



**HAL**  
open science

# Impact de l'endomycorhization sur la résistance naturelle et induite de la vigne à *Plasmopara viticola* (agent causal du mildiou)

Jérémie Zerbib

## ► To cite this version:

Jérémie Zerbib. Impact de l'endomycorhization sur la résistance naturelle et induite de la vigne à *Plasmopara viticola* (agent causal du mildiou). Sciences du Vivant [q-bio]. 2015. hal-02800479

**HAL Id: hal-02800479**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02800479v1>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Rapport de stage Master deuxième année,  
Année universitaire 2014-2015

## Impact de l'endomycorhization sur la résistance naturelle et induite de la vigne à *Plasmopara viticola* (agent causal du mildiou)



Jérémie ZERBIB

Université de Bourgogne – Dijon  
UFR des Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement  
Master Sciences, Technologies, Santé  
Mention Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité Biologie Intégrative des Interactions Plante Microbes Environnement  
Parcours Professionnel Plante Production Biotechnologie

Maitres de stage : Sophie TROUVELOT et Laurent BONNEAU

UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB

Pôle Interactions Plantes-Microorganismes-ERL CNRS 6300

## DECLARATIONS

Par la présente, je soussigné Jérémie ZERBIB, certifie avoir rédigé mon mémoire de stage intitulé « Impact de l'endomycorhization sur la résistance naturelle et induite de la vigne à *Plasmopara viticola* (agent causal du mildiou) », seul(e) et sans aucune aide interdite. Je ne me suis basé(e) sur aucune autre source que celles mentionnées et citées dans le manuscrit. Ce mémoire n'a ni dans sa forme actuelle, ni dans une forme proche, été soumis à une autre institution (Université, MASTER, ...).

Lieu, Date et Signature  
Dijon, le 01/09/2015

Par la présente, nous soussignés Laurent BONNEAU et Sophie TROUVELOT, Maîtres de stage de Jérémie ZERBIB certifions avoir lu le manuscrit intitulé : « Impact de l'endomycorhization sur la résistance naturelle et induite de la vigne à *Plasmopara viticola* (agent causal du mildiou) » et être en accord avec son contenu.

Lieu, Date Signature  
Dijon, le 01/09/2015

## Remerciements

J'adresse mes remerciements à :

Marielle Adrian, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et votre disponibilité ;

Daniel Wipf, pour m'avoir encouragé et orienté dans mon choix de stage ;

Sophie Trouvelot et Laurent Bonneau, pour m'avoir donné la possibilité de mener un stage sous votre direction et sur un sujet passionnant, pour votre disponibilité et vos encouragements dans les moments difficiles ;

Eric Bernaud, pour son aide importante et sa bonne humeur de tous les instants ;

Lucile Jacquens, pour m'avoir formé à la biologie moléculaire, un univers qui m'était étranger, son aide et sa bonne humeur ;

Diederik van Tuinen, pour son aide et sa disponibilité ;

Mon collègue de bureau, Hervé, pour nos discussions à la fois studieuses et distrayantes ;

Les membres de l'équipe mycorhize, résistance induite et NO ;

La relève de l'INRA : Antonin, Sam, Vincent, Justine, Yuko, Daphné, Cécile, Laure-Anne, Maud, Lény, Damien, Cannelle, Carole, Elise, Nora, Alice, Florent, Martin *et al.*

Mes colocos ;

Ma famille ;

Enfin, je remercie tous ceux que j'ai pu oublier.

## Liste des abréviations

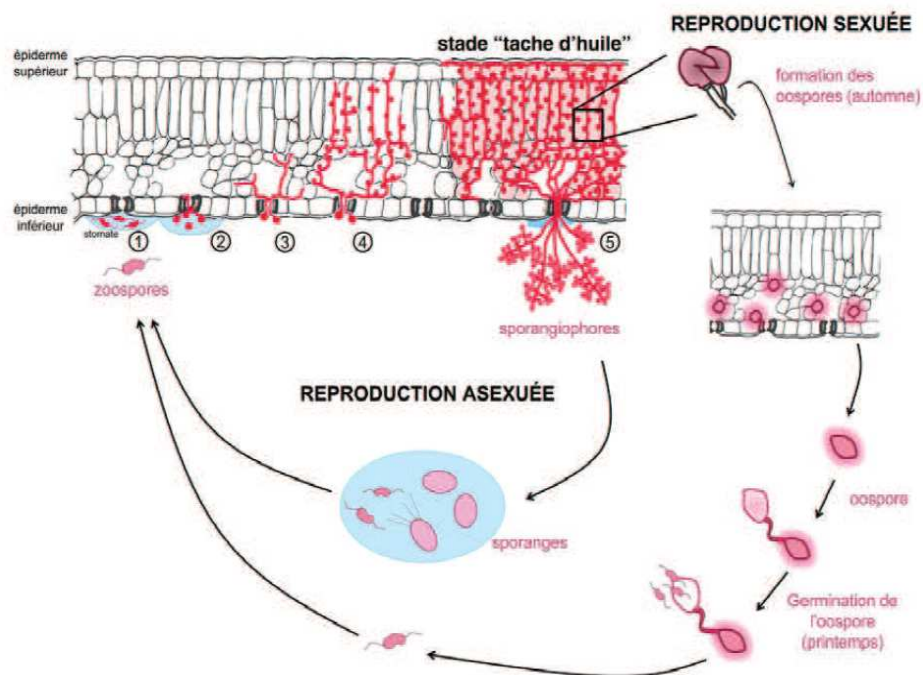
a%	Pourcentage des arbuscules de la partie mycorhizée
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BABA	Acide $\beta$ -aminobutyrique
BET	Bromure d'éthidium
BEG/IBG	International Bank for the Glomeromycota
bp	Paire de bases
BTH	Acibenzolar-S-méthyl
CMA	Champignon Mycorhizogène à Arbuscules
DAMP/MAMP/PAMP	Damage/Microbe/Pathogen-Associated Molecular Pattern
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphate
DTT	Dithiothréitol
E	Elicité par PS3
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
F%	Fréquence de la Mycorhization
HT	Hexose Transporter
JA	Acide Jasmonique
LSU	Large ribosomal Subunit
M%	Intensité globale de la mycorhization
MI « NE »	Moyenne des Indices de sporulation de 50 disques « Non Elicités »
MI « E »	Moyenne des Indices de sporulation de 50 disques « Elicités »
MIR	Résistance Induite par la Mycorhize
MPN	Most Probable Number
Myc	Mycorhizé
NE	Non élicité par PS3
NM	Non Mycorhizé
NPP	Nombre le Plus Probable
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRR	Pattern Recognition Receptors
PS3	Laminarine Sulfatée (degré de sulfatation 3)
PV+	Inoculé par <i>Plasmopara viticola</i>
PV-	Non inoculé par <i>P. viticola</i>
RT	Reverse Transcription
SA	Acide Salicylique
SAR	Résistance Systémique Acquise
SDP	Stimulateurs des défenses des plantes
SUC/SUT	Sucrose Carrier/Transporter
SWEET	Sucrose Will Eventually be Exported Transporter
TAE	Tris/Acétate/EDTA
Tm	Température d'hybridation
UV	Ultra-Violet

## Sommaire

- 1- Introduction
  - 2- Matériels et Méthodes
    - 2.1- Matériel végétal
    - 2.2- Conditions de culture des plants greffé-soudés
    - 2.3- Inoculation des champignons mycorhiziens
    - 2.4- Traitement éliciteur avec PS3
    - 2.5- Inoculation avec *Plasmopara viticola*
    - 2.6- Mesures de croissance et de biomasse végétale
    - 2.7- Evaluation du taux de mycorhization
    - 2.8- Evaluation du potentiel mycorhizogène de l'inoculum Symbivit®Pro
    - 2.9 - Evaluation de la résistance induite contre *P. viticola*
      - 2.9.1- Estimation du taux moyen de protection
      - 2.9.2- Estimation de la colonisation parasitaire interne
    - 2.10- Identification des champignons mycorhiziens présents dans les racines
      - 2.10.1- Extraction d'ADN de racines
      - 2.10.2- Amplification par PCR
    - 2.11- Analyse *in planta* de l'expression de gènes cibles
      - 2.11.1- Extraction des ARNs totaux de racines
      - 2.11.2- Extraction des ARNs totaux de feuilles
      - 2.11.3- Transcription réverse des ARNm en ADNc
      - 2.11.4- Vérification de la validité des amorces par PCR gradient
  - 3- Résultats et Discussion
    - 3.1- Détermination du taux de mycorhization
    - 3.2- Estimation du potentiel mycorhizogène de l'inoculum Symbivit®Pro
    - 3.3- Identification *in planta* des CMAs
    - 3.4- Suivi de croissance (hauteur et biomasse) des jeunes plants de vigne
    - 3.5- Estimation de l'induction de résistance à *P. viticola*
      - 3.5.1- Impact des traitements sur la sporulation parasitaire
      - 3.5.2- Impact des traitements sur la colonisation parasitaire interne
    - 3.6- Analyse *in planta* de l'expression de gènes cibles
- Références bibliographiques
- Annexes
- Résumé/abstract

## 1-Introduction

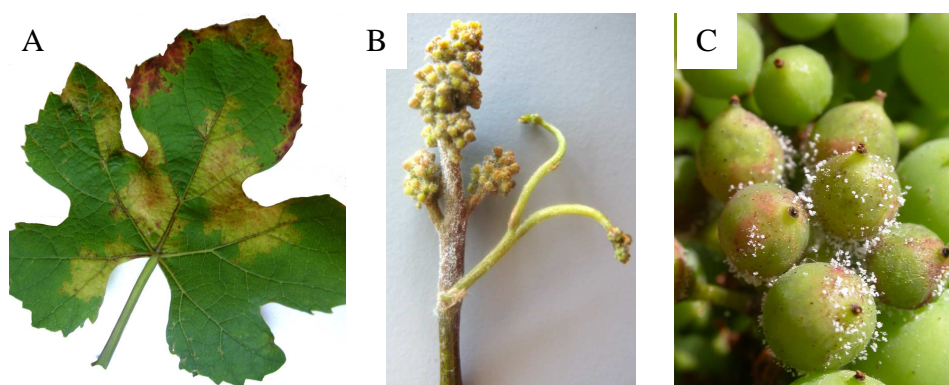
La viticulture constitue un enjeu économique majeur pour la France puisqu'elle représente 15 % de la valeur de la production agricole (FranceAgrimer, 2013). Néanmoins, elle est l'une des filières les plus consommatrices en produits phytopharmaceutiques étant donné qu'elle utilise à elle seule 30% des fongicides (lutte chimique), tandis qu'elle ne représente que 4% de la surface agricole utile (Rapport d'expertises pesticides INRA, 2006).



**Figure 1 : Présentation des cycles de reproduction asexuée et sexuée de *P. viticola*.** Durant la phase de reproduction asexuée, des zoospores (spores flagellés), libérées de sporanges, nagent dans un film d'eau jusqu'au voisinage des stomates (1). Ces spores s'enkystent (pertes des flagelles et adhésion au tissu végétal) au niveau des cellules de garde avant de former une vésicule sous-stomatique et des hyphes germinatifs (2). *P. viticola* développe alors un réseau d'hyphes entre les cellules végétales (3) et des suçoirs (haustoria) au sein de ces dernières, capables d'absorber les nutriments de la plante hôte (sucres en particulier) (4). Finalement, en conditions environnementales propices, on observe la sporulation asexuée du pathogène qui se traduit par la formation de sporangiophores, émergeant des stomates et portant des sporanges, générant de nouvelles zoospores asexuées infectieuses (Riemann *et al.*, 2002) (5). *P. viticola* peut également, à l'automne, enclencher un cycle de reproduction sexuée se traduisant par la formation d'oospores (œufs d'hiver) dans les tissus préalablement contaminés. Dans ce contexte, des hyphes présents au sein des tissus foliaires vont différencier, à leur extrémité hyphale, la formation soit d'anthéridie (activité gamétogène mâle) soit d'oogone (activité gamétogène femelle). Il y aura alors fusion entre gamètes compatibles, cette reproduction sexuée se traduisant par la formation d'un zygote correspondant à l'oospore. Au printemps suivant, une réduction chromatique (méiose) s'effectuera dans ces oospores pour produire des zoospores (d'origine sexuée) sources d'inoculum primaire (Berk et Curt, 2009).

Ce phénomène s'explique principalement par le fait que la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.) est génétiquement sensible à de nombreux agents pathogènes cryptogamiques, dont *Plasmopara viticola*, agent causal du mildiou (Boso et Kassemeyer, 2008 ; Berk et Curt, 2009 ; Gessler *et al.*, 2011 pour revues). Ce dernier est un oomycète, biotrophe obligatoire inféodé à la vigne, présentant une phase annuelle de reproduction sexuée et de plusieurs cycles de reproduction asexuée (Vercesi *et al.*, 1999) (**Figure 1**).

*P. viticola* est capable d'infecter tous les organes herbacés : feuilles (symptômes « tache d'huile » sur la face supérieure et sporulation parasitaire blanche sur la face inférieure), inflorescences (rot gris) et baies vertes (symptômes de rot gris ou de rot brun) (Lafon et Bulit, 1981) (**Figure 2**). Incidemment, le parasite peut réduire quasiment à néant les rendements mais aussi altérer la qualité du raisin s'il n'est pas maîtrisé (Dubos, 2002).



**Figure 2 :** Photographies illustrant la symptomatologie du mildiou de la vigne sur différents organes herbacés. **A :** taches d'huiles sur la face supérieure d'une feuille ; **B :** rot gris (sporulation) sur inflorescence et **C :** rot gris (sporulation) sur jeune baie. (Source : S. Trouvelot, INRA Dijon, UMR Agroécologie).

Ainsi, pour lutter contre le mildiou les viticulteurs ont majoritairement recours à l'utilisation systématique de fongicides de synthèse ou à base de cuivre (jusqu'à 10 traitements par an selon la région ; Agreste, 2006). L'impact économique de ce parasite est double pour le viticulteur du fait d'une perte de récolte et du coût lié à l'achat de produits phytosanitaires se chiffrant à lui seul à approximativement 300 millions d'euros par an (FranceAgrimer, 2013). Ces pratiques phytosanitaires ont par ailleurs un impact négatif avéré sur la santé humaine et sur l'environnement. Enfin, malgré la large gamme de spécialités référencées dans le catalogue des usages phytopharmaceutiques destinés à la lutte contre le mildiou (28 matières actives, source : e-phy), l'application répétée de fongicides a provoqué des phénomènes de résistance, chez les populations de *P. viticola*, de plus en plus fréquents (ANSES, 2012). La gestion du mildiou, notamment par la lutte chimique, est ainsi contraignante.

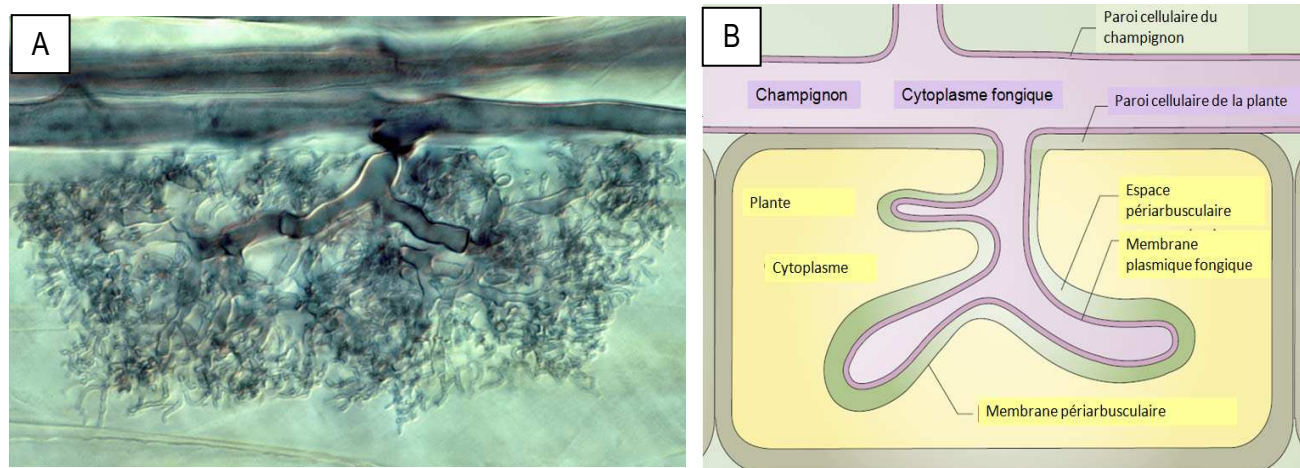


Dans ce contexte, la France a décidé, suite au Grenelle de l'environnement, la mise en place en 2008 du plan EcoPhyto ([agriculture.gouv.fr/ecophyto](http://agriculture.gouv.fr/ecophyto) ; Cousinie *et al.*, 2015). Ce dernier a pour objectif majeur de réduire si possible de moitié l'utilisation de pesticides pour la protection des cultures. Ainsi, de nombreuses études ont été menées afin de développer des solutions complémentaires voire alternatives à la lutte chimique. Parmi ces stratégies, la stimulation des défenses innées de la plante, par l'application d'éliciteurs (ou Stimulateurs des Défenses des Plantes, SDP), apparaît comme une voie prometteuse (Walters *et al.*, 2013 ; Huang et Zimmerli, 2014). Les défenses que la plante met en place à l'encontre de bioagresseurs se déclinent en deux catégories majeures : (i) les défenses dites « constitutives », en place avant l'infection et (ii) celles dites « inductible » ou « induites » en réponse à l'interaction avec des agents potentiellement pathogènes (Jones et Dangl, 2006). La première catégorie se caractérise par des barrières physiques (cuticules, paroi cellulaire) et chimiques ; ce dernier type impliquant soit une libération de molécules par la plante dans son milieu (exsudats racinaires, composés racinaires, etc.) soit des molécules déjà présentes dans les cellules (métabolites secondaires, protéines antifongiques). Si les défenses constitutives n'ont pas permis de stopper l'infection, les défenses induites pourront alors être déclenchées par la plante (Jones et Dangl, 2006). En effet, lors de la perception d'un bioagresseur, la plante déclenche la PAMP-triggered immunity (PTI). Celle-ci est basée sur la détection, par des récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptors) situés au niveau de la membrane plasmique végétale, de différents types de motifs moléculaires (Jones et Dangl, 2006 ; Macho et Zipfel, 2014). Ces derniers sont représentatifs soit (i) de la paroi ou d'excrétions de l'agent pathogène ou du microbe ainsi perçu (Microbe/Pathogen-Associated molecular pattern, MAMP ou PAMP), soit (ii) de fragments de la paroi végétale générés suite à l'attaque du bioagresseur (Damage-Associated Molecular Pattern, DAMP). L'activation des récepteurs PRRs qui s'ensuit, déclenche alors une cascade de signalisation dirigée vers le noyau qui se traduit notamment par l'induction de flux d'ions ou de formes actives de l'oxygène (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Incidemment, des facteurs de transcription sont activés, induisant des régulations du niveau d'expression de gènes de défense.

Dans ce contexte, la stimulation des défenses de la plante par l'application d'un éliciteur (ou SDP) consiste à traiter le végétal, généralement par voie foliaire, avec une molécule de type PAMP, MAMP ou DAMP, mimant ainsi l'attaque d'un agent pathogène avirulent (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Parmi les éliciteurs qui permettent d'activer les défenses et d'induire la résistance de la vigne contre *P. viticola*, la laminarine ( $\beta$ -1,3-glucane extrait de l'algue brune *Laminaria digitata*) sous sa forme sulfatée (PS3) est un modèle d'étude. Elle montre en effet une bonne efficacité en terme d'induction de résistance (Trouvelot *et al.*,

2008 ; Steimetz *et al.*, 2012 ; Gauthier *et al.*, 2014), même si les résultats acquis au vignoble apparaissent peu reproductibles (Trouvelot, communication personnelle). Chez la vigne, contrairement à la laminarine native, PS3 agit comme un agent de priming, i.e. capable d'activer les réactions de défense de la plante de manière plus rapide et intense en réponse à l'attaque d'un agent pathogène postérieure au traitement polysaccharidique (Trouvelot *et al.*, 2008 ; Gauthier *et al.*, 2014). Il induit notamment la potentialisation des défenses dépendantes de la production de ROS, de l'acide jasmonique (JA), de l'acide salicylique (SA) et du déclenchement d'une HR-like (mort cellulaire) aux sites d'infection (Trouvelot *et al.*, 2008 ; Gauthier *et al.*, 2014).

Les champignons mycorrhizogènes (CMA) sont aussi capables d'établir un dialogue moléculaire, notamment avec la vigne, durant la symbiose dite « mycorhizienne ». Ce type de symbiose est apparu il y a 450 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000) et *Vitis vinifera*, comme près de 80% des plantes terrestres, est capable de vivre en symbiose mutualiste avec ces champignons microscopiques du sol pour former des mycorhizes à arbuscules au niveau de ses racines (Aguín *et al.*, 2004). Dans ce contexte d'interaction, le champignon symbiotique se développe sous forme d'hyphes extra-radiculaires, d'hyphes intra-radiculaires (intercellulaires) et d'arbuscules (structures de forme buissonnante) à l'intérieur de cellules racinaires, pour former *in fine* une interface d'échange (Garg *et al.*, 2010 ; Gutjahr et Parniske, 2013 ; **Figure 3**).

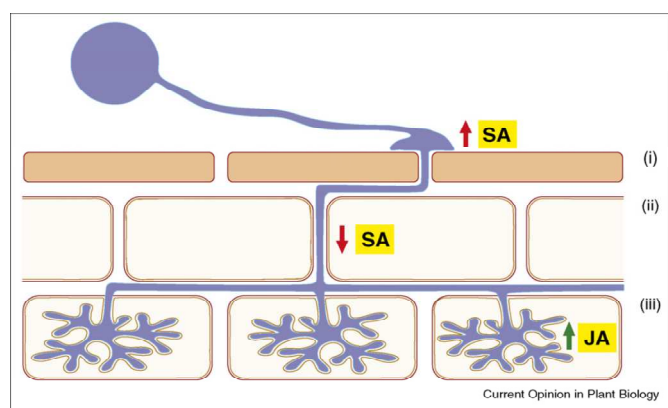


**Figure 3: Mise en place, in planta, d'un arbuscule intracellulaire d'un champignon mycorrhizogène. A :** photographie d'un arbuscule observé en microscopie photonique (d'après Smith et Read 1997) ; **B :** Schéma représentant la structure d'un arbuscule mycorhizien dans une cellule végétale racinaire (d'après Parniske, 2008). Chaque ramification de cet arbuscule est séparée du cytoplasme de la cellule végétale par une espace périarbusculaire qui provient de la plante. La membrane périarbusculaire fait office de zone d'échange, d'interface entre le champignon mycorrhizogène et la plante.

Ces champignons sont notamment capables, *via* cette interface, d'améliorer le développement de la plante en augmentant la disponibilité des éléments minéraux peu

mobiles du sol (phosphore et azote principalement) en échange de glucose (molécule carbonée d'origine photosynthétique) fourni par le végétal (Baumgartner *et al.*, 2006).

Cependant, lors de l'établissement de la symbiose, la plante réagit en premier chef conformément à la perception d'une attaque par un agent pathogène biotrophe et active ses défenses. La mycorhization implique donc, pour s'effectuer durablement, la suppression partielle de la réponse dépendante de l'acide salicylique (SA), contrebalancée par une augmentation de la défense régulée par l'acide jasmonique (JA) endogène (Pozo et Aguilar 2007) (**Figure 4**). Sachant qu'il est généralement admis que le SA coordonne les défenses contre les agents biotrophes tandis que JA régule plutôt les défenses contre les parasites nécrotrophes, ce processus permettrait de favoriser l'établissement de la mycorhize en limitant l'expression des défenses qui lui seraient contraire (Pozo et Aguilar 2007).



**Figure 4 : variation des teneurs en phytohormones de défense lors de la mycorhization** (i) Dès la germination, le champignon mycorhizogène forme un appressorium à la surface de la racine. La plante réagit en augmentant la concentration en SA. (ii) Telle une symbiose parasitaire, le niveau de SA diminue. (iii) Lorsque les arbuscules s'établissent et deviennent fonctionnels, on constate une augmentation de la concentration en JA dans les cellules contenant ces arbuscules (d'après J. Perez-Tienda).

Les CMA sont également réputés pour rendre les plantes, et en particulier la vigne, plus robustes en améliorant notamment leur capacité d'absorption des nutriments (phosphore, azote, fer, magnésium, comme expliqué précédemment) mais aussi leur tolérance à certains stress tant abiotiques, hydrique ou liés à la présence de métaux lourds en particulier, que biotiques (Schreiner, 2005 ; Gianinazzi *et al.*, 2010 ; Trouvelot *et al.*, 2015). Ainsi, lors d'une agression par un agent pathogène, la plante voit ses capacités de défense améliorées si ses racines ont été préalablement colonisées par des CMA (Gianinazzi *et al.*, 2010). On parle alors de Résistance Induite par la Mycorhize ou MIR. La MIR peut offrir une protection systémique contre un large panel de bioagresseurs (de type biotrophe ou nécrotrophe). Elle partage des caractéristiques avec la Résistance Systémique Acquise (SAR) après l'infection (Cameron *et al.*, 2013). En ce sens, le CMA peut limiter certaines phytopathologies *via* l'induction d'une résistance systémique. Les effets des mycorhizes sur les maladies telluriques sont clairement établis (Azcón-Aguila et Barea, 1996 ; Whipps, 2004 ; Hao *et al.*, 2012). A l'inverse, les études portant sur le rôle de la symbiose mycorhizienne dans l'activation des défenses végétales suite à l'agression par un agent pathogène aérien,

notamment biotrophe, sont rares et parfois peu concluantes (Pozo et Aguilar 2007 ; Jung *et al.*, 2012, pour revues). Cependant, la symbiose mycorhizienne peut ainsi améliorer la résistance de *Medicago truncatula* (plante modèle) à *Xanthomonas campestris* (Liu *et al.*, 2007) et de la tomate à *Pseudomonas syringae* (MJ Pozo *et al.*, données non publiées). Une augmentation de la sensibilité de la plante à certains parasites foliaires, en particuliers biotrophes tels que l'oïdium (biotrophe foliaire), a également été rapportée (Pozo et Aguilar 2007, pour revue). Dans ce contexte pathologique (plante mycorhizée / pathogène foliaire biotrophe), Gernns *et al.*, (2001) se sont intéressés plus spécifiquement à la relation source-puits qui existe entre l'orge mycorhizé et l'agent pathogène responsable de l'oïdium. Ils montrent ainsi que, pour l'orge mycorhizé, le rendement et la qualité de la récolte sont meilleurs comparativement aux données obtenues à partir d'un plant non mycorhizé, quand bien même la sporulation parasitaire ne semble pas affectée (i.e. non réduite). Les auteurs rapportent que ce phénomène serait essentiellement lié au fait que les relations source-puits, qui s'établissent entre le phytopathogène et la plante mycorhizée, sont en faveur du végétal. En conséquence, la mycorhize assure le maintien d'une activité photosynthétique satisfaisante, une meilleure capacité de stockage (i.e. fructane dans les entre-nœuds) et une utilisation des ressources carbonées plus efficace.

Finalement, un traitement éliciteur, tout comme l'établissement de la mycorhize, induit au sein du végétal une signalisation cellulaire spécifique, passant notamment par la synthèse de phytohormones régulant la progression de parasites biotrophes et/ou nécrotrophes. Il semble alors, dans le cadre d'une stratégie conjointe de traitement/inoculation de la vigne pour lutter contre le mildiou, intéressant d'étudier les interactions possibles entre ces deux voies de signalisation spécifiques. Ainsi, il peut être envisagé qu'un traitement éliciteur, notamment s'il induit la synthèse de SA, puisse être contraire à l'établissement de la mycorhize et que, incidemment, des signalisations croisées entre application de SDP et endomycorhization deviennent alors antagonistes. Tosi et Zizzerini (2000) ont montré que l'application, sur un tournesol mycorhizé (par *Glomus mossae*), d'un spray foliaire contenant respectivement du BABA (Acide  $\beta$ -aminobutyrique ; potentialisateur induisant la voie SA) ou du BTH (Acibenzolar-S-méthyl ; éliciteur, analogue du SA) permettait une bonne résistance de la plante à *Plasmopara helianthi* (agent du mildiou), sans impact majeur au niveau du réseau mycélien ou du système racinaire. A travers cette étude, il semblerait donc que la combinaison d'un éliciteur et d'un champignon mycorhizogène puisse être efficace pour lutter contre un agent phytopathogène aérien. Cependant, De Román *et al.* (2011), rapportent à l'opposé qu'un traitement éliciteur (BTH) par voie foliaire peut conduire à une diminution

transitoire du taux de mycorhization, vraisemblablement en lien avec une réattribution des ressources carbonées.

A la lumière de ces résultats, la question biologique de la présente étude porte donc sur la nature des interactions traitement SDP/endomycorhization sur le pathosystème {*V. vinifera* / *P. viticola*}. Cette problématique s'inscrit dans le contexte professionnel suivant : le pépiniériste doit concevoir des plants (greffé-soudés) de vigne à la fois sûrs, c'est à dire garants d'une identité génétique fiable, et sains pour finalement être certifiés. Le pépiniériste doit également s'assurer d'une reprise rapide, et surtout maximale, de ces plants au vignoble. Il apparaît essentiel pour le pépiniériste, de garantir auprès des viticulteurs un taux de reprise maximum des jeunes plants et leur résistance vis-à-vis de stress biotiques comme abiotiques. Un jeune plant de vigne, sortant de pépinière et résultant d'étapes de bouturage, ne possède pas un réseau racinaire très développé. Il est donc particulièrement sensible, au moment de la plantation et durant ses premières années de développement, à différents stress (stress hydrique en particulier) difficilement maîtrisables en plein champ.

Pour répondre à cette problématique, il a été proposé d'éprouver l'efficacité d'un traitement avec des SDP (PS3 en l'occurrence) contre une infection de mildiou de plants de vigne en conditions de production (pépinières). Etant donné la capacité des CMAs à conférer une résistance vis-à-vis des stress abiotiques notamment (fréquemment observés en condition de production), conjuguer l'inoculation de CMAs de plants de greffé-soudés avec un traitement SDP pourrait s'avérer être une stratégie éventuellement complémentaire pour améliorer l'aptitude des plants à se défendre.

## **2- Matériels et Méthodes**

### **2.1- Matériel végétal**

Des greffons de Marselan (*Vitis vinifera* L. ; Cabernet sauvignon N x Grenache noir; obtention INRA) ont été soudés sur des porte-greffes de type S04 (*Vitis Riparia* x *Vitis berlandieri* ; espèces américaines). Ce matériel végétal a été choisi car (i) le Marselan est un cépage classiquement utilisé au laboratoire au regard de sa facilité de culture sous serres et (ii) le S04 est un porte-greffe présent dans toutes les régions viticoles françaises et peut donc être considéré comme un représentant classique (180 000 ha plantés en France, franceagrimer.fr). Les fiches décrivant les spécificités de ces matériels végétaux sont respectivement présentées en **Annexes 1 et 2**.

L'expérience a débuté dès la fin de la stratification, étape de formation du cal de soudure entre le greffon et le porte-greffe, soit après que les plants aient passés approximativement 1 mois à l'obscurité, à 28°C sous 100% d'humidité relative.

## 2.2- Conditions de culture des plants greffés-soudés

Les plants ont été élevés en condition de production chez les Pépinières Guillaume situées à Charcenne. L'expérience a été successivement répétée trois fois de manières indépendantes (soit 3 répétitions biologiques). Pour chaque répétition, 96 jeunes greffé-soudés ont été placés dans des pots de tourbe individuels contenant du terreau (société Sonofep, Saulon la rue) préalablement stérilisé par ionisation aux rayons Gamma (société Ionisos, Dagneux). Après un mois de culture, les greffé-soudés ont été individuellement repotés dans des pots plastiques d'un litre puis ces derniers ont été regroupés au sein de barquettes pouvant contenir douze pots. La fertilisation des plants est assurée par un apport bihebdomadaire en engrais liquide NPK (Azote-Phosphore-Potassium) 14-0-14 dosé à 2,5 g /l.

## 2.3- Inoculation des champignons mycorhiziens

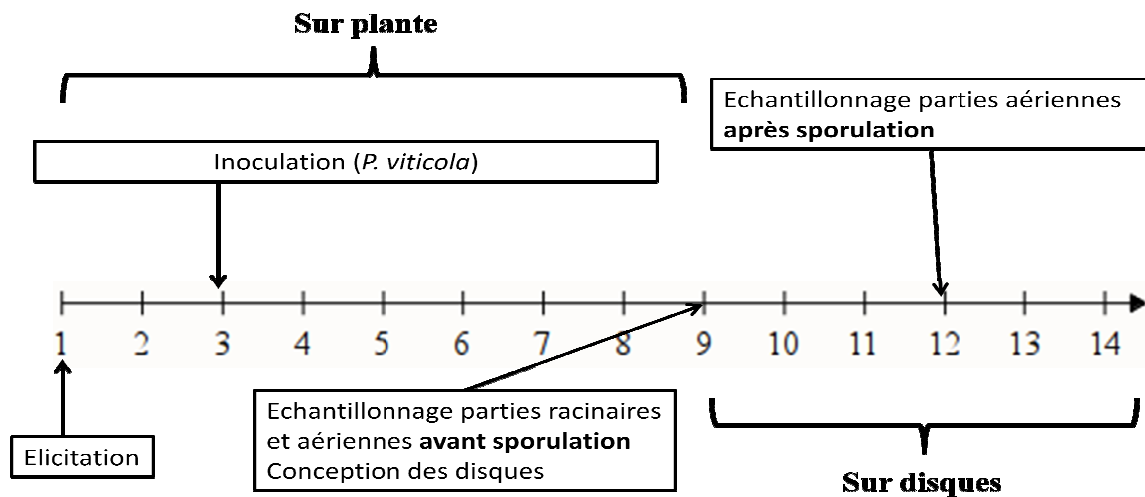
Pour chaque répétition biologique, la moitié des plants (soit 48) a été inoculée avec le produit Symbivit®Pro. Ce dernier se présente sous forme de granulés, et est défini comme contenant cinq souches de champignons mycorhiziens : *Rhizophagus irregularis*, *Funneliformis mosseae*, *Claroideoglossum etunicatum* (nouvelle classification, Redecker *et al.*, 2013) et *Glomus geosporum*. Le fournisseur assure une concentration d'un million de propagules par kilogramme. Dans nos conditions, 6 g du produit (soit environ 6 000 propagules théoriques) ont été placés au fond des pots de tourbe, avant de les remplir de terreau ionisé. Cette opération d'inoculation mycorhizienne (« Myc ») a ainsi été réalisée simultanément à la mise en pot de tourbe et correspond par conséquent au temps zéro de l'expérience. Les plants non mycorhizés (« NM »), ont été repotés dans le terreau ionisé.

## 2.4- Traitement éliciteur

L'opération d'élicitation a été menée trois mois après le début de l'expérience. Pour chaque répétition biologique, 24 plants mycorhizés et 24 plants non mycorhizés ont été soumis à un traitement par spray foliaire de PS3 (laminarine sulfatée), appliqué à 5 g/l formulé dans un adjuvant (0,05%, confidentiel). Le traitement a été appliqué sur les faces inférieures et supérieures, jusqu'au point de ruissellement. Les plants qualifiés de « non élicités » (« NE ») ont reçu un blanc de formulation (adjuvant seul).

## 2.5- Inoculation avec *P. viticola*

Vingt quatre heures après l'élicitation, délai minimum pour une mise en place efficace des défenses végétales (Trouvelot, communication personnelle), les plants sont inoculés par l'agent pathogène *P. viticola*, agent responsable du mildiou de la vigne (**Figure 5**). Une souche de *P. viticola* (Berk. & Curt.) (Berl. et de Toni), nous a été précédemment fournie par l'ancien SRPV (Service Régional de Protection des Végétaux) de Beaune et cette dernière est entretenue, depuis 2001, par repiquages successifs sur des plants herbacés de Marselan.



**Figure 5** Frise chronologique des différentes opérations de l'expérience réalisées ; la graduation est en en jour, de un à quatorze. Elicitation au jour un et inoculation au troisième jour sur plante entière. Echantillonnage au neuvième jour des parties racinaires et aériennes ; réalisation de disque foliaires pour sporulation. Echantillonnage au jour douze des disques sporulants.

A l'aide d'un pinceau, des sporanges de *P. viticola* ont été récoltés par brossage sur la surface inférieure de feuilles sporulantes puis mis en suspension dans de l'eau osmosée. La concentration de la suspension a ensuite été ajustée, à l'aide d'une cellule de Malassez, à 10<sup>4</sup> sporanges/ml. L'inoculation a été réalisée à l'aide d'un pulvérisateur manuel, sur la face inférieure des feuilles des plants, jusqu'au point de ruissellement.

Les plants qualifiés de « non infectés » (« Pv- ») ont subit pour leur part une pulvérisation d'eau osmosée. L'intégralité des plants a ensuite été placée en situation d'hygrométrie saturante (100% HR) pendant une nuit, afin de favoriser la libération des zoospores puis leur enkystement au niveau des stomates (pores d'entrée de l'agent pathogène dans les tissus végétaux).

Myc				NM			
E		NE		E		NE	
PV+	PV-	PV+	PV-	PV+	PV-	PV+	PV-
12 plantes	12 plantes	12 plantes	12 plantes	12 plantes	12 plantes	12 plantes	12 plantes

**Tableau 1 :** Détail des huit modalités de l'expérience. Douze plants ont été répartis par modalité, soit un total de 96 greffés-soudés par répétition biologique. Cette expérience a été répétée successivement à 3 reprises. « Myc » = mycorhizé, « NM » = non mycorhizé, « E » = élicité par PS3, « NE » = non élicité par PS3, « PV+ » = inoculé par *P. viticola* et « PV- » = non inoculé par *P. viticola*.

Ainsi, pour les conditions mycorhizés et non mycorhizés, 12 plantes élicitées et 12 plantes non élicitées ont été infectées par *P. viticola* (« Pv +»). Les plants restants correspondent aux témoins d'infection (« Pv- »).

Finalement, huit modalités ont été réalisées par répétition biologique, avec 12 plants par modalité (**Tableau 1**).

#### 2.6- Mesures de croissance et de biomasse végétale

Un premier échantillonnage a été entrepris 6 jours après l'inoculation de *P. viticola* (**Figure 5**). Pour chaque modalité de chaque répétition biologique, 5 des 12 plants ont été sélectionnés aléatoirement afin d'effectuer, manuellement, des mesures de hauteur de la partie aérienne et de biomasse fraîche des parties racinaires et aériennes (tige, feuilles, vrilles). Ces estimations n'ont par conséquent pas été conduites de manière cinétique, mais selon un seul temps, correspondant à 2 mois post-mycorhization, 8 jours post-élicitation et 6 jours post-inoculation par *P. viticola*.

#### 2.7- Evaluation du taux de mycorhization

Une première partie des racines des 5 plants, sélectionnés aléatoirement par modalité pour les mesures de biomasse, a été prélevée puis stockée à -80°C pour des analyses biomoléculaires (voir ci-après). Une seconde partie a servi à évaluer le taux de mycorhization.

Les racines ont été coupées en fragments de un centimètre de longueur avant de subir une digestion des contenus cellulaires dans du KOH 10 % pendant une heure à 90°C. Elles ont ensuite été rincées à 3 reprises à l'eau osmosée avant d'être colorées au bleu Trypan (1% dans du lactophénol) pendant 15 min à 90°C (Phillips et Hayman 1970). Les fragments racinaires ont enfin été montés entre lame et lamelle avant d'être observés au microscope (objectif X40) à fond clair dans le but d'estimer (i) le pourcentage de la mycorhization de l'échantillon (F%), (ii) l'intensité globale de la mycorhization de l'échantillon (M%) et (iii)



le pourcentage des arbuscules de la partie mycorhizée (a%) selon la méthode décrite par Trouvelot et al. (1986). Cette méthode est présentée en **annexe 3**.

## 2.8- Evaluation du potentiel mycorhizogène de l'inoculum utilisé.

La notion de potentiel mycorhizogène traduit la richesse de l'inoculum en propagules (spores, hyphes) aptes à générer de la mycorhization. Pour déterminer le potentiel mycorhizogène de l'inoculum utilisé SymbivitPro®, la technique volumétrique basée sur des dilutions successives, le « Most Probable Number » (MPN), a été employée. Celle-ci permet de déterminer le nombre le plus probable (NPP) de propagules dans l'inoculum en réalisant 5 dilutions successives de raison 10 (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000 et 1/100 000) avec du sol Epoisses stérilisé. Chaque dilution a été divisée en 5 répétitions de 50 ml de sol par pot et un jeune plant de trèfle (plante à système racinaire bien ramifié et à mycorhization rapide) a été planté dans chaque pot. Le système racinaire entier de chaque plante a été récupéré au bout de 5 semaines pour être lavé puis coloré, comme expliqué en 2.7. La présence/absence de l'infection mycorhizienne s'effectue par l'observation au microscope (objectif X40) à fond clair des systèmes racinaires entiers. Le nombre de propagules par litre est, enfin, déduit de cette observation par utilisation des tables d'Alexander (1965) (**Tableau A annexe 4**). Enfin, il est possible d'établir l'intervalle de confiance à 95 % pour les valeurs des NPP ainsi calculées, selon les tables de Cochran (1950) (**Tableau B annexe 4**).

## 2.9 - Evaluation de la résistance induite contre *P. viticola*

Pour chacun des 7 plants restants (sur 12) par modalité, 2 à 3 feuilles adultes sont prélevées 6 jours post-inoculation par *P. viticola* (soit avant sporulation), et utilisées à la réalisation, à l'aide d'un emporte-pièce, de 120 disques foliaires de 1 cm de diamètre. Soixante de ces 120 disques ont été immédiatement stockés à -80°C pour des analyses biomoléculaires ultérieures (voir ci-après) tandis que l'autre moitié a été placée en boîtes plastiques, face supérieure contre un papier Whatmann humide, dans une enceinte de culture afin de déclencher la phase de sporulation parasitaire. Après 3 jours sous ces conditions, un second échantillonnage a été réalisé (**Figure 5**) : 50 disques, prélevés aléatoirement, ont servi pour la calcul du taux moyen de protection (voir 2.9.1), avant d'être stockées à -80°C pour des analyses biomoléculaires ultérieures (voir ci-après) ; les 10 disques restants ont été stockés dans du méthanol absolu pour évaluer ensuite l'intensité de colonisation interne par *P. viticola* (voir 2.9.2).

### 2.9.1- Estimation du taux moyen de protection

Le niveau de sporulation des 50 disques prélevés a été estimée par notation visuelle (Kim Khiook *et al.*, 2013) en utilisant la notation des indices de sporulation suivante : classes 0 = 0%, 1=1-10%, 2=10-25%, 3=25-50%, 4=50-70% et 5>=75% (Trouvelot *et al.*, 2008).

Ensuite, le calcul du taux moyen de protection a été effectué grâce à la formule suivante :

$$\frac{MI^{NE} - MI^E}{MI^{NE}} \times 100 \quad , \text{ où :}$$

MI « NE » = Moyenne des Indices de sporulation de 50 disques « Non Elicités »

MI « E » = Moyenne des Indices de sporulation de 50 disques « Elicités »

### 2.9.2 Estimation de la colonisation parasitaire interne

Les 10 disques préalablement stockés dans du méthanol (une nuit à minima afin de fixer les tissus végétaux et de solubiliser les pigments chlorophylliens) sont ensuite placés dans de l'hydrate de chloral (1 g/ml) pendant 24h afin de lyser le contenu cellulaire. Ils sont ensuite rincés à 3 reprises par du tampon phosphate 0,1M pH 8 avant d'être mis à colorer dans du bleu d'aniline en tampon phosphate pendant une nuit. Une fois colorés, les disques ont été montés entre lame et lamelle avant d'être observés au microscope à épifluorescence à l'aide du filtre UV (longueurs d'onde excitation à 340-380 nm). Dans ce contexte, la colonisation interne de l'endoparasite *P. viticola* se manifeste par la présence d'hyphes intercellulaires et d'haustoria (suçoirs à nutriments) fluorescent en bleu sous excitation UV. Par disque foliaire, le pourcentage de surface foliaire présentant de la colonisation interne (rapport de la surface infectée du disque sur la surface totale) est estimé avec le logiciel ImageJ. Un exemple de photographie de disque infectée par *P. viticola* sous excitation UV est présenté en **annexe 5**.

### 2.10- Identification des CMAs présents dans les racines

#### 2.10.1- Extraction d'ADN de racines

Après un broyage fin, à l'aide un mortier et d'un pilon, de 50 mg de racines (comme expliqué dans la partie 2.7, les échantillons racinaires ont également été utilisés pour des analyses biomoléculaires) dans l'azote liquide, nous avons réalisé une extraction d'ADN de nos échantillons en utilisant le kit Dneasy® Plant ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) selon les instructions données par le fournisseur.

#### 2.10.2- Amplification par PCR

Les réactions d'amplification ont été faites avec la Taq DNA Polymerase (Q-BIOgene), pour 20µl réactionnels contenant 10mM TrisHCl pH 9, 50 mM KCl, 1,5 mM

MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, 0,2 mg/ml BSA ou gélatine, 100 µM dNTP, 500 nM de chaque amorce, 0,75 U Taq polymérase et 1 µl de matrice (ADN). Les réactions d'amplification ont été faites dans un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler® pro) selon le programme suivant :

- 30 cycles :

94°C - 1 min (dénaturation)

58°C - 1 min (hybridation spécifiques des amorces)

72°C - 1min30 (élongation spécifique de la Taq polymérase)

- 72°C - 10 min (arrêt de l'activité de l'enzyme)

Afin d'améliorer la sensibilité de l'amplification, une PCR gigogne a été réalisée en faisant deux amplifications (PCRs) successives. La première PCR consiste à amplifier une région suffisamment grande de la grande sous-unité ribosomale (LSU ; 28S) de l'ARN ribosomal (environ 80% des ARNs totaux) pour couvrir les deux régions polymorphiques D1 et D2 (D pour Divergent) situées dans la région 5'. Leur polymorphisme, entre et dans les taxa, a permis d'identifier des séquences nucléotidiques spécifiques qui ont été utilisées pour dessiner des amorces répondant à différents niveaux de discrimination ou de spécificité (van Tuinen *et al.*, 1998a). Ainsi les deux amorces NDL22 (5'-TGGTCCGTGTTTCAAGACG-3' ; amorce reverse) et LR1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3' ; amorce forward) (van Tuinen *et al.*, 1998a) ont été dessinées de telle sorte à amplifier l'intégralité des organismes eucaryotes et flanquent les régions D1 et D2.

Les produits d'amplification de la première PCR servent ensuite de matrice pour une seconde PCR utilisant des amorces spécifiques de CMA (amorces taxon-spécifiques). Ces dernières, spécifiques de chaque CMA, sont : 5.25 (5'-ATCAACCTTTTGAGCTCG-3') pour *F. mosseae* (van Tuinen *et al.*, 1998b) ; 8.24 (5'-CGATCAGAGACCAGACAGGT-3') pour *R. irregularis* et Getunsp2 (5'-AGCCAGGTGGAACAGCCCTG-3') pour *C. etunicatum* (Farmer *et al.*, 2007). Elles sont utilisées en combinaison avec les amorces eucaryotiques NDL22 ou LR1 selon la règle paire/reverse-impair/forward. Pour exemple, NDL22 est utilisé couplé avec 5.25.

Les produits d'amplification obtenus après la deuxième PCR, ont été mis à migrer en électrophorèse sur un gel d'agarose 1,6% (1,6 g d'agarose Sigma-Aldrich® dans 100ml de tampon TAE Tris/Acétate/EDTA pH 8 à une concentration de 0,5X). La migration terminée, le gel est placé 5 minutes dans un bain de BET (Bromure d'éthidium ; marqueur d'acides nucléiques), puis 10 minutes dans un bain de rinçage. En fin, le gel subit une excitation par des rayons UV (environ 380 nm), ce qui induit une émission de fluorescence du BET, intercalé dans les séquences d'ADN.

## 2.11- Analyse *in planta* de l'expression de gènes cibles

Comme expliqué en 2.7, les échantillons racinaires ont également servi pour des analyses biomoléculaires *in planta* de l'expression de certains gènes cibles. Comme il l'a été également décrit dans la partie 2.9, les disques foliaires, échantillonnés avant et après sporulation et stockés à -80°C, ont également servi de matrice pour de l'analyse biomoléculaire ciblée.

### 2.11.1- Extraction des ARNs totaux de racines

Une extraction des ARNs totaux de nos échantillons de racines a été accomplie à l'aide du kit RNeasy® (Qiagen ; [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)), selon les instructions données par le fournisseur et après un broyage fin dans l'azote liquide au moyen d'un mortier et pilon.

Les racines de vigne de plants greffés-soudés sont riches en polyphénols, polysaccharides et autres métabolites secondaires. Lors de l'extraction des acides nucléiques, ces composés précipitent avec les ARNs rendant par conséquent difficile leur purification. Dans ce contexte, nous avons ajouté au tampon d'extraction RLC (lyse chimique des cellules) du polyéthylène glycol 8000 (Sigma-Aldrich) afin de lier les composés phénoliques entre eux. Ces derniers seront ensuite éliminés lors de l'étape de précipitation à l'éthanol (Yazid et Sidik, 2011). Incidemment, l'isolement des ARNs est de meilleure qualité et le rendement est également augmenté.

### 2.11.2- Extraction des ARNs totaux de feuilles

Après un broyage fin, au moyen d'un mortier et pilon, de 50 mg de tissus foliaire dans de l'azote liquide, le broyat a été vortexé avec 500 µl de Plant RNA Reagent® (Invitrogen). Cette étape permet de lyser les cellules, avant de former un complexe insoluble entre le détergent et les acides nucléiques tout en inhibant l'activité des nucléases (grâce au β-mercaptoéthanol présent dans le tampon d'extraction). Suite à 2 min d'une centrifugation à 12 000 g, le surnageant est récupéré tandis que les composés phénoliques, les sucres et autres contaminants sont éliminés du complexe nucléique par l'ajout de 300 µl d'un mélange chloroforme/IAA (24 :1). Après centrifugation (12 000 g à 4°C pendant 10 minutes), les acides nucléiques du surnageant sont alors concentrés par l'ajout de 400 µl d'isopropanol et 100 µl de 5M NaCl pré-centrifugation (10 min à 12 000 g à 4°C). Après centrifugation, le surnageant est éliminé et 1 ml d'éthanol 75 % est ajouté au culot restant. Suite à une dernière centrifugation (5 min à 12 000 g), le surnageant est éliminé et le culot d'acides nucléiques est séché à l'air libre avant d'être immédiatement repris dans 15 µl d'eau RNase-free. Les ARNs fraîchement extraits sont ensuite conservés à -20°C.

### 2.11.3- Transcription réverse des ARNm en ADNc

Afin de synthétiser des ADNc à partir des ARNm extraits de racines ou de feuilles de plants de vigne, nous avons utilisé l'enzyme SuperScript III® Reverse Transcriptase (RT ; Invitrogen). Un mélange réactionnel de 13 µl contenant 30 ng d'oligo (dT), 40 à 80 ng d'ARN et 1 mM de dNTP, a été chauffé à 65°C pendant 5 min. Après cette étape, 4 mM de TrisHCl pH 7,5, 25 mM de NaCl, 25 µM d'EDTA, 10% glycérol, 50 mM de DTT et 10 U de l'enzyme ont été ajoutés au mélange. Les réactions de transcription inverse ont été menées dans un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler® pro) selon le programme suivant :

- 50°C 60 min (élongation spécifique de la RT)
- 70°C 15 min (arrêt de l'activité de l'enzyme)

### 2.11.4- Vérification de la validité des amorces par PCR gradient

Une PCR gradient consiste à trouver la température d'hybridation optimale ( $T_m$ ) d'un couple d'amorces sur une séquence nucléotidique cible pour une matrice donnée. Ce travail est nécessaire dans l'optique d'une PCR quantitative, pour l'analyse de l'expression de gènes cibles. Pour ce faire, nous avons utilisé le programme de « PCR gradient » sur le thermocycleur Eppendorf Mastercycler® pro, qui permet de réaliser simultanément jusqu'à 12 amplifications PCR différentes par leurs valeurs de  $T_m$ . Ainsi, pour chaque couple d'amorces testés (voir ci-après), 12 amplifications PCR (mélange réactionnel et programme de PCR décrits en 2.11.2) ont été réalisées avec les 12  $T_m$  suivants {53 ; 53,2 ; 53,7 ; 54,5 ; 55,5 ; 56,7 ; 57,8 ; 59 ; 60 ; 60,9 ; 61,5 ; 61,8°C}.

Pour cette étude, nous avons choisi plusieurs gènes cibles certains se rapportant à des évènements de défense et d'autres étant plus spécifiquement liés au transport de sucres. Les gènes de défense ciblés ont été les gènes encodant la chitinase, la glucanase et la stilbène synthase. Ces derniers ont été choisis car potentiellement exprimés en réponse à l'endomycorhization (Trouvelot, communication personnelle). Ceux concernant les transporteurs de sucre correspondent aux gènes encodant les SWEET (Sucrose will eventually be exported transporter) 2a, 9, 10, 11, 12 et 15 ; les SUC/SUT (Sucrose carrier/transporter) 11, 2 et 27 ; les HT (Hexose transporter) 2 et 5. Ces transporteurs SWEET (Chong *et al.*, 2014), SUC/SUT (Afoufa-Bastien *et al.*, 2010) et HT (Afoufa-Bastien *et al.*, 2010 ; Lecourieux *et al.*, 2010) ont été choisis afin de relater d'éventuelles transitions source/puits carboné, généralement décrites dans les interactions biotiques.

Sachant que des amplifications des gènes SWEET, SUC/SUT et HT, n'avaient jamais été effectuées à partir de matrices de Marselan ou de SO4, il nous a donc fallu vérifier la capacité des couples d'amorces décrits dans la littérature (**Tableau C annexe 6**) et mis au point sur le

cultivar séquencé Pinot noir (Velasco *et al.*, 2007) à s'hybrider spécifiquement sur nos propres matrices.

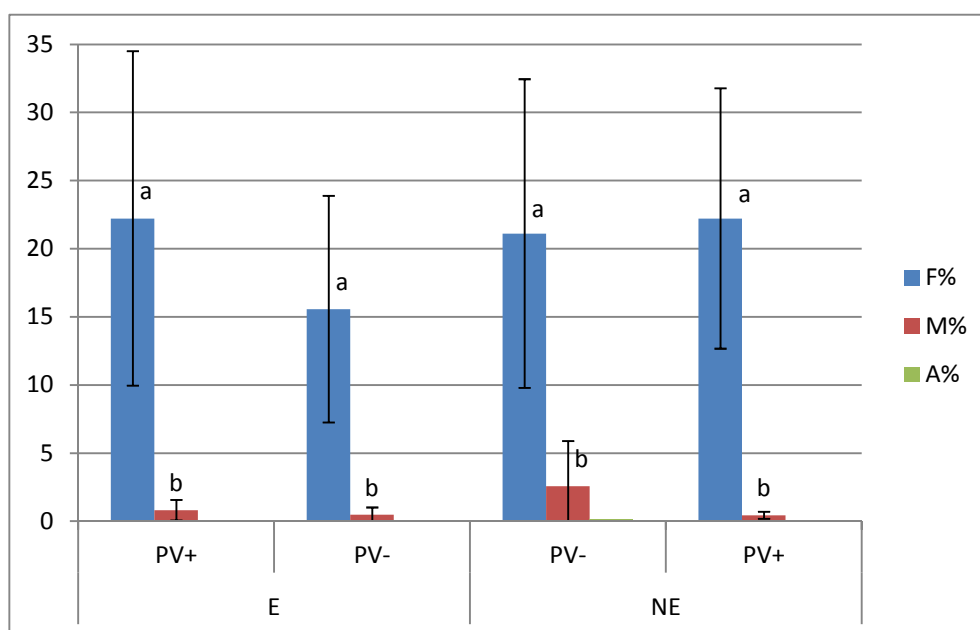
Les produits d'amplification obtenus après la PCR gradient, ont été mis à migrer en électrophorèse comme expliqué au 2.10.2.

### 3- Résultats et discussion

#### 3.1- Détermination du taux de mycorhization

Les résultats présentant les valeurs de fréquence (F%) ou d'intensité de mycorhization (M%) et de richesse arbusculaire (A%) sont rapportés en **Figure 6**.

Dans notre contexte expérimental, il apparaît que les paramètres calculés (F%, M% et A%) pour les différentes modalités ne présentent pas de différences significatives entre elles (**Figure 6**). Ainsi, un traitement éliciteur (PS3) et/ou une infection par *P. viticola* ne semblent pas affecter significativement les paramètres de mycorhization.



**Figure 6.** Fréquence de mycorhization (F%), intensité de mycorhization (M%) et richesse arbusculaire (A%) (+/- écart-type) moyennées sur les trois répétitions biologiques. Des lettres identiques représentent des différences non significatives (test de Kruskal-Wallis,  $P < 0,05$ ). « E » = élicité avec PS3 ; « NE » = non élicité ; « PV+ » = inoculé avec *P. viticola*. ; « PV- » = non inoculé avec *P. viticola*.

Cependant, il est important de noter que dans cette étude, quelles que soient les modalités et les répétitions biologiques, les fréquences de mycorhization (F%) sont très faibles (moins de 25%), indiquant une mauvaise mycorhization des racines des plants greffés-soudés. De la même manière, le système racinaire est faiblement colonisé (M% inférieur à

3%) puisqu'on estime généralement que la mycorhization devient fonctionnelle quand elle dépasse les 20%. Face à ces résultats, nous avons suspecté que l'inoculum mycorhizien, conservé depuis plus d'un an (toutefois dans le respect des instructions données par le fabricant), puisse être affecté et peu viable.

Ces faibles taux de mycorhization peuvent s'expliquer par d'autres facteurs puisque la présence d'hyphes septés, caractéristiques de la non appartenance aux gloméromycètes (hyphes cœnocytiqes) (Hibbett *et al.*, 2007), a pu être notée sur quelques échantillons. Les milieux de culture ont pourtant été stérilisés comme expliqué au 2.2, ce qui n'a pas été le cas pour les pots en tourbe. Cette opération de stérilisation pourrait également être menée sur ces derniers afin d'éviter toute infection parasitaire, susceptible d'induire une compétition avec les CMAs. Par ailleurs, nous aurions pu vérifier si les quantités de nutriments présents dans le terreau et si les quantités d'engrais apportés n'étaient pas trop importantes. En effet, un excès de nutriments dans le milieu de culture peut induire une diminution de l'abondance en spores (Oehl *et al.*, 2003).

La très faible richesse arbusculaire (A% proche de 0) (**Figure 6**) implique l'absence de structures d'échange entre la plante hôte et les CMAs. Dans ce contexte, il paraît difficile d'imaginer une symbiose mutualiste efficace avec un échange de nutriments et une amélioration du potentiel défensif de la vigne. Néanmoins, même si l'échange de carbone contre du phosphate est essentiellement réalisé au niveau de l'interface arbusculaire, le mycélium intra-radiculaire est également capable d'absorber du sucre de manière H<sup>+</sup>-dépendante *via* des transporteurs spécifiques de ces structures (Helber *et al.* 2011). De plus, certains auteurs vont jusqu'à suggérer qu'une plante hôte à faible niveau de colonisation mycorhizienne pourrait profiter d'une symbiose mycorhizienne de la même manière qu'une plante à haut niveau de colonisation racinaire (Alberton *et al.*, 2005).

Finalement, au regard de cette littérature émergente, il nous a semblé opportun de poursuivre l'étude jusque dans l'analyse de certains paramètres moléculaires (induction de l'expression génique). Néanmoins, du fait des faibles résultats de colonisation mycorhizienne, nous avons estimé le potentiel mycorhizogène de l'inoculum commercial utilisé (cf. 3.2).

### 3.2- Estimation du potentiel mycorhizogène de l'inoculum utilisé.

L'inoculum Symbivit®Pro est défini, par le fournisseur, comme un support à base d'argile naturelle comportant un nombre minimum de 1 000 000 propagules/kg de substrat. Dans notre contexte expérimental nous avons utilisé 6g d'inoculum par plant, correspondant théoriquement à 6 000 propagules par greffé-soudé.

Les résultats obtenus quant à la mesure du potentiel mycorhizogène de l'inoculum, par dilutions 1/10 et estimation du nombre le plus probable (NPP), sont rapportés dans le **tableau 2**. Au vu des résultats, il apparaît que le nombre de propagules est réduit à 460/kg de substrat, ce qui rapporté à ce qui est donné par le fournisseur témoigne d'une baisse d'un facteur 2 000 environ.

	Nombre de tubes présentant des propagules par dilution (sur 5 tubes)						NPP	Facteur de dilution	Potentiel mycorhizogène (propagules/kg)	Intervalle de confiance à 95 % (propagules/kg)
	1	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000				
Inoculum SymbivitPro	3	5	1	0	0	0	0,23	1/100	460	[140 ; 15200]
Milieu de culture des plants de vignes	5	3	1	0	0	0	0,49	1/10	98	[29,6 ; 323,4]

**Tableau 2.** Potentiel mycorhizogène d'un sol par dilutions 1/10 et estimation du nombre le plus probable (NPP ou MPN : Most Probable Number) en nombre de propagules par kg, selon Alexander (1965). Intervalle de confiance à 95 % pour les NPP d'après Cochran (1950). Les calculs ont été réalisés sur l'inoculum Symbivit@Pro et sur le milieu de culture des plants de vignes (terreau).

Dans ce contexte, il apparaît que nous avons inoculé chaque plant avec en moyenne 2,5 propagules, assurément trop faible pour permettre une mycorhization supérieure à 50%.

A la lumière de ces résultats, il aurait été judicieux de réaliser cette évaluation de potentiel mycorhizogène de l'inoculum commercial avant le début de notre expérimentation. Cela n'a malheureusement pas été fait car ce même inoculum avait donné des taux de mycorhization satisfaisants (d'environ 80%) sur de jeunes greffés-soudés de Marselan/SO4 dans une expérimentation précédente, d'un an au préalable. L'inoculum a en outre été conservé dans des conditions préconisées par le producteur entre les deux expérimentations.

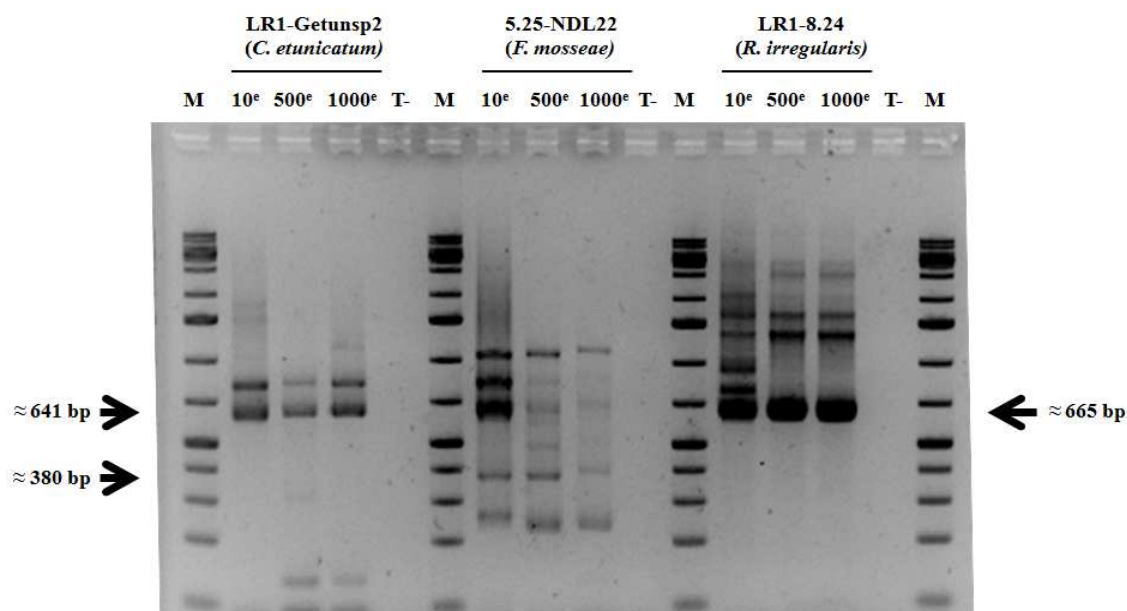
Dans la littérature, des inocula commerciaux peuvent atteindre des niveaux de colonisation de l'ordre de 80 % au vignoble (Meyer *et al.*, 2005), soit dans des conditions beaucoup moins contrôlées qu'en pépinière. Il aurait été possible d'utiliser des inocula mycorhiziens de laboratoire beaucoup plus invasifs sur SO4 (Trouvelot, communication personnelle), mais le principe de cette expérimentation était de se rapprocher au plus près des conditions de production et, de ce fait, d'utiliser un inoculum commercial.

Malgré la très faible quantité de propagules inoculée par plant, les résultats de la partie 3.2 ont révélé une mycorhization, certes faible, des plants de greffé-soudés. Nous avons ainsi décidé de déterminer les espèces de CMAs, présents dans le produit SymbivitPro®, associés aux racines des plants de vigne.



### 3.3- Identification in planta des CMAs

Nous avons souhaité vérifier la présence, parmi la faible fréquence de mycorhization, des différentes espèces de CMAs au sein des racines des plants greffés-soudés inoculés avec le produit Symbivit®Pro. Pour ce faire, nous avons effectué une PCR gigogne pour laquelle la seconde amplification s'avère taxon-discriminante. Cette dernière a été réalisée à trois reprises avec distinctivement, dans les couples utilisés, trois amorces taxon-spécifiques LR1-**Getunsp2**, LR1-**8.22** (Farmer *et al.*, 2007) et **5.25**-NDL22 (Van Tuinen *et al.*, 1998) afin de révéler la présence/absence de *C. etunicatum*, *R. irregularis*, et *F. mosseae*, respectivement. Lors de la seconde PCR, nous avons effectué une série de dilution : 1/10, 1/500 et 1/ 1000 afin de (i) limiter l'action de possibles inhibiteur de la Taq polymérase et (ii) ne pas amplifier *de novo* l'intégralité des eucaryotes de par la présence des amorces eucaryote-spécifiques NDL22 et LR1 qui persisteraient de la première PCR dans le mélange réactionnel.



**Figure 7.** Détection par PCR gigogne de *C. etunicatum* (641 pb), *F. mosseae* (380 pb) et *R. irregularis* (665 pb) dans des racines de jeunes greffés-soudés. Résultats donnés pour une modalité représentative. Pour chaque CMA testé, trois dilutions ont été réalisées : 10°, 500° et 1000°. (T-) témoin négatif ; gel à 1,6 % d'agarose ; (M) Marqueur de poids moléculaire échelle 1 kb (Thermo Scientific, GeneRuler).

Suite à la seconde amplification et quelles que soient les amorces taxon-spécifiques utilisées, des bandes de faible intensité apparaissent ou disparaissent selon les dilutions (**Figure 7**). Par exemple, pour l'amplification de *R. irregularis*, une bande d'environ 800 pb est présente à la dilution 1/10 mais disparaît pour les dilutions 1/500 et 1/1000. A l'inverse, des séquences sont amplifiées intensément quel que soit le degré de dilution du produit de la première PCR. En effet, l'amplification de la matrice d'ADN avec le couple d'amorces LR1-Getunsp2 d'environ 641 et 800 pb est toujours réalisée sur l'ensemble de la série de dilution. L'amplification de la matrice nucléotidique diluée au 10° avec le couple d'amorce LR1-Getunsp2 se traduit par la

présence de bandes de forte intensité (**Figure 3**). Cependant, la dilution de la matrice (500° et 1000°) induit une diminution de l'intensité des bandes. A l'inverse la bande spécifique de *R. irregularis* (665 bp) reste de très forte intensité quelque soit les dilutions. Enfin, l'intensité de la bande spécifique de *F. mosseae* (641bp) ne varie globalement pas selon les dilutions.

*C. etunicatum* a été détecté avec la paire d'amorces LR1-Getunsp2 dans un inoculum BEG 168 (International Bank for the Glomeromycota IBG, <http://www.i-beg.eu/>) avec une bande à 648 pb (Farmer *et al.* 2007). Dans le produit Symbivit®Pro, une amplification de la matrice d'ADN d'environ 641 pb nous permet de conclure définitivement, du fait de la spécificité de l'amorce (Farmer *et al.* 2007), à la présence de cette souche dans les racines des plants de vigne mycorhizés, même si la souche proposée est BEG 92.

De la même manière, *R. irregularis* a été détecté avec la paire d'amorces LR1-8.22 dans un inoculum BEG 141 avec un produit d'amplification à 659 pb (Farmer *et al.*, 2007). La souche utilisée dans l'inoculum Symbivit ® Pro est BEG 140 ; le produit d'amplification que nous avons obtenu est d'environ 665 pb. Toutefois, en raison de la spécificité de l'amorce 8.22 (Farmer *et al.*, 2007), on peut en conclure à la présence de *R. irregularis* dans les racines des plants de vignes mycorhizés.

Enfin, Farmer *et al.* en 2007 ont détecté *F. mosseae* avec l'amorce spécifique 5.25 et l'amorce champignon-spécifique FLR2 (5'-GTCGTTTAAAGCCATTACGT-3') (Trouvelot *et al.*, 1999). Nous avons utilisé l'amorce NDL22 (réverse, paire) pour les amorces spécifiques forward (impair). Cependant, les positions des amorces NDL22 et FLR2 ne sont que peu éloignées sur la grande sous-unité ribosomale (28S ou LSU pour Large ribosomal subunit) et flanquent toutes les deux la région D2. Ainsi, les différences de taille des produits d'amplification comparativement à l'étude de Farmer *et al.*, 2007 ne sont que ténues. En effet, le produit d'amplification est d'environ 380 pb contre 372 chez Farmer *et al.* 2007. Ces différences d'amplification pour une même espèce de CMA peuvent notamment s'expliquer par la grande diversité génétique qui règne au sein d'une même espèce, comme chez *R. irregularis* pour exemple (Börstler *et al.* 2008).

Comme nous l'avons expliqué précédemment, des séquences d'ADN ne correspondant pas à *R. irregularis* ont été amplifiées avec le couple d'amorces taxon-spécifique LR1-8.24, pour exemple. D'après la littérature (Farmer *et al.*, 2007 ; Van Tuinen *et al.*, 1998 ; Van Tuinen, communication personnelle), ces bandes aspécifiques de plus grande taille que celle attendue (environ 1400 bp et 1700 bp dans le cas de l'amplification avec les amorces LR1-8.24, **Figure 7**) n'auraient pas dû apparaître du fait du caractère spécifique et discriminant des amorces (8.24, toujours dans l'exemple de *R. irregularis*). Ce phénomène peut néanmoins s'expliquer par un nombre de cycles d'amplification trop important lors de la seconde PCR

(30 cycles d'amplification), induisant une saturation des séquences cibles ; ce constat a été souligné précédemment. Incidemment, les amorces s'hybrident de manière aléatoire sur des séquences nucléotidiques différentes de celles cibles, et sont alors amplifiées (Van Tuinen, communication personnelle). Ces amplifications aspécifiques peuvent également trouver leur origine dans la persistance d'amorces de la première PCR, même si les dilutions sont sensées éviter ce phénomène.

Finalement, les racines des plants de vigne contiennent bien les CMAs (*C. etunicatum*, *F. mosseae* et *R. irregularis*) présents dans l'inoculum, malgré leur faible mycorhization (M%).

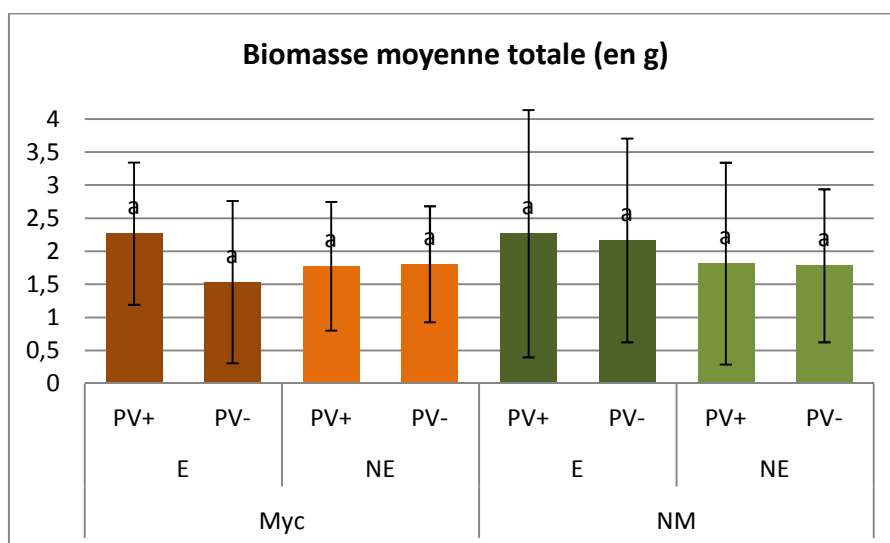
Il aurait été possible d'optimiser davantage les conditions de la deuxième PCR de la PCR gigogne (cf. 2.11.2) en modifiant la Taq Polymerase afin d'éliminer les amplifications non spécifiques. Dans un second, temps, diminuer le nombre de cycles de la deuxième PCR ou diluer davantage les produits de la première PCR aurait également permis d'éviter une amplification aspécifique.

### 3.4- Suivi de croissance (hauteur et biomasse) des jeunes plants

Les résultats présentant les analyses de biomasse fraîche et de hauteur des parties aériennes sont respectivement donnés dans les **figures 8 et 9**. Aucune différence significative des valeurs de biomasse n'est observée entre les différentes conditions (**Figure 8**). Par conséquent, il apparaît que dans notre contexte expérimental la mycorhization et/ou l'élicitation n'ont pas eu d'influence sur le développement des plants de vigne. La grande variabilité des biomasses des répliques techniques se traduit par des écart-types importants. Par exemple, pour la condition non mycorhizée (« NM »), traité avec PS3 (« E ») et infecté par *P. viticola* (« PV+ »), l'écart-type vaut 3,74. Pour la première répétition biologique (comprenant cinq répliques techniques) de cette condition, la biomasse d'un plant est de 4,81g contre 8,61 g pour un autre, soit près 56% de différence (données non présentées).

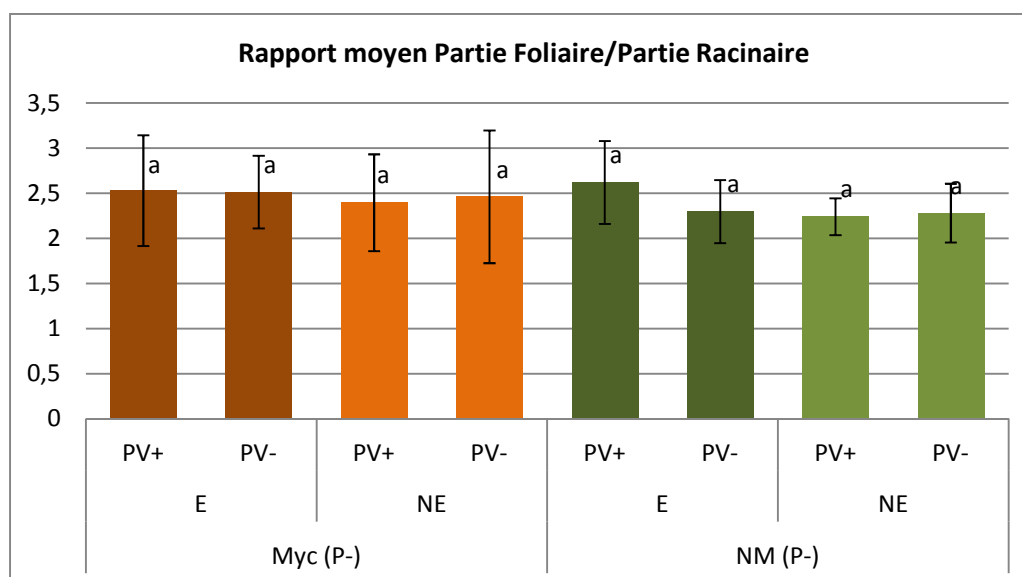
On aurait pu s'attendre à une biomasse totale plus importante pour les plants mycorhizés infectés par *P. viticola* par rapport à ceux non mycorhizés et infectés par l'agent pathogène du mildiou. En effet, Gernns et collaborateurs (2001) ont rapporté l'existence d'une réattribution de ressources carbonées en faveur d'orges mycorhizés plutôt que pour le biotrophe obligatoire *Erysiphe graminis*, l'agent phytopathogène de l'oïdium de l'orge. Incidemment, un amortissement des pertes de récolte est constaté sur des orges mycorhizés infectés par *Erysiphe graminis*. De manière générale, le développement des plantes mycorhizées est amélioré principalement en augmentant la captation de nutriment (Marschner et Dell, 1994). La vigne n'échappe pas à ce constat, d'autant plus dans un milieu à faible teneur en phosphate (Linderman et Davis, 2001), ce qui est le cas dans notre étude. Il était ainsi raisonnable de

s'attendre à un développement accru des plants de greffé-soudés. L'absence de propagules dans l'inoculum commercial (cf. 3.2) explique ce décalage.



**Figure 8.** Biomasses totales (+/- écart-type) moyennés sur trois répétitions biologiques. Des lettres identiques représentent des différences non significatives (test de Kruskal-Wallis,  $P < 0,05$ ). « E » = élicité avec PS3 ; « NE » = non élicité ; « PV+ » = inoculé avec *P. viticola*. ; « PV- » = non inoculé avec *P. viticola*.

Il est souvent judicieux de corrélérer les valeurs de biomasse avec celles des rapports des masses foliaires comparativement aux racinaires, afin d'estimer quelle partie (aérienne / sous-terrain) de la plante s'est le plus développée sous l'effet d'un traitement.



**Figure 9.** Ratios moyens (+/- écart-type) « biomasse aérienne/ biomasse racinaire », moyennés sur trois répétitions biologiques indépendantes. Des lettres identiques représentent des différences non significatives (test de Kruskal-Wallis). « Myc » = inoculé avec le produit Symbivit® ; « NM » = non inoculé ; « E » = élicité avec PS3 ; « NE » = non élicité ; « PV+ » = inoculé avec *P. viticola*. ; « PV- » = non inoculé avec *P. viticola*.

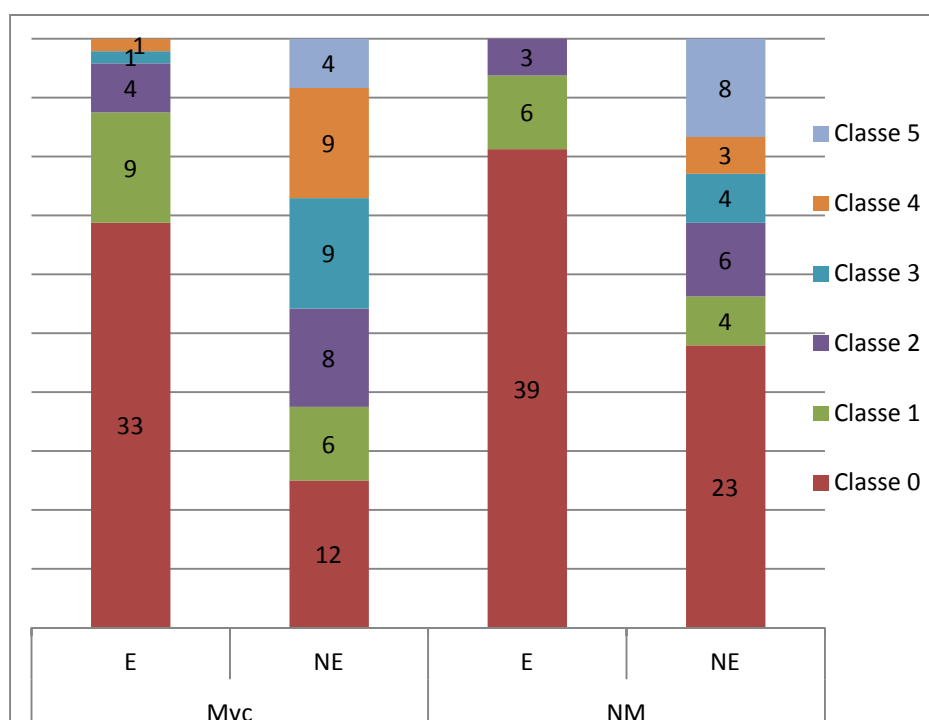
Typiquement, le rapport des masses « partie foliaire/partie racinaire » est censé être supérieur pour une plante infectée par des CMA par rapport à une plante témoin non infectée (Hendrix *et al.*, 1992). Néanmoins, comme nous pouvons le voir sur la **figure 9**, il n’y a aucune différence significative entre nos modalités. Le constat est identique pour un traitement avec PS3.

Afin de pouvoir étudier les potentiels effets positifs (état nutritionnel et amélioration des réactions de défense) des CMA sur les plants de vignes, il aurait fallu faire une cinétique de mycorhization pour déterminer le maximum de mycorhization spécifique des greffé-soudés Marselan/SO4 et incidemment réaliser l’échantillonnage à ce moment-ci. Les temps d’échantillonnage (**Figure 5**) pourraient être également modifiés à 24h et 48h post infection par *P. viticola* afin de pouvoir analyser l’impact de l’endomycorhization sur la régulation de gènes de défense précoces (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

### 3.5- Estimation de l’induction de résistance à *P. viticola*

#### 3.5.1- Impact des traitements sur la sporulation parasitaire

Quelles que soient les modalités, le niveau d’infection par *P. viticola* est faible (peu de disques représentés avec la note classe 4 ou 5) (**figure 10**).



**Figure 10.** Classification de 48 disques par modalité, infectés par *P. viticola* selon la notation des indices de sporulation suivante : classes 0 = 0%, 1=1-10%, 2=10-25%, 3=25-50%, 4=50-70% et 5=>75%. « Myc » = inoculé avec le produit Symbivit® ; « NM » = non inoculé ; « E » = élicité avec PS3 ; « NE » = non élicité ; « PV+ » = inoculé avec *P. viticola*. ; « PV- » = non inoculé avec *P. viticola*. Résultats donnés pour une répétition biologique représentative.

Toutefois, un traitement PS3 induit une augmentation du nombre de disques de classe O, c'est-à-dire n'arborant pas de sporulation parasitaire, que les plants soient mycorhizés ou non.

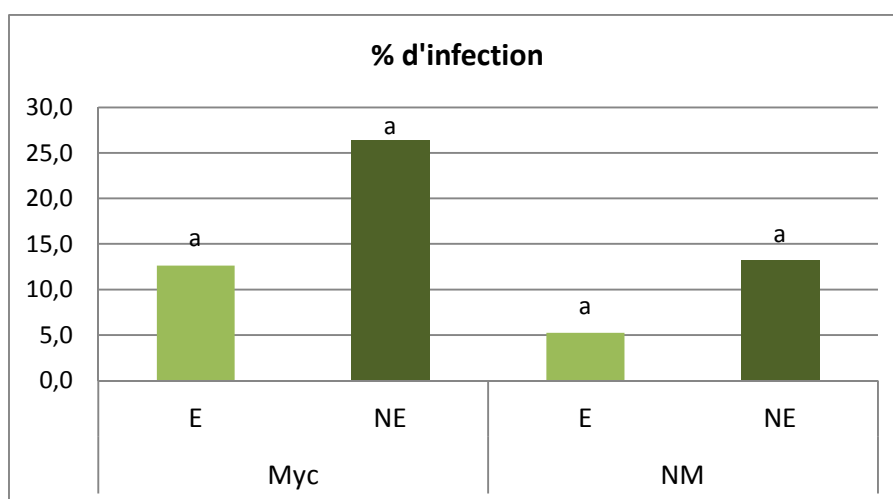
Pour les échantillons traités par PS3, on note une nette diminution, voire l'absence, de disques très fortement recouverts de sporulation (classes 4 et 5). Cela confirme donc l'aptitude de ce traitement à induire une résistance contre *P. viticola*, conformément à ce qui a été précédemment décrit dans la littérature (Trouvelot *et al.*, 2008 ; Gauthier *et al.*, 2014).

Cependant, dans notre contexte expérimental, on ne note pas d'effet interactif (synergie ou antagonisme) significatif entre un traitement PS3 et la mycorhization. En effet, le nombre et la répartition des différentes classes (indices de sporulation) sont très comparables entre les conditions mycorhizées (« Myc ») et non mycorhizées (« NM »). Encore une fois, ce résultat n'est pas étonnant à la lumière du nombre de propagules par kg présent dans l'inoculum commercial (cf. 3.2).

### 3.5.2 Impact des traitements sur la colonisation parasitaire interne

Les résultats traduisant l'intensité de la colonisation parasitaire interne sont présentés dans la **Figure 11**.

Globalement, il n'est pas possible de discriminer statistiquement les taux d'infection parasitaire entre les différentes modalités. Cela est visiblement lié à la grande variabilité des taux d'infection observée au sein d'une même modalité.



**Figure 11.** Taux d'infection par *P. viticola* estimé d'après des observations au microscope à épifluorescence, à partir de 10 disques foliaires par modalité. Des lettres identiques représentent des différences non significatives (test de Kruskal-Wallis,  $P < 0,05$ ). « Myc » = inoculé avec le produit Symbivit® ; « NM » = non inoculé ; « E » = élicité avec PS3 ; « NE » non élicité par PS3 ; « PV+ » = inoculé avec *P. viticola*. ; « PV- » = non inoculé avec *P. viticola*. Résultats donnés pour une répétition biologique représentative des 3 effectuées.

Pour exemple, la condition « Myc-NE » comprend des disques foliaires présentant des taux d'infection allant de quelques % à plus de 80%. Dans ce contexte, les écart-types intra-modalité recouvrent les écart-types inter-modalités et ne permettent pas de révéler des différences significatives entre les traitements.

Ce résultat suggère une limite inhérente à l'échantillonnage (10 disques par modalité), trop faible dans ce contexte expérimental pour noter un effet ne serait-ce que du traitement éliciteur (PS3), pourtant connu comme réduisant considérablement le développement interne de *P. viticola* (Trouvelot *et al.*, 2008 ; Kim Khiook *et al.*, 2013).

### 3.6- Analyse *in planta* de l'expression de gènes cibles

Les résultats de la PCR gradient obtenus, par migration sur gel d'agarose, n'ont pas permis de déterminer des T<sub>m</sub> pour l'ensemble des couples d'amorces testés (cf. 2.11.4) sur les matrices de feuille ou racines (données non présentées). Les séquences d'une amorce donnée sont spécifiques d'une espèce et même d'une variété. Ici des amorces dessinées contre le cépage Pinot noir (qui est séquencé) ont été testées sur le cépage Marselan, il n'est pas tout à fait étonnant de ne pas avoir de résultats positifs. Ainsi, le choix du matériel sur lequel travailler est essentiel. D'un point de vue biomoléculaire, passer d'une variété à une autre change toutes les conditions de travail (séquences d'amorces, température d'hybridation...), d'autant plus pour des génomes complexes comme *V. vinifera*. En perspective, il faudrait faire un travail de dessin d'amorces contre Marselan l'en ayant au préalable séquencé. Ce travail n'a pas pu être mené par manque de temps lors de ce stage.

Nous n'avons finalement pas pu procéder à l'analyse de l'expression des gènes cibles *in planta* par PCR quantitative.

La présente étude aura cependant permis de mettre en relief des points de protocole à optimiser mais aussi de préparer des analyses moléculaires pour des expérimentations ultérieures (voir précédemment).

### Références bibliographiques

- Afoufa-Bastien D, Medici A, Jeauffre J, Coutos-thévenot P, Lemoine R, Atanassova R, Laloi M (2010) The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family : phylogenetic overview and microarray expression profiling. BMC Plant Biology 10:245
- Agreste (2006) Lutte sanitaire en viticulture Situation 2006. <http://agreste.agriculture.gouv.fr/>
- Alberton O, Kuyper TW et Gorissen A (2005) Taking mycocentrism seriously: mycorrhizal fungal and plant responses to elevated CO<sub>2</sub>. New Phytologist 3:859–868
- Alexander M (1965) Most probable number method for microbial populations. In : Black CA (ed) Methods of soil analysis. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp 1467-1472

- ANSES (2012) Résistance du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) vis-à-vis des CAA et des QiI. Plan de surveillance 2012. <http://draaf.pays-de-la-loire.agriculture.gouv.fr/>
- Azcon-Aguilar C et Barea JM (1996) Arbuscular mycorrhiza and biological control of soil-borne plant pathogens — an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6:457-464
- Baumgartner K, Smith RF et Bettiga L (2005) Weed control and cover crop management affect mycorrhizal colonization of grapevine roots and arbuscular mycorrhizal fungal spore populations in a California vineyard. *Mycorrhiza* 15:111–119
- Borstler B, Raab PA, Thiery O, Morton JB et Redecker D (2008) Genetic diversity of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as determined by mitochondrial large subunit rRNA gene sequences is considerably higher than previously expected. *New phytologist* 2 : 452-465
- Boso S, Kassemeyer HH (2008) Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis* 47:39–49
- Cameron D, Neal AL, Saskia CM, van Wees, et Jurriaan T (2013) Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Plant Science* 18:539–545
- Chong J, Piron MC, Meyer S, Merdinoglu D, Bertsch C et Mestre P (2014) The SWEET family of sugar transporters in grapevine : VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* 22:6589-6601
- Cochran WG (1950) Estimation of bacterial densities by means of the “most probable number”. *Biometrics* 6: 105-116.
- Cousinie P, Desmulier X, Greillier MM, Billaut G, Grimaud M, Rousval S, Robert F et Duhamel P (2015) The Ecophyto experience of agricultural education in the service of agro-ecological transition. *Courrier de l'Environnement de l'INRA* 65:87-94
- de Román M, Fernández I, Wyatt T, Sahrawy M, Heil M et Pozo MJ (2011) Elicitation of foliar resistance mechanisms transiently impairs root association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology*, 99: 36–45
- Dubos B (2002) Maladies cryptogamiques de la vigne. In : Ferret (ed), 2e ed
- Farmer MJ, Li X, Feng G, Zhao B, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V et van Tuinen (2007) Molecular monitoring of field-inoculated AMF to evaluate persistence in sweet potato crops in China. *Appl Soil Ecol* 35:599-609
- FranceAgrimer (2013) La production de vin en 2013. <http://franceagrimer.fr>
- Garcia\_Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B et al (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:711-24
- Garg N et Chandel S (2010) Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. A review. *Agron Sustain* 3:581-599
- Gauthier A, Trouvelot S, Kelloniemi J, Frettinger P, Wendehenna D, Daire X et al. (2014) The sulphated Laminarin triggers a stress transcriptome before priming the SA- and ROS-dependent defences during grapevine’s induced resistance against *Plasmopara viticola*. *Plos One* 9:e88145
- Gernns H, von Alten H, et Poehling (2001) Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen – is a compensation possible? *Mycorrhiza* 11: 237-243
- Gessler C, Pertot I et Perazzolli M (2011) *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* 1:3-4
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, et D Wipf (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 8:519–530
- Gutjahr C et Parniske M (2013) Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology* 29: 593-617
- Hao Z, Fayolle L, van Tuinen D, et al. (2012) Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* involves priming of defence gene responses in grapevine. *J Exp Bot* 63:3657–3672



- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B et Requena N (2011) A Versatile Monosaccharide Transporter That Operates in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus* sp Is Crucial for the Symbiotic Relationship with Plants. *The Plant Cell* 10:3812-3823
- Hendrix JW, Jones KJ et Nesmith WC (1992) Control of pathogenic mycorrhizal fungi in maintenance of soil productivity by crop-rotation. *Journal of production agriculture* 3:383-386
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE et al. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological Research*, 111 :509-547
- Huang PY et Zimmerli L (2014) Enhancing crop innate immunity: new promising trends. *Frontiers in Plant Science* 5: 624
- Jones J et Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature*. 444:323-329
- Jung SC, Martínez-Medina A, López-Ráez JA, Pozo MJ (2012) Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*. 6: 651-664
- Lafon R, et Bulit J (1981) Downy mildew of the vine. In: Spencer DM (ed) *The downy mildews*, pp 601–614
- Lecourieux F, Lecourieux D, Vignault C et Delrot S (2010) A Sugar-Inducible Protein Kinase, VvSK1, Regulates Hexose Transport and Sugar Accumulation in Grapevine Cells. *Plant Physiology* 2:1096-1106.
- Linderman RG et Davis EA (2001) Comparative response of selected grapevine rootstocks and cultivars to inoculation with different mycorrhizal fungi. *American journal of enology and viticulture* 1: 8-11
- Li Kim Khiook I, Schneider C, Heloir MC, Bois B, Daire, X, Adrian M et Trouvelot S (2013) Image analysis methods for assessment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and *Plasmopara viticola* development in grapevine leaves: application to the evaluation of resistance to downy mildew. *Journal of Microbiological Methods* 2:235-244
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M et Cheung F (2007) Town CD, Harrison MJ: Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J* 50:529-544
- Macho AP et Zipfel C (2014) Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol Cell* 2: 263-72
- Marschner H et Dell B (1994) Nutrient-uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and soil*, 1:89-102
- Meyer A H, Botha A, Valentine A J, Archer E et Louw PJE (2005) The occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in inoculated and uninoculated rhizosphere soils of two-year-old commercial grapevines. *South African Journal of Enology and Viticulture* 2:90-94
- Pozo M et C Azcon-Aguilar (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10:393–398
- Phillips JM et Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:157-160
- Rapport d'expertises pesticides INRA (2005). <http://genet.univ-tours.fr>
- Kempel A, Schmidt AK, Brandl R et Schädler M (2010) Support from the underground: Induced plant resistance depends on arbuscular mycorrhizal fungi. *Functional Ecology* 24:293–300
- Redecker D, Kodner R et Graham LE (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289:1920-1921
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer S, Morton J et Walker C (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* 23:515-531
- Riemann M, Büche C, Kassemeyer HH et Nick P (2002) Cytoskeletal response during early development of the downy mildew of grapevine (*Plasmopara viticola*). *Protoplasma* 219:13–22

- Schreiner RP (2003) Mycorrhizal Colonization of Grapevine Rootstocks under Field Conditions. *Am J. Enol. Vitic.* 54:3
- Schreiner RP (2005) Effects of native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of “Pinot noir” (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorus. In: *Proceedings of the soil environment and vine* pp 1–12
- Smith SE, Read DJ, ed (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London
- Steimetz E, Trouvelot S, Gindro K, Bordier A, Poinssot B, Adrian M, et al. (2012) Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. *Physio. Mo. Plant patho.* 79:89-96
- Tosi L et Zazzarini A (2000) Interactions between *Plasmopara viticola helianthi*, *Glomus mossae* and two plant activators in sunflower plants. *European journal of plant pathology* 106:735-744
- Trouvelot S, van Tuinen D, Hijri M, Gianinazzi-Pearson V (1999) Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 4:203-206
- Trouvelot A, Kough JL et Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi (ed) *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> European Symposium on mycorrhizae* pp 217-221
- Trouvelot S, Varnier AL, Allègre M, Mercier L, Baillieul M, Arnould C et al (2008) A  $\beta$ -1,3 Glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:232-243
- Trouvelot S, Adrian M, Bonneau L, Redecker D, Tuinen Dv et Wipf D (2015) BENEFITS OF ARBUSCULAR MYCORRHIZA (AM) FUNGI IN VITICULTURE: FACTS AND EXPECTATIONS. *Agronomy* 12:1326
- van Tuinen D, Zhao B et Gianinazzi-Pearson V (1998a) PCR in studies of AM Fungi: from Primers to Application. In : AK Varma (ed) *Mycorrhiza Manual* . Springer-Verlag: Heidelberg pp 387-400
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Golotte A et Gianinazzi-Pearson V (1998b) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol* 7:103-111
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright D A, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, FitzGerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D et Coppola G (2007) A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. *PLoS ONE* 12:1326
- Vercesi A, Tornaghi R, Sant S, Burrano S et Faoro F (1999) A cytological and ultrastructural study on the maturation and germination of oospores of *Plasmopara viticola* from overwintering vine leaves. *Mycol Res* 103:193–202
- Walters DR, Ratsep J et Havis ND (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot* 64:1263 –1280
- Wehner J, Antunes PM, Powell JR, Mazukatow J et Rillig MC (2010) Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia* 53:197-201
- Whipps JM (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can J Bot.* 82: 1198-1227
- Yazid RM et Sidik NM (2011) Extraction of functional total RNA from *Cayratia trifolia*. *Advances in Environmental Biology* 5: 3404-3409

## Annexes

**Annexe 1.** Fiche technique du porte-greffe SO4 ou Sélection oppenheim n°4 (D'après [http://plantgrape.plantnet-project.org/fr/porte-greffe/Sélection\\_Oppenheim\\_4](http://plantgrape.plantnet-project.org/fr/porte-greffe/Sélection_Oppenheim_4))



### Nom de la variété en France (et dénomination usuelle)

Sélection Oppenheim 4 (SO 4)

### Obtenteur / sélectionneur et année d'obtention

Sigmund Teleki et Heinrich Fuhr, 1896

### Origine génétique

Il s'agit d'une variété issue d'un croisement entre *Vitis berlandieri* et *Vitis riparia* provenant d'Euryale Rességuier.

### Evolution des surfaces en vigne-mère

	1945	1955	1965	1975	1985	1995	2005	2011
Rang	31	13	6	1	1	2	2	1
ha	0.8	27	363	821	2	339	461	352

### Surface estimée du vignoble français greffé avec ce porte-greffe et

180 000 ha. Le SO 4 est présent dans toutes les régions viticoles françaises.

### Eléments de description ampélographique

L'identification fait appel :

- à l'extrémité du jeune rameau qui est demi-ouverte, avec une pigmentation anthocyanique en liseré et une densité moyenne des poils couchés,
- aux jeunes feuilles bronzées,
- au rameau allongé, avec un contour côtelé, une section légèrement elliptique, des noeuds et des entre-noeuds rouges luisants avec des ponctuations rougeâtres sur la face ventrale, et une densité nulle des poils dressés et des

poils couchés,

- aux vrilles qui sont trifi des,

- aux feuilles adultes qui sont grandes, cunéiformes, involutées, avec le limbe ondulé entre les nervures, un sinus pétiolaire en U ou en V ouvert, des dents à côtés rectilignes, une faible pigmentation anthocyanique des nervures et face inférieure une densité faible à moyenne des poils dressés,

- aux fleurs de sexe mâle,

- aux sarments qui sont de couleur brun foncé.

## Profil Génétique

Microsatellite	VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD27	VRZAG62	VRZAG79	VVMD25	VVMD28	VVMD32
Allèle 1	143	234	233	238	200	252	238	214	259
Allèle 2	145	263	264	249	214	256	249	235	259

## Résistance aux parasites du sol

Le SO 4 a un degré de tolérance élevé au phylloxéra radicole. De même sa résistance aux nématodes *Meloidogyne incognita* et *Meloidogyne arenaria* est très bonne. Son degré de tolérance aux nématodes *Meloidogyne hapla* est moyen.

## Adaptation au milieu

Le SO 4 résiste jusqu'à 35% de calcaire total, 17% de calcaire actif et à un IPC de 30. Sa résistance à la chlorose ferrique peut donc être considérée comme moyenne. Il présente par ailleurs un bon comportement en sols acides et sa tolérance aux chlorures est assez bonne. La résistance à la sécheresse du SO 4 est moyenne à bonne mais son adaptation à l'humidité est faible à moyenne et ce porte-greffe se montre parfois sensible à la thyllose. Le SO 4 absorbe mal le magnésium et favorise le phénomène de dessèchement de la rafl e. Ce porte-greffe convient bien aux sols sablonneux (sous réserve de correction de la carence magnésienne), aux terroirs de plaine et aux sols argilo-calcaires moyennement ou peu fertiles. Il se montre en revanche peu adapté aux terroirs très secs, chlorosants ainsi qu'aux sols trop compacts.

## Interaction avec le greffon et objectifs de production

De façon générale, le SO 4 présente une bonne compatibilité avec les greffons mais la croissance radiale du tronc reste très limitée. On dit de ce porte-greffe qu'il a 'la jambe fine' ce qui peut engendrer des différences de diamètre importantes avec le greffon et la nécessité d'un tuteurage.

La vitesse de développement des plants greffés sur SO 4 est très grande et la vigueur conférée aux greffons par ce porte-greffe est forte notamment au cours de la première partie de la vie du vignoble (15 premières années). Le SO 4 permet ainsi d'obtenir des rendements élevés, dès les premières années après la plantation ce qui nécessite parfois la pratique de l'éclaircissage. Il engendre de bonnes teneurs en sucres mais les vins obtenus manquent souvent de corps et présentent parfois des notes herbacées du fait des rendements importants. Le SO 4 favorise également l'obtention de vins à pH élevés.

## Aptitudes à la multiplication végétative

Le SO 4 est un très bon producteur de bois (60 000 à 100 000 m/ha) avec cependant parfois une certaine proportion de bois secs. Il réagit bien à la fertilisation et à l'irrigation mais l'aoûtement des bois est assez tardif. Il a également une très bonne aptitude au bouturage ainsi qu'une bonne aptitude au greffage et il est facile à débouter. Ses entre-noeuds sont de diamètre moyen et la croissance des prompts-bourgeons est limitée. S'il est pratiqué, l'hormonage doit être modéré et la durée de stratification peut être parfois un peu plus longue.

## Résistance aux parasites de la couronne aérienne

La sensibilité du SO 4 au phylloxéra gallicole et à l'anthracnose est faible à moyenne et il présente un degré de résistance élevé au mildiou.

## Sélection clonale en France

Les 24 clones agréés de SO 4 portent les numéros 5, 15, 18, 20, 72, 73, 74, 102, 103, 104, 106, 156, 157, 158, 159, 161, 165, 166, 174, 203, 204, 205, 761 et 762.



## Nom de la variété en France

Marselan N

## Origine

Cette variété obtenue par l'INRA en 1961 est issue d'un croisement entre le Cabernet-Sauvignon N et le Grenache N.

## Synonymie

Aucun synonyme n'est officiellement reconnu en France, ni dans les autres pays de l'Union Européenne.

## Données réglementaires

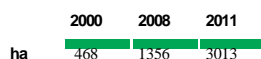
En France, le Marselan N est officiellement inscrit au "Catalogue des variétés de vigne".

Cette variété est également inscrite au Catalogue de la Bulgarie.

## Utilisation

Variété de raisin de cuve

## Evolution des surfaces cultivées en France



## Éléments de description

L'identification fait appel :

- à l'extrémité du jeune rameau qui présente une faible densité de poils couchés,

- au rameau avec des entre-nœuds de couleur verte,
- aux jeunes feuilles de couleur verte à plages bronzées,
- aux feuilles adultes vert foncé, brillantes, orbiculaires, à cinq, sept ou neuf lobes, avec un sinus pétiolaire peu ouvert en U ou à lobes légèrement chevauchants, des dents courtes ou moyennes à côtés convexes ou rectilignes, une pigmentation anthocyanique des nervures nulle ou faible, un limbe tourmenté, lisse, et à la face inférieure, une densité nulle des poils couchés,
- aux baies qui sont de forme arrondie ou elliptique courte.

## Profil Génétique

Microsatellite	VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD27	VRZAG62	VRZAG79	VVMD25	VVMD28	VVMD32
Allèle 1	137	223	239	186	188	248	238	233	239
Allèle 2	143	229	243	191	194	258	240	243	239

## Phénologie

Epoque de débourrement : 5 jours après le Chasselas.  
 Epoque de maturité : 3ème époque, 4 semaines après le Chasselas.

## Aptitudes culturales et agronomiques

Le Marselan N peut être taillé court (en cordons). Il est préférable de le conduire avec un palissage suffisant car il émet des rameaux assez longs.

## Sensibilité aux maladies et aux ravageurs

Le Marselan N est très peu sensible à la pourriture grise et peu sensible à l'oidium et aux acariens.

## Potentialités technologiques

Les grappes sont grosses tandis que les baies sont très petites. Le rendement en jus est, de ce fait, limité (environ 160 kg/hl). Le Marselan N permet d'élaborer des vins colorés, typés et de grande qualité. Ils sont aromatiques, corsés, dotés d'une structure très intéressante (tanins souples sans amertume) qui les rend aptes au vieillissement.

## Sélection clonale en France

Le seul clone agréé de Marselan N porte le numéro 980.

## Références bibliographiques

- Catalogue des variétés et clones de vigne cultivés en France. Collectif, 2007, Ed. IFV, Le Grau-du-Roi.
- Documentation interne du Domaine de Vassal. 1949-2011, INRA, Marseillan-plage.
- Dictionnaire encyclopédique des cépages. P. Galet, 2000, Ed. Hachette, Paris.

## Description des clones agréés en France

N° de Clone	Identité et disponibilités		Données Agronomiques		Données Technologiques	
	Origine	Sélection	Fertilité	Niveau de production	Richesse en sucre	Potentiel couleur
	Année d'agrément	Références Agronomiques	Poids des grappes	Vigueur	Acidité totale	Structure tannique
	Surface en multiplication	Taille de baies <td>Sensibilité au Botrytis <td>Intensité aromatique <td>Aptitudes œnologiques</td> <td></td> </td></td>	Sensibilité au Botrytis <td>Intensité aromatique <td>Aptitudes œnologiques</td> <td></td> </td>	Intensité aromatique <td>Aptitudes œnologiques</td> <td></td>	Aptitudes œnologiques	
980		INRA				
	1991 17,22 ha	Languedoc, Provence				

ENTAV  INRA®

**Annexe 3.** Méthodologie appliquée pour déterminer la fréquence de mycorhization (F%), l'intensité globale de mycorhization (M%) et l'intensité arbusculaire de la partie mycorhizée (a%) – D'après Trouvelot *et al.* (1986)

1/ FREQUENCE DE LA MYCORHIZATION :

$$F\% = (\text{nombre de fragments mycorhizés} / \text{nombre total de fragments}) \times 100$$

2/ INTENSITE GLOBALE DE MYCORHIZATION :

$$M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / (\text{nombre total de fragments})$$

Où  $n_i$  = nombre de fragments notés  $i$ , avec  $i = 0, 1, \dots, 5$

3/ INTENSITE DE MYCORHIZATION DES FRAGMENTS MYCORHIZES :

$$m\% = M \times (\text{nombre total de fragments}) / (\text{nombre de fragments mycorhizés}) = M \times 100 / F$$

4/ INTENSITE ARBUSCULAIRE DE LA PARTIE MYCORHIZEE :

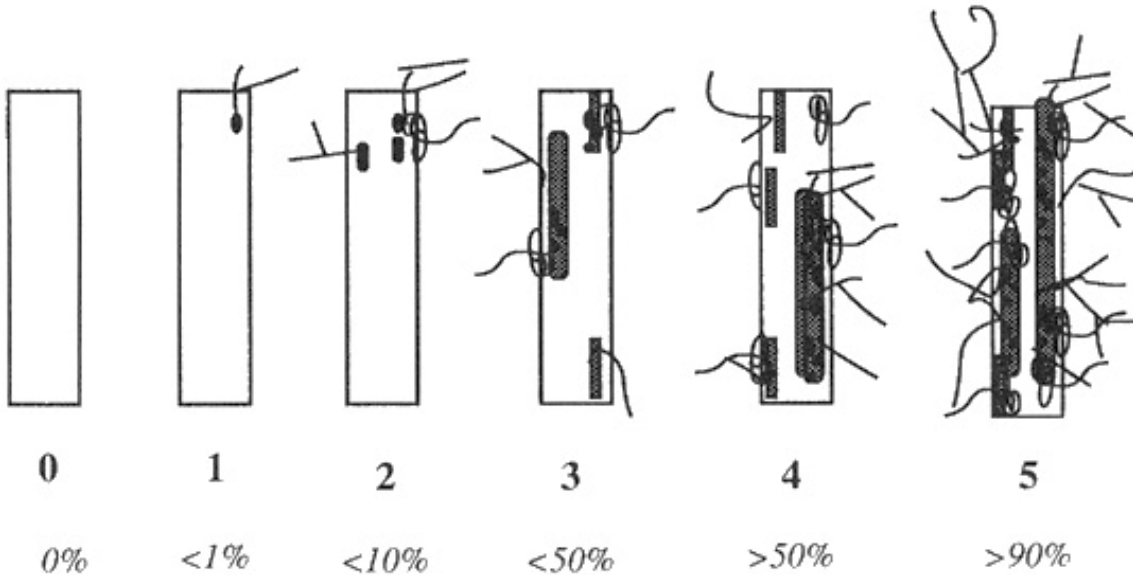
$$a\% = (100mA_3 + 50mA_2 + 10mA_1) / 100$$

Où les  $mA_i$  sont respectivement affectés des notes  $A_i$ ,

et  $mA_i = ((95n_5A_i + 70n_4A_i + 30n_3A_i + 5n_2A_i + n_1A_i) / \text{nombre de fragments mycorhizés}) \times 100 / m$ , avec  $i=0, 1, 2, 3$

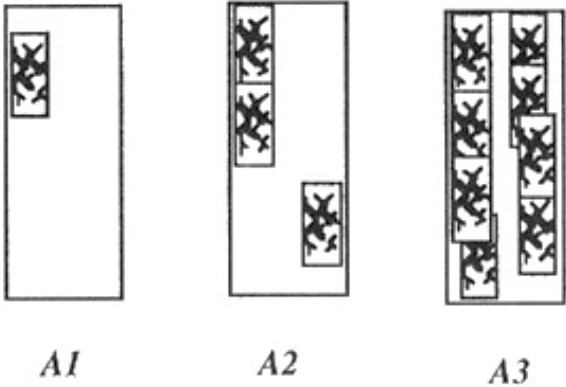
$$A\% = a \times (M/100)$$

NOTATION DE L'INFECTION MYCORHIZIENNE  
EN CLASSES NOTEES DE 0 A 5



NOTATION DE LA RICHESSE EN ARBUSCULES

*pas d'arbuscule : A0*  
*peu d'arbuscules : A1*  
*richesse moyenne : A2*  
*grande richesse : A3*





**Annexe 4.** Méthodologie appliquée pour déterminer le nombre le plus probable (NPP) de propagules de champignons mycorrhizogènes dans un sol

Une fois le protocole de dilution réalisé (cf. 2.8), il est possible de calculer le nombre le plus probable (NPP) de propagules dans une matrice (en l'occurrence l'inoculum commercial SymbivitPro®). Il s'agit de déterminer (i)  $P_1$  qui est soit (a) le nombre de tubes positifs (contient des propagules) dans la plus faible dilution si tous les tubes y sont positifs, soit (b) le plus grand nombre de tubes positif pour une dilution donnée, puis (ii) d'évaluer  $P_2$  et  $P_3$  qui représentent le nombre de tubes positifs dans les deux dilutions plus élevées.

Une fois les valeurs de  $P_1$ ,  $P_2$  et  $P_3$  déterminées, les tables d'Alexander (1965) (**Tableau A**) permettent d'en déduire le nombre le plus probable de propagules présent dans l'inoculum de la deuxième dilution. Enfin, pour obtenir le potentiel mycorrhizogène de la matrice originale, il faut multiplier le nombre obtenu à partir des tables d'Alexander (1965) par l'inverse du facteur de la deuxième dilution.

**Tableau A.** Table du nombre le plus probable (NPP) pour une utilisation avec des dilutions de raison 10 et 5 tubes par dilution (Alexander, 1965).

$P_1$	$P_2$	Le nombre le plus probable pour les valeurs de $P_3$					
		0	1	2	3	4	5
0	0	-	0.019	0.036	0.054	0.072	0.090
0	1	0.019	0.036	0.055	0.073	0.091	0.11
0	2	0.037	0.055	0.074	0.092	0.11	0.10
0	3	0.056	0.074	0.093	0.11	0.13	0.15
0	4	0.075	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17
0	5	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19
1	0	0.020	0.040	0.060	0.090	0.10	0.12
1	1	0.040	0.061	0.081	0.10	0.12	0.14
1	2	0.061	0.082	0.10	0.12	0.15	0.17
1	3	0.093	0.10	0.13	0.15	0.17	0.19
1	4	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22
1	5	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22	0.24
2	0	0.045	0.068	0.091	0.12	0.14	0.16
2	1	0.068	0.092	0.12	0.14	0.17	0.19

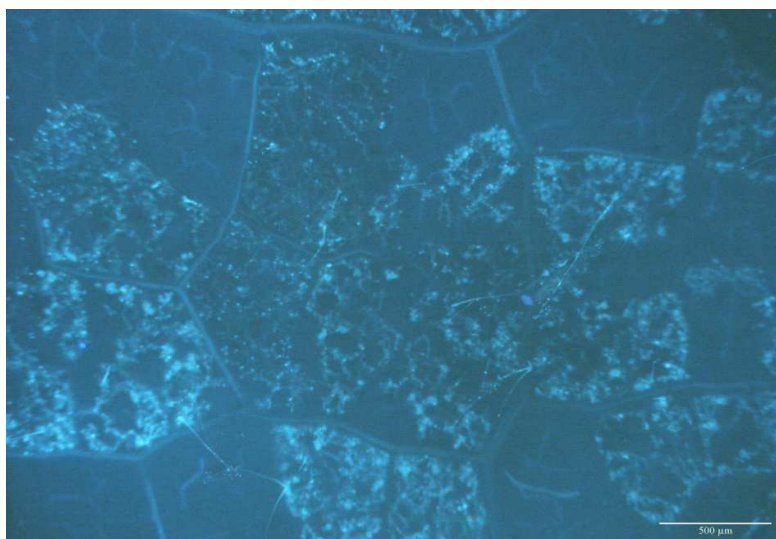
2	2	0.093	0.12	0.14	0.17	0.19	0.22
2	3	0.12	0.14	0.17	0.20	0.22	0.25
2	4	0.15	0.17	0.20	0.23	0.25	0.29
2	5	0.17	0.20	0.23	0.26	0.29	0.32
3	0	0.078	0.11	0.13	0.16	0.20	0.23
3	1	0.11	0.14	0.17	0.20	0.23	0.27
3	2	0.14	0.17	0.20	0.24	0.27	0.31
3	3	0.17	0.21	0.24	0.28	0.31	0.35
3	4	0.21	0.24	0.28	0.32	0.36	0.40
3	5	0.25	0.29	0.32	0.37	0.41	0.45
4	0	0.13	0.17	0.21	0.25	0.30	0.36
4	1	0.17	0.21	0.26	0.31	0.36	0.42
4	2	0.22	0.26	0.32	0.38	0.44	0.50
4	3	0.27	0.33	0.39	0.45	0.52	0.59
4	4	0.34	0.40	0.47	0.54	0.62	0.69
4	5	0.41	0.48	0.56	0.64	0.72	0.81
5	0	0.23	0.31	0.43	0.58	0.76	0.95
5	1	0.33	0.46	0.64	0.84	1.1	1.3
5	2	0.49	0.70	0.95	1.2	1.5	1.8
5	3	0.79	1.1	1.4	1.8	2.1	2.5
5	4	1.3	1.7	2.2	2.8	3.5	4.3
5	5	2.4	3.5	5.4	9.2	16	-

Une fois le nombre le NPP calculé, la table de Cochran (1950) (**Tableau B**) permettent de déterminer l'intervalle de confiance à 95 %. En effet, la limite de fiabilité supérieure à 95 % s'obtient en multipliant la valeur du NPP par le facteur approprié de la table ; pour la limite inférieure, il faut diviser la valeur de NPP par ce même facteur.

**Tableau B.** Facteurs pour le calcul des limites de l'intervalle de confiance pour le nombre le plus probable (NPP) (Cochran, 1950).

N° de tubes par dilution (n)	Facteur pour les limites de confiances 95% avec les ratios de dilution			
	2	4	5	10
1	4.00	7.14	5.32	14.45
2	2.57	4.20	4.47	5.81
3	2.23	2.10	3.39	4.88
4	2.00	2.89	2.38	3.80
5	1.85	2.41	2.59	3.30
6	1.76	2.23	2.39	2.93
7	1.59	2.10	2.23	2.74
8	1.54	2.00	2.12	2.57
9	1.53	1.92	2.02	2.43
10	1.53	1.96	1.95	2.32

**Annexe 5.** Exemple de photographie (Nikon) de disque foliaire infecté par *P. viticola*, excité par UV (longueurs d'onde excitation à 340-380 nm). Observation sous microscope à épifluorescence, objectif 2,5X.



**Annexe 6.** Liste des couples d'amorces utilisés pour les amplifications par PCR, réalisées dans la présente étude.

Amorces	Séquences (5'-3')	Gènes cibles	Références
Vv_SWEET2a_F	CGTTCTCTGTTGTTGCCAGTC	VvSWEET2a	Chong <i>et al.</i> , 2014
Vv_SWEET2a_R	ACCAAGCAGTTTAGGAGAGCA		
Vv_SWEET9_F	GCTCCAATCTGGAAAGTTTCTG	VvSWEET9	Chong <i>et al.</i> , 2014
Vv_SWEET9_R	TCATTTTCAATGTCGCAACC		
Vv_SWEET10_F	CCATTCACCATCCTTTGGTTT	VvSWEET10	Chong <i>et al.</i> , 2014
Vv_SWEET10_R	CCACGTAGGGAACAGACTGAA		
Vv_SWEET11_F	GGGACGTGCATAGAAGCTACA	VvSWEET11	Chong <i>et al.</i> , 2014
Vv_SWEET11_R	GCAGACCCAACCGACTATCTT		
Vv_SWEET12_F	GGTACTTCTTCTAATAAACCTTGGAG	VvSWEET12	Chong <i>et al.</i> , 2014
Vv_SWEET12_R	GAATACGCTCACAGCGAATATGA		
Vv_SWEET15_F	GGCCAAGAAACAAACTCTCAAA	VvSWEET15	Chong <i>et al.</i> , 2014
Vv_SWEET15_R	GCCACTGAGAATGAAGCACAG		
Vv_SUC11_F	CCATGGGATCAACTTTTTG	VvSUC11	Afoufa-Bastien <i>et al.</i> , 2010
Vv_SUC11_R	CATTTAACCACCCATATTGAT		
Vv_SUT2_F	GCAGCTCGTTTGATGGGTGGTG	VvSUT2	Gambetta <i>et al.</i> , 2010
Vv_SUT2_R	TGGAGGCATCAAGCTTCTGC		
Vv_SUC27_F	TGTGCTTGGCACTGACGGTA	VvSUC27	Gambetta <i>et al.</i> , 2010
Vv_SUC27_R	TGGAATGCTGTAGGTGATCGCAA		
Vv_HT2_F	GCGGTGTTGGTACTGGTAC	VvHT2	Afoufa-Bastien <i>et al.</i> , 2010
Vv_HT2_R	GGACTTGAGAAGGCATTTACC		
Vv_HT5_F	GGTGTGGAAGAAGCATTGG	VvHT5	Afoufa-Bastien <i>et al.</i> , 2010
Vv_HT5_R	GGCACAAGAACACATATA		

Vv_STS F	AGGAAGCAGCATTGAAGGCTC	Stilbène synthase	Trouvelot <i>et al.</i> , 2008
Vv_STS R	TGCACCAGGCATTTCTACACC		
Vv_PR3 F	GCAACCGATGTTGACATATCA	Chitinase 4c	Aziz <i>et al.</i> , 2003 Trdá <i>et al.</i> , 2014
Vv_PR3 R	CGTCGCCCTAGCAAGTGAG		
Vv_PR1 F	GCGTGGGTGGGGAATGCCGA	Protéine de réponse PR-1	Trdá <i>et al.</i> , 2014
Vv_PR1 R	GATGTTGTCCCTGATAGTTGCC		
Vv_PR2 F	TCAGCCGTCCTCGGCAAATCA	Glucanase	Lachhab <i>et al.</i> , 2014
Vv_PR2 R	TTGGCCAGGAGTGGGGAGCC		
EF1 $\gamma$ F	GAAGGTTGACCTCTGGGATG	Gène de ménage	Dufour <i>et al.</i> , 2013
EF1 $\gamma$ R	AGAGCCTCTCCCTCAAAAGG		

**Mots clefs :** *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, PS3, Mycorhize, Pépinière

## Résumé

*Plasmopara viticola* est l'oomycète responsable du mildiou chez la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.). Les viticulteurs ont souvent recours à une lutte chimique (fongicide) massive pour contrôler cette maladie. Cependant, l'utilisation systématique de produits phytopharmaceutiques implique aussi bien un coût économique pour le viticulteur et des répercussions avérées sur l'environnement et la santé humaine. Dans le cadre du plan EcoPhyto, qui encourage une forte diminution de l'utilisation de produits de synthèse pour la protection des cultures, des solutions alternatives font l'objet d'études.

Dans ce contexte, la forme sulfatée (PS3) de la laminarine ( $\beta$ -1,3-glucane extrait de l'algue brune *Laminaria digitata*) fait déjà l'objet d'études en tant que stimulateur des défenses des plantes (SDP). La pulvérisation foliaire de PS3 induit une résistance de la vigne contre le mildiou en conditions semi-contrôlées (serre) et cette molécule consiste, sur cette culture, en un agent de priming (Trouvelot *et al.*, 2008 ; Gauthier *et al.*, 2014).

La présente étude visera à éprouver l'efficacité d'un traitement avec le SDP PS3 pour la lutte contre le mildiou de la vigne en conditions de production chez les pépinières Guillaume (Charcenne). Cette stratégie alternative à la lutte chimique, permettrait de répondre aux contraintes des pépiniéristes dans l'optimisation de la reprise des jeunes plants de vigne au vignoble, en améliorant notamment leurs capacités de défense face à des stress biotiques. Par ailleurs, les CMAs (Champignons mycorrhizogènes à arbuscules) sont capables de former une relation symbiotique mutualiste avec la vigne. L'influence de ces champignons dans l'induction des défenses de la vigne est également étudiée : des travaux rapportent que la résistance induite par la mycorrhization (MIR) garantit à la vigne une protection systémique contre des maladies racinaires (Hao *et al.*, 2012). Dans un deuxième temps, il s'agira alors d'évaluer la compatibilité (synergique, antagoniste ou complémentaire) d'un traitement SDP et une inoculation de CMAs (produit commercial) pour un traitement conjoint, toujours dans le cadre des contraintes du pépiniériste évoquées précédemment.

Les résultats de l'expérience ont permis de mettre en évidence avec un traitement par spray foliaire de PS3, une induction efficace des défenses des plants de greffé-soudés face à une infection par *P. viticola*. Néanmoins, nous n'avons pas pu conclure quant à un possible effet de l'inoculation des CMAs sur le pathosystème {*V. vinifera*/*P. viticola*} traité ou non avec PS3, principalement à cause d'une très faible quantité de propagules dans l'inoculum commercial utilisé.

**Key words :** *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, PS3, Mycorrhiza, nursery

## **Abstract**

*Plasmopara viticola* is an oomycete responsible for the downy mildew in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). Vine-growers often resort to a massive chemical control (fungicide) to struggle against this disease. However, the automatic use of phytopharmaceuticals involves an economic cost for vines-growers as well as identified effects on environment and on human health. In the framework of the EcoPhyto plan which supports a strong decrease of the use of synthetic products for crop protection, alternatives solutions are under review.

In this context, the sulfated form (PS3) of laminarin (a  $\beta$ -1,3-glucane extract from the brown algae *Laminaria digitata*) is under review as an elicitor of plant defense reaction. PS3 foliar spraying induces grapevine resistance against the downy mildew under greenhouse conditions and this molecule is a priming agent on this crop (Trouvelot *et al.*, 2008; Gauthier *et al.*, 2014).

In a first phase, this study will aim at analysing the efficiency of PS3 treatment to struggle against vine downy mildew in production conditions at Guillaume nursery (Charcenne). This alternative chemical control strategy would enable to cope with the specific constraints of nursery owner to maximize their regrowth in the vineyard, by improving especially their defense against biotic stresses. Moreover Arbuscular mycorrhizal fungi (CMA) are able to establish a symbiotic interaction with grapevines. Fungi effects on grapevine defense induction are also studied: papers reveal that the Mycorrhiza-induced resistance (MIR) provides systemic protection against belowground diseases in grapevine (Hao *et al.*, 2012).

In a second phase, we will assess the compatibility (synergetic, antagonistic or complementary) of both elicitor and arbuscular mycorrhizal fungi to a joint treatment.

The results highlight a well PS3-induced plant defense against *P. Viticola* infection. Nevertheless, we could not conclude on the effect of CMAs inoculation on the pathosystem {*V. vinifera/P. viticola*} treated or not with PS3, due to a small amount of propagules in the commercial inoculums used.