



Diversité des souches de *Botryosphaeria* dans les ceps.
Morvan COARER, IFV pôle Val de Loire – Centre, Unité de Nantes-Vertou.
morvan.coarer@vignevin.com

Synthèse :

Les maladies de dépérissement du bois sont liées à la présence d'un certain nombre de micro-organismes, dont les *Botryosphaeria*. Pour espérer comprendre ces maladies, il convient de mieux connaître les cycles biologiques des champignons impliqués et d'aller plus loin que la simple identification taxonomique. Pour ce faire, une technique de caractérisation infra-spécifique des *Botryosphaeria*, validée sur un relativement large échantillonnage de souches issues de parcelles touchées et régulièrement suivies est absolument nécessaire.

Objectif de l'étude :

Entre 2008 et 2013, l'IFV a étudié la biodiversité des espèces de moisissures, dont les *Botryosphaeria* en fonction des millésimes, de la localisation géographique, des organes, du statut (malade et asymptomatique) et du mode de production. Ces études, menées dans 2 vignobles différents (Val de Loire et Bourgogne) ont révélé l'existence de 3 à 5 espèces différentes dont deux principales : *N. parvum* et *D. seriata*. La question de la biodiversité infra-spécifique (i.e. le nombre de souches différentes susceptibles d'être retrouvées à l'extérieur comme à l'intérieur du cep) n'avait pas été abordée à ce jour. La problématique était donc la suivante : combien de souches différentes sont-elles susceptibles de coloniser un cep ? Se retrouvent-elles au niveau des ceps adjacents ? Ont-elles des caractéristiques différentes, notamment au niveau de la virulence ?

Résultats :

Une technique de caractérisation infra-spécifique d'UP-PCR avait été décrite en 2011 par Billones-Baaijens *et al.*¹ pour l'espèce *N. luteum*. Nous nous sommes attachés à tester cette méthode sur nos autres espèces de *Botryosphaeria*, de même que les techniques de RAPD que nous utilisons pour d'autres fungi (notamment *Botrytis cinerea*), afin d'estimer le niveau de polymorphisme obtenu et son caractère discriminatoire. Après optimisation et validation sur les souches conservées dans le CRB « MICROORGANISMES VIGNE ET VIN » de l'IFV, les amorces B15 et L15 ont été retenues pour la caractérisation infra-spécifique de *D. seriata*. En revanche, pour *N. parvum*, ces amorces ne sont pas révélées suffisamment aptes à révéler le polymorphisme clonal, puisque l'amorce L15 n'a livré que 12 profils et l'amorce B15 seulement 2 profils différents, conduisant à une diversité globale de 51.8 %. Pour pallier ce manque de révélation de polymorphisme, nous avons testé en 2014/2015 deux autres amorces (F16 et AA2M2), uniquement sur cette espèce. Les résultats semblaient plus intéressants au départ, ne se sont pas révélés aussi prometteurs par la suite.

Nous nous sommes donc penchés sur une série de 20 amorces RAPD de la série OPERON A 1 à 20.

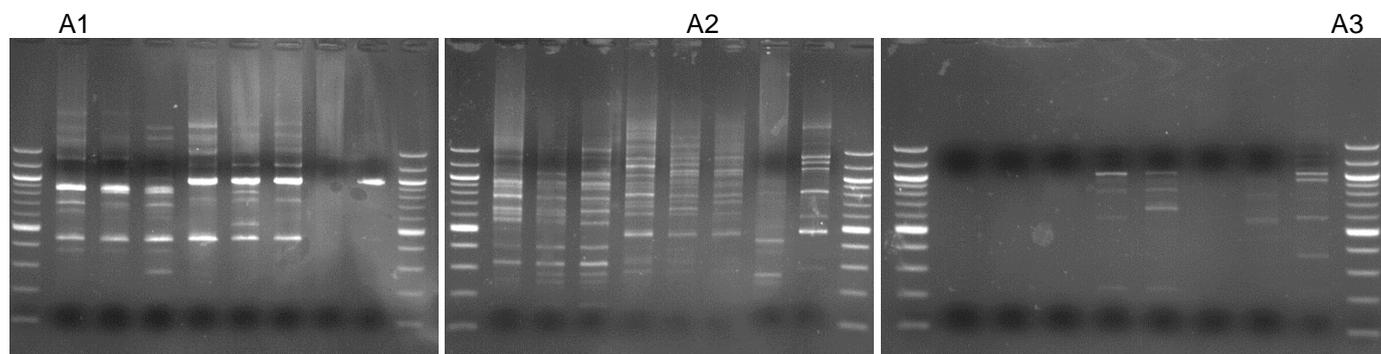
Primer	Séquence	Référence
L15/AS19	GAG GGT GGC GGC TAG	Lubeck <i>et al.</i> 1998, Billones-Baaijens 2013
B15	GGA GGG TGT T	operon, Coarer <i>et al.</i> 1999
A1	CAG GCC CTT C	operon
A2	TGC CGA GCT G	operon
A3	AGT CAG CCA C	operon
A4	AAT CGG GCT G	operon
A5	AGG GGT CTT G	operon
A6	GGT CCC TGA C	operon
A7	GAA ACG GGT G	operon
A8	GTG ACG TAG G	operon
A9	GGG TAA CGC C	operon
A10	GTG ATC GCA G	operon
A11	CAA TCG CCG T	operon
A12	TCG GCG ATA G	operon
A13	CAG CAC CCA C	operon
A14	TCT GTG CTG G	operon
A15	TTC CGA ACC C	operon
A16	AGC CAG CGA A	operon
A17	GAC CGC TTG T	operon
A18	AGG TGA CCG T	operon
A19	CAA ACG TCG G	operon
A20	GTT GCG ATC C	operon

Parmi ces amorces, le primer OPERON A2 s'est révélé suffisamment polymorphe pour différencier les clones de *N. parvum*.

Après optimisation, le programme retenu pour cette amorce est finalement le suivant :

95°C, 2 mn
95°C, 1mn
36°C, 1mn
72°C, 2mn
72°C, 5 mn

} x 45 cycles

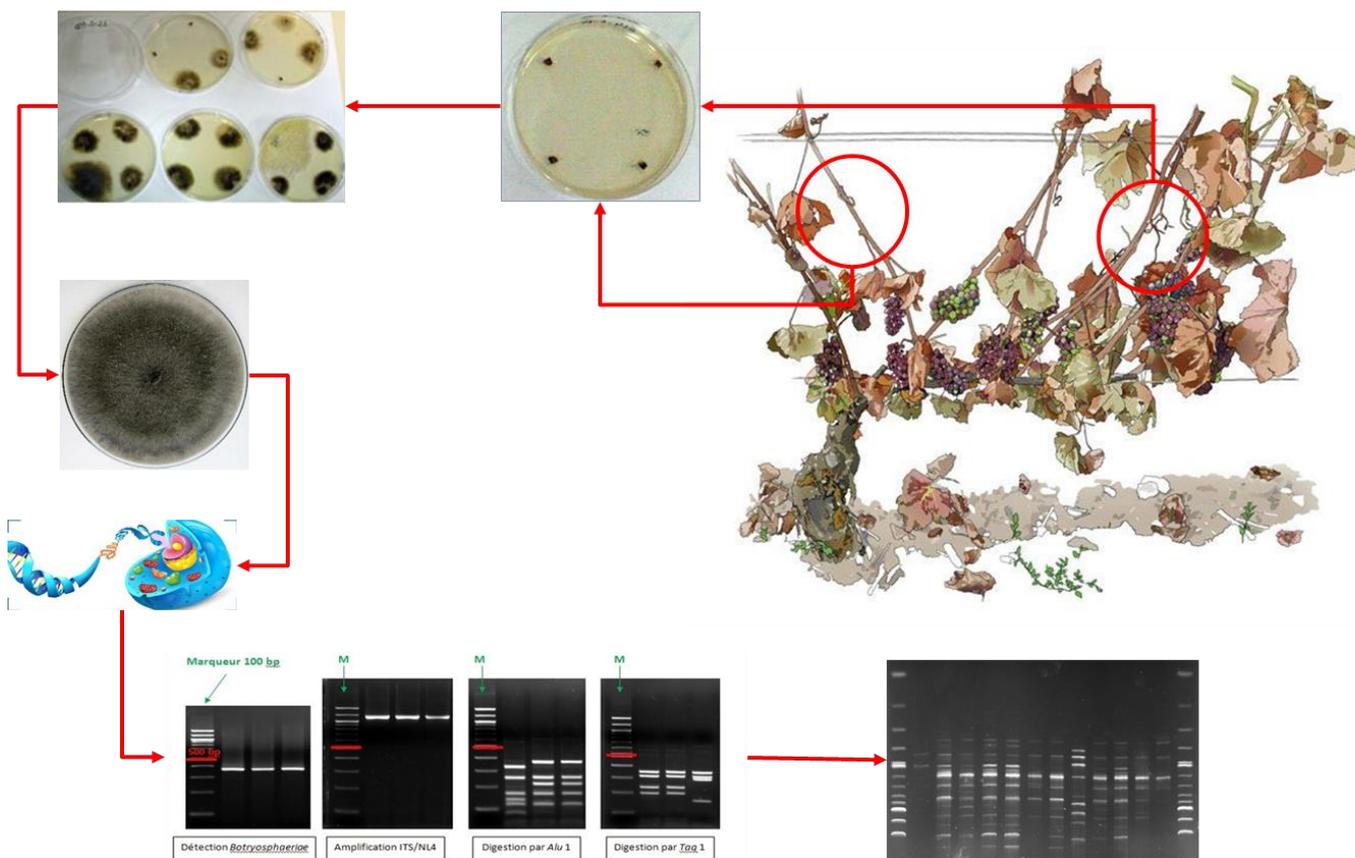


Essai de différentes amorces sur un panel choisi d'isolats de *N. parvum*

L'amorce A2 a ensuite été appliquée à un certain nombre de souches de *N. parvum* isolées en Val de Loire en 2010 et 2011 sur deux parcelles différentes. Cet essai a permis de mettre en évidence 90 % de polymorphisme. Par ailleurs, dans 5 cas, il a été mis en évidence la présence de souches génétiquement différentes dans les mêmes organes. On ne constate par contre pas de lien entre les populations de l'écorce et du cep. Dans un cas, un génotype (L) est retrouvé dans deux cepts géographiquement très éloignés du Pays Nantais, sans qu'il soit possible de démontrer qu'il s'agit là de génotypes réellement différents ou bien d'une limite de la technique.

Code CRB	Code essai	année	organe	statut	Génotype A2
NM01509	P4C1	2010	cep	malade	A
NM01510	P4C2	2010	cep	malade	B
NM01511	P4C3	2010	cep	malade	B
NM01512	P4C4	2010	cep	malade	F
NM01513	P4C5	2010	cep	malade	C
NM02526	P4E2	2011	écorce	malade	I
NM02511	P4E7	2011	écorce	malade	D
NM02508	R7E3	2011	écorce	malade	G
NM02507	R8C1	2011	cep	sain	H
NM02519	P7C2	2011	cep	malade	L
NM02523	P7C4	2011	cep	malade	N
NM02521	P7E6	2011	écorce	malade	O
NM02513	P7E3	2011	écorce	malade	E
NM02516	R8C5	2011	cep	sain	J
NM02517	R9C4	2011	cep	sain	K
NM02518	R1C1	2011	cep	malade	L
NM02525	R1C3	2011	cep	malade	M
NM02522	P9E1	2011	écorce	sain	P
NM02524	P1C2	2011	cep	malade	Q

Cette méthodologie a ensuite été appliquée à des prélèvements effectués en 2015, après la chute des feuilles, sur des sarments différents de ceps exprimant les symptômes d'ESCA/BDA sur deux parcelles éloignées du Pays Nantais.



Les différentes souches de *N. parvum* et *D. Seriata* isolées (respectivement 65 et 69) ont livré 61 génotypes différents (33 et 28). Les situations sur les deux parcelles sont très proches, donnant une moyenne de 2.95 génotypes par cep et de 1.92 par sarment. Dans 43 % des cas, *N. parvum* ou *D. seriata* n'étaient isolées que sur un seul des sarments. Quand des souches pouvaient être isolées sur deux sarments différents appartenant au même cep, la présence de souches communes n'était révélée que dans 9% des cas, *a contrario*, des espèces différentes étaient isolées dans l'un et l'autre des sarments dans 18 % des situations. Enfin, dans un même rang, il n'a pas été mis en évidence de génotype commun à différents ceps d'un même rang.

Conclusions :

Cette étude a permis la mise au point et la validation d'une méthode de caractérisation infra-spécifique de *N. parvum* qui vient compléter celle permettant de différencier les souches de *D. seriata* à l'aide de deux amorces différentes B15 et L15. Les premiers résultats semblent indiquer une grande diversité génotypique ainsi qu'une répartition spatiale assez restreinte des souches de *Botryosphaeria*.

Perspectives :

L'amorce A2, particulièrement polymorphe sur *N. parvum* devra être testée sur *D. seriata*, l'utilisation d'une seule amorce pouvant se révéler particulièrement économe. Une fois définitivement optimisée, cette technique de caractérisation infra-spécifique des *Botryosphaeria* pourra permettre l'étude fine du cycle biologique des champignons impliqués dans les maladies du bois et tenter de répondre à quelques questions importantes notamment celles ayant trait à la localisation de l'inoculum dans les tissus et organes et les éventuelles contaminations entre écorce et tissus ligneux, courson et entre-nœuds...

Billones-Baaijens R., (2011). *Botryosphaeria* infections in New zealand grapevine nurseries : sources of inoculum and infection pathways. Lincoln University. thesis

Coarer M., Bredoux M.C., Le Clinche C ., Coulon T ., Daniel P., (1999) Identification génétique de *Botrytis cinerea* par RAPD : évaluation de la diversité des populations en Pays Nantais et Bordelais. Oenologie 99 actes du VIème symposium international d'oenologie. *Editions Tec & Doc, Paris* : 82-86

Qiu Y., Steel C .C ., Ash G .J ., Savocchia S. (2015) Hierarchical genetic variation of *Botryosphaeriaceae* species associated with decline and dieback of grapevine in south-eastern Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, doi:10.1111/ajgw.12144