

## Etude de la toxicité du filtrat de culture de *Botrytis cinerea* sur des vitroplants de vignes: I. Effet du filtrat brut

par

D. VANNEL, M. BARBIER et R. BESSIS

Laboratoire des Sciences de la Vigne, Université de Bourgogne, Dijon, France

### Study of culture filtrate toxicity of *Botrytis cinerea* observed on grapevine vitroplants: I. Effect of crude culture filtrate

**S u m m a r y :** The purpose of this research was: 1) to show culture filtrate toxicity of *Botrytis cinerea*, 2) to determine an eventual relation between susceptibility of grapevines to *B. cinerea* in the field and susceptibility of *in vitro* plantlets to fungal culture filtrate. In this way, effects of culture filtrate on the growth of vitroplants were examined to evaluate on the one hand, susceptibility of *Vitis* and, on the other, degree of culture filtrate toxicity. Growth inhibition increased with grapevine sensitivity and no phytotoxic effects were observed on resistant grapevines. So a discrimination between resistant, susceptible and very susceptible grapevines was achieved. A comparative study has also shown that factors like fungal culture age or isolate nature were able to affect toxicity. 1-week-old culture filtrate was able to induce symptoms on vitroplants and toxicity increased with fungal culture age. Moreover, this was not due to enzyme activity.

**Key words :** *Botrytis*, *Vitis*, variety of vine, tissue culture, fungal culture filtrate, toxicity, growth, resistance, test, method.

#### Introduction

La mise au point de méthodes de lutte, efficaces et durables, contre la pourriture grise est rendue difficile par les caractères biologiques de *Botrytis cinerea*. Aussi, la sélection de plantes résistantes ou à sensibilité réduite à l'égard de ce champignon devient un objectif intéressant.

Les méthodes classiques d'amélioration génétique de la vigne ne peuvent être retenues pour les cépages de cuve, du fait de la contrainte de typicité variétale imposée dans les vignobles de tradition. Par contre, l'utilisation de la variation somaclonale induite par la culture *in vitro* apparaît comme une voie prometteuse (BOUQUET 1989).

La sélection de phénotypes résistants peut se faire de deux manières: soit en sélectionnant les plantes régénérées, soit en exerçant une pression de sélection dans le milieu de régénération par addition de filtrat de culture plus ou moins purifié de l'agent pathogène. Cependant, une telle approche ne peut être envisagée qu'à deux conditions: (1) la résistance doit s'exprimer *in vitro* et (2) l'organisme pathogène doit sécréter des molécules phytotoxiques jouant un rôle primordial dans la pathogenèse (DAUB 1986). Il est donc nécessaire de mettre au point des biotests *in vitro* permettant non seulement d'évaluer la sensibilité de la vigne, mais également d'étudier les composés phytotoxiques sécrétés par *B. cinerea*. Récemment, plusieurs tests mettant en oeuvre des techniques de culture *in vitro* ont ainsi été réalisés pour apprécier la sensibilité de la vigne à divers organismes tels *Eutypa lata* (MAURO 1986; MAURO *et al.* 1988; TEY-RULH 1988), *Plasmopara viticola* (BARLASS *et al.* 1986, 1987) et également *B. cinerea* (HOOS et BLAICH 1988).

Le but de ce travail est donc d'étudier le comportement des vitroplants de différentes vignes à l'égard du filtrat de culture de *B. cinerea* afin de déterminer s'il existe une relation entre ce comportement et celui des vignes cultivées dans le vignoble à l'égard de *B. cinerea*.

### Matériel et méthodes

#### Plantes hôtes

Les plantes hôtes retenues pour ce test sont classées en fonction de leur comportement dans le vignoble à l'égard de *B. cinerea* (GALET 1977):

- résistantes: *Vitis riparia* cv. Gloire de Montpellier,
- moyennement sensibles: *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon clone 1565,
- très sensibles: *V. vinifera* cv.: Chardonnay clone 95, Chardonnay clone 96, Pinot clone 113.

Les vitroplants sont multipliés par microbouturage en tubes sur 20 ml de milieu GALZY (1969) légèrement modifié (BARBIER 1988) et cultivés sous conditions contrôlées: 25 °C, 16 h de jour, environ 50  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (tubes fluorescents GroLux Sylvia FT 30 «Lumière du jour»). Seule la partie intermédiaire des vitroplants est utilisée pour fournir des boutures à un bourgeon afin de limiter l'hétérogénéité observée lors de leur croissance.

#### Organisme pathogène

Les différents isolats de *B. cinerea* (N, P18A, P61A, RFA2) ont été fournis par M. LEROUX (INRA, Versailles). Le champignon est cultivé dans des fioles d'Erlenmeyer de 2 l contenant 800 ml de milieu liquide de même composition que le milieu utilisé pour la micropropagation de la vigne avec 30 g/l de saccharose. L'inoculum correspond à 10 ml d'une suspension de conidies à  $2 \cdot 10^6$  conidies/ml, préparée à partir d'une culture âgée d'une semaine. La culture se fait sans agitation, à l'obscurité et à température ambiante.

#### Préparation du filtrat

Après 1, 2, 3 ou 4 semaines de culture, le mycélium est éliminé par filtration sur filtre sans cendre DURIEUX n° 113. Le filtrat est ensuite éventuellement lyophilisé ou concentré par évaporation sous vide à 40 °C. Les filtrats dialysés sont préparés à l'aide d'une membrane dont la porosité est de 2,4 nm, ce qui permet le passage des molécules de poids moléculaire inférieur à  $10^4$ .

#### Bioessai

Il consiste à introduire le filtrat des cultures de *B. cinerea* dans le milieu de culture des vitroplants et à évaluer sa toxicité par son action inhibitrice sur la croissance des boutures.

Les filtrats sont introduits dans le milieu de micropropagation de la vigne, de telle sorte que la concentration finale en éléments toxiques soit identique à celle présente dans le milieu de culture fongique. La quantité de saccharose ajoutée dans le milieu de culture des vitroplants varie en fonction de la quantité de sucres (saccharose, fructose et glucose) qui reste dans le milieu de culture fongique, la quantité totale devant être égale à 30 g/l. Les filtrats sont introduits soit avant l'autoclavage du milieu (20 min, 120 °C), soit après et, dans ce cas, ils sont stérilisés par filtration sur membrane cellulosique de porosité 0.22  $\mu\text{m}$  (Stérivex Millipore). Le pH des différents milieux est ajusté à 6,4.

Un milieu témoin est réalisé avec du filtrat de culture provenant d'un milieu non ensemencé. Sa concentration en sels minéraux est par conséquent deux fois supérieure à celle du milieu habituel de microbouturage.

Les boutures obtenues à partir des vitroplants sont repiquées sur les différents milieux testés. Après 2 mois de culture, la taille des vitroplants est mesurée. Les essais sont réalisés en tubes (6—12 tubes) ou en bocaux contenant 12 boutures (2 bocaux). Chaque expérience est effectuée au moins deux fois. Sur les graphiques illustrant les résultats, la moyenne des différentes mesures est indiquée avec son intervalle de confiance à 5 % (IC sur les graphiques).

### Résultats

#### Effets des filtrats de cultures de différents isolats sur les vitroplants

Les filtrats provenant de cultures âgées de 4 semaines des différents isolats (N, P18A, P61A et RFA2) ont un effet toxique sur les vitroplants de Chardonnay (Fig. 1 et 2). Après 2 mois de culture, les plantes sont peu développées et les feuilles jaunissent puis se nécrosent rapidement, alors que la croissance des vitroplants de *V. riparia* n'est pas significativement différente de celle du témoin. Cette toxicité diffère entre les isolats: les filtrats des isolats N et P18A sont plus toxiques que ceux des isolats RFA2 et P61A.

#### Influence de l'âge des cultures de *B. cinerea* (isolat N) sur la toxicité des filtrats

La toxicité des filtrats sur les vitroplants des *V. vinifera* (Cabernet Sauvignon, Pinot et Chardonnay clones 95 et 96) augmente avec l'âge de la culture fongique (Fig. 3). En présence de filtrat de culture âgée de 4 semaines les vitroplants des *V. vinifera* sont peu développés, alors que la taille des vitroplants de *V. riparia* n'est pas significativement différente de celle du témoin.

#### Influence de la concentration du filtrat

La toxicité des filtrats sur les vitroplants de *V. vinifera* augmente en fonction de la concentration du filtrat (Fig. 4 et 5). La croissance des vitroplants en présence des filtrats dilués de moitié n'est cependant pas toujours significativement différente de celle

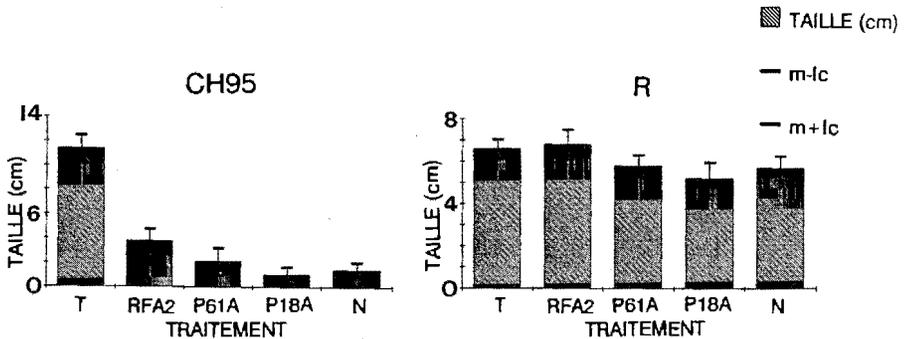


Fig. 1: Taille (en cm) des vitroplants de *V. riparia* (R) et de Chardonnay clone 95 (CH95) après 2 mois de culture sur le milieu témoin (T) ou en présence des filtrats de cultures des différents isolats N, P18A, P61A et RFA2.

Vitroplants height (in cm) of *V. riparia* (R) and Chardonnay clone 95 (CH95) after 2 months of culture on control medium (T) or on media containing culture filtrates of various isolates N, P18A, P61A and RFA2.

du témoin. Le filtrat non dilué est toxique pour les quatre *V. vinifera*. Néanmoins, les vitroplants de Cabernet Sauvignon sont significativement moins sensibles que ceux de Pinot et Chardonnay. Seul le filtrat concentré deux fois est toxique pour les vitroplants de *V. riparia*.

Par ailleurs, la présence de sels minéraux concentrés deux fois et de saccharose à 30 g/l dans le milieu de culture des vitroplants ne perturbe ni leur croissance, ni leur développement.

### Toxicité des filtrats après divers traitements

#### 1. après dialyse

Les filtrats dialysés ont une activité toxique sur les vitroplants de *V. vinifera* plus

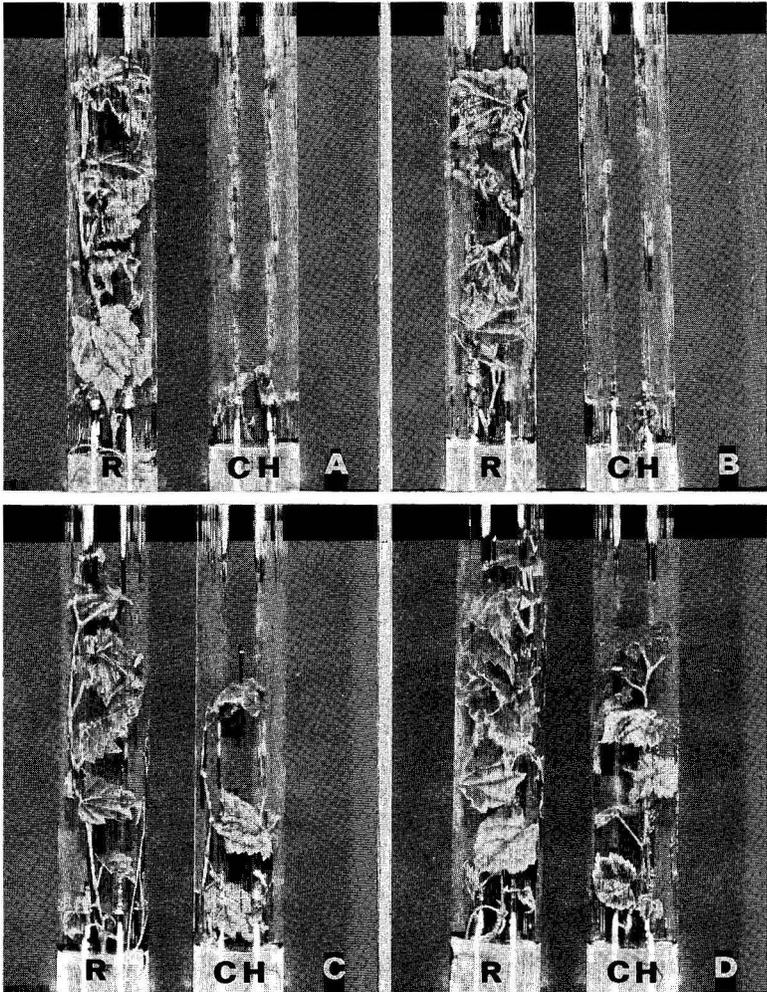


Fig. 2: Vitroplants de *V. riparia* (R) et de Chardonnay clone 95 (CH) après 2 mois de culture en présence des filtrats de cultures de différents isolats N (A), P18A (B), P61A (C) et RFA2 (D).

Vitroplants of *V. riparia* (R) and Chardonnay clone 95 (CH) after 2 months of culture on media containing culture filtrates of various isolates N (A), P18A (B), P61A (C) and RFA2 (D).

faible que les filtrats bruts correspondants (Fig. 3). Cette différence est, dans la plupart des cas, significative au risque de 5 %.

## 2. après autoclavage

Aucune différence significative n'est observée entre les filtrats autoclavés et non autoclavés (Fig. 5).

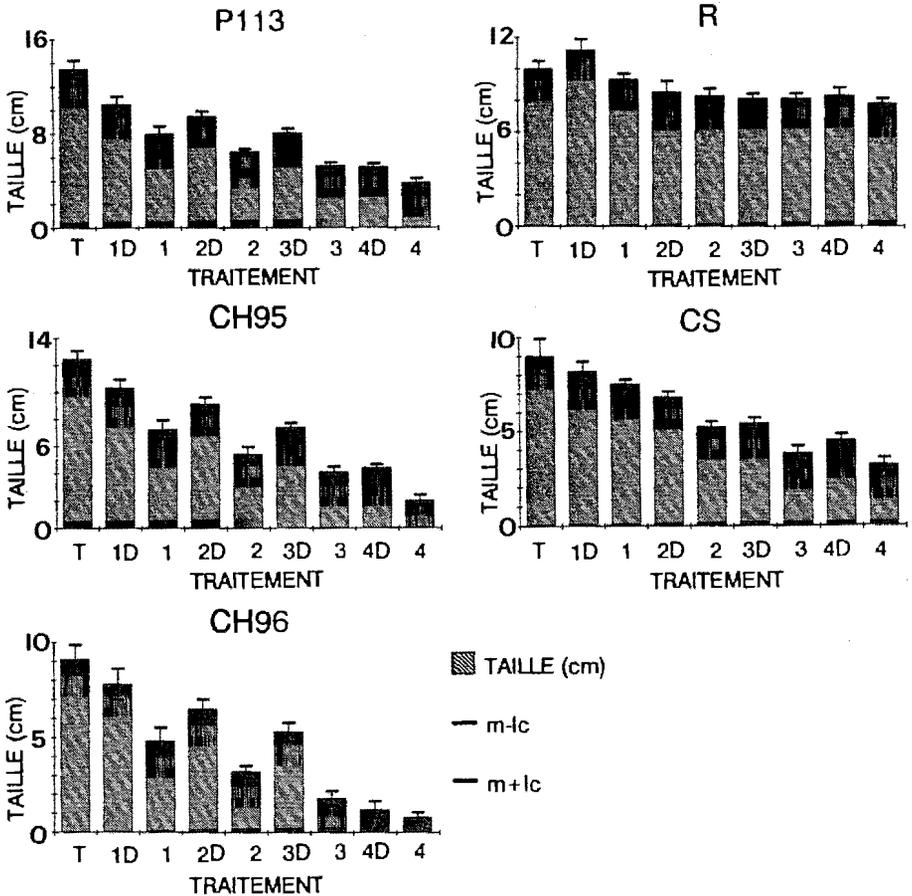


Fig. 3: Taille (en cm) des vitropants de *V. riparia* (R), Cabernet Sauvignon (CS), Pinot (P) et de Chardonnay clone 95 (CH95) et clone 96 (CH96) après 2 mois de culture sur le milieu témoin (T) ou en présence des filtrats bruts (1, 2, 3 et 4) ou dialysés (1D, 2D, 3D et 4D) provenant de cultures de l'isolat N âgées de 1, 2, 3 ou 4 semaines.

Vitropants height (in cm) of *V. riparia* (R), Cabernet Sauvignon (CS), Pinot (P) and Chardonnay clone 95 (CH95) and clone 96 (CH96) after 2 months of culture on control medium (T) or on media containing crude filtrates (1, 2, 3 and 4) or dialysed filtrate (1D, 2D, 3D and 4D) obtained with 1, 2, 3 or 4 weeks old isolate N cultures.

## Discussion et conclusion

Les filtrats de cultures de *B. cinerea* n'ont aucun effet mesurable sur les vitropants de *V. riparia*, mais sont toxiques pour ceux de *V. vinifera*. Cette toxicité se traduit par une réduction de la croissance des microboutures, qui est d'ailleurs plus

importante dans le cas du Pinot et du Chardonnay que dans celui du Cabernet Sauvignon.

Cet effet toxique ne peut être attribué à un excès en sels minéraux provoqué par l'addition du filtrat contenant, non seulement de nombreux composés sécrétés ou liés

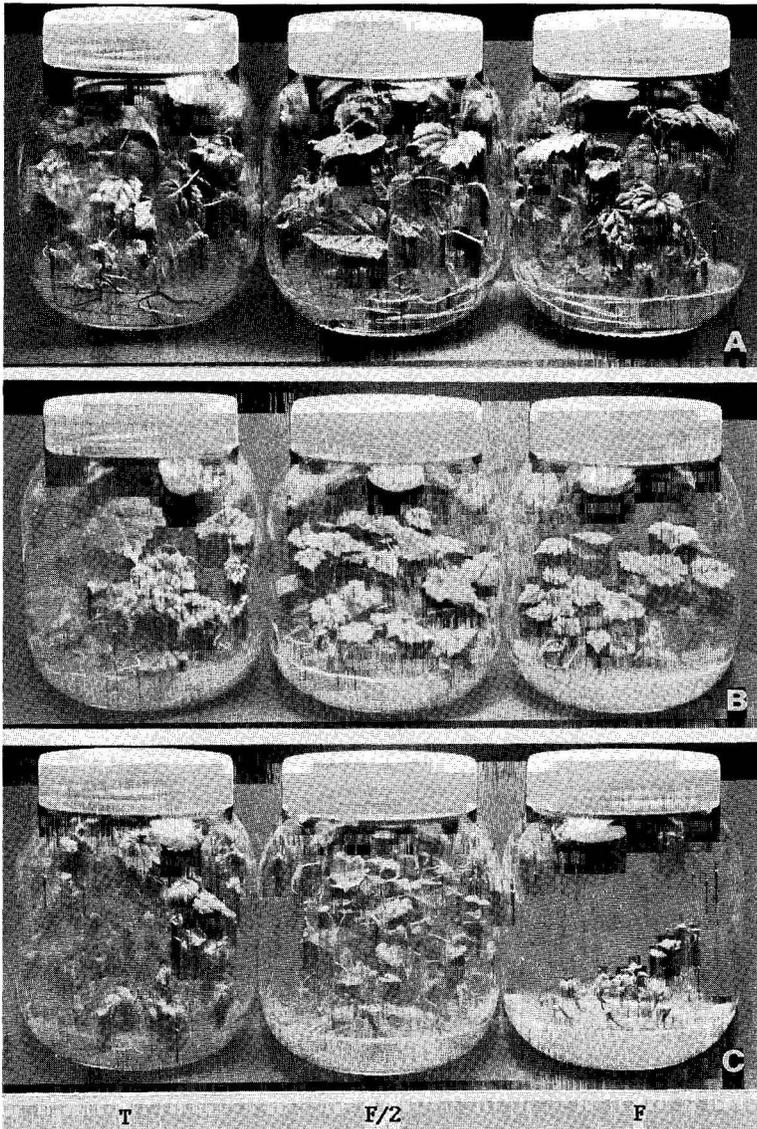


Fig. 4: Vitroplants de *V. riparia* (A), Cabernet Sauvignon (B) et de Chardonnay clone 95 (C) après 2 mois de culture sur le milieu témoin (T) ou en présence des filtrats dilués deux fois (F/2) ou non dilués (F) (filtrats bruts non autoclavés préparés à partir d'une culture âgée de 4 semaines de l'isolat N).

Vitroplants of *V. riparia* (A), Cabernet Sauvignon (B) and Chardonnay clone 95 (C) after 2 months of culture on control medium (T) or on media containing filtrates diluted two times (F/2) or not diluted (F) (crude filtrates not autoclaved obtained with 4 weeks old isolate N culture).

au métabolisme fongique, mais également des résidus d'éléments du milieu de culture. En effet, le milieu témoin réalisé avec du filtrat de culture non ensemencé ne montre aucune toxicité vis-à-vis des vitroplants, malgré une concentration en sels minéraux deux fois supérieure à celle du milieu de microbouturage.

Les composés responsables de cette activité toxique sont produits très tôt par le champignon cultivé en milieu liquide. En effet, après une semaine de culture fongique, les filtrats sont déjà toxiques pour les vitroplants de Pinot et de Chardonnay. Avec un filtrat de culture âgée de 4 semaines, la croissance des boutures est très faible.

Les filtrats provenant des cultures des différents isolats n'ont pas la même toxicité. Celle-ci augmentant avec l'âge de la culture, la différence de toxicité des filtrats des différents isolats pourrait être liée à une différence de vitesse de croissance. Or, l'évolu-

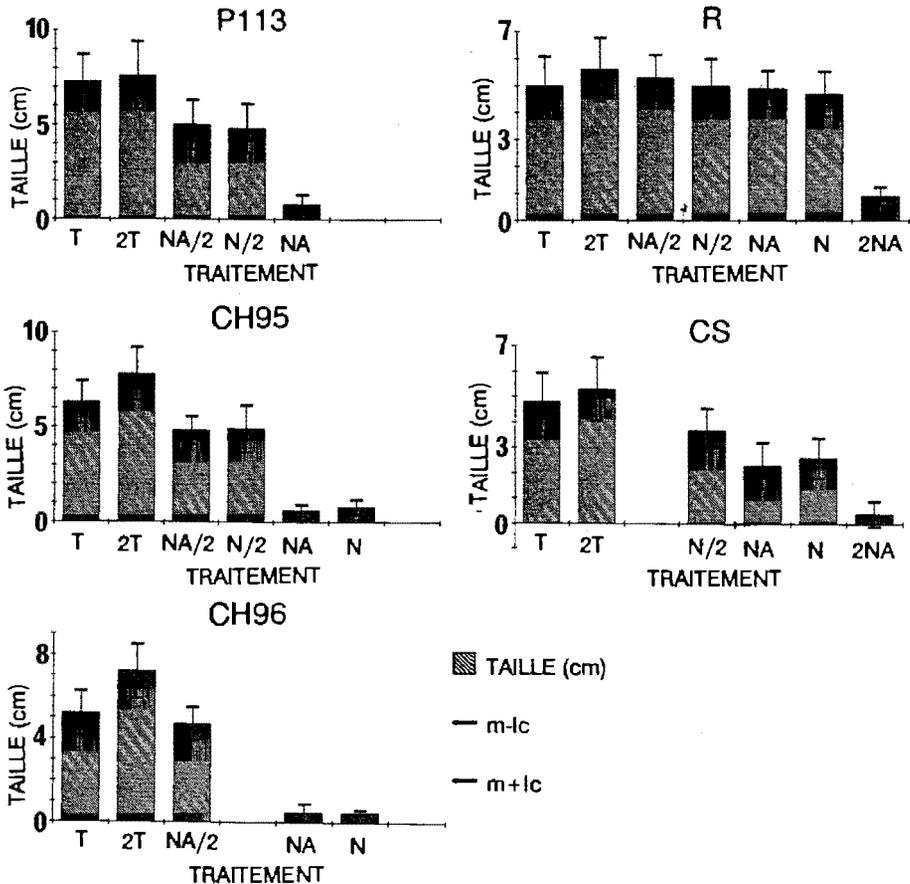


Fig. 5: Taille (en cm) des vitroplants de *V. riparia* (R), Cabernet Sauvignon (CS), Pinot (P) et de Chardonnay clone 95 (CH95) et clone 96 (CH96) après 2 mois de culture sur le milieu témoin (T), concentré deux fois (2T) ou en présence des filtrats, autoclavés (NA/2, NA et 2NA) ou filtrés stérilement (N/2, N). Les filtrats sont dilués deux fois (NA/2 et N/2), non dilués (NA et N) et concentrés deux fois (2NA) (filtrats préparés à partir d'une culture âgée de 4 semaines de l'isolat N).

Vitroplants height (in cm) of *V. riparia* (R), Cabernet Sauvignon (CS), Pinot (P) and Chardonnay clone 95 (CH95) and clone 96 (CH96) after 2 months of culture on control medium (T), concentrated two times (2T) or on media containing autoclaved (NA/2, NA and 2NA) or filter-sterilized filtrates (N/2, N). Filtrates are diluted two times (NA/2 and N/2), not diluted (NA and N) and concentrated two times (2NA) (filtrates are obtained with 4 weeks old isolate N culture).

tion de la biomasse au cours du temps n'est pas différente entre les quatre isolats (VANNEL 1990). Par ailleurs, une corrélation entre la toxicité des filtrats et l'agressivité des isolats n'a pu être établie *in vitro* en raison des difficultés posées par l'utilisation directe du champignon sur des vitroplants (VANNEL 1990). D'après les travaux de PHILLIPS *et al.* (1987), l'agressivité des isolats est fonction du nombre de noyaux par conidie mais ce nombre peut, pour un même isolat, varier en fonction du milieu. Par conséquent, il est très difficile d'établir un classement des isolats en fonction de leur agressivité.

Il faut également noter que la dialyse provoque une perte significative de l'activité toxique, alors que la chaleur ne modifie pas cette toxicité (autoclavage à 120 °C pendant 20 min). La toxicité ne peut donc résulter d'une activité enzymatique. Elle semblerait liée à la présence de différentes molécules thermostables dont certaines auraient un poids moléculaire inférieur à 10<sup>4</sup>. *B. cinerea* est connu pour sécréter *in vitro* de nombreuses molécules phytotoxiques et, en particulier, des enzymes pectinolytiques et des polysaccharides (DUBOURDIEU 1982; KAMOEN *et al.* 1978; KAMOEN 1984). Ces composés ont été également mis en évidence dans les tissus végétaux infectés par *B. cinerea* (DUBOURDIEU et KAMOEN 1978). Aussi, une étude plus poussée est en cours pour déterminer la nature des molécules responsables de la toxicité du filtrat sur les vitroplants. Leur rôle dans la pathogenèse devra être défini avant de pouvoir envisager l'utilisation du filtrat plus ou moins purifié dans un programme de sélection.

### Résumé

Le but de ce travail est de: 1) mettre en évidence la toxicité du filtrat de culture de *Botrytis cinerea*, et 2) déterminer s'il existe une relation entre la sensibilité de la vigne à *B. cinerea*, observée dans le vignoble, et la sensibilité des vitroplants au filtrat de culture fongique. Aussi, les effets du filtrat de culture sur la croissance des vitroplants ont été étudiés pour évaluer d'une part, la sensibilité de différents *Vitis* et, d'autre part, le niveau de toxicité du filtrat. L'inhibition de la croissance augmente avec la sensibilité de la vigne et aucun effet phytotoxique n'est observé sur les vitroplants résistants. Une discrimination entre les vignes résistantes, sensibles et très sensibles a ainsi pu être obtenue. Une étude comparative a permis de mettre en évidence l'influence de l'isolat et de l'âge de la culture sur la toxicité. Le filtrat provenant d'une culture âgée d'une semaine est capable d'induire des symptômes et sa toxicité augmente avec l'âge de la culture fongique. Par ailleurs, cette toxicité ne peut être attribuée à une activité enzymatique.

### Références

- BARBIER, M.; BESSIS, R.; 1988: Effets de différents facteurs contribuant à l'amélioration de l'isolement de protoplastes à partir de feuilles de vigne (*Vitis vinifera* L.). Bull. Soc. Bot. France **135**, 251—261.
- BARLASS, M.; MILLER, R. M.; ANTCLIFF, A. J.; 1986: Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. I. Dual culture *in vitro*. Amer. J. Enol. Viticult. **37**, 61—66.
- — —; DOUGLAS, J.; 1987: Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. II. Resveratrol production. Amer. J. Enol. Viticult. **38**, 65—68.
- BOUQUET, A.; 1989: Intérêt des techniques de culture *in vitro* pour l'amélioration génétique de la vigne. Bull. O.I.V. **62**, 179—192.
- DAUB, M. E.; 1986: Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. **24**, 159—186.

- DUBOURDIEU, D.; 1982: Recherche sur les polysaccharides sécrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. Thèse Doctorat d'Etat, Bordeaux II.
- — ; KAMOEN, O.; 1978: Phytotoxic polysaccharides from *Botrytis cinerea* in infected grapes. 3rd Intern. Congr. Plant Pathol., München, 16—23 August; 241.
- GALET, P.; 1977: Les Maladies et les Parasites de la Vigne. Tome I. Les Maladies dues à des Végétaux. Pourriture grise, 313—360. Imprimerie du Paysan du Midi, Montpellier.
- GALZY, R.; 1969: Remarques sur la croissance de *Vitis rupestris* cultivée *in vitro* sur différents milieux nutritifs. *Vitis* 8, 191—205.
- HOOS, G.; BLAICH, R.; 1988: Metabolism of stilbene phytoalexins in grapevines: Oxidation of resveratrol in single-cell cultures. *Vitis* 27, 1—12.
- KAMOEN, O.; 1984: Secretions from *Botrytis cinerea* as elicitors of necrosis and defence. *Rev. Cytol. Biol. Vég. Bot.* 7, 241—248.
- — ; JAMART, G.; MOERMANS, R.; VANDEPUTTE, L.; DUBOURDIEU, D.; 1978: Comparative study of phytotoxic secretions of *Botrytis cinerea* PERS.. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.* 43, 847—857.
- MAURO, M. C.; 1986: Embryogenèse somatique chez *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Application à la sélection de clones résistants à *Eutypa lata* (PERS.: FR.) TUL. Thèse Doctorat, INP Toulouse.
- — ; VAILLANT, V.; TEY-RULH, P.; MATHIEU, Y.; FALLOT, J.; 1988: *In vitro* study of the relationship between *Vitis vinifera* and *Eutypa lata* (PERS.: FR.) TUL. I. Demonstration of toxic compounds secreted by the fungus. *Amer. J. Enol. Viticult.* 39, 200—204.
- PHILLIPS, D. J.; MARGOSAN, D. A.; MACKAY, B. E.; 1987: Size, nuclear number aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations. *Phytopathology* 77, 1606—1608.
- TEY-RULH, P.; 1988: Métabolites toxiques sécrétés *in vitro* par *Eutypa lata* (PERS.: FR.) TUL., parasite de la vigne. Isolement, identification et activité biologique. Thèse Doctorat, INP Toulouse.
- VANNEL, D.; 1990: Etude *in vitro* de la relation vigne-*Botrytis cinerea*: mise au point de biotests. Thèse Doctorat, Univ. de Bourgogne.

Reçu le 11 Mars 1991

Correspondance à:

D. VANNEL ou M. BARBIER  
Laboratoire des Sciences de la Vigne  
Faculté des Sciences Mirande  
Université de Bourgogne  
B.P. 138  
F-21004 Dijon Cedex  
France