

**AFPP – QUATRIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES EN PROTECTION DES CULTURES
LILLE – 8, 9 ET 10 MARS 2011**

**EVALUATION D'UN OUTIL INNOVANT POUR ETUDIER LA STIMULATION DES
DEFENSES DE LA VIGNE AU VIGNOBLE**

AVELINE N. ⁽¹⁾, RIFFARD A. ⁽¹⁾, TITE A. ⁽¹⁾, LEJEALLE S. ⁽⁴⁾, CLUZET S. ⁽³⁾,
CORIO-COSTET M.-F. ⁽²⁾

(1) IFV Pôle Bordeaux-Aquitaine – 39 rue Michel Montaigne 33290 Blanquefort, France
nicolas.aveline@vignevin.com

(2) INRA – UMR SAVE 1605 – Domaine de la Grande Ferrade 33883 Villenave d'Ornon,
France

(3) GESVAB – EA3675- ISVV, 210 chemin de Leysotte CS50008– 33882 Villenave d'Ornon,
France

(4) FORCE-A – Centre Universitaire Paris Sud bat.503 – 91893 Orsay, France

RÉSUMÉ

Le Multiplex® représente un outil potentiel pour la recherche d'informations et d'indicateurs sur la stimulation des défenses au vignoble. L'IFV et ses partenaires girondins (INRA et GESVAB) réalisent depuis 2009 des études sur l'évaluation et l'utilisation de cet appareil développé par Force-A pour mettre en évidence une réaction de la vigne à l'application d'éliciteurs. Les essais préliminaires de 2009, développés dans cet article, montrent que le Multiplex® est capable de mesurer une réaction de feuilles de vigne à un stress UV, mais ne permet pas de conclure quant à l'effet de l'application des diverses substances SDN sélectionnées. Ces premières études sont très prometteuses car l'outil peut être amélioré (spectre de mesure plus large, protocoles d'emploi plus adaptés), et permettre d'évaluer l'effet des SDN en plus de celui des UV.

Mots-clés : élicitation, SDN, fluorescence, vigne, Multiplex.

SUMMARY

ASSESSMENT OF A NEW TOOL TO STUDY THE ELICITATION OF GRAPEVINE DEFENCE IN VINEYARD

Multiplex® seems to be an effective tool to get some informations or indicators about defenses induction at the vineyard. Since 2009, IFV and partners (INRA, GESVAB and Force-A) leads some experimentations to record some physiological changes of grapevine by a spray of elicitor. The very first assays, commented in this article, showed that Multiplex® is able to measure a reaction of vine's leaves after UV-C stress, but not after a spray of various elicitors. Nevertheless, these first tests were very promising as this tool could be adjusted (adaptation of its broad-spectrum and improvement of measurement methodology) and therefore allow to evaluate the SDN effect as well as the UV one.

Key words: grapevine, fluorescence, elicitor, Multiplex, defenses.

INTRODUCTION

Le recours aux stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN ou SDP) est avancé comme une des solutions alternatives et/ou complémentaires pour réduire l'emploi des pesticides au vignoble, suivant les principes et objectifs du Plan Ecophyto 2018 (INRA, 2009).

Le concept de la stimulation des défenses des végétaux pour prévenir les attaques de pathogènes n'est pas nouveau : depuis plus d'une vingtaine d'années, les efficacités de protection contre de nombreux couples hôte/pathogène sont rapportées dans la littérature scientifique. Pour la vigne, plusieurs types de substances présentent des perspectives encourageantes contre diverses maladies telles que le mildiou (Daire *et al*, 2006, Dufour et Corio-Costet, 2009), l'oïdium (Dagostin *et al*, 2006, Belhad *et al.*, 2006) et la pourriture grise (Elmer *et al*, 2006). Malheureusement, au vignoble, les résultats sont rares et les efficacités très variables, voire nulles (Molot, 2006), avec bien souvent de très fortes variations, empêchant une réelle conclusion sur l'intérêt ou non de l'usage de SDN. Il est certain que les conditions de production recèlent divers facteurs qui influencent fortement l'expression et l'efficacité des moyens de défenses de la vigne : la physiologie, la pression parasitaire ou le type d'application par exemple.

Dans ce contexte de transfert difficile, les méthodes d'expérimentation n'ont guère évolué. Les essais « terrain » font intervenir des protocoles influencés par les méthodes CEB, éprouvées et très adaptées pour évaluer des produits phytosanitaires classiques. Néanmoins, les SDN sont fortement éloignés de ce type de produits de par leur mode d'action indirect (la cible du SDN est la vigne et non l'agent pathogène), leur efficacité partielle et leur type d'application méconnu. De plus, on relève un manque de connaissances de ces substances et de leurs effets en conditions naturelles (Pajot et Fayot, 2009).

Actuellement, les objectifs de la recherche appliquée sur les SDN sont simples : comment utiliser ces produits, en les intégrant dans un programme de traitement pour permettre une diminution globale de l'utilisation d'intrants phytosanitaires classiques et obtenir ainsi une efficacité de protection correcte contre les agresseurs de la vigne ?

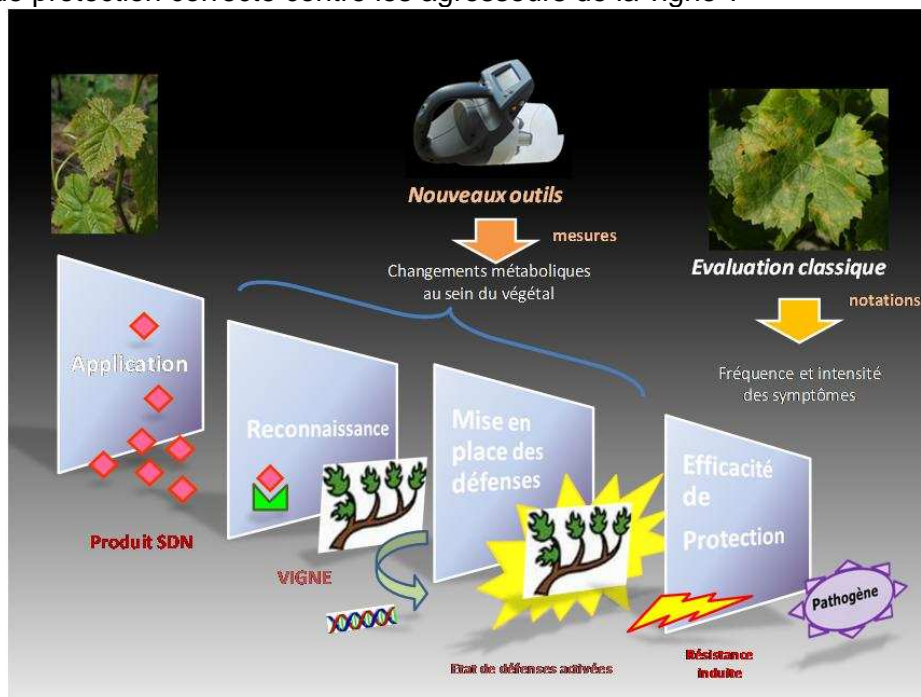


Figure 1 : Schéma des étapes de l'élicitation au vignoble et du besoin d'informations complémentaires lors des évaluations de SDN. (Aveline 2010)

Schema of the different steps of the elicitation process in the vineyard. For a better elicitors efficacy, the need of supplementary information during this process is underlined.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le travail réalisé par l'IFV et ses partenaires autour du Multiplex®, un capteur optique développé par Force-A. L'étude de cet outil innovant a pour finalité d'obtenir des informations simples sur le terrain telles que : est ce que la vigne a réagi à l'application du SDN ? Y a-t-il des changements perceptibles au sein de certains organes après application ? Est-il possible de relier ces changements avec une efficacité ? Avec cette étude, on s'attache tout d'abord à évaluer l'impact primaire du SDN, à savoir s'il a été efficace pour induire des changements métaboliques au sein du végétal et permettre la mise en place de réponses de défense. Ces informations sont ensuite à relier avec l'efficacité constatée pour contrôler un agent pathogène (figure 1).

Cet article présente les premiers essais réalisés en 2009 afin de mettre en évidence une réaction des feuilles de vigne à l'application d'un éliciteur en utilisant le Multiplex®. Les expérimentations ont été déclinées au laboratoire sur des feuilles en survie et au vignoble avec des rameaux traités.

MATERIELS ET MÉTHODES

LE MULTIPLEX®

Le Multiplex® est un capteur optique portable dont le principe est basé sur la mesure de l'auto-fluorescence des végétaux. Il est déjà utilisé dans des applications de pilotage de la fertilisation ou des suivis de maturité, Le Multiplex permet de mesurer douze signaux de fluorescence ou de réflectance différents et plusieurs indicateurs physiologiques de la plante comme la concentration en chlorophylle et en plusieurs composés phénoliques tels que les anthocyanes, flavonols... (Le Moigne et al, 2008).

Les intérêts du Multiplex® sont nombreux : il est portable, utilisable au vignoble, la mesure est rapide et la quantité de données enregistrées est importante. Les résultats sont directement visibles et exploitables par informatique. Ce sont ses atouts face aux techniques d'analyses classiques (biochimie, biologie moléculaire) qui sont sûrement plus précises mais très coûteuses en argent et en temps et donc peu adaptées au terrain. Enfin, les enregistrements réalisés par le Multiplex sont non destructifs et permettent de réaliser plusieurs mesures sur le même organe au cours du temps et d'apporter des informations complémentaires très pertinentes sur l'évolution temporelle de certaines réponses.

MATERIEL VEGETAL

Les essais en laboratoire sont réalisés sur des feuilles détachées de *Vitis vinifera* cépage Cabernet-Sauvignon. Les feuilles ont le même âge (3-4^{ème} feuille en partant de l'apex). Elles sont mises en survie dans une boîte de Petri avec un papier filtre humide, et placées dans un incubateur dans des conditions standards et homogènes.

Au vignoble, on repère un rameau par cep. Une modalité est constitué de 3 rameaux. Les 3 premières feuilles vraies en partant de l'apex sont traitées et mesurées.

MODALITES

Les substances testées sont des éliciteurs de référence (Dufour *et al*, 2009, Belhadj *et al.*, 2006), des spécialités commerciales déjà homologuées (ASM, Fosétyl-AI) ou des spécialités fertilisantes revendiquant un effet SDN mais non homologuées comme produits phytosanitaires (Tableau I). L'application des UV-B (312nm) et UV-C (254nm) se fait par exposition de la face inférieure des feuilles pendant 15 secondes à 30mm de distance de la source. Cette dose est non létale, les feuilles survivent pendant la durée de l'expérience.

Produit testé	Dosage	Matière active
Méthyl-Jasmonate (Sigma)	1.12g.l-1	-
Sierra® (BayerCropscience)	0.9g.l-1	Ethephon (précurseur de l'éthylène)
Bion® (Syngenta)	2g.l-1	Acibenzolar-S-Methyl (ASM)
Aliette Flash® (Bayer Cropscience)	5g.l-1	Fosetyl-Al
BABA (Sigma)	3g.l-1	-
Elistim® (Ithec)	5g.l-1	Extraits de levures
Sémafort® (Tribo)	2.5%	Phosphite de Potassium, acides aminés et extraits d'algues

Tableau I : Liste des substances de type SDN testées lors des essais Multiplex en 2009. Defense inducers tested with Multiplex® in 2009.

List of the plant defence inducer tested during Multiplex® experimentation in 2009.

APPLICATIONS ET MESURES

Les traitements sont réalisés le premier jour dès la mise en survie des feuilles. Les applications au laboratoire sont réalisées avec un Ecospray®, à raison d' 1 mL par feuille, à la concentration indiquée dans le tableau I. Un témoin est traité avec de l'eau distillée. Au vignoble, les rameaux sont traités avec un vaporisateur de jardin jusqu'au point de ruissellement.

La première mesure par Multiplex® a lieu avant le traitement (T0) des feuilles, puis quotidiennement pendant 4 à 7 jours après le traitement. On mesure la face supérieure et inférieure de chaque feuille.

Les résultats sont analysés selon les différents indices exportés par le Multiplex®. Ici seul l'indice BRR-FRF sera commenté. Cet indice correspond à un ratio entre la fluorescence UV sous excitation UV et la fluorescence proche infrarouge sous excitation UV. Les mesures permettent de suivre l'évolution moyenne des indices jours par jour ou l'évolution particulière de chaque feuille.

RESULTATS

LABORATOIRE

Les résultats obtenus à partir des mesures effectuées avec le Multiplex en laboratoire (protocole feuilles en survie) montrent une forte réaction des feuilles à l'irradiation aux UV-B et C pour un indice (figure 2). En effet, une forte augmentation du ratio BRR-FRF est observée dès la deuxième, mesure. En moins de 24h après irradiation aux UV, les feuilles présentent une valeur de BRR-FRF 2 à 3.5 fois plus élevée que celle du témoin non traité. Les jours suivants, la fluorescence diminue mais reste toujours significativement plus élevée par rapport au témoin les jours suivants. La modalité témoin (TNT) reste stable au cours du temps avec un indice BRR-FRF autour de 1.

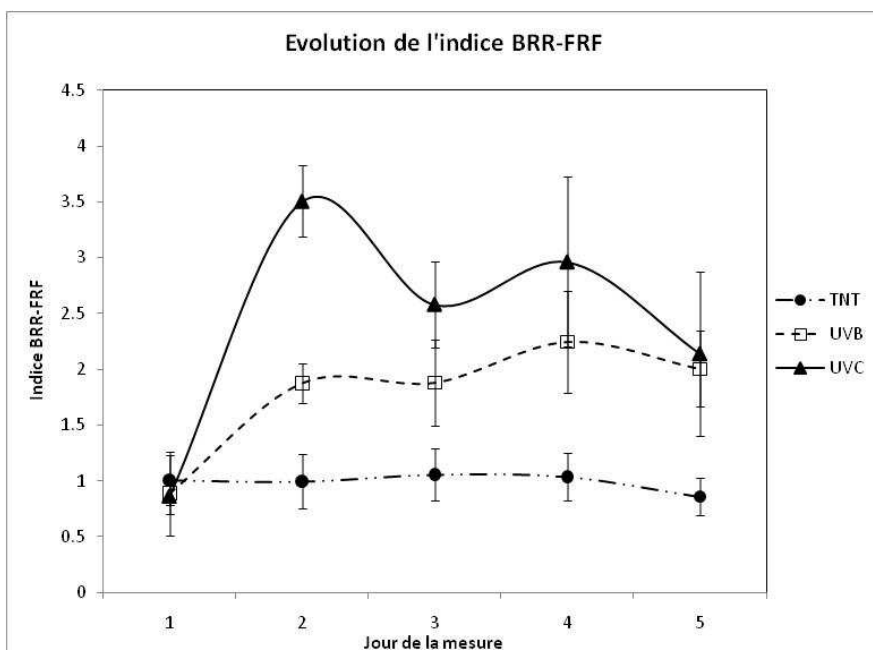


Figure 2 : Suivi quotidien des moyennes (6 feuilles par modalités) de l'indice BRR-FRF après irradiation aux UV-B et UV-C. Le traitement a lieu entre les mesures du jour 1 et du jour 2. Daily measurements (average of 6 leaves) of BRR-FRF index after UV-B and UV-C treatments (applied between days 1 and 2).

Les résultats des modalités traitées avec des substances élicitrices ne montrent pas de pics se différenciant du témoin, et ce pour tous les 12 indices obtenus avec le Multiplex® (figure 3).

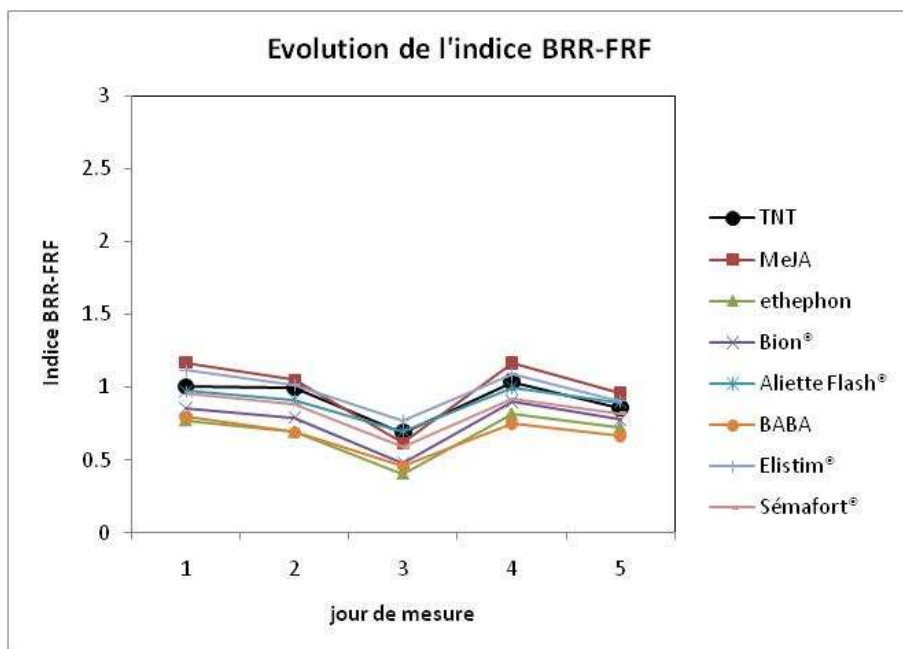


Figure 3 : Suivi quotidien des moyennes de l'indice BRR-FRF après l'application de diverses substances élicitrices. Le traitement est réalisé entre les mesures des jours 1 et 2. Daily measurements (averages) of BRR-FRF index after different defense inducers treatment (applied between days 1 and 2).

AU VIGNOBLE

Les mesures sur les rameaux marqués n'ont pas montré de différences ou d'évolutions significatives entre les indices issus des témoins non traités et les modalités traitées avec des SDN. On observe en outre une très forte hétérogénéité entre les feuilles dès la mesure avant le traitement.

DISCUSSION

Les mesures réalisées avec la configuration du Multiplex en 2009 ne permettent pas de conclure quant à la réaction des feuilles de vigne à l'application d'un éliciteur.. Selon nos protocoles et les spécialités testées, aucune mesure d'indice n' a permis de différencier une feuille traitée avec un SDN d'une feuille non traitée. Des questions se posent donc sur les protocoles (choix du moment opportun, type de produits SDN, dosage, matériel végétal...) mais aussi sur les caractéristiques du Multiplex® utilisé. En effet ce dernier est utilisé pour d'autres applications (maturité, fertilisation) et d'autres organes comme les grappes. L'utilisation d'un Multiplex® plus adapté au suivi des réponses de défenses est une piste intéressante, notamment pour mesurer les stilbènes tels que le resveratrol (Poutaraud et al, 2007). En 2010, Force-A a conçu un Multiplex® avec des longueurs d'onde plus adaptées à la mesure des réponses de défense de la vigne (stilbènes). Les premiers tests effectués durant la saison 2010 en laboratoire (IFV-INRA de Bordeaux) ont donné des résultats encourageants (Tite, 2010).

De nombreux facteurs sont encore à étudier et à inclure dans les protocoles, comme l'intervention des agents pathogènes pour vérifier un éventuel effet *priming* des substances SDN testées, à savoir une réelle mise en place des défenses seulement lors d'une bio-agression (Conrath et al, 2006). Quelques essais ont été menés, avec une inoculation post-traitement SDN, des feuilles avec *Plasmopara viticola* (agent responsable du mildiou de la vigne). Ils seront développés en 2011.

Les résultats obtenus avec l'irradiation aux UV des feuilles de vigne sont aussi une piste intéressante. Les pics enregistrés par le Multiplex® corroborent des observations déjà mentionnées dans la littérature (Latouche *et al*, 2008). L'intensité de ces pics est très significative et se retrouve aussi avec le nouveau Multiplex® adapté aux défenses. Néanmoins, on ne peut pas qualifier ce pic de réaction de défense à proprement parler. On peut supposer que les UV induisent un stress puissant sur le métabolisme de la feuille. L'influence des UV est connue sur des phénomènes comme l'épaississement des parois végétales ou la production de métabolites secondaires tels que des polyphénols (Di Stephano *et al*. 2007).

Enfin, sur un plan technique, les expérimentations menées en 2009 et 2010 ont fait ressortir la simplicité d'utilisation du Multiplex® (rapidité de mesure, intégration simple des données) et son potentiel pour réaliser des essais sur la physiologie végétale au laboratoire ou au vignoble.

CONCLUSION

Les essais préliminaires menés en 2009 avec la première version du Multiplex® ont permis de confirmer l'intérêt d'un tel outil pour étudier certaines réponses physiologiques des organes de la vigne et son potentiel pour visualiser certains changements significatifs du métabolisme de la feuille. L'objectif principal concernant l'obtention d'un indicateur de réaction des feuilles à l'application d'un éliciteur au vignoble n'est pas encore atteint : les travaux de 2010 faisant intervenir un Multiplex® avec une configuration dédiée à cet objectif ont apporté des résultats encourageants et de nouvelles voies de recherches. La continuité de ces travaux en 2011 devrait permettre d'avancer sur l'adaptation du Multiplex® sur le terrain.

L'utilisation du Multiplex® s'inscrit dans la recherche d'informations complémentaires au vignoble sur l'évaluation et l'utilisation des SDN. L'apport des nouvelles technologies, regroupées sous le terme de « *viticulture de précision* », est une réelle voie d'investigation pour améliorer la recherche appliquée aux SDN mais aussi aux méthodes alternatives en général. Il est certain que les informations obtenues au vignoble par le biais de ces outils permettront de mieux évaluer les méthodes de lutte et surtout optimiseront leurs usages dans des programmes de traitements intégrés.

REMERCIEMENTS

Un grand merci aux équipes et aux collègues des différentes structures partenaires du projet et spécialement au laboratoire de l'UMR SAVE de l'INRA de Bordeaux qui nous accueille dans ses locaux pour la réalisation des expérimentations. Les projets menés par l'IFV Pôle Bordeaux-Aquitaine sur la stimulation des défenses de la vigne ont été co-financés en 2009 et 2010 par le Comité Interprofessionnel des Vins de Bordeaux (CIVB) et la Région Aquitaine (CVA).

BIBLIOGRAPHIE

Aveline N., 2010. Etude des stimulateurs des défenses de la vigne : utilisation et évaluation d'un outil innovant – Union Girondine des Vins de Bordeaux fiche IFV n°38 janvier 2010

Belhadj A., Saigne C., Telef N., Cluzet S., Bouscaut J., Corio-Costet M-F., Mérillon J-M., 2006. Methyl jasmonate Induces Defense Responses in Grapevine and Triggers Protection against Erysiphe necator, J. Agric. Food Chem, 54: 9119-9125.

Conrath U, Beckers GJ, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CM, Poinssot B, Pozo MJ., 2006. Priming: getting ready for battle. Molecular Plant Microbe Interaction ; 19(10):1062–1071.

Dagostin S, Vecchione A, Zulini L, Ferrari A, Pertot I., 2006. Efficacy evaluation of the resistance inducer Benzothiadiazole against grapevine downy mildew 5th Intl Workshop on grapevine downy and powdery mildew, San Michele All'Adige 18-23 June 2006

Daire X, Poinssot B, Boutejac M, Silué D, Pugin A., 2002. Stimulation des défenses de la vigne contre les pathogènes. Des résultats encourageants vis-à-vis du mildiou Phytoma 548 :24-26

Di Stefano V., Agati G., Cerovic Z.G., Dalla Marta A., Mancini M., Martinelli L. & Orlandini S., 2007. Effect of solar radiation levels on grapevine leaf polyphenolic content and interaction with *Plasmopara viticola*. In: Congress on Climate and Viticulture (V. Sotés, ed.), Zaragoza, Spain. , 1-9

Dufour M-C, and Corio-Costet M-F., 2009. Impact of grapevine downy and powdery mildew diversity on efficacy of phosphonate derivatives (fosetyl-AL and fertilizer PK2) and salicylic acid (BTH) described as stimulators of plant defences. Bulletin of IOBC working group, "Induced resistance in plants against insects and diseases" (Granada, 12-16 May, 2009, Spain), in press.

Dufour M.C, Druelle L, Sauris P, Taris G, Corio-Costet M.F., 2009. Efficacité de stimulateurs de défenses des plantes (BTH et phosphonates) sur l'oïdium et le mildiou de la vigne : impact de la diversité des pathogènes – 9^{ème} conférence internationale sur les maladies des plantes ; 2009/12/08-09 Tours (FRA)

Elmer P & Reglinski T., 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes Plant Pathology (2006) 55 : 155–177

INRA, 2009. Rapport ECOPHYTO R&D : Vers de systèmes de culture économes en produits phytosanitaires. Volet 1, Tome III : Analyse comparative de différents systèmes en viticulture, Janvier 2009.

Latouche G., Poutaraud A., Meyer and Cerovic Z.G., 2008. Influence of natural UV light climate on the phenolic response of grapevine leaf to infection by *Plasmopara viticola*, Macrowine Montpellier.

Le Moigne M, Martinon V, Besancon E, Cheriet M, Cerovic Z. 2008. Le Multiplex® : capteur optique portable pour déterminer la maturité phénolique des grappes de raisin. Revue des œnologues n°130

Molot B. , 2006. Solutions alternatives : qu'en attendre ? Actes du colloque Euroviti, Montpellier 28-29 novembre 2006 : 113-116

Pajot E, Fayot B, 2009. Stimulation des Défenses Naturelles des Plantes, un engouement certain malgré un manque de connaissances préjudiciable !, Alter Agri, 95, 23-26

Poutaraud A, Latouche G, Martins S, Meyer S, Merdinoglu D. and Cerovic Z. 2007. Fast and Local Assessement of Stilbene Content in Grapevine Leaf by in vivo Fluorometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55, 4913-492

Riffard A, 2009. Utilisation et évaluation du Multiplex3® dans l'étude des stimulateurs de défenses naturelles au vignoble, mémoire fin d'étude ENSAT, Institut Français de la Vigne et du Vin, 2009

Tite A, 2010. Etude de l'apport du Multiplex 330 dans la caractérisation d'une réaction des feuilles de vigne à l'application un éliciteur, Mémoire fin d'étude ENSAT, Institut Français de la Vigne et du Vin