

**AFPP- 9<sup>ème</sup> CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES  
TOURS-8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**EFFICACITE DE STIMULATEURS DE DEFENSES DES PLANTES (BTH ET  
PHOSPHONATES) SUR L'OIDIUM ET LE MILDIOU DE LA VIGNE : IMPACT DE LA  
DIVERSITE DES PATHOGENES**

M-C. DUFOUR, L. DRUELLE, P. SAURIS, G. TARIS, M-F CORIO-COSTET

INRA, UMR Santé végétale, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883, Villenave  
d'Ornon, France

**RESUME :**

Les phosphonates, sont connus pour posséder un pouvoir antifongique, mais également pour stimuler les défenses des plantes. Dans cette étude l'efficacité de deux phosphonates ; le fosétyl-Al et un fertilisant foliaire (PK2) a été évaluée sur différents génotypes et phénotypes de mildiou de la vigne (sensibles ou résistants aux fongicides - *Plasmopara viticola*) et d'oïdium (*Erysiphe necator*- groupe génétique A ou B). Leur efficacité a été comparée à celle de l'acibenzolar-S-méthyle, un analogue de l'acide salicylique décrit comme stimulateur des défenses. En parallèle, nous avons également quantifié par RT-Q-PCR l'expression de 16 gènes d'intérêt impliqués dans les défenses des plantes. Il existe des efficacités variables de la stimulation des défenses de la vigne en fonction du groupe d'agents pathogènes considérés. L'expression des gènes de défenses varie selon la molécule stimulatrice mais également selon la variabilité inter et intra espèces des pathogènes. En complément, une étude d'efficacité sur le terrain a été réalisée en 2009 qui compare les efficacités de traitements du fosétyl-Al, de l'acibenzolar-S-méthyle et du mancozèbe vis-à-vis du mildiou après une inoculation artificielle de mildiou

Mots-clés : défense des plantes, méthodes alternatives, expression de gènes, efficacité terrain, *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola*

**SUMMARY:**

**IMPACT OF GRAPEVINE DOWNY AND POWDERY MILDEW DIVERSITY ON THE EFFICACY OF PHOSPHONATE DERIVATIVES (FOSÉTYL-AL, PK2) DESCRIBED LIKE STIMULATOR OF PLANT DEFENCES.**

Phosphonates are well known to possess powerful antifungal activity, and the fungicide fosetyl-Al is known to exert both a direct effect on the pathogen and an indirect effect via stimulation of host defences. In this study, the efficacy of two phosphonate derivatives fosetyl-Al and a foliar fertilizer (PK2) was tested on different genotypes and phenotypes of grape downy (*Plasmopara viticola*) and powdery (*Erysiphe necator*) mildews. We quantified the level of gene expression of proteins involved in potential plant defence pathways by RT-Q-PCR and compared the gene expression induced after treatments with Benzothiadiazole (BTH), which mimics salicylic acid in natural systemic acquired resistance. Phosphonate derivatives are efficient against powdery mildew depending on genetic group (A or B) and that group B strains are four -fold more sensitive to fosetyl-Al than group A strains. Field trials undergone in 2009, show significant differences in fosetyl, BTH, dithane efficiencies compared to the control against downy mildew after artificial contamination. We conclude on the role of diversity of the two pathogens on the efficacy of these chemical compounds and also on the effective stimulation of grapevine plant defences.

Keywords: acquired systemic resistance, plant immunity, phosphonates, bezothiadiazole, gene expression, powdery mildew, downy mildew,

## INTRODUCTION

La vigne est soumise à la pression de nombreux bioagresseurs dont des parasites obligatoires tels que l'oïdium (*Erysiphe necator*) et le mildiou (*Plasmopara viticola*). À elle seule, avec moins de 3% de SAU, la vigne consomme 20 % des pesticides commercialisés en France chaque année, dont 80 % sont des fongicides. La maîtrise des épidémies nécessite ainsi de nombreux traitements chimiques ayant des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé. L'utilisation de stimulateurs de défenses, aux côtés de la résistance variétale et de la lutte biologique, peut représenter une méthode de lutte alternative d'intérêt.

Parce qu'ils agissent sur la plante et non directement sur le pathogène, les éliciteurs induisent une résistance de la plante hôte multifactorielle qui sera plus difficile à contourner par le pathogène, que l'effet d'un fongicide mono-site. Les voies de signalisation intracellulaires activées chez les plantes suite à la réaction de défense convergent notamment vers la production de formes actives de l'oxygène, de métabolites secondaires, d'hormones (acide salicylique (SA), acide jasmonique, éthylène ou acide abscissique) la mise en place d'un renforcement des parois cellulaires et l'induction de gènes de défense dont les produits directs ou indirects peuvent contribuer à l'arrêt du développement du pathogène. Parmi toutes les réactions mises en place par la plante pour limiter le développement des agents pathogènes, la synthèse de nouvelles protéines, appelées protéine de pathogénèse (PR) localement accumulées au site de l'infection (Van Loon *et al.*, 2006), sont décrites comme étant un bon marqueur de la résistance induite dans plusieurs espèces de plantes. De manière générale, la résistance systémique acquise (SAR) est le résultat de l'effet combiné de plusieurs PR protéines plutôt que l'effet spécifique d'une seule (Durrant et Dong, 2004).

L'acibenzolar-S-méthyle, un dérivé benzothiadiazole (BTH), est un analogue fonctionnel de l'acide salicylique, décrit comme stimulateur de la résistance systémique acquise chez les mono et dicotylédones. Il est efficace envers un large spectre de pathogènes allant des virus, bactéries aux parasites fongiques mais également contre les insectes, nématodes et phytoplasmes (Sticher *et al.*, 1997). Il active le signal de transduction de la SAR en agissant sur des étapes qui se situent en amont ou au niveau de l'accumulation de SA (Ryals *et al.*, 1996).

Le fosétyl-aluminium (FOS) est un fongicide actif contre les oomycètes, mais ce phosphonate jouerait également un rôle de stimulant des défenses naturelles chez la tomate infectée par *Phytophthora capsici* (Bompeix *et al.*, 1981) et chez la vigne lors d'une attaque par *Plasmopara viticola* (Raynal *et al.*, 1980).

Le PK2, un fertilisant foliaire, appartient aussi à la famille des phosphonates et semble présenter une action de stimulateur des défenses naturelles de la vigne. En effet, des plants traités avec ce produit suggèrent l'existence de stimulation des défenses suite à la présence précoce d'éthylène (indication de stress), d'une accumulation précoce de lignine et de phytoalexines autour du site d'infection (Soyez, 2001). Il semble que tous les phosphonates ( $\text{HPO}_3^-$ ) possèdent ce potentiel de stimulation des défenses, et qu'ils soient immédiatement disponibles pour la mise en alerte des systèmes de défense de la plante.

Le but de cette étude était de préciser le rôle d'élicitation de produits générant des ions phosphonates et d'évaluer, *in vitro* et *in natura*, l'efficacité de stimulation des défenses de la vigne contre les deux principaux agents pathogènes que sont l'oïdium et le mildiou. Il s'agit d'appréhender l'efficacité de tels traitements face à la diversité des populations d'oïdium et de mildiou. Ainsi, différentes souches d'oïdium de la vigne appartenant soit au groupe génétique A ou B, et différentes souches de mildiou sensibles ou résistantes aux fongicides ont-elles été confrontées à l'efficacité de pré-traitements des plantes avec les différentes molécules précitées. Les efficacités ont été évaluées à différents niveaux : biologique (tests d'efficacité sur la croissance mycélienne des pathogènes) et au niveau moléculaire (niveau d'expression de gènes). Des essais au vignoble, sur des parcelles expérimentales élémentaires prétraitées avec les différents produits éliciteurs, ont été réalisés, afin d'estimer l'efficacité et le potentiel de ces produits en conditions naturelles. L'objectif final est de mieux comprendre comment ces éliciteurs fonctionnent, et d'évaluer

l'intérêt de développer des stratégies alternatives d'induction des mécanismes de défense au cours du développement de la vigne.

## MATERIEL ET METHODE

### Collection d'isolats et production d'inoculum

#### Plasmopara viticola

Une collection de souches mono-sporange a été repiquée sur des feuilles de vigne en survie et conservée à – 20°C comme décrit par Chen *et al.*, 2006. Six souches présentant des sensibilités différentes à plusieurs fongicides ont été utilisées (2 sensibles et 4 résistantes) (Tableau I).

#### Erysiphe necator

Les souches d'oïdium sont repiquées sur des feuilles maintenues en survie ou conservées sur des vitro-plants de vigne à 15 °C, après un isolement monoconidien comme décrit par Délye *et al.*, 1997. Dix souches appartenant au groupe génétique A et 9 au groupe B ont été utilisées au cours des expériences (Tableau I).

Tableau I : Caractéristiques des souches française de *P. viticola* et *E. necator* utilisées dans cette étude.

(Table I Characteristics of *P. viticola* and of *E. necator* isolates)

	Souches	Année de prélèvement	FAM <sub>1</sub>	IPRO <sup>2</sup>	MEF <sub>3</sub>	Tests d'efficacité	Expression de gènes
<i>Plasmopara viticola</i>	PIC 59	2003	R	S	R	X	
	<b>CAS 01</b>	2005	<b>R</b>	<b>R</b>	S	X	<b>X</b>
	PAU 32	2003	R	S	R	X	
	EAU 08	2005	R	R	S	X	
	FLE 01	2004	S	S	S	X	
	<b>COU 15</b>	2003	S	S	S	X	<b>X</b>
				Groupe génétique			
<i>Erysiphe necator</i>	PVR 43	2003		A		X	
	GF 10	2003		B		X	
	LAT 12	2003		B		X	
	CC 49	1999		B		X	
	CHL 02	2004		B		X	
	BR 33	2002		A		X	
	PAL 01	2003		B		X	
	LLU 70	2006		A		X	
	<b>LLU 41</b>	<b>2006</b>		<b>A</b>		<b>X</b>	<b>X</b>
	LLU 55	2006		A		X	
	PV 15	2006		A		X	
	PV 33	2006		A		X	
	PVR 38	2005		A		X	
	ORA 4	2003		A		X	
	2B 15	2000		B		X	
	PV 28	2006		B		X	
	PV 46	2006		B		X	
	PV 74	2006		<b>B</b>		<b>X</b>	<b>X</b>
ORA 3	2003		A		X		

FAM : famoxadone ; IPRO : Iprovalicarbe, MEF : mefenoxam.

## **Produits utilisés**

Les solutions des différents produits sont préparées extemporanément pour les tests *in vitro*. Pour l'oïdium, les applications sont effectuées en conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire.

### Acibenzolar S-méthyle ou BTH

Nom UIPAC: S-méthyl (1, 2, 3) benzothiadiazole 7 – carbothioate.

Nom commercial: Bion®, C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>OS<sub>2</sub>, PM = 210. Le BTH est appliqué à 6 concentrations de matière active: 0,47 ; 1,18 ; 2,36 ; 3,54 ; 4,72 et 7,08 mM sur des disques de feuilles.

### Fosétyl d'aluminium ou FOS

Nom UIPAC: Ethyl hydrogene phosphonate aluminium.

Nom commercial: Aliette®, C<sub>6</sub>H<sub>18</sub>-(PO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Al, PM = 354. Le FOS est appliqué à 6 concentrations : 0,28 ; 0,70 ; 1,40 ; 2,11 ; 2,81 et 4,21 mM.

### Un fertilisant ou PK<sub>2</sub>

Nom usuel : phosphonate de potassium, K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>, PM = 157.

Le PK<sub>2</sub> est appliqué à 6 concentrations : 0,63 ; 1,59 ; 3,18 ; 4,78 ; 6,37 et 9,55 mM.

## **Détermination de la sensibilité aux traitements**

Les tests d'évaluation de l'efficacité des stimulateurs des défenses de la vigne sont réalisés sur des disques de feuilles comme décrit dans Délye *et al.*, 1997 et Chen *et al.*, 2006 . Huit disques de feuilles sont pulvérisés avec les différentes concentrations d'éliciteurs, séchés, puis inoculés soit avec une suspension de sporanges (5000 spores/ml) soit avec une dispersion de conidies (600-800 par cm<sup>2</sup>). Quatre expériences indépendantes ont été réalisées avec les différentes souches d'oïdium et trois avec les souches de mildiou. L'efficacité du traitement est déterminée par une évaluation visuelle du pourcentage de croissance des pathogènes sur les disques après 12 jours de croissance pour l'oïdium et après 7 jours pour le mildiou à 22°C. Les CI<sub>50</sub>, concentrations inhibant 50% de la croissance du pathogène sont déterminées comme décrit dans Sombardier *et al.*, 2009.

## **Evaluation de l'efficacité au vignoble**

Les tests sont réalisés sur une parcelle expérimentale, constituée de répétition de 4 blocs constitués de trois ceps de Cabernet Sauvignon non traités ou traités hebdomadairement avec 2 g/L de matière active de BTH, 2,5 g/L de Fosétyl-aluminium et 2,1g/L de mancozèbe (fongicide de référence).

Les traitements ont débuté le 5 mai 2009 au stade phénologique 13-14 de l'échelle BBCH (3-4 feuilles étalées) et ont cessé le 21 juillet au stade 79 de l'échelle BBCH (fruits et baies ont atteint leur taille finale), soit 12 traitements. Une inoculation artificielle a été réalisée le 27 mai, (stade 55, BBCH) 24 h après le quatrième traitement, à raison de 6 feuilles par cep pulvérisé avec une solution à 44 000 sporanges /ml. Quatre prélèvements sont effectués (24h après les traitements) au cours de la période de test, à raison de 12 feuilles par modalité pour tester au laboratoire l'efficacité des produits au niveau biologique, biochimique et moléculaire. L'évaluation de la maladie au vignoble a débuté le 4 juin, après 5 traitements et une semaine après l'inoculation artificielle. Le niveau d'attaque de 100 feuilles par bloc est ainsi évalué hebdomadairement et le niveau d'attaque de 50 grappes par bloc a été évalué deux fois au cours de l'expérience : le 25 juin, et le 23 juillet soit 4 semaines et 9 semaines après l'inoculation artificielle.

## **Extraction d' ADN et amplification par RT-QPCR**

Pour l'étude de l'expression des gènes, *in vitro*, les concentrations suivantes ont été utilisées pour pré traiter les feuilles, 24 h avant l'inoculation de pathogènes: 1,90 mM de BTH, 1,13 mM de FOS et 3,18 mM de PK<sub>2</sub>. Les tests sont effectués sur 6 feuilles entières par modalité. Quatre expériences indépendantes sont réalisées, 2 pour le mildiou et 2 pour l'oïdium.

L'extraction des ARNs est réalisée selon le protocole décrit par Reid *et al.*, (2006). Le mélange agité est incubé une heure à 65°C. Après ajout d'un volume du mélange chloroforme: alcool isoamylique (24:2 ; v/v), et centrifugation, la phase aqueuse est ré-extraite dans 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 0,6 volume d'isopropanol. Après précipitation (- 80°C, 30 min) et centrifugation, le culot d'acides nucléiques est dissout dans 1 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,5), puis ajouté à 3 vol de LiCl à 8 M. Après une nuit à 4°C, les ARNs précipitent par centrifugation à 20000 g (30 minutes à 4°C), et les quantités d'ARNs sont mesurées à 260 nm et 280 nm par spectrométrie (Genequant pro, Amersham Bioscience, France).

Deux µg d'ARNs sont traités à la DNase puis rétro-transcrits en utilisant 1,2 µM d'oligo d(T)<sub>15</sub> et la reverse transcriptase M-MLV de Promega selon les recommandations du fabricant. Les cDNAs obtenus sont ensuite stockés à -20 °C. Les réactions de qPCR sont réalisées en double comme décrit par Dufour et Corio-Costet, 2009. Pour chaque gène et pour chaque modalité, une valeur de Cq moyen (cycle quantification) est obtenue, représentant la valeur du nombre de cycle de qPCR à partir duquel le seuil de fluorescence devient significativement différent du bruit de fond. L'expression relative (ER) des gènes est ensuite calculée en appliquant la formule suivante (Germer *et al.*, 2000):  $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  où  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (modalité étudiée) -  $\Delta Ct$  (modalité témoin).

Tableau II : Gènes utilisés pour dessiner les amorces pour l'étude de l'expression des gènes de défense de la vigne.

(Table II: Genes used to design primers to gene expression study in *Vitis vinifera*)

Gènes	N° accession GeneBank
Chaîne gamma du facteur d'élongation 1 ( <b>EF1</b> )	AF176496
Phénylalanine ammonia lyase ( <b>PAL</b> )	X75967
Stilbène synthase ( <b>STS</b> )	X76892
PR protéines de classe 1 ( <b>PR1</b> )	AJ536326
PR protéines de classe 10 ( <b>PR10</b> )	AJ291705
Chalcone isomérase ( <b>CHI</b> )	X75963
Chalcone synthase ( <b>CHS</b> )	X75969
Chitinase de classe III ( <b>CHIT3</b> )	Z68123
Chitinase de classe IV ( <b>CHIT4</b> )	VWU97521
Protéine inhibant les polygalacturonases ( <b>PGIP</b> )	AF305093
β1,3 glucanase ( <b>GLU</b> )	AF239617
Inhibiteur de sérine protéase ( <b>PIN</b> )	AY156047
Lipoxygénase ( <b>LOX</b> )	AY159556
Leucoanthocyanidine dioxygénase ( <b>LDOX</b> )	X75966
Glutathione S- transférase ( <b>GST</b> )	AY156048
Anthocyanidine réductase ( <b>BAN</b> )	VW000166
Acide 1-aminocyclopropane, 1-carboxylique synthase ( <b>ACC</b> )	AF424611

### Analyses des données

Pour évaluer l'efficacité de stimulation des défenses de la vigne et l'expression des gènes selon la diversité des pathogènes, les données ont été soumises soit à une analyse de covariance par modèle général linéaire (données d'efficacité), soit à une analyse de variance (données d'expression) en utilisant un programme d'analyse statistique Systat 11 (Systat Software, Inc). Les différences significatives des valeurs moyennes sont déterminées au seuil de 0,05 et les comparaisons deux à deux sont effectuées par le test de Tukey.

## RESULTATS

### Evaluation biologique de l'efficacité des différents stimulateurs

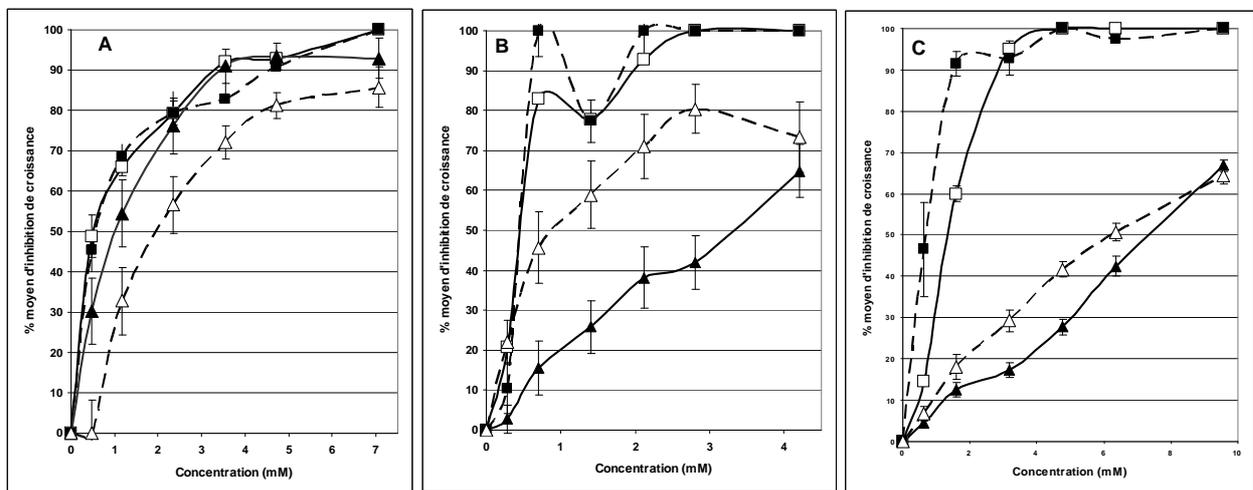
L'efficacité des différents stimulateurs a été évaluée sur 19 souches d'oidium de la vigne (10 appartenant au groupe A et 9 au groupe B) ainsi que sur 2 souches de mildiou sensibles aux fongicides et 4 souches présentant de la résistance aux fongicides (Tableau I).

### Effet du benzothiadiazole (BTH)

Le BTH a une bonne efficacité contre le mildiou et l'oïdium et permet d'atteindre 85 à 100% d'inhibition (figure 1, A). Les valeurs de  $CI_{50}$  déterminées sont de 0,47 mM pour les deux groupes de souches de mildiou et de 1,05 mM et 2 mM pour les souches de groupe A et B d'oïdium. Cependant aucune différence significative n'existe entre les différents groupes. L'efficacité du BTH s'avère assez homogène quel que soit le groupe de pathogène considéré.

Figure 1 : Inhibition de croissance des différents groupes de souches de *P. viticola* : (-■-) sensibles aux fongicides (n = 2); (-□-) résistantes aux fongicides (n=4) ; et d' *E. necator* : (-▲-) souches de groupe A (n= 10), (--Δ-) souches de groupe B (n= 9) en fonction des différentes molécules testées : (A) : BTH ; (B) FOS ; (C) PK2.

(Figure 1: Growth inhibition of the different groups of *P. viticola* [(■) fungicide sensitive (n = 2); (□) fungicide resistant (n=4)] and of *E. necator* isolates [(▲) genetic group A (n= 10), (Δ) genetic group B(n= 9)] depending on various concentrations of different compounds; (A) : BTH ; (B) FOS ; (C) PK2)



### Effet du fosétyl d'aluminium (FOS)

Le fosétyl d'aluminium (FOS) (figure 1, B) induit des efficacités variables de 65 à 100% selon le pathogène considéré, avec une meilleure efficacité vis-à-vis du mildiou que vis-à-vis de l'oïdium. Les valeurs de  $CI_{50}$  calculées pour les souches sensibles (0,48 mM) et résistantes (0,52 mM) ne sont pas significativement différentes. A l'inverse, pour les souches d'oïdium appartenant soit au groupe génétique A (3,30 mM) soit au groupe génétique B (0,98 mM), il existe une différence significative ( $P= 0,0001$ ). Aucune différence significative n'existe entre les deux groupes de souches de mildiou et le groupe de souche B d'oïdium. Seules les souches appartenant au groupe A sont moins sensibles à l'effet du fosétyl que l'ensemble des autres souches de pathogènes testés.

### Effet du fertilisant PK2

L'efficacité obtenue suite aux applications de différentes concentrations de PK2 (figure 1, C), conduit à un maximum d'efficacité vis-à-vis des deux groupes de souches de mildiou (100%) et à une efficacité plus faible vis-à-vis de l'oïdium (65%). Les valeurs de  $CI_{50}$  obtenues pour les souches sensibles et résistantes de mildiou sont de 0,64 et 1,27 mM ne sont pas significativement différentes. Cependant le fertilisant est significativement plus efficace vis-à-vis du mildiou que vis-à-vis de l'oïdium ( $P = 0,0001$ ). Concernant l'oïdium, les  $CI_{50}$  obtenues pour les souches du groupe A (7,44 mM) et les souches du groupe B (6,36 mM) ne sont pas significativement différentes.



Des différences existent selon le produit utilisé et le pathogène présent. En effet en présence de BTH, les voies de biosynthèses des stilbènes et anthocyanes (STS, BAN) sont privilégiées en présence d'oïdium, alors qu'en présence de mildiou ce sont surtout les PR protéines qui sont sur exprimés (PR1, GLU, CHIT3). À noter également que les gènes surexprimés varient également selon l'appartenance de l'oïdium au groupe génétique A ou B. Pour ce dernier on note une sur expression significative d'une PR protéine (CHIT4) et de la glutathione S- transférase (GST) impliqués dans les mécanismes d'oxydo-réduction.

Concernant les phosphonates, ils induisent essentiellement l'expression de gènes codant pour la biosynthèse des anthocyanes (CHI, CHS, BAN, LDOX) et pour des PR protéines (PR10, PGIP) quel que soit le pathogène, et de chitinase et de glucanase en présence de mildiou. A noter la surexpression de la stilbène synthase (STS) qui est exclusivement retrouvée en présence du groupe A d'oïdium.

### Efficacité comparée du BTH, fosétyl et du mancozèbe sur le mildiou de la vigne *in natura*

Les plots témoins révèlent que l'épidémie prend son essor dès le 18 juin et une phase particulièrement explosive se déroule à partir du 9 juillet qui conduit à la date du 20 août à plus de 90% de sévérité sur feuilles. Sur grappes, plus de 90% de sévérité sont atteints en juillet. Aucune grappe ne subsiste à la date du 1<sup>er</sup> septembre (figure 3).

#### Effet du mancozèbe

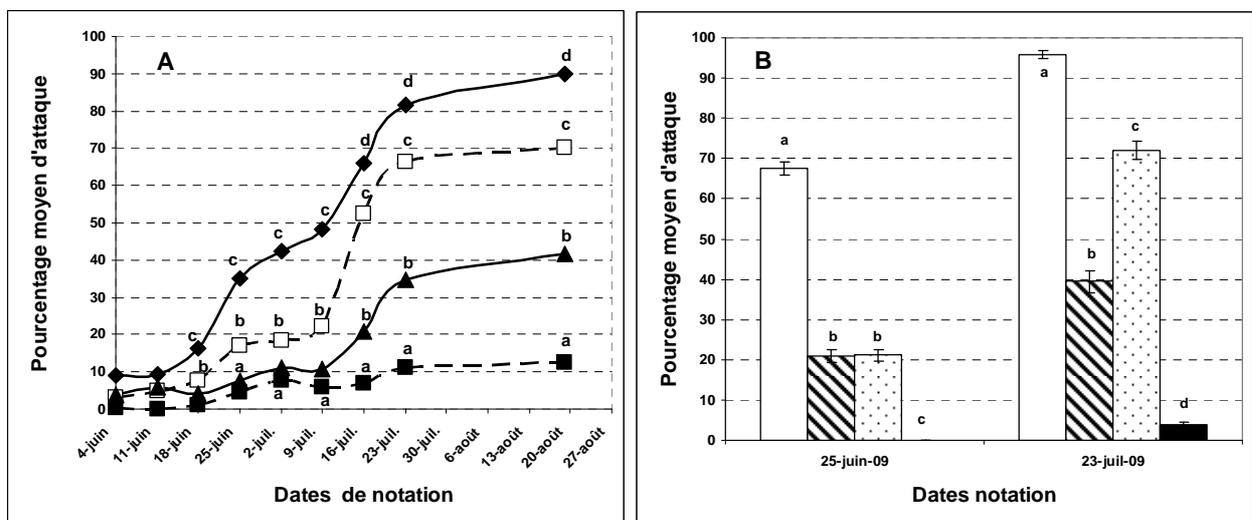
Ce fongicide appliqué en tant que référence fongicide, dans les conditions d'expérimentations (inoculation artificielle de mildiou, traitement hebdomadaire) montre une bonne efficacité tout au long de l'expérience, tant sur feuilles que sur grappes (figure 3A, B).

#### Effet du fosétyl d'aluminium

Le fosétyl d'aluminium présente également une bonne efficacité jusqu'au 16 juillet et permet de n'obtenir que 40% d'attaque sur feuilles à la date du 20 août, par rapport au témoin atteint plus de 90%. Sur grappes, au mois de juin 20% des grappes sont attaquées et en juillet, le pourcentage moyen d'attaque atteint 70%. Au 1<sup>er</sup> septembre quelques grappes subsistent mais très attaquées.

Figure 3 : Evolution de la sévérité d'attaque (%) sur feuilles (A) [(♦) Témoin, (□) BTH ; (■) Dithane; (▲) FOS] et du pourcentage moyen d'attaque sur grappes (B) [(□) control ; (≡) BTH, (▨) FOS ; (■) mancozèbe] de *P. viticola* après inoculation artificielle le 27 mai . (♦) Témoin, (□) BTH ; (■) Dithane; (▲) FOS.

(Figure 3: Severity evolution on leaves [(♦) control, (□) BTH ; (■) mancozeb; (▲) FOS] and on grape berries after an artificial inoculation with *P. viticola* )



#### Effet du BTH

Concernant le BTH, il procure également une bonne protection jusqu'au 9 juillet, mais rapidement les feuilles sont très attaquées et la sévérité atteint 70%. Sur grappe, au mois de juin la sévérité sur grappe atteint seulement 20% comme pour le fosétyl, par contre en juillet, une meilleure protection est conférée par le BTH que par le fosétyl puisqu'on atteint 40% de sévérité sur grappe contre 70% avec le fosétyl. À noter toutefois que les grappes traitées avec le BTH possèdent encore de belles grappes intactes à la date du 1<sup>er</sup> septembre, mais non vérées.

## DISCUSSION

Pour la première fois nous comparons directement l'efficacité de molécules « élicitrices » sur les deux parasites obligatoires, principaux agents pathogènes de la vigne. Les produits testés présentent généralement une meilleure efficacité anti-mildiou qu'anti-oidium. Au cours de tests *in vitro* avec le BTH, une efficacité similaire est cependant obtenue vis-à-vis du mildiou et de l'oidium. Si l'efficacité du BTH est bien connue vis-à-vis de l'oidium de la vigne (Campbell et Latorre, 2004), celle observée envers un oomycète est rarement décrite. En terme d'efficacité, il semble que les souches d'oidium de groupe A soient moins sensibles aux phosphonates que les souches de groupe B. Une telle différence d'efficacité au sein d'une même espèce n'avait jamais été décrite à ce jour. Ce fait est peut être à relier aux exigences écologiques des souches de groupe A qui hiverneraient en France exclusivement sous forme de mycelium dormant, dans la plante.

La vigne est capable de moduler les niveaux d'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de défenses, en réponse à l'application des stimulateurs, mais leurs expressions varient selon la molécule. Ainsi, le BTH stimule essentiellement l'expression de gènes PR tels que PR1, des chitinases (CHIT3, CHIT4) et de glucanase (GLU), pour les mildious, et des gènes de la biosynthèse des stilbènes et des anthocyanes pour les groupes d'oidiums. Ceci est en accord avec les gènes surexprimés chez *Arabidopsis Thaliana*. et la biosynthèse de stilbènes et anthocyanes chez la vigne (Dao *et al.*, 2009, Iriti *et al.*, 2004). Les phosphonates, quant à eux, semblent stimuler la vigne différemment du BTH avec cependant une stimulation générale de PR protéines (PR10, PGIP et parfois CHIT4) et de nombreux gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes (CHI, CHS, LDOX, BAN). A noter que lors de l'élicitation de la plante, inoculée avec l'oidium de groupe A, par les phosphonates, on retrouve une stimulation spécifique de la stilbène synthase comme avec le BTH.

## CONCLUSION

Cette étude montre que les réponses de la plante après différents traitements « éliciteur » conduisent à une efficacité et à une modulation de l'expression des gènes de la vigne dépendante de la molécule utilisée mais également du pathogène présent. Ainsi, existe-t-il une spécificité de réponses liées à la variabilité inter-espèce mais également intra-espèce. Le mildiou de la vigne et les souches d'oidium du groupe B favorisent la surexpression de gènes impliqués dans les voies de biosynthèses des anthocyanes et des PR protéines. Il est intéressant de noter que l'oidium du groupe A favorise plutôt l'expression des gènes de la synthèse de stilbènes. Nous analysons actuellement les polyphénols produits dans les feuilles issues des différentes modalités afin de corréliser ou non l'expression de gènes à une sur production de molécules de défenses.

L'expérimentation terrain réalisée nous a permis de comparer réellement l'efficacité des produits sur le mildiou de la vigne et les analyses biochimiques et moléculaires des feuilles prélevées à différents temps nous renseigneront sur l'état de défense réelle de la plante avant la présence du pathogène.

Les approches déployées complémentaires permettent de mieux comprendre comment agissent ces stimulateurs et quelle efficacité potentielle l'on peut en attendre dans des conditions difficiles (inoculation artificielle). Les données obtenues doivent également permettre de positionner au mieux ces produits dans le cadre de programme de traitement et la mise en place de méthodes alternatives de lutte contre ces agents pathogènes.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient S. Gambier pour la production de plants de vigne et les sociétés Syngenta, Proval et Bayer pour les dons de produits. Un grand merci au CIVB pour son soutien financier.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bompeix G., Fettouche F., Saindrenan P., 1981 - Mode of action of phosethyl Al. *Phytiatrie-Phytopharmacie* 30, 257-272.
- Cambell P.A., Latorre B.A., 2004 – Suppression of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*) by acibenzolar-S-methyl. *Vitis* 43, 209-210.
- Chen WJ., Delmotte F., Richard-Cervera S., Douence L., Greif C., Corio-Costet MF., 2007 - At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied Environ. Microbiol.* 73: 5162-6172.
- Dao TTH., Puig R.C., Kim HK., Erkelens C., Lefeber AWM., Linthorst HJM., Choi YH., Verpoorte R., 2009 – Effect of benzothiadiazole on the metabolome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 146-152.
- Delye C., Laigret F., Corio-Costet M-F, 1997 - New tools for studying epidemiology and resistance of grape powdery mildew to DMI fungicides. *Pesticide Science* 51(3): 309-314.
- Dufour M.-C., 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. IOBC working group, “Induced resistance in plants against insects and diseases”, in press.
- Durrant, W. E., Dong X., 2004 - Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42, 185-209.
- Germer S., Holland M.J., Higuchi R., 2000 - High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Research* 10 (2), 258-266.
- Iriti M., Rossoni M., Borgo M., Faoro F., 2004 – Benzothiadiazole enhances Resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4406-4413.
- Raynal G., Ravise A., Bompeix G. 1980 - Action of aluminium tris-O-ethylphosphonate on pathogenicity of *Plasmopara viticola* and on stimulation of defence reactions of grapevine. *Annales de Phytopathologie* 12, 163-175.
- Reid K. E., Olsson N., Schlosser J., Peng F., Lund S.T., 2006 - An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development - art. no. 27. *BMC Plant Biology* 6, 27-27.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y., Hunt M.D., 1996 - Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Sombardier A., Dufour M-C., Blancard D., Corio-Costet M.-F., 2009b - Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides : distribution and reduced cross-sensitivity. *Pest Manag. Sci.* 65, sous presse.
- Soyez J.L., 2001 - New phosphonates and potassium polyvalents for use in viticulture (1993-2001). *Progres Agricole et Viticole* 118, 487-490.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Metraux J.P., 1997 - Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35, 325-370.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J, 2006 - Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44, 135-162.