



ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES SYMPTÔMES FOLAIRES D'ESCA ET CARACTÉRISATION DES COMMUNAUTÉS FONGIQUES DES TISSUS LIGNEUX

BENETREAU Céline
12 Septembre 2014



Introduction
Partie 1
Partie 2a
Partie 2b

Conclusions/Perspectives

Plan de l'exposé

Introduction

Partie 1

Etude de l'évolution et caractérisation des symptômes d'esca

Partie 2a

Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable

Partie 2b

Caractérisation de la microflore fongique et bactérienne par empreinte moléculaire

Conclusions/Perspectives



Introduction
Partie 1
Partie 2a
Partie 2b

Conclusions/Perspectives

Plan de l'exposé

Introduction

Partie 1

Etude de l'évolution et caractérisation des symptômes d'esca

Partie 2a

Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable

Partie 2b

Caractérisation de la microflore fongique et bactérienne par empreinte moléculaire

Conclusions/Perspectives



Plan de l'exposé

Introduction

Partie 1

Etude de l'évolution et caractérisation des symptômes d'esca

Partie 2a

Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable

Partie 2b

Caractérisation de la microflore fongique et bactérienne par empreinte moléculaire

Conclusions/Perspectives



Plan de l'exposé

Introduction

Partie 1

Etude de l'évolution et caractérisation des symptômes d'esca

Partie 2a

Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable

Partie 2b

Caractérisation de la microflore fongique et bactérienne par empreinte moléculaire

Conclusions/Perspectives



Introduction
Partie 1a
Partie 1b
Partie 2

Conclusions/Perspectives

Plan de l'exposé

Introduction

Partie 1

Etude de l'évolution et caractérisation des symptômes d'esca

Partie 2a

Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable

Partie 2b

Caractérisation de la microflore fongique et bactérienne par empreinte moléculaire

Conclusions/Perspectives



- 3 principaux dépérissements affectant la vigne (Urbez-Torrez, 2011)
 - L'eutypiose
 - Les chancres à *Botryosphaeria* spp.
dont le Black Dead Arm (BDA)
 - L'esca



➡ Pertes économiques importantes

2001 : Suppression de l'arsénite de sodium





Symptômes foliaires...

- Forme lente



- Forme sévère



Cépage blanc



Cépage noir



Black Dead Arm *sensu* Larignon



La Bande Brune...

- Localisée souvent au niveau des bras
- Intensité de la coloration évolue avec le temps
- Origine encore incomprise

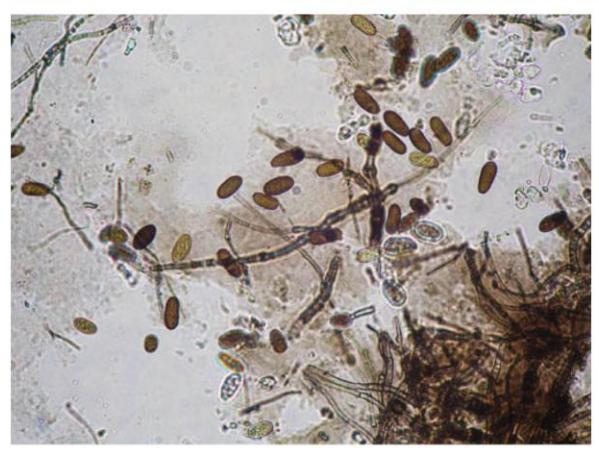




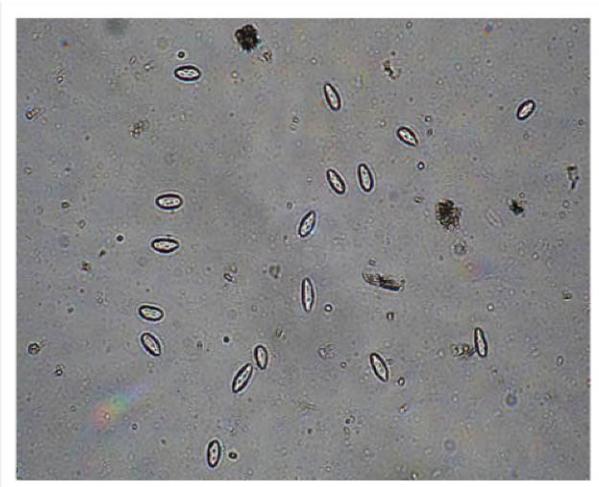
Botryosphaeria spp. : 2 espèces principales en France



B. obtusa



B. stevensii





Symptômes foliaires ...

- Forme lente



Cépage blanc



Cépage noir

- Forme sévère





Symptômes dans le bois...

- Nécroses internes...



Sectorielle



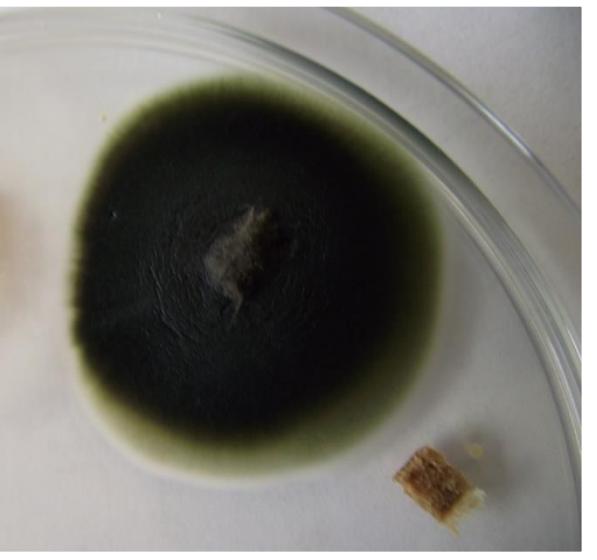
Mixte



Centrale

- Lésion longitudinale superficielle...





Phaeomoniella chlamydospora (Pch)



Phaeoacremonium aleophilum (Pal)

**Une synergie
parasitaire complexe**

*Fomitiporia mediterranea
(Fm)*





- Cohabitations des symptômes foliaires
- Convergence des symptômes foliaires
- Bande Brune retrouvée chez plants Esca
- Postulat de Koch partiellement reproduit

Hypothèses concernant l'origine des symptômes foliaires:

1. Toxines
2. Hypothèse « pression parasitaire »



Source =
Darrietort et al.,
2007



Introduction

Partie 1
Partie 2a
Partie 2b

Conclusions/Perspectives

Objectif de l'étude

Introduction

Partie 1

Etude de l'évolution et caractérisation des symptômes d'esca

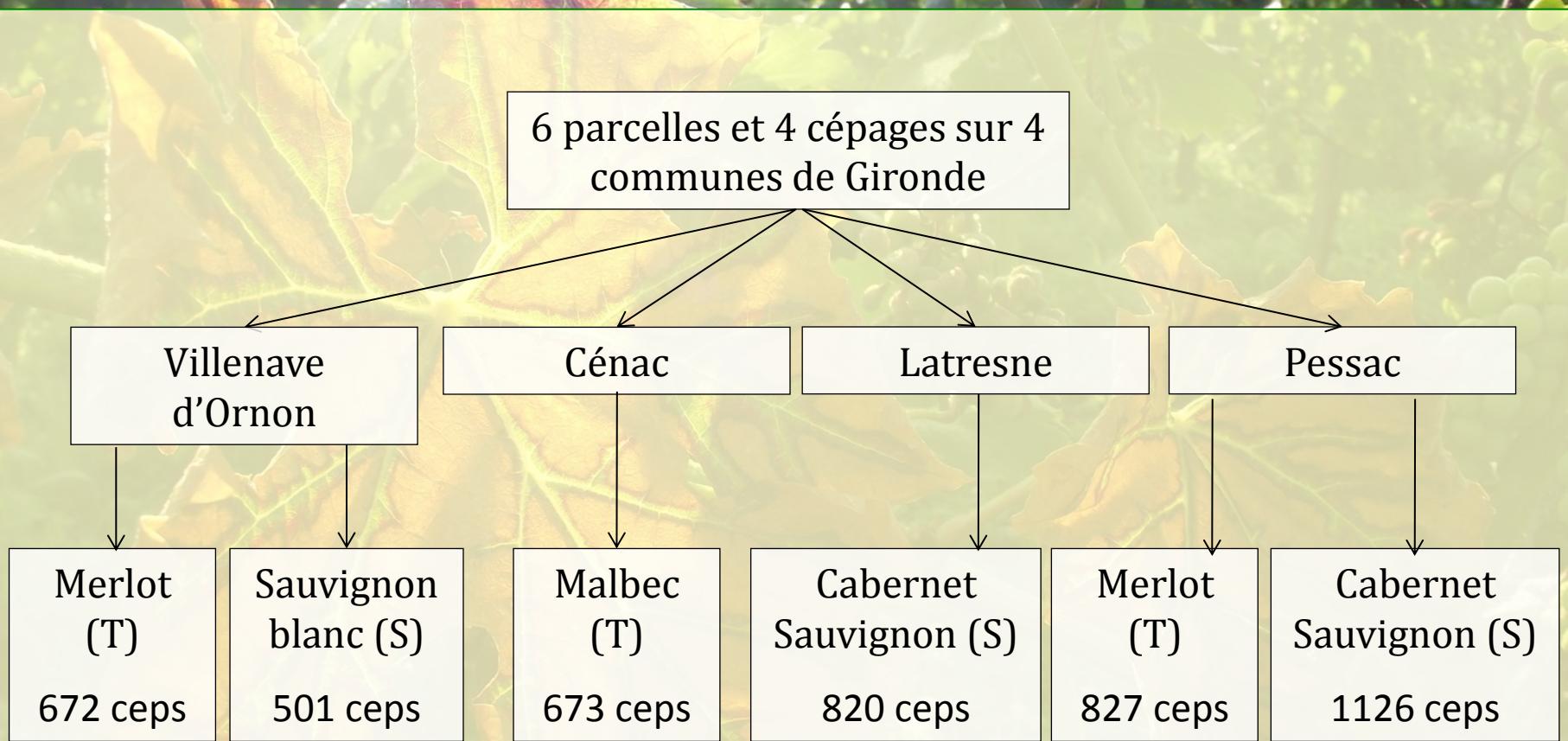
Partie 2a

Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable

Partie 2b

Caractérisation de la microflore fongique et bactérienne par empreinte moléculaire

Conclusions/Perspectives



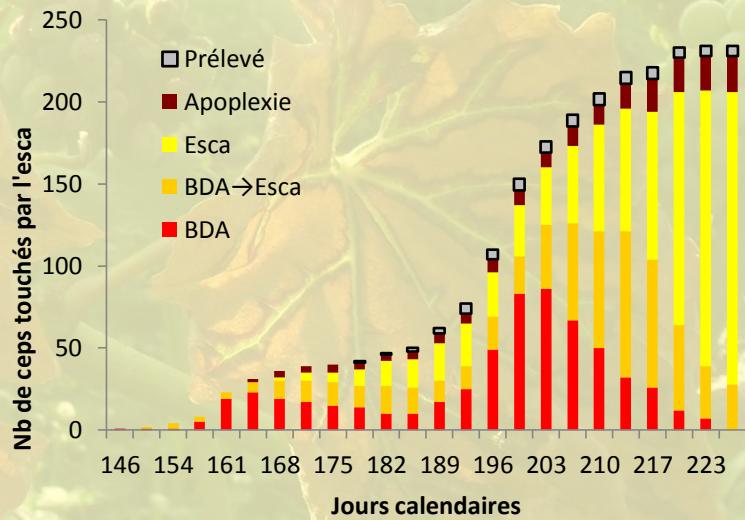
2 notations par semaine de l'évolution des symptômes
= 24 notations au total



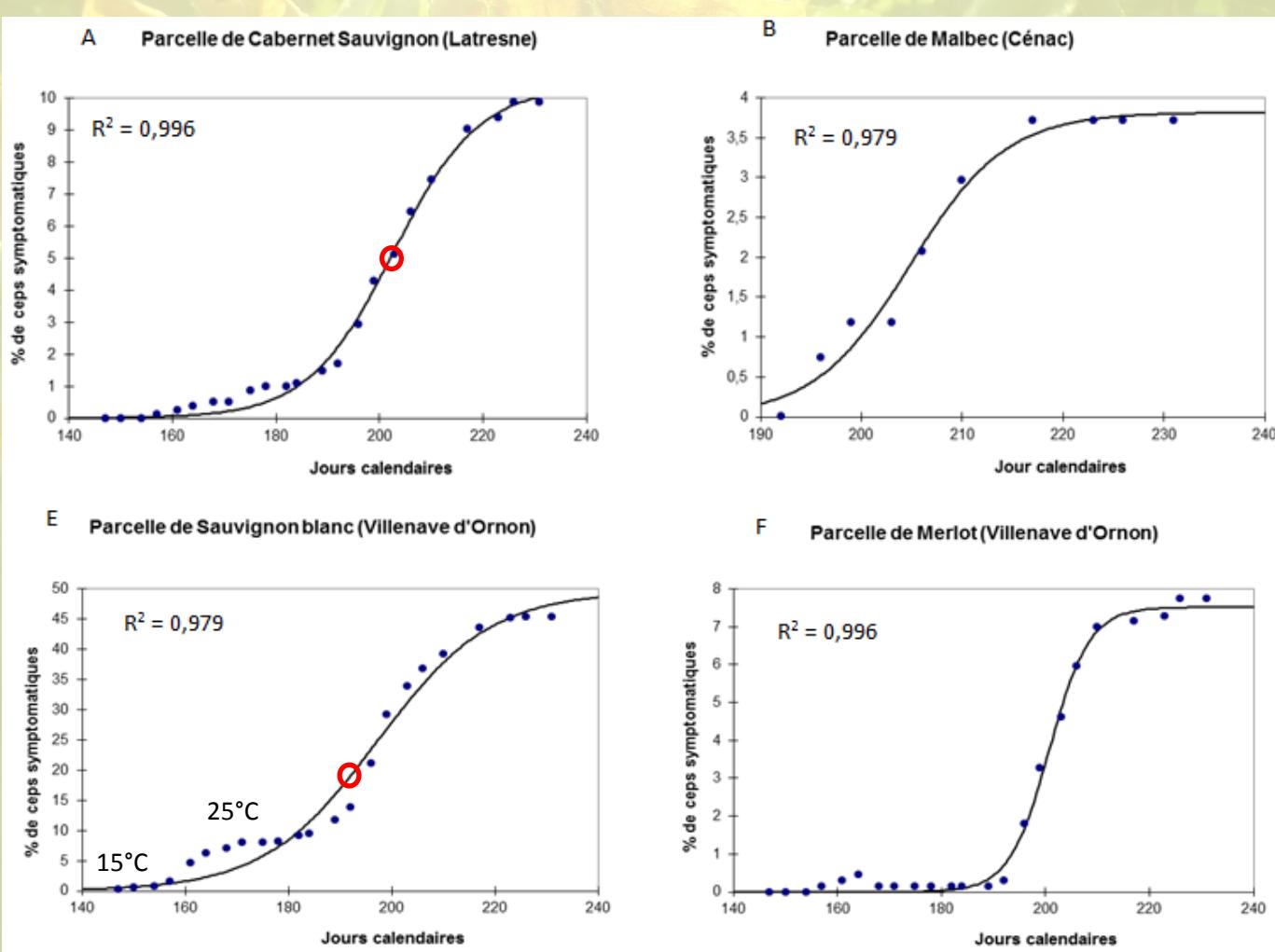
Résultats du suivi au vignoble



Esca = BDA



Représentation de l'évolution des symptômes d'esca pour la parcelle de Sauvignon blanc de Villenave d'Ornon



Sol argilo-
calcaire

Sol graveleux
= peu de
rétenzione
d'eau

Courbes de régression obtenues à partir du nb de céps symptomatiques en fonction du tps et basées sur l'équation logistique $Y = (pr3 / (1+Expo (-pr1-pr2*x)))$

○ Date d'expression de 50% des symptômes



- ➡ **Esca et BDA = 1 seule maladie**
- ➡ **Même cinétique quel que soit le cépage ou l'année d'étude (même courbes en 2012 et 2013)**
- ➡ **Ecarts à la courbe probablement expliqués par la réserve hydrique du sol**
- ➡ **Relation probable entre T°, disponibilité en eau et cinétique d'apparition des symptômes**



Introduction
Partie 1
Partie 2a
Partie 2b

Conclusions/Perspectives

Plan de l'exposé

Introduction

Partie 1

Etude de l'évolution et caractérisation des symptômes d'esca

Partie 2a

Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable

Partie 2b

Caractérisation de la microflore fongique et bactérienne par empreinte moléculaire

Conclusions/Perspectives



2 parcelles = 2 cépages

10 plants de Cabernet franc (Cénac) prélevés en juin 2013

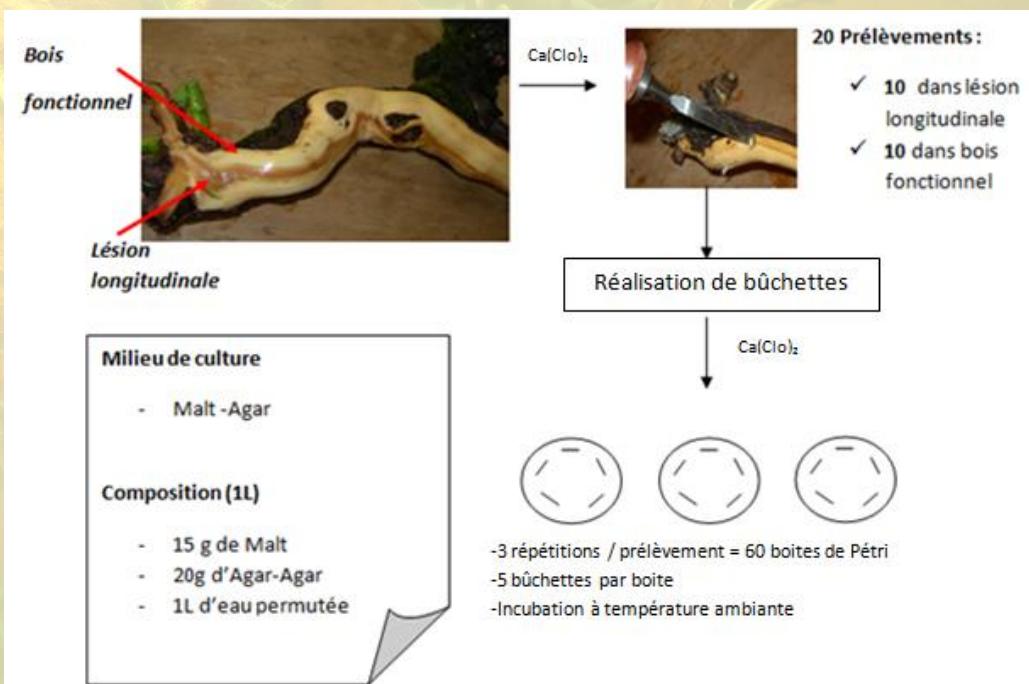
20 plants de Cabernet franc (Cénac) prélevés en mars 2014*

20 plants de Sauvignon blanc (Villenave) en avril* et juin 2014*

■ Comparaison des bandes brunes à différentes dates de prélèvement sur CF

■ Comparaison des bandes brunes à différentes dates de prélèvement sur SB

* Plants utilisés pour les analyses SSCP



→ Etude réalisée sur 15 000 bûchettes

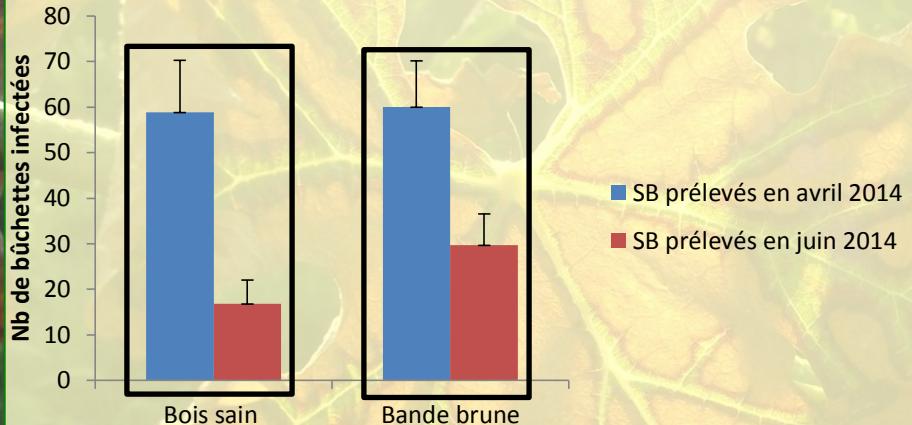


Classification				
Regne	Phylum	Ordre	Famille	Genre
Fungi	Ascomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria
Fungi	Ascomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus
Fungi	Ascomycetes	Dothideales	Dothioraceae	Aureobasidium
Fungi	Ascomycetes	Botryosphaeraiales	Botryosphaeriaceae	Botryosphaeria
Fungi	Ascomycetes	Chaetothyriales	Chaetothyriaceae	Chaetothyrium
Fungi	Deuteromycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	Cladosporium
Fungi	Ascomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Curvularia
Fungi	Ascomycetes	Xylariales	Diatrypaceae	Eutypa
Fungi	Ascomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium
Fungi	Ascomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Gliocladium
Fungi	Ascomycetes	Pleosporales	Lophiostomataceae	Lophiostoma
Fungi	Ascomycetes	Onygenales	Arthrodermataceae	Microsporum
Fungi	Ascomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Penicillium
Fungi	Ascomycetes	Xylariales	Amphisphariaceae	Pestalotia
Fungi	Ascomycetes	Diaporthales	Togniniaceae	Phaeoacremonium
Fungi	Ascomycetes	Incartae sedis	Incartae sedis	Phaeomoniella
Fungi	Ascomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	Phomopsis
Fungi	Ascomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Saccharomyces
Fungi	Ascomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma
Fungi	Ascomycetes	Hypocreales	Plectosphaerellaceae	Verticillium

En noir les saprophytes ; en rouge le pathogènes ; en vert les champignons potentiellement bénéfiques



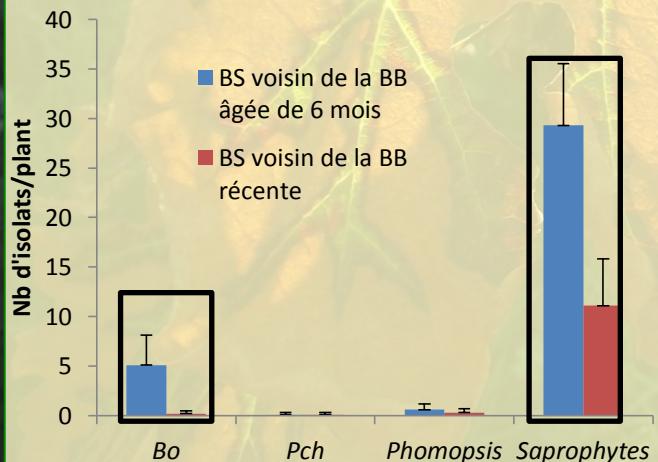
Nombre de bûchettes infectées selon le type de tissu et la date de prélèvement



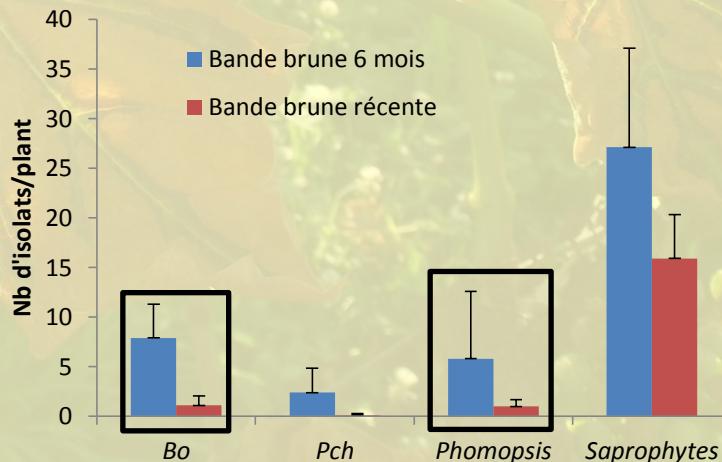
→ Plus de colonisation dans les SB avec une BB âgée de 6 mois (prélévés en avril 2014)

→ Plus de *Bo* et *Phomopsis* dans la BB âgée de 6 mois

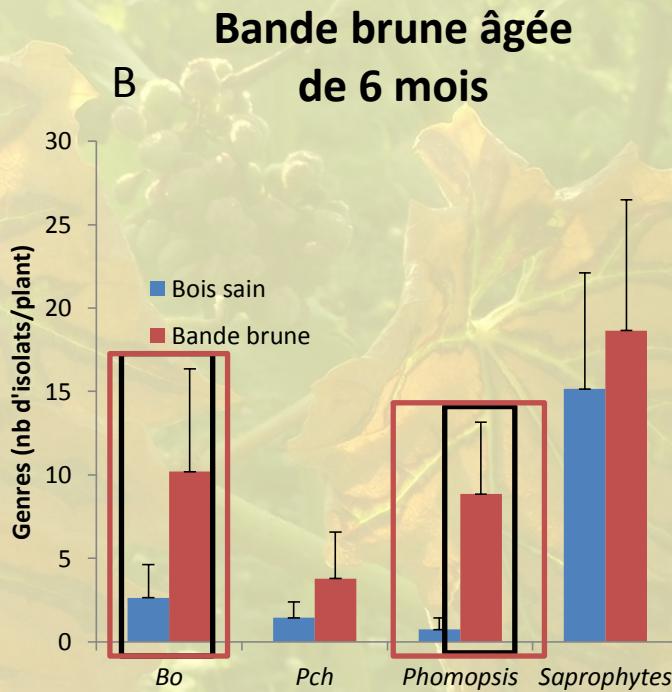
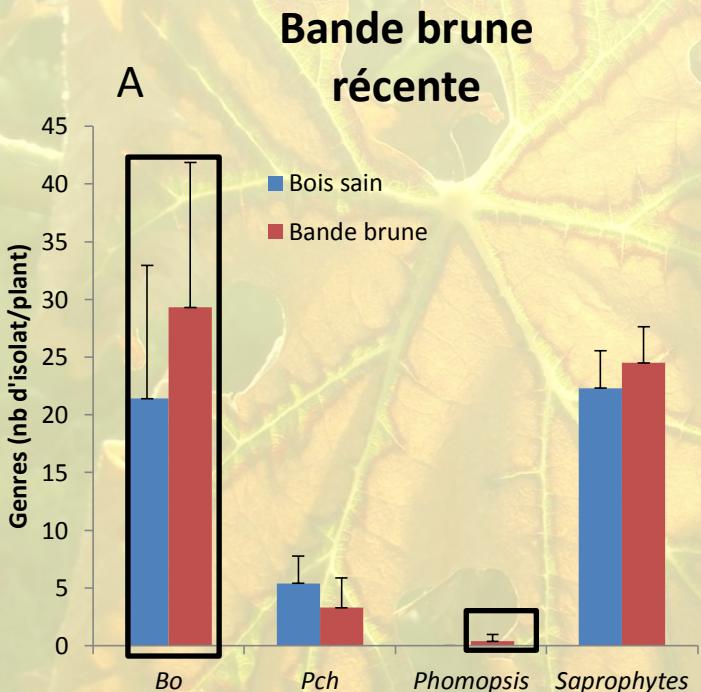
Bois sain



Bande brune



— ANOVA



Moyennes du nombre d'isolats de champignons pathogènes et saprophytes isolés dans les plants de Cabernet franc prélevés en 2013 par Yacine Meziani (bande brune âgée de quelques jours) (A) et en 2014 (bande brune âgée de 6 mois) (B)

— ANOVA
— Student



- 
- ➡ Grande diversité fongique dont des champignons potentiellement bénéfiques (*Trichoderma*, *Fusarium*...)
 - ➡ Variations du nb de bûchettes infectées selon la date de prélèvement
 - ➡ *Botryosphaeria* spp. et *Phomopsis* plus abondants dans la BB plusieurs mois après sa formation = évolution de la microflore fongique



Plan de l'exposé

Introduction

Partie 1

Etude de l'évolution et caractérisation des symptômes d'esca

Partie 2a

Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable

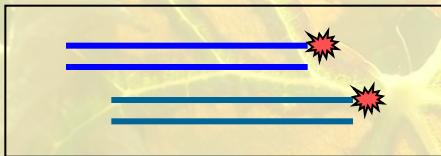
Partie 2b

Caractérisation de la microflore fongique et bactérienne par empreinte moléculaire

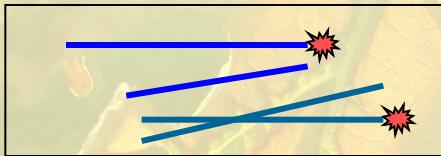
Conclusions/Perspectives



SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism



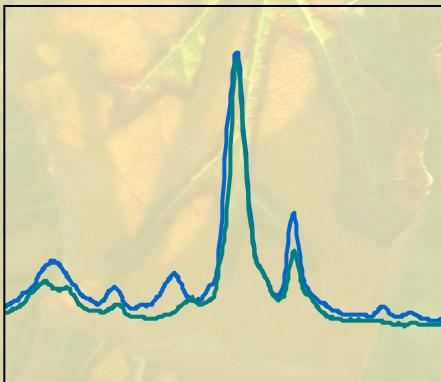
Amplification PCR de l'ADN à l'aide d'amorces universelles
Marquage (*fluorophore 6-FAM*)



Dénaturation (5 min à 95°C)



Renaturation (10 min à 0°C)



Electrophorèse non dénaturante
(*séquenceur automatique ABI 3130*)

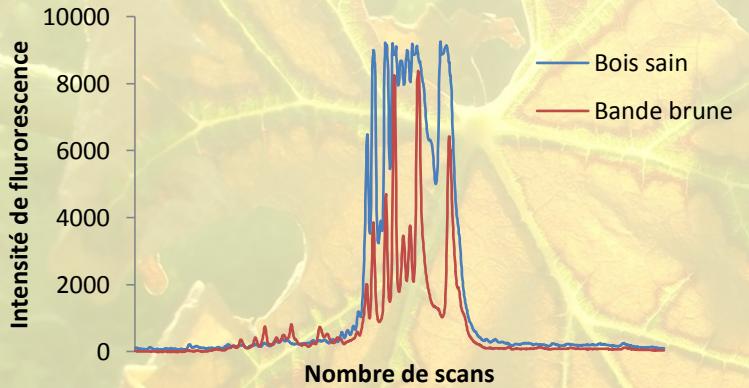
Traitement statistique par ACP



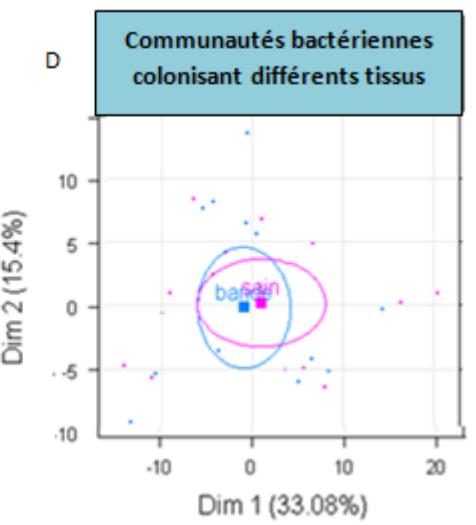
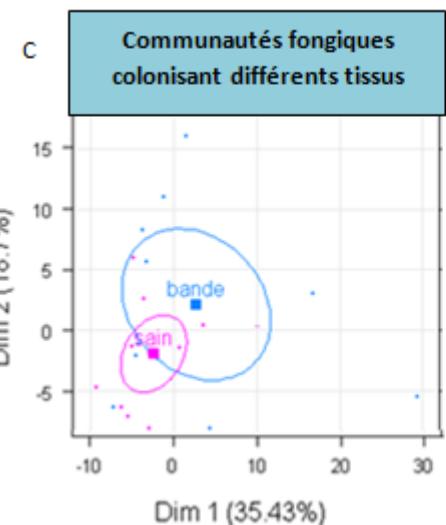
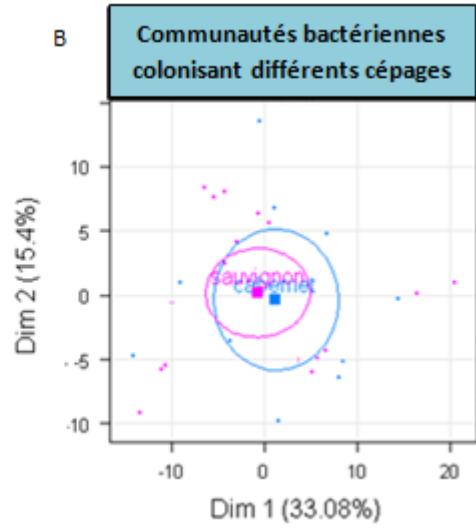
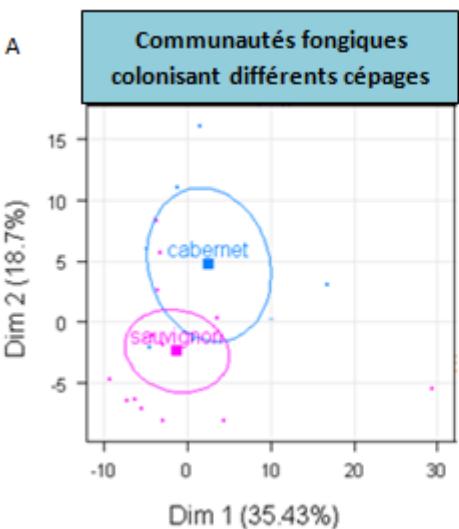
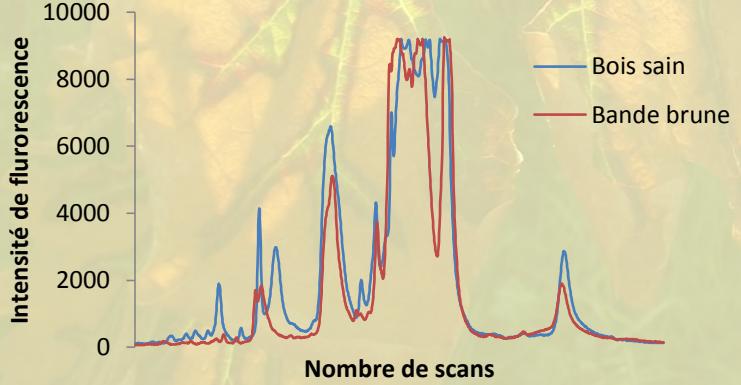


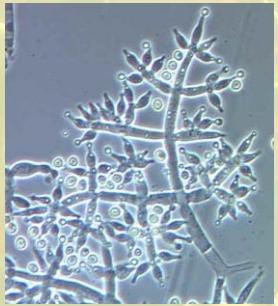
Analyse des communautés microbiennes par SSCP

Communautés fongiques sur Sauvignon blanc

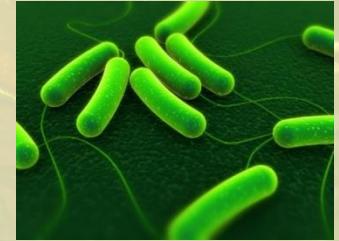


Communautés bactériennes sur Sauvignon blanc



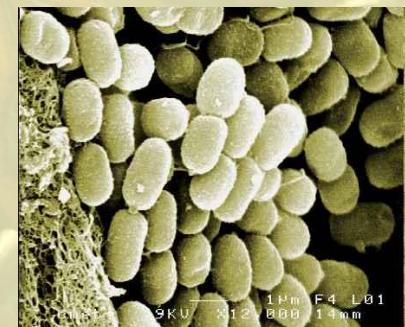


- ➡ **Visualisation de la richesse des communautés fongiques et bactériennes**
- ➡ **Tendance des populations fongiques à se différencier selon le type de tissus et le cépage = confirmation des résultats de microbiologie classique**
- ➡ **Pas de mise en évidence d'un effet date de prélèvement**





- ➡ **BDA et esca = 2 stades d'une même maladie**
- ➡ **Modélisation de la cinétique d'apparition des symptômes**
- ➡ **Le bois de vigne = milieu riche et hospitalier**
 - ↳ environ 20 genres fongiques en microbiologie classique
- ➡ **Pathogènes sont endophytes**
 - ↳ *Botryosphaeria* spp. sont dominants
 - ↳ *Phomopsis* et *Pch* présents
 - ↳ Evolution quantitative dans la bande brune
 - ↳ Origine de la bande brune non expliquée
- ➡ **Analyses moléculaires : comparaison de la diversité des communautés fongiques et bactériennes**



SKU X12 1.0m F4 L01



- ➡ **Augmenter les effectifs pour le suivi des cépages tolérants**
- ➡ **Meilleure compréhension de l'activité des pathogènes**
 - ↳ *Mesure de la conduction hydrique*
- ➡ **Les relations entre les champignons devront être étudiées**
 - ↳ *Trichoderma, Fusarium...*
- ➡ **Rôle des bactéries ?**
 - ↳ *Pathogénicité ? Mise en place des symptômes d'esca ?*
- ➡ **Méthodes moléculaires ouvrent un large champ d'études à poursuivre**
 - ↳ *SSCP, pyroséquençage et qPCR*

Esca = Maladie complexe

↳ **plusieurs agents microbiens**

↳ **facteurs abiotiques**



MERCI DE VOTRE ATTENTION