X	X									
Témoin	42	12		X	X									
Témoin	43	13	X	X	X	X		X				X		
Témoin	44	14		X	X						X			
Témoin	45	15		X	X	X		X						X
Témoin	46	16	X	X	X			X						
Témoin	47	17	X	X	X	X		X			X			
Témoin	48	18	X	X	X		X	X					X	
Témoin	49	19		X	X			X						
Témoin	50	20		X	X	X		X						
Témoin	30	81		X	X			X						

Nom	Ref ITV	Ref EIP	Pch			Bob			Pal			Bpv		
			µbio	PCR	Qpcr									
Oxysan 1	1	21		X	X									
Oxysan 1	2	22		X	X	X	X	X		X	X			
Oxysan 1	3	23		X	X									
Oxysan 1	4	24		X	X	X	X	X		X	X			
Oxysan 1	5	25									X			
Oxysan 1	6	26					X							
Oxysan 1	7	27		X	X	X		X						
Oxysan 1	8	28												
Oxysan 1	9	29		éch.épu			éch.épu			éch.épu			éch.épu	
Oxysan 1	10	30	X			X	X	X						
Oxysan 1	11	31												
Oxysan 1	12	32		X	X	X								
Oxysan 1	13	33					X	X			X			
Oxysan 1	14	34		X	X						X			
Oxysan 1	15	35					X							
Oxysan 1	16	36				X		X						
Oxysan 1	17	37		X	X									
Oxysan 1	18	38												
Oxysan 1	19	39					X	X						
Oxysan 1	20	40					X							

Nom	Ref ITV	Ref EIP	Pch			Bob			Pal			Bpv		
			µbio	PCR	Qpcr									
Oxysan 2	1	41				X		X						
Oxysan 2	2	42		X	X	X	X							
Oxysan 2	3	43					X							X
Oxysan 2	4	44		X	X	X	X	X			X			X
Oxysan 2	5	45				X	X	X						
Oxysan 2	6	46				X	X	X						
Oxysan 2	7	47				X								X
Oxysan 2	8	48				X		X		X	X			
Oxysan 2	9	49				X	X	X			X			
Oxysan 2	10	50												X
Oxysan 2	11	51			X			X						
Oxysan 2	12	52		X	X							X		X
Oxysan 2	13	53												
Oxysan 2	14	54			X	X		X			X			
Oxysan 2	15	55				X					X			X
Oxysan 2	16	56						X			X			
Oxysan 2	17	57				X		X			X			
Oxysan 2	18	58				X		X			X			X
Oxysan 2	19	59						X						X
Oxysan 2	20	60												

Nom	Ref ITV	Ref EIP	Pch			Bob			Pal			Bpv		
			µbio	PCR	Qpcr									
Switch	1	61		X	X							X		
Switch	2	62												
Switch	3	63												
Switch	4	64				X		X						
Switch	5	65		X	X									
Switch	6	66				X						X		X
Switch	7	67			X							X		
Switch	8	68										X		
Switch	9	69								X				
Switch	10	70		X	X							X		
Switch	11	71		X	X									
Switch	12	72		X	X		X							
Switch	13	73												
Switch	14	74										X		
Switch	15	75			X									
Switch	16	76		X	X	X		X						
Switch	17	77		X	X						X			
Switch	18	78												
Switch	19	79		X	X							X	X	X
Switch	20	80												

Analyse de ces données, récapitulée dans le tableau ci-dessous :

	Pch	Bob	Pal	Bpv	
microbiologie	9 témoins	9 témoins	0 témoins	1 témoins	
	1 oxy1	6 oxy1	0 oxy1	0 oxy1	
	0 oxy2	12 oxy2	0 oxy2	1 oxy2	
	0 sw	3 sw	0 sw	6 sw	
	total 10	total 30	total 0	total 8	total 48
	Pch	Bob	Pal	Bpv	
PCR qualitative	21 témoins	7 témoins	0 témoins	10 témoins	
	8 oxy1	8 oxy1	2 oxy1	0 oxy1	
	3 oxy2	6 oxy2	1 oxy2	0 oxy2	
	8 sw	1 sw	0 sw	1 sw	
	total 40	total 22	total 3	total 11	total 76
	Pch	Bob	Pal	Bpv	
QPCR	21 témoins	13 témoins	2 témoins	2 témoins	
	8 oxy1	7 oxy1	5 oxy1	0 oxy1	
	5 oxy2	12 oxy2	8 oxy2	8 oxy2	
	10 sw	2 sw	2 sw	2 sw	
	total 44	total 34	total 17	total 12	total 107

Il semblerait une plus grande détection par la QPCR que par PCR qualitative, que par microbiologie. L'utilisation de l'outil QPCR permettrait de détecter davantage de champignons que par PCR qualitative, et que par microbiologie. Or, dans l'estimation de présence / absence effectuée précédemment, l'outil de quantification que représente la QPCR est sous-utilisé.

1.7.2 - Comparaison des résultats de présence /absence dans les plants des 4 champignons obtenus par les 3 outils de détection

Nous avons comptabilisé les résultats identiques obtenus par les 3 moyens de détection. Sont considérés comme identiques par comparaison, les présences, comme les absences similaires (= non détection).

Résultats en fréquences :

	identique microbiologie/ PCR	identique microbiologie / QPCR	identique PCR / QPCR	les 3 identiques
Pch	48	44	76	44
Bob	53	64	52	43
Pal	77	64	66	63
Bpv	63	57	60	55

Résultats en pourcentage par rapport au total d'échantillons (81 par champignon considéré individuellement pour l'ensemble des plants de l'essai) (au total, 324 pour l'ensemble des observations) :

	identique microbiologie/ PCR	identique microbiologie / QPCR	identique PCR / QPCR	les 3 identiques
Pch	60%	54%	94%	54%
Bob	65%	80%	64%	53%
Pal	95%	80%	81%	78%
Bpv	78%	70%	74%	68%
TOTAL	74%	71%	78%	63%

Afin de comprendre les écarts observés par ces comparaisons, nous avons recherché la possibilité d'établir des clés de lecture en tenant compte des possibilités de chacun des 3 outils. Les outils de biologie moléculaire détectant des champignons qui ne sont pas désignés en microbiologie. Et inversement, des observations de champignons en microbiologie non confirmées par une détection en PCR. Parfois, la QPCR va permettre de détecter des champignons observés en microbiologie, mais non en PCR qualitative, indiquant la présence de traces trop petites pour être appréciées par cette dernière. Par contre, de faibles quantités seront quantifiées en QPCR et permettront un développement sur milieu gélosé. Par ailleurs, étant donné la qualité de détection de l'outil de biologie moléculaire QPCR, les résultats obtenus par cette méthode peuvent servir de référence en terme de présence / absence.

1.7.3 - Résultats de quantification des 4 champignons dans les échantillons de l'essai par QPCR

Les données présentées pour la quantification des champignons sont obtenues par la moyenne de résultats obtenus à partir de 3 répétitions indépendantes. On qualifie de "traces", une quantité inférieure à 10 copies de champignons par échantillon, mais supérieure à 3 copies (= limite de détection de la QPCR) dans les 3 répétitions. Si pour une des 3 répétitions, on obtient moins de 3 copies, nous avons décidé de ne pas comptabiliser le résultat, et de considérer un artéfact. Pour plus de lisibilité, nous avons représenté les données sous forme d'échelle d'intensité sur 4 niveaux, également répartis entre 10 et 4967 copies (= bornes mini et maxi des nombres de copies quantifiés). Les données QPCR sont étudiées en parallèle des résultats de microbiologie obtenus par l'IFV. Cette fois-ci nous détaillons la fréquence d'observation des différents champignons et précisément à quel niveau d'observation du plant (G, greffon ; S, soudure ; PG1, porte-greffe niveau 1 ; PG2, porte-greffe niveau 2 ; PG3, porte-greffe niveau 3 ; PG4, porte-greffe niveau 4). Cette comparaison permettra de comprendre les écarts de lecture entre les 2 méthodes d'outils de diagnostic.

Echantillon	Résultats qPCR				Visibilité en µbio				Bps 1	Niveaux détectés				
	Pch	Bob	Pal	Bpv	Pch	Bob	Pal	Bpv		Pch	Bob	Pal	Bpv	
Témoin 1					1	4				PG 3	G	S	PG1	PG2
Témoin 2					1	2				G	S	PG1		
Témoin 3														
Témoin 4						1					PG3			
Témoin 5						6					Tous			
Témoin 6														
Témoin 7					1						PG3			
Témoin 8					1						PG3			
Témoin 9					1	3					PG3	S	PG1	PG2
Témoin 10					TRACES									
Témoin 11														
Témoin 12														
Témoin 13					1	1		1			S	PG1	PG3	
Témoin 14					TRACES									
Témoin 15						1					S			
Témoin 16					1						PG3			
Témoin 17					1	2					PG4	PG1	PG2	
Témoin 18					1						PG3			
Témoin 19														
Témoin 20						1					PG2			
Témoin 81					TRACES									

Oxy 121			
Oxy 122		4	G S PG1 PG2
Oxy 123			
Oxy 124		3	G S PG1
Oxy 125			
Oxy 126			
Oxy 127		2	S PG1
Oxy 128			
Oxy 129			
Oxy 130		1 1	PG3 S
Oxy 131			
Oxy 132		1	G
Oxy 133	TRACES 		
Oxy 134	 TRACES		
Oxy 135			
Oxy 136		1	PG2
Oxy 137			
Oxy 138			
Oxy 139	TRACES		
Oxy 140			

Oxy 2 41	TRACES	2
Oxy 2 42		1
Oxy 2 43	TRACES	
Oxy 2 44	TRACES TRACES	3
Oxy 2 45		2
Oxy 2 46	TRACES	1
Oxy 2 47	TRACES	1
Oxy 2 48	TRACES	1
Oxy 2 49	TRACES	2
Oxy 2 50	TRACES	
Oxy 2 51	TRACES	
Oxy 2 52		3
Oxy 2 53		
Oxy 2 54	TRACES	3
Oxy 2 55	TRACES	1
Oxy 2 56	TRACES TRACES	
Oxy 2 57	TRACES	1
Oxy 2 58	Traces TRACES	4
Oxy 2 59	TRACES TRACES	
Oxy 2 60		

G
S
PG1
G
S
PG1
S
PG2
G
G
G
G
S
PG1
G
PG2
PG3
G
S
PG1
G
G
G
S
PG1
PG2

Switch 61		1
Switch 62		
Switch 63		
Switch 64	TRACES	1
Switch 65		
Switch 66	TRACES	1
Switch 67	TRACES	
Switch 68		1
Switch 69	TRACES	
Switch 70		1
Switch 71		
Switch 72		
Switch 73		
Switch 74		1
Switch 75		
Switch 76		1
Switch 77	TRACES	
Switch 78		
Switch 79		3
Switch 80		

G
S
PG3
G
G
G
G
S
G
S
PG1

Les résultats obtenus en microbiologie, laissent entrevoir que cette méthode ne permet de détecter qu'un champignon par niveau étudié. En effet, les boîtes de pétri ont été faites puis observées un mois plus tard, durant ce laps de temps, on peut supposer que le champignon le plus virulent a pris le pas sur les autres. Pour ces raisons, nous avons étudié chaque cas de comparaison pour chaque plant, afin de comprendre les différences d'appréciation par les 2 méthodes. Des clés de lecture ont été établies par travail de collaboration avec l'IFV, et devraient permettre pour la suite de travaux futurs de tenir compte de ces observations pour l'interprétation des résultats.

1.7.4 - Clés de lecture pour l'appréciation des résultats obtenus par les 3 méthodes de détection des champignons

Un ensemble de situations ont été définies par étude comparative et discussion avec l'IFV ayant obtenu les résultats de microbiologie. EIP et IFV se sont basés sur la bibliographie et leurs connaissances pratiques relatives à la mise en œuvre des 3 méthodes de diagnostic étudiées. 6 situations, ou "clés de lecture", ont été relevées et permettant de décrire tous les cas de figures pour lesquels la lecture entre outils moléculaires et microbiologiques ne donne pas les mêmes informations à l'identique. Elles sont récapitulées dans le tableau ci-dessous :

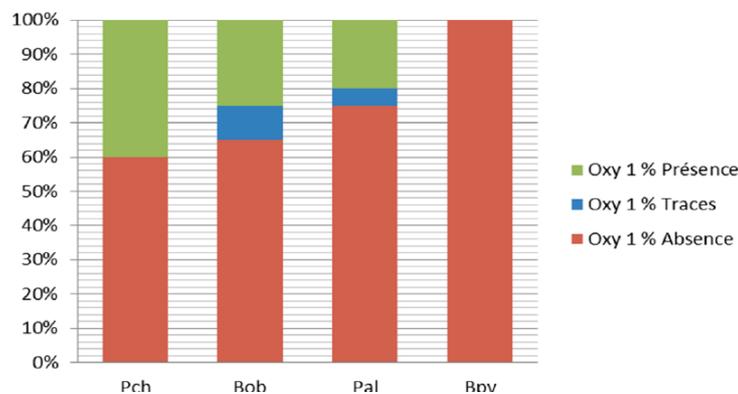
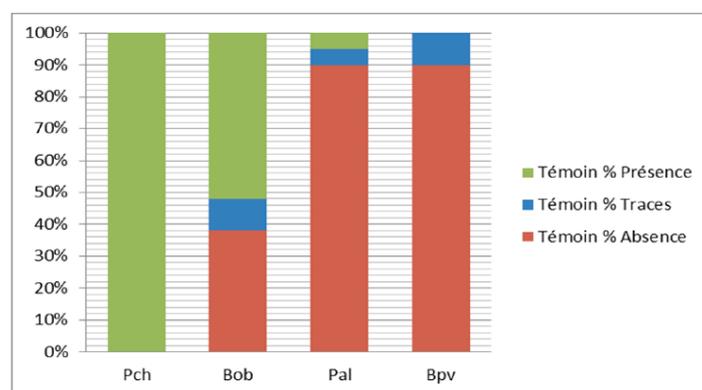
Echantillons pour lesquels rien n'a poussé en microbiologie alors que des champignons ont été détectés en <u>qPCR</u>
Echantillons dont la différence d'analyse s'explique par le fait que Pal est difficile à faire pousser sur boîte.
Echantillons dont la différence peut s'expliquer du fait que les deux <u>Botryosphaeria</u> peuvent être confondus sur boîte.
Echantillons dont la différence peut être expliquée par la prédominance de la virulence des <u>Botryosphaeria</u> .
Echantillons dont la différence d'analyse s'explique par plusieurs des raisons évoquées ci-dessus.
Non expliqués (ou pas totalement)

Parfois, nous avons détecté des champignons en PCR tandis que les boîtes de microbiologies n'ont rien révélé. Ceci peut avoir plusieurs explications : la présence de champignons non-recherchés dans les boîtes, de mauvaises conditions environnementales, ou un seuil de détection plus bas pour la PCR. De plus, le constat fait dans plusieurs publications montre la difficulté de faire pousser du Pal sur boîte de pétri, ce qui pourrait expliquer près de 7 % des différences d'analyse. Près de 5 % des différences peuvent être expliquées par la difficulté de différencier les deux champignons de la famille de *Botryosphaeria* (Bob et Bpv). Parallèlement, il est reconnu que cette famille de champignons est plus virulente que les deux autres observés (Pch et Pal), ce qui pourrait expliquer qu'en leur présence, on ne puisse pas détecter d'autres champignons susceptibles d'être présent sur le plant, et donc près de 15 % des différences entre les deux types d'analyse rien que pour cette raison. Cette explication est toute fois à relativiser du fait que généralement on retrouve Bob et Bpv en haut du plant tandis que Pch est plus présent en bas, il ne devrait donc pas y avoir de compétition entre les deux champignons. Près de 5 % des différences en général, sont expliquées par plusieurs des raisons évoquées ci-dessus. Il reste donc des cas qui ne sont pas expliqués par ces dernières précisions. Il s'agit de cas où l'on retrouve des *Botryosphaeria* en microbiologie mais pas en qPCR dans près de 8 % des cas. Il est dans ce cas possible de supposer une contamination des boîtes durant la pousse des champignons étant donné le temps d'incubation de plusieurs semaines dans un espace confiné. Le dernier cas restant est une non-détection en PCR de Pch en qPCR alors qu'il a

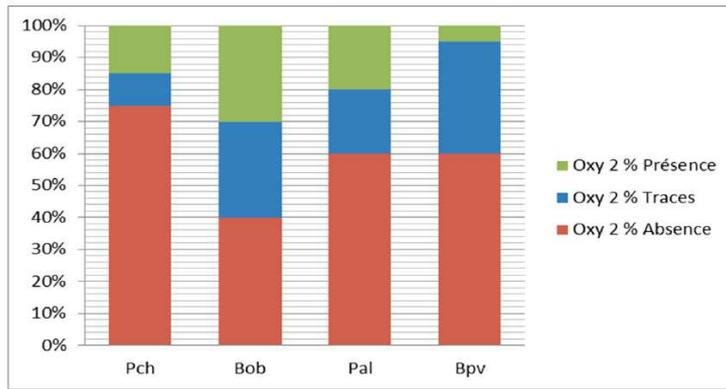
été détecté en microbiologie, il pourrait s'expliquer de la même manière que précédemment par contamination ou mauvaise appréciation de sa présence.

1.7.5 - Test de l'efficacité des moyens de décontamination mis en place par l'usage des outils de diagnostic moléculaire quantitatifs :

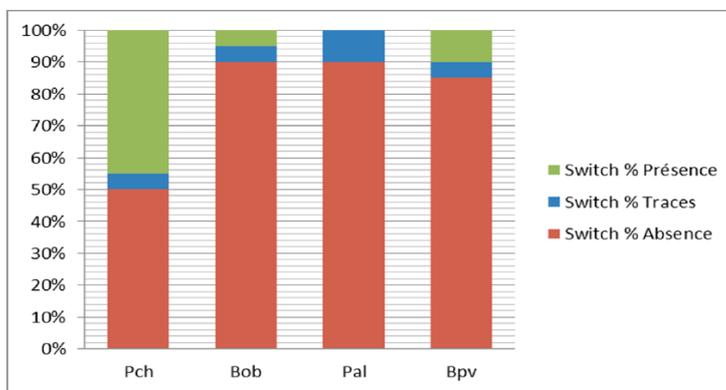
Les résultats obtenus par l'usage des outils de diagnostic moléculaire ont aussi permis d'établir l'efficacité des moyens de traitement mis en œuvre par les partenaires de l'étude. Pour chaque type d'échantillon : témoin, oxysan 1, oxysan 2 et switch, nous avons analysé 3 choses : la présence du champignon, sa présence à l'état de traces, ou son absence. Les résultats sont estimés en pourcentage. La situation des plants témoins, permet de pouvoir comparer les résultats obtenus par les moyens de décontamination.



Le traitement par l'oxysan 1 semble réduire la présence de Pch, Bob et de Bpv.



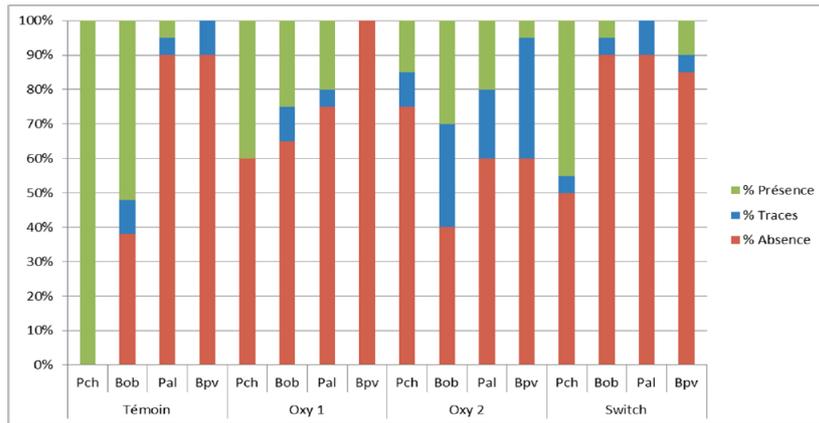
Le traitement par l'oxysan 2 semble réduire la présence de Pch et Bob.



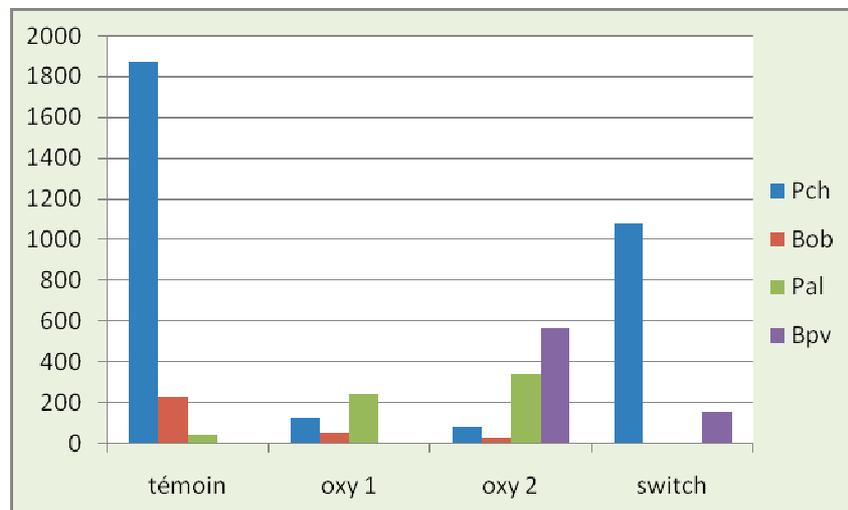
Le traitement par le switch semble réduire la présence de Pch, Bob et de Pal.

Les résultats sont aussi représentés pour l'ensemble des modalités afin d'illustrer les observations ci-dessus :

		Pch	Bob	Pal	Bpv
Témoïn	% Présence	100%	52%	5%	0%
	% Traces	0%	10%	5%	10%
	% Absence	0%	38%	90%	90%
Oxy 1	% Présence	40%	25%	20%	0%
	% Traces	0%	10%	5%	0%
	% Absence	60%	65%	75%	100%
Oxy 2	% Présence	15%	30%	20%	5%
	% Traces	10%	30%	20%	35%
	% Absence	75%	40%	60%	60%
Switch	% Présence	45%	5%	0%	10%
	% Traces	5%	5%	10%	5%
	% Absence	50%	90%	90%	85%



Les résultats sont représentés par nombre de copies totales par plants pour chaque modalité :



Le traitement par l'oxysan 1 semble réduire la présence de Pch, Bob et de Bpv. Le traitement par l'oxysan 2 semble réduire la présence de Pch et Bob. Le traitement par le switch semble réduire la présence de Pch, Bob et de Pal. Par conséquent, on peut retenir que le switch pourrait représenter une meilleure efficacité que les traitements par l'oxysan sur les 2 doses testées dans l'essai. Son spectre d'action est plus large. Cependant, aucun des 3 traitements ne présente d'efficacité satisfaisante par rapport au témoin afin de représenter un traitement unique. Néanmoins, chacun semble avoir ses spécificités d'action et peut représenter un intérêt d'usage sélectif ou en complémentarité.

1.8 – Bilan et perspectives

L'utilisation d'outils PCR fiables, rapides et d'un coût économique faible pour identifier les champignons responsables des maladies du bois au niveau de la pépinière viticole a été testée au cours de ce projet. On peut retenir que le diagnostic des champignons par les moyens de biologie moléculaire sont complémentaires et présentent des intérêts pertinents pour ce type d'étude. Le bilan des 3 méthodes peut être présenté dans ce tableau récapitulatif :

	Microbiologie	PCR qualitative	PCR quantitative
Rapidité	NON	OUI	OUI
Faux négatifs	OUI (compétition entre les différents champignons)	NON	NON
Faux positifs	OUI	NON	NON
Exhaustif	OUI	NON	NON
Identification	A postériori et complexe	Pré-requise	Pré-requise
Sensibilité	+/-	+	+++

De plus, ces outils de détection/diagnostic permettent de déterminer l'efficacité de moyens de décontamination ou de lutte, ce qui devrait être exploité pour la recherche de moyens de traitements et la compréhension des mécanismes d'action, tant des champignons, que des molécules.

2 –Action 2 : Définir des processus de multiplication des plants permettant de garantir la production d'un matériel indemne de champignons associés aux maladies du bois en sortie de pépinière

Pour espérer produire des plants indemnes de champignons associés aux maladies du bois, il est nécessaire de raisonner l'amélioration des processus de production dans leur ensemble, en tenant compte de tous les points sensibles identifiés lors des études précédemment menées. Ainsi, cette partie du projet vise à tester de nouvelles méthodes d'élaboration susceptibles, d'une part de diminuer la pression de l'inoculum à toutes les étapes de fabrication des plants, d'autre part de réduire les risques de pénétration et de développement des champignons dans les tissus internes des plants. Les voies d'amélioration des processus de fabrication des plants qui vont être explorées sont les suivantes :

- diminution de l'inoculum en entrée de pépinière (influence de l'origine des bois),
- possibilités d'assainissement des bois (produit fongicide, eau chaude),
- limitation des risques de pénétration (hygiène, méthodes de stratification) des champignons dans les tissus internes du bois,
- intérêt d'un autre processus de production des plants (greffage en vert).

2.1 – Objectifs attendus par chaque partenaire impliqué dans l'action 2

Les objectifs poursuivis par les différents partenaires au cours du programme sont rapportés dans le tableau 1.

Tableau 1 : objectifs poursuivis par chaque partenaire impliqué dans l'action 2

Sous action	Partenaire	Objectifs
Influence de l'âge des parcelles et de leur état sanitaire sur la qualité des plants	IFV RM CA 84 SPBPVV	<ul style="list-style-type: none"> • Caractériser des parcelles présentant différents niveaux de maladies • Caractériser la contamination microbiologique du matériel végétal (greffons et porte greffe) • Caractériser la contamination microbiologique des plants après greffage
Recherche de nouveaux moyens de désinfection des bois	BNIC IFV Sud ouest	<ul style="list-style-type: none"> • Répertorier les produits de désinfection • Sélectionner les matières actives à tester en conditions de production des plants • Tester les produits les plus pertinents dans les bains de réhydratation en pépinière
Amélioration d'étapes du processus d'élaboration des plants	BNIC	<ul style="list-style-type: none"> • Nouveaux substrats de stratification : évaluation de leur intérêt technique • Incidence de la nature des substrats sur la reprise et la contamination des plants
Greffage en vert	IFV RM	<ul style="list-style-type: none"> • Fabrication des plants et caractérisation de leur contamination

2.2 – Mise en place des essais : matériels et méthodes

Les rapports d'essai exhaustifs rédigés par chacun des partenaires et correspondant aux quatre sous-actions décrites dans le tableau 1 sont disponibles. Les protocoles mis en œuvre pour :

- l'évaluation des propriétés fongicides et fongistatiques des produits de désinfection à l'échelle du laboratoire,
 - l'évaluation des propriétés phytotoxiques des produits de désinfection,
 - les conditions de réalisation des plans d'expérience à l'échelle de la pépinière
 - l'analyse microbiologique des plants,
- y sont détaillés.

2.3 – Résultats

2.3.1 - Influence de l'âge des parcelles et de leur état sanitaire sur la qualité des plants

2.3.1.1 - Choix du matériel végétal

Un travail de prospection réalisé dans le Vaucluse et la région Sud-Ouest a permis de sélectionner dans chacune des régions, 3 parcelles de greffons (3 parcelles de Mourvèdre, 3 parcelles de Sauvignon) et 3 parcelles de porte-greffe (R110).

Ces parcelles sont caractérisées par différents niveaux de maladie : les critères de sélection sont le pourcentage de ceps présentant des symptômes foliaires et de ceps morts pour les vignes de greffons, et le pourcentage de mortalité pour les vignes-mères de porte-greffe (tableau 2).

Tableau 2 : choix des parcelles

<i>matériel</i>	<i>âge</i>	<i>% manquants</i>	<i>% symptômes</i>
Sauvignon	4	0	0
Sauvignon	19	5	7.5
Sauvignon	35	40	7.2
110R	8	6	
110R	11	9	
110R	16	29	

<i>matériel</i>	<i>âge</i>	<i>% manquants</i>	<i>% symptômes</i>
<i>Mourvèdre</i>	<i>8</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Mourvèdre</i>	<i>21</i>	<i>1.9</i>	<i>2.1</i>
<i>Mourvèdre</i>	<i>28</i>	<i>26</i>	<i>30</i>
<i>110R</i>	<i>8</i>	<i>3</i>	
<i>110R</i>	<i>13</i>	<i>12</i>	
<i>110R</i>	<i>28</i>	<i>26</i>	

Les résultats rapportés dans le tableau 1 indiquent une bonne corrélation entre l'âge des parcelles et l'état sanitaire lié aux maladies du bois.

2.3.1.2 - Influence de l'origine du matériel végétal sur l'état microbiologique des plants

2.3.1.2.1 - Analyses microbiologiques

Elles sont effectuées à six niveaux dans le plant : le greffon (G), le point de soudure (S), 1 cm au-dessous de la soudure (PG1), mi-porte-greffe (PG2), 1 cm au-dessus du talon (PG3) et le talon (PG4).

Elles sont réalisées également en surface. Les zones analysées sont : greffon - soudure (GeSe), 1 cm au-dessous de la soudure (PG1e), mi-porte-greffe (PG2e) et 1 cm au-dessus du talon (PG3e).

Pour chaque zone, dix morceaux de bois sont prélevés et mis sur milieu de culture (malt : 15 g/L, agar-agar : 20 g/L). Après un mois d'incubation, la présence des champignons est notée. Les champignons recherchés sont : *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Neofusicoccum parvum* (Np), *Diplodia seriata* (Ds), *Fusicoccum aesculi* (Fa), *Diplodia mutila* (Dm), autres *Botryosphaeriaceae*, *Phomopsis* spp. et *Ilyonectria liriodendri* (Il).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de greffons, de porte-greffe, de greffes boutures et de plants présentant tel ou tel champignon.

2.3.1.2.2 - Résultats : Mourvèdre /R110

Les analyses microbiologiques ont été réalisées tout au long du processus de fabrication des plants, dans les tissus internes du bois et au niveau des écorces.

Les espèces de *Phaeomoniella chlamydospora* et de *Phaeoacremonium aleophilum* n'ont pas été isolées au niveau du matériel végétal, ni dans les greffes-boutures. En revanche, ces deux espèces sont isolées après élevage au champ. Ce résultat peut s'expliquer par une contamination au champ ou bien par la difficulté d'isoler ces champignons à croissance lente au niveau du matériel végétal.

L'évolution des fréquences d'isolement des espèces *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum* et *Phomopsis* spp. au cours du processus de fabrication des plants est représentée sur les figures 1, 2 et 3.

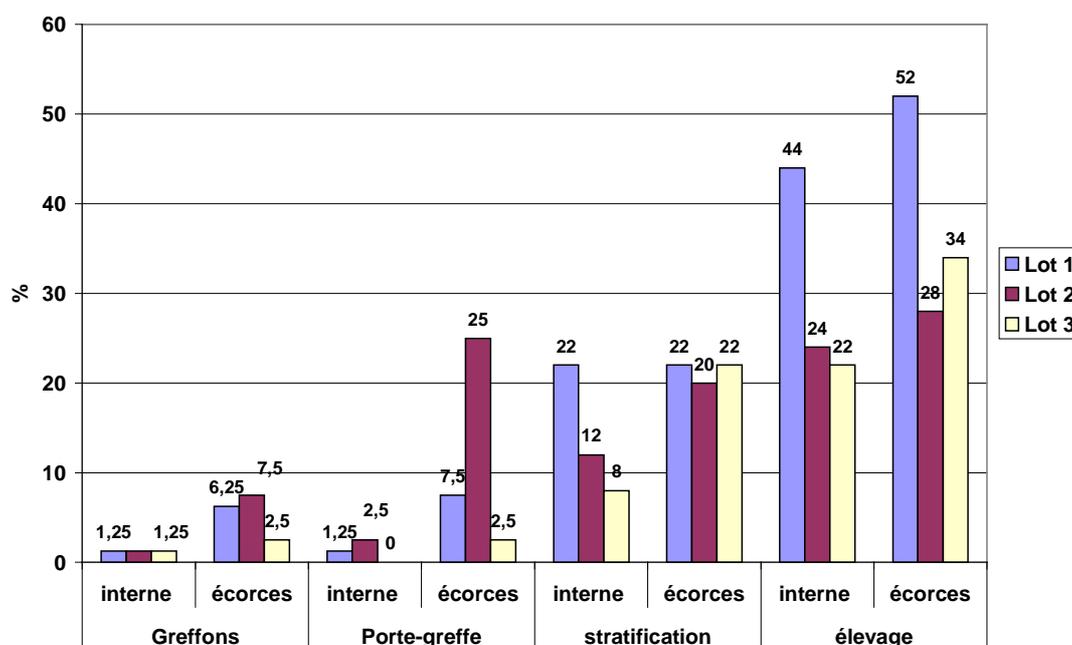


Figure 1 : Evolution de *D. seriata* dans les tissus ligneux internes et au niveau des écorces pour chaque lot analysé (lot 3 : parcelles les plus âgées, lot 2 : âge intermédiaire ; lot 1 : parcelles les plus jeunes)

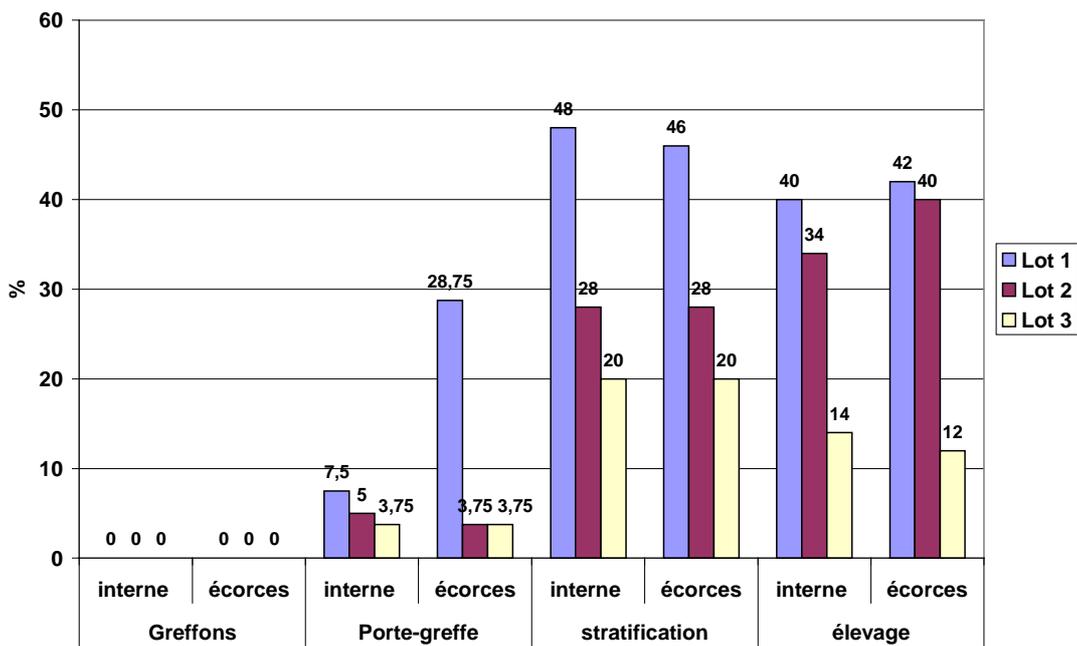


Figure 2 : Evolution de N. parvum dans les tissus ligneux internes et au niveau des écorces pour chaque lot analysé (lot 3 : parcelles les plus âgées, lot 2 : âge intermédiaire ; lot 1 : parcelles les plus jeunes)

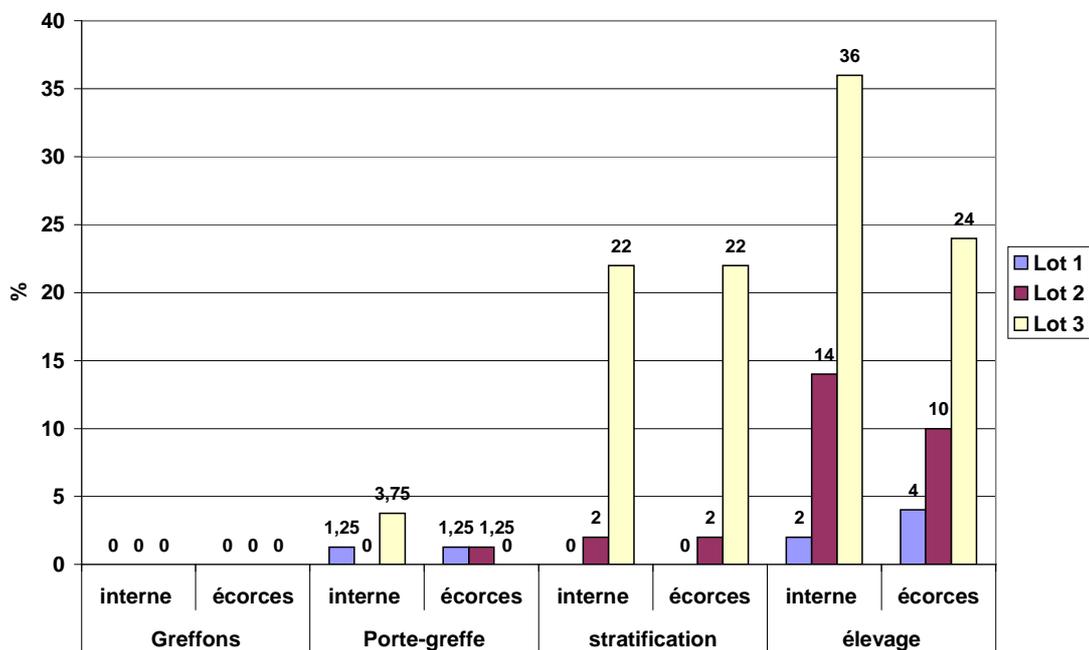


Figure 3 : Evolution de Phomopsis spp. dans les tissus ligneux internes et au niveau des écorces pour chaque lot analysé (lot 3 : parcelles les plus âgées, lot 2 : âge intermédiaire ; lot 1 : parcelles les plus jeunes)

Globalement, l'état sanitaire des parcelles de prélèvement des bois n'influence pas le niveau de contamination du matériel végétal.

On note une augmentation nette de la fréquence d'isolement des espèces de *Botryosphaeriaceae* après l'étape de stratification qui favorise à la fois le développement des champignons dans les écorces et leur pénétration dans les tissus internes du bois.

Cette augmentation est également observée dans le lot 3 pour les espèces de *Phomopsis* sp. mais limitée pour les lots 1 et 2.

2.3.1.2.3 - Sauvignon /R110

Pour chaque catégorie d'âge, 80 greffons et 80 porte-greffe ont été analysés. Pour les greffes boutures, le nombre d'éléments analysés dépend du taux de reprise : il varie de 60 à 106 greffés-soudés.

La figure 4 représente la fréquence de contamination des tissus internes du matériel végétal, selon l'origine des bois, par les espèces majoritairement isolées.

Dénomination des espèces majoritairement isolées dans les plants :

- *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch)
- *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal)
- *Diplodia seriata* (Ds)
- *Neofusicoccum parvum* (Np)
- *Fusicoccum aesculi* (Bd)
- Autres Botryosphaeriacées (Bsp). Il est très difficile d'analyser ce paramètre car il regroupe à la fois des espèces connues mais non pas identifiables lors de la lecture des boîtes et des espèces inconnues.
- *Phomopsis* sp (Pv)
- *Ilionectria liriodendri* (Cyl) (responsable du pied noir)
- Les *Pestalotiopsis* sp sont aussi recensés. 2 faciès sont observés : le blanc et le gris, chacun pouvant regrouper plusieurs espèces.

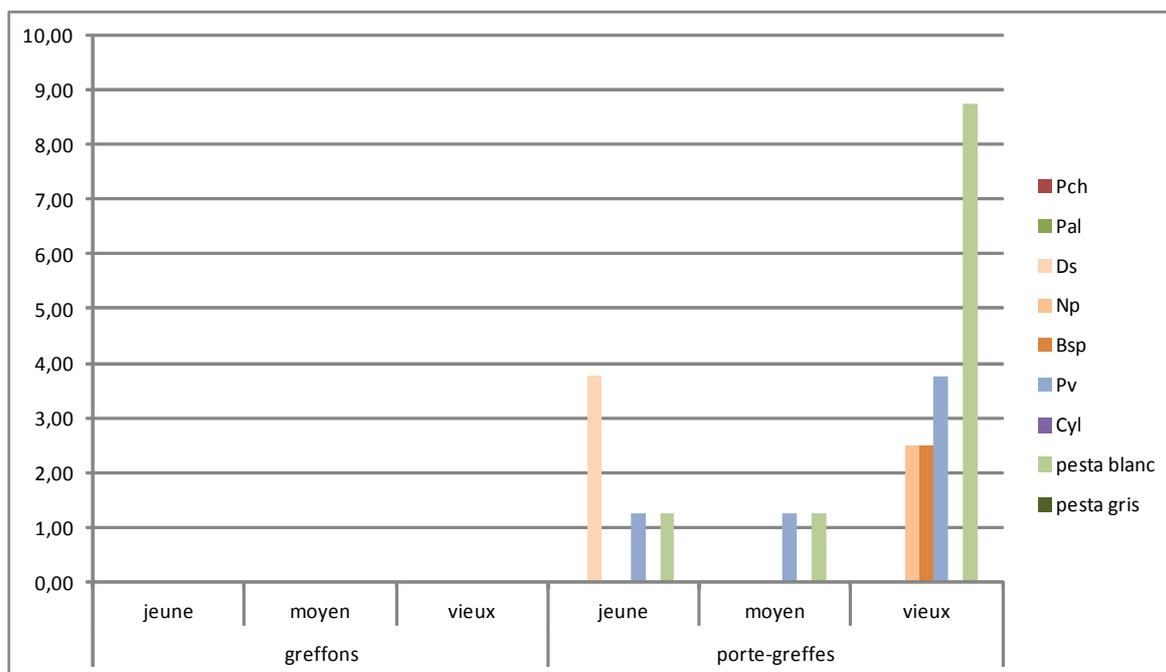


Figure 4 : % de contamination des greffons, porte-greffe et greffes bouture

Quel que soit l'âge des vignes-mère de greffons, il n'y a pas ou très peu de champignons associés aux maladies du bois à l'intérieur des greffons. Les porte-greffe semblent très légèrement plus contaminés. Néanmoins, ce taux reste faible et l'âge de la vigne-mère ne détermine pas le niveau de contamination.

La figure 5 compare le niveau de contamination des plants greffés-soudés en pots, selon l'origine des lots de greffons et porte-greffe.

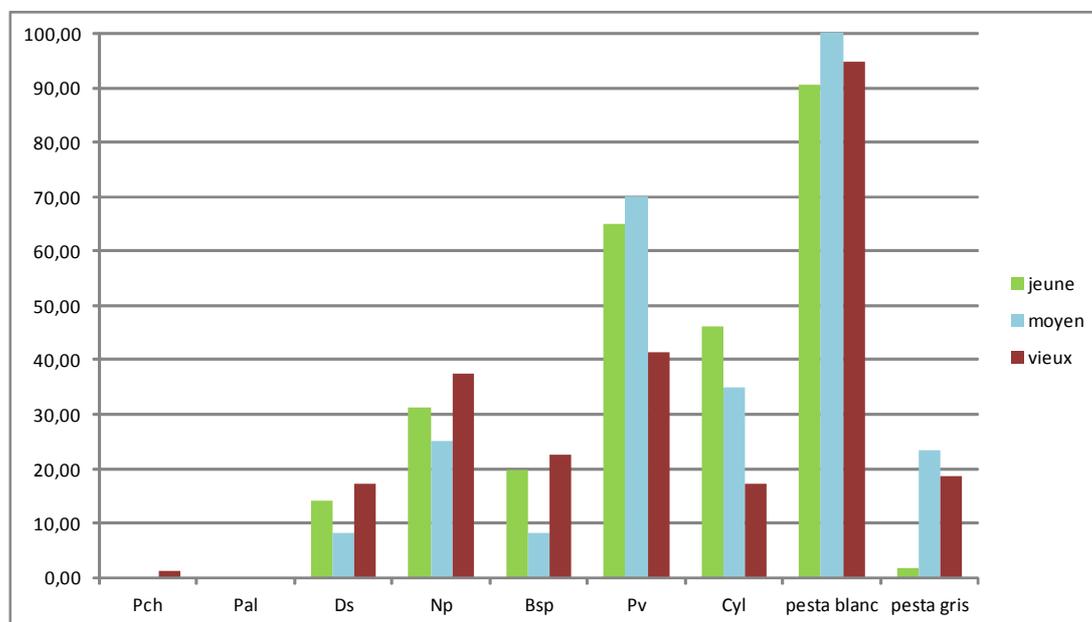


Figure 5 : zoom sur le niveau de contamination des greffes bouture

Les résultats obtenus sur Sauvignon/ R110 confirment les observations réalisées sur Mourvèdre R110 : dans ces essais, l'âge de la parcelle de vigne-mère et en conséquence, son état sanitaire ne détermine pas le niveau de contamination par les espèces de champignon associées aux maladies du bois, des greffons, porte-greffe et plants qui en sont issus.

2.3.2 - Amélioration d'étapes du processus d'élaboration des plants : 12 substrats de stratification sont comparés

Cette action est menée par le BNIC.

Douze substrats de stratification sont testés :

- 5 substrats organiques : tourbe, terreau de multiplication, écorce de pin, chips de coco, fibre de coco
- 3 substrats inertes : sable, perlite, vermiculite
- 2 substrats liquides : eau désinfectée, eau circulante
- 2 substrats de références (utilisés par les pépiniéristes) : l'eau et la sciure

2.3.2.1 - Viabilité des plants

Après 15 jours de stratification, les taux de débourrement sont de 100 % pour tous les substrats à l'exception de la fibre de coco (88 %), l'écorce de pin (66 %), et l'eau désinfectée (0 % - tous les plants sont morts). Les cals sont bien formés pour tous les substrats sauf l'eau désinfectée. Les racines sont bien développées dans toutes les caisses à la fin de la stratification sauf pour l'écorce de pin où elles sont moins développées.

Les plants sont décaissés à la fin de l'essai et mis en pot pour évaluer les variations du taux de reprise par substrat.

La figure 6 présente le taux moyen de reprise calculé pour chacun des substrats : elle semble indiquer un taux de reprise légèrement inférieur pour la perlite et l'écorce de pin. Cependant, l'analyse statistique des résultats ne montre pas de différence significative entre les 11 substrats.

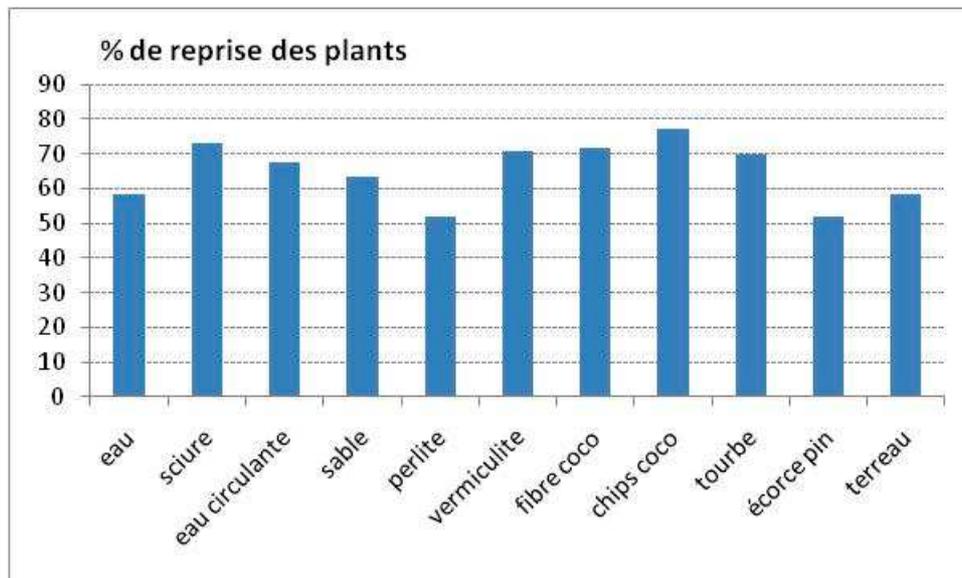


Figure 6 : effet des substrats de stratification sur le pourcentage de reprise des plants

2.3.2.2 - Influence de la nature du substrat de stratification sur la contamination microbologique des plants

Compte tenu de l'échec de stratification des plants, observé dans l'essai "produits de désinfection" mené par le BNIC, les analyses initialement prévues sur l'essai produit ont finalement été réalisées sur les plants issus de cet essai stratification. Il faut noter cependant que les effectifs de plants disponibles dans chacune des modalités de cet essai sont faibles. La présence de *P. chlamydospora* n'est pas détectée dans les plants analysés. Dans cet essai, tous les plants ont été traités à l'eau chaude ce qui peut expliquer l'absence de cette espèce.

Les espèces *Diplodia seriata* (Ds) et *Neofusicoccum parvum* (Np) ne sont pas distinguées lors de la lecture des boîtes : elles sont répertoriées sous le terme générique *Botryosphaeriaceae* (Bsp).

La nature du substrat de stratification n'a statistiquement pas d'effet sur le développement des *Botryosphaeriaceae* dans les plants.

2.3.3 - Recherche de nouveaux moyens de désinfection des bois

2.3.3.1 - Choix des produits

Les propriétés fongicides et fongistatiques de 10 produits de désinfection (représentant 10 matières actives répertoriées parmi les désinfectants utilisés en production végétale) ont été testées à l'échelle du laboratoire, par le BNIC et la société ECOLAB. Les tests microbiologiques ont été complétés (BNIC) par des tests de phytotoxicité réalisés sur boutures de greffon.

A l'issue de ces tests, 5 produits de désinfection représentant 5 matières actives ont été sélectionnés pour être testés à l'échelle de la pépinière. L'IFV a complété le dispositif

expérimental (voir tableau 3) par l'étude de l'anolyte (produit à base de chlore produit par électrolyse) et d'un produit phytosanitaire, le Switch, qui avait donné des résultats encourageants à l'issue de précédents essais.

Tableau 3 : produits de désinfection du matériel végétal testés à l'échelle de la pépinière

Produit	Matière active	Conditions de traitement des bois
○ Vibafon	○ <i>chlorure de didecyl /diméthylammonium/formaldéhyde</i>	Trempage 2 % 1 heure
○ Halamid	○ <i>Nsodiumnchloroparatoluenesulfonamide</i>	Trempage 1 % 1 heure
○ Oxysan	○ <i>acide acétique acide peracétique /peroxyde d'hydrogene</i>	Trempage 1 % 1 heure 1 % 2 heures
○ Menoflorades	○ <i>a. benzoïque</i>	Trempage 1 % 1 heure
○ Phénoseptyl	○ <i>orthophénylphénol</i>	Trempage 1 % 1 heure
○ Virkon	○ <i>a. sulfamique/monopersulfate de K, a.malique</i>	Trempage 1 % 1 heure
○ Switch	○ <i>fludioxonil/cyprodinil</i>	100 g/hl 1 heure
○ Anolyte	○ <i>chlore</i>	Trempage 12 h dans la solution d'anolyte à 50 %

2.3.3.2 - Synthèse des essais réalisés à l'échelle de la pépinière

Toutes les modalités mises en œuvre à l'échelle de la pépinière par l'IFV et le BNIC au cours des 3 années du programme sont rapportées dans le tableau 4.

Tableau 4 : modalités des essais de désinfection mises en œuvre à l'échelle de la pépinière

An	Partenaire	Modalité	Pdt désinfectant dans bain de réhydratation	TEC	Conditions
2010	IFV	Sciure	Non	Non	Expérimentales IFV
2010	IFV	Sciure	Vibafon 2 %	Non	Expérimentales IFV
2010	IFV	Sciure	Oxysan 1 % et 2 %	Non	Expérimentales IFV
2010	IFV	Sciure	Switch 100 g/hl	Non	Expérimentales IFV
2011	BNIC	Sciure	Non	Non	Expérimentales BNIC
2011	BNIC	Vermiculite	Non	Non	Expérimentales BNIC
2011	BNIC	Sciure	Non	Oui	Expérimentales BNIC
2011	BNIC	Sciure	Halamid 1 %	Non	Expérimentales BNIC
2011	BNIC	Sciure	Virkon 1 %	Non	Expérimentales BNIC
2011	BNIC	Vermiculite	Virkon 1 %	Oui	Expérimentales BNIC
2011	IFV	Sciure	Non	Non	Expérimentales IFV
2011	IFV	Sciure	Menoflorades 1 %	Non	Expérimentales IFV
2011	IFV	Sciure	Phenoseptyl 1 %	Non	Expérimentales IFV
2011	IFV	Sciure	Anolyte (50 % 12 h)	Non	Expérimentales IFV
2012	BNIC	Sciure	Non	Oui	Pépiniériste
2012	BNIC	Sciure	Non	Oui	Expérimentales BNIC
2012	BNIC	Sciure	Menoflorades 1 %	Oui	Expérimentales BNIC
2012	BNIC	Sciure	Switch 100 g/hl	Oui	Expérimentales BNIC
2012	BNIC	Eau + menoflorades 0,1 %	Non	Oui	Expérimentales BNIC

2.3.3.3 - Influence des traitements de désinfection sur le pourcentage de reprise des plants

200 plants sont mis en œuvre pour toutes les modalités de l'essai.

Le pourcentage de reprise après stratification est, pour chaque modalité, indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5 : pourcentage de reprise des plants

Part.	Modalité	Prdt désinfectant dans bain de réhydratation	TEC	% de reprise
IFV	Sciure	Non	Non	80
IFV	Sciure	Vibafon 2 %	Non	48
IFV	Sciure	Oxysan 1 h 1 %	Non	74
		Oxysan 2 h 1 %	Non	74
IFV	Sciure	Switch 100 g/hl	Non	73
BNIC	Sciure	Non	Non	29
BNIC	Vermiculite	Non	Non	40
BNIC	Sciure	Non	Oui	75
BNIC	Sciure	Halamid 1 %	Non	28
BNIC	Sciure	Virkon 1 %	Non	24
BNIC	Vermiculite	Virkon 1 %	Oui	34
IFV	Sciure	Non	Non	71
IFV	Sciure	Menoflorades 1 %	Non	62
IFV	Sciure	Phenoseptyl 1 %	Non	22
IFV	Sciure	Anolyte (50 % 12 h)	Non	64
BNIC	Sciure	Non	Oui	79
BNIC	Sciure	Non	Oui	85
BNIC	Sciure	Menoflorades 1 %	Oui	91
BNIC	Sciure	Switch 100 g/hl	Oui	77
BNIC	Eau + menoflorades 0,1 %	Non	Oui	80

La mise en œuvre de l'étape de stratification en conditions expérimentales (caisses de 200 plants) a généré, dans les locaux du BNIC, des problèmes de reprise des plants, y compris pour les modalités témoin. Ces problèmes de qualité de stratification n'ont pas été observés avec le matériel végétal préalablement traité à l'eau chaude (hydratation des bois probablement favorisée par le traitement à l'eau chaude).

Utilisés dans les bains de réhydratation en amont du greffage à la concentration de 1 %, le vibafon (matière active : chlorure de didecyl/diméthylammonium/formaldéhyde) et le phenoseptyl (matière active : orthophénylphénol), présentent un effet phytotoxique net.

2.3.3.4 - Influence des traitements de désinfection des bois sur la flore fongique des plants

2.3.3.4.1 - Définitions /codes

Zones:

- 1 : G : greffon
- 2 : S : soudure
- 3 : PG1 (1cm sous soudure)
- 4 : PG2 : milieu du PG
- 4.5 : PG3 : juste au-dessus du plateau racinaire
- 5 : PG4 : plateau racinaire

Dénomination des espèces de champignon répertoriées :

Bsp (BNIC): *Diplodia seriata* et *N. parvum* non distingués

Tri : *trichoderma sp.*

Chaet : *chaetomium sp.*

Fus : *fusarium sp.*

Alt : *alternaria sp.*

Ds : *diplodia seriata*

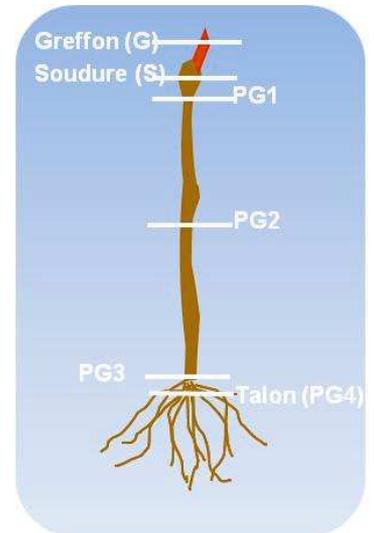
Np : *neofusicocum parvum*

Bd : *botryosphaeria dothidea* ou *fuscococcum aesculi*

Bsp1, Bsp2 : espèces appartenant au genre *botryosphaeriae*

Pv : *phomopsis viticola*

Pesta blanc et gris : *pestalotiopsis spp*



Les analyses sont réalisées sur 3 répétitions de 80 plants si les effectifs après stratification le permettent.

2.3.3.4.2 - Résultats

- Ils sont présentés par essai.
- Pour chaque essai :
 - un tableau reprend les modalités correspondantes
 - un histogramme représente la fréquence et la localisation (n° de zone) de la flore fongique répertoriée dans les plants
 - un tableau récapitule l'effet (statistiquement significatif ou non) des modalités testées dans l'essai vis-à-vis de la microflore répertoriée
 - *** : très significatif (SIG. $F < 0.001$)
 - ** : significatif (SIG. $F < 0.01$)
 - * : peu significatif (SIG. $0.01 < F < 0.05$)
 - NS : non significatif
 - des figures illustrent les effets les plus marquants

Essai IFV 2010

Tableau 6 : rappel des modalités

An	Partenaire	Modalité	Trempe dans produit désinfectant	TEC	Conditions
2010	IFV	Sciure	Non	Non	Expérimentales IFV
2010	IFV	Sciure	Vibafon 2 %	Non	Expérimentales IFV
2010	IFV	Sciure	Oxysan 1 %	Non	Expérimentales IFV
2010	IFV	Sciure	Switch 100 g/hl	Non	Expérimentales IFV

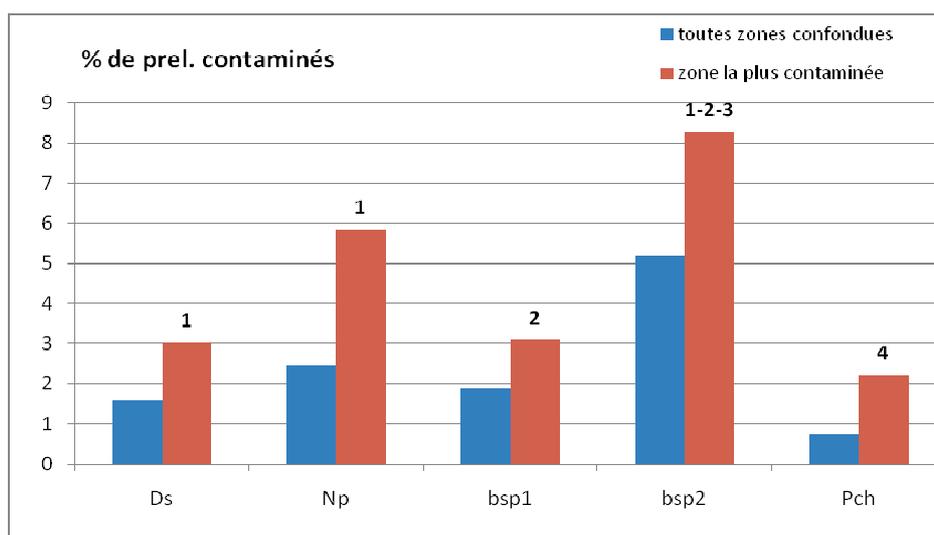


Figure 7 : principales espèces répertoriées et localisation dans les plants

Tableau 7 : effet des traitements sur la fréquence d'isolement des champignons

Chps	effet	A retenir
Ds	***	Le switch réduit significativement la contamination par Ds
Np	*	Au contraire le switch favorise l'isolement de neofusicoccum parvum
Bsp1	**	Le switch réduit significativement la contamination par Bsp1
Bsp2	***	Le switch réduit significativement la contamination par Bsp2
Pch	NS	

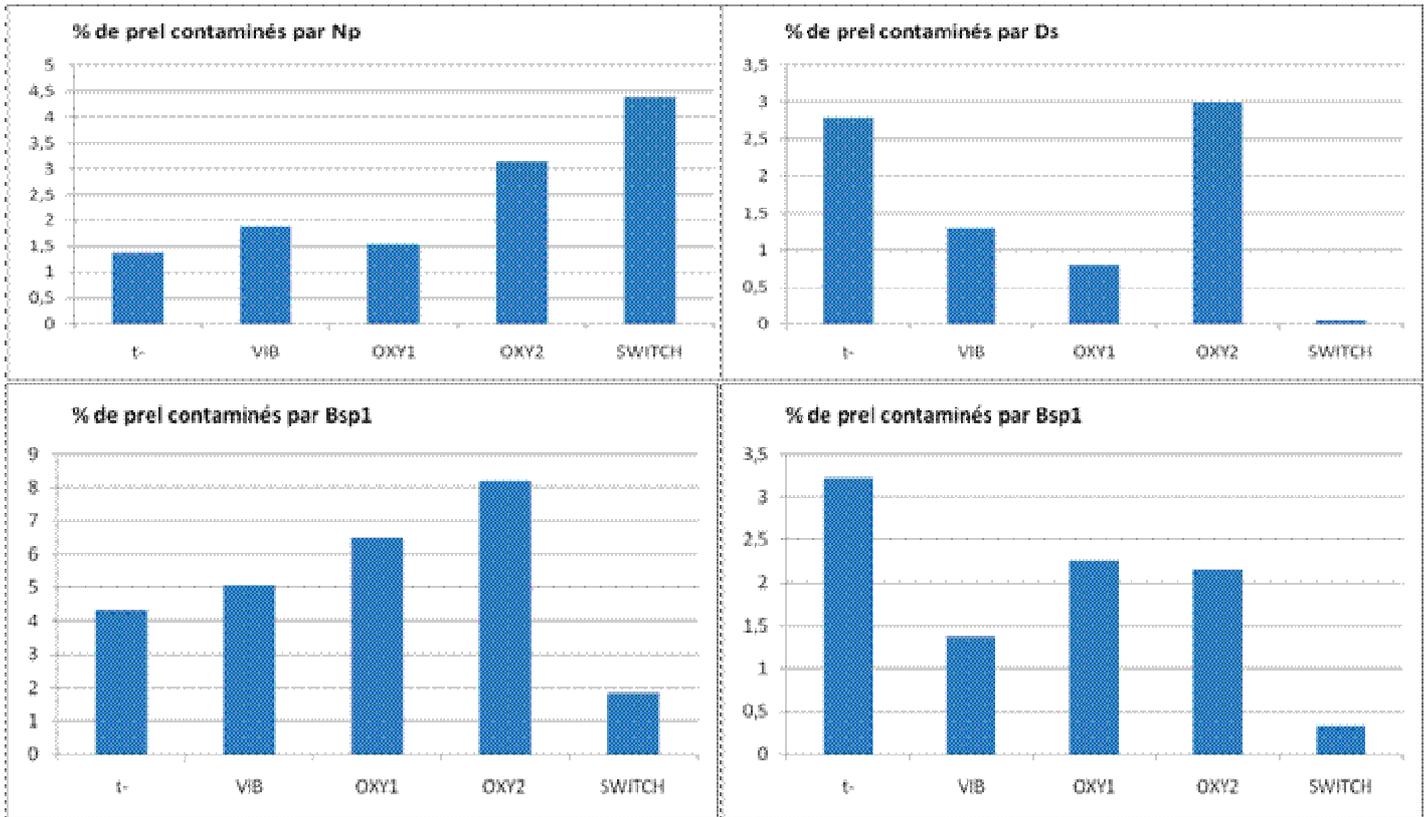


Figure 8 : effet des produits sur la fréquence d'isolement des espèces de botryosphaeriaceae (prél : échantillons de bois prélevés au niveau de chaque zone)

Essai IFV 2011

Tableau 8 : rappel des modalités

An	Partenaire	Modalité	Trempe dans produit désinfectant	TEC	Conditions
2011	IFV	Sciure	Non	Non	Expérimentales IFV
2011	IFV	Sciure	Menoflorades 1 %	Non	Expérimentales IFV
2011	IFV	Sciure	Phenoseptyl 1 %	Non	Expérimentales IFV
2011	IFV	Sciure	Anolyte (50 % 12 h)	Non	Expérimentales IFV

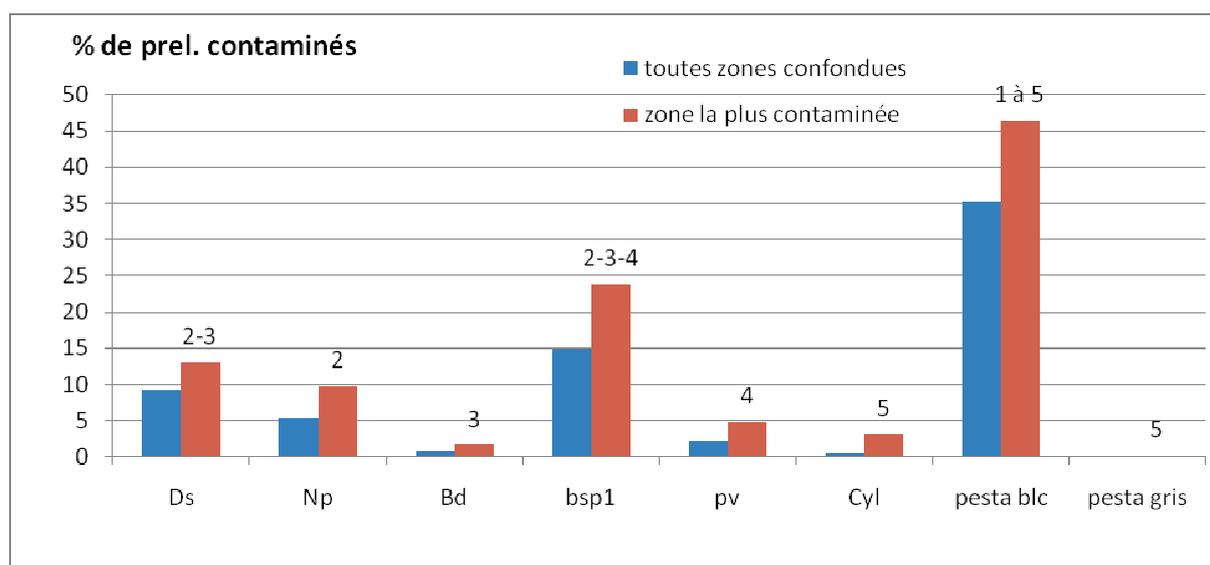


Figure 9 : principales espèces répertoriées et localisation dans les plants

Tableau 9 : effet des traitements sur la fréquence d'isolement des champignons

	Effet produit	A retenir
Ds	*	Aucun produit ne permet de diminuer les Ds / au témoin
Np	**	Aucun produit ne permet de diminuer les Np / au témoin
Bd	***	Produits tous efficaces / au témoin
Bsp1	**	Tous les produits augmentent la contamination par les Bsp1
Pv	NS	
Cyl	NS	
Pesta blanc	***	Le témoin est le moins contaminé
Pesta gris		Produits tous efficaces / au témoin mais faible fréquence d'isolement
Pch	Non isolé !	

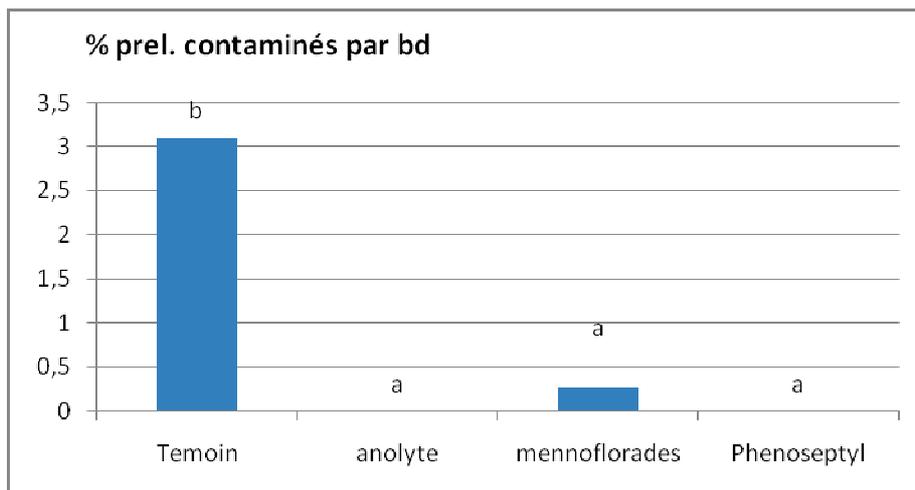


Figure 10 : effet des produits sur la fréquence d'isolement de *B. dothidea*

Essai produits/substrats BNIC 2011

Tableau 10 : rappel des modalités

An	Partenaire	Modalité	Trempeage dans produit désinfectant	TEC	Conditions
2011	BNIC	Sciure	Non	Non	Expérimentales BNIC
2011	BNIC	Vermiculite	Non	Non	Expérimentales BNIC
2011	BNIC	Sciure	Non	Oui	Expérimentales BNIC
2011	BNIC	Sciure	Halamid 1 %	Non	Expérimentales BNIC
2011	BNIC	Sciure	Virkon 1 %	Non	Expérimentales BNIC
2011	BNIC	Vermiculite	Virkon 1 %	Oui	Expérimentales BNIC

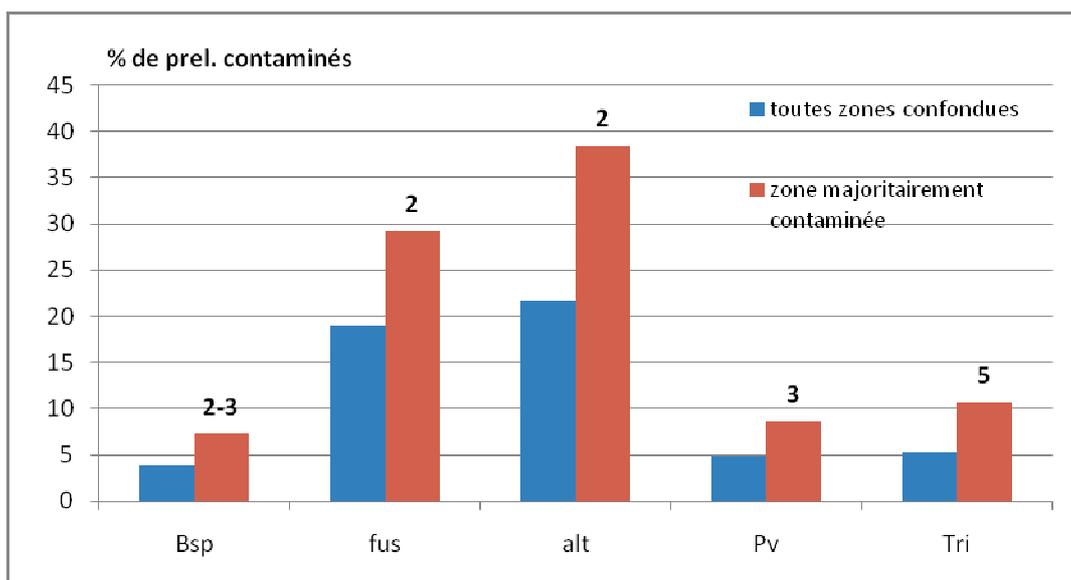


Figure 11 : principales espèces répertoriées et localisation dans les plants

Tableau 11 : effet des traitements sur la fréquence d'isolement des champignons

	Effet produit	A retenir
Bsp (Ds et Np)	***	Traitement à l'eau chaude diminue significativement la contamination par les bsp
Fusarium sp	***	Traitement à l'eau chaude augmente significativement la contamination par fusarium
Alternaria	***	Traitement à l'eau chaude diminue significativement la contamination par alternaria
Phomopsis	***	Le virkon augmente significativement la présence de phomopsis. Le Tec diminue significativement la contamination par Phomopsis
Trichoderma	***	Le virkon augmente significativement la présence de trichoderma

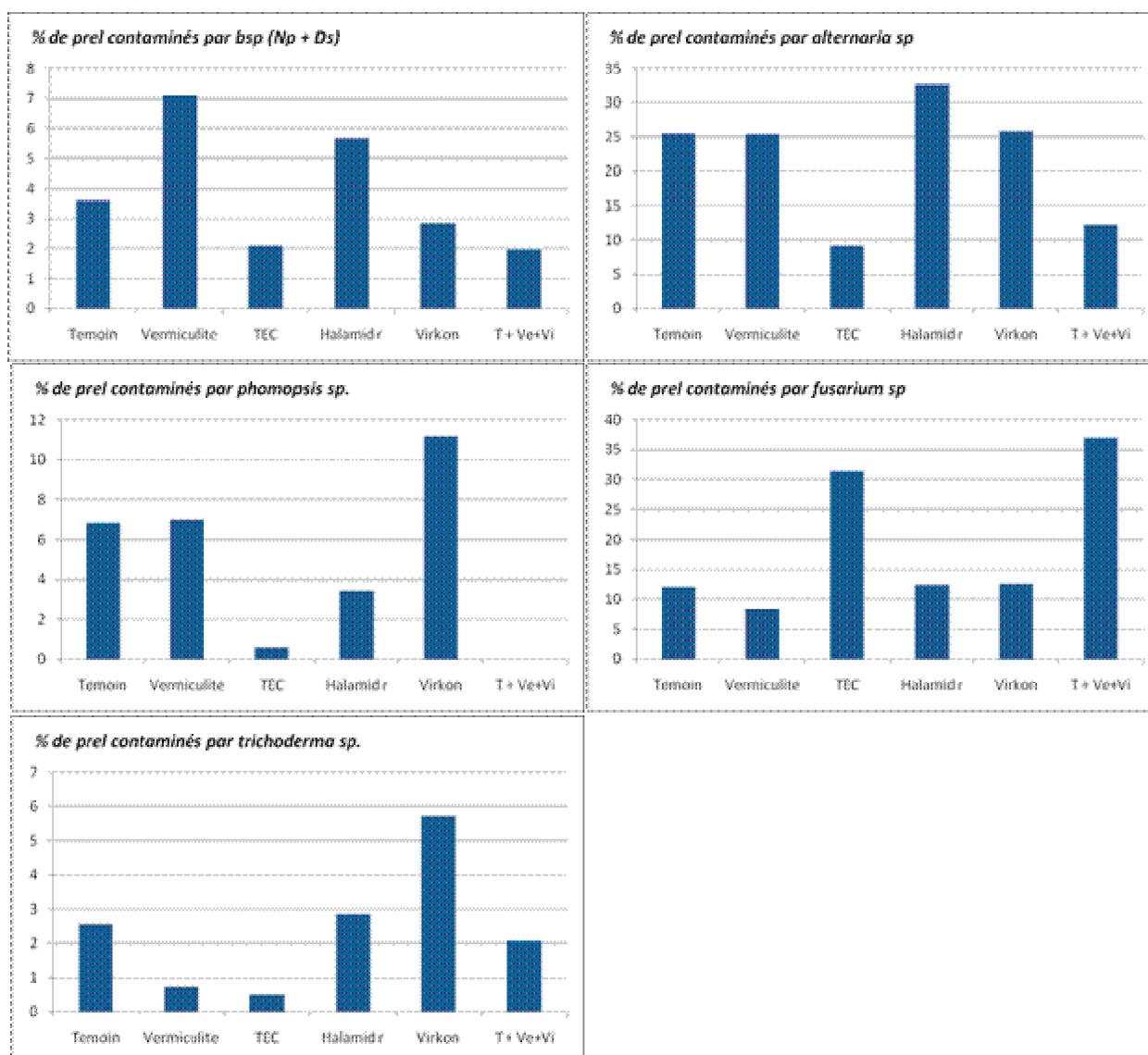


Figure 12 : effet des produits sur la fréquence d'isolement des espèces de champignon

Essai BNIC 2012

Tableau 12 : rappel des modalités

An	Partenaire	Modalité	Trempage dans produit désinfectant	TEC	Conditions
2012	BNIC	Sciure	Non	Oui	Pépiniériste
2012	BNIC	Sciure	Non	Oui	Expérimentales BNIC
2012	BNIC	Sciure	Mennoflorades 1 %	Oui	Expérimentales BNIC
2012	BNIC	Sciure	Switch 100 g/hl	Oui	Expérimentales BNIC
2012	BNIC	Eau + mennoflorades 0,1 %	Non	Oui	Expérimentales BNIC

Tableau 13 : effet des traitements sur la fréquence d'isolement des champignons

	Effet produit	A retenir
Bsp (Ds et Np)	***	Le switch diminue très significativement la contamination par les Bsp

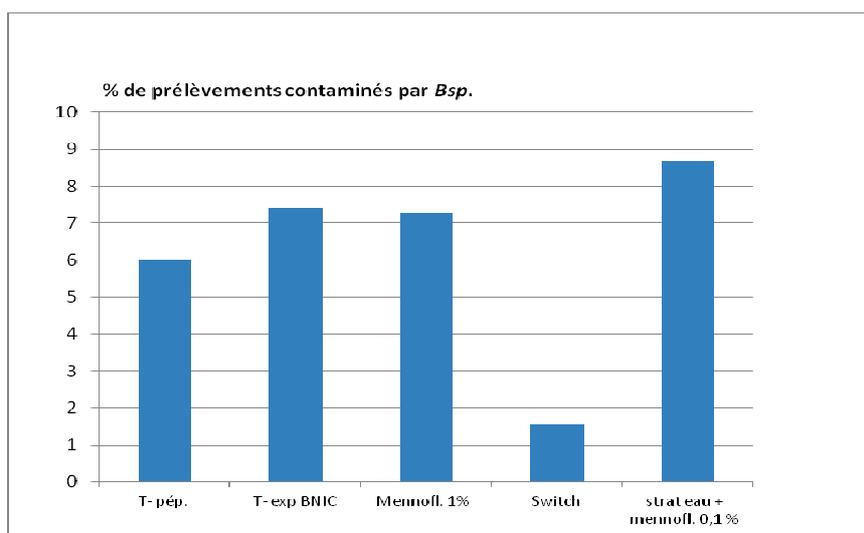


Figure 13 : effet des produits sur la fréquence d'isolement des espèces de champignon

La plupart des produits de désinfection mis en œuvre dans les bains de réhydratation des bois avant greffage au cours des 3 années d'essais ne présentent pas d'effets significatifs vis-à-vis de la fréquence d'isolement des espèces de champignon associées aux maladies du bois dans les plants en sortie de pépinière. Deux d'entre eux présentent un effet phytotoxique net.

Seul le Switch présente une efficacité intéressante vis-à-vis de plusieurs espèces de *Botryosphaeriae*, ce qui confirme des résultats précédemment obtenus.

Dans l'essai mis en place par l'IFV en 2010, la diminution quasi-totale de *D. seriata* est cependant malheureusement compensée par une augmentation significative de *N. parvum*.

2.3.4 - Greffage en vert

La technique de greffe-bouture herbacée associe la simplicité des techniques *in vivo* aux avantages du travail sur les organes jeunes. Elle permet de produire rapidement et en continu des plants greffés. La culture des plantes qui produisent le matériel végétal est réalisée en serre. Ainsi, elles ne sont pas soumises aux pollutions, aux contaminations observées dans le vignoble. La production de plants issus de cette technique pourrait permettre d'obtenir des plantes dénuées de champignons inféodés aux maladies du bois. Bien que le transfert aux conditions réelles de production de cette technique reste probablement délicat, elle peut néanmoins s'avérer intéressante pour l'obtention de plants exempts des espèces de champignons. La disponibilité d'une méthode de production de plants sains serait très intéressante dans un cadre plus général de recherche sur les maladies du bois. Cela permettrait en effet de mettre en place et de suivre dans le temps des parcelles issues de matériel végétal sain afin de mieux comprendre le rôle des plants dans l'épidémiologie de la maladie.

2.3.4.1 - Le matériel végétal

Le matériel végétal testé est résumé dans le tableau 14.

Tableau 14 : le matériel végétal testé

Type de matériel	Date de greffage	Date de fin de l'élevage en serre	Nombre analysé
Cabernet Sauvignon 412/Riparia Gloire	2 août 2010	7 décembre 2010	45
Cabernet Sauvignon cl 412/140 Ruggieri	3 août 2010	29 mars 2011	16
Cabernet Sauvignon cl 412/5BB	3 août 2010	29 mars 2011	15
Cabernet Sauvignon cl 412/Rupestris du Lot	3 août 2010	29 mars 2011	13

2.3.4.2 - Résultats des analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques sont, comme dans les essais produits et stratification précédemment rapportés, effectuées à six niveaux dans les plants greffés et 3 niveaux dans le matériel végétal non greffé. Elles sont également réalisées en surface.

Les champignons recherchés sont : *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *Fusicoccum aesculi*, *Diplodia mutila*, autres *Botryosphaeriaceae*, *Phomopsis* spp., *Neonectria liriodendri*, *Pestalotiopsis* sp.

L'analyse microbiologique montre qu'aucun des champignons recherchés n'a été trouvé dans le matériel végétal analysé (greffes boutures, porte-greffe). Les champignons n'ont également pas été trouvés sur les écorces.

2.4 – Bilan et perspectives

Le bilan des actions mises en œuvre et les principaux résultats obtenus est présenté ci-dessous.

En préambule, il faut noter que l'ensemble des résultats compilés dans ce rapport repose sur l'analyse microbiologique du matériel végétal par isolement. Cette méthode est fastidieuse et présente certaines limites en terme d'interprétation : l'augmentation de la fréquence d'isolement d'une espèce ne signifie pas obligatoirement que cette espèce est plus

représentée dans les plants (compétition des espèces dans le milieu nutritif gélosé : les espèces à croissance rapide sont favorisées).

A noter cependant que, au cours de l'année 2011, une centaine de contrôles microbiologiques ont été réalisés en double (isolement et QPCR) sur les échantillons IFV et BNIC : les résultats se sont révélés très cohérents dans l'ensemble (voir bilan action 1).

- étudier l'impact de l'âge des parcelles de pied mères, sur le niveau de contamination du matériel végétal prélevé et la contamination finale des plants (IFV, CA84)
 - ➔ les espèces associées aux maladies du bois sont pratiquement exclusivement localisées au niveau des écorces du matériel végétal et pénètrent dans les tissus internes du bois après l'étape de greffage. A ce stade des essais, aucune relation entre l'origine (parcelles plus ou moins âgées), le niveau de contamination du matériel végétal et le pourcentage de plants contaminés en sortie de pépinière n'a été mise en évidence. Le nombre de lots de matériel végétal analysé est cependant insuffisant à ce jour pour pouvoir conclure ; des contrôles plus larges vont être réalisés sur 2 années supplémentaires.

- évaluer des méthodes d'assainissement de la surface du matériel végétal utilisé pour le greffage (BNIC, IFV)
 - ➔ sur 8 produits de désinfection (correspondant à 8 matières actives) testés sur greffons et porte-greffe dans les bains de réhydratation, seul le switch a présenté un effet significatif permettant de réduire la présence de certaines espèces appartenant au genre *Botryosphaeria* dans les plants en sortie de pépinière. la valorisation de l'effet de ce produit phytosanitaire pourrait faire l'objet d'une réflexion.
L'effet du traitement à l'eau chaude du matériel végétal avant greffage a également été vérifié : il modifie l'écologie microbienne des plants et réduit significativement la présence de plusieurs espèces associées aux maladies du bois (*phomopsis viticola*, *diplodia seriata* en particulier).
Cependant, aucun des procédés testés ne permet de garantir la production de plants indemnes de champignons associés aux maladies du bois.

- tester de nouveaux substrats de stratification (BNIC)
 - ➔ 12 substrats de stratification ont été comparés. L'utilisation de substrats de stratification inertes (vermiculite, perlite, sable) ne permet pas de réduire la contamination des plants par rapport à des substrats organiques innovants (écorces de pin, chips coco) ou des substrats classiquement utilisés dans le processus de production (sciure, eau).

- comparer l'écologie microbienne des greffés soudés classiques et des plants greffés en vert (IFV)
 - ➔ aucune des espèces fongiques associées au syndrome de l'ESCA ou du BDA n'a pu être isolée à partir des plants obtenus par la technique de greffage en vert. Les plants "sains" ainsi obtenus représentent un modèle d'étude intéressant en particulier pour mieux comprendre la dynamique de contamination des pieds au vignoble. Plusieurs parcelles de plants greffés en vert vont être implantées en 2013 par l'IFV.

3 – Action 3 : Etude en plein champ l'intérêt du traitement à l'eau chaude des plants au cours de leur production

Pour plus de commodités, le terme "traitement au chaude" a par la suite été remplacé par "TEC".

L'étude se propose de répondre à la question de l'impact du traitement à l'eau chaude (TEC) des plants sur le comportement ultérieur des vignes vis à vis des maladies du bois. L'expression des symptômes étant soumise à l'influence de nombreux paramètres l'action se scinde en deux sous-actions complémentaires. Un travail de suivi de l'impact du TEC comme seul paramètre de variation d'une part et un travail de suivi de la part d'influence du TEC au sein de l'ensemble des facteurs d'autre part.

- ✧ Etudier la part du TEC dans l'ensemble des facteurs de variations de l'expression => réseau de parcelles en Gironde.
- ✧ Comparaisons monofactorielles TEC / témoin non TEC => réseau de parcelles Aude, Gard, Saône-et-Loire et Yonne.

3.1 – Part du TEC dans l'ensemble des facteurs de variations de l'expression des maladies du bois

3.1.1 - Rappel des objectifs attendus

La part du TEC dans l'ensemble des facteurs de variation de l'expression des maladies du bois. Nous étudierons un réseau de parcelles plantées en 2001 soit avec des plants traités à l'eau chaude soit avec des plants non traités. Le réseau comportera une trentaine de parcelles. Une analyse statistique multi-dimensionnelle réalisée à partir des comptages et des enquêtes de pratiques et de caractérisation de parcelle permettra de mesurer le poids du TEC.

Région	Cépage	Organismes impliqué	Nombre de parcelles suivies	Taille des modalités	Dates de plantation
Aquitaine	Merlot, Cabernet Sauvignon, Sauvignon	CA33	> 30	300 plants	2000

3.1.2 - Méthodes de travail utilisées

Chaque parcelle sera finement caractérisée aussi bien dans son environnement (situation pédologique, topographique, géographique et surtout état sanitaire "maladies du bois" des parcelles voisines) que dans les pratiques culturales. Trois comptages annuels seront effectués, un sur l'Eutypiose en juin, un en juillet sur le BDA et un sur l'ESCA et le BDA en août. Concernant le suivi de l'Eutypiose, il se justifie malgré le fait que la transmission de cette maladie ne se fasse pas par les plants car nous voulons voir si un effet secondaire du

TEC ne pourrait pas être un développement accru de l'Eutypiose du fait de la disparition sur les plants traités d'une partie de la flore fongique naturelle. Dans chaque parcelle, le comptage sera réalisé sur des zones définies, homogènes et invariables sur 150 à 300 pieds selon la taille des parcelles ou 150 pour les parcelles d'essais de plants de remplacement sur la base d'un protocole de notation commun (un calage préalable des observateurs sera réalisé et l'échelle de notation sera identique).

L'analyse statistique a été réalisée sur Statbox au moyen d'analyses de variances adossées à des tests de Newman et Keuls.

3.1.3 - Etapes et calendrier

Mise en place en janvier 2010 du protocole de suivi (fiche de notation commune entre les deux sous-actions, périodes de comptages. Caractérisation des parcelles et de leurs environnements.

Chaque année :

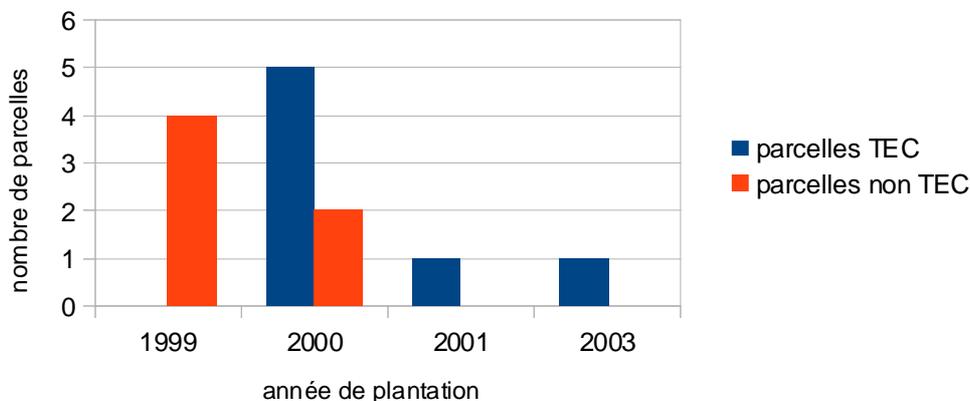
- comptages Eutypiose aux stades 10-12 feuilles étalées et comptages Esca / BDA pendant la véraison. l'ensemble des parcelles a été suivi au cours de la même semaine afin d'éviter l'influence de changements de conditions climatiques.
- Saisies des données et envois à la Chambre régionale de Bourgogne en octobre - novembre.
- Synthèse pour le comité de pilotage annuel en novembre.

En 2012, comptages des parcelles avoisinant les parcelles d'essais pour mesurer l'impact de l'environnement.

3.1.4 - Résultats obtenus

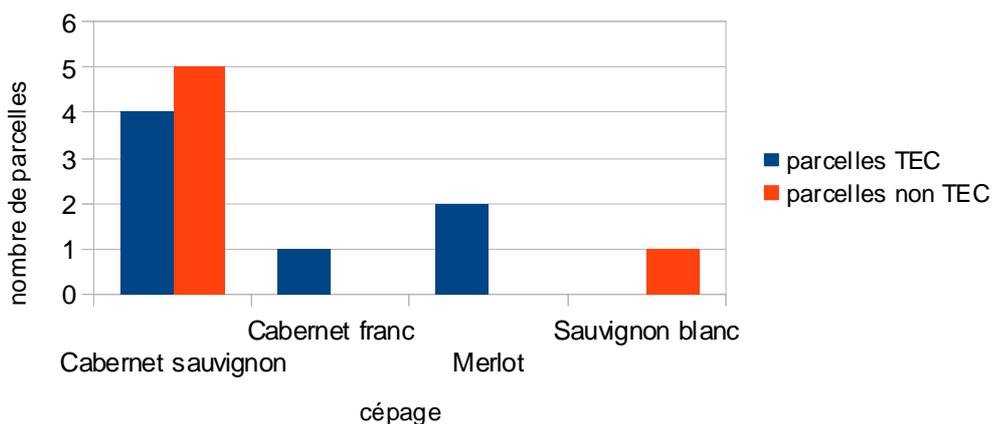
13 parcelles ont finalement été suivies, 7 comportant des plants TEC et 6 non TEC. Les plantations ont eu lieu entre 1999 et 2001 sauf pour 1 parcelle TEC plantée en 2003.

Répartition des parcelles selon l'année de plantation



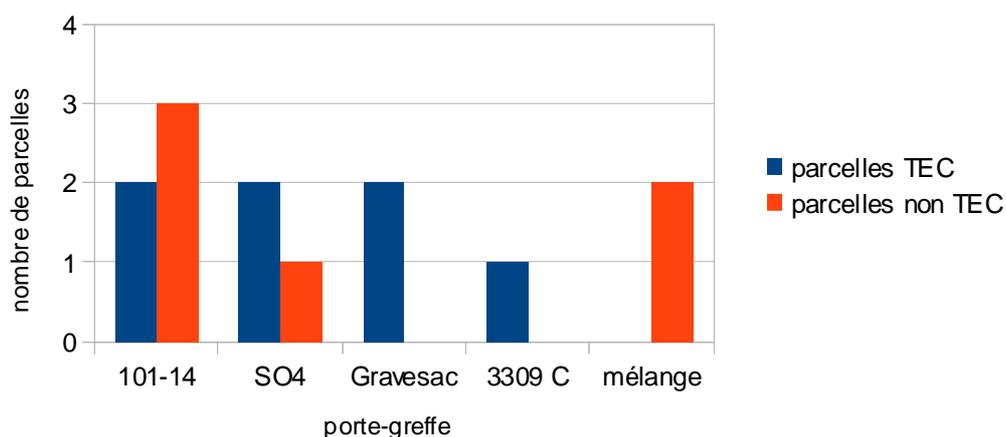
L'âge des parcelles au moment des comptages a donc été compris entre 10 et 12 ans (sauf 1 parcelle à 8 ans) lors du premier comptage et 12 à 14 ans (sauf 1 parcelle : 10 ans) soit généralement le début de la phase d'expression maximale constatée au niveau national. Le réseau est majoritairement composé de parcelles de Cabernet Sauvignon. Sur les autres cépages, on trouve le Cabernet franc et le Merlot pour les parcelles TEC et le Sauvignon blanc pour les parcelles non TEC.

Répartition des parcelles selon le cépage



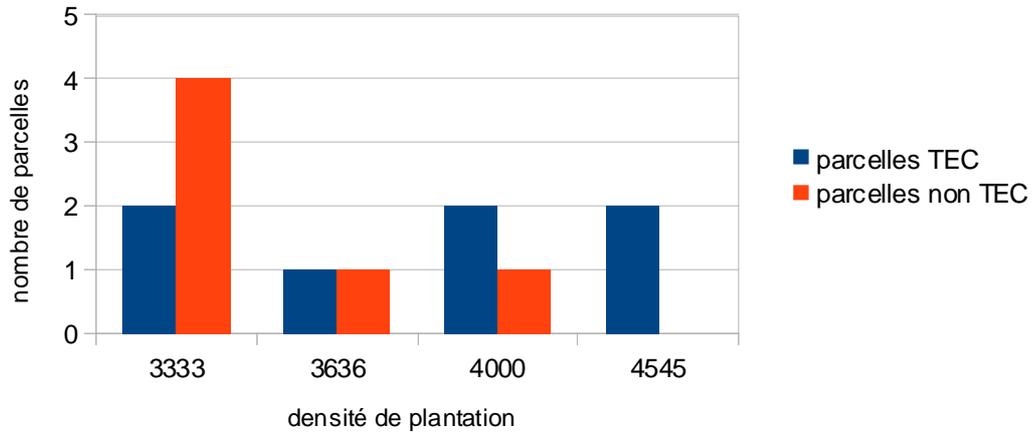
Au niveau des porte-greffe, les parcelles TEC sont équilibrées entre quatre porte-greffe tandis que les parcelles non TEC utilisent plus le 101-14.

Répartition des parcelles selon le porte-greffe



Enfin, en terme de densité de plantation, les parcelles non TEC sont en densités de plantation légèrement plus faibles.

Répartition des parcelles selon la densité de plantation

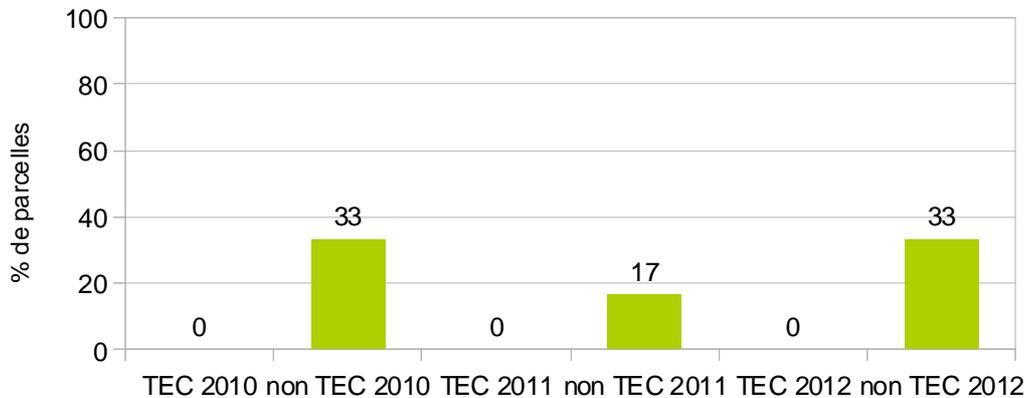


3.1.5 - Résultats sur l'Eutypiose

Lors des trois comptages, aucun symptôme d'Eutypiose n'a été détecté dans les parcelles TEC tandis que 1 à 2 parcelles non TEC ont exprimé des symptômes.

Fréquence de parcelles touchées par l'Eutypiose

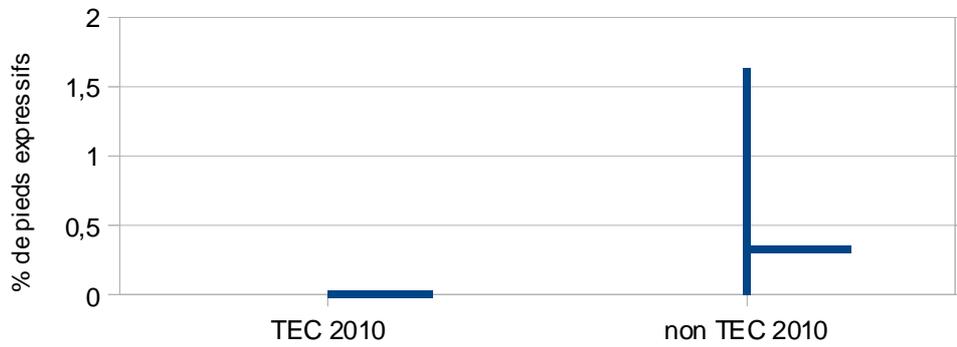
sous action 1



Toutefois, les intensités d'expression sont très faibles (inférieure à 2 % en 2010 et inférieures à 1 % en 2011 et 2012).

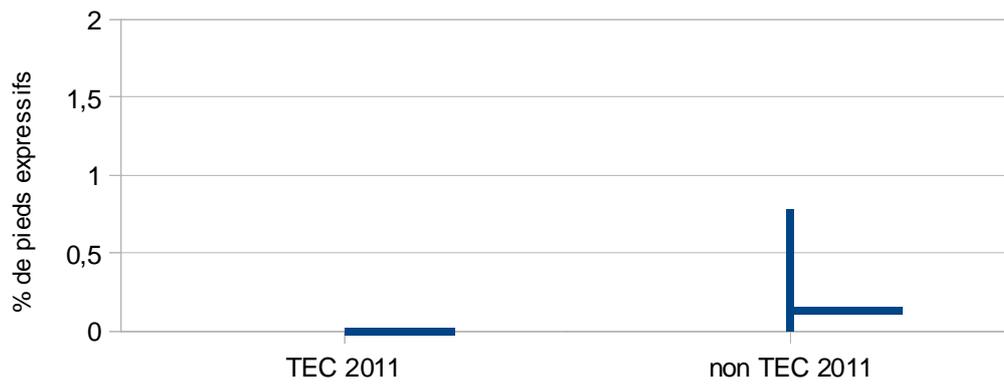
Intensité de l'Eutypiose

Parcelles Gironde



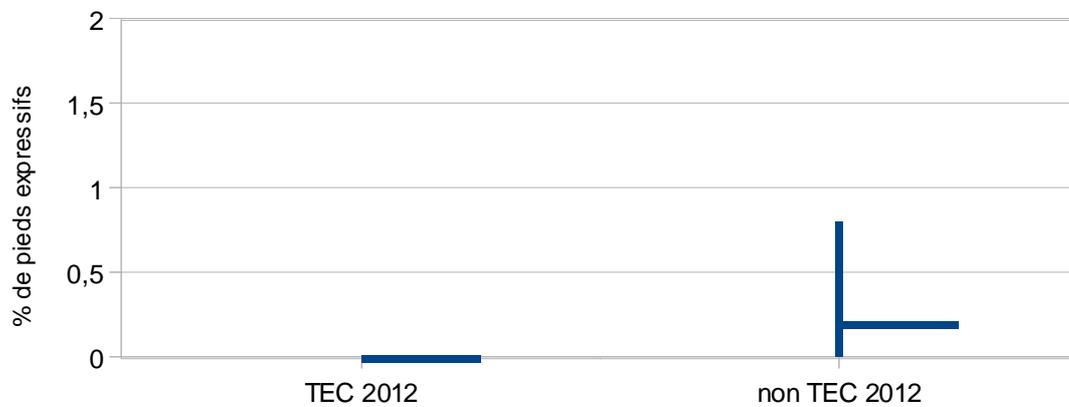
Intensité de l'Eutypiose 2011

Parcelles Gironde



Intensité de l'Eutypiose 2012

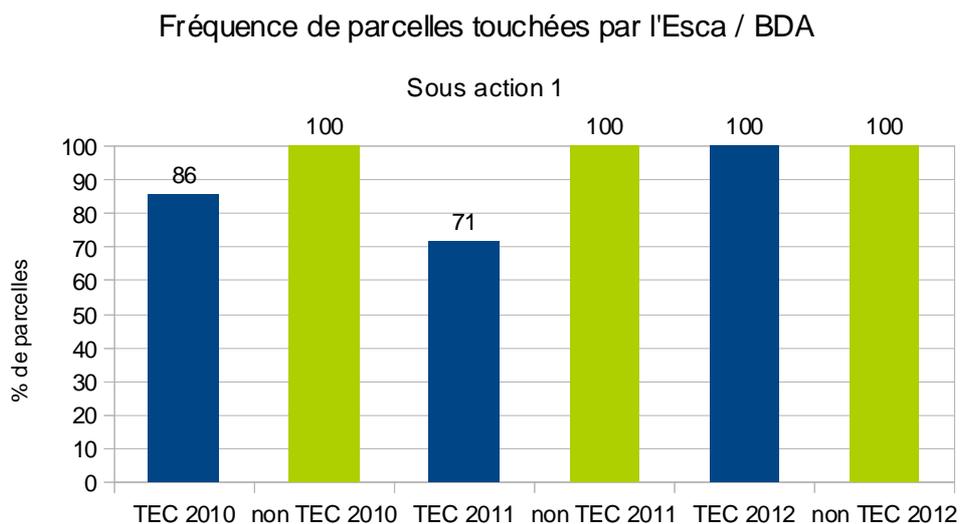
Parcelles Gironde



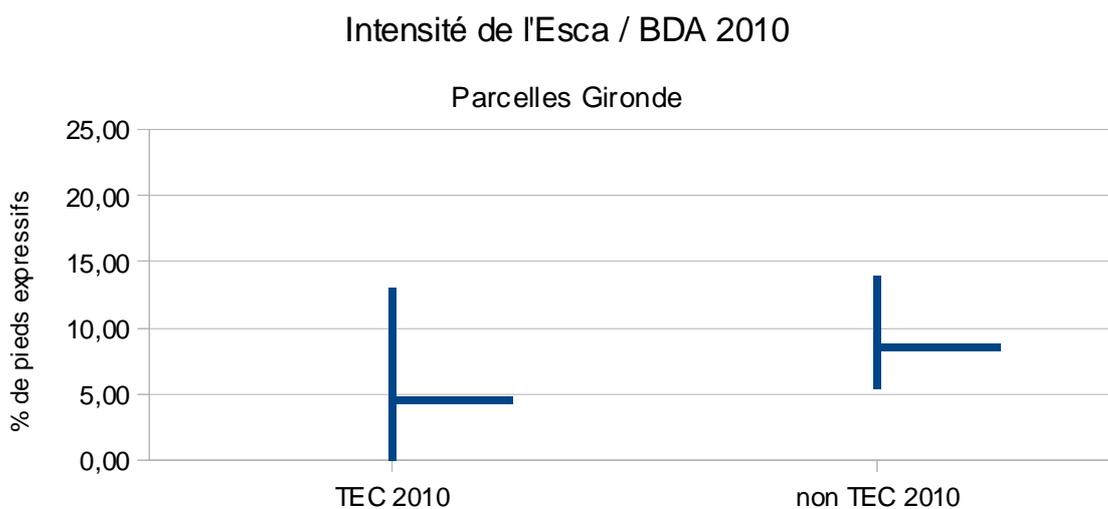
L'analyse de variance effectuée n'a pas fait ressortir de différences entre les parcelles TEC et les parcelles non TEC.

- Résultats Esca / BDA :

Là encore léger avantage aux parcelles TEC qui ont exprimé moins souvent les symptômes que les parcelles non TEC. Si 100 % des parcelles non TEC ont exprimé des symptômes chaque année, ce n'est qu'en 2012 que la situation a été identique pour les parcelles TEC (il n'y a toutefois pas d'informations sur les situations antérieures à 2010).

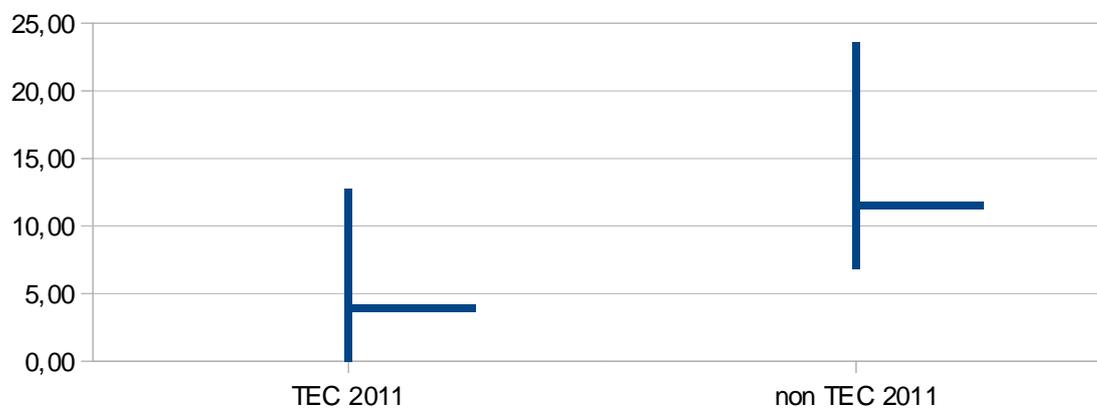


En intensité d'expression, le niveau est nettement plus élevé qu'avec l'Eutypiose puisque les intensités dépassaient souvent les 5 % voire 10 % dans les parcelles non TEC. Si en moyenne, l'expression des parcelles non TEC est supérieure (les trois années) à celle des parcelles TEC l'analyse de variance effectuée n'a pas fait ressortir de différences entre les parcelles TEC et les parcelles non TEC.



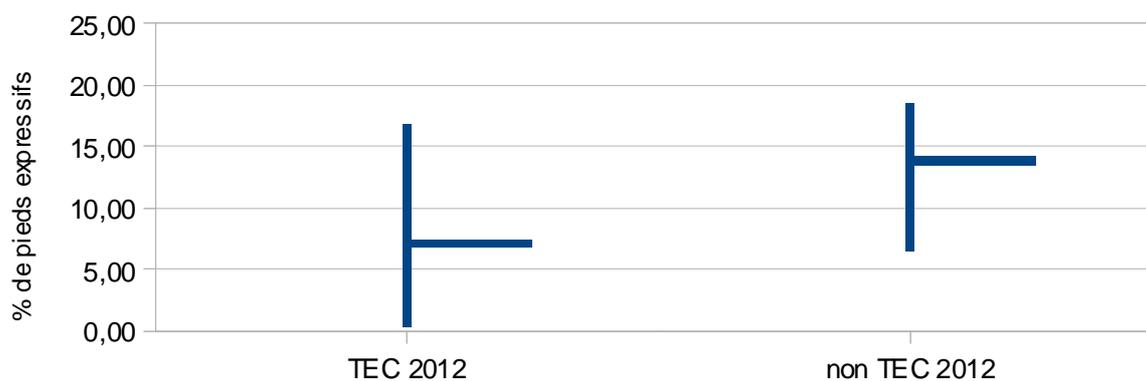
Intensité de l'Esca / BDA 2011

Parcelles Gironde



Intensité de l'Esca / BDA 2012

Parcelles de Gironde



- Indicateurs de suivi :

Nombre de parcelles chaque année
Comptes-rendus expérimentaux annuels et finaux
Compte-rendu d'activité des équipes partenaires

- Indicateurs de réalisation :

Conclusions du compte rendu final, documents de communication (diaporamas, articles, fiches techniques, posters).

3.2 – Comparaisons monofactorielles TEC / témoin non TEC

3.2.1 - Rappel des objectifs attendus

Le TEC comme seul facteur de variation. Nous étudierons des parcelles plantées pour partie avec des plants traités à l'eau chaude et pour partie avec des plants non traités à l'eau chaude, tous les autres paramètres étant égaux par ailleurs dans chacune des parcelles (sol, matériel végétal, pépiniériste, conditions de plantation, pratiques culturales ultérieures). Dans chaque parcelle il y aura donc un témoin et une modalité TEC. Trois parcelles ont été mises en place pour suivre la problématique "traitement à l'eau chaude" sur des plants de remplacement de manquants à l'intérieur de parcelles déjà plantées (avec des plants non traités à l'eau chaude). Ces trois parcelles permettront de suivre l'impact du traitement à l'eau chaude sur l'expression des maladies du bois dans un contexte sanitaire différent, le voisinage de chaque plant suivi étant potentiellement déjà plus fréquemment touché par les maladies du bois.

Région	Cépage	Organismes impliqués	Nombre de parcelles suivies	Taille des modalités	Dates de plantation
Bourgogne	Chardonnay	CA89 – CRAB - CA71	8 dans l'Yonne (dont 3 sur le thème des remplacements de pieds morts) et en Saône-et-Loire	150 plants pour les plants de remplacement. De 200 à 1 900 plants pour les plantations	2005 - 2006
	Pinot noir	CA 71 - CRAB	1	250 à 650 plants	2005 - 2006
	Aligoté	CA 71 - CRAB	1	500 à 930 plants	2005
Languedoc Roussillon	Sauvignon	CA 30	2	150 plants	2008
	Mourvèdre	CA 30	2	150 plants	2008
	Cabernet Sauvignon	CA11	1	800 plants	2000
	Cabernet Franc	CA11	1	250 plants	2002
	Marselan	CA11	1	1000 plants	2002
				540 plants	2002

3.2.2 - Méthodes de travail utilisées

Chaque parcelle sera finement caractérisée aussi bien dans son environnement (situation pédologique, topographique, géographique et surtout état sanitaire "maladies du bois" des parcelles voisines) que dans les pratiques culturales. Trois comptages annuels seront effectués, un sur l'Eutypiose en juin, un en juillet sur le BDA et un sur l'ESCA et le BDA en août. Concernant le suivi de l'Eutypiose, il se justifie malgré le fait que la transmission de cette maladie ne se fasse pas par les plants car nous voulons voir si un effet secondaire du TEC ne pourrait pas être un développement accru de l'Eutypiose du fait de la disparition sur les plants traités d'une partie de la flore fongique naturelle. Dans chaque parcelle, le comptage sera réalisé sur des zones définies, homogènes et invariables sur 150 à 300 pieds selon la taille des parcelles ou 150 pour les parcelles d'essais de plants de remplacement sur la base d'un protocole de notation commun (un calage préalable des observateurs sera réalisé et l'échelle de notation sera identique). Une analyse statistique a été réalisée lorsque les expressions étaient suffisantes. Elle a consisté en une analyse de variance des distributions de symptômes après régression linéaire de Poisson (analyse réalisée sous R version 2.15.2 (2012-10-26)).

3.2.3 - Etapes et calendrier

Mise en place en janvier 2010 du protocole de suivi (fiche de notation commune entre les deux sous-actions, périodes de comptages. Caractérisation des parcelles et de leurs environnements.

Chaque année :

- Comptages Eutypiose aux stades 10-12 feuilles étalées et comptages Esca / BDA pendant la véraison. l'ensemble des parcelles a été suivi au cours de la même semaine afin d'éviter l'influence de changements de conditions climatiques.
- Saisies des données et envois à la Chambre régionale de Bourgogne en octobre - novembre.
- Synthèse pour le comité de pilotage annuel en novembre.

En 2012, comptages des parcelles avoisinant les parcelles d'essais pour mesurer l'impact de l'environnement.

3.2.4 - Résultats obtenus

3.2.4.1 - Réseau expérimental

Il est constitué par un réseau de parcelles comportant systématiquement une modalité TEC et une modalité non TEC. Ceci est la seule différence entre les modalités, les autres facteurs (matériel végétal, pratiques culturales, contexte pédomicroclimatique...) sont identiques. On peut séparer le réseau en trois sous réseaux en triant les parcelles selon leurs âges :

- Des parcelles très jeunes, plantées en 2008. La première année de comptages correspond donc aussi à la première année de production qui est aussi une année de stress pour les pieds de vignes et conduit dans un certain nombre de cas aux premières expressions de maladies du bois. Ces parcelles, au nombre de 2, sont plantées dans le Gard. Une parcelle est plantée avec du Sauvignon blanc (cépage sensible) sur SO4 (4000 pieds/ha), l'autre parcelle utilise du Mourvèdre (autre cépage sensible) sur Fercal (4444 pieds / ha). 300 pieds sont comptés par modalité.

- Des parcelles plantées dans les années 2005 à 2006, elles avaient donc entre 5 et 8 ans au moment des comptages. Elles sont situées en Bourgogne. En Saône-et-Loire, le réseau comporte 7 parcelles dont 5 de Chardonnay, 1 de Pinot noir et 1 d'Aligoté. Dans l'Yonne, le réseau comprend 7 parcelles : 4 parcelles plantées en 2005 ou 2006 et 3 parcelles plus âgées dans lesquelles des repiquages (jeunes plants utilisés pour remplacer des pieds morts) ont été utilisés en novembre 2006. Toutes les parcelles sont en Chardonnay.
- Des parcelles plantées 2000 (1 parcelle), 2001 (2 parcelles) et 2002 (3 parcelles) dans l'Aude. Trois sont sur Cabernet Sauvignon, 2 sur Cabernet franc et 1 sur Marsellan. La densité de plantation est de 4040 pieds / ha sauf les deux parcelles de Cabernet franc (5000 pieds / ha).

3.2.4.2 - Eutypiose

- Jeunes plantations (parcelles du Gard)

Aucune expression n'a été notée pendant les trois années d'étude quelque soit la parcelle et la modalité.

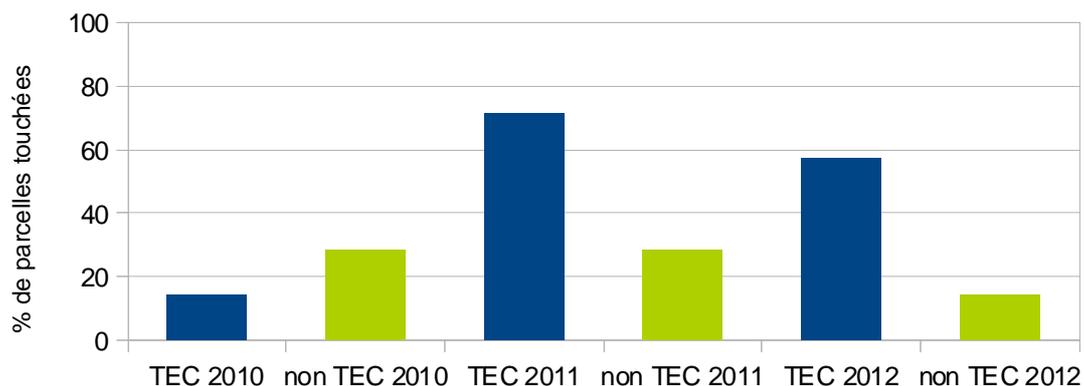
- Vignes de 4 à 7 ans (parcelles de Saône-et-Loire et Yonne)

Aucune expression n'a été notée dans l'Yonne pendant les trois années d'étude quelque soit la parcelle et la modalité.

En Saône-et-Loire, la situation est contrastée selon l'année de comptage. En 2010, peu de parcelles ont exprimé des symptômes et un peu plus dans les modalités non TEC. c'est le contraire qui a été observé les deux autres années, les modalités TEC exprimant nettement plus fréquemment l'Eutypiose (en fréquence de parcelles touchées).

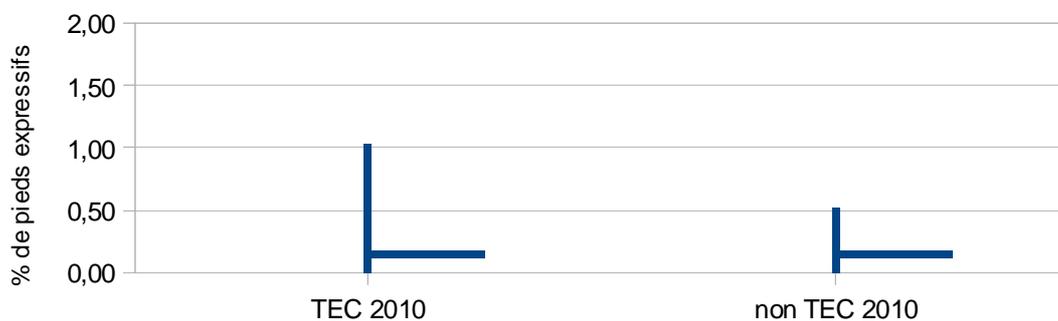
Fréquence de parcelles touchées par l'Eutypiose

Réseau de Saône et Loire



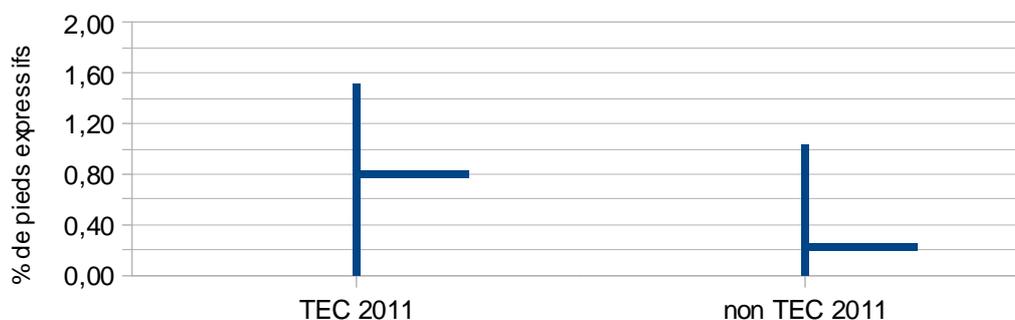
Intensité de l'Eutypiose 2010

Parcelles Saône et Loire



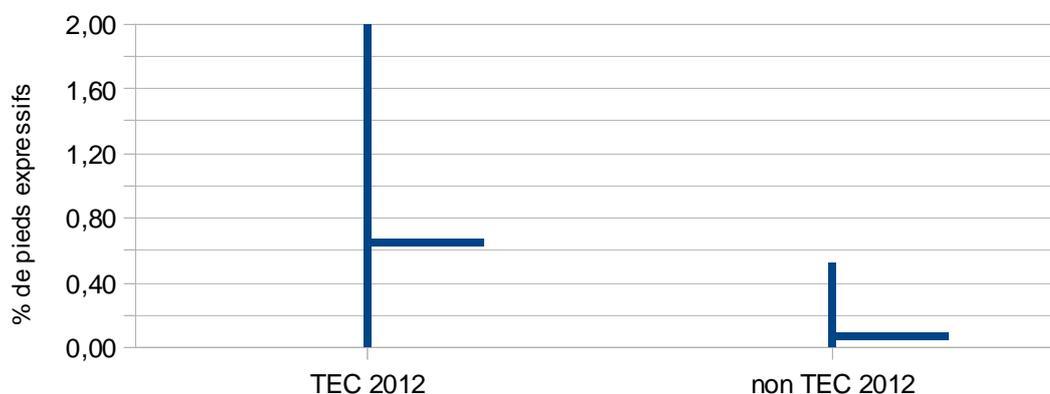
Intensité de l'Eutypiose 2011

Parcelles de Saône et Loire



Intensité de l'Eutypiose 2012

Parcelles de Saône et Loire



En moyenne les parcelles TEC expriment plus l'Eutypiose que les parcelles non touchées. Toutefois, l'intensité d'expression reste faible pendant les 3 années et sur toutes les parcelles (toujours inférieure à 2 %) et la différence moyenne entre les parcelles TEC et les

parcelles non TEC est faible : chaque année de l'ordre de l'écart type de l'expression entre les parcelles.

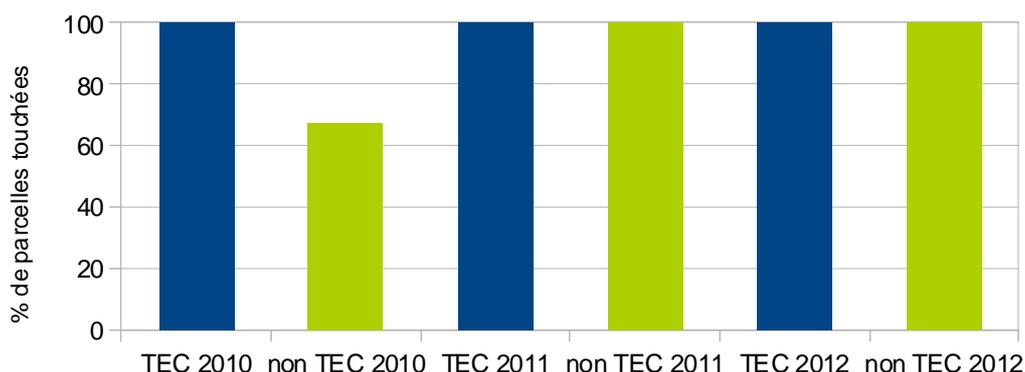
Expression de l'Eutypiose dans les parcelles de Saône-et-Loire (en % de pieds expressifs).

Saône et Loire	2010			2011			2012		
	TEC2010	non TEC2010	TEC-non TEC	TEC2011	non TEC2011	TEC-non TEC	TEC2012	non TEC2012	TEC-non TEC
max	1,04	0,53	0,53	1,52	1,04	1,52	2,03	0,52	2,03
min	0,00	0,00	-0,53	0,00	0,00	-0,02	0,00	0,00	0,00
moyenne	0,15	0,15	0,00	0,80	0,22	0,58	0,65	0,07	0,58
Écart type	0,39	0,25	0,31	0,58	0,41	0,62	0,76	0,20	0,80
fréquence de parcelles avec expression	14	29		71	29		57	14	

Vignes de 10 à 12 ans (parcelles de l'Aude)

Mis à part le lot de parcelles non TEC lors du comptage de l'année 2010, l'intégralité des parcelles exprime les symptômes d'Eutypiose chaque année.

Fréquence de parcelles touchées par l'Eutypiose Réseau de l'Aude



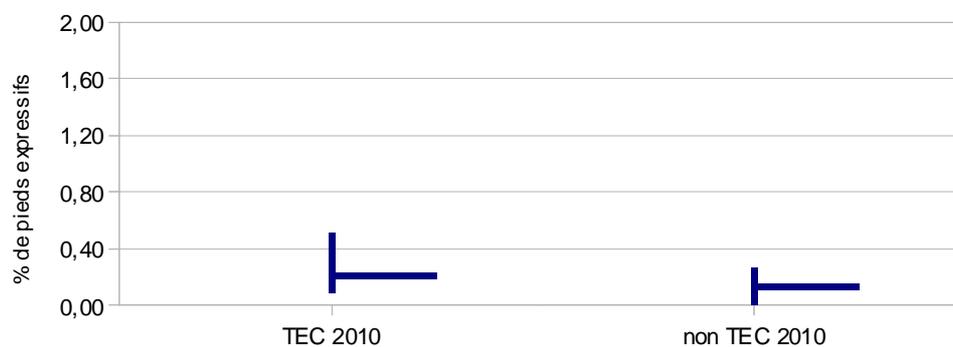
Les intensités d'expression sont du même ordre de grandeur que celles observées dans le réseau de parcelles de Saône-et-Loire c'est-à-dire faible, inférieures à 2 %. Comme l'indiquent les graphiques ci-dessous, les différences entre les deux modalités sont nulles à quasi-nulles.

Expression de l'Eutypiose dans les parcelles de Saône-et-Loire (en % de pieds expressifs).

Aude	2010			2011			2012		
	TEC2010	non TEC2010	TEC-non TEC	TEC2011	non TEC2011	TEC-non TEC	TEC2012	non TEC2012	TEC-non TEC
max	0,51	0,27	0,29	0,66	0,85	0,09	1,14	1,54	0,13
min	0,08	0,00	-0,10	0,31	0,34	-0,19	0,36	0,34	-0,40
moyenne	0,21	0,13	0,08	0,44	0,49	-0,05	0,79	0,83	-0,05
Écart type	0,15	0,11	0,16	0,12	0,19	0,11	0,28	0,41	0,20
fréquence de parcelles avec expression	100	67		100	100		100	100	

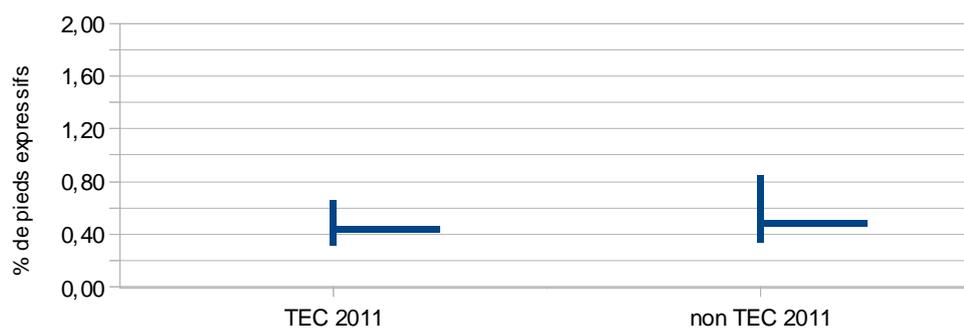
Intensité de l'Eutypiose 2010

Parcelles de l'Aude



Intensité de l'Eutypiose 2011

Parcelles de l'Aude



Intensité de l'Eutypiose 2012

Parcelles de l'Aude



3.2.4.3 - Esca / BDA

- Jeunes plantations (parcelles du Gard)

Comme pour l'Eutypiose, aucune expression n'a été notée pendant les trois années d'étude quelque soit la parcelle et la modalité.

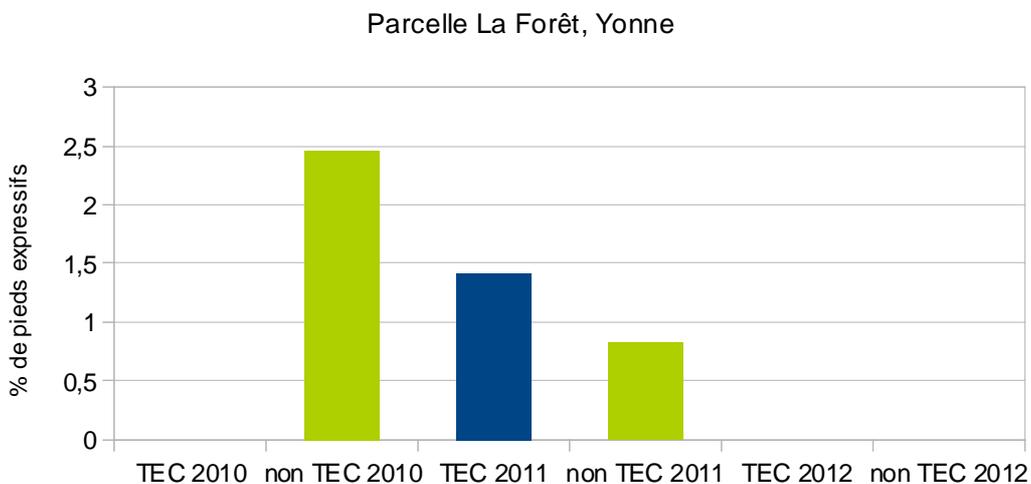
- Vignes de 4 à 7 ans (parcelles de Saône-et-Loire et Yonne)

Dans l'Yonne, les expressions sont nulles à faibles.

Dans les vignes plantées, un seul pied a été observé dans une modalité TEC. Il n'y a donc pas de différence entre les deux modalités.

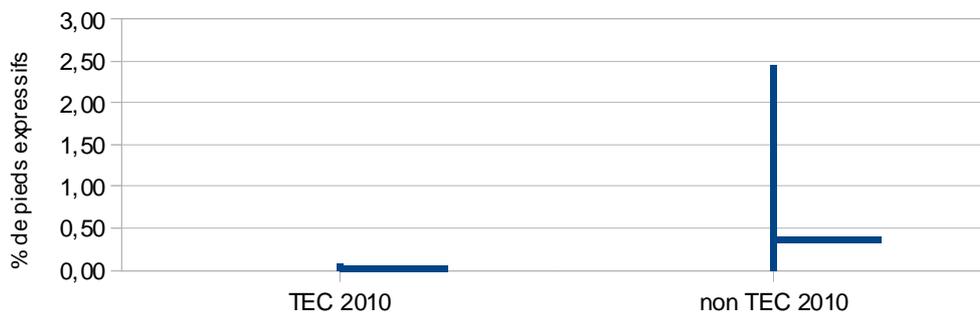
Dans les 3 parcelles retenues pour la thématique "plants de remplacement", deux parcelles n'ont jamais exprimé (durant la période couverte par l'étude) le moindre symptôme, quelle que soit la modalité. Pour une parcelle, notée "la forêt", les expressions sont variables selon l'année comme le montre le graphique ci-dessous.

Expression de l'Esca / BDA, influence du traitement à l'eau chaude



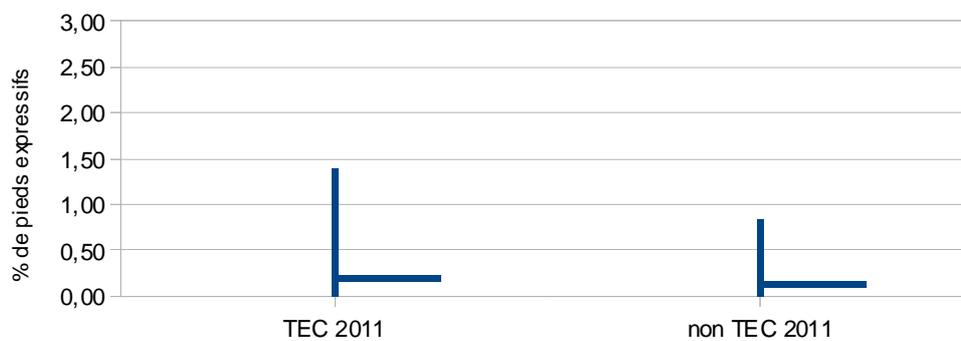
Intensité de l'Esca / BDA en 2010

Parcelles Yonne



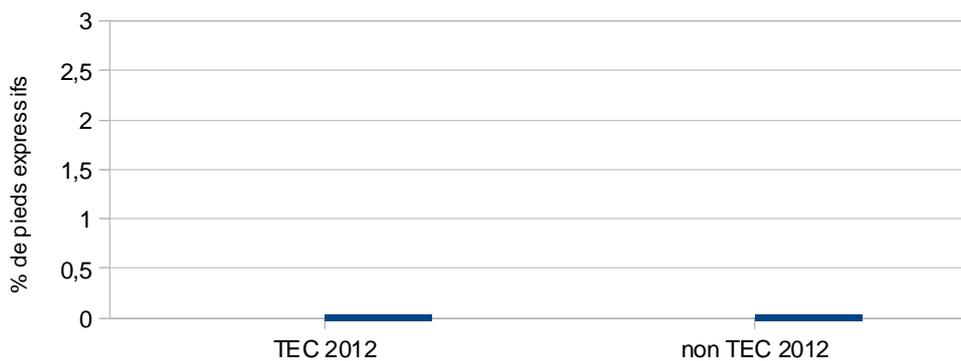
Intensité de l'Esca / BDA 2011

Parcelles Yonne



Intensité de l'Esca / BDA en 2012

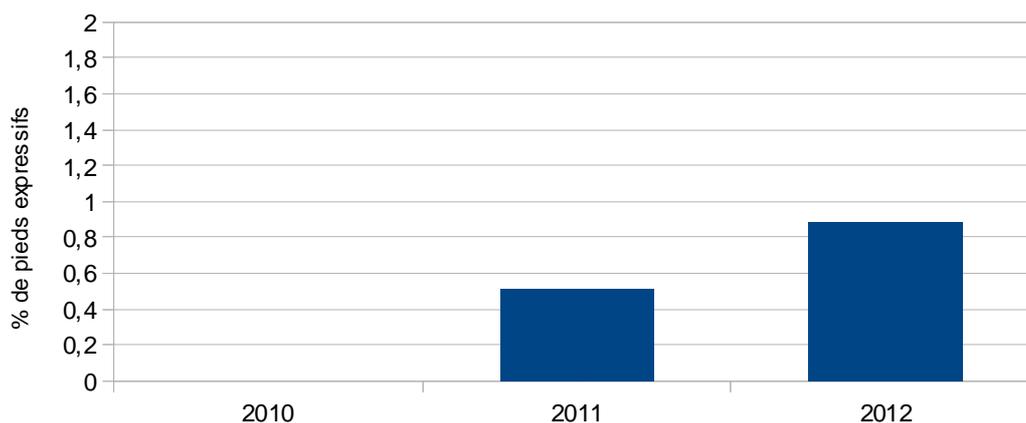
Parcelles Yonne



En Saône-et-Loire, les premières expressions ont été notées en 2011. Elles restent à un niveau plutôt faible, généralement inférieures à 3 %. En moyenne l'expression dans le réseau a subi une croissance continue sur la période de l'étude, passant de 0 % en 2010 à 0,88 % en 2012.

Evolution de l'expression de l'Esca / BDA

Réseau Saône et Loire



Deux parcelles ont montré en 2011 et 2012 une expression supérieure dans leur modalité TEC par rapport à leur modalité non TEC, une parcelle une expression supérieure en 2011 et 2012 dans sa modalité non TEC par rapport à sa modalité TEC, trois parcelles une expression supérieure ou égale en 2011 et 2012 dans leur modalité non TEC par rapport à leur modalité TEC et une parcelle a montré une expression supérieure dans sa modalité TEC en 2011 et supérieure dans sa modalité non TEC en 2012.

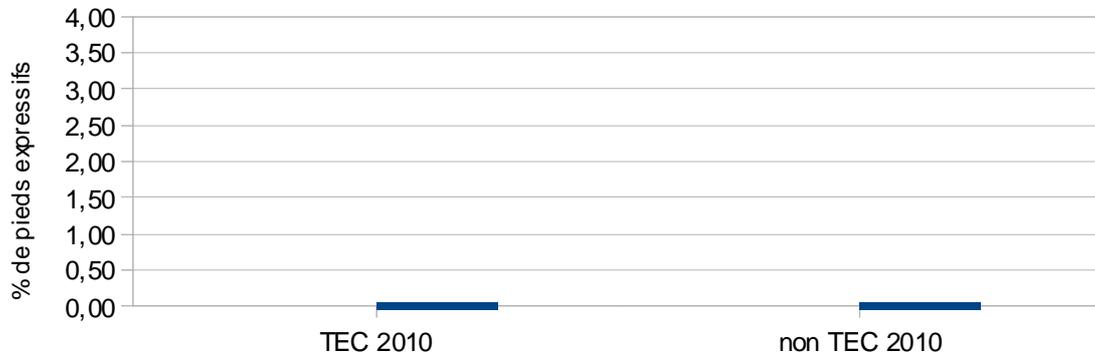
Aucune différence n'est donc montrée entre les deux modalités dans ce département. L'analyse statistique pluriannuelle de chaque parcelle prise individuellement ne fait apparaître de différence statistique entre les deux modalités que dans 1 parcelle sur 7 : la parcelle Barday. La différence en porte que sur le taux de jeunes plants, plus élevé dans la modalité non TEC (1,5 % en 2012 dans la modalité non TEC contre 0 % dans la modalité TEC).

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				23		3051.18	
traitement	1	0.00		22		3051.18	1.000000
symptome	3	3024.16		19		27.02	< 2.2e-16 ***
annee	2	0.00		17		27.02	1.000000
traitement:symptome	3	16.26		14		10.76	0.001003 **
traitement:annee	2	0.00		12		10.76	1.000000
symptome:annee	6	7.56		6		3.21	0.272507
traitement:symptome:annee	6	3.21		0		0.00	0.782535

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

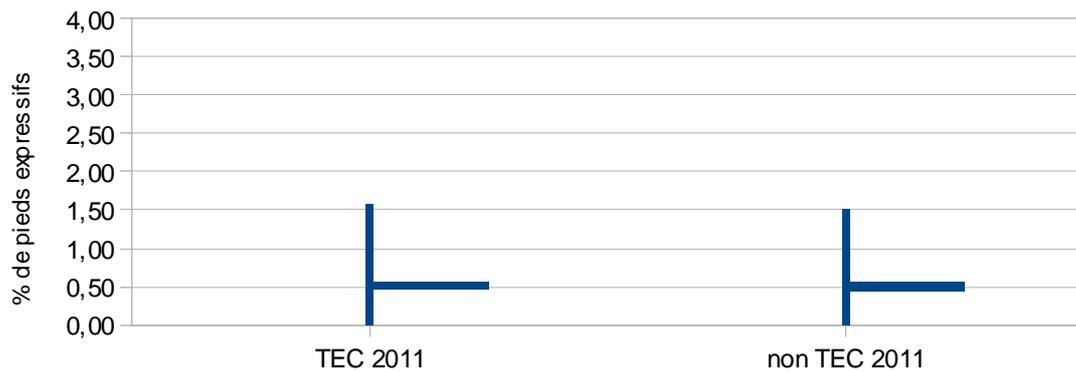
Intensité de l'Esca / BDA 2010

Parcelles de Saône et Loire



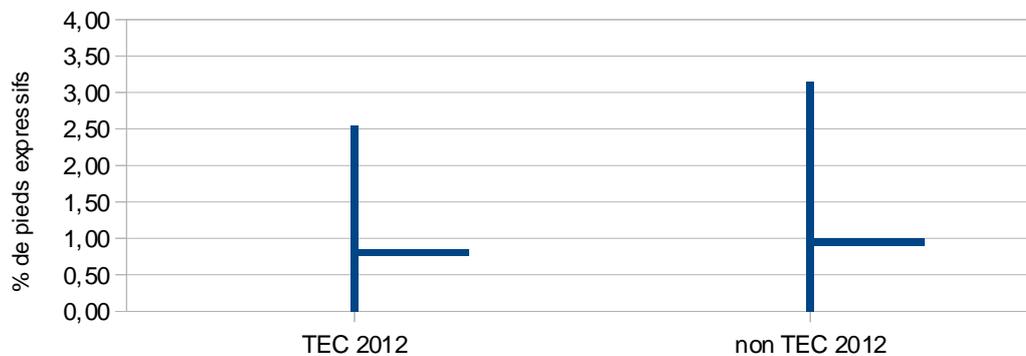
Intensité de l'Esca / BDA 2011

Parcelles de Saône et Loire



Intensité de l'Esca / BDA 2012

Parcelles de Saône et Loire

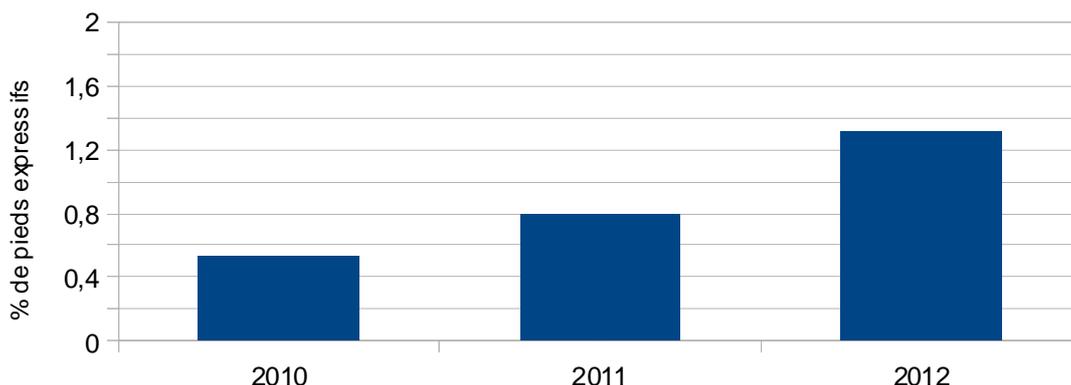


- Vignes de 10 à 12 ans (parcelles de l'Aude)

Dans les 6 parcelles suivies, toutes les modalités de toutes les parcelles ont exprimées des symptômes toutes les années de suivi. L'expression a augmenté au cours de l'étude (graphique ci-dessous) tout en restant à un niveau faible, moins de 1,5 % en moyenne).

Evolution de l'expression de l'Esca / BDA

Réseau Aude



Comme on peut le voir plus bas, l'évolution est identique dans les deux modalités, TEC ou non TEC et aucune différence n'est visible entre les deux réseaux. Une seule parcelle montre systématiquement une expression supérieure dans sa modalité non TEC par rapport à sa modalité TEC, les 5 autres parcelles montrent des expressions tantôt supérieures dans leur modalité TEC tantôt supérieures dans leur modalité non TEC.

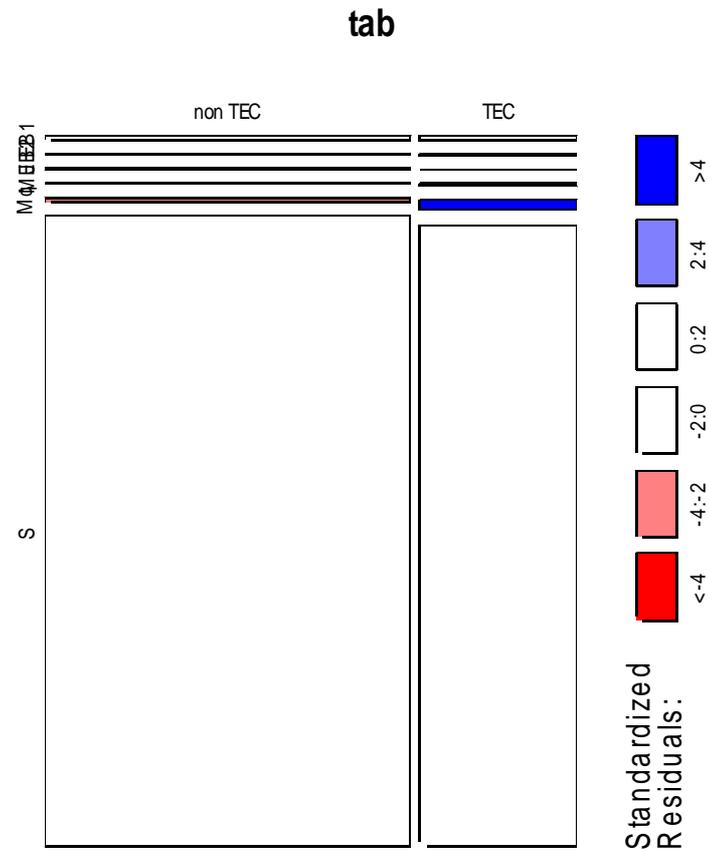
L'analyse statistique (pluriannuelle) ne fait pas ressortir d'influence du traitement dans 4 parcelles sur 6. Seules deux parcelles en font état.

Dans le premier cas, Cazal2, l'analyse indique de manière hautement significative que la modalité TEC a plus de morts et manquants que la modalité non TEC (2,19 % en 2012 dans la modalité TEC contre 0,85 % dans la modalité non TEC).

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				35		49666	
traitement	1	2292		34		47374	< 2.2e-16 ***
symptome	5	47302		29		71	< 2.2e-16 ***
annee	2	0		27		71	1.000000
traitement:symptome	5	42		22		30	7.143e-08 ***
traitement:annee	2	0		20		30	1.000000
symptome:annee	10	28		10		2	0.002143 **
traitement:symptome:annee	10	2		0		0	0.996357

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Mosaic Plot sur les données de la parcelle Cazal2



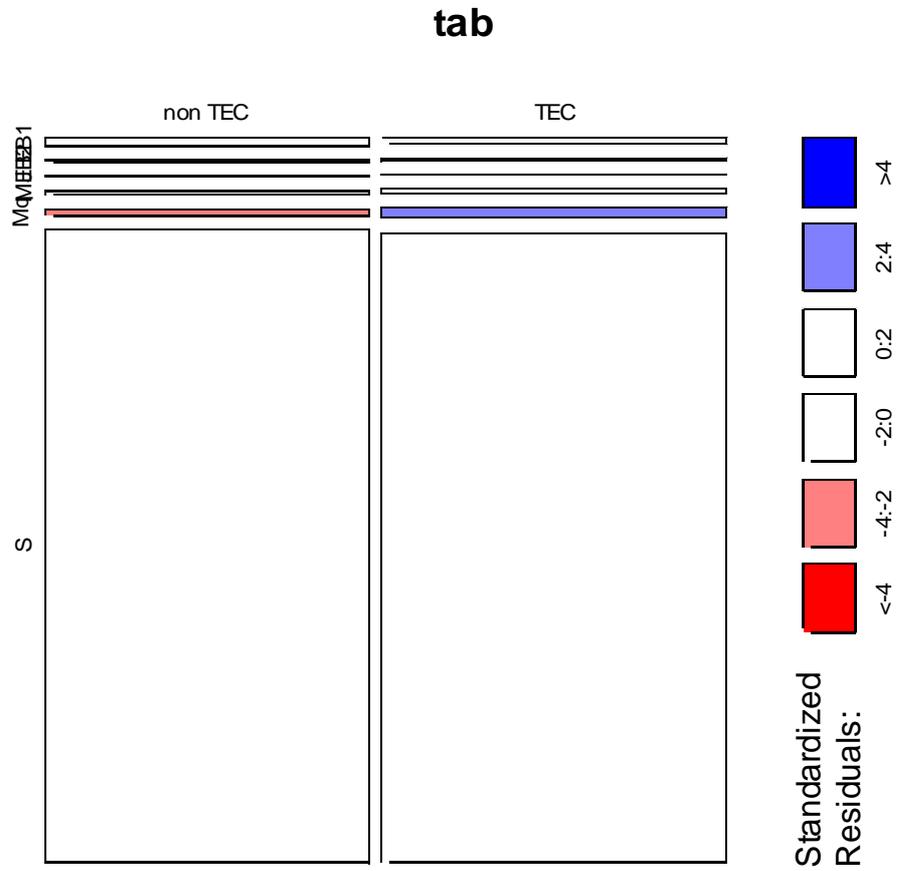
Dans le second cas, Marty - plantation 2000, il s'agit aussi d'une fréquence de manquants supérieure dans la modalité TEC.

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				35		18714.8	
traitement	1	6.0		34		18708.8	0.01440 *
symptome	5	18617.1		29		91.7	< 2.2e-16 ***
annee	2	0.0		27		91.7	1.00000
traitement:symptome	5	12.0		22		79.8	0.03493 *
traitement:annee	2	0.0		20		79.8	1.00000
symptome:annee	10	70.6		10		9.2	3.441e-11 ***
traitement:symptome:annee	10	9.2		0		0.0	0.51416

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

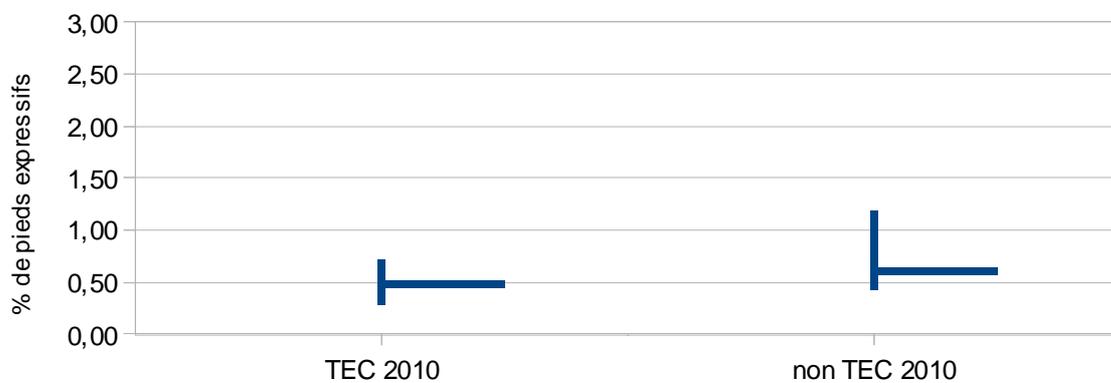
Notons que dans les deux cas, les mortalités constatées au bout de 12 ans restent très faibles.

Mosaic plot sur les données de la parcelle Marty 2000



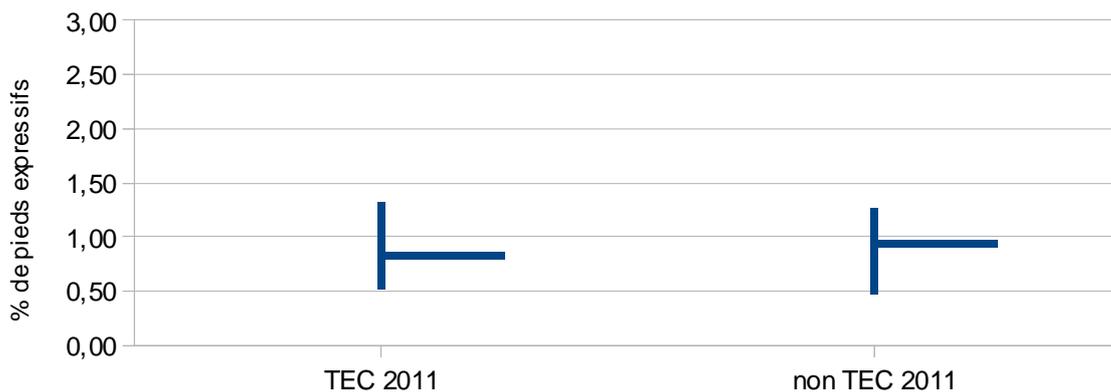
Intensité de l'Esca / BDA 2010

Parcelles de l'Aude



Intensité de l'Esca / BDA 2011

Parcelles de l'Aude



Intensité de l'Esca / BDA 2012

Parcelles de l'Aude



3.3 – Conclusion générale pour la sous action 2

Les parcelles ont été plantées récemment et les expressions constatées lors des observations 2010 - 2012 sont nulles à faibles. On note malgré tout une tendance à l'augmentation des intensités d'expression surtout pour l'Esca / BDA.

Néanmoins et bien que les analyses statistiques ne soient pas significatives du fait des faibles niveaux d'expression, il ne ressort aucune différence d'expression entre les modalités TEC et non TEC :

- en moyenne, dans les départements, les niveaux d'expression sont très proches à identiques,
- la hiérarchie des deux modalités, TEC et non TEC, varie soit d'une parcelle à l'autre, soit d'une année à l'autre dans la très grande majorité des cas.

3.4 – Bilan et perspectives

On peut donc conclure que le traitement à l'eau chaude des plants avant plantation selon la procédure en vigueur dans la lutte contre la Flavescence Dorée n'a pas conduit, dans les 12 premières années suivant la plantation, ni à une baisse ni à une hausse de l'expression des symptômes de l'Esca, du BDA et de l'Eutypiose, ni à une apparition plus précoce ou plus tardive des symptômes liés à la maladie.

Considérant ces résultats obtenus sur un nombre important de parcelles et une grande diversité de situations, il ne nous apparaît pas comme nécessaire de continuer cette étude. Il est, toutefois, important d'insister sur l'efficacité de ce traitement sur le phytoplasme de la Flavescence Dorée uniquement.

4 – Action 4 – Diffuser à l'ensemble de la profession les acquis scientifiques et avancées techniques obtenus

Responsable : Laurent Bernos - Service Vigne et Vin - Chambre d'Agriculture de la Gironde

4.1 – Rappel des objectifs attendus

Cette dernière action a pour objectif de mettre en place la diffusion des outils et des résultats expérimentaux obtenus.

La diffusion cible les pépiniéristes, les viticulteurs, les techniciens et les lycées agricoles par l'intermédiaire des différents supports actuels de communication. Il est apparu important dans le cadre de ce projet d'attacher une grande part à la diffusion des résultats.

4.2 – Axes de diffusion

Deux axes ont été retenus :

- Le premier a concerné la présentation du projet, de ces objectifs et des résultats attendus.
- Le second qui se fera plutôt dans la deuxième partie du projet s'articulera autour de la diffusion des résultats.

La diffusion au cours de la première année a essentiellement porté sur la présentation de l'action elle-même afin d'expliquer aux pépiniéristes les outils attendus et le gain que pourront en avoir les viticulteurs. Par la suite, ce sont les résultats du projet qui ont été diffusés.

4.2.1 - Présentation du projet retenu

Dès lors que le projet a été retenu, les différents acteurs impliqués dans le projet ont assuré la promotion de cette information.

Communications orales

CHAMBRE D'AGRICULTURE DE GIRONDE - Assemblée Générale des Pépiniéristes du Sud-Ouest - Lycée Agricole de Montagne (33) - 16/12/2009.

BNIC - Réunion du groupe de travail "qualité des plants" comprenant des représentants professionnels du Syndicat des Pépiniéristes Charentais, des viticulteurs charentais, des techniciens viticoles et de FranceAgriMer - 29/01/2010.

LARIGNON P - Les maladies du bois : eutypiose, esca, Black Dead Arm. Journée technique maladies du bois, Chambre d'Agriculture du Var, Hyères, 2010. (oral, écrit) - 16/02/2010.

LARIGNON P - Etat des lieux et perspectives sur les maladies du bois. Conseil de Département Viticole de l'IFV, Paris - 2010, 4/11/2010.

ECOLE D'INGENIEUR DE PURPAN, CHAMBRE D'AGRICULTURE DE GIRONDE, CHAMBRE D'AGRICULTURE DU VAUCLUSE - IFV GARD, TARN-ET-GARONNE - Journées Maladies du Bois - Domaine de l'Eclair (Villefranche/Saône) - 16-17/11/2010.

BNIC - réunion annuelle d'information organisée par "Charentes Alliance" à destination des viticulteurs - 25/11/2010.

BNIC - Assemblée Générale des Pépiniéristes Charentais - Décembre 2010.

IFV - Actualités sur les Maladies du Bois - Conférence Vinitech - Forum des Idées - Chambre d'Agriculture de la Gironde - 01/12/2010.

LARIGNON P. - Etat des lieux et perspectives sur les maladies du bois. Réunion FNSEA., Paris, 2010 - 8/12/2010.

Communications écrites

LARIGNON P. 2009. Les maladies du bois. Cinq projets de Recherche... La Marne Agricole, 13 nov. 40.

LARIGNON P. 2009. Les maladies du bois. Favoriser les projets de recherche. Union Girondine, déc. 2009, 39-40.

LARIGNON P. 2009. Les maladies du bois. Les Vins d'Alsace, 10, 14.

LARIGNON P. 2009. Maladies du bois. Des projets importants dans la Recherche... Carrefour des Groupes Viti-Oeno 41 (Loir-et-Cher), n°148, 3-4.

LARIGNON P. 2009. Maladies du bois. Les projets de recherche. Volonté paysanne du Gers, 1170, 6.

LARIGNON P. 2009. Les maladies du bois. Cinq projets de recherche retenus. Terre de Touraine, 30 octobre 2009, 9.

LARIGNON P. 2009. Maladies du bois : Cinq projets de recherche retenus. Le Vigneron du Val de Loire, 313, 16.

LARIGNON P. 2009. Maladies du bois : Cinq projets de recherche retenus. Le Paysan Vigneron, 1102, décembre 09, 28.

LARIGNON P. 2009. Maladies du bois. Le pépiniériste, 189, 41-42.

LARIGNON P. 2009. Le Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche finance cinq projets dans le domaine des maladies du bois (Lettre technique). Site internet www.vignevin.com (22 sept. 09).

LARIGNON P. 2010. Les maladies du bois. En pays varois, 884, 6.

LARIGNON P. 2010. Les maladies du bois. Le Vigneron Champenois, 2, 42-43.

LARIGNON P. 2010. Le ministère finance les recherches sur les maladies du bois et de la vigne. Le Paysan Tarnais, 4 février 2010, 7.

LARIGNON P. 2010. Appel à projets sur les maladies du bois. Le Paysan du Midi, 3306, 17.

4.2.2 - Présentation des résultats

Les premiers résultats obtenus ont ensuite été communiqués largement.

Communication orales

ECOLE D'INGENIEUR DE PURPAN - Journées Maladies du bois - Domaine de l'Eclair (Villefranche/Saône) - Chambre d'Agriculture de la Gironde, Vaucluse - IFV Gard, Tarn-et-Garonne - 16-17/11/2010.

BNIC - Réunion annuelle d'information organisée par "Charentes Alliance" - Décembre 2010.

BNIC - Assemblée Générale des Pépiniéristes Charentais - 25/11/2010.

Chambre d'Agriculture de la Gironde - IFV - Actualités sur les maladies du bois - Conférence Vinitech - Forum des Idées - 01/12/2010.

LARIGNON P. 2010 - Etat des lieux et perspectives sur les maladies du bois. Réunion FNSEA., Paris - 08/12/2010.

LARIGNON P. 2012. Assessment of quality of plants in French grapevine nurseries with regard to fungi involved in wood diseases. 8th IWGTD, Valence, Espagne - 18-21 juin 2012.

LARIGNON P., BAPTISTE C., MALLET J.F., GRANIER J.P. & BLOY P. 2012. Use of green-grafting technique for plant sanitation in the control of grapevine wood pathogens. 8th IWGTD, Valence, Espagne - 18-21 juin 2012.

VIGUES V., YOBREGAT O., MILLE B., BERUD F., AYME-SEVENIER V., BAPTISTE C. & LARIGNON P. 2012. Wood decay diseases and nursery : focusing on scion cuttings and rootstocks. 8th IWGTD, Valence, Espagne - 18-21 juin 2012.

Communications lors de colloques, de rencontres techniques à vocation de transfert

LARIGNON P. 2012. Etat des lieux : programmes AAP Casdar. **Vinitech** - Bordeaux, le 27 novembre 2012.

BERNOS L. 2012. Recherche et évaluation de procédés permettant la production de plants indemnes de champignons associés aux maladies du bois / programmes AAP Casdar. **Vinitech** - Bordeaux, le 27 novembre 2012.

LARIGNON P. 2012. Les maladies du bois. Etat des lieux. **Conseil technique du Bassin du Val-de-Loire** - Vertou, le 18 décembre 2012.

LARIGNON P. 2012. Les maladies du bois. Les axes de recherche - **Préfecture de Dijon**, 30 novembre 2012.

LARIGNON P. 2013. Sortir de l'impasse technique des maladies du bois en viticulture bio. **Assemblée générale de Vitibio** - Jonzac, le 28 janvier 2013.

LARIGNON P. 2013. L'essentiel sur les maladies du bois (esca et Black Dead Arm). **Stage de formation et de perfectionnement en viticulture** - Ostheim, les 6 et 7 février 2013.

LARIGNON P. 2013. Les maladies du bois : état des lieux - **Assemblée générale de la Cave coopérative de Buxy**, 13 février 2013.

LARIGNON P., BAPTISTE C., MALLET J.F., GRANIER J.P. & BLOY P. 2013. Evaluation de l'intérêt du greffage en vert pour l'assainissement des plants vis-à-vis des champignons associés aux maladies du bois de la vigne. **Journées du Groupe national des maladies du bois de la vigne** - Angers, les 19 et 20 mars 2013.

Rédaction de documents

BNIC - FranceAgriMer et le syndicat des pépiniéristes de la région du Cognac - "Maladies du bois : prophylaxie en bois et plants de vigne", février 2011.

BNIC - "Les pépiniéristes attentifs à la qualité du matériel végétal" - Le Paysan N°1114, 23 février 2011.

BNIC - Evaluation des propriétés fongicides et phytotoxiques de différents produits de désinfection vis-à-vis des champignons associés aux maladies du bois, 2010.

BNIC - Test de nouvelles méthodes d'élaboration des plants permettant de diminuer la pression de l'inoculum, 2010.

BNIC - Recherche et évaluation de procédés permettant la production de plants indemnes de champignons associés aux maladies du bois, Casdar années 2 et 3, 2012.

IFV Nîmes, CA84, SPBPVV - Evaluation de l'influence de l'âge des parcelles et de leur état sanitaire sur la qualité des plants à la sortie de la pépinière, années d'expérimentation 2011-2012.

IFV - Evaluation de l'intérêt du greffage en vert pour l'assainissement des plants vis-à-vis des champignons associés aux maladies du bois, année d'expérimentation 2010.

IFV Gaillac - Les champignons associés aux maladies du bois : années 2010 et 2011.

GUERIN-DUBRANA L., BERNOS L., CHEVRIER C., FONTAINE F. & GOMES E., REY P. juin 2013 - Note sur l'état des recherches en France sur les maladies du bois de vigne. Projets de recherche appliquée et d'innovation dans le domaine des maladies du bois de la vigne (projet CASDAR 2010-2012) - Sites internet www.vinopole.com; www.gironde.agriculture.fr; www.vignevin.com;

LARIGNON P. & BLOY P. 2012. La pépinière et les champignons des maladies du bois. **Carrefour des Groupes Viti-Oeno 41**, 174, 6-7.

LARIGNON P. & BLOY P. 2012. La pépinière et les champignons des maladies du bois. **L'Aurore Paysanne**, 832, 13.

LARIGNON P. & BLOY P. 2012. Maladies du bois de la vigne, le greffage en vert offre de nouvelles perspectives. **Le Paysan Tarnais**, 27 décembre 2012, 17.

LARIGNON P. & BLOY P. 2012. La technique du greffage en vert. **L'Exploitant Agricole de Saône-et-Loire**, 2520, 11.

LARIGNON P. & BLOY P. 2012. La piste du greffage en vert - **Terre de Touraine**, 1703, 7.

LARIGNON P. & BLOY P. 2012. La pépinière et les champignons des maladies du bois. <https://extranet.bivb.com/>

LARIGNON P. & BLOY P. 2012. La pépinière et les champignons des maladies du bois. http://www.sv-jura.com/medias/IFV-greffage_en_vert.pdf

LARIGNON P. & BLOY P. 2013. La pépinière et les champignons des maladies du bois. **Union Girondine**, 1096, 46-47.

LARIGNON P. & BLOY P. 2013. Le greffage en vert limite les champignons des maladies du bois. **Terres des Savoie**, 288, 24.

LARIGNON P. & BLOY P. 2013. En pépinière, la solution du greffage en vert. **L'Agriculteur Provençal**, 1513, 6.

LARIGNON P. & BLOY P. 2013. En pépinière, la solution du greffage en vert. **Paysan du Midi**, 3432, 16.

LARIGNON P., BAPTISTE C., MALLET J.F., GRANIER J.P. & BLOY P. 2013. Greffage en vert, premier test contre les maladies du bois. **Phytoma**, 661, 33-35.

VIGUES V. 2012. Maladie du bois, gros plan sur les greffons et porte-greffe en entrée de pépinière. **Phytoma**, 658, 26-28.

POUZOULET J. 2012. Thèse : Développement d'une méthodologie PCR en temps réel pour la détection de la quantification in planta des principaux champignons pathogènes associés aux maladies du bois de la vigne.

4.3 – Perspectives de diffusion

Les résultats obtenus continueront à être diffusés via les sites Internet des partenaires et les revues professionnelles.

L'utilisation des sites Internet outre le fait que ce canal de diffusion est maintenant très prisé, permet une reprise des articles écrits.

Concrètement, les résultats seront également diffusés lors des assemblées générales des ODG ou syndicats techniques.

IV - Les modalités de valorisation du projet

Outre les modalités de diffusion décrites dans le paragraphe précédent, les résultats obtenus pourront être valorisés et utilisés différemment.

L'action 1 a permis la mise au point d'un outil de PCR quantitative (QPCR) pour les actions 2 et 3 du projet. La détermination des amorces et des clés de lecture, la mise au point du test sur le matériel végétal ouvre la perspective de son utilisation pour déterminer l'efficacité des moyens de décontamination ou de lutte.

La généralisation d'un test QPCR pour le matériel végétal à destination des pépiniéristes voire des viticulteurs est une piste de transfert en cours : des mises au point ont été faites par des laboratoires privés (Océania - communication personnelle).

Le travail mené au sein de l'action 2 a permis de consolider des résultats concernant l'étape clé de la stratification et mis en évidence que l'état sanitaire des parcelles de vignes-mères de greffons n'influence pas le niveau de plants en sortie de pépinières.

Ce résultat va à l'encontre des avis actuels : il nécessite d'être affiné et confirmé par des études complémentaires.

Les moyens de désinfection du matériel végétal testés ont montré qu'ils n'influencent pas le niveau de contamination des plants en sortie de pépinières. Parallèlement, le travail sur des nouveaux substrats utilisables pendant la stratification n'a pas permis de dégager des pistes d'amélioration en terme de qualité des plants ou des taux de reprise.

Ces informations communiquées aux pépiniéristes ne remettent pas en cause les techniques actuelles de production des plants.

Le TEC modifie l'équilibre de la microflore des champignons associés aux maladies du bois, le projet n'a pas permis de mesurer un éventuel effet sur l'expression des maladies du bois, au moins au cours des 12 premières années qui suivent la plantation.

Ce résultat montre que le TEC (protocole de lutte contre le phytoplasme de la Flavescence Dorée) n'influe pas sur l'expression des symptômes des maladies du bois des plantations.

Ce point ne remet donc pas en cause les méthodes de productions actuelles.

V - Les perspectives

Les points forts et les points faibles du projet

Le projet a permis d'obtenir des résultats concrets qui répondent aux attentes de la profession. Concernant le déroulement du projet lui-même, l'articulation entre les résultats de l'action 1 (mise au point de l'outil QPCR) et son utilisation pour les actions 2 et 3 s'est parfaitement enchaînée.

On peut regretter un fonctionnement un peu trop cloisonné lié aux structures.

Les difficultés organisationnelles rencontrées

La difficulté majeure dans ce projet a concerné le déroulé de l'action 1. Elle a finalement été menée par un seul partenaire (El Purpan) alors qu'une collaboration était prévue. L'impact direct a été une perte d'activité et financière par l'IFV. Indirectement, cela a pesé sur la confiance entre les acteurs du projet et rendu difficile certaines réunions. Le bon déroulement du projet a pu être un moment compromis.

Le point clé concerne la description fine des actions afin d'éviter toute interprétation par la suite.

Concernant l'action de l'effet du TEC, il a été difficile de trouver des parcelles correspondant au protocole prévu dans le projet.

Les suites envisagées

Les actions à poursuivre seront réintégrées dans d'autres appels à projets car les actions restantes à travailler étaient insuffisantes pour le montage d'un projet cohérent.

Cela concerne par exemple la QPCR dont la sensibilité peut encore être améliorée et sur la détection d'autres champignons ou bien l'évaluation du traitement TEC associé au Switch comme moyen de désinfection.

L'effet de l'état sanitaire des parcelles de vignes-mères demande une poursuite des observations voire l'établissement d'un protocole spécifique.

Des observations complémentaires d'un échantillon plus important (sous forme de réseau par exemple) seraient souhaitables pour suivre les expressions des symptômes des maladies du bois sur les vignes traitées au TEC.

Conclusion

Ce projet avait pour but de travailler sur l'obtention de plants exempts de champignons responsables de l'expression des symptômes des maladies du bois.

La première étape a consisté à mettre un outil moléculaire de QPCR permettant l'identification de certains des champignons responsables. Cet outil a également permis de travailler directement sur les bois des plants. Il a été ensuite utilisé dans le dépistage de ces champignons lors des différentes études menées.

Il a été démontré que l'état sanitaire des parcelles de vignes-mères de greffons n'influçait pas le niveau de contamination des plants. Si la stratification est une étape clé dans les pépinières, aucun produit de désinfection ou de substrat de stratification testé n'a permis de définir de nouvelles méthodes de production de plants qui soient exempts de champignons associés aux maladies du bois.

Enfin, le travail sur l'influence du traitement à l'eau chaude des plants (protocole de lutte contre phytoplasme de la Flavescence Dorée) a montré que ce procédé n'influçait pas, au moins sur les 12 premières années, l'expression des symptômes des maladies du bois.

Les résultats obtenus ont permis de valider ou d'éliminer des pistes de travail. La durée du projet est très courte pour pouvoir confirmer certains résultats. Il est nécessaire de poursuivre certains essais d'autant que les professionnels sont désemparés face à la problématique des maladies du bois toujours aussi présente dans les vignobles.

Au-delà du côté technique, ce projet a permis de mettre en commun des moyens et de faire travailler ensemble des agents de structures différentes sur l'ensemble du territoire national en jouant sur la complémentarité. Ce réseau qui s'est construit peut être un facteur facilitant pour la diffusion d'informations et le travail en commun face aux maladies du bois.