Projet Co-Act, Action 2

Comprendre et exploiter les différences de sensibilité variétale pour réduire l'impact de la Flavescence dorée.

Un protocole pour caractériser la sensibilité à la Flavescence dorée de cépages, porte-greffes et *Vitis* sauvages

S. Eveillard, T. Lusseau, F. Razan, D. Desque et S. Malembic-Maher, UMR BFP (INRA Bordeaux)
M. Perrin et J. Masson, UMR SVQV (INRA Colmar)

La Flavescence dorée (FD) est une maladie de la vigne provoquée par un phytoplasme qui s'étend à toute l'Europe. Les seuls moyens de contrôle consistent à détecter précocement puis à arracher les plants atteints et à traiter les vignobles concernés avec des insecticides contre l'insecte vecteur *Scaphoideus titanus.*

Des différences de sensibilité entre variétés de vigne existent et des études en vignoble ont par exemple montré que le Cabernet Sauvignon (CS) est très sensible à la FD avec beaucoup de plantes infectées, une diffusion du phytoplasme généralisée à toute la plante dans laquelle il se multiplie fortement. Le Merlot (M) est très peu sensible à la FD avec peu de plantes infectées, peu de diffusion au sein de la plante et une faible concentration en phytoplasmes au point de piqure (Eveillard *et al.* 2016).

Dans de telles situations de faible concentration de phytoplasmes, la propagation de la maladie sur d'autres plantes via l'insecte vecteur est atténuée (Galetto *et al.* 2014). L'utilisation de variétés moins sensibles à la transmission du phytoplasme et au sein desquelles il se multiplie moins pourrait donc permettre de limiter la propagation de la maladie et d'améliorer son contrôle par prophylaxie.

Symptômes de FD sur Cabernet Sauvignon sensible (en haut) et Merlot peu sensible (en bas)

Nos études s'attachent à caractériser les réponses à l'infection de cépages, porte-greffes et Vitacées sauvages. Un des objectifs est de déterminer la sensibilité à la FD de ressources génétiques existantes, permettant de conseiller la plantation de cépages moins sensibles, et/ou de renforcer les programmes nationaux de création variétale en identifiant des variétés génitrices peu sensibles à la FD.

La règlementation de quarantaine obligeant à l'arrachage systématique, nous avons développé un protocole permettant de caractériser la sensibilité à la FD chez la vigne en conditions contrôlées. Les résultats obtenus à ce jour corroborent et précisent les études et observations en vignoble.

Caractérisation de la sensibilité en conditions contrôlées

(1): transmission des phytoplasmes FD par *Scaphoideus titanus* en serre de haut confinement

Éclosion de *S. titanus* (12 sem.)

Acquisition des phytoplasmes sur fèves infectées (1 sem.)

Incubation sur vigne saine (4,5 sem.)

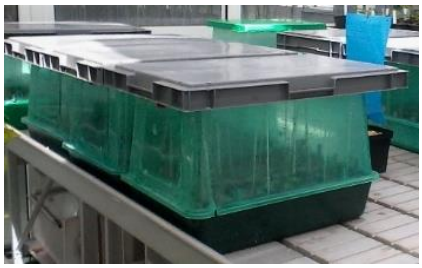
A gauche, des œufs de *S. titanus* pondus sur des bois de vignes, provenant de parcelles infestées par le vecteur, sont placés à éclore dans des mini-serres, avec une humidité constante et une température de 25 à 30°C. Dès leur éclosion, les larves sont transférées sur des plants de vigne pour leur développement.

Les larves au stade L4-L5 sont ensuite placées sur des fèves infectées par le phytoplasme. Elles s'y nourrissent et acquièrent la bactérie. Puis on les transfère à nouveau sur vigne pour une période d'incubation 4 à 5 semaines pendant laquelle le phytoplasme se multiplie dans le corps de l'insecte. Les *S. titanus* adultes sont alors devenus infectieux et sont prêts à être transférés sur les vignes à tester.

A droite, les vignes à tester proviennent de plants cultivés *in vitro* qui ont été acclimatés en perlite puis repiqués en terreau. Ces plantes herbacées sont sensibles à la piqure et donnent des résultats plus reproductibles que sur des plants issus de bois aoutés.

Au centre. Les *S. titanus* infectieux sont mis en contact pendant une semaine avec les vignes à tester, sous bonnette. C'est l'étape de transmission.

Obtention puis sevrage des plants *in vitro* (4 à 8 sem.)



Repiquage en terreau des plants à tester

Transmission

S. titanus infectieux

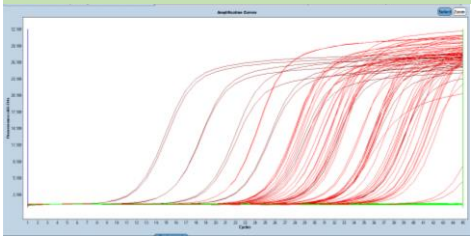
Caractérisation de la sensibilité en conditions contrôlées

(2): caractérisation qualitative et quantitative de la sensibilité

Incubation des plants de vigne (10 sem.)

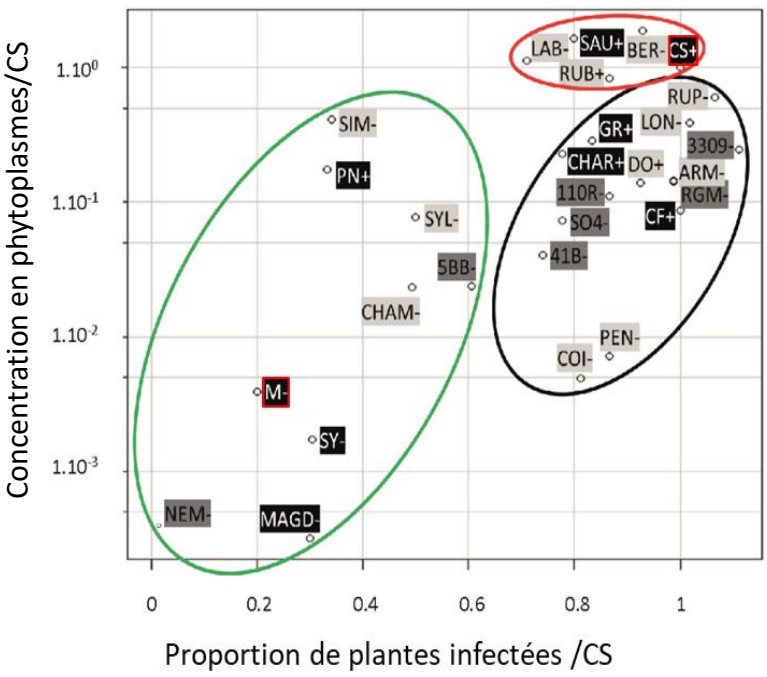
Exemple de vigne symptomatique

Quantification des phytoplasmes par PCR en temps-réel (dans les vignes et les insectes)



Les plants de vigne sont incubés à 25°C, l'apparition de symptômes est notée. Après 10 semaines d'incubation, les vignes sont prélevées, les acides nucléiques extraits et la concentration en phytoplasmes est déterminée pour chaque plante et dans les insectes utilisés.

Ce test a permis d'établir une gamme de sensibilité à la FD pour 28 Vitacées



Neuf *Vitis vinifera* (noir), 7 porte-greffes (gris foncé) et 12 *Vitis* sauvages (gris clair) ont été testés. Trois groupes ont été déterminés: **peu sensibles** en vert (faible concentration en phytoplasmes et faible pourcentage de plantes infectées); **très sensibles** en rouge (forte concentration en phytoplasmes et fort pourcentage de plantes infectées); **intermédiaires** en noir, (Eveillard *et al.* 2016). La présence de symptômes est notée «+», l'absence de symptômes après 10 sem. est notée «-».

Le Cabernet Sauvignon (CS) et son parent le Sauvignon (SAU) sont très sensibles. La Magdeleine Noire des Charentes (MAG), mère du Merlot (M), est très peu sensible à la FD, et donc source potentielle de résistance. Le Cabernet Franc (CF) l'autre parent du Merlot et du CS est intermédiaire.

Ce protocole permet donc d'infecter des plants de vigne avec le phytoplasme de la FD *via* l'insecte vecteur naturel *S. titanus* et de mesurer leur capacité de résistance à la transmission par l'insecte, à la multiplication du phytoplasme ainsi que le développement des symptômes. Les résultats de sensibilité à la maladie obtenus sur différents cépages, et porte-greffe ont permis de montrer qu'ils étaient similaires à ceux observés en vignoble (Eveillard *et al.* 2016).

Caractérisation de la sensibilité des variétés de vigne en conditions contrôlées

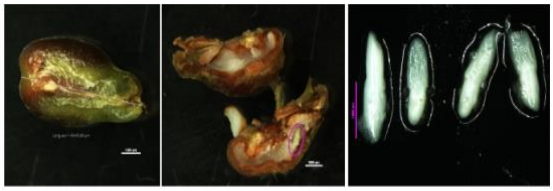
(3): Evaluation de la sensibilité d'une descendance du croisement Magdeleine x Cabernet Franc = « frères du Merlot »

Castration

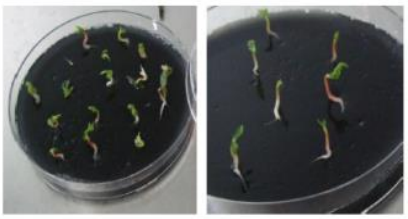
Fécondation sous poche

Grappe à maturité

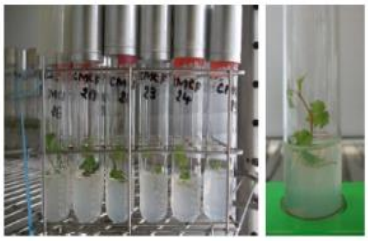
Sauvetage des embryons



Développement de plantules



Multiplication des plantules *in vitro*



Croisements réalisés

♀ ♀

MAG CF

MagxCF

CF MAG

CFxMag

MAG MAG

XMag

A gauche, les fleurs du parent femelle sont castrées, le pollen du parent mâle est récolté et mis en contact avec le pistil. La grappe est ensuite enfermée dans une poche afin d'éviter les contaminations par d'autres pollen. Une fois mûres, les baies sont expédiées à l'INRA de Colmar où est effectué le sauvetage d'embryons à partir des pépins (**au milieu**). En 30 jours seulement, des plantules sont obtenues puis multipliées *in vitro.*

A droite, les croisements ont été réalisés à l'INRA de Bordeaux et Montpellier et au Conservatoire des Charentes entre la Magdeleine Noire des Charentes (MAG) et le Cabernet Franc (CF), l'autre parent du Merlot. Nous avons ainsi obtenu des « frères du Merlot ». Des autofécondations de MAG ont également été réalisées.

Quarante quatre descendants MagxCF, 28 CFxMag et 25 XMag ont été obtenus et multipliés.

Vingt quatre descendants du croisement MAGxCF ont été testés. Ils présentent une gradation de sensibilité à la FD et sont répartis dans les trois groupes définis: très sensibles (comme le Cabernet Sauvignon), intermédiaires (comme le Cabernet Franc) et peu sensibles (comme la Magdeleine et le Merlot). Les individus issus des autres croisements sont en cours d'analyse.

Les variétés issues du programme RESDUR de résistance aux maladies cryptogamiques, Artaban, Vidoc, Floréal et Voltis sont actuellement testées.

Crédits photos: UMR BFP, INRA Bordeaux, UMR SVQV INRA Colmar.