



Alternatives au cuivre dans la lutte contre le mildiou de la vigne : Etude de l'efficacité de l'acide salicylique

Marc Chovelon, Grab– Séverine Lepaul, Stagiaire

1. Principe :

- On cherche à tester l'effet éliciteur de l'acide salicylique par un suivi en réaction après élicitation de la réaction de la vigne à une inoculation avec *Plasmopara Viticola*.
- Une comparaison avec une tisane de saule, qui serait utilisable en Agriculture biologique sera réalisée afin de voir si le composé non purifié peut provoquer des réactions suffisantes pour limiter le développement mycélien.

Ici on se propose d'étudier l'évolution de la maladie pour un cépage avec des doses variables à des dates d'élicitation différentes également.

2. Connaissance déjà acquise :

L'acide salicylique est un intermédiaire dans les mécanismes de défense des plantes. On connaît par exemple son rôle dans le métabolisme de H_2O_2 dans la réaction d'hypersensibilité : il inhibe la catalase, responsable de la dégradation de l'eau oxygénée en ($H_2O + O_2$) en s'y fixant (le site actif est bloqué). L'acide salicylique est synthétisé à partir de la phénylalanine, les réactions intermédiaires n'étant pas toutes établies encore. Cet acide serait aussi à l'origine de l'expression des PR Protéines acides. (Deloire, documents de cours). Dans ce cas précis, des études ont déjà été menées.

Sur tabac, l'étude du rôle de l'acide salicylique a été étudié, notamment en lien avec l'acidification du cytoplasme de la cellule végétale et sa position en tant que composés produits secondairement dans les réactions de défense (Lebrun-Garcia, 2001).

D'après une étude des systèmes de défense constitutifs et induits, réalisée sur vigne (Deloire *et al.*, 2000), une induction était réalisée par l'apport d'acide salicylique exogène, un suivi des nécroses cellulaires était effectué pour différents génotypes. La conclusion de l'étude était l'observation d'une grande variabilité d'un cépage à l'autre et d'une région à l'autre, et donc la nécessité d'être prudent quant aux conclusions liées à l'efficacité des éliciteurs pour la défense de la plante.

3. Expérimentation:

Sur des plants de Grenache en pots âgés de 2 ans,

- élicitation à des doses différentes avec de l'acide salicylique (7 mmol/l à 0,1 nmol/l) sur 4 plants à chaque fois : élicitation avec 15 ml sur chaque plant
- élicitation avec une tisane de saule pure (préparation de la tisane : 250 g de feuilles infusées dans 5 litres d'eau à 80 °C) et diluée 10 fois
- témoin : pas d'élicitation

Pour tester la meilleure date d'application de l'éliciteur, on inocule les feuilles prélevées en boîte de Pétri 2 jours après pour la moitié des prélèvements et 4 jours après pour l'autre moitié (5 répétitions pour une date et une dose).

L'inoculum a été obtenu suite à un prélèvement dans un champ mildioué de spores que l'on a conservées par congélation (prélèvement avec un pinceau humidifié à l'eau d'Evian). Avant chaque inoculation, pour connaître la quantité inoculée, on compte dans les prélèvements la quantité de spores présentes grâce à un Hématimètre de Malassez.

Remarque : préparation des différentes solutions d'acide salicylique ($HOC_6H_4CO_2H$)

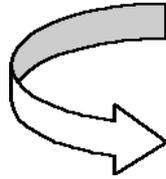
A partir de poudre, on effectue une solution mère à 50 mmol/l que l'on dilue en cascade pour obtenir les diverses dilutions (cf. fiche technique en annexe pour plus de détails).

4. Observation :

Au bout de 24 h, on fait une observation pour voir s'il y a des nécroses éventuelles, dues au traumatisme subi lors du prélèvement, afin de ne pas les compter avec les futures nécroses causées par le mildiou.

Les observations ultérieures se feront dès l'apparition des tâches, c'est à dire 4 ou 5 jours après inoculation jusqu'à la nécrose totale de la feuille. On observe à chaque fois la surface de feuille atteinte, soit la surface de feuilles atteintes des premiers symptômes (taches d'huile et jaunissement de la feuille), soit la surface de feuilles nécrosées (apparition des tâches brunes) ou soit la surface de feuille où on peut observer des sporulations.

ELICITATION à J - 2 ou à J -4 avec de l'acide salicylique (doses de 0,1 nmol/l à 7 mmol/l), ou de la tisane de saule (pure ou diluée 10 fois) ou absence d'élicitation (**TEMOIN**)



Plants de Grenache de 2 ans en pots



Prélèvements de feuilles sur les pots (5 répétitions par modalité) **INOCULEES** en boîte de pétri (3 gouttes d'inoculum), sur une feuille de papier filtre humidifiée régulièrement



Suivi du développement du mildiou dans une chambre thermostatée (25 °C) : notation de l'intensité de la maladie

Figure 1: Schéma de l'expérimentation

5. Résultats

L'expérience a été réalisée en deux fois, car nous ne disposions pas assez de place dans la chambre thermostatée pour disposer toutes les boîtes de Pétri. Deux témoins, un pour chaque partie de l'expérience, ont été mis en place. On va donner les résultats en deux parties sous forme de graphe, les deux expériences réalisées s'étant déroulées à des dates différentes et donc à des conditions météorologiques et physiologiques différentes. Les deux témoins sont bien distincts, il ne sera donc pas possible de comparer toutes les modalités entre elles.

5.1. Première partie de l'expérience :

Comparaison des modalités 1 à 6 à 2 dates d'élicitation différentes

Les résultats sont présentés sous forme de graphiques qui résument l'ensemble des observations réalisés. L'ensemble des résultats sera sous forme de tableau en annexe.

légende : témoin 1 : témoin correspondant à la série 1, absence d'élicitation

modalité 1 : élicitation avec une solution à 10 $\mu\text{mol/l}$ d'acide salicylique

modalité 2 : élicitation avec une solution à 1 $\mu\text{mol/l}$ d'acide salicylique

modalité 3 : élicitation avec une solution à 0,1 $\mu\text{mol/l}$ d'acide salicylique

modalité 4 : élicitation avec une solution à 10 nmol/l d'acide salicylique

modalité 5 : élicitation avec une solution à 1 nmol/l d'acide salicylique

modalité 6 : élicitation avec une solution à 0,1 nmol/l d'acide salicylique

évolution de la surface de la feuille présentant des symptômes

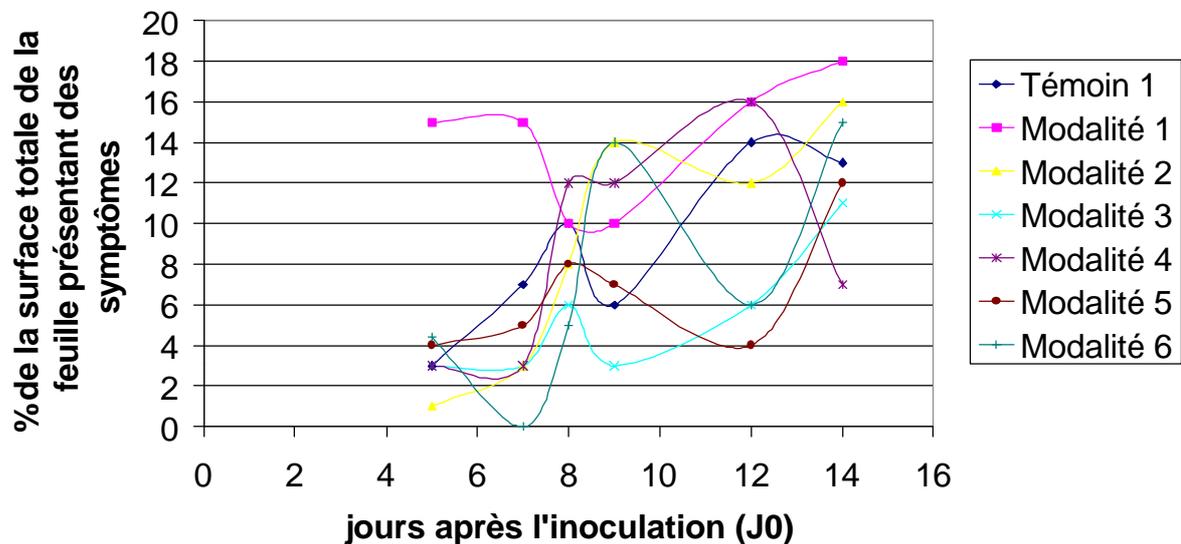


figure 2 : évolution moyenne de la surface de la feuille présentant des symptômes à des doses d'élicitation différentes, inoculation 2 jours après élicitation

évolution de la surface de la feuille présentant des symptômes sous différentes modalités

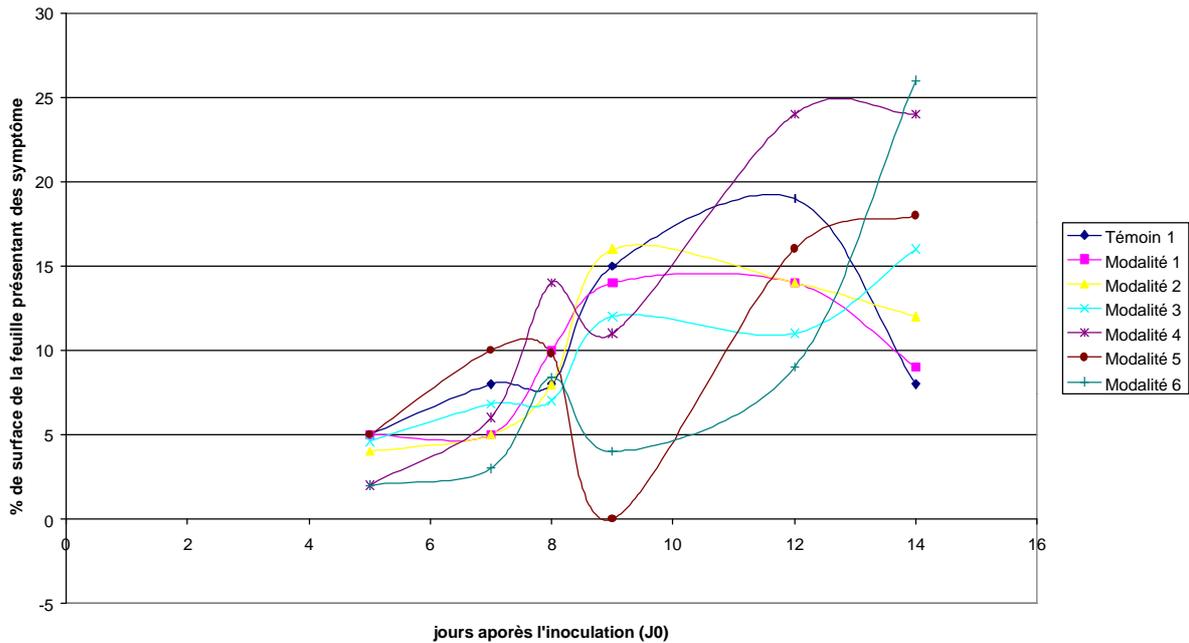


figure 3 : évolution de la surface moyenne de feuilles où on observe une sporulation, à des doses d'éllicitation différente , inoculation 4 jours après éllicitation

D'après ces graphiques, il semble que pour la première partie (modalité 1 à 6), on ne puisse rien dégager de l'observation des courbes, il sera effectué une analyse statistique ultérieurement pour le confirmer.

La figure 3 permet de dire que la modalité 5 se distingue 9 jours après l'inoculation, mais ce n'est que ponctuel, on ne retrouve pas cela aux autres dates d'observation.

évolution de la surface de feuilles présentant des symptômes en fonction de la date d'éllicitation

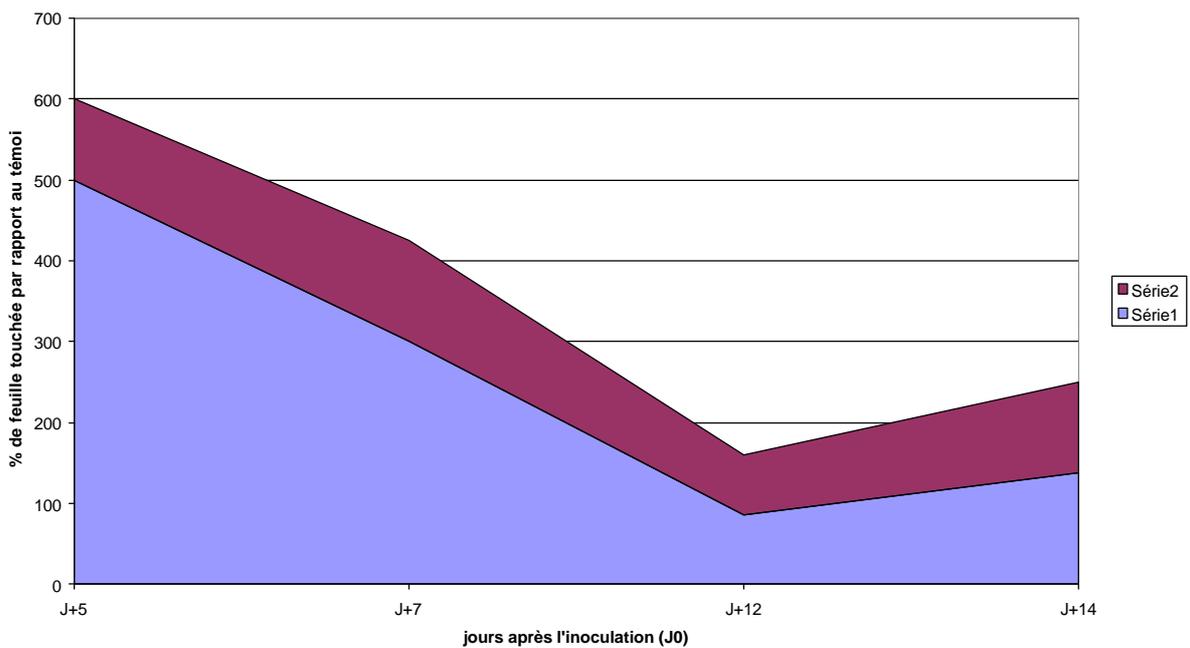


figure 4 : évolution de la surface nécrosée pour la modalité 1 (10 mmol/l) suivant la date d'éllicitation (série 1 : 2 jours avant inoculation ; série 2 : 4 jours avant inoculation)

D'après la figure 4, la série 1 (élicitation deux jours avant) semble liée à une pression de maladie moins forte que dans le cas de la série 2 (élicitation 4 jours avant). Cependant, il est à noter que il y a beaucoup de valeurs qui sont supérieures au témoin, il semble alors difficile dans ce cas de monter l'effet de l'élicitation.

5.2. deuxième partie de l'expérience :

Comparaison des modalités 7 à 9 et tisane de saule pure et diluée à 2 dates d'élicitation différentes

légende : modalité 7 : élicitation à la dose de 0,1 mmol/l
 modalité 8 : élicitation à la dose de 1 mmol/l
 modalité 9 : élicitation à la dose de 7 mmol/l
 tisane mère : tisane pure non diluée
 tisane diluée : tisane mère diluée 10 fois

évolution de la surface de la feuille atteinte de nécroses selon différentes modalités

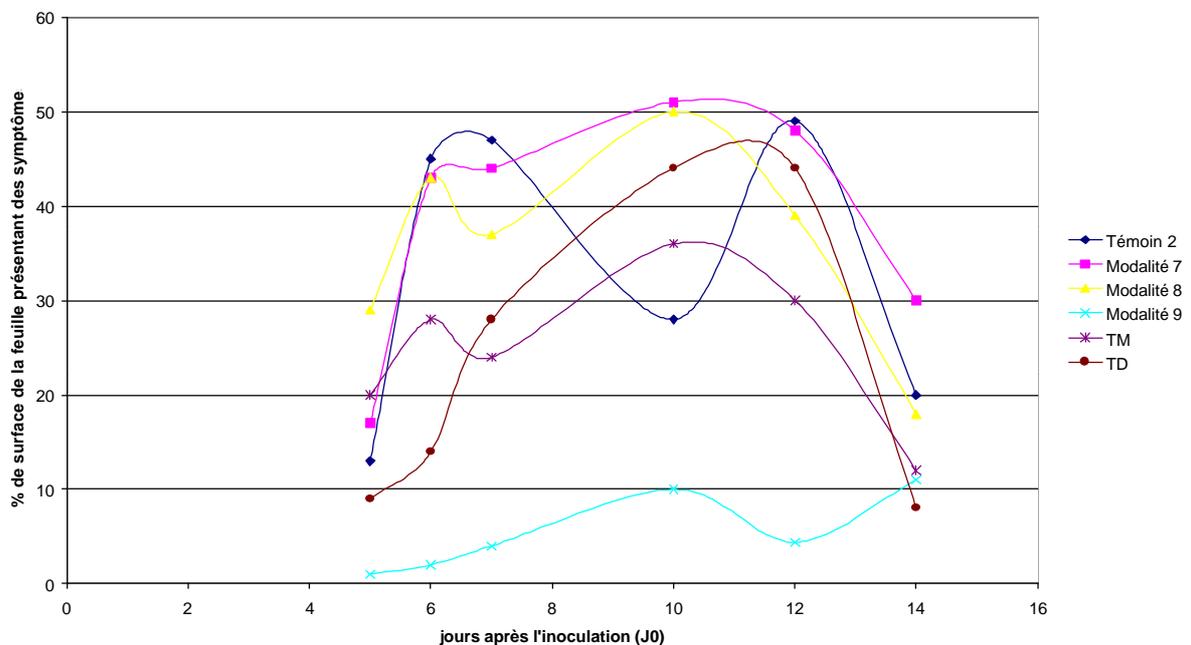


figure 5 : évolution des premiers symptômes dans le cas élicitation 2 jours avant inoculation au cours de la seconde série d'expérience

témoin 2 : témoin de la deuxième partie de l'expérience

Dans ce cas encore il semble difficile de mettre une modalité en évidence : la modalité 9 semble associée à des feuilles présentant moins de symptômes, de même il faudra réaliser une analyse statistique pour le confirmer.

Pour la deuxième partie de l'expérience, comme la figure 6 le montre, il est impossible de donner une conclusion. Le témoin semble même dans la première phase d'observation présenter beaucoup moins de symptômes, ce qui n'est plus vrai après 10 jours d'observation.

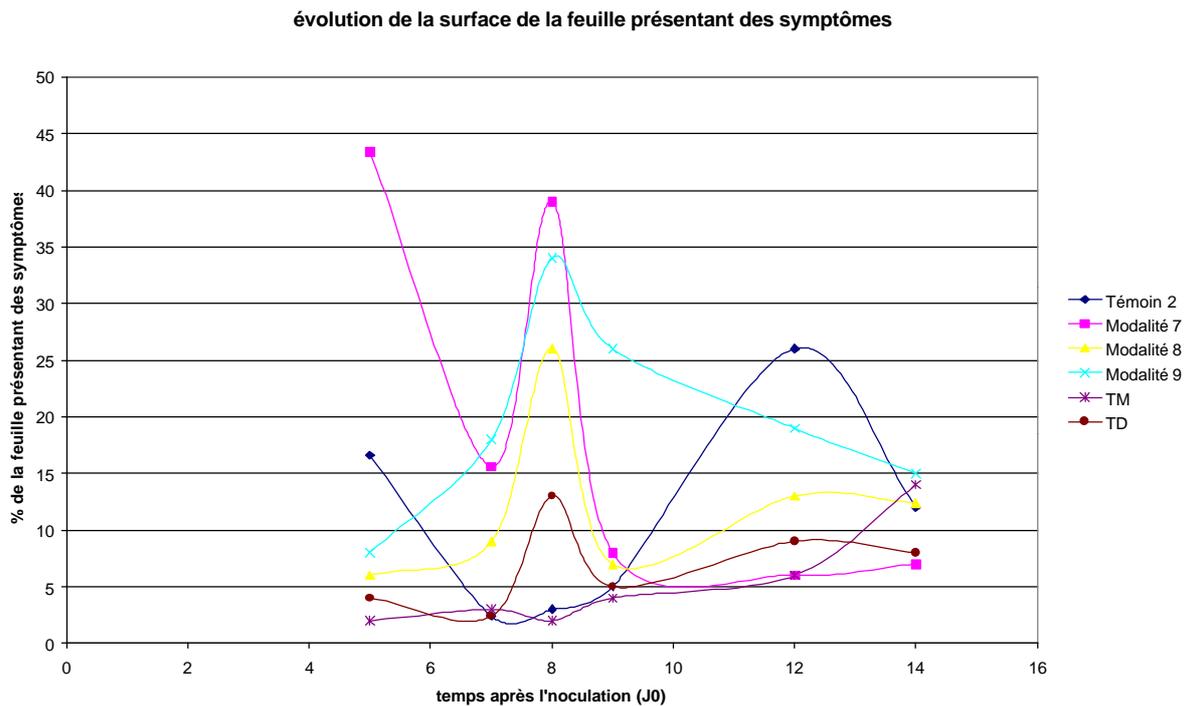


figure 6 : évolution des premiers symptômes dans le cas élicitation 4 jours avant inoculation au cours de la seconde série d'expérience

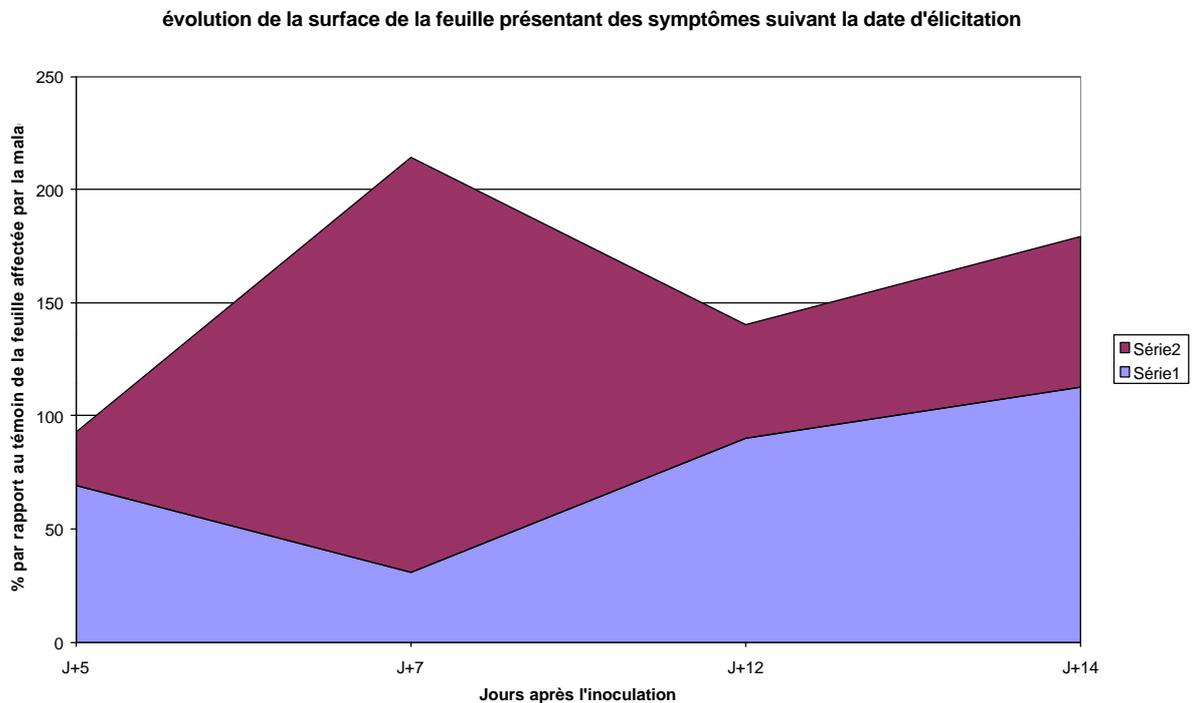


figure 7: effet de la date d'élicitation (2 jours avant, série 1, et 4 jours avant, série 2, inoculation pour la modalité tisane diluée sur la surface moyenne de feuille atteinte des premiers symptômes

Dans ce cas présent, on observe encore une différence entre l'élicitation 2 jours avant et 4 jours avant l'inoculation. Une analyse statistique dans la partie suivante permettra de dire si ces différences observées sont significatives ou non.

5.3. Compléments à l'étude :

D'après les premiers résultats, corrélés à ceux trouvés par M. Deloire et son équipe, on fait une seconde expérience sur boutures avec suivi sous ombrière en élicitant deux jours avant l'inoculation à 3 doses (1 nmol/l, 0,1 µmol/l et 1 mmol/l) qui semblent intéressantes, toujours d'après les résultats déjà obtenus en boîte de pétri. Cependant, nous n'avons aucun résultat pour cette essai car les températures trop élevées même sous ombrière ont empêché le développement de la maladie et donc nous n'avons pas de résultat pour cette suite d'expérience.

6. interprétation

6.1. Pour la première expérience

- d'après les graphes, le cas de l'élicitation 2 jours avant l'inoculation semble nettement mieux appropriée que 4 jours avant. Les différentes concentrations ne semblent pas donner de résultats nettement différent de ceux obtenus dans le cas témoin.
- Une analyse de variance de l'ensemble des résultats a été effectuée avec le logiciel STATITCF.

On compare les résultats dans chaque cas en posant comme variables la dose d'acide salicylique, la date d'élicitation et le nombre de blocs (5 répétitions), on réalise le test de Newman-Keuls (à 5% d'erreur) pour savoir si les différences observées entre les modalités sont significatives ou non. Pour le test, on fait varier soit **la date d'observation** (J+7, J+12 et J+ 14) soit **le critère que l'on observe** (symptômes de la maladie, ou seulement les fructifications).

Après avoir défini ces paramètres, on entre l'ensemble des données, une analyse des résidus, c'est à dire des relevés aberrants, est automatiquement faite, la répartition des données doit préférentiellement suivre une répartition normale et centrée sur une valeur moyenne. Une classe moyenne doit se dégager.

Le test sera ensuite réalisé et si on obtient une probabilité inférieure à 0,05 le résultat sera démontré comme significatif. On pourra dire qu'il y a une différence entre les valeurs comparées.

Variable : date d'observation

A J+7, aucun résultat significatif n'apparaît ; ce qui se voyait déjà dans les graphes.

A J+14, ce sont les traitements acide salicylique aux doses 4 et 6 qui ressortent, associés aussi à un mildiou plus présent, ce qui semble difficile à expliquer. L'ensemble de cette analyse est faite pour le critère 'surface de feuille où l'on voit des fructifications'

Par contre **à J+14**, il ressort nettement **que l'élicitation 2 jours avant l'inoculation est associée à des dégâts moins important du champignon**. La réaction de la plante serait donc assez rapide dans le cas de l'élicitation par l'acide salicylique puisque au bout de seulement 4 jours on observe déjà plus de tâches.

6.2. Pour la seconde expérience

Variable : date d'observation (la donnée utilisée est la surface de feuille présentant des symptômes)

A J+7 , on ne peut rien déduire de significatif, par contre à J+12 et J+14, il est possible de dire que éliciter **2 jours avant est plus efficace que d'éliciter 4 jours avant**. La concentration c9 (7 mmol/l) est corrélée à une intensité de premiers symptômes moins importante.

Symptômes observés à J+12

Pour la proportion de feuille présentant des fructifications, on ne déduit rien de significatif

Par contre, pour ce qui est des premiers symptômes visuels, **l'élicitation 2 jours avant ressort défavorable à l'expansion mycélienne**.

7. bilan :

Dans quasiment tous les cas, un résultat semble apparaître : éliciter 2 jours avant l'inoculation est plus efficace que de le faire 4 jours avant. Par contre, il semble difficile de dégager une concentration d'éliciteur qui soit nettement efficace car il y a très peu de résultats significatifs et quand il y en a, c'est à une date bien précise pour un critère d'observation donnée.

Si l'on considère l'apparition des premiers symptômes, la concentration de 7 mmol/l (modalité 9) paraît produire un effet, en début d'observation (J+7), il y aurait donc un retard dans l'apparition des symptômes, seulement à des dates d'observation ultérieures, il n'est plus possible de faire une différence entre cette dose et les autres concentrations.

Pour comparer nos résultats avec les connaissances déjà acquises sur ce sujet, nous ne disposons pas de résultats assez précis sur **les différentes modalités appliquées**.

Pour la facteur **date d'élicitation**, il faut noter que les composés synthétisés lors d'un stress abiotique (comme les UV) ou biotique (comme l'acide salicylique) s'échelonnent dans le temps. Par exemple, le resvératrol est d'abord synthétisé, les radicaux libres sont présents plus tardivement. C'est pourquoi il serait important de savoir précisément quand placer l'élicitation, afin d'avoir le maximum de composés de défense mais avant qu'ils ne soient dégradés.

8. perspectives

Des expériences en conditions contrôlées mais non *in vitro* seraient beaucoup plus proches des conditions réelles. Travailler comme nous l'avons fait est délicat car dès l'inoculation, la feuille est séparée de la plante, or les réactions d'élicitation se font à l'échelle de la plante entière, il semble donc très difficile d'observer quelque chose de cette façon.

Une autre date aurait pu être testée pour positionner encore mieux la date d'élicitation, **3 jours** avant inoculation aurait été un cas intéressant à étudier.

Seulement, pratiquement il se pose un problème : si au bout de 4 jours la réaction de la plante causée par l'élicitation est presque totalement amenuisée, il faudrait ajuster les élicitations très précisément, c'est à dire toujours prévoir 2 jours à l'avance s'il y a un risque potentiel., ce qui demanderait un suivi très régulier et contraignant au viticulteur.

Pour ce qui est de la tisane de saule, on ne dégage pas un résultat significatif, cependant en biodynamie, sont déjà appliqués des tisanes mélangée d'achillée millefeuilles et d'orties, dans le but de réguler les maladies cryptogamiques. Dans le but d'opposer une résistance à la pénétration des champignons, la tisane de pissenlit est également utilisée.