

# Champignons associés aux maladies du bois : une enquête en pépinières

26

**RÉSUMÉ** Une enquête menée auprès des pépiniéristes du Sud-Est de la France a permis de mettre en évidence les champignons pionniers de l'esca (*Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*), ceux associés au Black Dead Arm (*Botryosphaeria obtusa*, *Neofusicoccum parvum*), l'agent responsable du pied noir (*Neonectria liriodendri*) et celui de l'excoriose (*Phomopsis viticola*) dans les plants après l'élevage au champ. Les champignons sont localisés sur des zones différents dans les plants. Les *Botryosphaeriaceae*, *P. viticola* et *P. aleophilum* sont trouvés préférentiellement dans leur partie haute (greffon, soudure, haut du porte-greffe) alors que *P. chlamydospora* est surtout rencontré à leur base (talon, bas du porte-greffe). *N. liriodendri* est quant à lui présent uniquement à leur base. L'utilisation d'outils moléculaires (PCR) révèle également leur présence à la surface du matériel végétal (greffons, porte-greffe), qui constituerait une source d'inoculum non négligeable pour les contaminations observées en pépinières.

Ces études montrent également qu'*Eutypa lata*, responsable de l'eutypiose, et *Fomitiporia mediterranea*, responsable de la pourriture blanche (amadou), ne sont pas trouvés dans les plants.

## MOTS CLÉS

PÉPINIÈRES, ESCA, EXCORIOSE, BLACK DEAD ARM, PIED NOIR

**ABSTRACT** A survey made in nurseries of south-east of the France showed that the pioneer fungi of esca disease, the fungi associated with Black Dead Arm, causal agents of black foot and *Phomopsis cane* and leaf spot were isolated from plants after planting. Fungi had some different locations in the plants. The *Botryosphaeriaceae*, *P. viticola* and *P. aleophilum* were found preferentially at the top of grafted cuttings (graft, graft union, top of the rootstock) where as *P. chlamydospora* was especially isolated from the zones located at their base (basal end, base of the rootstock). *N. liriodendri* was present only at their base. The use of molecular tools (PCR) also revealed their presence on the surface of the vegetative material (grafts, rootstock), which would constitute a considerable source of inoculum for the contaminations observed in nurseries.

These studies also showed that *Eutypa lata*, responsible for eutypa dieback, and *Fomitiporia mediterranea*, responsible for white rot (tinder), were not found in the plants.

## KEYWORDS

NURSERIES, ESCA, BLACK DEAD ARM, BLACK FOOT

Philippe LARIGNON  
Karine GIANSETTO  
Elian SALANCON  
IFV (Institut Français  
de la Vigne et du Vin)  
Domaine de Donadille  
30230 Rodilhan  
[philippe.larignon@itv-france.com](mailto:philippe.larignon@itv-france.com)  
04 66 20 67 04

Katia GIRARDON  
SPBPV  
384, route de Caderousse  
84100 Orange

François BERUD  
Olivier JACQUET  
Chambre d'agriculture  
du Vaucluse  
2260, route du Grès  
84100 Orange

Morvan COARER  
IFV (Institut Français  
de la Vigne et du Vin)  
Unité Pays-de-Loire  
44120 Vertou



Philippe LARIGNON

## Fungi associated with wood diseases : a survey in nurseries



Les maladies du bois sont considérées comme très dommageables pour la pérennité du patrimoine viticole, car les parasites responsables de ces maladies attaquent les organes pérennes de la vigne, provoquant à plus ou moins long terme la mort du cep. En France, les maladies du bois touchent les jeunes plantations (Pied noir)(Maluta et Larignon, 1991) et les vignes plus âgées (eutypiose, esca, Black Dead Arm) (Dubos, 1999, Larignon et Dubos, 1997, 2001, Larignon, 2004). Pour trouver des méthodes de lutte efficaces contre ces dépérissements, il est nécessaire de bien connaître le cycle biologique des champignons qui y sont associés. Les travaux rapportés dans cet article concernent la mise en évidence de certains champignons dans les plants à la sortie de la pépinière et l'identification des sources d'inoculum, qui seraient responsables des contaminations observées lors de leur fabrication.



### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### • Mise en évidence des champignons associés aux maladies du bois dans les plants

##### → Le matériel végétal

Douze lots de cinquante plants provenant de la région Sud-Est de la France, paraffinés, et prêts pour la commercialisation sont collectés en 2005 et 2006 (tabl. 1). Les pratiques utilisées en pépinières pour l'élaboration de ces plants sont décrites dans le tableau 2. La méthodologie d'analyse des plants

Les analyses microbiologiques sont effectuées selon la méthode de Larignon et Dubos (1997) à l'hypochlorite de calcium (60% de chlore actif

à 3%). 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), juste au-dessus de la plaie d'éborgnage (PG3) et le talon (PG4). Dix ou cinq morceaux de bois sont prélevés dans chacune des zones.

Liste des plants analysés

tableau 1	
N° lot	Cépage/porte-greffe
1	Grenache cl 435 /110R cl 151
2	Syrah cl 300/3309C cl 144
3	Alicante b. cl 804/140R cl 265
4	Syrah cl 525/161.49 cl 176
5	Chardonnay cl 095/Fercal cl 242
6	Grenache cl 135/110R cl 151
7	Mourvèdre N 369/110 Richter 151
8	Mourvèdre N 369/110 Richter 151
9	Mourvèdre N 369/110 Richter 232
10	Mourvèdre N 369/110 Richter 151
11	Mourvèdre N 369/110 Richter 151
12	Mourvèdre N 369/110 Richter 151

# Champignons associés aux maladies du bois : une enquête en pépinières

N° lot	Durée de stockage des bois (mois) Chambre froide	Méthodes de désinfection (Porte-greffe)	Méthodes de désinfection (greffons)	Eborgnage	Stratification	Elevage	Arrosage
1	3,5	aucun	aucun	manuel	tourbe	champ	goutte-à-goutte
2	3,5	aucun	aucun	manuel	tourbe	champ	goutte-à-goutte
3	2	aucun	aucun	manuel	eau	champ	goutte-à-goutte
4	1,5	Cryptonol		manuel	eau	champ	goutte-à-goutte
5	2	aucun	aucun	manuel	eau	champ	goutte-à-goutte
6	1,5	Cryptonol		manuel	eau	champ	goutte-à-goutte
7	2	Cryptonol (12h)	aucune	manuel	eau	champ	aspersion goutte-à-goutte
8	2,5	aucune	aucune	machine	eau	champ	aspersion goutte-à-goutte
9	4	Rovral, Dithane BB Mc 80	aucune	machine	eau	champ	aspersion goutte-à-goutte
10	1	Cryptonol	Cryptonol	manuel	eau	champ	aspersion
11	1	aucune	aucune	manuel	eau	champ	aspersion
12	2	aucune	aucune	manuel	eau	champ	aspersion
11	1	aucune	aucune	manuel	eau	champ	aspersion
12	2	aucune	aucune	manuel	eau	champ	aspersion

tableau 2

## Pratiques utilisées en pépinières pour chaque lot étudié

### • Mise en évidence des champignons à la surface du matériel végétal

→ Le matériel végétal et les analyses par PCR (Polymerase Chain Reaction)

En 2004, 2005 et 2006, des tronçons de bois d'une longueur approximative de 4 cm sont prélevés à la base de sarments de différentes origines (tabl. 3). Les tronçons de sarments sont mis dans des flacons de 40 ml auxquels ont été ajoutés 30 ml d'eau stérile. Après contact d'une heure, les flacons sont fortement agités. A partir des rinçats obtenus, l'ADN est extrait et les champignons

sont recherchés au moyen de la PCR. Les couples d'amorces utilisés sont rapportés dans le tableau 4.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### • Identification des champignons dans les plants à la sortie de la pépinière (tabl. 5)

Les champignons les plus souvent rencontrés appartiennent à la famille des Botryosphaeriaceae. Ils sont présents dans les 3/5e des plants étudiés. Parmi eux, ils sont trouvés à un pourcentage relativement identique, *Neofusicoccum parvum* 31,8% contre 20,5% pour '*Botryosphaeria obtusa*'. Les champignons pionniers de l'esca sont présents à des proportions moindres. *Phaeoconiella chlamydospora* est rencontré dans 10,3% des plants analysés et *Phaeoacremonium aleophilum* dans 3,8%. *Phomopsis viticola* est trouvé dans 37,1% des plants et *Neonectria liriodendri* (ex *Cylindrocarpon destructans*) dans 35,9%. Enfin, *Eutypa lata* et *Fomitiporia mediterranea* ne sont pas présents dans ces échantillons.

Le pourcentage d'isolement des différents champignons est variable selon le lot étudié. *P. chlamydospora* est plus particulièrement isolé sur les plants des lots 2 et 5 (34%) et pas du tout sur les plants du lot 10. *P. aleophilum* est isolé sur

		Nombre	Dates de prélèvement
Lot 1	41B clone 153	100	Janvier 2005
Lot 2	Cabernet Sauvignon	100	Décembre 2004
Lot 3	Ru 140	50	Février 2005
Lot 4	S04 clone 102	50	Janvier 2005
Lot 5	Sauvignon	400	Janvier 2006
Lot 6	Sauvignon	400	Novembre 2006

tableau 4 Les couples d'amorces utilisés pour la détection

<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	<i>Botryosphaeriaceae</i>
PCH1/PCH 2: Tegli et al	PAL1/PAL2: Péros (couple 5 PAP01)	Botryof2/BotryofR (Coarer)
PCL1/PCL2: Groenwald et al	PAL3/PAL4: Péros (couple 6 PAC06)	



huit lots de plants, à une proportion variant de 2 à 12%. Les champignons de la famille des Botryosphaeriaceae sont présents à des pourcentages variant entre 28 et 96,1%. Quant aux *P. viticola* et *N. liriodendri*, ils sont présents respectivement à un pourcentage variant entre 1,8 et 88%, et 20 et 68%. Cette variabilité entre les lots peut être due à l'origine du matériel végétal et/ou au processus de fabrication des plants en pépinière.

Les plants analysés en vue de la commercialisation peuvent par conséquent présenter un ou plusieurs des champignons associés aux maladies du bois. En ne tenant pas compte du *P. viticola* qui est impliqué dans l'excoriose ou du *N. liriodendri*, responsable du Pied noir, on constate, qu'en moyenne, les 2/3 des plants analysés en présentent au moins un (esca ou BDA). Parmi ces 67,9% de plants infectés, 10% en hébergent deux (1% les champignons pionniers de l'esca (*P. aleophilum* ou *P. chlamydospora*) et un champignon de la famille des Botryosphaeriaceae), et 0,3% des plants en présentent trois.

#### • Leur localisation dans les plants (tabl. 6)

Leur localisation diffère dans les plants. Les Botryosphaeriaceae, *P. viticola* et *P. aleophilum* sont présents préférentiellement dans leur partie

haute (greffon, soudure, haut du porte-greffe) alors que *P. chlamydospora* est rencontré le plus souvent dans les zones situées à leur base (bas du porte-greffe). Le champignon *N. liriodendri* n'est isolé qu'à la base du plant.

La localisation des champignons permet d'imaginer leurs voies de pénétration dans le plant. D'une manière générale, ils pénètrent par les plaies occasionnées par le débitage, l'ébourgeonnage ou encore le greffage. Les Botryosphaeriaceae, *P. aleophilum* et *P. viticola* pénètrent surtout par les plaies situées dans la partie haute du plant, alors que *P. chlamydospora* entre le plus souvent par celles localisées à la base. Les étapes au cours desquelles ont lieu les contaminations ont été en partie identifiées. Les Botryosphaeriaceae et *P. chlamydospora* pénètrent dans les greffes-boutures au stade de la stratification (Viguès *et al.*, 2005, Larignon *et al.*, 2007). *P. aleophilum* semble contaminer les plants lors de l'élevage au champ (Larignon *et al.*, 2007) Pour *N. liriodendri*, il n'est présent qu'à leur base, signifiant que les contaminations ne se feraient qu'à ce niveau lors de l'élevage au champ. Selon Halleen *et al.* (2006), ce champignon est rarement rencontré dans le matériel végétal (greffons et porte-greffe), les contaminations se font via le sol.

N° lot	Nb <sup>+</sup>	Pch	Pal	Bot total	Bp	Bo	Bsp.	Pv	Nl	El	Fm
1	50	4	12	54	36	2	28	60	nd	0	0
2	50	34	4	28	6	6	8	42	nd	0	0
3	50	2	2	44	28	12	6	64	nd	0	0
4	50	2	0	42	36	8	24	22	nd	0	0
5	50	34	4	44	36	12	24	88	nd	0	0
6	50	2	0	58	26	30	12	22	nd	0	0
7	54	16,7	11,1	75,9	1,8	68,5	9,3	1,8	31,5	0	0
8	52	1,9	0	96,1	63,5	15,4	30,8	9,6	26,9	0	0
9	50	10	2	58	24	30	14	26	68	0	0
10	50	0	0	74	48	12	22	30	20	0	0
11	50	6	2	80	38	44	4	22	38	0	0
12	48	10,4	8,3	66,7	39,6	2,1	37,5	60,4	31,2	0	0
TOTAL (nb de plants infectés)	604	62	23	363	192	124	110	224	109	0	0
TOTAL (% de plants infectés)		10,3	3,8	60,1	31,8	20,5	18,2	37,1	35,9	0	0

Identification des champignons dans les plants. Les résultats sont exprimés en % de plants présentant le champignon.

(Pch = *Phaeoconiella chlamydospora*, Pal = *Phaeoacremonium aleophilum*, Bot total = Botryosphaeriaceae totaux, Np = *Neofusicoccum parvum*, Bo = '*Botryosphaeria obtusa*', Bsp = autres Botryosphaeriaceae, Pv = *Phomopsis viticola*, Nl = *Neonectria liriodendri*, El = *Eutypa lata*, Fm = *Fomitiporia mediterranea*)

tableau 5

# Champignons associés aux maladies du bois : une enquête en pépinières

30

tableau 6

	Pch (%)	Pal (%)	B. obtusa (%)	N. parvum (%)	Autres Bot <sup>2</sup> (%)	P. viticola (%)	N. liriodendri (%)
G	3,9	16	14,7	19,8	23,5	22,9	0
S	1,3	4	39,1	36,7	28,2	26,6	0
PG1	23,4	60	24,9	20,6	14,7	26,8	0
PG2	15,6	8	10,6	8,6	12,4	15,9	0
PG3	51,9	12	5,1	5,7	10,6	4,4	15,1
PG4	3,9	0	5,6	8,6	10,6	3,4	84,9

Répartition des champignons associés aux maladies du bois dans les plants (G = greffon, S = soudure, PG1 = 1 cm au-dessous de la soudure, PG2 = mi-porte-greffe, PG3 = juste au-dessus de la plaie d'éborgnage, PG4 = talon). Les résultats sont exprimés en %.

tableau 7

Couples d'amorces	PCL	PCH	PAL 1/2	PAL 3/4
Ref Rinçat	% de sarments présentant en surface Pch		% de sarments présentant en surface Pal	
Lot 1	9	20	11	12
Lot 2	10	5	9	3
Lot 3	10	4	7	6
Lot 4	30	10	4	24
Lot 5	14	1,8	1,5	3,3
Lot 6	nd	17,1	6,9	nd

Détection par PCR des champignons en surface du matériel végétal. (nd = non déterminé) (Pch = *P. chlamyospora*, Pal = *P. aleophilum*)

### • Identification des sources d'inoculum

(tabl. 7 et 8)

Les champignons pionniers de l'esca sont détectés à la surface des bois de greffons ou de porte-greffe. Le taux de détection est variable selon le couple d'amorce utilisé. Le taux de présence maximal (réponse avec au moins un couple d'amorce) diffère entre les lots, il varie entre 10 et 38 % pour *P. chlamyospora* et de 18 à 26 % pour *P. aleophilum*. Les deux champignons peuvent être même détectés à leur surface (entre 1,5 et 12 % des tronçons de sarments étudiés). Pour les *Botryosphaeriaceae*, ils sont également trouvés à la surface des bois. Ils sont détectés dans 4,5 % (lot 5) et 28,1 % (lot 6) des échantillons analysés.



La présence des champignons à la surface du matériel végétal pourrait constituer une source d'inoculum non négligeable pour les contaminations observées en pépinières.

	Lot 1		Lot 2		Lot 3		Lot 4		Lot 5		Lot 6	
	Pch	Pal	Pch	Pal	Pch	Pal	Pch	Pal	Pch	Pal	Pal	Pch
Taux de contamination minimum (positif pour les deux couples d'amorce)(%)	9	5	5	3	0	2	2	2	0,3	0	nd	nd
Taux de contamination max (positif pour au moins 1 des 2 couples d'amorce)(%)	20	18	10	9	24	18	38	26	15,5	4,8	nd	nd
Taux de contaminations par Pch et Pal (%)	7		4		6		12		1,5		2,6	
Taux de contaminations total (par Pch et/ou Pal)(%)	30		15		36		50		18,5		21,4	

tableau 8

Détection par PCR des champignons en surface du matériel végétal. Les résultats sont exprimés en pourcentage de sarments présentant le champignon en surface (nd = non déterminé) (Pch = *P. chlamyospora*, Pal = *P. aleophilum*)



## CONCLUSION

L'enquête menée chez les pépiniéristes du Sud-Est de la France a mis en évidence la présence des champignons associés aux maladies du bois dans les plants à la sortie de la pépinière. La comparaison de ces résultats avec ceux portant sur l'analyse du matériel végétal à l'entrée de la pépinière (Larignon *et al.*, 2007) révèle la présence de contaminations qui se sont déroulées lors de la fabrication des plants. Ces contaminations sont probablement dues aux sources d'inoculum situées à la surface du matériel végétal.

Les recherches porteront maintenant sur la mise au point de méthodes de lutte qui permettront d'éradiquer les sources d'inoculum pour éviter les contaminations qui ont lieu lors de l'élaboration des plants.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à la participation financière de Viniflhor et du CASDAR.

## BIBLIOGRAPHIE

- Dubos B., 1999. Maladies cryptogamiques de la vigne. Editions Féret, Bordeaux, 176 p.
- Groenewald M., Denman S. & Crous P.W., 2000. A PCR-based method for the detection of *Phaeoconiella chlamydospora* in grapevines. South African Journal of Science. 96, 43-46.
- Halleen F., Fourié P.H. & Crous P. W., 2006. A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*. 45, S55-S67.
- Larignon P., 2004. Réflexions sur l'esca. *Phytoma*, 576, 28-31.
- Larignon P. & Dubos B., 1997. Fungi associated with Esca disease in grapevine. *European Journal of Phytopathology*, 103, 147-157.
- Larignon P. & Dubos B., 2001. Le Black Dead Arm. Maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca. *Phytoma*. 538, 26-29.
- Larignon P., Berud F., Girardon K. & Jacquet O., 2007. Premiers résultats sur le cycle biologique des champignons associés aux maladies du bois de la vigne en pépinières. *Rhône en VO*. 2, 16-23.
- Maluta D.R. & Larignon P., 1991. Pied noir : mieux prévenir. *Viti*. 11, 71-72.
- Tegli S., Bertelli E. & Surico G., 2000. Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR based assay for the detection of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea*. 39, 134-149.
- Viguès V., Serrano E., Dumas C., Coarer M., Yobregat O. & Larignon P., 2005. Les champignons associés aux maladies du bois et la pépinière. In : Euroviti, 30 nov-1er déc., Montpellier, 51-59.
- Whiteman S.A., Jaspers M.V., Stewart A. & Ridgway H.J., 2002. Detection of *Phaeoconiella chlamydospora* in soil using species-specific PCR. *New Zealand Plant Protection*. 55, 139-145.