

Traitement des bois à l'eau chaude contre la flavescence dorée: effet sur l'anatomie et l'intégrité des tissus conducteurs

Etudes préliminaires

Eric REMOLIF¹, Vivian ZUFFEREY², Pierre-Henri DUBUIS¹, Francine VOINESCO¹, Olivier FENDELEUR³ et Katia GINDRO¹
¹Agroscope, 1260 Nyon, Suisse – ²Agroscope, 1009 Pully, Suisse – ³Pépinière Guillaume, 70700 Charcenne, France
 Renseignements: Katia Gindro, e-mail: katia.gindro@agroscope.admin.ch, tél. +41 58 460 43 53, www.agroscope.ch



Débourrement d'un plan greffé.

Introduction

La flavescence dorée, causée par un phytoplasme (une bactérie, membre des elm yellows) et propagée rapidement par son vecteur, une cicadelle (*Scaphoideus titanus*), a provoqué des épidémies en Europe depuis les années cinquante. Cette jaunisse de la vigne affecte la vigueur des plantes (réduction de la dimension des bois, enroulement et chlorose foliaire) et la qualité du raisin par une mortalité des inflorescences ou un flétrissement des baies. A terme, le phytoplasme provoque la

mort du cep. La prévention de la flavescence dorée s'avère difficile car les plantes infectées peuvent rester asymptomatiques durant des années. De ce fait, la sélection de matériel végétal sain pour la multiplication comporte certains risques: si des greffons ou des porte-greffe sont prélevés sur des souches malades, les plants produits peuvent être porteurs du phytoplasme. Des études ont permis de mettre au point une séquence de traitement des greffons, porte-greffe et plants greffés-soudés en immergeant les bois dans un bain d'eau chaude à 50°C durant 45 min, en respectant des stades

d'acclimatation de 24 h à 15 °C, avant et après traitement, et en préchauffant les bois à 30 °C durant 10 min avant traitement (Caudwell 1990; Boidron et Grenan 1992). Il a été démontré que le respect scrupuleux de ce protocole permet de dénaturer le phytoplasme et garantit la production d'un matériel sain pour la plantation et la multiplication (ENTAV et INRA 2006; Dupraz et Schaub 2007). La même procédure permet d'éliminer le phytoplasme du bois noir. Si ce traitement est très efficace contre ces deux phytoplasmes, en revanche il ne permet pas d'éliminer la communauté fongique associée aux jeunes plants de vigne, et notamment les champignons liés à l'esca, mais seulement de modifier cette communauté (Casieri *et al.* 2009).

De façon générale, la température et la durée de traitement efficaces contre le phytoplasme présentent des valeurs limites au-delà desquelles une mortalité des plants greffés est constatée. En respectant les températures indiquées (50 °C), des retards au débourrement pouvant atteindre deux à trois semaines ont toutefois été observés lorsque le matériel végétal est planté directement après le traitement, ce qui est le cas lors de commandes tardives au pépiniériste. Lorsque le matériel est remis au froid (4 °C) durant au moins cinq semaines, ces retards de débourrement deviennent négligeables. Le traitement à l'eau chaude risque d'être imposé à plus ou moins court terme dans certaines régions viticoles à titre préventif standard obligatoire. Cette exigence signifierait pour les pépiniéristes une augmentation de la quantité de matériel à traiter et des problèmes d'organisation liés à un nouveau stockage au froid d'au moins cinq semaines.

Le but du travail présenté est d'analyser les conséquences d'un traitement à l'eau chaude sur la structure anatomique des bourgeons et des tissus conducteurs et sur l'intégrité des vaisseaux du bois (taux d'embolie) dans le but d'identifier les causes possibles de la mortalité accrue et du retard de débourrement observé chez les plants traités à l'eau chaude.

Matériel et méthodes

Matériel végétal et conditionnement

Des boutures ligneuses à un œil de *Vitis vinifera* cv. Chasselas, Merlot et Cabernet Sauvignon ont été préparées en janvier 2014, puis stockées en chambre froide (4 °C). En avril, elles ont été acclimatées durant 24 h à 15 °C, préchauffées durant 10 min à 30 °C, puis traitées selon trois modalités à raison de 40 boutures par traitement: a) traitement à l'eau chaude durant 45 min à 50 °C, b) traitement à l'eau chaude durant 45 min à 60 °C, c) aucun traitement (contrôle). Les bois ont été

Résumé

Le traitement à l'eau chaude (TEC) est efficace contre les phytoplasmes responsables de la flavescence dorée et du bois noir de la vigne. Toutefois, la température et la durée du traitement présentent des valeurs limites au-delà desquelles les tissus du bois de la vigne peuvent subir des dommages. Ceux-ci se traduisent notamment par des retards au débourrement lorsque le matériel végétal est planté directement après TEC à 50 °C. Des analyses microscopiques des tissus conducteurs et des bourgeons de trois cépages (*Vitis vinifera* cv. Chasselas, Merlot et Cabernet Sauvignon) de même que des mesures de la conductivité hydraulique ont été réalisées après TEC à 50 °C. En parallèle, un essai de TEC à 60 °C, bien au-delà de la valeur limite supportée par la vigne, a été effectué afin de visualiser et d'évaluer les dommages infligés aux tissus du bois. Les résultats montrent que les bourgeons présentent des dégénérescences cellulaires localisées après TEC à 50 °C et des altérations totales à 60 °C. Le TEC à 50 °C n'induit pas d'altération des tissus conducteurs ni de perturbations significatives de la conductivité hydraulique, tandis que le TEC à 60 °C réduit la conductivité hydraulique en provoquant une embolie significative des conduits de la bouture. Les causes possibles du retard de débourrement observé chez les plants traités à l'eau chaude sont discutées.

utilisés soit directement après traitement, soit réacclimatés à 15 °C durant 24 h avant prélèvement. Afin d'estimer le temps de débourrement, une partie des bois a été mise en végétation dans du terreau de multiplication (terre de semis Brill n°3 Ricoter et perlite) en serre (20 °C), avec un bassinage quotidien.

Analyses microscopiques

Bourgeons

Dix bourgeons par traitement ont été prélevés directement après traitement à l'eau chaude et maintenus en chambre humide avant utilisation afin d'éviter tout dessèchement ou apparition d'artéfacts. Chaque bourgeon a été coupé en deux: une moitié a été observée à la loupe binoculaire et l'autre moitié fixée et traitée selon la méthode de Roland et Vian (1991). Ces échantillons ont été observés au microscope électronique à

transmission (MET) en coupes ultrafines (épaisseur $0,08\mu\text{m}$) et en coupes semi-fines (épaisseur $0,8\mu\text{m}$) au microscope optique.

Anatomie du bois et des tissus conducteurs

Les bois ont été découpés soit juste après traitement, soit après 24 h d'acclimatation à 15°C au moyen d'une scie, puis lissés à la lame de rasoir. Quatre sections de bois par bouture ont été observées à la loupe bino-culaire ou fixées et traitées selon la méthode décrite ci-dessus, puis observées après coloration au bleu de toluidine (solution aqueuse à 0,5 %) au micros-copie optique en coupes semi-fines (épaisseur $0,8\mu\text{m}$). Au total, plus de 30 sections ont été observées par traitement.

Mesure de la conductivité hydraulique des boutures

La conductivité hydraulique des boutures de *Vitis vini-fera* cv. Chasselas (K_{boutures}) a été mesurée au moyen d'un appareil XYL'EM (*Xylem Embolism meter*, Instrutec,

Montigny-lès-Cormeilles, France), selon la méthodolo-gie proposée par Cochard *et al.* (2000), les 7 et 9 avril. La conductivité hydraulique de douze boutures de Chasselas (segments de sarment de 12 à 15 cm de long-ueur et de $7,2\text{mm} (\pm 0,2)$ de diamètre, comprenant chacun deux nœuds) a été estimée par traitement (contrôle non traité, TEC à 50 et 60°C). Les boutures de sarment ont été attachées aux tubes de l'appareil XYL'EM et leur conductivité initiale (K_{initiale}) a été dé-terminée avec une pression hydrostatique de 3–4 kPa. Par la suite, les boutures ont été saturées en eau, en perfusant l'échantillon avec de l'eau déionisée et dé-gazée, sous pression à $0,15\text{MPa}$ durant 2–3 min. Cette perfusion permet d'expulser ou de dissoudre l'air d'un certain nombre de conduits ou de vaisseaux des boutu-res et d'estimer la conductivité hydraulique maximale (K_{maximale}). Le rapport entre la conductivité initiale et la conductivité à saturation (K_{maximale}) fournit une valeur quantitative du degré d'embolie. La conductivité hy-draulique des boutures a été estimée selon la formule

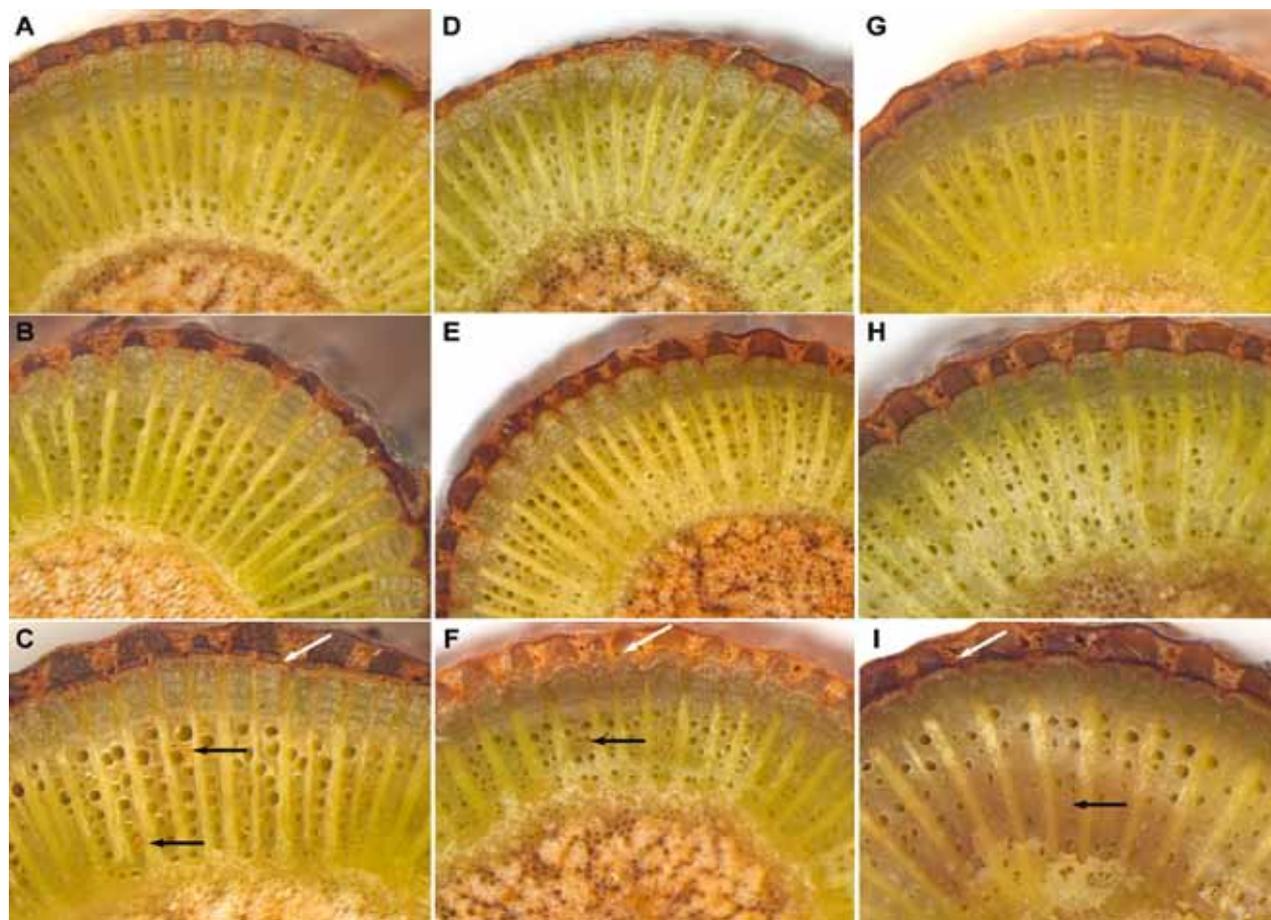


Figure 1 | Sections transversales de boutures ligneuses de *Vitis vinifera* cv. Chasselas, Merlot et Cabernet Sauvignon traitées à l'eau chaude (TEC) ou de contrôles non traités. A–C. Chasselas: A. Contrôle non traité. B. TEC 50°C . C. TEC 60°C . D–F. Merlot: D. Contrôle non traité. E. TEC 50°C . F. TEC 60°C . G–I. Cabernet Sauvignon: G. Contrôle non traité. H. TEC 50°C . I. TEC 60°C . Les flèches noires montrent les altérations des tissus conducteurs (brunissement) et les flèches blanches les espaces de déchirement entre l'écorce et le système vasculaire.

suivante: $K_{\text{bouture}} = K_{\text{initiale}} \times L$, K_{initiale} étant la conductivité hydraulique initiale, et L la longueur du segment de sarment (bouture).

Résultats et discussion

Anatomie et conductivité hydraulique des boutures

A 50 °C, quel que soit le cépage, les vaisseaux conducteurs ou les cellules de soutien ne montrent aucune perturbation du système vasculaire ni aucune altération (fig.1). Par contre, après TEC à 60 °C, un déchirement est observé sur tous les cépages entre l'écorce et le système vasculaire proprement dit. A cette température de traitement, le Cabernet Sauvignon présente un brunissement important des tissus de soutien et vasculaires. Chez le Chasselas, on observe des nécroses périphériques des vaisseaux du xylème. En microscopie optique, aucune particularité ni altération n'apparaît dans les tissus conducteurs des bois traités à 50 °C, tandis qu'à 60 °C, des tissus bruns signalent des zones d'al-

tération du contenu cellulaire, telles que des déstructurations importantes du contenu cellulaire (désorganisation des organelles).

Afin d'évaluer la capacité hydraulique du système vasculaire après TEC à 50 °C et à 60 °C, des mesures de conductivité ont été réalisées sur des boutures de Chasselas (tabl.1). Celles qui ont été soumises au TEC à 60 °C présentent une conductivité hydraulique initiale (débit du flux d'eau à travers les vaisseaux) et surtout maxi-

Tableau 1 | Conductivité hydraulique initiale et maximale (K_{initiale} , K_{maximale}) et taux d'embolie gazeuse des boutures de vigne de Chasselas (n = 12) après traitement à l'eau chaude (50 °C et 60 °C durant 45 min) ou sans traitement (témoin)

Variante	K_{initiale} (mmol.m/s/MPa)	K_{maximale} (mmol.m/s/MPa)	Embolie (%)
Témoin	2,27 A	4,65 A	52,8 A
TEC 50 °C	2,05 A	2,83 AB	54,8 A
TEC 60 °C	1,25 A	1,50 B	74,9 B

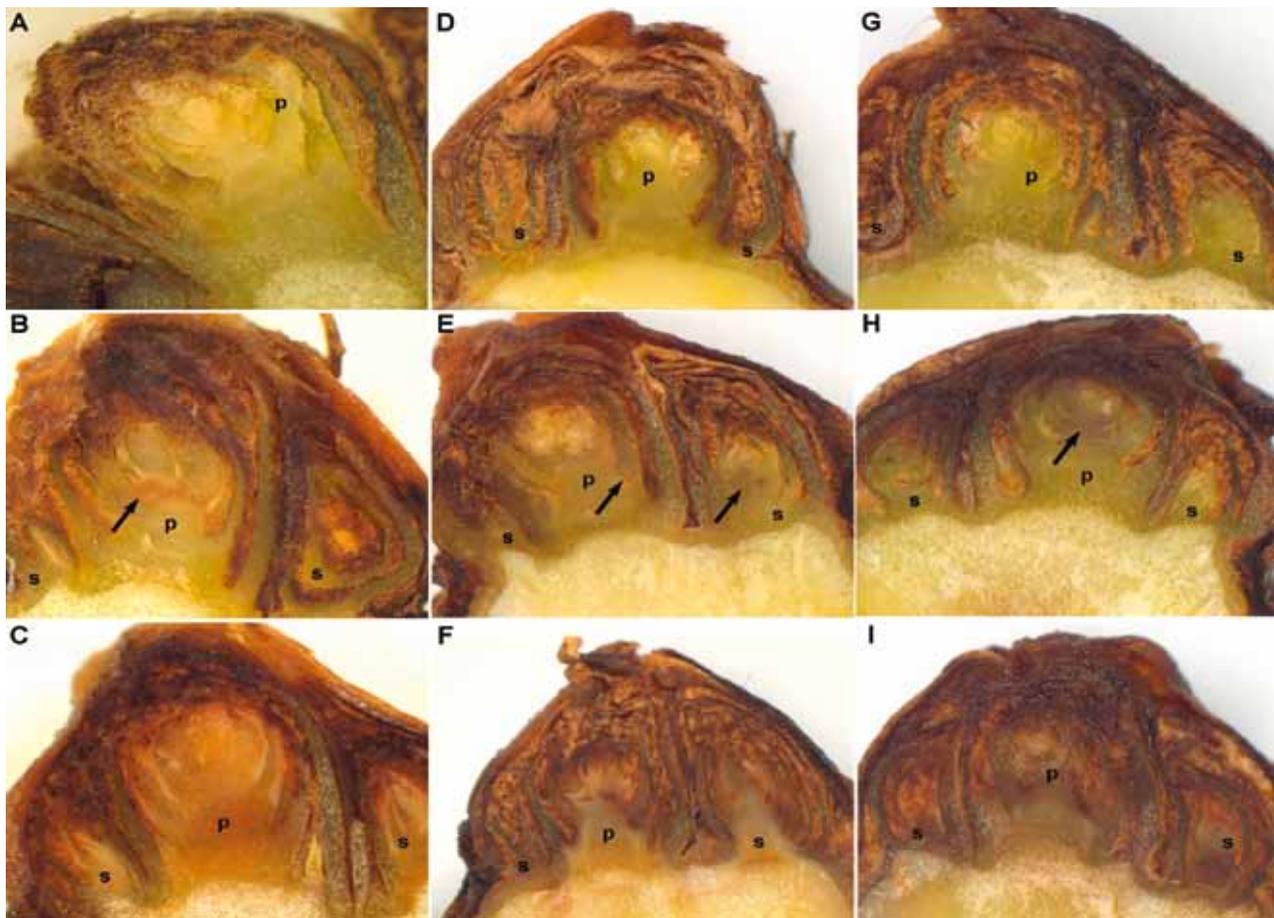


Figure 2 | Aspect des bourgeons de *Vitis vinifera* cv. Chasselas, Merlot et Cabernet Sauvignon issus de boutures ligneuses traitées à l'eau chaude (TEC) ou de contrôles non traités. A–C. Chasselas: A. Contrôle non traité. B. TEC 50 °C. C. TEC 60 °C. D–F. Merlot: D. Contrôle non traité. E. TEC 50 °C. F. TEC 60 °C. G–I. Cabernet Sauvignon: G. Contrôle non traité. H. TEC 50 °C. I. TEC 60 °C. Les flèches montrent les altérations des tissus (brunissement). p: bourgeons primaires, s: bourgeons secondaires.

male (après dégazage des vaisseaux) inférieure à celle des boutures témoins, non traitées à l'eau chaude. La conductivité des boutures chauffées à 50°C occupe une situation intermédiaire.

Le TEC à 60°C réduit sensiblement la conductivité hydraulique en provoquant une embolie importante des conduits de la bouture. A 50°C par contre, la conductivité hydraulique et le taux d'embolie sont comparables à ceux du témoin. La préparation à l'air des boutures (coupage des sarments, conditions de stockage) explique en grande partie les taux élevés d'embolie observés dans cette expérimentation. Selon ces résultats, il semble donc que le TEC de boutures de Chasselas à 50°C durant 45 min, effectué de manière contrôlée et maîtrisée, ne perturbe pas significativement la conductivité hydraulique, et donc le flux de sève brute.

Anatomie des bourgeons

Les observations au microscope optique et électronique à transmission des bourgeons des trois cépages après les différents traitements ont montré qu'un brunissement du bourgeon principal se produit après traitement à l'eau chaude à 50°C sur Chasselas et Cabernet

Sauvignon (fig. 2). Chez le Merlot, ces altérations se produisent plutôt sur les bourgeons secondaires. La microscopie électronique permet de voir que ces zones brunes correspondent à d'importantes altérations cellulaires. L'intégrité de l'ultrastructure des cellules, et plus particulièrement des organelles telles que les mitochondries, des noyaux cellulaires et de leurs membranes, de l'appareil de Golgi et des systèmes membranaires est très dénaturée (fig. 3). Ces altérations cellulaires sont irréversibles et les parties tissulaires lésées ne peuvent donc plus participer au débourrement. Le maintien à 4°C durant au moins cinq semaines permet probablement le remplacement progressif des zones cellulaires détruites au sein des bourgeons par de nouveaux tissus, limitant le retard au débourrement après reconditionnement. A l'inverse, le débourrement retardé des plants traités sans phase de repos à 4°C pourrait correspondre en partie au temps nécessaire à la reconstruction des tissus du bourgeon primaire ou secondaire. Après TEC à 60°C, les bourgeons présentent des altérations tissulaires et cellulaires importantes. Les expériences de plantation des bois après TEC à 50°C, sans phase de repos à 4°C, montrent un débourrement retardé de trois semaines par rapport aux con-

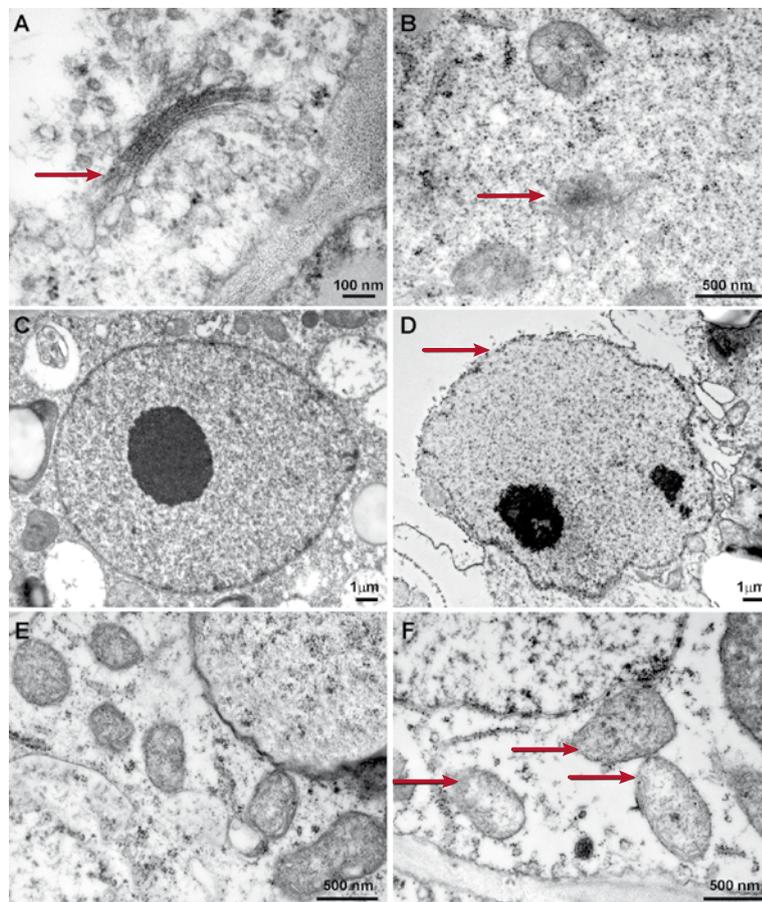


Figure 3 | Ultrastructure des bourgeons de *Vitis vinifera* cv. Chasselas dans les zones tissulaires brunes après traitement à l'eau chaude à 50°C (B, D et F) et dans le contrôle non traité (A, C et E) observée en microscopie électronique à transmission. A. Appareil de Golgi fonctionnel avec vésicules (flèche). B. Appareil de Golgi détruit (flèche). C. Noyau cellulaire présentant une double membrane nucléaire intacte. D. Noyau détruit et membrane nucléaire détruite à de nombreux endroits (flèche). E. Mitochondries et membranes mitochondriales intactes. F. Altérations des membranes mitochondriales et du contenu organellaire (flèches).

trôles non traités chez le Chasselas et le Cabernet Sauvignon, mais d'une semaine seulement chez le Merlot. Ce retard moins marqué sur Merlot pourrait s'expliquer par l'altération nettement moins importante du bourgeon primaire. Après TEC à 60 °C, aucun débourrement n'a pu être observé. Des expérimentations sont en cours pour évaluer l'état sanitaire des bourgeons après un repos à 4 °C, ainsi qu'un suivi du débourrement afin d'identifier quel bourgeon déclenche le débourrement après TEC à 50 °C selon le cépage.

Par ailleurs, il n'est pas exclu que le traitement à l'eau chaude exerce une influence sur l'hydrolyse de l'amidon en glucides solubles des bourgeons qui interviennent dans les processus de débourrement au printemps. Des études ont en effet montré que le froid (ou la période de froid) favorisait l'hydrolyse de l'amidon à travers la synthèse de l'enzyme α -amylase impliquée dans la conversion de l'amidon en sucres solubles chez la vigne (Wample et Bary 1992; Koussa *et al.* 1998). La capacité de mobilisation de ces réserves carbonées contenue dans la bouture et les bourgeons serait-elle affectée par le traitement à l'eau chaude? La question reste ouverte.

Conclusions

- Les effets d'un traitement à l'eau chaude (TEC) à 50 °C durant 45 min sur des boutures ligneuses de vigne ont été évalués sur la base de critères physiologiques (mesure du flux de sève) et anatomiques (intégrité des tissus conducteurs et des bourgeons).
- La conductivité hydraulique et le taux d'embolie des boutures traitées ne sont pas significativement

différents de ceux des boutures non traitées. Cela signifie qu'à 50 °C, le TEC ne cause pas de perturbation du flux de sève brute. Le même constat est fait sur des coupes de bois montrant que les boutures traitées ne présentent pas d'altérations physiologiques du système vasculaire par rapport au témoin non traité.

- Le TEC (50 °C) cause des altérations de zones tissulaires localisées sur les bourgeons primaires du Chasselas et du Cabernet Sauvignon, moins marquées pour le Merlot, chez qui c'est surtout le bourgeon secondaire qui est atteint.
- Lorsque les plants sont mis en terre sans période de repos à 4 °C, le débourrement est retardé de trois semaines chez le Chasselas et le Cabernet Sauvignon, contre une semaine chez le Merlot. Aucun retard de débourrement n'est observé lorsqu'un repos au froid d'au moins cinq semaines est respecté avant plantation.
- Le repos à 4 °C des bois traités pourrait correspondre au temps nécessaire à la reconstruction des zones de tissus détruites et ainsi expliquer que le retard de débourrement devient négligeable après un stockage d'au moins cinq semaines.
- Le traitement à l'eau chaude risque de devenir obligatoire à plus ou moins court terme comme moyen de lutte préventive dans certaines régions viticoles. Cette obligation signifierait pour les pépiniéristes l'allongement de la période de traitement à l'eau chaude et une nette réduction du temps de remise au froid. Dans ce cas, la recherche devrait alors se diriger vers le développement d'alternatives de traitement ou de méthodes de protection des tissus de la vigne. ■

Remerciements

Nous tenons à remercier Clément Panigai, étudiant en master viticulture à L'Agro de Montpellier, pour l'aide apportée dans les mesures de conductivité hydraulique.

Bibliographie

- Casieri L., Hofstetter V., Viret O., Dubuis P.-H. & Gindro K., 2009. Effet du traitement à l'eau chaude sur les champignons associés aux jeunes plants de vigne. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **41** (4), 219–224.
- Caudwell A., Larrue J., Valat C. & Grenan S., 1990. Les traitements à l'eau chaude des bois de vigne atteints de la flavescence dorée. *Progress agricole et viticole* **107**, 281–286.
- Dupraz P. & Schaub L., 2007. Lutte contre le phytoplasme de la flavescence dorée: l'eau chaude a été réinventée. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **39** (2), 113–115.
- ENTAV & INRA, 2006. Jaunisses à phytoplasmes de la vigne – flavescence dorée et bois noir. Groupe de travail national-flavescence dorée 2006, 24 p.
- Koussa T., Cherrad M., Bertrand A. & Broquedis M., 1998. Comparaison de la teneur en amidon, en glucides solubles et en acide abscissique des bourgeons latents et des entre-nœuds au cours du cycle végétatif de la vigne. *Vitis* **37**, 5–10.
- Mannini F., 2006. La lotta con la termoterapia contro la flavescenza dorata. *OICCE times* **28**, 25–27.
- Roland J. & Vian B., 1991. General preparation and staining of thin sections. In: J. Hall, C. Hawes (Eds.). *Electron Microscopy of Plant Cells*, Academic Press, London, 1–66.
- Wample R. L. & Bary A., 1992. Harvest date as a factor in carbohydrate storage and cold hardiness of Cabernet Sauvignon grapevines. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **117**, 32–36.

Summary

Hot-water treatment of the grapevine wood against Flavescence dorée: effect on the anatomy and integrity of the conductive tissues. Preliminary studies

Hot-water treatment (HWT) is effective against the phytoplasmas responsible for both flavescence dorée and grapevine bois noir. However, the temperature and duration of treatment employed present maximum values above which damage to the woody tissues of the vine can be detected. In particular, this leads to delays in budburst when the planting material is planted directly after HWT at 50°C. Microscopic analyses of the conductive tissues and buds of three grape varieties (*Vitis vinifera* cv. Chasselas, Merlot and Cabernet Sauvignon) as well as hydraulic conductivity measurements were carried out after HWT at 50°C. At the same time, an HWT test was conducted at 60°C, well above the upper limit tolerated by the vine, in order to illustrate the damage to the woody tissues of the vine. The results show that the buds exhibit local cellular degeneration after HWT at 50°C, whilst damage is total above 60°C. HWT at 50°C does not lead to any damage of the conductive tissues, or to any significant disturbances of hydraulic conductivity, while HWT at 60°C appears to reduce hydraulic conductivity by causing an acute embolism in the ducts of the cutting. The possible reasons for the delay in budburst observed among the plants treated with hot water are discussed.

Key words: phytoplasma, bois noir, hydraulic conductivity, microscopy.

Zusammenfassung

Heisswasserbehandlung des Holzes gegen die Goldgelbe Vergilbung: Einfluss auf die Anatomie und die Unversehrtheit des Leitgewebes. Einige Untersuchungsansätze

Die Heisswasserbehandlung (HWB) ist wirksam gegen Phytoplasmen, welche die Goldgelbe Vergilbung und die Schwarzholzkrankheit verursachen. Mit der dabei eingesetzten Temperatur und der Behandlungsdauer begibt man sich jedoch in einen Grenzbereich, bei dem erste Schäden des verholzten Gewebes der Reben auftreten können. Die Folge davon ist insbesondere ein verzögertes Austreiben des Pflanzguts direkt nach der Heisswasserbehandlung. Nach einer Heisswasserbehandlung bei 50°C wurden mikroskopische Untersuchungen des Leitgewebes und der Knospen von drei Rebsorten (*Vitis vinifera* cv. Chasselas, Merlot und Cabernet Sauvignon) sowie Messungen der Wasserleitfähigkeit vorgenommen. Parallel dazu wurde eine HWB bei einer Temperatur von 60°C, die deutlich über dem von der Rebe tolerierten Wert liegt, durchgeführt und die Gewebedegeneration des Rebenholzes visuell untersucht, um zu prüfen, welche Schäden bei der Anwendung einer ungeeigneten Temperatur auftreten können. Die Ergebnisse zeigen, dass die Knospen nach einer HWB bei 50°C Bereiche zerstörter Zellen aufweisen, während es bei einer Temperatur von 60°C zu einer vollständigen Degeneration kommt. Die HWB bei 50°C hat weder Schäden des Leitgewebes noch deutliche Störungen der Wasserleitfähigkeit zur Folge. Die HWB bei 60°C dagegen scheint die Wasserleitfähigkeit durch den Verschluss von Leitgefäßen der Stecklinge empfindlich zu beeinträchtigen. Die möglichen Ursachen des beobachteten verzögerten Austreibens von heisswasserbehandelten Pflanzen werden diskutiert.

Riassunto

Trattamento con acqua calda del legno contro la Flavescenza dorata: effetto sull'anatomia e sull'integrità dei tessuti conduttori. Studi preliminari

Il trattamento con acqua calda (HWT) è efficace sia contro il fitoplasma responsabile della flavescenza dorata sia contro quello del legno nero della vite. Tuttavia, la temperatura e la durata del trattamento presentano valori limite al di là dei quali è possibile constatare danni sui tessuti del legno della vite. In particolare, quando il materiale vegetale viene piantato subito dopo il trattamento a 50°C, si hanno come effetto ritardi nel germogliamento. In seguito al trattamento a 50°C sono state svolte analisi microscopiche dei tessuti conduttori e dei germogli di tre vitigni (*Vitis vinifera* cv. Chasselas, Merlot e Cabernet Sauvignon), oltre a misurazioni della conduttività idraulica. Parallelamente è stata effettuata una prova di trattamento con acqua calda a 60°C, molto oltre il valore limite sopportato dalla vite, al fine di vedere quali sono i danni sui tessuti del legno e valutare così gli effetti negativi dell'uso di una temperatura inadatta. I risultati mostrano che i germogli presentano degenerazioni cellulari localizzate in seguito al trattamento a 50°C, mentre dopo quello a 60°C le alterazioni sono totali. Il trattamento con acqua calda a 50°C non induce alcuna alterazione dei tessuti conduttori né variazioni significative della conduttività idraulica. Il trattamento a 60°C, invece, sembra ridurre sensibilmente la capacità di conduttività idraulica, provocando un'embolia importante dei tessuti conduttori della talea. Vengono discusse le possibili cause del ritardo nel germogliamento osservato presso le piante trattate con acqua calda.