

AFPP – 8<sup>eme</sup> CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES  
TOURS – 5 ET 6 DECEMBRE 2006

ETUDE DE L'AGRESSIVITE DES CHAMPIGNONS  
IMPLIQUES DANS L'ESCA ET LE BLACK DEAD ARM DE LA VIGNE

C. LAVEAU<sup>(1)</sup>, A. LETOUZE<sup>(2)</sup>, G. LOUVET<sup>(1)</sup>, S. BASTIEN<sup>(1)</sup>, L. GUERIN-DUBRANA<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMRSV INRA-ENITA Bordeaux, 71 avenue E. Bourleaux, BP 81, 33883 Villenave  
d'Ornon Cedex –France– l-guerin@enitab.fr

<sup>(2)</sup> IUT, Site Universitaire, 24019 Périgueux cedex –FRANCE– anne.letouze@u-bordeaux4.fr

**RESUME :**

L'esca et le black dead arm sont des syndromes de dépérissement de la vigne impliquant plusieurs champignons lignicoles: *Botryosphaeria parva*, *Botryosphaeria obtusa*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeomoniella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum*. Afin de comparer l'agressivité de 10 souches de chacun de ces champignons, un essai d'inoculation de boutures de vigne (var. Cabernet Sauvignon) est mis en place sous tunnel. Cinq mois après l'inoculation, si toutes les espèces de champignons sont capables de générer des nécroses dans le bois, de grandes différences intraspécifiques et interspécifiques sont notées. *P. chlamydospora*, considéré comme un des champignons pionniers de l'esca, présente une forte capacité d'envahissement des vaisseaux du bois contrairement à *F. mediterranea* qui induit de petites lésions. Pour *Botryosphaeria*, une grande diversité de réponses est observée entre souches.

Mots clefs : esca, black dead arm, vigne, agressivité, inoculation.

**SUMMARY :**

**PATHOGENECITY STUDY OF FUNGI IMPLICATED IN ESCA AND BLACK DEAD ARM OF GRAPEVINE**

Esca and black dead arm are syndroms of grapevine decline associated with fungi: *Botryosphaeria parva*, *Botryosphaeria obtusa*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. An inoculation experiment on rooted grapevine cuttings (cv. Cabernet Sauvignon) conducted under open greenhouse was carried out in order to compare pathogenicity of 10 isolates for each fungus. Five months after inoculation, all these fungi degraded woody tissue and large differences between isolates and between species were observed. *P. chlamydospora*, described as a pionner of esca, present a greater capacity to colonize the woody tissue than *F. mediterranea*. Among *Botryosphaeria* isolates, a large diversity of host response was observed.

Key-words : esca, black dead arm, grapevine, pathogenicity, inoculation

## INTRODUCTION

Les maladies du bois de la vigne telles que l'Esca et le Black Dead Arm (BDA) engendrent une mort prématurée des ceps entraînant une menace pour la pérennité du vignoble (Dubos et Larignon, 1988). En l'absence de moyens de lutte efficaces et économiquement acceptables, les pertes pour les viticulteurs sont à la fois quantitatives et qualitatives notamment du fait d'un rajeunissement de l'encépagement.

Ces maladies apparaissent comme très complexes. Au vignoble, l'expression des symptômes foliaires est irrégulière et imprévisible. Plusieurs facteurs tels que le climat, les pratiques culturales, la vigueur ou encore l'âge de la vigne pourraient être responsables de cette variabilité mais sans que l'on sache encore quel est le degré d'implication de chacun. La complexité de ces maladies est également liée au fait que les agents pathogènes impliqués sont des champignons lignicoles internes et qu'il semblerait qu'un ou plusieurs des champignons suivant soit en cause : *Botryosphaeria obtusa* et *Botryosphaeria parva*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeoconiella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum*, sans que le rôle respectif de chacun soit clairement établi (Mugnaï *et al.*, 1999). Le développement de nouveaux moyens de lutte efficaces ne pourra se faire sans une meilleure compréhension du rôle de chacun des champignons incriminés et des facteurs régissant l'expression des symptômes de ces maladies de dépérissement.

Dans ce contexte, l'objectif à long terme de cette étude est de reproduire les symptômes de ces maladies en conditions contrôlées, afin de mieux appréhender les différents facteurs impliqués dans l'expression de ces syndromes. Les premiers résultats d'une enquête épidémiologique dans le vignoble bordelais montrant notamment une relation positive entre le taux d'expression foliaire de ces syndromes et la réserve utile des sols (Guérin *et al.*, 2005), pourront fournir des hypothèses d'études expérimentales. Dans un premier temps, afin de choisir le matériel fongique nécessaire, un essai en conditions semi contrôlées est mis en place. Des contaminations artificielles sur boutures sont réalisées afin de tester la fiabilité et la reproductibilité d'une méthode d'inoculation (Péros et Berger, 1994) et de caractériser l'agressivité de plusieurs souches de chacun des champignons cités précédemment. Les résultats de cet essai permettront d'initier avec les souches retenues d'autres expérimentations combinant des infections simples ou multiples et des conditions physiologiques différenciées de l'hôte.

## MATERIELS ET METHODES

### Champignons pathogènes et souches

L'agressivité de souches appartenant à 5 genres et 6 espèces de champignons est étudiée : *B. obtusa* (Bo), *B. parva* (Bp), *E. lata* (El), *F. mediterranea* (Fm), *P. chlamydospora* (Pch) et *P. aleophilum* (Pal). Pour chaque genre, 10 souches fongiques (exceptée Pal, 9 souches) sont sélectionnées selon des origines géographiques variées (Tab. I). La souche 1 d'*E. lata*, les souches 1, 2, 4 et 5 de *B. obtusa* sont choisies en fonction de résultats connus sur leur niveau d'agressivité (Larignon *et al.*, 2001, Péros *et al.*, 1999) et les souches 1, 3, 5, 8 et 9 de *P. chlamydospora* selon des haplotypes différents (Borie *et al.*, 2002). Chacune de ces souches est conservée à 5°C avant d'être mise en culture à 22°C, en boîte de Pétri sur un milieu gélosé Malt pour l'essai.

### Préparation et élevage des plants

Des sarments de Cabernet Sauvignon, récoltés en janvier 2005 dans le vignoble expérimental de l'INRA à Villenave d'Ornon (33), sont débités en 600 boutures à 2 bourgeons calibrées selon leur diamètre (9 mm (+/- 1,2 mm)) et leur longueur de mérithalle (84 mm (+/- 0,8 mm)). Les boutures sont désinfectées dans une solution de CRYPTONOL (3,5L/hL, pH=7,5) pendant 1 nuit puis mises à enraciner dans du sable, sur une couverture chauffante (25°C), pendant 1 mois et arrosées quotidiennement. Après enracinement, elles sont transférées dans des pots de 0,5L remplis d'un mélange commercial «Klassman RHP15» composé de sphaigne (70%), de tourbe blonde (15%), de perlite et d'argile (15%). Ces boutures sont

ensuite placées en serre à 25°C pendant 2 mois. Elles sont arrosées 3 fois par semaine et fertilisées 1 fois par semaine avec une solution commerciale « Peter's professional » (3\*20 U NPK + éléments trace, 2g/L) en sub-irrigation. Les boutures sont alors inoculées et laissées en serre pour une période d'adaptation de 15 jours. A l'issue de ces 15 jours, elles sont repotées dans des pots de 2,5L (même mélange que précédemment). Après une seconde période d'adaptation, elles sont transférées sous un tunnel ouvert. Pendant les 5 mois de croissance, les plants sont arrosés 4 fois par semaine, fertilisés avec une solution « Peter's professional » 1 fois par semaine en sub-irrigation et rognés régulièrement à une hauteur d'environ 1m.

Tableau I : Identification et origine des 49 souches sélectionnées (pour les abréviations, cf. texte).

Identification and origin of the 49 selectionned isolates (for abbreviation, see the text)

Espèces	Souches	Origine géographique
Bo	1	Perpignan (66)
Bo	2	Die (26)
Bo	3	Naujean et Postiac (33)
Bo	4	St Julien Beychevelle (33)
Bo	5	Avize (51)
Bp	6	Nimes (30)
Bp	7	Armagnac (32)
Bp	8	Pauillac (33)
Bp	9	Mardeuil (51)
Bp	10	Nimes (30)
El	1	Bordeaux (33)
El	2	St Christophe des Bardes (33)
El	3	Provence (France)
El	4	Vérone (Italie)
El	5	Traenheim (67)
El	6	Rouffach (68)
El	7	Avisé (51)
El	8	Orbais (51)
El	9	Julienne (16)
El	10	Les touches de Périgny (17)
Fm	1	St Prieul (16)
Fm	2	Jurançon (64)
Fm	3	Pouillac (17)
Fm	4	St Christophe des Bardes (33)
Fm	5	Zellenberg (68)

Fm	6	Eichhoffen (67)
Fm	7	Leyrac (34)
Fm	8	Macau (33)
Fm	9	Moncaup (64)
Fm	10	St Prieul (16)
Pch	1	Moncaup (64)
Pch	2	Julienne (16)
Pch	3	Montbazillac (24)
Pch	4	Ribeauvillé (68)
Pch	5	Saint Laurent de C. (11)
Pch	6	Martillac (33)
Pch	7	Espiet (33)
Pch	8	Labastide d'Armagnac (40)
Pch	9	Pouillac (17)
Pch	10	Rouffach (68)
Pal	1	Aydie (64)
Pal	2	Soublecause (65)
Pal	3	Julienne (16)
Pal	4	Les touches de Périgny (17)
Pal	5	St Julien Beychevelle (33)
Pal	6	Montbazillac (24)
Pal	7	Marlenheim (67)
Pal	8	Rouffach (68)
Pal	9	Assignan (34)

### Méthodes d'inoculation

Parmi les 600 plants, 500 sont inoculés, les 100 autres servant de témoin. Après désinfection, un trou de 3 mm de diamètre est percé jusqu'à la moelle à environ 3 cm sous le bourgeon supérieur. Le mycélium d'un explant de 5 mm de diamètre, prélevé dans chacune des cultures fongiques, est introduit dans l'orifice. Le site d'inoculation est scellé avec de la paraffine. Pour chaque genre de champignon, 100 plants sont ainsi inoculés (10 plants/souche, Tab. I).

Deux types de témoins sont utilisés : 50 plants (Tp) sont perforés à l'identique et une simple pastille de milieu Malt-Agar stérile est introduite dans le trou de perforation et 50 autres plants (Tnp) n'ont subi aucun traitement.

### Dispositif expérimental de l'essai sous le tunnel

L'ensemble des plants est déposé sur des tablettes métalliques situées à 1m de hauteur. Les 5 genres de champignon sont disposés successivement sur la longueur du tunnel (20m, Fig. 1). Au sein de chaque genre de champignon, les 10 souches (10 plants/souche) sont totalement randomisées. A ces 100 plants par genre, sont ajoutés 10 plants de chaque type de témoin (Tp et Tnp), eux aussi totalement randomisés au sein des plants inoculés (Fig. 1).

Figure 1 : Dispositif expérimental sous le tunnel (pour les abréviations, se référer au texte)  
Experimental design in open greenhouse (For abbreviations, see the text)

Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5
10 souches des espèces <b>Bo</b> et <b>Bp</b>	10 souches de l'espèce <b>Fm</b>	9 souches de l'espèce <b>Pal</b>	10 souches de l'espèce <b>Pch</b>	10 souches de l'espèce <b>EI</b>
10 plants/souche	10 plants/souche	10 plants/souche	10 plants/souche	10 plants/souche
10 plants Tp	10 plants Tp	10 plants Tp	10 plants Tp	10 plants Tp
10 plants Tnp	10 plants Tnp	10 plants Tnp	10 plants Tnp	10 plants Tnp

← Entrée 20 m Sortie →

### Evaluation de l'agressivité et analyses des résultats

#### Observation des nécroses au niveau du site d'inoculation

Après 5 mois de croissance sous le tunnel, la moitié des plantes (5 plantes/souche, 5 plantes/type de témoin, Fig.1) sont extraites du dispositif pour observation et notation des nécroses éventuelles produites à partir du site d'inoculation. Quatre types de critères sont retenus :

- présence ou absence de lésion au niveau externe du bois,
- présence ou absence de lésion au niveau du bois après écorçage,
- forme et étendue de la nécrose interne (coupe transversale)
- longueur de la nécrose interne de part et d'autre du site d'inoculation à partir de

l'extérieur de la perforation (coupe longitudinale)

#### Isolément du champignon inoculé

En parallèle, afin de s'assurer de la présence du champignon inoculé 5 mois plus tôt, 20 petits morceaux de bois (2 mm de côté) sont prélevés sur 2 plants parmi les 5 observés : 5 morceaux au point d'inoculation, 5 morceaux dans la partie haute de la nécrose, 5 morceaux dans la partie basse de la nécrose et 5 morceaux hors nécrose. Ces différents morceaux de bois sont désinfectés séparément dans une solution d'hypochlorite de calcium à 2% pendant 45 secondes puis rincés à l'eau stérile. Ils sont ensuite placés sur un milieu de culture Malt-Agar. Une observation basée sur des critères culturels et morphologiques est réalisée pour permettre d'identifier les différentes espèces de champignon.

#### Analyses des résultats

Les résultats quantitatifs obtenus sont analysés à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA), suivie d'un test de Newman-Keuls (seuil de 5%). Les barres verticales représentent l'erreur standard.

## RESULTATS

### I- Comparaison des différents critères de notation.

- Observation visuelle des lésions au niveau externe du bois, au point d'inoculation  
Aucune lésion n'est apparue quel que soit le traitement.
- Observation visuelle des lésions au niveau du bois au site d'inoculation, après écorçage

Pour l'ensemble des plants inoculés ainsi que pour les plants témoins percés (Tp), une cicatrisation totale de la plaie est observée au niveau du bois après écorçage, à l'exception des plants inoculés avec les souches *P. chlamydospora*. En effet, sur ces plants, quelle que soit la souche inoculée, un chancre est observé tout autour du point d'inoculation après écorçage. Aucune lésion n'est apparue sur les plants témoins non percés (Tnp).

- Observation de la nécrose interne au point d'inoculation en coupe transversale  
Aucune différence ne peut être observée entre les plants quels que soient la modalité, le genre et la souche de champignon inoculée, tant au niveau de la forme que de l'étendue de la nécrose interne.
- Observation de la nécrose interne au point d'inoculation en coupe longitudinale  
Aucune lésion n'a été observée pour les témoins non percés. Des lésions sous forme de stries suivant les vaisseaux du bois, allant du marron clair au noir, sont observées sur les autres modalités et des différences significatives de longueur sont mesurées (résultats présentés ci-après). Le degré d'agressivité des différentes souches fongiques testées est évalué sur ce critère. Les nécroses sont mesurées séparément au dessus et en dessous du point d'inoculation. Seule la longueur totale résultant de ces deux mesures sera présentée.
- Isolement du champignon inoculé  
A l'exception des souches de l'espèce *F. mediterranea*, les mesures de longueur des nécroses internes en coupe longitudinale sont confortées par les isollements réalisés. L'espèce fongique inoculée est systématiquement re-isolée dans le bois 5 mois plus tard. L'espèce *F. mediterranea* est en revanche peu re-isolée (3/10 souches). Pour les 2 types de témoins (Tp et Tnp), aucun des champignons testés n'est isolé à l'exception de l'espèce *B. obtusa* qui est retrouvée dans 30% des plants Tp (résultats non présentés). Cependant, l'identification ne permet pas de préciser s'il s'agit des souches testées dans cet essai.

## **II- Longueur totale de la nécrose interne au point d'inoculation en coupe longitudinale**

Aucune nécrose n'est observée sur les plants témoins non percés (Tnp). En revanche, une petite nécrose, d'une longueur totale variant de 1 à 5 mm de long est systématiquement observée au point de perforation sur les plants témoins percés (Tp). Cette nécrose serait due à la simple perforation du bois jusqu'à la moelle. Les longueurs moyennes (moyenne sur 5 plants) des nécroses observées sur les plants inoculés seront comparées à celles observées sur les plants Tp.

- *Botryosphaeria obtusa* et *Botryosphaeria parva* (Bo et Bp)

A l'exception de la souche 5, toutes les souches testées occasionnent au niveau interne du bois une nécrose dont la longueur moyenne est significativement différente de celle observée chez les plants percés mais non inoculés (Tp, 4,8 mm). Exceptée la souche 5, les nécroses mesurent entre 11 mm et 37,6 mm de long (Fig. 2 A). Il existe des différences significatives de longueur de nécrose entre les souches utilisées et, au sein de ce genre, 4 niveaux d'agressivité peuvent en conséquence être établis :

Niveau d'agressivité élevé: souches 3, 6, 7 et 9

Niveau d'agressivité moyen : souche 10

Niveau d'agressivité faible : souches 1, 2, 4 et 8

Niveau d'agressivité nul : souche 5

On remarquera que parmi les souches testées, les souches de l'espèce *B. parva* sont plus fréquemment agressives (4/5 souches) que celles de l'espèce *B. obtusa* (1/5 souches).

- *Eutypa lata* (Ei)

Toutes les souches occasionnent, au niveau interne du bois, des nécroses dont la longueur moyenne est significativement différente de celle observée sur les plants Tp (1 mm). La longueur la plus grande (14,6 mm) est observée pour la souche 1 et la plus petite (5,4 mm) pour la souche 7 (Fig. 2 B). Il existe des différences significatives de longueur de nécrose entre souches et, pour cette espèce, 3 niveaux d'agressivité peuvent être établis:

Niveau d'agressivité élevé : souches 1 et 9

Niveau d'agressivité moyen : souches 2, 3, 6 et 10

Niveau d'agressivité faible : souches 4, 5, 7 et 8

- *Fomitiporia mediterranea* (Fm)

Toutes les souches ont entraîné l'apparition, au niveau interne du bois, d'une nécrose dont la longueur moyenne est significativement différente de celle observée sur les plants Tp (2,6 mm). Des différences significatives peuvent également être observées entre les souches bien que l'ensemble des souches testées n'occasionne que de petites nécroses. Ainsi, la souche 9 est la moins agressive des souches avec une nécrose moyenne de 3,3 mm. La souche 7 qui est la plus agressive n'occasionne qu'une nécrose moyenne de 6,4 mm de long (Fig. 2 C). De plus, *F. mediterranea* et *P. chlamydospora* ont été isolés ce qui met en cause l'agressivité de cette souche 7. Enfin, pour la souche 4, *P. chlamydospora* est isolé sans la présence de *F. mediterranea* (résultats non présentés).

- *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch)

Quelle que soit la souche de l'espèce *P. chlamydospora* inoculée, la nécrose moyenne observée est toujours significativement différente de celle observée sur les plants Tp (2,8 mm). Des différences significatives sont aussi observées entre souches. La longueur moyenne de nécrose la plus importante est obtenue avec la souche 1 (49,2 mm) et la plus petite avec la souche 9 (13,8 mm) (Fig. 2 D). Au regard des longueurs des nécroses occasionnées, trois niveaux d'agressivité peuvent être établis pour cette espèce :

Niveau d'agressivité élevé : souches 1, 2, 3, 4, 6 et 7

Niveau d'agressivité moyen : souches 5 et 8

Niveau d'agressivité faible : souches 9 et 10

- *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal)

Toutes les souches ont engendré au niveau interne du bois des longueurs moyennes de nécrose significativement plus importantes que celle observées sur les plants Tp (0,4 mm). Des différences significatives sont observées entre les souches. La longueur moyenne de nécrose la plus importante est obtenue avec la souche 5 (24,8 mm) et la plus petite avec la souche 2 (6,8 mm). Cependant, 6 souches n'engendrent que de courtes nécroses, toutes inférieures à 11 mm de long (Fig. 2 E). Les 9 souches testées de cette espèce peuvent être réparties en fonction des longueurs moyennes de nécrose, selon 3 niveaux d'agressivité :

Niveau d'agressivité élevé : souches 5 et 8

Niveau d'agressivité moyen : souche 7

Niveau d'agressivité faible : 1, 2, 3, 4, 6, et 9

## DISCUSSION

Le pouvoir pathogène d'un champignon dépend de son pouvoir infectieux (capacité à établir un foyer infectieux dans les tissus), de son pouvoir invasif (capacité à se répandre dans ces tissus) et de son pouvoir toxicogène (capacité à produire des toxines agissant à distance). Notre expérimentation repose sur l'observation des deux premiers points. Les nécroses longitudinales sont apparues en forme de stries allant de couleur marron clair au noir quelle que soit l'espèce testée. Cet aspect reflète l'invasion du champignon *via* les vaisseaux du bois et une réaction non spécifique de la plante à l'infection avec émission de composés de nature phénolique. La longueur des stries nécrosées permet pour une espèce de champignon donnée de comparer le niveau d'agressivité entre différentes souches. Les isolements réalisés à partir de ces nécroses ont toujours mis en évidence la présence du champignon inoculé sauf pour *F. mediterranea* qui présente un taux de re-isolement faible (3/10 souches testées) (résultats non présentés).

La méthode d'inoculation par explant mycélien, mis au point par Péros et Berger (1994) pour tester l'agressivité de souches d'*Eutypa lata* a été étendue avec succès aux 5 autres espèces dans cette expérimentation.

L'essai a révélé, pour chacune des espèces à l'exception de *F. mediterranea*, une diversité de réponses selon la souche testée, permettant de définir 3 ou 4 groupes d'agressivité. Ces résultats vont permettre de sélectionner au moins une souche d'agressivité connue pour la suite de nos essais, ayant pour but de mieux comprendre l'implication des champignons dans les syndromes de l'esca et du BDA et de reproduire les symptômes foliaires en conditions contrôlées.

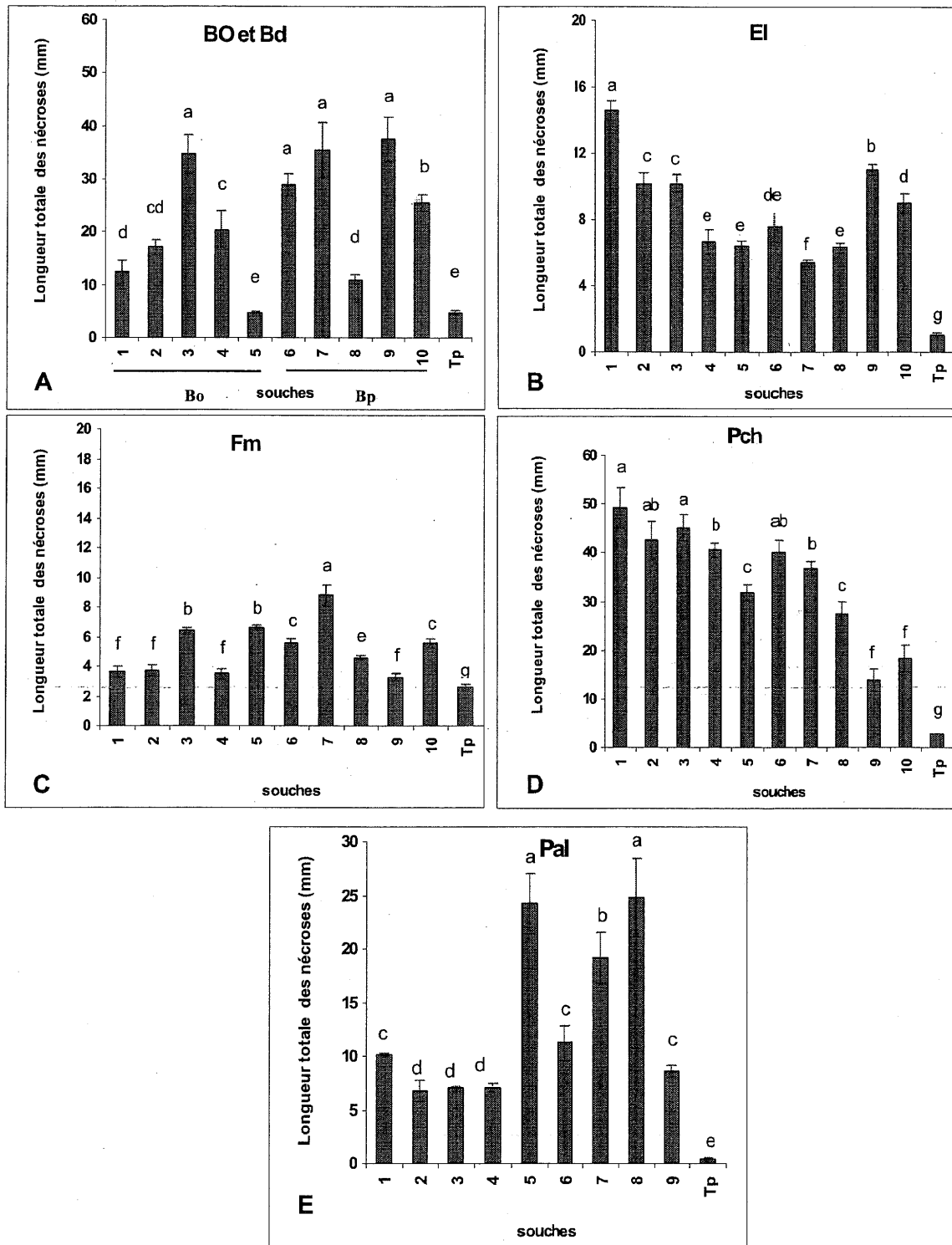
Malgré un dispositif expérimental adapté à la comparaison intra spécifique, ce dispositif permet de révéler des comportements très différents entre espèces : (1) les nécroses les plus étendues sont observées, toutes souches confondues, avec l'espèce *Phaeoconiella chlamydospora* (34,5mm +/-1,12), (2) les nécroses les plus petites sont obtenues avec les espèces *Fomitiporia mediterranea* et *Eutypa lata* (5,19 mm +/- 0,17 et 8,74 +/- 0,30, respectivement), (3) les nécroses engendrées par l'espèce *Phaeoacremonium aleophilum* présentent une longueur moyenne intermédiaire (13,1 mm +/- 0,74), et (4) le genre *Botryosphaeria* présente une grande variabilité avec des souches comparables pour la longueur de nécrose à *P. chlamydospora* et des souches d'une agressivité nulle (Bo, souche 5, longueur de nécrose pas significativement différente de celle du témoin percé).

Les souches de *P. chlamydospora*, considéré comme un des champignons pionniers de l'esca et responsable de la maladie de Petri (affectant les jeunes plantations de vigne) provoquent les nécroses les plus importantes. Nos résultats sont similaires aux longueurs de nécroses obtenues par Auger *et al.* (2004) au Chili après inoculation sur boutures enracinées de vigne cultivar Pinot noir par injection de conidies dans la moelle. Toutes les souches de *P. chlamydospora*, contrairement aux autres espèces, induisent des lésions progressant autant vers le haut que vers le bas du point d'inoculation (résultat non montré). De plus, toutes les souches induisent systématiquement un chancre autour du point d'inoculation chez les plantes. En revanche, les souches de toutes les autres espèces induisent la cicatrisation totale de la plaie. Ces résultats correspondent aux observations faites par Sparapano *et al.* (2001) et pourraient témoigner de la difficulté voire de l'impossibilité de la plante à mettre en place des mécanismes de défense au niveau du site après inoculation.

Les souches de *F. mediterranea* provoquent des nécroses peu développées rarement associées à l'isolement du champignon. De plus, *P. chlamydospora* a parfois été isolé (avec ou sans présence de *F. mediterranea*) mettant en doute l'agressivité de ces souches. Cependant, 2 souches sont capables d'induire des nécroses et sont re-isolées ce qui est concordant avec les résultats obtenus par Sparapano *et al.* (2000). Ces auteurs ont montré la capacité de *F. mediterranea* à dégrader seul le bois. Par contre, les nécroses obtenues ne s'apparentent pas à une pourriture blanche, comme l'avaient observé ces auteurs 6 mois

Figure 2 : Longueur moyenne des nécroses (mm)  $\pm$  l'erreur standard, observées 5 mois après l'inoculation des plants avec *Botryosphaeria obtusa* (Bo) et *B. parva* (Bp), *Eutypa lata* (El), *Fomitiporia mediterranea* (Fm), *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch) ou *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P=0.05$ ) selon le test de Newman-Keuls.

Mean length necrosis (mm)  $\pm$  standard error, observed 5 months after plant inoculation with one of the five fungi tested: *Botryosphaeria obtusa* (Bo) and *B. parva* (Bp), *Eutypa lata* (El), *Fomitiporia mediterranea* (Fm), *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch) ou *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal). Means followed by the same letter are not significantly different ( $P=0.05$ ) according to the Newman-Keuls test.





après inoculation. Dans nos conditions, l'observation 5 mois après inoculation est peut-être trop précoce pour observer une dégradation caractéristique du bois par ce champignon.

L'observation 15 mois après inoculation des 5 plantes maintenues dans le dispositif permettra de vérifier l'agressivité de ces souches et leur capacité à produire la pourriture blanche. D'autres auteurs (Larignon et Dubos, 1997) obtiennent de petites nécroses et un faible taux de re-isolément avec *F. mediterranea*. Ils suggèrent le rôle d'envahisseur secondaire de ce champignon. Nos résultats, à la vue du faible taux de re-isolément, pourraient aller dans ce sens.

*Eutypa lata*, responsable de l'eutypiose est aussi décrit comme un champignon pouvant être impliqué dans le syndrome de l'esca. La comparaison de l'agressivité de 10 souches d'*E. lata* a permis de sélectionner la souche 1 d'*E. lata*, la plus agressive dans notre essai. Elle correspond à la souche Bx1.10 classée par Péros *et al.* (1999) comme une des plus agressives selon leurs critères. L'essai montre cependant une faible diversité de comportement parmi les 10 souches et une progression faible du champignon dans le bois. Une explication à ces observations, 5 mois après inoculation par *E. lata*, peut être avancée. Au vignoble *E. lata* pénètre par les plaies de taille pendant l'hiver (Péros, 1995), le repos hivernal du cep pourrait être nécessaire à ce champignon pour coloniser le bois. Or, dans l'expérimentation, les inoculations ont été effectuées au printemps, en pleine croissance végétative. *E. lata* aurait pu rencontrer des difficultés à coloniser les tissus dans cette situation. Cette hypothèse pourra être confirmée ou infirmée grâce à l'observation des plantes restant dans le dispositif dans le courant de l'automne 2006 et qui auront ainsi subi le repos hivernal.

Les souches de *P. aleophilum*, considéré comme *P. chlamydospora* comme un des champignons pionniers dans le syndrome de l'esca, induisent une diversité de réponse selon les souches. La longueur moyenne des lésions obtenue avec les 9 souches de ce champignon est inférieure à celle obtenue avec les 10 souches de *P. chlamydospora* ou les 5 souches de *B. parva* dans les conditions de notre essai. Cependant, la comparaison entre espèces est très dépendante des conditions de l'essai (variété, condition d'inoculation, température). Ainsi selon le cultivar de vigne utilisé (cultivar Matilde, cultivar Italia), Sparapano *et al.* (2001) obtiennent des résultats opposés pour la longueur de nécroses après inoculation au vignoble de *P. chlamydospora* et de *P. aleophilum*.

Les souches de *B. parva* induisent en moyenne des nécroses de taille importante et dans la majorité des cas supérieure à celles des souches de *B. obtusa*. L'espèce *B. parva* peut provoquer des nécroses de longueur comparable à celles de *P. chlamydospora* alors que *B. obtusa*, à l'exception d'une souche, présente de faibles nécroses. La souche 5 de *B. obtusa* n'a pas développé de nécroses significativement différentes du témoin. Cette même souche (F 007) testée par Larignon *et al.* (2001) sur des sarments détachés avait alors été classée parmi les plus agressives. A l'inverse, la souche 2 notée par ces auteurs F 99.7 ne présentait pas des nécroses significativement différentes du témoin.

Par ailleurs, *B. obtusa* a été isolé dans 30% des plants témoins percés et jamais dans les plants témoins non percés (résultat non montré). Les plants ont probablement été contaminés lors de leur perforation qui en créant une blessure a permis au champignon soit présent sur l'écorce, soit présent dans l'environnement aérien de la serre, de pénétrer dans la plantule.

Afin de comparer le comportement des 2 espèces principalement observées en France (Larignon *et al.*, 2001) sur vigne, 10 souches de *B. obtusa* et *B. parva* seront testées dans les mêmes conditions. Par ailleurs, au vue de la forte diversité des espèces de *Botryosphaeria* (Slippers *et al.*, 2004) décrites comme pathogènes sur vignes et autres ligneux une étude plus approfondie du genre s'avère indispensable afin de mieux cerner leur rôle dans les syndromes de dépérissement de la vigne (esca et BDA).

Actuellement, seules les contaminations artificielles de champignons seuls ou associés réalisées au vignoble ont permis, après un, deux ou trois ans d'incubation, d'obtenir des symptômes foliaires

similaires à ceux d'esca (Sparapano *et al.*, 2001, Feliciano *et al.*, 2004). Aucun essai en conditions contrôlées n'a donné de résultats probants de reproduction des symptômes foliaires. Les prochains essais mis en place viseront cet objectif et les différentes souches sélectionnées pour leur agressivité au sein de chaque espèce pourront être utilisées pour effectuer des inoculations croisées en conditions contrôlées, afin de révéler et de comprendre les interactions entre champignons dans l'établissement des symptômes. Au vu de facteurs climatiques et/ou édaphiques, pouvant expliquer une variation de l'expression des symptômes foliaires des maladies de dépérissement de la vigne (esca et BDA), il pourra être envisagé d'inoculer une de ces souches sélectionnées à des plants de vigne, présentant, par exemple, différents statuts hydriques. *P. chlamydospora* serait un bon candidat, étant donné son fort pouvoir pathogène (longueur de nécroses et présence d'un chancre) et son implication en tant que pionnier de l'esca.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions P. Larignon, P. Lecomte et JP Péros pour les souches et les conseils qu'ils nous ont apportés. Ce projet reçoit le soutien du CIVB et de VINIFLOR.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Auger J., Esterio M., Pérez I., 2004 - First report of *Phaeoconiella chlamydospora* on *Vitis vinifera* and French American Hybrids in Chile. *Plant disease* 88, 1285.
- Borie B., Jacquot L., Jamaux-Despréaux I., Larignon P., Péros J-P., 2002 - Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France. *Plant Pathology* 51, 85-96.
- Dubos B; Larignon P., 1988 - Esca and Black Measles In : Pearson RC. *et al.* Compendium of grape diseases. St Paul, MN, USA : American Phytopathological Society Press, 34-35.
- Feliciano AJ., Eskalen A., Gubler W.D., 2004 - Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* in California. *Phytopathologia mediterranea* 43, 66-69
- Guérin-Dubrana L., Destrac-Irvine A., Goutouly J.P., Letouze A., Gaudillère J.P., 2005 - Relationship between incidence of Esca and Black Dead Arm foliar symptom expression in the vineyard, ecophysiological indicators and cultural practices. 4<sup>th</sup> International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, South Africa-20-21 Janvier.
- Larignon P., Dubos B., 1997 - Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103,147-157.
- Larignon P., Fulchic R., Cere L., Dubos B., 2001 - Observation on black dead arm in french vineyards. *Phytopathologia mediterranea* 40, 336-382.
- Mugnaï L., Graniti A., Surico G., 1999 - Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant disease* 83, 404-418.
- Péros JP., Berger G., 1994 - A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa dieback*. *Agronomie* 14, 515-523.
- Péros JP., 1995 - Sensibilité des cépages à l'eutypiose: le problème du comportement de référence au vignoble. *Progrès Agricole et Viticole* 112 (3), 61-67.
- Péros JP., Jamaux-Despréaux I., Berger G., Gerba D., 1999 - The potential importance of diversity in *eutypa lata* and co-colonising fungi in explaining variation in development of grapevine dieback. *Mycology* 103, 1385-1390.
- Slippers B., Crous P.W., Denman S., Coutinho T.A., Wingfield B. D., Wingfield M.J., 2004 - Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96, 1, 83-101.
- Sparapano L., Bruno G., Ciccarone C., Graniti A., 2000 - Infection of grapevines by some fungi associated with esca. II. Interaction among *Phaeoacremonium chlamydospora*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia mediterranea* 39,53-58.
- Sparapano L., Bruno G., Graniti A., 2001 - Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathologia mediterranea* 40, 376-386.