

**« ANALYSE DE LA PRESENCE DE GNOMONIOPSIS  
SMITHOGILVYI DANS LES FRUITS ET PORTE-  
GREFFES DE CHATAIGNIER »**

Thèse de bachelor présentée par:

**Matteo CONTI**

pour l'obtention du titre Bachelor of Science HES-SO en Agronomie

**Novembre 2016**

Professeur HES responsable TB

**Dr. François LEFORT**

Conseiller scientifique

**M. Julien CROVADORE**

Responsable de la filière

Agronomie

**Sophie Rochefort**

## Déclaration

Ce travail de bachelor est réalisé dans le cadre de l'examen final de la Haute École du paysage, d'ingénierie et d'architecture de Genève, en vue de l'obtention du titre de Bachelor HES en Agronomie.

L'étudiant assume la responsabilité du travail et accepte, le cas échéant, la clause de confidentialité. Par contre, les conclusions et les recommandations qu'il y formule, sans préjuger de leur valeur, n'engagent ni les responsabilités de l'auteur, ni celle du Prof. HES responsable TB ni celle du conseiller scientifique, des experts et de hepia.

« J'atteste avoir réalisé seul le présent travail, sans avoir utilisé des sources autres que celles citées dans la bibliographie.»

Fait à Genève, le 10.11.2016

Matteo Conti

## Remerciements

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de cette thèse de Bachelor.

En premier lieu, je remercie le Dr. François Lefort, professeur à l'HEPIA de Genève. Premièrement pour m'avoir donnée l'opportunité de réaliser ma thèse sur ce sujet et, deuxièmement, pour m'avoir suivi, en tant que responsable, dans toutes les étapes du travail et m'avoir aidé quand je n'ai eu besoin.

Je remercie aussi tout l'équipe du groupe Plantes et Pathogènes de l'inTNE, M. Julien Crovadore, M. Romain Chablais, M. Bastien Cochard et Mme Martine Hänzi, pour m'avoir guidé dans les différentes étapes nécessaires à la réalisation du travail.

Je remercie le Dr. Mauro Jermini, de Agroscope Cadenazzo, pour m'avoir suivi dans l'analyse du plan de travail pour déterminer les échantillons à analyser.

Je tiens à remercier aussi le pépiniériste du Canton du Tessin, M. Francesco Bonavia, pour m'avoir donné accès à sa production végétale, sans laquelle je n'aurais pas pu réaliser ma thèse de Bachelor.

Un remerciement va aussi à M. Charles Rey, qui m'a aidé dans les corrections orthographiques et grammaticales du mémoire.

Je tiens aussi à remercier mon père, Ario Conti, ma mère, Roberta Conti et mon frère, Nicolò Conti, non seulement pour leur soutien financier et matériel, mais aussi pour leur engagement moral, sans lequel il m'aura été impossible de conclure ce chemin d'études.

## Résumé

Le châtaignier européen est un arbre à fruit ancré dans la tradition de plusieurs régions géographiques, comme par exemple le Canton du Tessin, où le châtaignier a eu une importance fondamentale dans l'histoire de la population tessinoise. Plusieurs agents pathogènes et ravageurs peuvent affecter le châtaignier et, dans des conditions optimales, ces agents pathogènes peuvent détruire des châtaigneraies entières ou encore la récolte. Cynips du châtaignier, chancre (causé par *Cryphonectria parasitica*) et maladie de l'encre (causé par *Phytophthora* spp) sont parmi les trois causes de mortalité ou de perte de production les plus importantes. Récemment un nouvel agent pathogène d'origine fongique a été découvert : *Gnomoniopsis smithogilvyi*, agent causal de la pourriture brune de la châtaigne et également responsable du chancre.

Les objectifs de cette thèse étaient au nombre de trois : développer des tests de diagnostic moléculaire spécifiques à *G. smithogilvyi* et *C. parasitica* ; analyser la prévalence des 2 champignons dans les fruits, porte-greffes et greffons de châtaignier et, enfin, sélectionner des organismes antagonistes potentiellement efficaces pour le contrôle et la lutte biologique contre *G. smithogilvyi*.

Le test de diagnostic moléculaire a été développé sur le gène de la bêta-tubuline, car parmi 3 séquences ADN il s'agit de la seule région où il a été possible de remarquer des différences suffisantes entre les séquences de *G. smithogilvyi* et les autres champignons du genre *Gnomoniopsis* sp. Après avoir sélectionné la zone d'intérêt et développé les amorces d'amplification, le test a été optimisé en évaluant la meilleure température d'hybridation et la concentration d'ADN la plus adaptée. La même méthodologie a été appliquée pour développer un test pour *C. parasitica* sur le même gène. Ces deux tests ont ensuite été appliqués sur 230 échantillons de divers organes de châtaignier. Ces tests ont montré que 60% des greffons analysés étaient contaminés, alors que les porte-greffes ne l'étaient quasiment pas. La conclusion principale est que *G. smithogilvyi* est certainement transmis au moment du greffage. *C. parasitica* n'a par contre jamais été retrouvé. En ce qui concerne l'évaluation des organismes à utiliser en tant qu'agent de lutte biologique, si de nombreux organismes ont montré être efficaces en confrontation *in vitro*, seulement deux de ces organismes ont montré une efficacité totale en confrontation *in vivo*. La bactérie *Pseudomonas putida* et le champignon *Trichoderma hamatum* ont en fait inhibé complètement le développement de *G. smithogilvyi* et de *C. parasitica* dans et sur les scions ; les résultats obtenus à ce niveau sont prometteurs et ces deux organismes devraient être développés rapidement comme agents de lutte biologique.

## Riassunto

Il castagno europeo è un albero da frutto radicato profondamente negli usi e costumi di molte zone geografiche, tra le quali anche quella corrispondente al Canton Ticino, sede di una tradizione castanicola molto antica. Come tutti gli alberi, pure il castagno è vittima dell'attività di agenti fitopatologici che, in condizioni ottimali per questi ultimi, possono portarlo alla morte. Cinipide galligeno, cancro del castagno (dovuto a *Cryphonectria parasitica*) e mal dell'inchiostro (causato da *Phytophthora* spp.) sono solo tre dei molteplici problemi a causa dei quali questa specie può soffrire. Recentemente quale causa di due delle malattie più gravi riscontrabili nel castagno è stato identificato un nuovo fungo: *Gnomoniopsis smithogilvyi*, agente causale del marciume bruno e del cancro del castagno.

Gli obiettivi di questo lavoro di diploma sono tre: in primo luogo la creazione di un test di diagnosi molecolare per poter, in seguito, analizzare la prevalenza del fungo nei frutti, portinnesti e marze del castagno; in secondo luogo la creazione di un altro test specifico per determinare anche la presenza di *C. parasitica* negli stessi campioni analizzati; in terzo luogo la selezione degli organismi antagonisti potenzialmente efficaci da impiegare quali agenti di lotta biologica contro *G. smithogilvyi*.

Il test di diagnosi molecolare è stato creato dalla regione della beta-tubulina, la quale ha permesso di ottenere delle differenze sufficientemente specifiche tra le sequenze di *G. smithogilvyi* e quelle del più generico *Gnomoniopsis* sp. Dopo aver selezionato la zona d'interesse per la creazione dei primer, il test è stato ottimizzato per quanto riguarda temperatura d'ibridazione e concentrazione del DNA. La stessa metodologia di lavoro è stata applicata per la creazione del test analizzante *C. parasitica*. Questi test molecolari sono stati in seguito eseguiti su 230 campioni di differente origine vegetale. I risultati di queste analisi hanno determinato che *G. smithogilvyi* s'introduce nelle nuove piante al momento dell'innesto; il 60 % delle marze analizzate era, infatti, contaminato. Per quanto riguarda *C. parasitica*, la sua presenza non è mai stata riscontrata.

La ricerca di organismi utilizzabili nella lotta biologica ha avuto esito positivo solo per un battere (*Pseudomonas putida*) e un fungo (*Trichoderma hamatum*). Questi due organismi, a differenza di tutti gli altri testati nello studio, hanno impedito lo sviluppo di *G. smithogilvyi* e *C. parasitica* sulle e nelle marze. I risultati ottenuti sono promettenti e lasciano speranze per la lotta contro questi due agenti.

## Abstract

The sweet chestnut is a fruit tree deeply anchored in the traditions of several geographical regions, such as Ticino, where chestnut fruits have had a fundamental importance in the history of its population. Several pathogens and pests can affect the chestnut and, in optimal conditions, they can destroy trees and harvests. Chestnut gall wasp, canker (caused by *Cryphonectria parasitica*) and ink disease (caused by *Phytophthora* species) are the top three causes of dieback or production losses. Recently, a new fungal pathogen has been discovered: *Gnomoniopsis smithogilvyi*. This fungus has been associated with both chestnut brown rot and canker.

This study had 3 objectives: - the development of molecular diagnostic tests, specific to *G. smithogilvyi* and *C. parasitica*; - the analysis of the prevalence of the two fungi in fruit, rootstocks and scions of chestnut and finally - the selection of potentially effective antagonists to biologically control *G. smithogilvyi*.

The molecular diagnostic test was developed on the beta-tubulin gene as, after analysis of three DNA regions, those sequences were the only ones where it was possible to notice sufficient differences between *G. smithogilvyi* and other fungi of the genus *Gnomoniopsis*. After selection of the region of interest and developing the amplification primers, the test has been optimised by for the best temperature of hybridisation and DNA concentration. The same methodology was applied on the same gene for the development of a test for *C. parasitica*. Both tests were then applied on 230 samples.

These tests showed that 60% of the grafts analysed were contaminated by *G. smithogilvyi*, while *C. parasitica* was never found. It then seems that *G. smithogilvyi* is transmitted by grafting scions at the time of grafting.

Regarding the assessment of the organisms used as biological control agents, while many of them have shown to be effective in *in vitro* confrontation technique, only two of these agents have proved a total efficiency in *in vivo* essays. The bacterium *Pseudomonas putida* and the fungus *Trichoderma hamatum* have in fact completely inhibited the development of *G. smithogilvyi* and *C. parasitica* in and on the scions. The results at this level are promising and both organisms should be developed rapidly as biological control agents.

# Zusammenfassung

Die Edelkastanie (*Castanea sativa*) ist ein im Brauchtum zahlreicher Gebiete, darunter den Kanton Tessin, tief verwurzelter Baum. Wie alle anderen Bäume, ist auch die Edelkastanie der Tätigkeit von Pathogenen ausgesetzt, welche bis zu deren Tod führen kann. Die Japanische Esskastanie-Gallwespe (*Dryocosmus kuriphilus*), der Kastanienrindenkrebs (der *Cryphonectria parasitica* geschuldet) sowie die durch der *Phytophthora* spp. erregte Krankheit sind nur drei der Probleme an welche die Pflanze leiden kann. Als Ursprung des Braunfäule und des Kastanienrindenkrebses wurde ein Pilz identifiziert: der *Gnomoniopsis smithogilvyi*.

Die vorliegende Diplomarbeit setzt sich drei Ziele: als erstes die Schaffung eines molekulardiagnostischen Tests um das Vorhandensein des Pilzes in den Früchten, Unterlagen und Edelreife; als zweites einen Test um die gleichen Mustern auf die Anwesenheit von *C. parasitica* zu überprüfen sowie als drittes Ziel die möglichen Organismen die sich zur biologischen Bekämpfung des *G. smithogilvyi* eignen würden auszuwählen.

Das molekulardiagnostische Test wurde aus der Region der  $\beta$ -Tubulin geschafft. Diese eignete sich um eine Sequenzierung herzustellen, die es ermöglichte den *G. smithogilvyi* vom generischeren *Gnomoniopsis* sp. zu unterscheiden. Nach die Wahl des Bereichs zur Herstellung des Primers, wurde der Test in Hinsicht der Hybridisierungstemperatur sowie der DNA-Verdünnung optimiert. Die gleiche Methode wurde für die Tests auf *C. parasitica* angewendet. Geprüft wurden 230 Muster unterschiedlicher Ursprung. Es konnte bewiesen werden dass *G. smithogilvyi* sich in den Pflanzen anlässlich der Veredelung ansiedelt: 60% der Edelreife waren kontaminiert. Die Anwesenheit *C. parasitica* konnte nicht bewiesen werden.

Die Suche nach in der biologischen Bekämpfung der vorgenannten Krankheiten einsetzbaren Organismen hat nur im Fall eines Bakteriums (*Pseudomonas putida*) sowie eines Pilzes (*Trichoderma hamatum*) ein positives Ergebnis geliefert. Beide Organismen konnten sich im Kampf gegen die Entwicklung von *G. smithogilvyi* und *C. parasitica* in und auf die Edelreife behaupten. Die Ergebnisse sind vielversprechend; es besteht somit Hoffnung auf einem Sieg im Kampf gegen den erwähnten Krankheitserreger.

# Table des matières

Déclaration .....	ii
Remerciements .....	iii
Résumé .....	iv
Riassunto.....	v
Abstract .....	vi
Zusammenfassung .....	vii
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des Figures .....	xii
Introduction .....	1
<b>1. Le châtaignier.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Ecologie, caractéristiques et diversité botanique .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Les modes de multiplication du châtaigner .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Semis.....	5
1.2.2 Bouturage .....	6
1.2.3 Greffage.....	7
<b>1.3 Le châtaignier dans la production alimentaire.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Le bois du châtaignier .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 La civilisation du châtaignier au Tessin .....</b>	<b>12</b>
<b>1.6 La diversité des cultivars présents au Tessin.....</b>	<b>14</b>
<b>1.7 La situation actuelle au Tessin .....</b>	<b>15</b>
1.7.1 Données économiques .....	15
1.7.2 Pertes post récolte .....	16
1.7.3 Restauration des vergers.....	16
<b>1.8 Maladies et ravageurs principaux .....</b>	<b>17</b>
1.8.1 <i>Cryphonectria parasitica</i> (Murr.) .....	17
1.8.2 <i>Phytophthora cambivora</i> (Petri) et <i>P. cinnamomi</i> (Rands) .....	19
1.8.3 <i>Dryocosmus kuriphylus</i> (Yasumatsu) .....	20



1.9	Un nouvel agent pathogène : <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> .....	21
2.	La pourriture brune du châtaignier .....	23
2.1	Description et symptomatologie .....	23
2.2	Les agents responsables .....	23
2.2.1	<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> (Shuttleworth et al.) .....	23
2.2.2	<i>Phomopsis endogena</i> (Speg.) .....	27
2.2.3	<i>Amphiportha castanea</i> (Tul.) .....	28
3.	Méthodes de lutte alternative contre les maladies fongiques chez le châtaignier.....	29
	Première partie – matériels et méthodes.....	32
1.	Analyse de la présence de <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i> dans les fruits et porte-greffes de châtaignier .....	33
1.1	Variétés utilisées.....	33
1.1.1	Lieux d'échantillonnage des variétés.....	33
1.2	Zone de l'étude.....	34
1.2.1	Informations pédologiques.....	34
1.2.2	Données climatiques .....	34
1.3	Matériel.....	35
1.4	Méthodes .....	36
1.4.1	Description du dispositif expérimental .....	36
1.4.2	Développement d'un test de diagnostic moléculaire spécifique pour l'identification de <i>G. smithogilvyi</i> .....	37
2.	Recherche de méthodes de lutte microbiologique.....	41
2.1	Objectifs.....	41
2.2	Organismes utilisés pour les tests de confrontation .....	41
2.3	Pathogènes utilisé .....	42
2.4	Description des dispositifs expérimentaux.....	42
2.4.1	Confrontation entre champignons antagonistes et <i>G. smithogilvyi</i> . 42	
2.4.2	Confrontation entre bactéries antagonistes et <i>G. smithogilvyi</i> .....	43
2.4.3	Le principe de la confrontation.....	43
2.5	Les essais de confrontation in vivo .....	44
	Deuxième partie : Résultats.....	47

<b>1. Analyse de la présence de <i>G. smithogilvyi</i> dans les fruits et porte-greffes de châtaignier.....</b>	<b>48</b>
<b>1.1 Extraction d'ADN.....</b>	<b>48</b>
<b>1.2 Développement des tests de diagnostic moléculaire spécifiques pour <i>G. smithogilvyi</i> et <i>C. parasitica</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>1.3 Purification et séquençage des ADN .....</b>	<b>51</b>
<b>1.4 Evaluation de la présence de <i>G. smithogilvyi</i> et <i>C. parasitica</i> par tests de diagnostic moléculaires spécifiques .....</b>	<b>52</b>
<b>1.5 Confrontation entre <i>G. smithogilvyi</i> et <i>C. parasitica</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>1.6 Recherche de <i>G. smithogilvyi</i> et <i>C. parasitica</i> dans des chancre.....</b>	<b>55</b>
<b>1.7 Analyse des isolats venant du Valais .....</b>	<b>57</b>
<b>2. Essais de lutte biologique.....</b>	<b>58</b>
<b>2.1 Essais de confrontation in vitro .....</b>	<b>58</b>
2.1.1 <i>Confrontations entre champignon antagonistes et champignons pathogènes.....</i>	<i>58</i>
2.1.2 <i>Confrontations entre bactéries antagonistes et champignon pathogène <i>G. smithogilvyi</i> .....</i>	<i>62</i>
<b>2.2 Résultats des essais de confrontation in vivo .....</b>	<b>63</b>
<b>Troisième partie : discussion .....</b>	<b>69</b>
<b>1. Analyse de la présence de <i>G. smithogilvyi</i> dans les fruits et porte-greffes de châtaignier.....</b>	<b>70</b>
<b>2. Essais de lutte biologiques.....</b>	<b>75</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>79</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>80</b>
<b>Annexe 1 : comparaison de plusieurs <i>G. smithogilvyi</i> .....</b>	<b>85</b>
<b>Annexe 2 : graphiques météorologiques tessinois.....</b>	<b>86</b>
<b>Annexe 3.1 : alignement des séquences relatives aux gènes de la Béta-tubuline</b>	<b>89</b>
<b>Annexe 3.2 : mise en évidence des différences des séquences relatives aux gènes de la Béta-tubuline .....</b>	<b>90</b>
<b>Annexe 4 : concentration d'ADN, rapports 260/280 et 260/230 de la totalité des échantillons .....</b>	<b>92</b>
<b>Annexe 5 : électrophorégrammes de la totalité des échantillons.....</b>	<b>98</b>

<b>Annexe 6 : électrophorégrammes des échantillons (galles) fournies par le centre WSL.....</b>	<b>103</b>
<b>Annexe 7 : protocole suivi pour l'extraction de l'ADN.....</b>	<b>104</b>
<b>Annexe 8 : protocole suivi pour la purification de l'ADN.....</b>	<b>105</b>
<b>Annexe 9 : composition des milieux de réaction et programmes d'amplification PCR, avec la Taq Biotools et la Taq Bioline.....</b>	<b>106</b>
<b>Annexe 10 : Confrontations in vitro entre <i>G. smithogilvyi</i> et le différents agents de lutte biologique.....</b>	<b>107</b>
<b>Annexe 11 : Confrontations in vivo sur scions de châtaignier après 6 semaines.....</b>	<b>119</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1: liste variétale .....	33
Tableau 2: Lieux de récolte et variétés récoltées. ....	34
Tableau 3: Caractéristiques pédologiques des lieux de récolte des châtaignes .....	34
Tableau 4: liste des champignons antagonistes utilisés .....	41
Tableau 5: liste des bactéries utilisées .....	41
Tableau 6: test de deux différents tampons d'extraction .....	48
Tableau 7: Résumé des échantillons analysés et des échantillons détectés comme contaminés par <i>G. smithogilvyi</i> .....	52
Tableau 8: Analyse statistique des 230 échantillons .....	53
Tableau 9: Recherche de <i>C. parasitica</i> dans les 230 échantillons analysés .....	54
Tableau 10: récapitulatif des scions contaminés .....	64

## Liste des Figures

Figure 1: le <i>Castanea sativa</i> .....	2
Figure 2: fleurs mâle et femelle.....	3
Figure 3: germination d'une châtaigne semée .....	6
Figure 4: déroulement de la germination d'une châtaigne .....	6
Figure 5: bouture herbacée de châtaignier .....	7
Figure 6: le greffage en fente.....	8
Figure 7: le greffage à l'anglaise .....	8
Figure 8: le greffage en écusson .....	8
Figure 9: le greffage en couronne.....	9
Figure 10: le périthèce de <i>G. smithogilvyi</i> .....	25
Figure 11: les asques de <i>G. smithogilvyi</i> .....	25
Figure 12: les conidies de <i>G. smithogilvyi</i> .....	26
Figure 13: une conidie de <i>G. smithogilvyi</i> .....	26
Figure 14: symptômes sur fruits.....	27
Figure 15: Lieux de récolte des châtaignes .....	33
Figure 16: Electrophorégramme des produits d'amplification de certains champignons pathogènes .....	40
Figure 17: Confrontation entre un champignon pathogène et champignon antagoniste .....	44

Figure 18: Confrontation entre un champignon pathogène et une bactérie antagoniste .....	44
Figure 19: Electrophorégramme de validation des paires d'amorces GS et CP .....	49
Figure 20: Electrophorégramme des essais de détermination de la température d'hybridation optimale pour les amorces GS et CP .....	49
Figure 21: Essai de détermination de la concentration d'ADN optimale pour les deux paires d'amorces.....	50
Figure 22: Exemple de résultats obtenus sur des échantillons de nature différente ....	50
Figure 23: Comparaison de la séquence obtenue avec la base de données GenBan (NCBI).....	51
Figure 24: Comparaison de la séquence obtenue avec la base de données Genbank (NCBI) : plusieurs occurrences possibles.....	51
Figure 25: Confrontation in vitro entre <i>C. parasitica</i> et <i>G. smithogilvyi</i> Ti 1 .....	55
Figure 26: Exemple de chancre (éch. 4.2) probablement dû à <i>G. smithogilvyi</i> .....	56
Figure 27: Exemple de chancre (éch. 1.2) probablement causé par <i>G. smithogilvyi</i> ...	56
Figure 28: Eléctrophorégramme des amplifications à partir d'extraits d'ADN des échantillons 1.2 et 4.2.....	56
Figure 29 : Surfaces moyennes des organismes dans les confrontations champignon - champignon, exprimées en mm <sup>2</sup> .....	59
Figure 30 : Surfaces moyennes des organismes dans les confrontations champignon - champignon, exprimées en mm <sup>2</sup> .....	60
Figure 31 : distances moyennes entre champignons confrontés, exprimée en mm.....	61
Figure 32 : Représentation graphique de la distance moyenne entre le champignon pathogène et la bande bactérienne, après 4, 7 et 12 jours, exprimée en mm.....	62
Figure 33 : Surfaces moyennes des pathogènes après 4,7 et 12 jours, exprimée en mm <sup>2</sup> .....	63
Figure 34: exemple de scion contaminé, avec l'échelle utilisée pour déterminer le taux de contamination.....	64
Figure 35: Fructifications de <i>C. parasitica</i> sur les scions de châtaignier .....	66
Figure 36: Scions inoculés par trempage avec <i>P. putida</i> UASWS0946 après 6 semaines.....	66
Figure 37: Scions inoculés par trempage avec <i>T. hamatum</i> UASWS1405 .....	67
Figure 38: Electrophorégramme de contrôle de la présence de <i>G. smithogilvyi</i> dans les scions. Témoin : scion témoin trempé dans l'eau, non inoculé par <i>G. smithogilvyi</i> ; <i>P. putida</i> : scion inoculé par <i>P. putida</i> UASWS0946 ; <i>T. hamatum</i> : scion inoculé par <i>T. hamatum</i> UASWS1405.....	67

Figure 39: Electrophorégramme de contrôle de la présence de *C. parasitica* dans les scions. Témoin : scion témoin trempé dans l'eau, non inoculé par *G. smithogilvyi* ; *P. putida* : scion inoculé par *P. putida* UASWS0946 ; *T. hamatum* : scion inoculé par *T. hamatum* UASWS1405..... 68

## Introduction

Le châtaignier commun (*Castanea sativa* Mill. 1768) est un arbre à fruit à feuilles caduques. Il appartient à la famille des Fagacées. En Europe, le châtaignier est présent dans les régions méditerranéennes, caucasiennes et balkaniques (Visentin et al., 2012a). Il est notamment apprécié pour ses possibles utilisations qui, mise à part le fait d'avoir une importance écologique élevée, permettent aussi un excellent approvisionnement en bois et en fruits, c'est à dire les châtaignes. En Italie, le châtaignier a été une partie économique importante de plusieurs communautés montagnardes jusqu'à la moitié du 20<sup>ème</sup> siècle (Visentin et al., 2012a). Aujourd'hui, son importance économique s'est beaucoup réduite, principalement à cause de deux facteurs : premièrement on trouve la mise en culture des variétés de plus haute qualité, en donnant peu d'importance aux autres variétés de châtaignier qui ne sont pas, économiquement parlant, autant valables et, deuxièmement, l'augmentation des facteurs pathologiques (Visentin et al., 2012a). La variabilité des variétés de châtaigniers a donc beaucoup diminué avec le temps. La baisse de la diversification variétale, ajoutée à l'augmentation des facteurs pathologiques a permis aux ravageurs de devenir de plus en plus nuisibles et donc, quand il y a l'attaque d'un organisme néfaste envers la plante, les pertes sont souvent très lourdes. Comme les variétés cultivées diffèrent peu entre elles, une attaque peut signifier la destruction totale de l'arbre ou de la culture.

Parmi les pathogènes les plus destructifs ces dernières années, on en compte cinq, exotiques, qui causent des dégâts très importants :

- *Dryocosmus kuriphylus* ;
- *Cryphonectria parasitica* ;
- *Phytophthora cambivora* ;
- *Phytophthora cinnamomi* ;
- *Gnomoniopsis smithogilvyi*.

Le dernier pathogène de la liste est le plus méconnu, parce qu'il vient d'être découvert sous nos latitudes. Il est à la base de l'objectif de cette thèse de Bachelor qui vise à analyser la présence de *Gnomoniopsis smithogilvyi* dans les fruits et porte - greffes de châtaignier ainsi qu'évaluer la potentialité de certains organismes en tant qu'agents de lutte biologique.

# 1. Le châtaignier

## 1.1 Ecologie, caractéristiques et diversité botanique

Le châtaignier européen (*Castanea sativa* Miller) est un arbre à feuilles caduques appartenant à la famille des Fagacées. L'espèce *sativa* est la seule existante en Europe, même si ces dernières années il a été importé, sur notre territoire, le châtaignier japonais (*Castanea crenata*). La raison de cette introduction est due au fait que cette variété de châtaignier est plus résistante à la maladie de l'encre, causée par *Phytophthora cambivora* et *P. cinnamomi*. Ce châtaignier a donc été utilisé pour le développement d'hybrides entre cette espèce et *C. sativa* (Gellini and Grossoni, 1996). La figure 1 ci dessous offre, en ordre alphabétique, arbre (A), feuilles (B), bogue (C) ainsi que châtaigne (D). En minuscule il y a la fleur femelle (a) et la fleur mâle (b).

**Figure 1: le *Castanea sativa***



Source : <http://sinergienaturali.altervista.org>

Le châtaignier est un arbre dont la hauteur peut varier, selon les conditions, entre 10 et 30 mètres. Le diamètre à la base peut atteindre 4 mètres. Il a des grandes feuilles caduques, lancéolées, dentées aux bords et avec un pétiole court. Les feuilles, alternes, peuvent atteindre 20 – 22 cm de longueur pour une largeur de 10 cm. A l'état juvénile les feuilles se montrent tomenteuses pour devenir ensuite glabres, brillantes et avec une consistance coriacée (Baffi and Merenda, 2006; Pron and Sormani, 2004). A noter que les feuilles du châtaignier sont riches en tannins.

L'écorce est lisse et de couleur grise – argentée quand l'arbre est jeune pour devenir brune avec des fissures longitudinales avec l'âge. La limite de vie biologique de cet arbre se situe aux alentours de 1000 ans au maximum ; la limite de vie



productive se situe par contre très en dessous : environ 150 ans pour un arbre en verger et environ 70 ans pour un arbre en forêt (Pron and Sormani, 2004).

Les fleurs unisexuées mâles et femelles sont présentes sur le même arbre. Elles sont bien séparées. Les fleurs mâles sont réunies en petits glomérules formant des chatons, d'une longueur variant entre 5 et 15 cm. De couleur blanchâtre, chacune d'elle comprend entre 6 et 15 étamines (androcée). Les fleurs femelles sont isolées et souvent réunies en groupes de 2 – 3. Chaque groupe de fleur est entouré d'une involucre de bractées (Baffi and Merenda, 2006).

**Figure 2: fleurs mâle et femelle**



Source : [www.ruchewarre.net](http://www.ruchewarre.net)

Il peut y avoir un problème majeur quant à la pollinisation pour l'obtention d'une variété commerciale désirée. En nature, les châtaignes produites à partir d'un arbre ne sont jamais exactement identiques car le pollinisateur (le mâle) est toujours un autre arbre, souvent sauvage. Le châtaignier ne peut finalement pas compter sur son propre pollen pour féconder les fleurs femelles. Pour résoudre ce problème d'hétérogénéité de fruits il faut procéder à un greffage en utilisant des greffons issus de la plante mère de la variété désirée. Ces greffons sont greffés sur des porte-greffes issus eux aussi des fruits venant de la plante mère choisie. L'idée de créer des porte-greffes à partir de châtaignes de la même variété que les greffons vient aussi du fait que, dans certains cas, il peut y avoir une incompatibilité entre greffon et porte-greffe. Ces incompatibilités peuvent se manifester après quelques années, quand l'arbre commence à produire des tannins. Donc la meilleure façon d'éviter cette incompatibilité est de ne greffer sur des porte-greffes que des greffons venant de châtaignes de la même variété.

Ainsi nous obtenons une culture de châtaignier de la même variété que celle de l'arbre mère; la pollinisation se fera de cette façon toujours entre châtaigniers de la même variété : les fruits obtenus seront ceux visés en tant qu'objectif (Conedera, 2006; Gellini and Grossoni, 1996).

La problématique du greffage intervient seulement pour les cultures commerciales : cette technique est en effet indispensable pour commercialiser des variétés certifiées. Par contre les châtaignes récoltées en forêt sont tout aussi bonnes même si elles ne sont pas produites sur des plants greffés (Conedera, 2015).

Le fruit est un akène, appelée couramment « châtaigne ». Il a un péricarpe de couleur brune, glabre, brillant à l'extérieur et tomenteux à l'intérieur. Sa forme a une face aplatie et une convexe. Concernant les « marrons », c'est à dire les châtaignes issues d'arbres cultivés, améliorés avec le greffage, ils sont plus gros et présentent les deux faces convexes. Il en résulte un fruit plus arrondi. Le « marron » montre aussi des rayures plus marquées sur le dos du fruit. Les fruits sont contenus, en nombre variant entre 1 et 3, dans une enveloppe appelée bogue. La bogue, une fois mûre, s'ouvre en quatre sections révélant les châtaignes contenues à l'intérieur (Stacchiotti, 1999).

Le châtaignier a une bonne tolérance au froid : les dégâts interviennent seulement à des températures inférieures à -25 °C. La température optimale de croissance se situe entre 8 °C et 15 °C. Pendant la saison végétative, il est très exigeant et il a notamment besoin d'environ 4 mois pour son cycle de fructification. Le débourrement a lieu dans la deuxième moitié du printemps et la floraison au début de l'été. Dans les régions caractérisées par le brouillard ou de fortes pluies estivales, la pollinisation peut devenir problématique et avoir une répercussion très négative sur la fructification. La récolte des fruits s'effectue en automne (Bernetti, 1995).

Les phases phénologiques du châtaignier sont dans l'ordre au nombre de 7 (Bernetti, 1995) :

- La période de repos hivernale, qui a lieu de fin novembre jusqu'à fin mars – début avril, permet à l'arbre de supporter des températures négatives ;
- Les bourgeons, déjà en place, commencent à se développer de la fin de mars jusqu'à la fin d'avril ;
- La formation des feuilles commence fin avril pour se terminer fin mai ;
- La floraison ainsi que la fécondation ont lieu pendant le mois de juin ;
- Les fruits, après fécondation, commencent à grossir et à mûrir ; ces processus se déroulent de la fin juin jusqu'à début octobre ;

- Pendant le mois d'octobre, les fruits tombent et c'est à ce moment là qu'ils sont récoltés ;
- Enfin, en novembre, les dernières feuilles tombent de l'arbre qui se prépare à un nouvel hiver.

En ce qui concerne les exigences pédologiques, le châtaignier préfère des sols riches en potassium en phosphore et en humus. Il pousse préférentiellement dans des sols neutres ou légèrement acides. Il ne tolère pas les sols argileux (Barbera, 2007).

## **1.2 Les modes de multiplication du châtaignier**

La multiplication du châtaignier comprend trois méthodes opérationnelles possibles : le semis, le bouturage et, celle qui est le plus utilisée, le greffage.

### **1.2.1 Semis**

Le semis est la première méthode de multiplication du châtaignier, qui est la plus logique. La châtaigne, comme tout autre fruit, a tout ce qu'il faut pour donner vie à une nouvelle plante si les conditions sont favorables. Il suffit de placer la châtaigne dans un substrat qui lui permettra de germer. Pour mieux réussir la germination, il est possible de placer les fruits dans un conteneur humide (pas trop toutefois car il peut y avoir le développement de champignons indésirables) et une fois que le processus de germination a démarré il suffit de les transplanter en pleine terre. Cette façon de procéder rendra les fruits moins appétants pour la macrofaune et mégafaune du sol (Bonavia, 2015).

La problématique principale du semis est la variabilité de la variété obtenue ainsi que la période de fructification : comme la pollinisation est très aléatoire, la variété obtenue pourra être assez différente de la variété qui avait été récoltée et semée pour la multiplication. Prenons le cas d'un semis d'une châtaigne dont la plante mère est résistante à une maladie. La châtaigne va germer et donnera des nouveaux fruits. Comme la pollinisation est effectuée par un autre arbre, les châtaignes obtenues par ce semis pourront être éloignées de la variété mère et donc ne pas être aussi résistantes comme l'était son ancêtre. Il n'y a donc pas de garantie que la châtaigne semée produira les mêmes fruits que ceux produits par la plante mère. D'outre fait, il faut savoir que la fructification est très lente sur un semis et donc commercialement c'est une opération risquée. Pour augmenter les chances d'obtenir la variété désirée et pour accélérer la fructification, on procède au greffage avec des greffons issus de la plante mère (Conedera, 2006; Raimondi, 2013).

Le semis est surtout utilisé pour la production de porte-greffes car les plantes qui s'en sont issues développent et offrent un bon système racinaire et donc sont optimales en tant que porte-greffes.

**Figure 3: germination d'une châtaigne sémée**



Source : [www.compoverde.com](http://www.compoverde.com)

**Figure 4: déroulement de la germination d'une châtaigne**



Source : <http://assets.kew.org>

### 1.2.2 Bouturage

Le bouturage constitue une deuxième méthode de multiplication. Il consiste à repiquer des fragments de tiges portant des yeux et une feuille. Les tiges vont peu après s'enraciner pour donner vie à de nouvelles plantes. Les nouvelles tiges se développeront à partir des yeux en utilisant la feuille comme capteur de lumière pour la photosynthèse. Cette méthode n'est pas trop pratique car elle demande beaucoup de temps et les résultats sont souvent décevants (faibles pourcentages d'enracinement). Le but de cette méthode, si elle opérée, est, comme pour le semis, l'obtention de porte-greffes ; pour ce faire on choisira des variétés qui développeront un bon système racinaire. Commercialement parlant, le semis garantit un système racinaire vigoureux et bien développé pour l'obtention des porte-greffes.

A noter que le procédé du marcottage est une alternative de propagation végétative au bouturage qui peut s'avérer plus efficace. Pour obtenir des plantes bien enracinées il faut, en tout cas, plus d'un an d'élevage.

**Figure 5: bouture herbacée de châtaignier**



Source : [www.inoplant.com](http://www.inoplant.com)

### 1.2.3 Greffage

Le greffage consiste à placer un greffon sur un porte-greffe spécifique. Le choix du porte-greffe est dicté en fonction de la résistance, par exemple face à certaines maladies (notamment face à la maladie de l'encre) ainsi que pour des raisons de compatibilité comme on l'a vu plus haut.

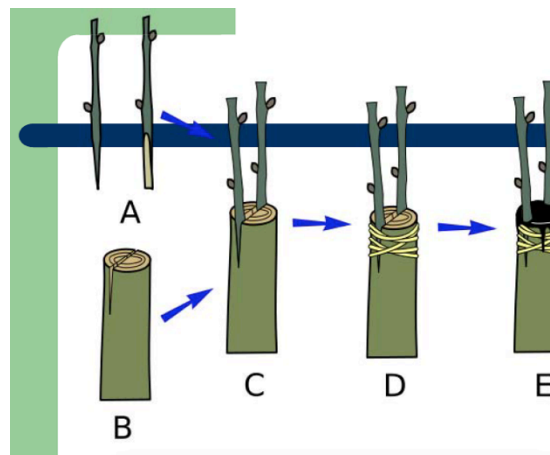
Pour effectuer un greffage il faut deux parties : un porte-greffe et un greffon. Le premier peut être obtenu à partir du semis ou du bouturage ; il a généralement 1-2 ans. Le greffon est au contraire prélevé sur la plante mère et représente un fragment de tige ou simplement un œil. Il est choisi en fonction du besoin du producteur. Ces deux parties doivent ensuite être mises en contact (le plus près possible) pour aligner les cambiums et permettre à la sève de circuler entre le porte-greffe et le greffon pour les unir de façon définitive. Pour accomplir cette opération il faut avoir des outils spécifiques (greffoir ou couteau bien affilés) ainsi qu'un bon savoir faire (pour le choix de la méthode de greffage et l'application du mastic par exemple). Un greffage mal effectué peut entraîner la mort de la jeune plante. L'exemple classique est la mauvaise application du mastic : chaque blessure de la plante est une porte d'entrée pour les agents pathogènes ainsi qu'une voie de dessèchement et, si l'application du mastic est mal exécutée, cette blessure pourra entraîner la mort de la plante greffée.

Le matériel végétal sera choisi avec soin. Par exemple, il faut éviter toute plante manifestant des signes de maladie et préférer, pour les greffons, les yeux venant de tiges productives et non de celles végétatives (Raimondi, 2013). Si les greffons doivent être conservés avant de les greffer il faut les désinfecter et les placer dans des sacs en plastique (ou dans du sable humide) à une température de 2-4 °C avec un taux d'humidité constant (Raimondi, 2013). La période idéale pour le greffage est

soit en avril-mai soit en juillet-août selon la typologie de greffage choisie (Raimondi, 2013).

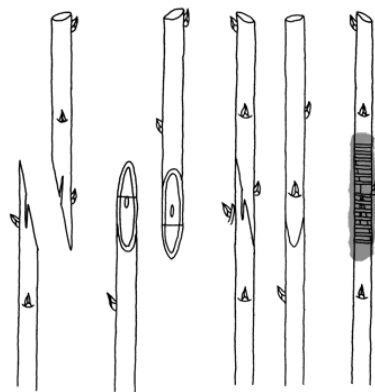
Concernant les typologies de greffage il en existe plusieurs : en fente, à l'anglaise, en écusson, en couronne, ... (figures 6, 7, 8 et 9).

**Figure 6: le greffage en fente**



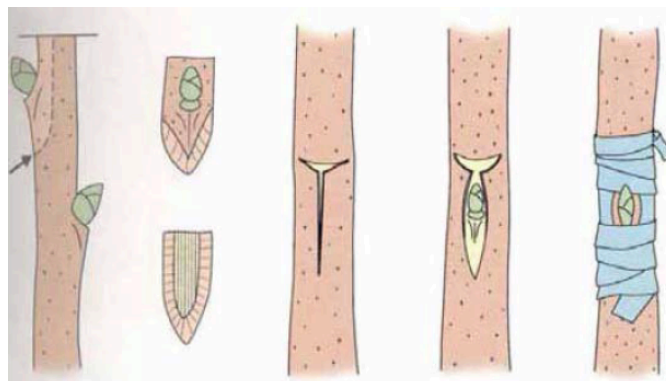
Source : Raimondi, 2013, p.32

**Figure 7: le greffage à l'anglaise**



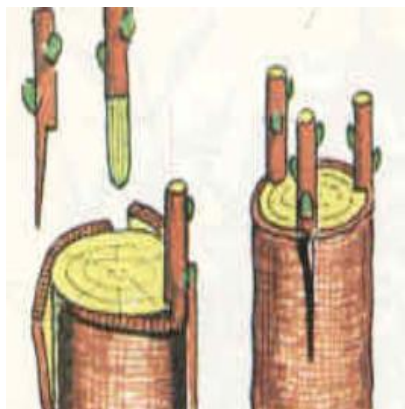
Source : [www.retropomme.ch](http://www.retropomme.ch)

**Figure 8: le greffage en écusson**



Source : Raimondi, 2013, p.41

**Figure 9: le greffage en couronne**



Source : [www.eaglecorp.be](http://www.eaglecorp.be)

Schématiquement, le processus du greffage peut-être composé comme suit :

- Récolte de châtaignes de la variété « X » dès que possible (plus tôt elles sont récoltées moins il y a des risques de développement de champignons interne) ;
- Semis des châtaignes récoltées ;

*--- Les châtaignes germent, forment des racines et poussent durant un an ---*

- Récolte de nouveaux greffons sur la plante mère de la variété « X » ;
- Greffage de la variété « X » sur les porte-greffes de la variété « X » dès que possible (généralement en mars – avril) ;
- Mise en culture jusqu'à la vente.

#### **1.2.3.1 Pourquoi choisir le greffage – avantages de cette méthode**

Le greffage se montre efficace car on peut choisir le greffon de la variété à cultiver. Si la variété mère est commercialement bonne (haute productivité, calibre adéquat, maturation précoce/tardive, goût optimal, ...), elle peut être la base de production de plantes de la même variété. Il suffit de prélever des yeux ou des fragments (greffons) de tige et de les greffer sur un porte-greffe avec la partie racinaire déjà développée. Comme dit précédemment, il est préférable de greffer un greffon de variété « X » sur un porte-greffe également de variété « X ». Ceci évitera des possibles incompatibilités suite à la production de tannins après quelques années. Si le porte-greffe et le greffon sont de la même variété, il ne peut pas y avoir d'incompatibilité vu qu'ils sont presque égaux. Le greffage est intéressant aussi pour d'autres raisons, notamment l'obtention d'une plante plus vigoureuse par rapport à

celle obtenue du simple semis ou encore des avantages comme l'adaptation au sol, un meilleur développement, un rendement majeur, ... sur la plante adulte (Raimondi, 2013).

### **1.3 Le châtaignier dans la production alimentaire**

Les fruits du châtaignier ont eu, et dans certaines communautés montagnardes ont toujours, un rôle très important en ce qui concerne l'alimentation. Jusqu'aux années 1950, les châtaignes, très riches en amidon, ont représenté, en Italie, en régions de montagne, la source de nourriture principale.

Le commerce des châtaignes est très ancien : il y a des informations dans la littérature qui racontent que la commercialisation des premières châtaignes est à attribuer aux Grecs, Phéniciens et Juifs. Ces trois ethnies commercialisaient ce précieux fruit tout autour du bassin méditerranéen. Concernant sa cuisson, il n'y avait personne qui, à l'époque de l'Empire Romain, pouvait rivaliser avec Naples et ses fameuses châtaignes rôties. Toujours dans l'Antiquité, des gens racontent que la farine issue de châtaignes était utilisée pour produire du pain pendant les fêtes de Cérès, déesse de l'agriculture, moissons et fécondité. Pendant cette période, il était en fait interdit d'utiliser toute sorte de céréales (Pron and Sormani, 2004).

Au Moyen-Âge la châtaigne a été cultivée par les moines, qui ont amélioré les techniques de culture et de conservation de ce fruit. Lors de cette période, il y a eu la création d'un nouveau métier : le « castagnadores » (Lenti, 2013). Cette tâche était accomplie parmi les paysans et, de ce fait, la châtaigne a été presque interdite sur les tables des nobles, car c'était devenu la nourriture de la plèbe (Lenti, 2013; Pron and Sormani, 2004).

En 1770, la châtaigne retourne dans les assiettes de la cour sous forme de marron glacé. Dans la même période à Paris, il y a la diffusion d'un chocolat composé, en parties égales, de châtaignes séchées et cacao, qui a eu un bon succès (Lenti, 2013).

De nos jours, la châtaigne est encore très appréciée sur les tables. C'est un fruit très nutritif, de l'ordre de 200 calories par 100 grammes de châtaignes fraîches. Elle est constituée à moitié d'eau et contient les vitamines C, B1, B2 et PP. Elle est pauvre en graisse et riche en fibres, qui réduisent le cholestérol (Lenti, 2013). Elle



contient les éléments nutritifs principaux comme le sucre, le potassium, le phosphore, le sodium, le magnésium, le fer et l'acide folique.

Il y a plusieurs utilisations et transformations possibles. La manière la plus simple pour les consommer directement c'est de les rôtir ou bouillir, comme substitution au pain ou par simple plaisir de goût; il y a autrement la possibilité de les transformer. La transformer en farine, par exemple, permet de faire du pain, des soupes ou de la pâtisserie. Concernant la panification, on peut en faire du très bon pain si le mélange de farine de châtaigne et farine de blé est bien proportionné. Si la proportion n'est pas bonne, elle limitera l'efficacité du levain. Les châtaignes peuvent enfin devenir des délicieux marrons glacés ainsi que des marmelades. A côté des fruits, les feuilles et l'écorce des jeunes pousses peuvent être utilisés en infusions ou en décoctions à but curatif, contre la dysenterie ou la toux par exemple (Pron and Sormani, 2004).

#### **1.4 Le bois du châtaignier**

Outre à la production alimentaire, le châtaignier a un impact sur la production de bois. En Suisse italienne ou plus en général au sud des Alpes, le bois du châtaignier a été exploité pour beaucoup de produits qui sont encore aujourd'hui ancrés dans la tradition rurale. Il a été utilisé, par exemple, pour toute sorte de support comme les poteaux de la vigne ou les protections contre les avalanches. Le fait d'avoir une résistance constitutionnelle élevée sans devoir être transformé par l'homme lui permet d'être utilisé dans plusieurs domaines. Les caractéristiques physiques de cet arbre sont au nombre de trois et elles sont difficilement repérables dans d'autres variétés d'arbres. Premièrement il a la particularité d'avoir le « *plus faible coefficient de gonflement et de rétractation* » (Delucchi, 2009) par rapport à d'autres arbres présents sur le territoire. Ce fait permet notamment une plus grande facilité lors de la transformation du bois pour la création des produits destinés au commerce. La deuxième particularité concerne sa densité : le fait d'avoir une densité très régulière, même si elle augmente avec les années, facilite aussi, comme pour le premier point, la transformation du bois par les artisans (Tassinari, 1976). La troisième particularité est plutôt chimique. Comme évoqué dans le chapitre 1.1, le châtaignier est riche en tannins. Le fait de les trouver dans le bois lui permet de pouvoir compter sur un pouvoir de défense naturelle face aux agents de pourriture (Delucchi, 2009).

Le bois du châtaignier n'a pas seulement des caractéristiques de « force » : il est en fait aussi un bois très beau et donc il peut être utilisé pour des produits qui visent en premier l'impact esthétique.

Le bois venant de cet arbre n'est toutefois pas sans défauts : les attaques fongiques sont assez fréquents et les phénomènes d'anneaux bougés, causés par le gel ou les intempéries, sont tout sauf rares (Delucchi, 2009); de plus, si on y rajoute la difficulté d'approvisionnement par rapport aux bois tropicaux, le commerce du bois de châtaignier reste un marché de niche.

### **1.5 La civilisation du châtaignier au Tessin**

Concernant la civilisation du châtaignier au Tessin, il y a deux grandes hypothèses. La première, le témoignage le plus fiable qu'il y a dans la littérature concernant la repopulation de châtaignier dans le canton du Tessin, est décrit par Zoller qui affirme que l'apparition du châtaignier dans la Suisse méridionale date environ de 2000 ans (Zoller, 1960), après « l'apparition » des premières colonies d'êtres humains sur le territoire qui est aujourd'hui connu comme le Canton du Tessin.

La deuxième hypothèse attribue au châtaignier une date de « naissance » qui se situe entre 800 et 700 av. J-C, donc succédant, dans la chronologie forestière tessinoise, le hêtre (Pron and Sormani, 2004).

Le châtaignier a été tout de suite apprécié pour ses qualités ; une fois installé, il a commencé à se développer très vite sur tout le territoire. Cette expansion est principalement due à des facteurs anthropiques durant l'empire romain. Il faut notamment dire que cette romanisation a eu des influences culturelles et économiques sur la population ancienne ; elle a influencé directement l'expansion du châtaignier (Pron and Sormani, 2004) car on peut dire que le développement du châtaignier sur le territoire tessinois a été possible grâce aux Romains qui ont reconnu le pouvoir économique et alimentaire de cet arbre en insistant sur son développement au détriment des chênes et des hêtres (Pron and Sormani, 2004).

Entre la chute de l'Empire romain et le XVIII<sup>e</sup> siècle, le châtaignier s'est encore plus répandu surtout grâce à l'augmentation sensible de la température et à l'augmentation démographique. Les populations, pour obtenir le maximum de bénéfices, cultivaient de plus en plus le châtaignier. A cette époque, le châtaignier commençait aussi à bien s'installer dans les vallées supérieures du Canton du Tessin (Conedera, 1996). L'importance du châtaignier au Tessin est aussi arrivée

par des témoignages physiques, comme par exemple la présence, encore de nos jours, de séchoirs de châtaignes (très anciens) dans certains villages. Des témoignages évoquent la présence de plusieurs marchés « publics » où la population pouvait vendre sa propre farine de châtaignes (Pron and Sormani, 2004).

Le châtaignier a donc eu une importance fondamentale dans le développement et la survie des ancêtres des tessinois. Malheureusement, durant le XVII et le XVIII siècle, les cultures de châtaignier ont de plus en plus disparu: l'exploitation de la châtaigne était devenue trop intensive. Le fait de vouloir produire toujours plus de fruits a affaibli les arbres qui, à l'arrivée de l'hiver, étaient dans des conditions de santé précaires. Il suffisait des températures plus froides que la normale pour les détruire. Comme si ce facteur ne suffisait déjà pas, l'arrivée de la révolution industrielle (XIX siècle) n'a pas du tout amélioré la situation: les châtaigniers n'étaient pas exploités massivement juste pour les châtaignes mais aussi pour le bois. De grandes quantités étaient nécessaires pour produire du charbon, ainsi que du bois de construction, pour le fonctionnement de la société industrielle, qui était en plein développement. La destruction massive de châtaignier au Tessin avait atteint des proportions trop élevées, si bien que la législation a dû établir des lois pour éviter l'extinction de cette espèce. Par exemple, à Soazza en 1750, il y a eu l'obligation de planter un châtaignier par chaque foyer familial. A Locarno, en 1771, il y a eu la décision de ne plus exporter de charbon issu de bois de châtaignier ou encore, 7 ans après, en 1778, un bailli zurichois habitant à Lugano décrétait l'interdiction de couper tout châtaignier sur le Monte Ceneri. Les infractions de ce décret étaient soumises à une amende (Pron and Sormani, 2004). Grâce à ces mesures extrêmes le châtaignier n'a pas disparu et, à la fin du XVIII siècle, les habitants pouvaient encore se nourrir de ce qui était, à cette époque, l'aliment le plus commun: la polenta de châtaignes.

Les années qui ont suivi le 1796 n'ont pas eu d'influence directe sur le châtaignier: la révolution française a radicalement changé la situation politique, mais le nouveau Canton formé par l'Acte de Médiation de Napoléon en 1803, le Tessin, n'avait pas changé au niveau social. Il y a eu bien sûr eu des améliorations, mais le territoire est toujours resté pauvre, et la châtaigne constituait encore la source d'alimentation principale. Son importance alimentaire n'a pas été en discussion jusqu'à ce que trois événements distincts causent une chute importante de la châtaigne au futur XIX siècle. La commercialisation de plus en plus importante de la pomme de terre et du maïs, ajoutée à l'ouverture du tunnel ferroviaire du St. Gothard (facilité

d'importation) ainsi qu'à l'émigration de la main d'œuvre vers d'autres pays ont abandonné le châtaignier à son destin : la législation ne le protégeait plus et son fruit était considéré au même niveau que la pomme ou la poire. La châtaigne, le précieux akène qui avait permis aux habitants de survivre, ne représentait plus un des aliments principaux de la scène tessinoise (Pron and Sormani, 2004).

En 1902, le châtaignier a été à nouveau pris en considération par l'Helvétie, qui l'inclut dans la nouvelle Loi fédérale visant à la protection de plusieurs espèces d'arbres présents sur le territoire. Cette loi décrétait la protection totale de la forêt lorsque des populations de châtaignier étaient en place. La coupe des arbres était interdite et, si nécessaire, seule la Confédération pouvait déroger des permissions spéciales à ce sujet. Les autorités fédérales n'ont pas seulement protégé les arbres existants, mais ils ont bien régénéré des zones de châtaigniers, en plantant des nouveaux arbres (Pron and Sormani, 2004).

Grâce à ces mesures la superficie des châtaigniers est aujourd'hui de l'ordre de 17'153 hectares (Ceschi, 2014).

## **1.6 La diversité des cultivars présents au Tessin**

En ce qui concerne les variétés de châtaigniers, il peut être affirmé que il y en a plus de 100. Essayer de les décrire toutes ne serait pas possible, car en pleine forêt la pollinisation est effectuée de façon complètement aléatoire et ce fait cause une différence, sensible dans certains cas, depuis la variété de la plante mère. Conedera, en 2004, a affirmé qu'il n'existait pas encore de clé de détermination qui pouvait garantir la détermination correcte de chaque variété forestière (Conedera et al., 2004a).

Au Tessin, les variétés prennent des noms provenant de la culture et du dialecte de la région. Une analogie très intéressante est citée par Pron et Sormani (2004): « *un des exemples le plus cité pour montrer la forte relation entre langue et culture vient de la langue des eskimos. Il est notamment fameux le fait que dans leur idiome il y a plus de 100 façons de nommer le concept de neige. Ces 100 façons et davantage ne se réfèrent généralement pas à la neige, mais à toutes les variétés que les eskimos savent distinguer* » (Pron and Sormani, 2004). Cette analogie, très pittoresque, décrit bien la difficulté de décrire toutes les variétés présentes sur le territoire au sud des Alpes. Pour en citer quelques-unes : *bunei*, *éntsats*, *karnéra*, *torciòn*, *verdésa* ou encore *volpat*. Les noms, à la fois bizarres et hors de sens,

peuvent se référer à plusieurs choses. Ils peuvent évoquer une caractéristique botanique (forme, couleur, poils, ...), la période de fructification, la condition de culture ou encore la position géographique. Ces quatre exemples ne sont bien évidemment qu'une partie des paramètres utilisés dans la dénomination d'une variété. Hans Käser, dans son ouvrage « *Die Kastanienkultur und ihre Terminologie in Oberitalien und in der Südschweiz* » (Käser, 1932) décrit dans le détail toutes les variétés qui étaient ou qui sont encore présentes sur le territoire. Un descriptif des variétés tessinoises peut aussi être consulté dans le « *Vocabolario dei Dialetti della Svizzera Italiana* » (1952) : cet ouvrage décrit tous les mots venant du dialecte tessinois.

Parmi cette quantité de variétés, il y en a bien certaines qui ont été retenues pour la mise en culture et la commercialisation : ce sont les cultivars. Les variétés cultivées actuellement dans la pépinière cantonale tessinoise sont :

- *Bunée*
- *Giacco*
- *Lüina*
- *San Pietro*
- *Torcione nero*
- *Marrone Michelangelo*
- *Marrone Lattecaldo*
- *Marrone di Sagno*
- *Bouche de Betizac*

## **1.7 La situation actuelle au Tessin**

### **1.7.1 Données économiques**

Les données économiques issues de la production tessinoise de châtaignes sont très difficiles à obtenir. Cette difficulté est due principalement au fait que la plupart des plantes sont vendues soit à des particuliers, et donc les châtaignes produites ne sont pas forcément commercialisées, soit à des personnes qui ont le but de restaurer des forêts.

La plupart des châtaignes commercialisées dans les magasins ou par les grossistes sont importées, aussi à cause des organismes nuisibles présents au Tessin. En 2014, la Confédération a importé 2'561 tonnes de châtaignes et marrons avec un prix moyen du kilo qui était de l'ordre de fr. 6.20. Le principal pays fournisseur en 2014 était l'Italie, avec plus du 50% de ce tonnage. La France, l'autre grand pays

exportateur de châtaignes, a contribué seulement pour un cinquième de ce tonnage (source : [www.ezv.admin.ch](http://www.ezv.admin.ch)).

### **1.7.2 Pertes post récolte**

Comme pour les données économiques, la quantification des pertes post récolte est très difficile à évaluer. Ce fait est dû à une non-analyse des fruits lors de la commercialisation : si le fruit ne présente pas de dégâts visuels sur l'épicarpe, comme par exemple des trous, il est considéré comme commercialisable. Ce fait implique que s'il y a un champignon dans le mésocarpe de la châtaigne, il ne serait visualisé qu'une fois le fruit prêt à consommer (par exemple une fois cuit).

Même en n'ayant pas de données concrètes, il est sûr que les pertes post récolte ont augmenté ces dernières années dans le commerce. Ces pertes ont, dans le pire des cas, atteint des taux de l'ordre de 80% dans certaines régions du Tessin (Colombi, 2015).

### **1.7.3 Restauration des vergers**

La restauration des vergers de châtaigniers au Tessin est un processus qui a débuté dans les premières années '90. Cette restauration était prise en charge par les autorités forestières cantonales et fédérales. En 1997, il y a eu un changement pionnier : l'office fédérale de l'agriculture avait reconnu les forêts de châtaigniers comme surface agricole utile (Moretti, 2006). Grâce à ce changement, les zones de châtaigniers ont été en fait juridiquement considérées comme forêts ; par contre si le but était la production agricole, elles pouvaient être considérés comme surfaces de compensation écologique (Moretti, 2006).

Un atout majeur de restauration des vergers a été l'accueil très favorable de la population tessinoise qui a facilité les activités nécessaires à la survie des châtaigniers : il y a eu notamment la création de sentiers dévolus aux châtaigniers ainsi que des semaines gastronomiques sur la châtaigne (Moretti, 2006). La création de produits issus de la transformation de châtaignes a donné une valeur tant économique qu'émotionnelle à ces fruits.

Les dernières années il y a eu beaucoup de restaurations effectuées par des privés, sans faire appel à l'aide financière de la Confédération. Toutes ces mesures ont permis d'avoir actuellement une surface globale de châtaigniers de 17'153 ha (forêts et cultures toutes confondues) (Ceschi, 2014) ; comme la plupart de ces hectares est de la forêt, la superficie des vergers pourrait sembler petite mais, comme la restauration des châtaigniers est en continuelle évolution, la surface devrait être beaucoup plus importante dans un proche avenir.

Pour un processus de restauration, il faut prévoir quatre phases. La première est le nettoyage de la forêt de châtaigniers pour tenter d'obtenir la structure qu'il y avait au départ. Pour cette phase, il faut normalement rester dans la quantité de 80 – 120 arbres par hectare (Scheggia, 2006) en éliminant tout arbre non intéressant, par exemple ceux trouvant leur origine dans des plantes sauvages non désirées ou encore ceux perturbant la bonne croissance des plantes désirées. Pour cette phase, les coûts sont de l'ordre de 1.50 – 3 francs par mètre carré (Scheggia, 2006).

La deuxième phase est la taille. Cette opération consiste à essayer de donner aux arbres une forme élancée, ce qui leur permettra d'avoir une bonne croissance. Il y a plusieurs typologies de taille qui dépendent de l'état de l'arbre en question. Les coûts pour cette phase varient selon le besoin de la plante (Scheggia, 2006).

La troisième phase est la reconstitution du « gazon » propice aux châtaigniers, car s'il n'y a pas le bon tapis d'herbes, le châtaignier peinera à pousser. La création de cette surface se fait à l'aide de semis idéal pour le châtaigner qui coûte entre 0.30 et 1.30 francs au mètre carré (Scheggia, 2006).

La dernière phase de la restauration est l'installation de nouveaux arbres de châtaigniers là où il y en a besoin (p.ex. les aires inutilisées dans la forêt). Si les arbres sont très jeunes il va falloir mettre en place des mesures de protection contre les éventuelles attaques de la faune forestière. Les coûts varient entre 150 et 300 francs par plante, tout dépend de son âge et du degré de protection nécessaire (Scheggia, 2006).

## **1.8 Maladies et ravageurs principaux**

Le châtaignier, comme toute autre plante existante, peut être attaqué par des ravageurs ou être affecté par des maladies. Les trois organismes qui suivent (cf. 1.8.1 ; 1.8.2 et 1.8.3) sont ceux qui ont causé le plus de dégâts ces dernières années.

### **1.8.1 *Cryphonectria parasitica* (Murr.)**

Le premier organisme qui crée encore de nos jours des dégâts majeurs est un ascomycète, venant du Moyen Orient, nommé *Cryphonectria parasitica* (Murr.). Ce champignon cause le chancre de l'écorce du châtaignier. Ce n'est pas par hasard qu'il est décrit en premier car c'est l'organisme qui a créé les dégâts les plus importants aux populations de châtaigniers.

Les plantes hôtes de cet ascomycète sont toutes les espèces du genre *Castanea*, avec la préférence pour *C. dentata* et *C. sativa*.

Le premier continent à repérer cet ascomycète fut l'Amérique du Nord à la fin du XIX siècle. La dispersion de *C. parasitica* a ensuite continué durant les 50 années suivantes en contaminant toutes les zones de châtaigniers. En 1938, à Genova (IT), ce champignon fut observé pour la première fois en Europe et à la fin de 1960, la plupart des cultures de châtaigniers situés au sud de l'Europe furent contaminés par *C. parasitica* (Smith et al., 1997).

La propagation des spores peut être effectuée par le vent, la pluie ou par un vecteur vivant, tel que oiseaux ou coléoptères. Si les conditions sont favorables, le champignon peut vivre jusqu'à 10 mois dans l'arbre (Smith et al., 1997). Une fois transporté, le champignon peut pénétrer dans l'arbre à travers une fissure, une blessure, un greffage mal effectué, etc.

Les symptômes de cette maladie sont la mort de la région autour de la zone attaquée ainsi qu'un flétrissement suivi d'un brunissage des feuilles, qui restent attachées à l'arbre. Ces symptômes peuvent être confondus avec ceux causés par *P. cambivora* (responsable de la maladie de l'encre). C'est pour cela qu'il est difficile de tirer des conclusions à ce stade. Le signe caractéristique d'une attaque de *C. parasitica* est l'induction de cancers sous les tiges ou sur le tronc de l'arbre. La particularité de ces zones est que sous les endroits développant des cancers, le feuillage peut rester sain et, après un certain temps, la formation de nouvelles pousses peut se remettre en marche. La maladie de l'encre, au contraire, est beaucoup plus destructive : la partie attaquée meurt définitivement et il n'y a plus de possibilité de voir pousser des nouveaux organes (Smith et al., 1997).

Ce champignon a causé des dégâts monstrueux, comme durant la période entre 1904 et 1940 aux Etats-Unis, causant la perte quasi totale de *C. dentata*. A partir de sa découverte en Italie, la majorité des cultures situées au sud de l'Europe ont ainsi été contaminées (Smith et al., 1997).

Pour lutter contre cet ascomycète, il faut utiliser des méthodes prophylactiques comme le choix de matériel sain ou encore, l'enlèvement des branches manifestant des symptômes d'attaque pour réduire la présence de l'inoculum. De plus, il y a eu la mise en culture d'hybrides potentiellement résistants, en croisant les espèces



sensibles avec des variétés Asiatiques résistantes. En Suisse, à partir de 1950, un programme de sélection visant à établir un éventail d'arbres résistants à *C. parasitica* a été mis en place. A ces jours, des variétés plus résistantes, issues d'hybrides, ont été commercialisées, mais leur résistance n'est guère plus élevée, tant que la garantie d'immunité face à ce champignon n'est pas assurée. Selon Smith et al., il n'existe pas encore sur la planète un arbre résistant à *C. parasitica* (Smith et al., 1997).

### **1.8.2 *Phytophthora cambivora* (Petri) et *P. cinnamomi* (Rands)**

Les deux espèces du genre *Phytophthora* décrites ci-après sont les causes de la maladie de l'encre du châtaignier. Cette maladie peut être causée uniquement par ces deux espèces : *P. cambivora* et *P. cinnamomi*. Ces champignons pénètrent par les racines, ce qui signifie que même la destruction du matériel végétal contaminé ne pourra pas garantir la destruction des champignons et l'immunité face à la maladie car, si les spores sont bien distribuées dans le sol, elles pourront toujours s'infiltrer dans la plante saine. Lorsque le sol a une bonne teneur en eau, la propagation des spores serait facilitée.

Signalée pour la première fois en 1824 aux Etats Unis et en 1838 au Portugal, la maladie de l'encre a détruit des quantités énormes de châtaigniers surtout entre la fin du XIXème et la première partie du XXème siècle (Pron and Sormani, 2004).

Le premier symptôme qui apparaît est le jaunissement précoce des feuilles, avec les bogues qui finissent rarement le processus de maturation. Pour être sûr de bien déterminer la maladie, il faudrait décortiquer un bout d'écorce : s'il y a des nécroses de couleur brun foncé à noir, de forme triangulaire, il s'agit malheureusement de la maladie de l'encre. Le nom de cette maladie vient de toute façon d'une autre caractéristique symptomatique : la zone du sol autour des racines de la plante infectée prend une couleur bleuâtre suite à des exsudats racinaires qui donnent cette couleur d'encre. Une fois la plante attaquée, sa durée de vie se situe entre 1 et 3 ans (Pron and Sormani, 2004).

Comme pour *C. parasitica*, il n'y a pas de véritables méthodes de lutte. Il y a, au contraire, des mesures préventives pour limiter les probabilités d'attaque. Ces méthodes peuvent aller de l'achat du matériel sain au contrôle constant de la qualité de l'eau ainsi que des sols. Un contrôle constant des plantes est nécessaire car, s'il y a la découverte d'un individu manifestant les symptômes de la maladie, il faut

procéder à l'enlèvement des parties malades (voir de toute la plante) pour essayer de stopper la propagation des champignons.

### **1.8.3 *Dryocosmus kuriphylus* (Yasumatsu)**

Le dernier de ces trois organismes est connu comme Cynips du Châtaignier. Ce petit hyménoptère de couleur noir est présent en Chine (apparemment c'est son lieu d'origine (Bosio and Vettorazzo, 2005)), Japon, Etats Unis et Corée. En ce qui concerne sa présence au Tessin, il a été repéré la première fois en 2009 ; en Italie, à Cuneo pour être précis, il a été trouvé la première fois en 2002.

Le cynips effectue une seule génération par année. La particularité de cette génération est la prédominance quasi totale de la femelle qui peut se reproduire par parthénogénèse. La femelle pond des grappes d'œufs (environ 3-5 œufs par grappe) et, en moyenne, elle peut pondre une totalité de 100 œufs dans les bourgeons. Il y a déjà eu le cas de la présence de 30 œufs dans un seul bourgeon (Bosio and Vettorazzo, 2005). Les œufs éclosent dans les bourgeons après 30 – 40 jours pour ensuite hiverner au stade de larve. L'hivernation est très lente.

La plante hôte principale de cet hyménoptère est le châtaignier européen (*Castanea sativa*) mais si cet arbre ne vit pas sur les lieux, les autres espèces du même genre (p. ex. *C. crenata* ou *C. dentata*) peuvent le remplacer (Bosio and Vettorazzo, 2005).

Les dégâts causés par le cynips sont essentiellement des galles, vertes ou roses avec un diamètre variable entre 5 et 20 mm sur les nouvelles pousses ou sur les feuilles. Au détriment de l'arbre, ces galles assurent le déroulement du cycle vital des larves, qui dure entre 20 et 30 jours (Bosio and Vettorazzo, 2005). Comme la galle attaque toute la nouvelle pousse, les futurs organes contenus en elle et qui se préparaient à se différencier cessent souvent leur développement végétatif. Cet arrêt de croissance peut endommager la formation de la fleur femelle pour finalement causer une perte considérable de fruits, stoppés dans leur développement. Le degré d'endommagement de l'arbre est proportionnel à la quantité de galles présentes. Chez certains producteurs, le pourcentage de perte de fruits causé par le cynips est de 70%. Le problème de la détection est qu'une fois que la galle est visible, c'est déjà trop tard. Il faudrait repérer l'attaque avant l'éclosion des œufs mais cette action est impossible.

En ce qui concerne la lutte contre le cynips du châtaignier, des méthodes biologiques sont en place. Mise à part la mesure prophylactique de destruction du matériel attaqué par les galles, l'utilisation de l'hyménoptère *Torymus sinensis* s'avère être très efficace. Ce petit insecte est un parasitoïde qui consomme avec plaisir le cynips et même si son introduction dans l'agrosystème a été très discutée par le Gouvernement fédéral, les effets positifs qui ont suivi cette introduction attirent l'attention de tout le monde aujourd'hui.

Ces toutes dernières années, les Japonais et les Coréens ont mis en place des cultivars résistants au cynips. Ces plantes pourront aussi être considérées comme une alternative valable en Europe, si *Torymus sinensis* ne devait pas se montrer efficace à long terme. Pour le moment, cet insecte a donné des résultats très satisfaisants et laissent augurer le sauvetage des variétés typiques du Canton du Tessin. A côté de ces techniques, la lutte préventive contre le cynips reste de toute façon encore obligatoire et on a l'interdiction de transporter ou importer/exporter du matériel qui pourrait être contaminé.

### **1.9 Un nouvel agent pathogène : *Gnomoniopsis smithogilvyi***

Comme si *C. parasitica*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi* et *D. kuriphilus* n'avaient pas causés suffisamment de dégâts dans les populations de châtaigniers, un nouvel agent pathogène vient d'être découvert. Il s'agit d'un champignon : *Gnomoniopsis smithogilvyi*. Ce champignon est l'agent responsable de la pourriture brune du châtaignier et, dernièrement, il a été considéré aussi comme étant une source du chancre. Cette dernière maladie est causée, principalement, par *Cryphonectria parasitica* (c.f. 1.8.1) mais des essais récents, plus approfondis, ont montré que *G. smithogilvyi* était aussi présent là où il y avait le chancre (Dar and Rai, 2015; Pasche et al., 2016a). L'étude menée en Inde par Dar et Rai a notamment montré que dans les pépinières analysées, il y a eu 80% de pertes dues au chancre ; ce chancre, après avoir été analysé, a été attribué à *Gnomoniopsis smithogilvyi*. A ce sujet, il y a eu beaucoup de confusion, car selon les experts le chancre du châtaignier était (et est) le symptôme d'une attaque de *C. parasitica*. Maintenant, il y a la prise de conscience que l'agent responsable de cette maladie pourrait aussi être *G. smithogilvyi*, comme déjà supposé par Pasche en 2013 et confirmé ensuite en 2016. Lors de l'essai mis en place par Pasche, il y a eu la découverte qu'au sein de la même espèce de *G. smithogilvyi* il y avait plusieurs différences, dépendantes de la région où le champignon avait été identifié (Pasche et al., 2016a). Les

différences peuvent être repérées dans le tableau cité en annexe 1. Toute information présente dans le tableau est issue du travail de Mlle Pasche.

Ce champignon est un endophyte, ce qui veut dire qu'il est présent à l'intérieur de la plante. Il est donc possible de le retrouver dans l'écorce de rameaux, tiges ainsi que dans les pédoncules des bogues. Des essais effectués en 2010 ont aussi montré sa présence dans les galles causés par *Dryocosmus kuriphilus* (Magro et al., 2010).

## 2. La pourriture brune du châtaignier

### 2.1 Description et symptomatologie

La pourriture brune du châtaignier est une maladie qui est devenue très problématique à partir de 2005 et 2006, lorsque l'on a constaté la pourriture dans les châtaignes durant les périodes de récolte. Ces phénomènes de pourriture massive sont apparus en Europe, premièrement à Cuneo (Italie) pour ensuite migrer et coloniser d'autres régions. En 2011, les mêmes symptômes sont apparus au Tessin (Bosio G., 2012).

Cette maladie attaque essentiellement les fruits ; c'est donc à ce niveau que les symptômes sont censés apparaître. Les signaux d'un développement de cette pourriture se manifestent par la formation de petites taches sur l'endosperme de la châtaigne ainsi que par une mutation de la couleur et de la consistance du fruit : de couleur jaune il devient blanchâtre et spongieux (Dennert et al., 2015). Les agents responsables de cette maladie peuvent être en nombre de trois : *Gnomoniopsis smithogilvyi*, *Phomopsis castaneae* ou *Amphiportha castanea*.

### 2.2 Les agents responsables

#### 2.2.1 *Gnomoniopsis smithogilvyi* (Shuttleworth et al.)

##### 2.2.1.1 Taxonomie

**Règne :** *Fungi*

**Division :** *Ascomycota*

**Classe :** *Sordariomycetes*

**Ordre :** *Diaporthales*

**Famille :** *Gnomoniaceae*

**Genre :** *Gnomoniopsis*

**Espèce :** *smithogilvyi*

Source : NCBI

##### 2.2.1.2 Historique du champignon

Les champignons du genre *Gnomoniopsis* ne sont pas seulement des pathogènes pour les châtaigniers mais ils attaquent aussi des plantes à baies, comme les myrtilles ou les fraises, ainsi que des arbres à vocation paysagère, comme le chêne (*Q. rubra*) en engendrant des pertes économiques non négligeables (Visentin et al.,

2012a). Bien que la pourriture brune du châtaignier soit présente depuis la deuxième moitié du 19<sup>ème</sup> siècle (Spegazzini, 1879) c'est seulement à partir de 2008 que cette maladie sera attribuée à *G. smithogilvyi* par une étude effectuée en Nouvelle Zélande (Visentin et al., 2012a). Cette maladie sera ensuite également attribuée à ce champignon en Italie (à Cuneo, en Piémont) à partir de la même année. C'est la première fois que ce champignon est repéré en Europe et, à partir de là, il n'a pas cessé de se développer et de coloniser région après région.

Récemment, des traces de ce champignon ont été retrouvées lors de symptômes du chancre du châtaignier. Selon une étude établie en Inde (Dar and Rai, 2015) la majorité des pépinières (80%) qui cultivent les châtaigniers sont infectées par un pathogène qui cause un chancre sur l'écorce. Après avoir analysé les régions ITS de l'ARN ribosomal, Dar et Rai (2015), ils ont pu identifier *Gnomoniopsis castanea* (syn. *Gnomoniopsis smithogilvyi*). Les symptômes de ce chancre ont été observés sur les jeunes pousses, tiges et branches (Dar and Rai, 2015). Une étude visant à identifier la présence de *G. smithogilvyi* dans les plantes présentant des symptômes du chancre a aussi été menée dans les Cantons du Tessin et de Genève en 2013 (Pasche et al., 2016a). Cette étude a effectivement eu pour conclusion que dans des souches de chancre, il y avait la présence de ce champignon ; à ce propos, différentes souches de champignons de l'espèce *Gnomoniopsis smithogilvyi* ont été retrouvées. Les différences étaient moindres, mais ils ont eu la constatation que, entre le Canton du Tessin et le Canton de Genève, les deux *Gnomoniopsis* n'étaient pas exactement les mêmes (Pasche et al., 2016a).

### **2.2.1.3 Description**

Le périthèce de ce champignon a été observé pour la première fois en Australie sur des branches mortes ainsi que sur la face interne des bogues. Il est abondant, sans stroma, de couleur noir et il peut être retrouvé seul ou dans des foyers de 25. Les mesures moyennes sont de l'ordre de 238 µm de hauteur pour un diamètre de 242 µm (Shuttleworth L.A. et al., 2012).

**Figure 10: le périthèce de *G. smithogilvyi***



Source : Shuttleworth et al., 2012

Les asques, c'est à dire les cellules reproductrices des ascomycètes, sont ovoïdes ou cylindriques, à l'apparence vitreuse. Les asques mesurent environ 31  $\mu\text{m}$  de longueur pour un diamètre de 5  $\mu\text{m}$  ; elles ont un anneau apical visible d'environ 1-2  $\mu\text{m}$  (Shuttleworth L.A. et al., 2012). Chaque asque contient 8 ascospores.

**Figure 11: les asques de *G. smithogilvyi***

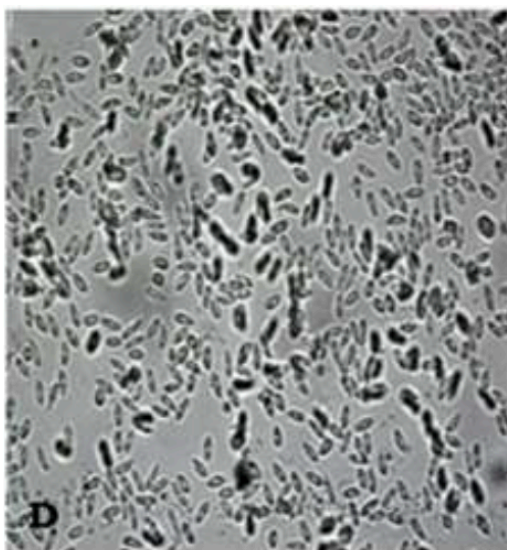


Source : Shuttleworth et al., 2012

Les ascospores, droites ou légèrement courbés ont, en moyenne, une longueur de 7  $\mu\text{m}$  et un diamètre de 2  $\mu\text{m}$  (Shuttleworth L.A. et al., 2012).

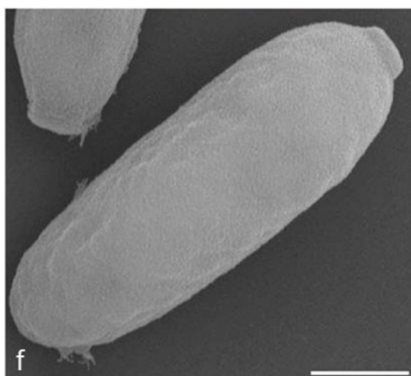
Les conidies, de forme ovale ou fusiforme, sont généralement tout droites ou, comme pour les ascospores, légèrement courbées. Les mesures dépendent du milieu de culture utilisée : pour le PDA elles sont de l'ordre de 7.5  $\mu\text{m}$  de longueur et 3  $\mu\text{m}$  de largeur (Shuttleworth L.A. et al., 2012).

**Figure 12: les conidies de *G. smithogilvyi***



Source : Dar and Rai, 2015

**Figure 13: une conidie de *G. smithogilvyi***



Source : Pasche, 2016

Pour plus de renseignements sur les mesures voir l'annexe 1.

#### **2.2.1.4 Ecologie**

En ce qui concerne l'écologie de ce champignon, il a été constaté qu'il hiverne comme saprophyte dans les parties mortes (par exemple dans les bogues sèches) mais il peut aussi bien hiverner dans les branches de tous les arbres du genre *Castanea* (Shuttleworth L.A. et al., 2012). Son développement optimal s'effectue à une température située entre 17°C et 26°C (Bosio G., 2012).

#### **2.2.1.5 Cycle d'infection**

Le champignon peut hiverner dans la plante comme saprophyte ; ce fait lui permet d'avoir déjà une « base » d'inoculum au moment de la reprise végétative de l'arbre la saison d'après. Les contaminations peuvent donc être très efficaces (Shuttleworth L.A. et al., 2012).



### 2.2.1.6 Symptômes

Les symptômes apparaissant après une contamination du champignon peuvent être divers. En ce qui concerne les fruits, il y a généralement une mutation de la texture et de la couleur de l'endosperme : de la couleur jaunâtre, le fruit tend à devenir blanchâtre et spongieux (Dennert et al., 2015), comme momifié ; des lésions brunes peuvent être présentes dans le fruit (Pasche, 2013).

**Figure 14: symptômes sur fruits**



Source : Shuttleworth et al., 2012

Sur les tiges et les branches, il ne peut y avoir des dégâts visibles à l'œil nu que si la maladie engendrée est le chancre, car la pourriture brune à des effets néfastes seulement sur les fruits. Dans le cas du chancre, des fissures régulières seront visibles dans l'écorce ; dans le pire des cas, ces fissures peuvent atteindre le xylème (Dar and Rai, 2015).

## 2.2.2 *Phomopsis endogena* (Speg.)

### 2.2.2.1 Taxonomie

**Règne :** *Fungi*

**Division :** *Ascomycota*

**Classe :** *Sordariomycetes*

**Ordre :** *Diaporthales*

**Famille :** *Valsaceae*

**Genre :** *Phomopsis*

**Espèce :** *endogena*

Source : NCBI

### 2.2.2.2 Description

En ce qui concerne la description de ce champignon, il a été très difficile d'obtenir des informations. Le seul témoignage fiable concernant sa morphologie date de 1879 et concerne son ascocarpe. L'ascocarpe de *P. endogena* est un périthèce de forme ovale et de couleur grisâtre. Sa dimension est de l'ordre de 150 – 200  $\mu\text{m}$ .

L'ascocarpe de champignon peut être retrouvé sur les tissus membraneux des cotylédons de la plante infectée (Saccardo, 1879).

Des essais menés en Nouvelle Zélande ont montré que, à l'intérieur de leurs châtaigniers, ce champignon se retrouve avec une présence de l'ordre de 92% (Stewart and Knowles, 2000) mais que, au contraire, il n'a pas été détecté à l'extérieur (Osmonaliev et al., 2000). Ce champignon, endophyte, était notamment présent dans toutes les parties de l'arbre : feuilles, fleurs, pousses et branches, mais c'est dans l'écorce la plus âgée que le pourcentage fut le plus élevé (Osmonaliev et al., 2000). D'après Washington et al. (1997), ce champignon pénètre dans la châtaigne par le pédoncule ou plus simplement par une blessure du fruit (Washington et al., 1997). La maladie qu'il engendre est bien la pourriture brune mais il cause aussi des nécroses sur les chatons du châtaignier (Stewart and Knowles, 2000).

### **2.2.3 *Amphiporthe castanea* (Tul.)**

#### **2.2.3.1 Taxonomie**

**Règne :** *Fungi*

**Division :** *Ascomycota*

**Classe :** *Sordariomycetes*

**Ordre :** *Diaporthales*

**Famille :** *Valsaceae*

**Genre :** *Amphiporthe*

**Espèce :** *castanea*

Source : NCBI

#### **2.2.3.2 Description**

Cet ascomycète a un stroma dispersé sur la plante hôte, en particulier dans l'écorce, en présentant des pustules visibles. La couleur du stroma varie entre le gris et le brun – noir, son diamètre est de l'ordre de 0.2 – 2 millimètres (Kinsey, 2014).

L'ascocarpe est un périthèce dont le diamètre se situe entre 200 et 500 µm. Sa forme est globuleuse sa couleur est noire. Son cou long peut atteindre les 700 µm. Sa forme est souvent oblique (Kinsey, 2014).

Les asques ont en moyenne une dimension de 60 x 10 µm. Leur forme est claviforme et chaque asque contient 8 ascospores fusiformes d'une dimension moyenne de 13 x 2.5 µm (Kinsey, 2014).

Les conidies de ce champignon sont de deux types: *alpha* et *beta*. Les premières sont ovoïdes avec une dimension moyenne de l'ordre de 8 x 5 µm, avec un côté aigu et l'autre obtus ; les conidies de type *beta* sont par contre plus grandes (en moyenne : 15 x 2 µm), fusiformes et droite, sans différences entre les deux côtés (Kinsey, 2014).

Ce champignon attaque le plus souvent les cotylédons qui, une fois infectés, changent leur couleur ; ils virent à l'ocre pâle (voir orange). Une caractéristique de ce champignon est le fait de causer une formation massive de pycnides, c'est à dire de structures reproductives du champignon sur la surface des cotylédons (Conedera et al., 2004b). *A. castanea*, d'après Bissegger et Sieber (1994), peut être considéré comme un parasite de faiblesse qui, pénétrant dans l'arbre par des blessures, peut causer des dépérissements ainsi que du chancre (Bissegger and Sieber, 1994).

### **3. Méthodes de lutte alternative contre les maladies fongiques chez le châtaignier**

Les méthodes de lutte biologique ne sont pas une nouveauté en ce qui concerne la gestion des maladies fongiques chez le châtaignier ; l'hypovirulence, c'est à dire le phénomène avec lequel la virulence est réduite par l'emploi d'un hypovirus, est par utilisé en Europe depuis les années 1960 (Peever et al., 2000). En nature les virus infectant *C. parasitica* peuvent être transmis que par anastomose, c'est à dire le processus par lequel il y a fusion des hyphes des champignons (Anagnostakis, 2001; Seccedil il, 2012). Avec cette fusion, les champignons impliqués seront en mesure de partager tout leur matériel nucléaire et cytoplasmique (Glass, 2004). De toute façon, l'utilisation des hypovirus en ce qui concerne la lutte biologique est malheureusement compliquée : pour lutter biologiquement avec l'hypovirulence il faut savoir exactement quelle est la souche virulente principale de *C. parasitica* qu'il y a dans l'environnement. Cette nécessité est due au fait que la souche hypovirulente doit reconnaître une souche virulente compatible de *C. parasitica* pour pouvoir transmettre le virus. S'il n'y a pas l'utilisation de la bonne souche hypovirulente (qui ne sera donc pas capable de transmettre le virus) la méthode ne marchera pas (Lee et al., 2006; Lefort, 2016; Trestic et al., 2001).

En 2001, Anagnostakis a mis en place un essai visant le contrôle de la maladie causée par *C. parasitica* avec un virus hypovirulent (Anagnostakis, 2001). A la fin de l'essai, la conclusion a été que, même si l'incidence du champignon était encore élevée, la sévérité a été très redimensionnée (Anagnostakis, 2001). En 2006, une

équipe chinoise a mis en place un essai visant la protection du châtaignier contre *C. parasitica*. Cette étude a évalué six souches hypovirulentes et a également conclu que la sévérité de la maladie a été redimensionnée après avoir utilisé ces souches (Ding et al., 2007). De même, une étude effectuée par une équipe franco-suisse en 2009, a évalué l'efficacité de la souche hypovirulente *CHV-1* contre *C. parasitica* (Robin et al., 2010). Le but de cette étude était d'évaluer si la souche *CHV-1*, déjà reconnue comme efficace dans de précédentes études, avait un développement autosuffisant. Pour ce faire, une souche a été lâchée dans plusieurs sites pour évaluer et tester son vrai potentiel. Cet essai s'est démontré très satisfaisant car les champignons infectés par la souche hypovirulente ont eu une croissance très ralentie ou inférieure par rapport aux non infectés (Robin et al., 2010). A ce sujet, d'autres essais ont été effectués ; ces études confirment l'efficacité des souches hypovirulentes *CHV-1* contre *C. parasitica* (Peters et al., 2014; Trestic et al., 2001; Turina et al., 2006; Zamora et al., 2014).

En Corée, en 2006, ils ont mené une expérience visant à évaluer l'efficacité de 3 souches hypovirulentes, KCPH-22, KCPH-135 et KCPH-136 contre *C. parasitica*. Les trois souches se sont en effet révélés être efficaces contre *C. parasitica* (Lee et al., 2006).

D'autre part, une étude menée en 2011 visait à décrire l'effet d'une souche mutée d'ADN qui était associée à une hypovirulence mais qui était par ailleurs contenue dans un morceau normalement sans hypovirus. Ce morceau a été catalogué comme KFC9 et il a été obtenu en nature (Baidyaroy et al., 2011). Cet essai a montré qu'avec une mutation il est possible d'ajouter un gène hypovirulent dans une souche que normalement ne l'est pas. Dans cette étude, l'hypovirus ajouté a été catalogué comme InC9 (Baidyaroy et al., 2011).

Une autre façon de gérer les maladies fongiques est l'utilisation de variétés résistantes. Une étude établie par Dinis et al. en 2011 a en effet démontré combien l'utilisation de variétés résistantes à *P. cinnamomi* peut drastiquement réduire l'incidence et l'effet de la maladie de l'encre (Dinis et al., 2011). Dans cette étude, il y a eu l'utilisation de la variété *Judia* (non résistante à *P. cinnamomi*) ainsi que les variétés résistantes *Ca90* et *C. crenata x C. sativa*. Après 30 jours, le 87.5% des plantes de variété *Judia* étaient mortes ; après seulement 16 jours le potentiel hydrique des feuilles était réduit de 92.9%. Les deux variétés résistantes au contraire ont toutes survécu (Dinis et al., 2011).

L'hypovirulence est donc un sujet d'actualité en ce qui concerne la lutte biologique face aux champignons pathogènes. Malheureusement, son efficacité face à *G.*

*smithogilvyi* n'a pas encore été confirmée. Si la première partie de ce travail vise à déterminer la présence de *G. smithogilvyi* sur le châtaignier, la deuxième partie veut contribuer à améliorer la protection phytosanitaire en utilisant soit des champignons, soit des bactéries, ceci afin de pouvoir évaluer s'il y a une potentialité de lutte parmi ces organismes, en s'éloignant de l'utilisation d'hypovirulences. Cette voie pourrait ainsi permettre d'œuvrer dans de nouveaux domaines d'études autres que l'hypovirulence.

## **Première partie – matériels et méthodes**

# 1. Analyse de la présence de *Gnomoniopsis smithogilvyi* dans les fruits et porte-greffes de châtaignier

## 1.1 Variétés utilisées

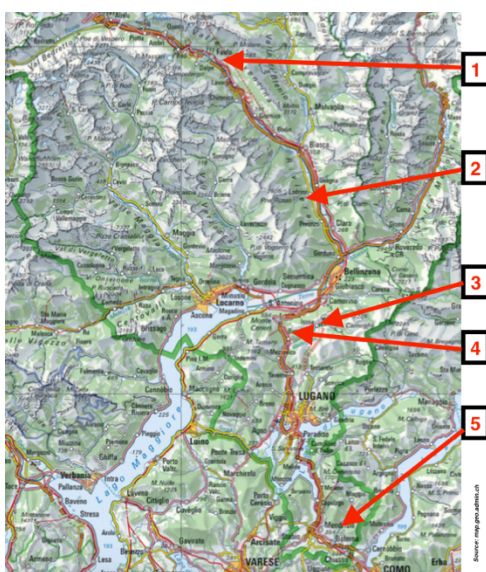
Les variétés de châtaignes utilisées dans cette étude sont au nombre de 6. Parmi ces 6 variétés il y a 3 variétés de marrons ou *Marroni* (Marrone Michelangelo, Bouche de Bétizac et Marrone Lattecaldo) et 3 variétés de châtaignes (Giacco, Torcione Nero et Lüina). Les variétés ont été récoltées à plusieurs endroits dans le Canton du Tessin car certains facteurs, comme l'altitude, ont une influence sur la présence ou pas d'une telle variété à un tel endroit. La variété « Bouche de Bétizac » a été achetée en Italie.

Tableau 1: liste variétale

Code	Variété
V1	Lüina
V2	Giacco
V3	Torcione Nero
V4	Michelangelo
V5	Marrone Lattecaldo (selva)
V6	Bouche de Bétizac

### 1.1.1 Lieux d'échantillonnage des variétés

Figure 15: Lieux de récolte des châtaignes



Source : map.geo.admin.ch

La carte géographique (fig. 15) précise les 6 endroits où les châtaignes ont été récoltées. Le tableau 2 précise les variétés récoltées en ces 6 endroits.

**Tableau 2: Lieux de récolte et variétés récoltées.**

N° sur carte	Lieu	Variétés
1	Chiggiogna	<i>Lüina</i>
2	Lodrino	<i>Lüina</i>
3	Isonne	<i>Giacco</i>
4	Rivera	<i>Torcione Nero</i>
5	Lattecaldo	<i>M. Lattecaldo, M. Michelangelo</i>

## 1.2 Zone de l'étude

### 1.2.1 Informations pédologiques

Les caractéristiques principales des sols de la Suisse méridionale ont été obtenues de la base de données de l'Office Fédéral de Topographie « swisstopo » et sont résumées dans le tableau 3.

**Tableau 3: Caractéristiques pédologiques des lieux de récolte des châtaignes**

Géocatalogue	Endroit de récolte				
	Chiggiogna	Lodrino	Isonne	Rivera	Lattecaldo
Classification des roches	Cristallines	Cristallines	Cristallines	Cristallines	Sédimentaires
Groupes lithologiques	Gneiss	Gneiss	Gneiss	Gneiss	Schistes calcaires
Origine des roches	Métamorphiques	Métamorphiques	Métamorphiques	Métamorphiques	Biogènes et clastiques
Capacité de rétention hydrique	Faible	Très faible	Faible	Faible	Faible
Permeabilité	Excessive	Excessive	Normale	Normale	Légèrement ralentie

### 1.2.2 Données climatiques

Les données climatiques propres à la zone d'étude ont été réunies à partir de trois stations météorologiques du Tessin ([www.agrometeo.ch](http://www.agrometeo.ch)). Les paramètres évalués sont : évapotranspiration potentielle (ETP) (mm) ; rayonnement (WH/m<sup>2</sup>) ; précipitations totaux (mm) ; humidité moyenne (%) et température moyenne (°C). Les données concernent la période novembre 2014 - novembre 2015 et elles y sont



cataloguées par mois. Les graphiques relatifs à ces données se trouvent en annexe. En ce qui concerne ETP et rayonnement il n'y a pas de données pour la station de Mezzana.

Dans l'ensemble, le climat du Tessin est caractérisé par des hivers peu rigoureux, des précipitations neigeuses de plus en plus rares ainsi que des étés de plus en plus chauds et étouffants, avec des journées qui atteignent facilement les 35°C. Les saisons intermédiaires entre hiver et été sont par contre assez douces.

### **1.3 Matériel**

Pour l'évaluation de la présence de *G. smithogilvyi*, le matériel végétal suivant a été récolté:

- 3 plantes « porte-greffes » entières par « variété » ; on ne peut parler de variété en sens strict car les fruits utilisés pour la production des porte-greffes sont issus d'une fécondation entre un arbre mère, de variété certifiée, et un arbre sauvage, de variété non certifiée. Cette fécondation donne naissance à un fruit génétiquement proche, mais cependant différent de la variété de l'arbre mère. De chaque plante porte-greffes il y a eu le prélèvement de 2 feuilles et de la jeune pousse apicale. Les feuilles et la pousse ont ensuite été broyées ensemble. Concernant la variété « *Bouche de Bétizac* », il n'a été possible que la récolte de 2 plantes porte-greffes.
- 10 radicules germées par variété à partir de châtaignes entreposées en chambre froide en août 2015, soit un total de 60 radicules.
- 41 pousses germées à partir de châtaignes entreposées en chambre froide en août 2015 ; il n'a pas été possible d'analyser 10 pousses par variété, comme souhaité au départ, car la germination a été, dans certains cas, inefficace.
- 10 couples porte-greffes / greffons par variété, soit un total de 112 échantillons (la variété *Bouche de Bétizac*, a été analysée sur seulement 6 greffons et 6 porte-greffes). Cette analyse particulière avait pour but de déterminer l'origine de l'infection. Si le champignon provient de l'arbre mère, il sera présent majoritairement dans les greffons. Si l'infection est d'origine différente, alors le champignon sera aussi présent dans les porte-greffes. Les analyses de ces couples ont été réalisées afin de se rapprocher au maximum de la pratique en pépinière.

Globalement, l'analyse de la présence de *G. smithogilvyi* a été effectuée sur 230 échantillons. *Cryphonectria parasitica* a également été recherché sur ces mêmes 230 échantillons par un test de diagnostic moléculaire spécifique.

Le fait que ce matériel végétal provienne d'une production gérée par une seule et même personne est une garantie de réduction des biais qui auraient pu être introduits par des différences de méthode de culture. Par ailleurs le matériel végétal prélevé à la pépinière cantonale n'a pas été traité avec le fongicide utilisé normalement. Ce choix était justifié par le désir de pouvoir effectuer et permettre des essais sans aucun type de traitement et d'évaluer la mortalité effective ainsi que les dégâts en pépinière. Si les échantillons avaient été traités par un fongicide cela aurait diminué les chances de trouver le champignon.

Une analyse complémentaire visant à analyser de 25 galles du châtaignier venant du Valais a aussi été menée. Le matériel a été fourni par Simone Prospero et Joana Meyer, de l'*Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage*.

## **1.4 Méthodes**

### **1.4.1 Description du dispositif expérimental**

#### **1.4.1.1 Sur le terrain**

La récolte, par variété, de 3 plantules entières (sources de feuilles et pousses) et de 10 châtaignes a été réalisée à la pépinière cantonale tessinoise (Lattecaldo). Les châtaignes ont été entreposées en automne 2015. Les plantules ont été choisies sur la ligne en utilisant une table de nombres aléatoires pour avoir un décalage suffisant entre les plantes. Concernant les couples porte-greffe–greffon, les échantillons des porte-greffes ont été récoltés à la pépinière ; les greffons ont été par contre prélevés à différents endroits dans les forêts du Canton du Tessin, selon la variété finale désirée.

#### **1.4.1.2 En laboratoire**

Les différents échantillons végétaux ont été traités en laboratoire selon les méthodologies suivantes :

Les feuilles prélevées sur les porte-greffes issus de châtaignes semés en 2015 ont été préalablement découpées pour leur enlever la nervure centrale ; puis elles ont été broyées à l'azote liquide avec les jeunes pousses. Les broyages ont été

effectués en séparant les échantillons par plante analysée. Le broyage était suivi de l'extraction de l'ADN. L'évaluation de la présence du champignon a ensuite été effectué avec l'amplification PCR selon un protocole développé au laboratoire du groupe *Plantes et Pathogènes* de Lullier (Lefort et al., 2014).

L'analyse des châtaignes a été effectuée sur des fruits récoltés en automne 2015 et ensuite stockés dans de la tourbe en chambre froide pour leur permettre de germer. Le prélèvement de ces fruits pour l'analyse a été effectué en février 2016. Ce fait a permis d'échantillonner des fruits ayant déjà une radicule et une pousse: La radicule et la pousse ont été prélevées et broyées à l'azote liquide. L'ADN extrait ensuite a été utilisé pour les tests par amplification PCR.

Les couples greffons et porte-greffes ont été traités de la même façon.

#### **1.4.2 Développement d'un test de diagnostic moléculaire spécifique pour l'identification de *G. smithogilvyi***

La biologie moléculaire permet de développer des tests de diagnostics moléculaires spécifiques pour détecter la présence d'un organisme. C'est donc cette méthode qui a été choisie pour évaluer la présence de *Gnomoniopsis smithogilvyi*.

Comme le test de diagnostic moléculaire spécifique pour l'identification de *G. smithogilvyi* n'existait pas, il a donc fallu le développer en analysant les séquences d'ADN disponibles pour l'espèce et le genre. Afin de développer des amorces d'amplification spécifiques 3 régions exploitables de l'ADN ont été analysés : « internal transcribed spacer ITS », « Beta-tubulin » et « Elongation factor 1-alpha ». La région qui a montré le plus grand nombre de différences en nucléotides entre *G. smithogilvyi* et tous les autres champignons du genre *Gnomoniopsis spp.* a été celle du gène de la beta-tubuline. Les amorces spécifiques ont donc été développées sur cette région. Après alignement et analyse de 164 séquences ITS, 90 séquences pour le gène du facteur d'élongation 1-alpha et 45 séquences du gène de la beta-tubuline, seul l'alignement des séquences du gène de la beta-tubuline a permis d'obtenir des différences de séquences significatives entre *Gnomoniopsis smithogilvyi* et toutes les autres espèces, garantissant ainsi la spécificité des amorces d'amplification ; les alignement des séquences de ces gènes sont consultables en annexe 3.1 et 3.2 ; l'annexe 3.2 met en évidence les nucléotides différentes des zones d'intérêt, en identifiant avec un « . » les nucléotides égaux. Des amorces PCR spécifiques pour chaque espèce ont été développées sur la base ces analyses d'alignements de séquences. Les analyses *in silico* menées par

BLAST (GenBank) ont aussi confirmé la stricte spécificité de ces amorces (Conti et al., 2016).

Les amorces utilisées pour détecter la présence de *G. smithogilvyi* permettent d'amplifier des amplicons de 264 paires de bases et leur construction est la suivante:

GSF : AATGCCCAACTCGACCGTGTC (Région 402→420) ;

GSR : AGATGGCGTTGCAGGTCTCG (Région 665→636).

Parallèlement un test spécifique a été aussi développé selon même méthodologie pour détecter la présence de *C. parasitica*. Les amorces choisies permettent d'amplifier des amplicons de 322 paires de bases et leur construction est la suivante:

CPF : ATACAGCTACATCGACATCGTGC (Région 399→421) ;

CPR : AAGCTCGCCTATACCAGAAGTCG (Région 722→700).

Les deux paires d'amorces ont ensuite été testées sur des ADN extraits d'isolats purs de *G. smithogilvyi* et de *Cryphonectria parasitica*, provenant du Tessin et de Genève puis sur des échantillons d'ADN provenant de racines et de tiges de châtaignes germées ou de feuilles de châtaigniers. Des tests pour déterminer la meilleure température d'hybridation ainsi que la concentration d'ADN la plus adaptée ont été menées avant de lancer l'analyse des échantillons.

La première étape nécessaire pour pouvoir déterminer la présence des pathogènes dans les échantillons concernait le broyage à l'azote liquide. Pour ce faire, le matériel végétal a été mis dans des mortiers stériles et broyé à l'aide de pilons préalablement stérilisés. Chaque partie végétale a été broyée séparément. Après avoir broyé le matériel végétal, il y a eu le prélèvement d'une masse équivalente à 50 mg, mise ensuite dans un tube Eppendorf stérile *DNA free* 2.5ml.

La deuxième étape a été l'extraction de l'ADN des échantillons ainsi que le dosage et le contrôle de leur qualité par spectrométrie au Nanodrop. Le protocole utilisé pour l'extraction de l'ADN à partir du matériel broyé à l'azote liquide a été établi par le *Groupe plantes et pathogènes*, HEPIA Genève (Lefort et al., 2014) et il est consultable en annexe 7. Ce protocole a également été expérimenté par Pasche (Pasche, 2013). Le tampon d'extraction utilisé pour cette démarche est le tampon CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide). Un essai a été mené pour déterminer le meilleur tampon d'extraction, entre celui de Douglas et Lefort (1999) et de tampon CTAB. Le second a produit un rendement en ADN plus faible mais d'une meilleure pureté.

La composition chimique du tampon d'extraction CTAB est la suivante :

- 2% (p/v) de CTAB ;
- 1.4 M NaCl ;
- 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA ;
- 100 mM Tris-HCl (pH 8.0).

Le milieu de réaction pour l'amplification PCR était composé de la façon suivante, par échantillon pour un volume final de 50 µl : 5 µl de PCR Taq Biotools Buffer, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 5 µl d'amorces Sens/Antisens (0.4 µM), 1.25 µl de dNTP (0.2 mM chaque), 34.75 µl de H<sub>2</sub>O, 1 µl (1 unité) de Taq Biotools (BIOTOOLS B&M LABS) ainsi que 1 µl d'ADN à 50 ng/µl (cette concentration ayant été déterminée comme optimale lors d'essais préliminaires). Le programme d'amplification par PCR appliqué était constitué comme décrit ci-après :

- Dénaturation initiale de 5 minutes à 95 °C ;
- 40 cycles de
  - 1 minute à 95 °C ;
  - 40 secondes à 58 °C – *La température d'hybridation de 58 °C a été retenue car les essais de développement des deux tests moléculaires ont montré qu'elle était la température d'hybridation optimale pour les deux paires d'amorce spécifiques (pour G. smithogilvyi et pour C. parasitica) ;*
  - 1 minute à 72 °C ;
- Extension finale de 7 minutes à 72 °C ;
- Terminaison à 4 °C

Deux ADN polymérases ont été testées, Taq Bioline et Taq Biotools ; l'ADN polymérase Taq Biotools a ensuite été retenue pour l'ensemble des essais. La composition des Mastermix et les déroulements des cycles PCR, avec les deux Taq polymérases, sont consultables en annexe 9.

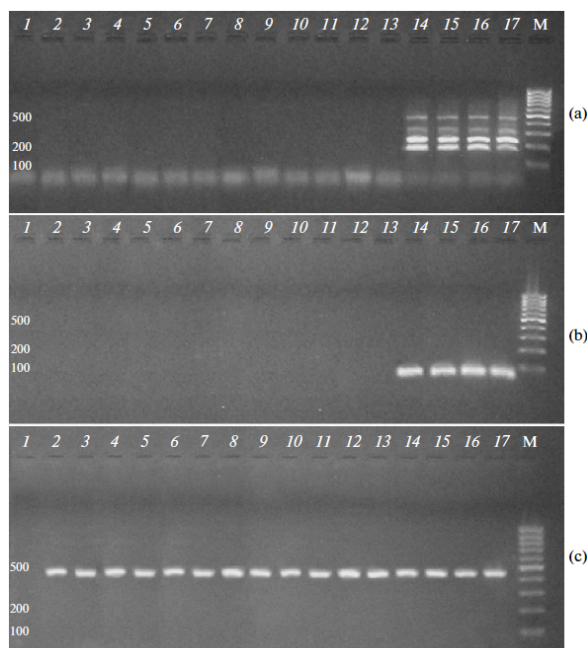
Les produits d'amplification PCR ont ensuite été séparés par électrophorèse, sur un gel d'agarose 1%, selon la démarche déjà décrite (Lefort et al., 2014) et ensuite visualisés sous lumière UV.

Les produits d'amplification ont été purifiés avec le kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) en vue du séquençage (effectué par Mycrosynth AG, CH-9436 Balgach). Le séquençage avait pour but de comparer les séquences obtenues aux séquences d'ADN connues de *G. smithogilvyi*.

L'avantage de ces tests spécifiques de diagnostic moléculaire était de pouvoir vérifier la présence ou l'absence des deux champignons pathogènes *G. smithogilvyi* et *C. parasitica* dans le même organe végétal testé, ce qui représente une économie de temps.

Popov et al. (2010) ont établi un autre test de diagnostic moléculaire pour identifier *C. parasitica* en utilisant deux amorces spécifiques (MF1 et MF2) et une amorce universelle, ces amorces ciblant le gène de l'ARN ribosomal 18S. Il semble que le test permettait de détecter la présence de nombreux autres champignon néfastes dans les mêmes échantillons analysés, tels que écorce, feuilles, fleurs et tiges (Popov et al., 2010).

**Figure 16: Electrophorégramme des produits d'amplification de certains champignons pathogènes**



(Popov et al., 2010)

Cet électrophorégramme (Fig. 16) montre des résultats d'amplification à partir de l'ADN de plusieurs champignons : contrôle (eau), 1 ; ADN de *Discella castanea*, 2 ; ADN de *Phomopsis castaneae*, 3 ; ADN de *Cryptodiaporthe castanea*, 4 ; ADN de *Phyllosticta castaneae*, 5 ; ADN de *Pestalotiopsis guepinii*, 6 ; ADN de *Alternaria alternata*, 7 ; ADN de *Monochaetia concentrica*, 8 ; ADN de *Aplosporella obscura*, 9 ; ADN de *Ascotricha chartarum*, 10 ; ADN de *Seimatosporium pestalozzioides*, 11 ; ADN de *Truncatella angustata*, 12 et ADN de quatre souches de *Cryphonectria parasitica*, 14 – 17 (Popov et al., 2010).

## 2. Recherche de méthodes de lutte microbiologique

### 2.1 Objectifs

Cette étude a deux objectifs : le premier est l'évaluation, en conditions stériles, de l'efficacité potentielle de 9 champignons et 5 bactéries différents, révélée par des tests de confrontation in vitro avec deux souches de *Gnomoniopsis smithogilvyi*. En fonction des résultats prometteurs l'étude sera ensuite poursuivie avec le deuxième objectif, c'est à dire la mise en place d'un essai visant à l'évaluation de l'efficacité des champignons antagonistes pour empêcher l'infection sur des scions.

Ces deux séries d'expériences sont destinées à identifier des organismes antagonistes efficaces pour réduire ou empêcher le développement de *G. smithogilvyi*.

### 2.2 Organismes utilisés pour les tests de confrontation

Pour l'évaluation de l'efficacité potentielle des agents biologiques face à *G. smithogilvyi*, 9 souches de champignons (Tableau 4) et 5 souches de bactéries (Tableau 5) ont été utilisées :

Tableau 4: liste des champignons antagonistes utilisés

Genre	Espèce
<i>Trichoderma</i>	<i>asperellum</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>atroviride</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>aureoviride</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>hamatum</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum (F1)</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum (B05)</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>pullulans</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>pullulans (éch. 5)</i>
<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>

Tableau 5: liste des bactéries utilisées

Genre	Espèce
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>elkanii</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>xanthomarina</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>viridiflava</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>graminis</i>

## **2.3 Pathogènes utilisé**

Les organismes antagonistes seront confrontés à deux souches de *Gnomoniopsis smithogilvyi* (Ti1 et Ge1) de la collection du laboratoire Plantes et Pathogènes de l'inTNE (hepia) et déjà utilisées dans une autre étude (Pasche et al., 2016a).

## **2.4 Description des dispositifs expérimentaux**

Pour évaluer si un organisme antagoniste, champignon ou bactérie, avait une efficacité potentielle, il y a eu la mise en place de tests de confrontation et, pour certains organismes, il y a eu l'évaluation de leur efficacité en utilisant la méthode du trempage de scions de châtaignier.

### **2.4.1 Confrontation entre champignons antagonistes et *G. smithogilvyi***

Les tests de confrontation ont été menés sur milieu de culture PDA. Les confrontations ont été répétées 3 fois pour chaque champignon antagoniste contre chaque souche du pathogène, ce qui représentait 54 boîtes de Petri. Pour être en mesure d'évaluer si les résultats obtenus étaient issus de l'effet de la confrontation, 2 témoins par antagoniste et 2 témoins par pathogène, avec la présence du seul organisme dans la boîte de Petri, ont été mis en place, ce qui produit un total de 76 boîtes de Petri en incluant ces témoins.

En ce qui concerne la méthodologie de confrontation, une distance de 3 cm a été gardée entre les deux organismes dans la boîte de Petri. L'inoculât de départ mesurait 25 mm<sup>2</sup>. La durée de l'essai a été de 12 jours par boîte. L'essai a débuté le jeudi 14 avril, avec 3 relevés le lundi 18.4.16, le jeudi 21.4.16 et un relevé finale le mardi 26.4.16.

Le relevé de données consistait en les mesures suivantes :

- Diamètres des colonies des champignons, mesurés perpendiculairement afin d'avoir deux longueurs par inoculât ;
- Evolution de la distance entre les deux colonies de champignons ;
- Inhibition de la croissance par rapport aux témoins.

Ces mesures permettent de classer les champignons antagonistes selon leur efficacité. *Beauveria bassiana* a été ajouté à cette liste car, champignon endophyte et entomopathogène, il pourrait être théoriquement efficace aussi contre le cynips (Li et al., 2001).



#### **2.4.2 Confrontation entre bactéries antagonistes et *G. smithogilvyi***

Cette expérience a été conduite de la même façon que pour les champignons, à la différence des milieux de culture utilisés. Les expériences ont été répétées trois fois sur deux milieux de cultures différents, le milieu *YEB* et le milieu *King B*, ce qui a produit 30 boîtes d'essais. Pour être en mesure d'évaluer si les résultats obtenus étaient issus de l'effet de la confrontation, 2 témoins par antagoniste et 2 témoins par pathogène, avec la présence du seul organisme dans la boîte de Petri, ont été mis en place. En ce qui concerne les témoins des pathogènes, 2 répétitions par milieu de culture (*YEB* et *King B*) ont été mises en place, ce qui a produit au total 18 boîtes de Petri pour les témoins.

En ce qui concerne la méthodologie de confrontation, les bactéries ont été inoculées en traçant une bande rectiligne au milieu de la boîte, d'un côté à l'autre. L'inoculation du champignon a été faite de part et de l'autre de la bande, à 1 cm du bord de la boîte, sous la forme d'un prélèvement d'une surface de 25 mm<sup>2</sup> d'une culture sur agar du champignon (Bezert et al., 1996). La durée de l'essai a été de 12 jours. L'essai a débuté le jeudi 14 avril, avec des relevés le lundi 18.4.16, le jeudi 21.4.16 et un relevé final le mardi 26.4.16.

Les données suivantes ont été relevées :

- Diamètre des colonies du champignon, mesurés perpendiculairement afin d'avoir deux dimensions par colonie ;
- Mesure de la distance champignon - bactéries;
- Inhibition de la croissance du champignon par rapport aux témoins.

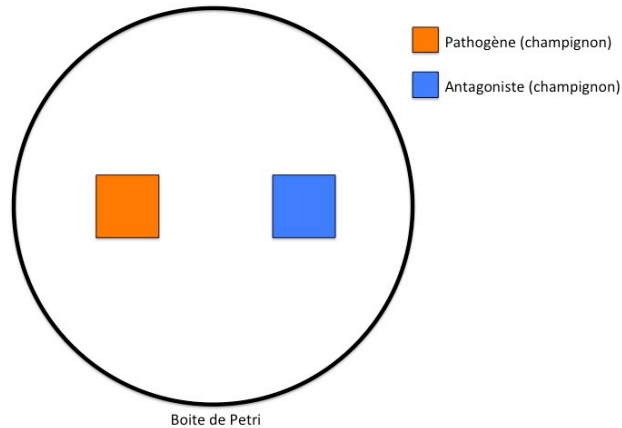
#### **2.4.3 Le principe de la confrontation**

La technique de la confrontation est la première étape utilisée pour évaluer l'efficacité d'un microorganisme antagoniste face à un microorganisme pathogène. Le principe est simple : il faut placer, dans la même boîte de Pétri, un inoculât du champignon pathogène et un inoculât d'un microorganisme antagoniste. Les boîtes de culture doivent être scellées avec du Parafilm, pour éviter toute contamination par des organismes étrangers, puis sont mises à incuber pour une certaine durée. Les deux microorganismes vont se développer et, potentiellement interagir. Les essais dans lesquels le microorganisme antagoniste contrôlera la croissance du pathogène seront considérés comme positifs ; dans le cas contraire, où le pathogène impose sa croissance au détriment du microorganisme antagoniste, l'essai sera considéré comme conclusion négative. Le principe est le même pour l'évaluation d'un champignon antagoniste ou d'une bactérie antagoniste. Seule la

disposition dans la boîte de Pétri sera différente, comme représenté dans les figures 3 et 4.

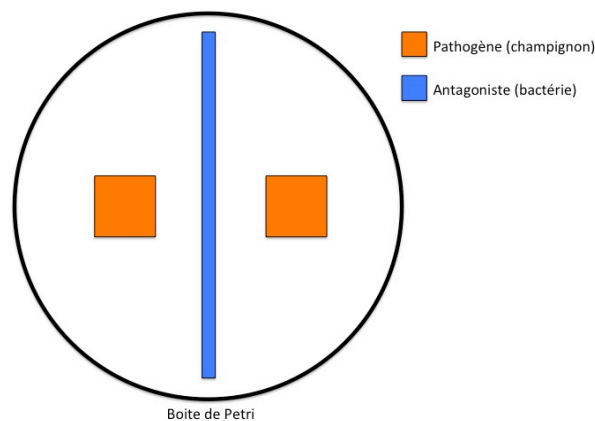
En ce qui concerne l'évaluation du champignon il faut procéder avec la disposition selon la figure 17:

**Figure 17: Confrontation entre un champignon pathogène et champignon antagoniste**



Pour l'évaluation de l'efficacité d'une bactérie antagoniste il faut au contraire procéder selon la disposition présentée en figure 18.

**Figure 18: Confrontation entre un champignon pathogène et une bactérie antagoniste**



## **2.5 Les essais de confrontation in vivo**

Après avoir déterminé l'efficacité des souches testées par confrontation, un essai de confrontation in vivo a été réalisé avec les microorganismes ayant démontré les plus grandes efficacités d'inhibition de la croissance de *G. smithogilvyi*. Pour ce faire des scions de châtaignier prélevés en milieu naturel ont été incubés en présence de

suspensions de cultures pures de champignons ou bactéries antagonistes, puis, après une période d'incubation de 3 semaines, les scions ont été inoculés par le champignon pathogène *G. smithogilvyi*.

Les champignons et les bactéries sélectionnées ont été repiqués en milieu liquide (PGB – *potato dextrose broth* – pour les champignons et milieu LBPGA – *Luria Bertani Potato glucose agar* – pour les bactéries).

La liste des organismes retenus est la suivante.

Champignons :

- *Trichoderma harzianum* F1 ;
- *Trichoderma harzianum* B05 ;
- *Trichoderma hamatum* ;
- *Trichoderma aureoviride* ;
- *Trichoderma asperellum*.

Bactéries :

- *Pseudomonas putida* :
- *Bacillus amyloliquefaciens* Ba2 ;
- *Bacillus amyloliquefaciens* Ba4.

En ce qui concerne la souche Ba4 de *B. amyloliquefaciens*, son efficacité a été prouvée séparément par un test de confrontation mené par M. Bastien Cochard, du groupe « plantes et pathogènes » de Lullier. La souche Ba2 de *B. amyloliquefaciens* a été testée dans un travail de S. Pasche (Pasche et al., 2016b) ; cette bactérie a montré une efficacité face à *G. smithogilvyi*. Pour cette raison elle a également été incluse dans cette étude.

Après 5 jours d'incubation dans des volumes de 500 mL de milieu, les milieux avec les champignons ont été centrifugés dans des bouteilles de centrifugation de 500 mL à 6000 rpm pendant 8 minutes, pour pouvoir récupérer les mycéliums et les spores. Le culot de centrifugation a été transféré dans de l'eau stérile. Les cultures bactériennes ont été également centrifugées de la même façon et les culots de centrifugation resuspendus dans de l'eau stérile.

Les scions, prélevés dans les forêts du Tessin, d'un diamètre moyen de 1 cm et d'une longueur de 20 cm, ont ensuite été trempés dans les suspensions aqueuses de champignons et bactéries antagonistes. Pour chaque antagoniste, 10 scions ont été trempés pour une durée de 48 heures dans des bouteilles Duran stériles de 2

litres. Passé ce délai, 8 scions par antagoniste, sélectionnés au hasard, ont été transférés dans des tubes en verre de 20 cm de longueur pour un diamètre de 2 cm, fermés avec leur bouchon et scellés avec du Parafilm. Seize scions témoins ont été trempés dans de l'eau stérile pendant 48 heures puis transférés de la même façon que décrite précédemment dans des tubes en verre et fermés avec bouchon et Parafilm. Tous les tubes ont ensuite été transférés dans une chambre climatique pendant 3 semaines, avec une température de 26°C, une humidité relative de 70% et une période jour/nuit de 16/8.

Après 3 semaines d'incubation en chambre climatique, les scions ont été sortis des tubes et inoculés par incision avec un explant de culture de *G. smithogilvyi*. Concernant les 16 témoins, l'inoculation du pathogène a été réalisée sur la moitié d'entre eux de façon à disposer d'un contrôle positif de l'expérience. Après inoculation, tous les tubes sont remis à incuber dans les mêmes conditions que décrites précédemment en chambre climatique pendant 3 semaines supplémentaires. Des observations visuelles de l'état superficiel de la santé des scions ont été réalisées tout au long des six semaines de l'expérience.

## Deuxième partie : Résultats

# 1. Analyse de la présence de *G. smithogilvyi* dans les fruits et porte-greffes de châtaignier

## 1.1 Extraction d'ADN

Le tableau 6 ci-dessous résume les différentes caractéristiques des deux tampons d'extraction testés. Les deux tampons ont été testés sur deux échantillons, un étant de provenance racinaire (R2) et l'autre venant d'une pousse (P2). Le tampon Douglas-Lefort (DL) offrait une concentration d'ADN plus élevée, mais une pureté moindre. Le rapport 260/280 (pureté par rapport aux protéines, phénols et autres contaminants) et le rapport 260/230 (pureté par rapport aux solvants, sels ou autres contaminants organiques) étaient en fait en faveur de l'autre tampon (CTAB). La totalité des données relatives aux concentrations et aux rapports 260/280 et 260/230 des 230 échantillons sont consultables en annexe 4.

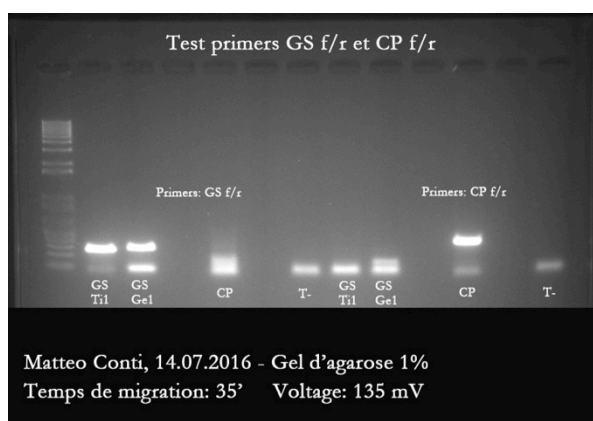
**Tableau 6: test de deux différents tampons d'extraction**

Sample ID	Date	ng/ul	260/280	260/230
R2 DL	04.07.16	1566.34	1.44	0.62
R2 CTAB	04.07.16	427.71	1.98	1.61
P1 DL	04.07.16	3886.54	1.73	1.09
P1 CTAB	04.07.16	365.04	2	1.98
DL : Tampon Douglas Lefort				
R2 : échantillon racinaire				
P1 : échantillon des pousses				

## 1.2 Développement des tests de diagnostic moléculaire spécifiques pour *G. smithogilvyi* et *C. parasitica*

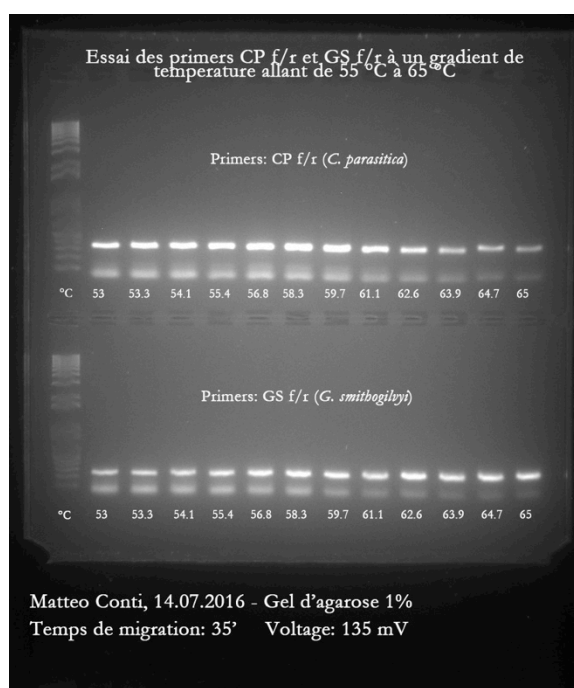
La figure 19 montre les résultats d'amplification des tests de spécificité des amorces développées sur le gène de la beta-tubuline pour détecter la présence de *G. smithogilvyi* et de *C. parasitica*. Les deux paires d'amorces, GS pour *G. smithogilvyi* et CP pour *C. parasitica*, ont été testés avec différents extraits d'ADN: Ti1, *G. smithogilvyi* souche Ti1 provenant du Canton du Tessin; GE1, *G. smithogilvyi* souche Ge1 provenant du Canton de Genève; CP, *C. parasitica* et T-, contrôle sans ADN. Les amorces GS amplifient *G. smithogilvyi* et les amorces CP, *C. parasitica*. Les amorces GS permettent d'amplifier des amplicons de 264 paires de bases; les amorces CP permettent d'amplifier des amplicons de 322 paires de bases.

**Figure 19: Electrophorégramme de validation des paires d'amorces GS et CP**



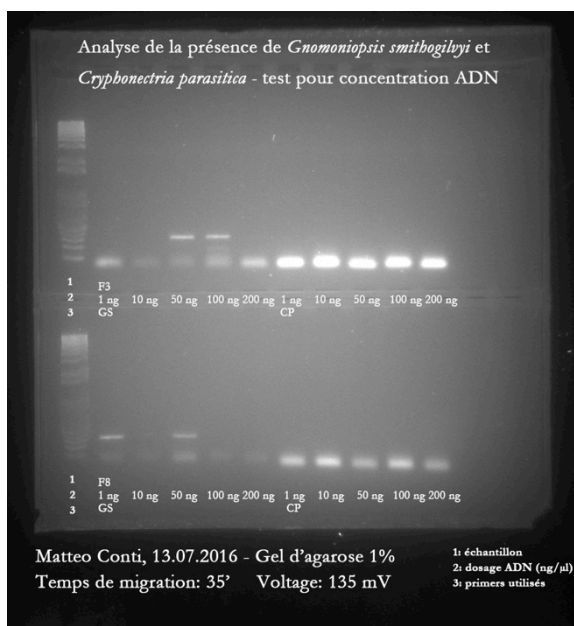
Les essais de détermination de la température d'hybridation optimale pour les deux paires d'amorces sont montrés en figure 20. Le gradient de température choisi pour ce test était compris entre 53°C et 65°C. Le test à été mené en utilisant les ADN des deux champignons dans les mix PCR.

**Figure 20: Electrophorégramme des essais de détermination de la température d'hybridation optimale pour les amorces GS et CP**



La figure 21 veut montrer le test effectué pour déterminer la concentration d'ADN la plus adapté pour l'amplification des ADN des parties végétales à analyser. L'essai c'est déroulé sur 2 échantillons d'ADN extraits de feuilles (représentés sur la figure 7) ainsi que sur deux échantillons d'ADN issus de racines

**Figure 21: Essai de détermination de la concentration d'ADN optimale pour les deux paires d'amorces**



Les différentes concentrations testées ont été les suivantes : 1 ng/μl, 10 ng/μl, 50 ng/μl, 100 ng/μl et 200 ng/μl.

La figure 22 est un exemple des résultats obtenus (la totalité des images des gels d'électrophorèse sont consultables en annexe 5). Cette figure représente plusieurs échantillons ayant une bande de fragments d'ADN située à une hauteur de 264 paires de bases ; Le témoin positif, amplifié à partir de l'ADN pur de *Gnomoniopsis smithogilyi*, présente la même bande à la même hauteur.

**Figure 22: Exemple de résultats obtenus sur des échantillons de nature différente**





### 1.3 Purification et séquençage des ADN

Après avoir purifié un produit d'amplification d'un échantillon sélectionné au hasard et séquéncé cet ADN, la séquence obtenue a été la suivante :

CGTTCATACGCCTCCGAGCTGGAGCTCAGAGGTACCATTGTAGCTGTATGACA  
 ATCAGTTCTGAACTGAAGTCGCGTGGTGTGGTGGCAGATGGGAATATATAAACGT  
 ACACGCCATTGCTGTCAAGGCCGTGCTCGCCCGAGATGGTTTGCCTGCAGTC  
 GAGGTCAGTTGTGCGAAGCCACGACACGGTTCGAGTTGGGCGTA.

Les deux figures suivantes (fig. 23 et fig. 24) montrent les homologies de cette séquence avec les organismes présentes dans la base de données de l'NCBI.

**Figure 23: Comparaison de la séquence obtenue avec la base de données GenBan (NCBI)**

Gnomoniopsis smithogilvyi isolate Ti5 beta-tubulin gene, partial cds  
 Sequence ID: [KP824767.1](#) Length: 767 Number of Matches: 1

Range 1: 383 to 578 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
302 bits(163)	3e-78	182/198(92%)	2/198(1%)	Plus/Minus
Query 19	CGTTNNTACGCCTCCGAGCTGGAGCTCAGAGGTACCATTGTAGCTGTATGACAATCANTT			78
Sbjct 578	CGTTCATACG-CT-CGAGCTGGAGCTCAGAGGTACCATTGTAGCTGTATGACAATCAGTT			521
Query 79	CTGAACTGAACTCGCGTGGTGTTCGCGCATGGGAATATATAAACGTACACGCCATTGCT			138
Sbjct 520	CTGAACTGAACTCGCGTGGTGTTCGCGCATGGGAATATATAAACGTACACGCCATTGCT			461
Query 139	GTCNAGGCCGTGCTCGCCCGANATGGTTTGCCTGCANTCNANGTCANTTGTGCGAANCCAC			198
Sbjct 460	GTCAGGCCGTGCTCGCCCGAGATGGTTTGCCTGCAGTTCAGTTCAGTTCGGAAGCCAC			401
Query 199	NACACCGTCCGAGTTGGGC	216		
Sbjct 400	GACACGGTCCGAGTTGGGC	383		

<http://ncbi.nlm.nih.gov/>

**Figure 24: Comparaison de la séquence obtenue avec la base de données Genbank (NCBI) : plusieurs occurrences possibles**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Gnomoniopsis castanea beta-tubulin gene for beta-tubulin, isolate VF25	302	302	90%	3e-78	92%	<a href="#">LN999976.1</a>
<input type="checkbox"/> Gnomoniopsis castanea beta-tubulin gene for beta-tubulin, isolate MA24	302	302	90%	3e-78	92%	<a href="#">LN999974.1</a>
<input type="checkbox"/> Gnomoniopsis castanea beta-tubulin gene for beta-tubulin, isolate BSD12	302	302	90%	3e-78	92%	<a href="#">LN999973.1</a>
<input type="checkbox"/> Gnomoniopsis castanea beta-tubulin gene for beta-tubulin, isolate PV26	302	302	90%	3e-78	92%	<a href="#">LN999972.1</a>
<input type="checkbox"/> Gnomoniopsis castanea beta-tubulin gene for beta-tubulin, isolate BID15	302	302	90%	3e-78	92%	<a href="#">LN999971.1</a>
<input type="checkbox"/> Gnomoniopsis castanea beta-tubulin gene for beta-tubulin, isolate VF6	302	302	90%	3e-78	92%	<a href="#">LN999970.1</a>
<input type="checkbox"/> Gnomoniopsis smithogilvyi isolate Ti5 beta-tubulin gene, partial cds	302	302	90%	3e-78	92%	<a href="#">KP824767.1</a>
<input type="checkbox"/> Gnomoniopsis smithogilvyi isolate Ti4 beta-tubulin gene, partial cds	302	302	90%	3e-78	92%	<a href="#">KP824766.1</a>
<input type="checkbox"/> Gnomoniopsis smithogilvyi isolate Ti3 beta-tubulin gene, partial cds	302	302	90%	3e-78	92%	<a href="#">KP824765.1</a>
<input type="checkbox"/> Gnomoniopsis smithogilvyi isolate Ti1 beta-tubulin gene, partial cds	302	302	90%	3e-78	92%	<a href="#">KP824764.1</a>

<http://ncbi.nlm.nih.gov/>

## 1.4 Evaluation de la présence de *G. smithogilvyi* et *C. parasitica* par tests de diagnostic moléculaires spécifiques

Le tableau 7 résume les différents échantillons analysés, en les cataloguant par variété et par partie végétale. Le tableau indique le nombre d'échantillons positifs détectés pour *Gnomoniopsis smithogilvyi* par variété et par organe végétal analysé.

**Tableau 7: Résumé des échantillons analysés et des échantillons détectés comme contaminés par *G. smithogilvyi***

Analyse de la présence de <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>										
Variété	Parties végétales analysées					Couples porte-greffes/greffons, ramassés le 17.08.2016				Tot. Parties végétales analysées, par variété
	Châtaignes germées, congelées le 19.04.2016		Porte-greffes, ramassés le 12.05.2016		Couples porte-greffes/greffons, ramassés le 17.08.2016		Couples porte-greffes/greffons, ramassés le 17.08.2016			
	Nombre radicules	Nombre pousses	Nombre feuilles + pousses	Nombre greffons	Nombre porte-greffes	Nombre greffons	Nombre porte-greffes contaminés	Nombre greffons contaminés	Nombre greffons contaminés	
Luina	10	6	3	10	10	10	0	0	0	39
Giacco	10	10	3	10	10	10	0	0	0	43
Torcione Nero	10	3	3	10	10	10	0	0	0	36
M. Michelangelo	10	10	3	10	10	10	0	0	0	43
Marrone Selva	10	2	3	10	10	10	0	0	0	35
Bouche de Bétizac	10	10	2	6	6	6	0	0	0	34
<b>Tot. Variétés</b>	<b>Tot. Radicules analysées</b>	<b>Tot. Pousses analysées</b>	<b>Tot. Feuilles + pousses analysées</b>	<b>Tot. Greffons analysés</b>	<b>Tot. Porte-greffes analysés</b>	<b>Tot. Greffons analysés</b>	<b>Tot. Porte-greffes contaminés</b>	<b>Tot. Greffons contaminés</b>	<b>Tot. Greffons contaminés</b>	<b>Tot. Parties végétales contaminées</b>
6	60	41	17	56	56	56	8	34	34	230
Analyse présence <i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>										
Variété	Châtaignes germées, congelées le 19.04.2016		Porte-greffes, ramassés le 12.05.2016		Couples porte-greffes/greffons, ramassés le 17.08.2016				Tot. Parties végétales contaminées, par variété	
	Nombre radicules contaminées	Nombre pousses contaminées	Nombre feuilles + pousses contaminées	Nombre greffons contaminés	Nombre porte-greffes contaminés	Nombre greffons contaminés	Nombre porte-greffes contaminés	Nombre greffons contaminés		
Luina	1	1	1	0	2	5	0	0	10	
Giacco	0	0	0	0	1	7	0	0	8	
Torcione Nero	1	0	1	0	2	8	0	0	12	
M. Michelangelo	1	0	0	0	1	5	0	0	7	
Marrone Selva	1	0	0	0	2	9	0	0	12	
Bouche de Bétizac	2	1	0	0	0	0	0	0	3	
<b>Tot. Variétés</b>	<b>Tot. Radicules contaminées</b>	<b>Tot. Pousses contaminées</b>	<b>Tot. Feuilles + pousses contaminées</b>	<b>Tot. Porte-greffes contaminés</b>	<b>Tot. Greffons contaminés</b>	<b>Tot. Greffons contaminés</b>	<b>Tot. Porte-greffes contaminés</b>	<b>Tot. Greffons contaminés</b>	<b>Tot. Parties végétales contaminées</b>	
6	6	2	2	8	34	34	8	34	52	

Le tableau 8 veut indiquer la significativité statistique de l'essai menée. L'analyse statistique, sous la forme du khi<sup>2</sup> de Pearson, a été effectuée par variété et par partie végétale. La p-valeur, statistiquement significative, a une valeur de 0.027 (par variété) et de <0.001 (par partie végétale).

**Tableau 8: Analyse statistique des 230 échantillons**

Analyse statistique présence <i>G. smithogilyvi</i> , par variété					Analyse statistique présence <i>G. smithogilyvi</i> , par partie végétale				
Variété	Absent	Présent	Total	Descriptif donnée	Partie végétale	Absent	Présent	Total	Descriptif donnée
Bouche de Bétizac	31	3	34	Dénombrement	Châtaignes, pousse	39	2	41	Dénombrement
	91.18	8.82	100	% de ligne		95.12	4.88	100	% de ligne
	26.31	7.69	34	Dénombrement attendu		32.04	8.96	41	Dénombrement attendu
Giacco	0.8349	2.8578		Contribution au khi deux	Châtaignes, radicule	1.511	5.405		Contribution au khi deux
	35	8	43	Dénombrement		54	6	60	Dénombrement
	81.4	18.6	100	% de ligne		90	10	100	% de ligne
Lùina	33.61	9.39	43	Dénombrement attendu	Couples PG - G, greffon	46.89	13.11	60	Dénombrement attendu
	0.0579	0.2071		Contribution au khi deux		1.078	3.855		Contribution au khi deux
	29	10	39	Dénombrement		22	34	56	Dénombrement
Marrone Michelangelo	74.36	25.64	100	% de ligne	Couple PG - G, porte-greffe	39.29	60.71	100	% de ligne
	30.48	8.52	39	Dénombrement attendu		43.34	12.66	56	Dénombrement attendu
	0.0718	0.2567		Contribution au khi deux		10.507	35.966		Contribution au khi deux
Marrone Selva Lattacaldo	36	7	43	Dénombrement	Porte-greffe	48	8	56	Dénombrement
	83.72	16.28	100	% de ligne		85.71	14.29	100	% de ligne
	33.61	9.39	43	Dénombrement attendu		43.34	12.66	56	Dénombrement attendu
Torcione Nero	0.1707	0.6105		Contribution au khi deux	Total	0.501	1.716		Contribution au khi deux
	23	12	35	Dénombrement		15	2	17	Dénombrement
	65.71	34.29	100	% de ligne		88.24	11.76	100	% de ligne
Total	27.35	7.65	35	Dénombrement attendu	Khi deux de Pearson	13.29	3.71	17	Dénombrement attendu
	0.6927	2.4778		Contribution au khi deux		0.221	0.791		Contribution au khi deux
	24	12	36	Dénombrement		178	52	230	Dénombrement
Total	66.67	33.33	100	% de ligne	Degrés de liberté	77.39	22.61	100	% de ligne
	28.13	7.87	36	Dénombrement attendu		178	52	230	Dénombrement attendu
	0.6076	2.1732		Contribution au khi deux					
Total	178	52	230	Dénombrement	P-valeur				
	77.39	22.61	100	% de ligne					
	178	52	230	Dénombrement attendu					
Khi deux de Pearson	12.646				62.65				
Degrés de liberté	5				4				
P-valeur	0.027				<0.001				

Le tableau 9 montre les résultats de la recherche de *Cryphonectria parasitica* dans les 230 échantillons par variété et par partie végétale. Cette expérience démontre l'absence de contamination par *Cryphonectria parasitica*

**Tableau 9: Recherche de *C. parasitica* dans les 230 échantillons analysés**

Analyse de la présence de <i>Cryphonectria parasitica</i>									
Variété	Parties végétales analysées					Couples porte-greffes/greffons, ramassés le 17.08.2016		Tot. Parties végétales analysées, par variété	
	Châtaignes germées, congelées le 19.04.2016		Porte-greffes, ramassés le 12.05.2016		Nombre porte-greffes				
	Nombre radicules	Nombre pousses	Nombre feuilles + pousses	Nombre greffons	Nombre greffons	Nombre greffons	Nombre greffons	Nombre greffons	
Luina	10	6	3	10	10	10	10	39	
Giacco	10	10	3	10	10	10	10	43	
Torcione Nero	10	3	3	10	10	10	10	36	
M. Michelangelo	10	10	3	10	10	10	10	43	
Marrone Selva	10	2	3	10	10	10	10	35	
Bouche de Bétizac	10	10	2	6	6	6	6	34	
<b>Tot. Variétés</b>	<b>Tot. Radicules analysées</b>	<b>Tot. Pousses analysées</b>	<b>Tot. Feuilles + pousses analysées</b>	<b>Tot. Greffons analysés</b>	<b>Tot. Greffons analysés</b>	<b>Tot. Greffons analysés</b>	<b>Tot. Greffons analysés</b>	<b>Tot. Parties analysées</b>	
<b>6</b>	<b>60</b>	<b>41</b>	<b>17</b>	<b>56</b>	<b>56</b>	<b>56</b>	<b>56</b>	<b>230</b>	
Analyse présence <i>Cryphonectria parasitica</i>									
Variété	Châtaignes germées, congelées le 19.04.2016		Porte-greffes, ramassés le 12.05.2016		Couples porte-greffes/greffons, ramassés le 17.08.2016		Tot. Parties végétales contaminées, par variété		
	Nombre radicules contaminées	Nombre pousses contaminées	Nombre feuilles + pousses contaminées	Nombre greffons contaminés	Nombre porte-greffes contaminés	Nombre greffons contaminés			
	Nombre radicules contaminées	Nombre pousses contaminées	Nombre feuilles + pousses contaminées	Nombre greffons contaminés	Nombre porte-greffes contaminés	Nombre greffons contaminés	Nombre greffons contaminés	Nombre greffons contaminés	Nombre greffons contaminés
Luina	0	0	0	0	0	0	0	0	
Giacco	0	0	0	0	0	0	0	0	
Torcione Nero	0	0	0	0	0	0	0	0	
M. Michelangelo	0	0	0	0	0	0	0	0	
Marrone Selva	0	0	0	0	0	0	0	0	
Bouche de Bétizac	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Tot. Variétés</b>	<b>Tot. Radicules contaminées</b>	<b>Tot. Pousses contaminées</b>	<b>Tot. Feuilles + pousses contaminées</b>	<b>Tot. Porte-greffes contaminés</b>	<b>Tot. Greffons contaminés</b>	<b>Tot. Greffons contaminés</b>	<b>Tot. Greffons contaminés</b>	<b>Tot. Parties contaminées</b>	
<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

## **1.5 Confrontation entre *G. smithogilvyi* et *C. parasitica***

Comme montré en figure 25 par un test de confrontation in vitro entre les deux champignons pathogènes, *C. parasitica* (gauche) et *G. smithogilvyi* (droite), aucun des deux champignons ne semble exercer une action inhibitrice sur l'autre. Ceci démontre que la présence de *G. smithogilvyi*, en tant qu'endophyte, n'est pas la raison de l'absence de *C. parasitica* comme endophyte.

**Figure 25: Confrontation in vitro entre *C. parasitica* et *G. smithogilvyi* Ti 1**

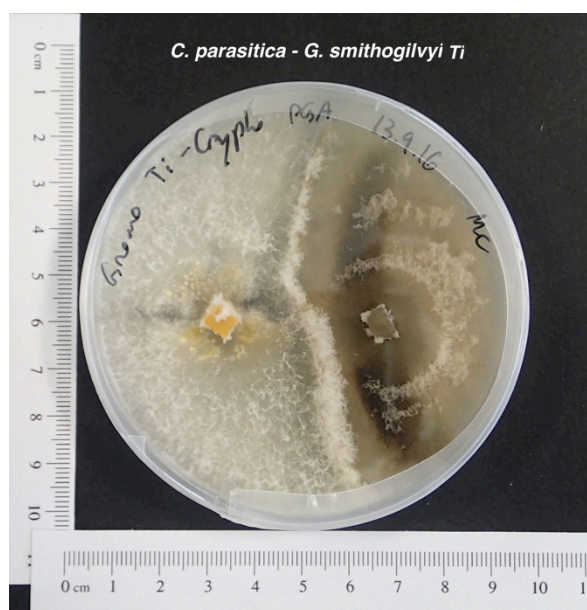


Photo : M. Conti

## **1.6 Recherche de *G. smithogilvyi* et *C. parasitica* dans des chancres**

Cette expérience avait pour but d'évaluer la présence des deux agents causant le chancre du châtaignier, sur cinq échantillons de chancre collectés en forêt au Tessin. Les figures 26 et 27 montrent des symptômes de chancres, difficilement attribuable à *C. parasitica*. Après extraction d'ADN de deux échantillons prélevés au sein de chaque chancre, le test de diagnostic moléculaire a confirmé la présence de *G. smithogilvyi* (fig. 28).

Figure 26: Exemple de chancre (éch. 4.2) probablement dû à *G. smithogilvyi*



Photo : M. Conti

Figure 27: Exemple de chancre (éch. 1.2) probablement causé par *G. smithogilvyi*



Photo : M. Conti

Figure 28: Électrophorégramme des amplifications à partir d'extraits d'ADN des échantillons 1.2 et 4.2



## **1.7 Analyse des isolats venant du Valais**

Concernant l'analyse des 25 échantillons d'ADN extrait d'isolats de *G. smithogilvyi* isolés de galles fournis par le centre WSL, ils ont tous été identifiés comme positifs par le test de détection moléculaire spécifique de *G. smithogilvyi*. Les électrophorégrammes de ces isolats sont consultables en annexe 6.

## 2. Essais de lutte biologique

### 2.1 Essais de confrontation in vitro

#### 2.1.1 Confrontations entre champignon antagonistes et champignons pathogènes

La figure 29 montre l'évolution de la croissance des champignons antagonistes testés, confrontés aux 2 souches de *Gnomoniopsis smithogilvyi* (Ti et Ge). Dans l'ordre, les confrontations effectuées étaient : 1, *T. asperellum* – *G. smithogilvyi* Ti ; 2, *T. asperellum* – *G. smithogilvyi* Ge ; 3, *T. atroviride* – *G. smithogilvyi* Ti ; 4 *T. atroviride* – *G. smithogilvyi* Ge ; 5, *T. aureoviride* – *G. smithogilvyi* Ti ; 6, *T. aureoviride* – *G. smithogilvyi* Ge ; 7, *T. hamatum* – *G. smithogilvyi* Ti ; 8, *T. hamatum* – *G. smithogilvyi* Ge ; 9, *T. harzianum* F1 – *G. smithogilvyi* Ti. Les relevés ont été effectués après 4, 7 et 12 jours de culture.

La figure 30 montre l'évolution de la croissance des champignons antagonistes testés, confrontés aux 2 souches de *Gnomoniopsis smithogilvyi* (Ti et Ge). Dans l'ordre, les confrontations étaient : 10, *T. harzianum* F1 – *G. smithogilvyi* Ge ; 11, *T. harzianum* B05 – *G. smithogilvyi* Ti ; 12, *T. harzianum* B05 – *G. smithogilvyi* Ge ; 13, *A. pullulans* – *G. smithogilvyi* Ti ; 14, *A. pullulans* – *G. smithogilvyi* Ge ; 15, *A. pullulans* éch. 5 – *G. smithogilvyi* Ti ; 16, *A. pullulans* éch. 5 – *G. smithogilvyi* Ge ; 17, *B. bassiana* – *G. smithogilvyi* Ti ; 18, *B. bassiana* – *G. smithogilvyi* Ge. Les relevés ont été effectués après 4, 7 et 12 jours de culture.



Figure 29 : Surfaces moyennes des organismes dans les confrontations champignon - champignon, exprimées en mm<sup>2</sup>

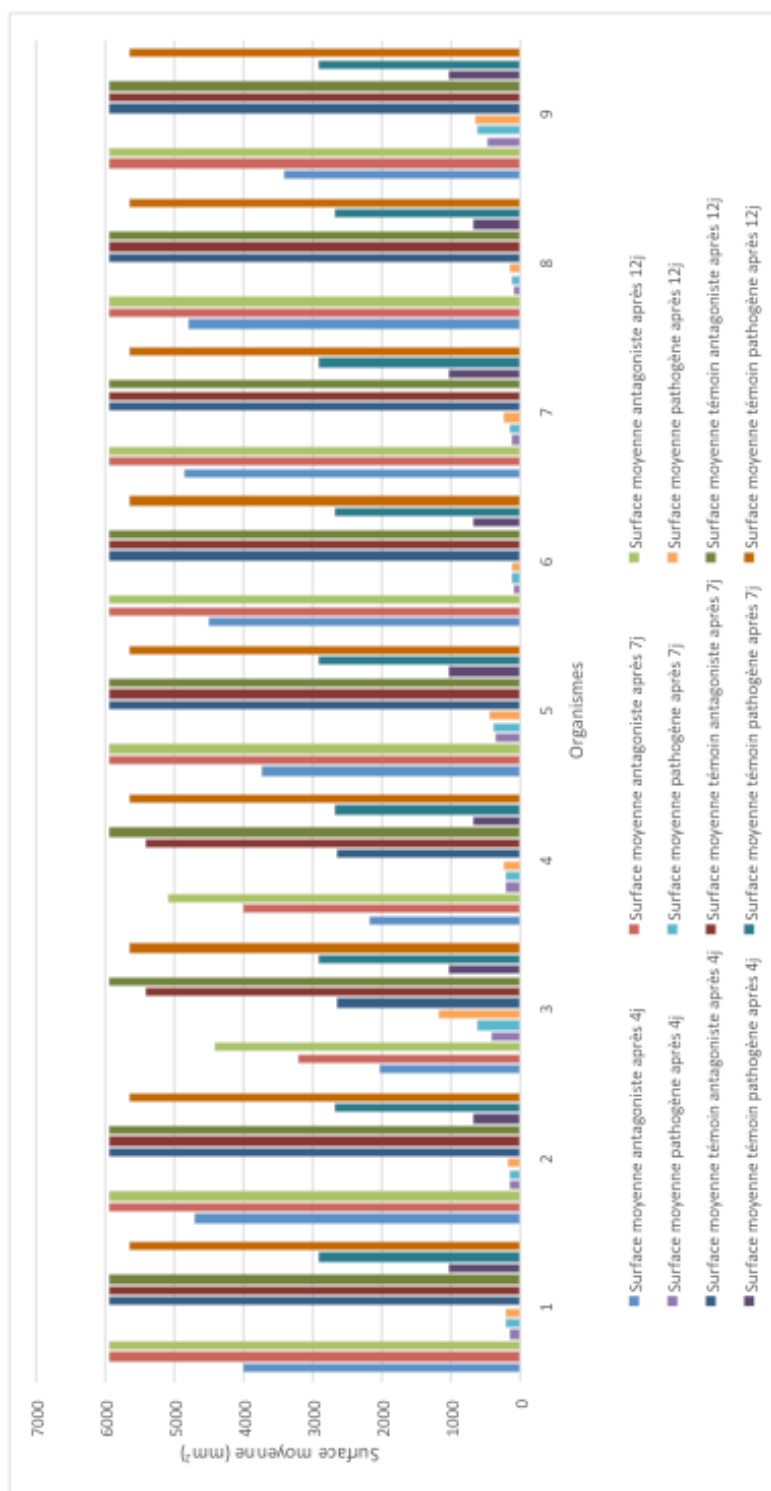
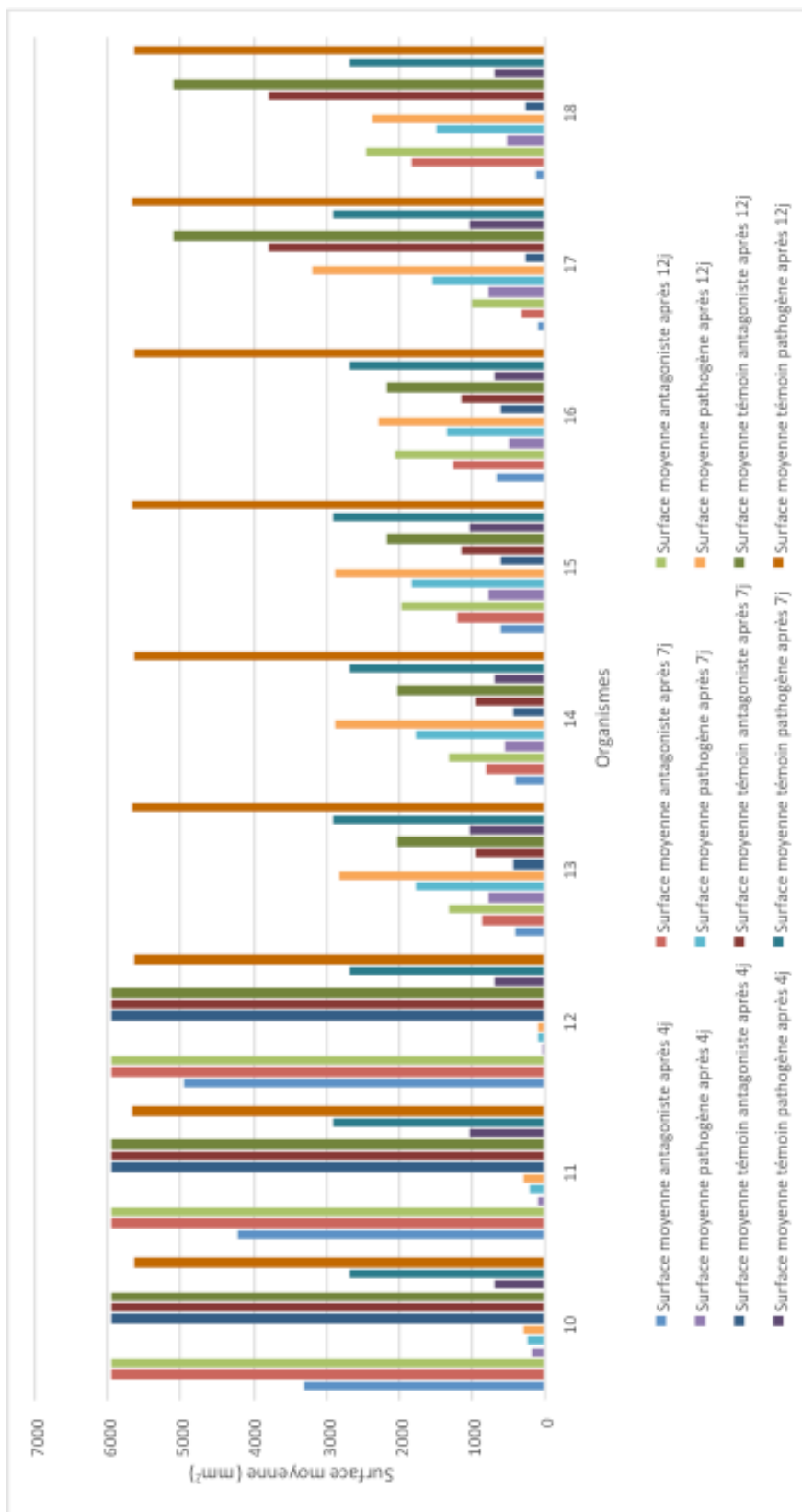
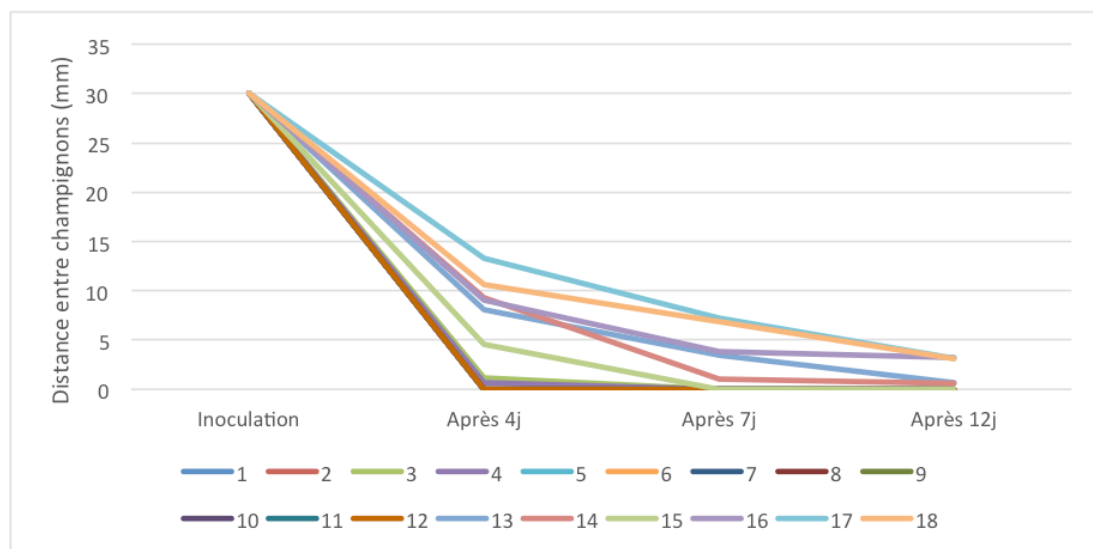


Figure 30 : Surfaces moyennes des organismes dans les confrontations champignon - champignon, exprimées en mm<sup>2</sup>



La figure 31 montre la distance moyenne entre les deux champignons en confrontation. Les relevés ont été effectués après 4, 7 et 12 jours de culture.

**Figure 31 : distances moyennes entre champignons confrontés, exprimée en mm**

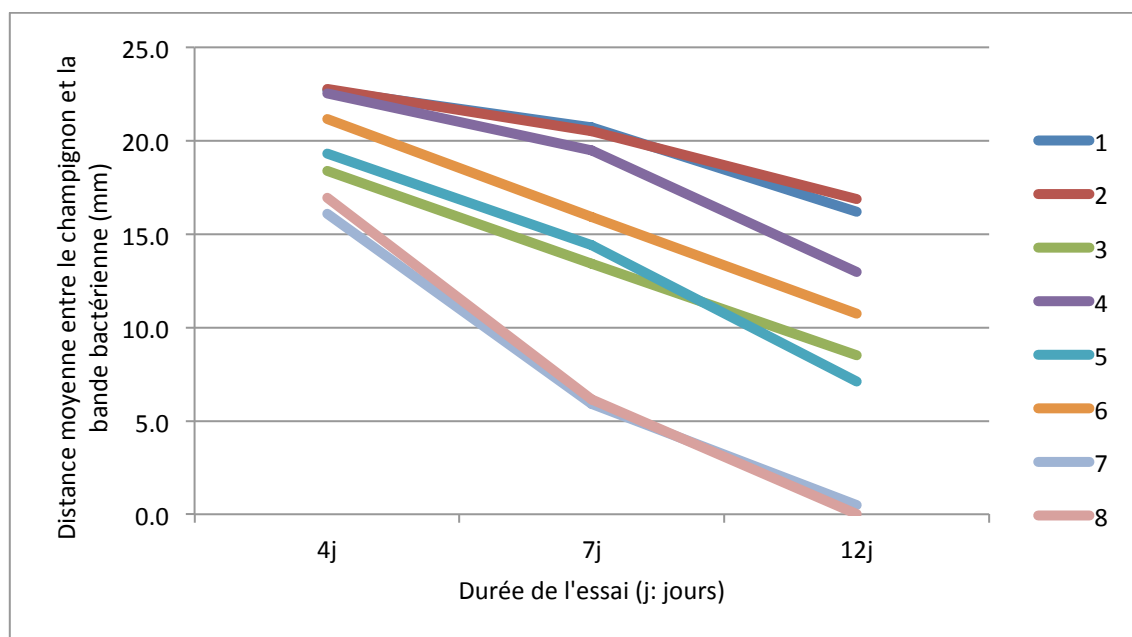


1, *T. asperellum* – *G. smithogilvyi* Ti ; 2, *T. asperellum* – *G. smithogilvyi* Ge ; 3, *T. atroviride* – *G. smithogilvyi* Ti ; 4 *T. atroviride* – *G. smithogilvyi* Ge ; 5, *T. aureoviride* – *G. smithogilvyi* Ti ; 6, *T. aureoviride* – *G. smithogilvyi* Ge ; 7, *T. hamatum* UASWS1405 – *G. smithogilvyi* Ti ; 8, *T. hamatum* UASWS1405 – *G. smithogilvyi* Ge ; 9, *T. harzianum* F1 – *G. smithogilvyi* Ti ; 10, *T. harzianum* F1 – *G. smithogilvyi* Ge ; 11, *T. harzianum* B05 – *G. smithogilvyi* Ti ; 12, *T. harzianum* B05 – *G. smithogilvyi* Ge ; 13, *A. pullulans* – *G. smithogilvyi* Ti ; 14, *A. pullulans* – *G. smithogilvyi* Ge ; 15, *A. pullulans* éch. 5 – *G. smithogilvyi* Ti ; 16, *A. pullulans* éch. 5 – *G. smithogilvyi* Ge ; 17, *B. bassiana* – *G. smithogilvyi* Ti ; 18, *B. bassiana* – *G. smithogilvyi* Ge.

### 2.1.2 Confrontations entre bactéries antagonistes et champignon pathogène *G. smithogilvyi*

La figure 32 représente, en fonction des jours de culture, l'évolution de la distance moyenne entre *G. smithogilvyi* et la bande bactérienne. Moins la distance diminue, plus l'organisme antagoniste est efficace. La bactérie qui a montré le plus d'efficacité a été *Pseudomonas putida*. La confrontation *P. viridiflava* – *G. smithogilvyi* est absente car la bactérie n'a pas réussi à se développer.

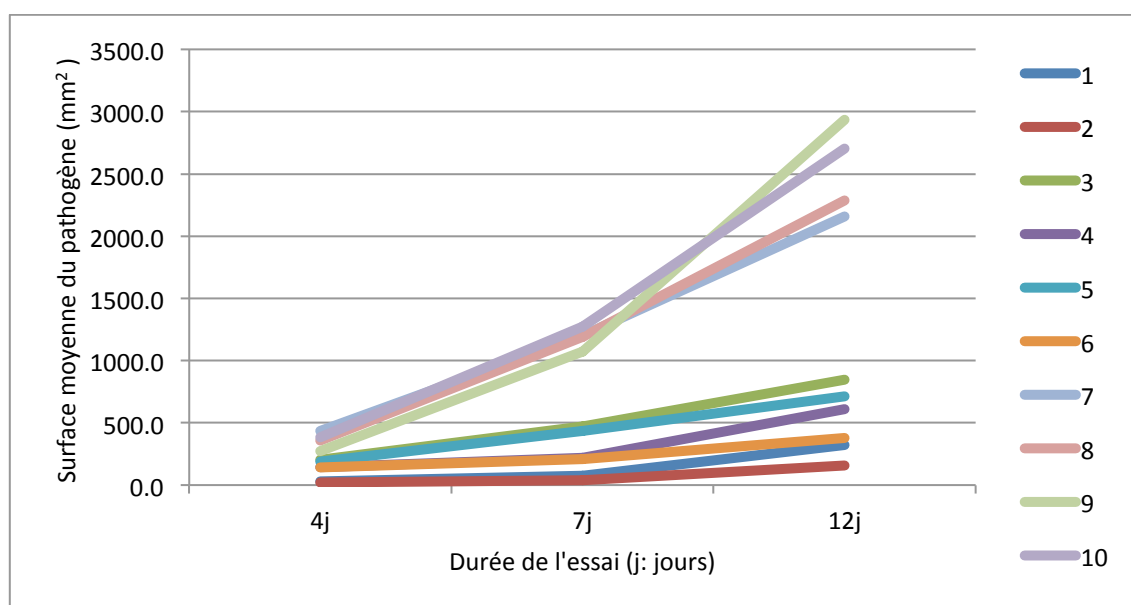
**Figure 32 : Représentation graphique de la distance moyenne entre le champignon pathogène et la bande bactérienne, après 4, 7 et 12 jours, exprimée en mm**



1, *P. putida* – *G. smithogilvyi* Ti ; 2, *P.putida* – *G. smithogilvyi* Ge ; 3, *P. raminis* – *G. smithogilvyi* Ti ; 4, *P. graminis* – *G. smithogilvyi* Ge ; 5, *P. xanthomarina* – *G. smithogilvyi* Ti ; 6, *P. xanthomarina* – *G. smithogilvyi* Ge ; 7, *B. elkanii* – *G. smithogilvyi* Ti ; 8, *B. elkanii* – *G. smithogilvyi* Ge.

La figure 33 représente, en fonction des jours de culture, l'évolution de la surface moyenne du pathogène selon la bactérie utilisée pour la confrontation. La bactérie qui à inhibe le plus la croissance du pathogène à été *P. putida*.

**Figure 33 : Surfaces moyennes des pathogènes après 4,7 et 12 jours, exprimée en mm<sup>2</sup>**



1, *P. putida* UASWS0946 – *G. smithogilvyi* Ti ; 2, *P. putida* UASWS0946 – *G. smithogilvyi* Ge ; 3, *P. raminis* – *G. smithogilvyi* Ti ; 4, *P. graminis* – *G. smithogilvyi* Ge ; 5, *P. xanthomarina* – *G. smithogilvyi* Ti ; 6, *P. xanthomarina* – *G. smithogilvyi* Ge ; 7, *B. elkanii* – *G. smithogilvyi* Ti ; 8, *B. elkanii* – *G. smithogilvyi* Ge ; 9, témoin *G. smithogilvyi* Ge ; 10 témoin *G. smithogilvyi* Ti.

La confrontation *P. viridiflava* – *G. smithogilvyi* est absente car la bactérie n'a pas réussi à se développer.

La totalité des Boîtes de Petri utilisés dans cet essai ont été prises en photos et sont consultables en annexe 10.

## **2.2 Résultats des essais de confrontation in vivo**

Après les 6 semaines de culture, la plupart des scions de toutes les modalités ont été recouverts de fructifications d'agents fongiques externes. La majorité des contaminations était causée par *C. parasitica*, dont les cirrhes jaunes orangés étaient facilement reconnaissables (Fig. 35), qui couvraient de 25 à 100% de la surface des scions. La figure 34 sert à expliquer la méthodologie utilisée pour calculer la contamination sur chaque scion ; le scion utilisé en tant qu'exemple, il a une contamination de 100%. Le tableau 10 ci-dessous représente, par différent traitement, la contamination des scions.

Figure 34: exemple de scion contaminé, avec l'échelle utilisée pour déterminer le taux de contamination

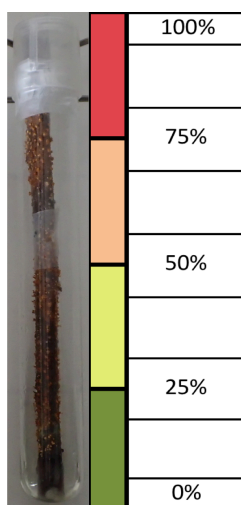


Photo : M. Conti

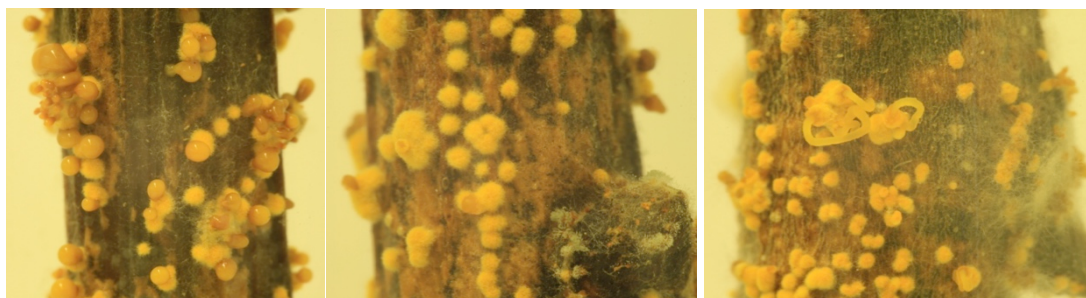
Tableau 10: récapitulatif des scions contaminés

Scion	Antagoniste utilisé	Contamination GS/CP	% contamination GS/CP	Moyenne contamination (%)
1	<i>T. hamatum</i>	Non	0	0.0
2	<i>T. hamatum</i>	Non	0	
3	<i>T. hamatum</i>	Non	0	
4	<i>T. hamatum</i>	Non	0	
5	<i>T. hamatum</i>	Non	0	
6	<i>T. hamatum</i>	Non	0	
7	<i>T. hamatum</i>	Non	0	
8	<i>T. hamatum</i>	Non	0	
1	<i>T. asperellum</i>	Non	0	6.3
2	<i>T. asperellum</i>	Non	0	
3	<i>T. asperellum</i>	Non	0	
4	<i>T. asperellum</i>	Non	0	
5	<i>T. asperellum</i>	Oui	25	
6	<i>T. asperellum</i>	Oui	25	
7	<i>T. asperellum</i>	Non	0	
8	<i>T. asperellum</i>	Non	0	
1	<i>T. harzianum F1</i>	Oui	100	71.9
2	<i>T. harzianum F1</i>	Oui	100	
3	<i>T. harzianum F1</i>	Oui	100	
4	<i>T. harzianum F1</i>	Oui	100	
5	<i>T. harzianum F1</i>	Oui	75	
6	<i>T. harzianum F1</i>	Oui	100	
7	<i>T. harzianum F1</i>	Non	0	
8	<i>T. harzianum F1</i>	Non	0	
1	<i>T. harzianum B05</i>	Oui	100	43.8
2	<i>T. harzianum B05</i>	Oui	100	
3	<i>T. harzianum B05</i>	Oui	100	
4	<i>T. harzianum B05</i>	Oui	25	
5	<i>T. harzianum B05</i>	Oui	25	
6	<i>T. harzianum B05</i>	Non	0	

7	<i>T. harzianum</i> B05	Non	0	40.6
8	<i>T. harzianum</i> B05	Non	0	
1	<i>T. aureoviride</i>	Oui	100	
2	<i>T. aureoviride</i>	Oui	100	
3	<i>T. aureoviride</i>	Oui	100	
4	<i>T. aureoviride</i>	Oui	25	
5	<i>T. aureoviride</i>	Non	0	
6	<i>T. aureoviride</i>	Non	0	
7	<i>T. aureoviride</i>	Non	0	0.0
8	<i>T. aureoviride</i>	Non	0	
1	<i>P. putida</i>	Non	0	
2	<i>P. putida</i>	Non	0	
3	<i>P. putida</i>	Non	0	
4	<i>P. putida</i>	Non	0	
5	<i>P. putida</i>	Non	0	
6	<i>P. putida</i>	Non	0	
7	<i>P. putida</i>	Non	0	65.6
8	<i>P. putida</i>	Non	0	
1	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba4	Oui	100	
2	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba4	Oui	100	
3	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba4	Oui	100	
4	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba4	Oui	100	
5	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba4	Oui	75	
6	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba4	Oui	50	
7	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba4	Non	0	53.1
8	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba4	Non	0	
1	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba2	Oui	50	
2	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba2	Oui	100	
3	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba2	Oui	100	
4	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba2	Oui	75	
5	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba2	Oui	25	
6	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba2	Oui	25	
7	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba2	Oui	25	90.6
8	<i>B. amyloliquefaciens</i> Ba2	Oui	25	
1	Témoin positif	Oui	100	
2	Témoin positif	Oui	100	
3	Témoin positif	Oui	100	
4	Témoin positif	Oui	100	
5	Témoin positif	Oui	100	
6	Témoin positif	Oui	100	
7	Témoin positif	Oui	50	9.4
8	Témoin positif	Oui	75	
1	Témoin sans pathogène	Oui	25	
2	Témoin sans pathogène	Oui	25	
3	Témoin sans pathogène	Non	0	
4	Témoin sans pathogène	Non	0	
5	Témoin sans pathogène	Non	0	
6	Témoin sans pathogène	Oui	25	
7	Témoin sans pathogène	Non	0	0
8	Témoin sans pathogène	Non	0	

Seules deux modalités ont maintenu les scions exempts de fructifications fongiques superficielles produites par des organismes externes. Ces modalités étaient la bactérie antagoniste *Pseudomonas putida* UASWS0946 et le champignon antagoniste *Trichoderma hamatum* UASWS1405.

**Figure 35: Fructifications de *C. parasitica* sur les scions de châtaignier**



*Photos : M. Conti*

La figure 35, divisée en trois images distinctes, offre le détail des cirrhes et des vrilles jaunes orangés caractéristiques d'une contamination par *C. parasitica* sur l'écorce de châtaignier.

Les figures suivantes représentent le résultat d'une partie des scions trempés dans les solutions contenant *P. putida* UASWS0946 (fig. 36) et *T. hamatum* UASWS1405 (fig. 37).

**Figure 36: Scions inoculés par trempage avec *P. putida* UASWS0946 après 6 semaines**



*Photo : M. Conti*



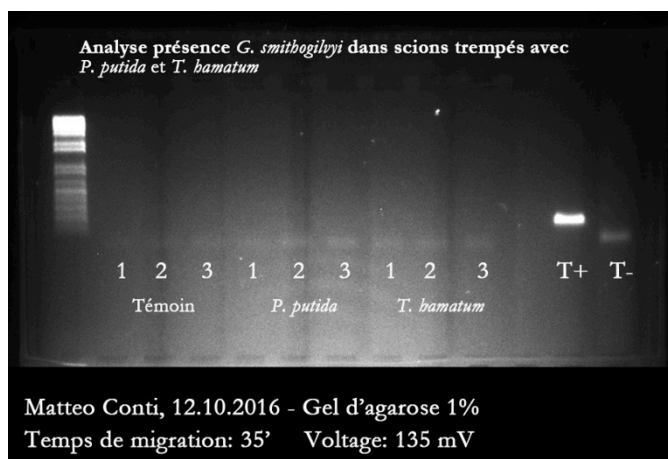
**Figure 37: Scions inoculés par trempage avec *T. hamatum* UASWS1405**



Photo : M. Conti

La figure 38 représente le test moléculaire effectué sur un scion témoin (sans agents fongiques), un scion trempé dans une solution avec *P. putida* et un scion trempé avec une solution contenant *T. hamatum*. Dans les trois scions analysés, la présence de *G. smithogilvyi* n'a pas été détectée.

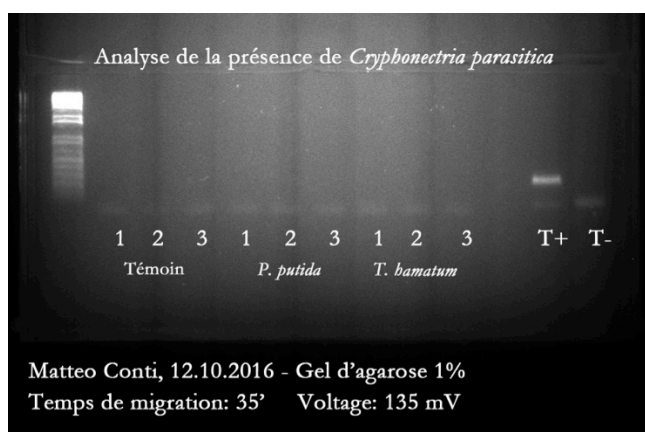
**Figure 38: Electrophorégramme de contrôle de la présence de *G. smithogilvyi* dans les scions. Témoin : scion témoin trempé dans l'eau, non inoculé par *G. smithogilvyi* ; *P. putida* : scion inoculé par *P. putida* UASWS0946 ; *T. hamatum* : scion inoculé par *T. hamatum* UASWS1405**



Pour l'analyse, les scions ont été coupés en lamelles à trois endroits: à 1 centimètre du fond (1), à 10 cm (moitié) (2) et à 1 cm du sommet (3).

La figure 39 représente le test moléculaire menée sur les mêmes scions de la figure 38 (avec les mêmes modalités), mais cette fois le but était d'analyser la présence de *C. parasitica*. Ce champignon n'a pas été détecté dans ces trois scions

**Figure 39: Electrophorégramme de contrôle de la présence de *C. parasitica* dans les scions. Témoin : scion témoin trempé dans l'eau, non inoculé par *G. smithogilvyi* ; *P. putida* : scion inoculé par *P. putida* UASWS0946 ; *T. hamatum* : scion inoculé par *T. hamatum* UASWS1405**



Pour l'analyse, les scions ont été coupés en lamelles à trois endroits: à 1 centimètre du fond (1), à 10 cm (moitié) (2) et à 1 cm du sommet (3).

## Troisième partie : discussion

# 1. Analyse de la présence de *G. smithogilvyi* dans les fruits et porte-greffes de châtaignier

L'analyse de la présence de *Gnomoniopsis smithogilvyi* a été effectuée sur un total de 230 échantillons récoltés dans le Canton du Tessin. Par ailleurs 25 échantillons d'ADN provenant d'isolats de *G. smithogilvyi* isolés de galles de cynips prélevés sur des châtaigniers du Valais (aimablement fournis par Simone Prospero et Joana Meyer, Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage WSL). Les mêmes échantillons ont été analysés aussi pour déterminer le taux de présence de *Cryphonectria parasitica*. Les six variétés choisies pour cette analyse sont les variétés communément utilisées par la Pépinière Cantonale du Tessin, qui sont les variétés les plus commercialisées au Tessin.

Dans une première phase, des expériences préliminaires ont été menées pour choisir le meilleur tampon d'extraction à parti de matériel de châtaignier. Comme montré par le tableau 6, une comparaison entre le tampon d'extraction Douglas-Lefort (DL) et le tampon d'extraction CTAB a été menée ; la comparaison a été effectuée sur 2 échantillons, un venant d'une pousse et un d'origine racinaire. Le choix du tampon pour les analyses du matériel végétal a été effectué en analysant les résultats présentés dans le tableau. Après avoir effectué le dosage au Nanodrop, le Douglas-Lefort s'est avéré extraire une concentration d'ADN beaucoup plus élevée que le tampon CTAB mais de moins bonne qualité comme le montrent les dosages spectrophotométriques. Le tampon CTAB a donc été retenu pour la suite des travaux. La racine, en tant qu'organe de réserve, contient beaucoup de sucres et l'utilisation du tampon CTAB a permis d'extraire de l'ADN de racine avec des meilleurs rapports DO260/DO280 et DO260/DO230, signifiant une moindre contamination en sucres, bien que les quantités obtenues soient plus faibles que celles obtenues avec le tampon Douglas-Lefort. Avec le tampon CTAB il a ainsi été possible d'extraire l'ADN de tous les échantillons avec des taux DO260/DO280 et DO260/DO230 satisfaisant (annexe 4); le seul souci qu'il y a eu concernait la concentration d'une petite portion d'échantillons, qui était en dessous de 50 ng/ $\mu$ l ; pour ces dernières, lors de la préparation du mix PCR, il y a eu l'ajoute d'une proportion plus élevée de produit ADN dans les puits PCR par rapport aux autres échantillons, où il y a eu l'utilisation de 1 $\mu$ l dosé à 50 ng/ $\mu$ l. La raison de cette manipulation était basée sur le fait que, lors de l'extraction de l'ADN, ce dernier, une fois extrait, a été resuspendu dans 100  $\mu$ l d'eau ultra pure ; avec une concentration finale en dessous de 50 ng/  $\mu$ l il était en fait impossible de préparer de l'ADN plus concentré, car il n'y avait pas suffisamment de matériel. Pour pourvoir à ce fait il y a

donc eu la conclusion d'augmenter la dose d'ADN dans le mix PCR. Prenons le cas d'un échantillon ayant une concentration d'ADN de 25 ng/  $\mu$ l. Etant impossible d'augmenter sa concentration à 50 ng/  $\mu$ l, il suffit de ajouter 2  $\mu$ l d'ADN plutôt de 1  $\mu$ l ; ce fait permet ainsi d'avoir, dans le puits avec le mix PCR, l'ADN doublement concentré.

La deuxième étape a été de développer des tests de diagnostic moléculaire spécifiques. Suite au développement in silico, expliqué en Matériels et Méthodes, la spécificité des amorces développées sur le gène de la beta-tubuline a été vérifiée. Le test, résumé en figure 19, a conclu que les paires d'amorces GS (pour *G. smithogilvyi*) et CP (pour *C. parasitica*) étaient suffisamment spécifiques et pouvaient donc être utilisées pour détecter la présence de ces deux champignons dans les échantillons végétaux. Les conditions d'amplification PCR ont été optimisées, pour la température d'hybridation (figure 20) ainsi que pour la concentration d'ADN à utiliser (figure 21). Concernant la température d'hybridation, les primers GS et CP sont efficaces tout au long du gradient de température testé (de 53°C jusqu'à 65°C) mais avec une amplification plus intense entre 56.8°C et 59.7°C. Le choix final de la meilleure température d'hybridation a été fixé à 58°C. Quant à l'adaptation du dosage, le test a été mené, sur les mêmes échantillons, à des concentrations de 1 ng/ $\mu$ l, 10 ng/ $\mu$ l, 50 ng/ $\mu$ l, 100 ng/ $\mu$ l et 200 ng/ $\mu$ l. Après avoir analysé les électrophorégrammes, la concentration de *G. smithogilvyi* donnant les meilleurs résultats a été 50 ng/ $\mu$ l. Cette concentration a été retenue car à 50 ng/ $\mu$ l les deux échantillons testés (feuille et racine) ont montré la présence du champignon. L'échantillon foliaire a révélé la présence de *G. smithogilvyi* aussi avec une concentration deux fois plus élevée (100 ng/ $\mu$ l) et l'échantillon racinaire avec une concentration 50 fois plus faible (1 ng/ $\mu$ l). L'absence d'uniformité de ces deux relevés, présentes dans un échantillon et pas dans l'autre (et vice-versa), a imposé le choix finale sur la concentration ou le champignon à pu se révéler dans les deux échantillons : 50 ng/ $\mu$ l. Le fait de ne pas avoir une présence constante de *G. smithogilvyi*, sauf pour la concentration de 50 ng/ $\mu$ l, pourrait s'expliquer par la présence du champignon, dans les échantillons, sous forme de traces. La faible présence du champignon pourrait donc être susceptible de ne pas être amplifié par PCR, si la concentration d'ADN présent n'est pas adaptée. Concernant *C. parasitica* la concentration a été donc choisie en fonction de celle utilisée pour *G. smithogilvyi* (50 ng/ $\mu$ l).

Après avoir déterminé et optimisé les conditions des cycles d'amplification PCR, l'analyse des différentes parties végétales a pu être effectué. L'analyse des

différents échantillons a montré une présence de *G. smithogilvyi* dans 21.8% des échantillons. Ce travail était bâti sur l'hypothèse que tout le matériel végétal était contaminé et donc source de contamination. Ces travaux montrent toutefois que les châtaignes sont moins contaminées qu'attendu. Les racines, tout aussi comme les pousses et les porte-greffes sont en fait générés à partir d'une châtaigne semée. Ce résultat pourrait s'expliquer par la difficulté du champignon à pénétrer le nouveau germe, présent dans la châtaigne. Malheureusement on ne peut pas conclure à une incapacité de pénétration car 10.1% du matériel végétal analysé issu de châtaignes, était contaminé.

Concernant les greffons, ceux contaminés par *G. smithogilvyi* représentent 14.3% de la totalité du matériel végétal analysé mais surtout 60% de l'ensemble des greffons. Plus de la moitié des greffons se sont révélés être contaminés. L'inoculation du champignon dans les châtaigniers se fait donc, dans la plupart des cas, au moment du greffage. Cette observation est particulièrement importante car elle suggère que le choix de l'arbre mère, sources de greffons, devrait être fait à la suite d'un test préalable de diagnostic permettant de déterminer l'état sanitaire de l'arbre. Cette méthodologie pourrait ainsi drastiquement limiter la présence de *G. smithogilvyi* dans les futurs plants greffés, et dans les nouveaux vergers.

Sur les six variétés analysées, une variété, « *Bouche de Bétizac* », est très peu contaminée. Dans les 42 échantillons analysés, pour cette variété, *G. smithogilvyi* a été détecté dans seulement 3 échantillons. Les contaminations ont été détectées sur deux racines et sur une pousse, ce qui certifie un excellent état sanitaire des arbres-mères. Il serait intéressant également de savoir si la moindre présence du champignon est due à une moindre acceptation de l'endophyte par la plante.

Les taux de contaminations, au sein des échantillons des 5 autres variétés analysées, varient entre 16,2% (*Michelangelo*) et 34,3% (*Selva Lattecaldo*). La variété *Giacco* est contaminée à 18.6%, la variété *Lüina* à 25.6% et la variété *Torcione Nero* est à 33.3%. Les variétés *Giacco*, *Torcione Nero* et *Selva Lattecaldo* ont des contaminations très élevées des greffons, à savoir 70% pour les greffons de *Giacco*, 80% pour ceux de *Torcione Nero* et 90% pour ceux de *Selva Lattecaldo*. Pour la production de ces variétés, il serait donc réellement judicieux d'analyser préalablement l'état sanitaire des arbres-mères, source de greffons, avant de prélever tout matériel de multiplication. Une recherche d'arbres-mères non-contaminés serait aussi une perspective intéressante.

Lors de l'application de ce test de diagnostic moléculaire spécifique de *G. smithogilvyi* certains échantillons ont montré, sur le gel d'électrophorèse, une bande « inconnue » située entre le front de migration du produit PCR et la bande spécifique de *G. smithogilvyi*. La première hypothèse était un défaut du à la Taq polymérase Biotools, et donc il y a eu le déroulement de plusieurs autres cycles PCR, en utilisant une Taq-polymérase plus puissante (Taq Bioline). Le résultat était inchangé ; la bande était toujours présente, mais le résultat était moins clair. De ce fait il y a eu, entre autre, la conclusion que pour ce test spécifique la Taq Biotools permet des meilleurs résultats, même si elle est censée être moins puissante que la Taq Bioline. Cette bande inconnue ne pose toutefois pas de soucis car son séquençage n'a donné aucune identité dans la base de données de l'NCBI et cette bande peut probablement s'expliquer par des artefacts d'amplification.

Lors de cette analyse il y a eu aussi l'échec de l'amplification d'une très petite portion d'échantillons. Pour essayer de résoudre ce problème, les échantillons ont été amplifiés à nouveau 3 fois, avec les deux Taq polymérases, mais les résultats n'ont jamais changés. D'après le « *New England Biolab inc.* » l'absence du produit PCR peut avoir plusieurs origines : les six premières raisons cités par ce laboratoire ( $T^{\circ}$  d'hybridation incorrecte, design des amorces mal effectué, amorces pas suffisamment spécifiques, concentration des amorces insuffisante, condition de réaction et nombres de cycles insuffisant) ne peuvent pas vraiment être la raison de l'absence d'amplification des échantillons car, pour le reste des analyses, tout à bien marché, donc ni les amorces ni les conditions de réaction sont en discussion. La septième raison attribuable à l'absence du produit PCR est l'absence d'un quelconque réactif dans le mix PCR ; ce défaut est difficilement la raison du problème, car le Mastermix préparé a été un pour tout les échantillons avec les mêmes amorces et car il est très peu probable que lors des essais menés à posteriori il y a eu la répétition de cet fantomatique erreur. Les deux dernières raisons qui pourront expliquer le défaut sont la mauvaise qualité de l'échantillon, avec notamment un rapport 260/280 insuffisant, ou la présence d'un inhibiteur dans la réaction. D'après le « NEB » les solutions à ces deux causes pourront être les suivantes : pour la première cause, une analyse de l'ADN sur gel d'électrophorèse avant et après l'incubation avec  $Mg^{++}$ , ainsi que un contrôle du rapport 260/280 des échantillons en question, pourront permettre la résolution de l'erreur. Pour la résolution de la deuxième cause il y a deux voies possibles : une purification de l'échantillon ou une diminution du volume dans le mix PCR ; ces deux manipulations

pourront annuler le défaut et permettre ainsi la visualisation des échantillons sur les électrophoregrammes (*pcr troubleshooting guide*, 2016).

Une autre observation particulièrement intéressante est que l'autre champignon testé, à savoir *C. parasitica*, n'a jamais été retrouvé. Une des hypothèses, pouvant expliquer son absence, était que *G. smithogilvyi* était prépondérant sur *C. parasitica* ; la supériorité hypothétique du premier lui aurait donc conféré la capacité de supplanter le deuxième. La confrontation menée entre les deux pathogènes (figure 25) a réfuté cette hypothèse, car les colonies des deux champignons ont grandi à vitesse égale jusqu'au moment du contact, quand ils ont cessé leurs croissance. Ce résultat nous laisse donc conclure que *C. parasitica* n'est probablement pas un champignon endophyte.

Une troisième observation faite dans le cadre de ces expériences est l'attribution probable pour la première fois d'un symptôme de chancre au champignon *G. smithogilvyi*, sur des échantillons de châtaigniers prélevés en forêt. Les figures 26 et 27 montrent en fait des branches de châtaigniers atteintes par une forme de chancre. Après avoir prélevé du matériel végétal à l'intérieur de ces chancres, l'analyse de la présence des deux champignons causant le chancre, a montré, dans les deux cas, que *G. smithogilvyi* était présent et que *C. parasitica* était absent. Ce résultat est très intéressant parce qu'il permet d'attribuer des symptômes concrets à la présence de *G. smithogilvyi*.

Enfin, l'analyse des échantillons d'ADN provenant des isolats de *G. smithogilvyi* issus de galles de cynips fournies par le WSL a permis de valider le test moléculaire sur un grand nombre d'isolats ; le résultat de ces analyses était une contamination de *G. smithogilvyi* du 100%. Cette conclusion ouvre deux réflexions : la première est celle concernant la méthode d'extraction de l'ADN utilisé par l'équipe du WSL (cf. S. Prospero et J. Meyer). Pour analyser les 230 échantillons venant du Tessin la méthode d'extraction a été longue et prenante, car pour chaque échantillon il a été nécessaire d'effectuer un broyage à l'azote et ensuite une extraction selon le protocole déjà décrit. L'équipe du WSL a par contre utilisé le kit *Dneasy Plant Kit* de *Qiagen*. L'utilisation de ce kit d'extraction pourra surement permettre de réduire les temps de manipulation concernant l'analyse des arbres-mères tout en gardant l'efficacité du test spécifique. La deuxième réflexion concerne le matériel végétal où le champignon a été retrouvé : les galles. Ces excroissances tumorales causées par *Dryocosmus kuriphilus* semblent être en relation avec *G. smithogilvyi*, car la totalité du matériel végétal analysé était contaminé. Une analyse plus approfondie pourrait



développer cet aspect et évaluer si effectivement il y a une relation entre ces deux organismes nuisibles.

Le taux de présence élevé du champignon amène une dernière réflexion, au sujet de son origine. La Nouvelle Zélande a été, selon la littérature, le premier pays à avoir découvert *G. smithogilvyi* en tant que pathogène (Visentin et al., 2012b). Les résultats obtenus lors de ce travail ont montré une forte présence du champignon, ce qui pourrait signifier qu'il est présent depuis longtemps dans les arbres tessinois et européens. Une exportation de châtaignes contaminées en Nouvelle Zélande aura ainsi permis au champignon de s'installer et de se développer. Cette réflexion reste évidemment une hypothèse, mais la forte présence de *G. smithogilvyi*, non seulement dans les châtaignes mais aussi dans les arbres âgés, laisse suggérer que le champignon est présent depuis bien plus longtemps que depuis 2008, date de sa découverte « officielle » au Tessin. Spegazzini, en 1879, avait notamment déjà attribué la pourriture brune à un champignon (Spegazzini, 1879), mais, d'après ses recherches, il s'agissait de *Phomopsis viterbensis*. Les techniques d'identification d'aujourd'hui, grâce à l'énorme progrès de la biologie moléculaire, sont plus puissantes que celles de 1879, et de ce fait, même s'il est très complexe de tirer des conclusions sur un sujet approfondi il y a plus d'une centaine d'années, il est toutefois normal de se poser la question si le champignon identifié par Spegazzini, en 1879, n'était pas *G. smithogilvyi*.

## 2. Essais de lutte biologiques

### Essais de confrontation in vitro

Lors des essais de confrontation in vitro, plusieurs souches se sont révélées, en conditions axéniques et contrôlées, très efficaces face à *Gnomoniopsis smithogilvyi*. Il n'y avait pas de différences entre les souches tessinoises et genevoises de *G. smithogilvyi*, ce qui a permis de conclure de manière globale l'efficacité potentielle de certaines antagonistes.

En ce qui concerne les confrontations entre le champignon pathogène et des champignons antagonistes, les souches du genre *Trichoderma* se sont montrées remarquables tant pour efficacité de biocontrôle que pour la vitesse de leur croissance. Toutes les souches testés, à savoir *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T. hamatum*, *T. harzianum F1* et *T. harzianum B05* ont supplanté et recouvert en peu de temps les deux isolats Ti1 et Ge1 du pathogène (voir annexe 10). La comparaison aux témoins mis en place a permis de conclure que la

réduction de croissance du pathogène était due à la présence du champignon antagoniste. Ces derniers ont maintenu une croissance uniforme durant le déroulement de l'essai. Les résultats obtenus avec les autres souches fongiques testées, *A. pullulans*, *A. pullulans éch. 5* et *B. bassiana* (annexe 10) étaient moins intéressants. Ces trois souches n'ont pas eu d'efficacité de contrôle de la croissance des deux souches de *G. smithogilvyi*. Leurs croissances étaient ralenties et aucun antagoniste n'a réussi à supplanter le pathogène. Le résultat concernant *B. bassiana* est décevant, car ce champignon a la particularité d'être entomopathogène et une efficacité potentielle à la fois contre *G. smithogilvyi* et *D. kuriphilus* aurait été particulièrement appréciable. La figure 31 représente les résultats sous la forme de la distance moyenne, en fonction du temps de culture, entre les deux champignons. Comme cité précédemment, les champignons du genre *Trichoderma* ont réduit la distance initiale en des temps très courts. Par exemple *T. hamatum* a couvert la distance au pathogène en seulement 4 jours.

Concernant les confrontations entre des bactéries antagonistes et le champignon pathogène, une seule espèce de bactérie a révélé une importante efficacité : *P. putida*. Cette bactérie a empêché totalement le développement du pathogène. Il sera particulièrement intéressant d'étudier les métabolites sécrétés par cette souche de *P. putida* pour arrêter la croissance du champignon. Les autres bactéries testées ont aussi présenté une certaine efficacité dans le ralentissement de la croissance de *G. smithogilvyi*, mais moindre que celle démontrée par *P. putida*. Concernant l'action antifongique de la bactérie *P. viridiflava* il y a eu un problème pour l'évaluer, car cette bactérie n'a pas réussi à se développer. Le manque de développement n'est toutefois pas attribuable à la présence de *G. smithogilvyi*, car aussi dans le témoin de la bactérie il n'y a pas eu de croissance. La raison de la difficulté de croissance pourrait donc s'expliquer par une souche pas particulièrement puissante. De toute façon il n'est pas possible de tirer des conclusions suite à cette confrontation spécifique, car la bactérie n'a pas pu montrer son potentiel, si existant.

#### Essais de confrontation in vivo

Les essais de confrontation in vivo ont donné des résultats moins marqués que ceux que l'on aurait pu attendre en utilisant les organismes ayant démontré les plus fortes efficacités in vitro. Cette efficacité n'a pas été retrouvée dans tous les essais in vivo. Les cas plus décevants concernent les bactéries *Bacillus amyloliquefaciens* Ba4 et *B. amyloliquefaciens* Ba2. Ces deux bactéries ont été testées dans cette partie même si leurs confrontations n'ont pas été testées directement dans cette étude. La raison est à attribuer au fait que leur efficacité en boîte de Petri a été

prouvée par M. Bastien Cochard (Ba4) et par Mlle Sabrina Pasche (Ba2). Ces deux bactéries, inhibant complètement et quasi instantanément la croissance de *G. smithogilvyi*, avaient un grand potentiel en tant qu'agents de lutte biologique. Malheureusement leurs efficacités n'ont pas été maintenues dans les essais in vivo, car la contamination d'autres pathogènes présente sur les scions était presque totale. Une explication possible à cette inefficacité pourrait être le mode dont ils inhibent la croissance de *G. smithogilvyi* en boîte de Petri ; d'après Bezert et al (1996), une bactérie peut inhiber le développement du champignon par trois mécanismes : production d'une substance inductible active, création d'une compétition trophique ou production d'une substance inhibitrice volatile (Bezert et al., 1996). Si les deux souches de *Bacillus amyloliquefaciens* inhibent le champignon avec la production d'une substance inhibitrice volatile, par exemple, l'efficacité dans le scion pourrait être redimensionnée. Ce qui pourrait être intéressant, pour ces deux bactéries résultant très efficaces en boîtes de Petri, serait d'analyser plus en détail le mécanisme d'inhibition de *G. smithogilvyi*, avec des tests supplémentaires. Concernant les champignons antagonistes, la plupart d'eux n'ont pas été efficaces pour contrôler *G. smithogilvyi*. Leur installation dans le scion a été possible, car la sporulation était visible, mais leur efficacité en ce qui concerne le contrôle du pathogène a été insuffisante. *T. asperellum* a réussi à inhiber partiellement le développement de *C. parasitica* mais, sur certains scions, la présence du pathogène, bien que minimale, a été détecté ; pour cette raison cet antagoniste ne peut pas être considéré comme efficace.

Ces essais ont été construits avec le souci de se rapprocher le plus possible d'une utilisation des antagonistes en conditions réelles. Pour cette raison les scions n'ont pas été stérilisés superficiellement. Cette absence de stérilisation a eu pour résultat une forte contamination superficielle des scions par des champignons, entre autres, par *C. parasitica*. Ce taux élevé de contamination de matériel prélevé en forêt a entraîné plusieurs réflexions qui permettraient le cas échéant dans le cas d'un essai similaire, d'en améliorer l'efficacité.

La première réflexion qui semble importante à faire concerne directement la forte contamination par d'autres champignons (p. ex. *C. parasitica*) sur le scion. Une solution tout à fait envisageable pourrait être l'utilisation de cultures de spores (Pasche, 2013), plutôt que de cultures liquides, pour obtenir les champignons à utiliser lors des trempages. Une culture de spore aura été peut-être plus adaptée à ce niveau, car ça aurait été plus aisé d'effectuer la dilution dans l'eau stérile. Une autre solution pourrait être la stérilisation préalable des scions par les UV. Cette

manipulation n'a pas été effectuée car la volonté était celle d'établir un essai qui se rapprochait le plus possible d'une hypothétique mise en pratique en pépinière. Une stérilisation des plantes en pépinière serait difficilement applicable. Enfin, même si les UV auraient affecté les organismes présents superficiellement, il y aurait pu y avoir quand même un développement d'autres organismes, présents à l'intérieur du scion.

La deuxième réflexion concerne une possible difficulté de pénétration passive des microorganismes par capillarité dans les scions. Certains organismes n'ont peut-être pas réussi, en trois semaines, à monter dans le scion comme désiré. Une première solution à ce problème hypothétique pourrait être l'augmentation de la durée de l'essai ; plutôt que 6 semaines, il serait intéressant d'étaler l'essai sur douze semaines, où les 6 premières semaines seront laissées pour l'établissement de l'antagoniste avant inoculation du pathogène et 6 semaine pour observer le potentiel développement du pathogène, même s'il y a un risque de développement de champignons saprophytiques. Des coupes verticales, d'une longueur d'un centimètre, à la base du scion, pourraient aussi faciliter l'entrée de l'organisme dans le scion et permettre de garder la durée de l'essai inchangée.

Bien que cet essai eût pu être amélioré, les résultats obtenus sont cependant très intéressants. Deux des organismes testés ont donné des essais exempts de toute contamination, due soit à *C. parasitica* soit à *G. smithogilvyi*; ces deux organismes, *P. putida* et *T. hamatum* ont donc un potentiel certain pour devenir des agents de lutte pour contrôler *G. smithogilvyi* et *C. parasitica*. Le trempage des porte-greffes et des greffons dans des solutions contenant ces organismes pourrait ainsi permettre d'éviter le développement des deux champignons pathogènes et réduire fortement le taux de mortalité des plantes en pépinière.

## Conclusion

Au Tessin le châtaignier est ancré dans les coutumes et traditions de la population depuis des centaines d'années. Cet arbre a malheureusement connu beaucoup de maladies dont certaines graves comme l'encre ou le chancre. Ces dernières années, un nouveau pathogène, *Gnomoniopsis smithogilvyi*, un champignon endophyte, s'est avéré être l'agent causal de la pourriture brune (Visentin et al., 2012a) et de chancres du châtaignier (Pasche et al., 2016a). Cet endophyte et pathogène latent est suspecté par les symptômes de chancre qu'il occasionne d'être responsable d'une mortalité très élevée des châtaigniers en pépinière et en châtaigneraies nouvellement établies (Pasche et al., 2016a). Il est nécessaire d'évaluer sa présence comme endophyte en pépinières aussi bien dans les porte-greffes que dans les plantes mères pour mesurer sa prévalence et envisager les techniques de lutte appropriées.

*Gnomoniopsis smithogilvyi* est un champignon problématique en raison de sa symptomatologie ; en effet l'infection ne peut être détectée que lorsque le processus de colonisation du champignon est déjà à un stade avancé. Cette caractéristique pose évidemment beaucoup de problèmes pour tout ce qui concerne la production et la commercialisation des châtaignes : une plante visiblement saine pourra produire des châtaignes momifiées à l'intérieur ou bien avoir des branches (ou d'autres organes) atteintes par le chancre. La production involontaire de matériel végétal contaminé est donc un gros problème tant pratique que financier. Un des buts de ce travail était donc de vérifier si la contamination par cet endophyte provenait des châtaignes qui ont été semés ou bien si la contamination avait lieu au moment du greffage, quand il y a le prélèvement des greffons depuis l'arbre mère.

Bien que présent dans une partie des châtaignes analysés, *G. smithogilvyi* s'avère être présent surtout dans les greffons prélevés depuis les arbres-mères. La contamination par ce champignon semble se faire au moment du greffage ; une analyse préalable des arbres-mères pourrait réduire le taux de contamination. La présence du champignon dans les arbres-mères semble suggérer qu'il est présent au Tessin depuis plusieurs années et, donc, le fait de l'avoir découvert pour la première fois en Australie pourrait s'expliquer par l'importation, dans le pays australien, de châtaignes européennes, déjà contaminés par le champignon.

Concernant les méthodes de lutte possibles, un traitement avec la bactérie *Pseudomonas putida* ou le champignon *Trichoderma hamatum* pourrait inhiber l'expression du pathogène dans les futures plantes.

## Bibliographie

- Anagnostakis, S.L. (2001). American chestnut sprout survival with biological control of the chestnut-blight fungus population. *For. Ecol. Manag.* 152, 225–233.
- Baffi, M., and Merenda, A. (2006). Castagna. *Il Seme Foglia Il Frutto* 6, 4.
- Baidyaroy, D., Hausner, G., Hafez, M., Michel, F., Fulbright, D.W., and Bertrand, H. (2011). A 971-bp insertion in the *rns* gene is associated with mitochondrial hypovirulence in a strain of *Cryphonectria parasitica* isolated from nature. *Fungal Genet. Biol.* 48, 775–783.
- Barbera, G. (2007). *Tuttifrutti* (Milano: Mondadori).
- Bernetti, G. (1995). *Il castagno* (Torino: UTET).
- BEZERT, G., CHAPPE, P., MOUREY, A., and LOUBINOUX, B. (1996). ACTION DE BACILLUS ET D'ACTINOMYCETES SUR LES CHAMPIGNONS DU BLEUISSEMENT DU BOIS.
- Bissegger, M., and Sieber, T.N. (1994). Assemblages of endophytic fungi in coppice shoots of *Castanea sativa*. *Mycologia* 648–655.
- Bonavia, F. (2015). Communication personnelle.
- Bosio, G., and Vettorazzo, M. (2005). Data sheets on quarantine pests, OEPP/EPPO. *Dryocosmus Kuriphilus* 422–424.
- Bosio G. (2012). problemi emergenti del castagno: il marciume dei frutti (Cuneo).
- Ceschi, I. (2014). I boschi castanili in Ticino - Vivere la montagna - Rivista.
- Colombi, F. (2015). Communication personnelle.
- Conedera, M. (2006). Aspetti varietali nel recupero dei castagneti da frutto tradizionali. *Forestaviva* 12–13.
- Conedera, M. (2015). Communication personnelle.
- Conedera, M., Krebs, P., Tinner, W., Pradella, M., and Torriani, D. (2004a). The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Veg. Hist. Archaeobotany* 13.
- Conedera, M., Jermini, M., Sassella, A., and Sieber, T.N. (2004b). Récolte, traitement et conservation des châtaignes. *Not. Pour Prat.* 38.
- Conti, M., Crovadore, J., Meyer, J.B., Cochard, B., Chablais, R., Prospero, S., Jermini, M., and Lefort, F. (2016). Etablissement de tests de diagnostic moléculaire spécifiques de *Gnomoniopsis smithogilvyi* et *Cryphonectria parasitica*. Interactions complexes entre plantes et organismes nuisibles - Journée d'automne de la société Suisse de phytatrie, 27 Octobre 2016, HFAL Zollikofen, Zollikofen Suisse. Poster.
- Dar, M.A., and Rai, M. (2015). *Gnomoniopsis smithogilvyi*, a canker causing pathogen on *Castanea sativa*: First report.

- Delucchi, M. (2009). Il cancro corticale e la lavorazione del castagno. *Forestaviva* 36.
- Dennert, F.G., Broggin, G.A., Gessler, C., and Storari, M. (2015). *Gnomoniopsis castanea* is the main agent of chestnut nut rot in Switzerland. *Phytopathol. Mediterr.* 54, 199–211.
- Ding, P., Liu, F., Xu, C., and Wang, K. (2007). Transmission of *Cryphonectria hypovirus* to protect chestnut trees from chestnut blight disease. *Biol. Control* 40, 9–14.
- Dinis, L.-T., Peixoto, F., Zhang, C., Martins, L., Costa, R., and Gomes-Laranjo, J. (2011). Physiological and biochemical changes in resistant and sensitive chestnut (*Castanea*) plantlets after inoculation with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 75, 146–156.
- Gellini, R., and Grossoni, P. (1996). *Botanica forestale* vol. 1 (Padova).
- Glass, L. (2004). Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends Microbiol.* 12, 135–141.
- Käser, H. (1932). *Die Kastanienkultur und ihre Terminologie in Oberitalien und in der Südschweiz* (Aarau: H.R. Sauerländer).
- Kinsey, G. (2014). *Amphiporthe castanea*.
- Lee, S.H., Moon, B.J., and Lee, J.K. (2006). Characteristics of hypovirulent strains of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, isolated in Korea. *Mycobiology* 34, 61–66.
- Lefort, F. (2016). *Communication personnelle*.
- Lefort, F., Cochard, B., and Pelleteret, P. (2014). *Module à option "Santé des plantes" - Dossier de Cours et de travaux pratiques*.
- Lenti, C. (2013). *Le infinite proprietà benefiche e i mille modi di utilizzo della regina dell'autunno: la castagna!*
- Li, Z., Li, C., Huang, B., and Fan, M. (2001). Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. *Chin. Sci. Bull.* 46, 751–753.
- Magro, P., Speranza, S., Stacchiotti, M., Martignoni, D., and Papparatti, B. (2010). *Gnomoniopsis* associated with necrosis of leaves and chestnut galls induced by *Dryocosmus kuriphilus*. *Plant Pathol.* 59, 1171–1171.
- Moretti, G. (2006). Condizioni quadro, possibilità di recupero e situazione attuale dei catagneti ticinesi. *Forestaviva* 6–7.
- Osmonaliev, A., McNeil, D.L., Stewart, A., Klinac, D.J., Wadia, K.D.R., and others (2000). *Phomopsis castanea* infection in chestnuts from Canterbury, New Zealand. *Agron. N. Z.* 30, 29–35.
- Pasche, S. (2013). *Assessment of canker symptoms on one-year-old chestnut trees and investigating ways for microbial control of the disease*. University of Neuchâtel.

- Pasche, S., Calmin, G., Auderset, G., Crovadore, J., Pelleteret, P., Mauch-Mani, B., Barja, F., Paul, B., Jermini, M., and Lefort, F. (2016a). *Gnomoniopsis smithogilvyi* causes chestnut canker symptoms in *Castanea sativa* shoots in Switzerland. *Fungal genetics and biology*. 9–21.
- Pasche, S., Crovadore, J., Pelleteret, P., Jermini, M., Mauch-Mani, B., Oszako, T., and Lefort, F. (2016b). Biological control of the latent pathogen *Gnomoniopsis smithogilvyi* in European chestnut grafting scions using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma atroviride*. *Dendrobiology* 75, 113–122.
- Peever, T.L., Liu, Y.-C., Cortesi, P., and Milgroom, M.G. (2000). Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4863–4869.
- Peters, F.S., Bußkamp, J., Prospero, S., Rigling, D., and Metzler, B. (2014). Genetic diversification of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* and its associated hypovirus in Germany. *Fungal Biol.* 118, 193–210.
- Popov, A.P., Tsvetkov, I.L., Belov, A.A., Konichev, A.S., Ivanushkina, N.E., Kochkina, G.A., and Ozerskaya, S.M. (2010). Molecular genetic identification of the phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica*. *Microbiology* 79, 223–228.
- Pron, S., and Sormani, M. (2004). *Quaderno del Museo del Malcantone: Il castagno nella Svizzera Italiana.*
- Raimondi, M. (2013). *L'innesto del castagno (Canzo (CO)).*
- Robin, C., Lanz, S., Soutrenon, A., and Rigling, D. (2010). Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south-eastern France is associated with fitness-related traits. *Biol. Control* 53, 55–61.
- Saccardo, P.A. (1879). *Fungi Italici autographice delineati a Prof. P.A. Saccardo.*
- Scheggia, C. (2006). *Tecniche e costi del recupero del castagneto. Forestaviva* 9.
- Seccedil il, A. (2012). Feasibility of biological control of chestnut blight caused by *Cryphonectria parasitica*, in Marmara region of Turkey. *Afr. J. Agric. Res.* 7, 6068–6072.
- Shuttleworth L.A., Guest D.I., and Liew E.C.Y. (2012). Fungal Planet description sheets: 107–127. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 28, 138.
- Smith, I., McNamara, D., Scott, P., and Holderness, M. (1997). *Data sheets on quarantine pests N° 69, OEPP/EPPO.*
- Spegazzini, C. (1879). La “mummificazione delle castagne” da *Phomopsis viterbensis* sp. n. Nova addenda ad *Mycologiam Venetam. Michelia* 1, 453–487.
- Stacchiotti, M. (1999). *Studio delle problematiche inerenti la biologia ed il controllo delle popolazioni del cinipide galligeno del castagno Dryocosmus kuriphilus Yasumatsu nel viterbese. Tesi di dottorato di ricerca in protezione delle piante. Università degli Studi della Tuscia.*
- Stewart, A., and Knowles, R. (2000). Occurrence of *Phomopsis castanea* as an endophyte in chestnut trees.



- Tassinari, G. (1976). Manuale dell'agronomo (Roma: ed. REDA).
- Trestic, T., Uscuplic, M., Colinas, C., Rolland, G., Giraud, A., and Robin, C. (2001). Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France.
- Turina, M., Zhang, L., and Van Alfen, N.K. (2006). Effect of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) infection on Cpkk1, a mitogen-activated protein kinase kinase of the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* 43, 764–774.
- Visentin, I., Gentile, S., Valentino, D., Gonthier, P., Tamietti, G., Cardinale, F., and others (2012a). *Gnomoniopsis castanea* sp. nov. (Gnomoniaceae, Diaporthales) as a causal agent of nut rot in sweet chestnut. *J Plant Pathol* 94, 411–419.
- Visentin, I., Gentile, S., Valentino, D., Gonthier, P., Tamietti, G., Cardinale, F., and others (2012b). *Gnomoniopsis castanea* sp. nov. (Gnomoniaceae, Diaporthales) as a causal agent of nut rot in sweet chestnut. *J Plant Pathol* 94, 411–419.
- Washington, W.S., Allen, A.D., and Dooley, L.B. (1997). Preliminary studies on *Phomopsis castanea* and other organisms associated with healthy and rotted chestnut fruit in storage. *Australas. Plant Pathol.* 37–43.
- Zamora, P., Martín, A.B., San Martín, R., Martínez-Álvarez, P., and Diez, J.J. (2014). Control of chestnut blight by the use of hypovirulent strains of the fungus *Cryphonectria parasitica* in northwestern Spain. *Biol. Control* 79, 58–66.
- Zoller, H. (1960). Pollenanalytische Untersuchungen zur Vegetationsgeschichte der insubrischen Schweiz. *Denkschr. Schweiz. Naturforschenden Ges.* 45–156.

# ANNEXES

Thèse de Bachelor présentée par:

**Matteo CONTI**

pour l'obtention du titre Bachelor of Science HES-SO en Agronomie

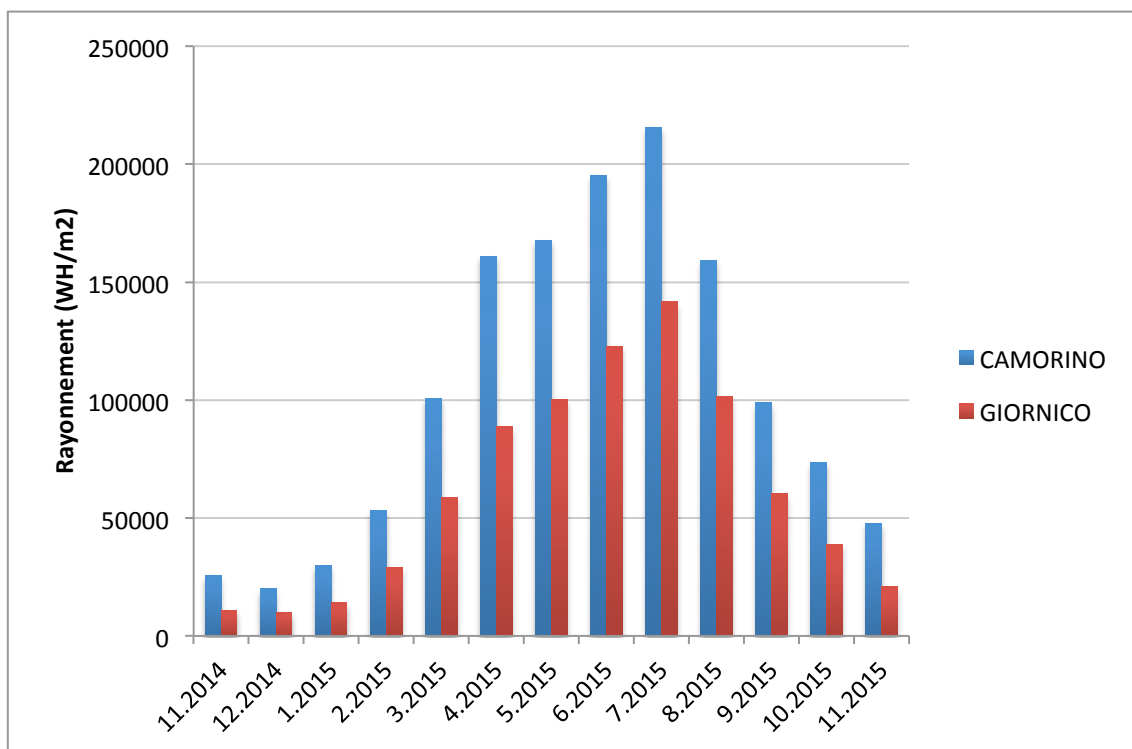
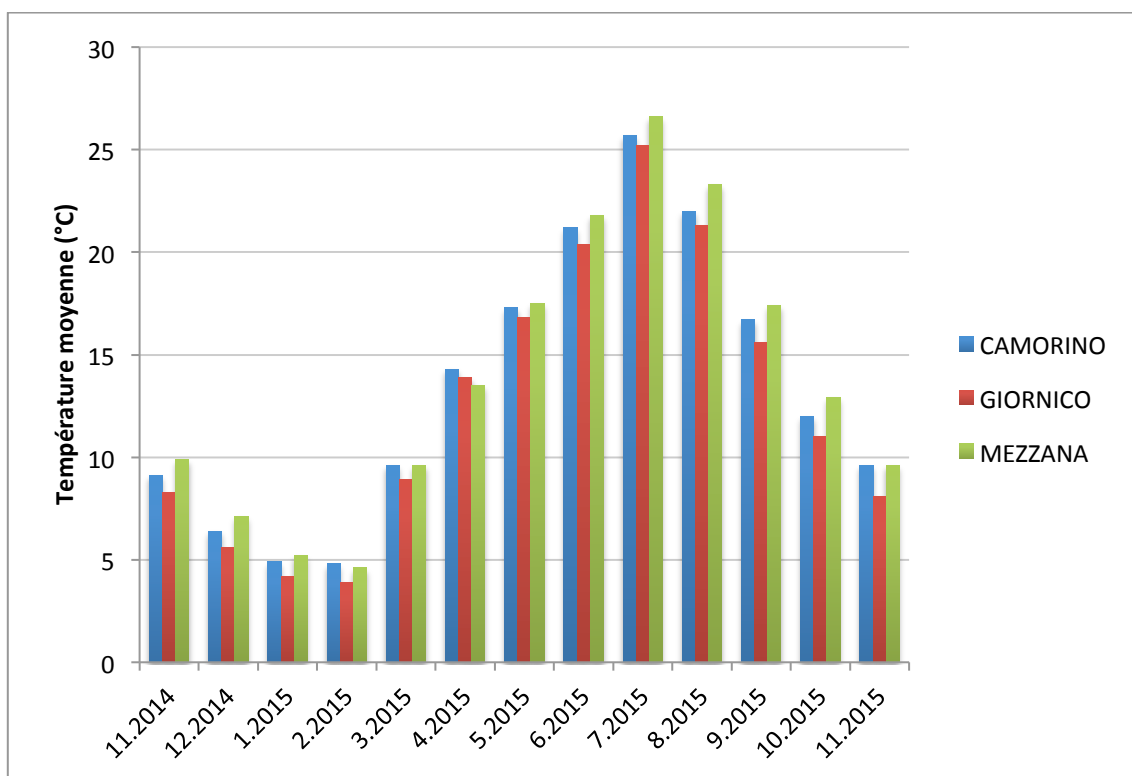
**Novembre 2016**

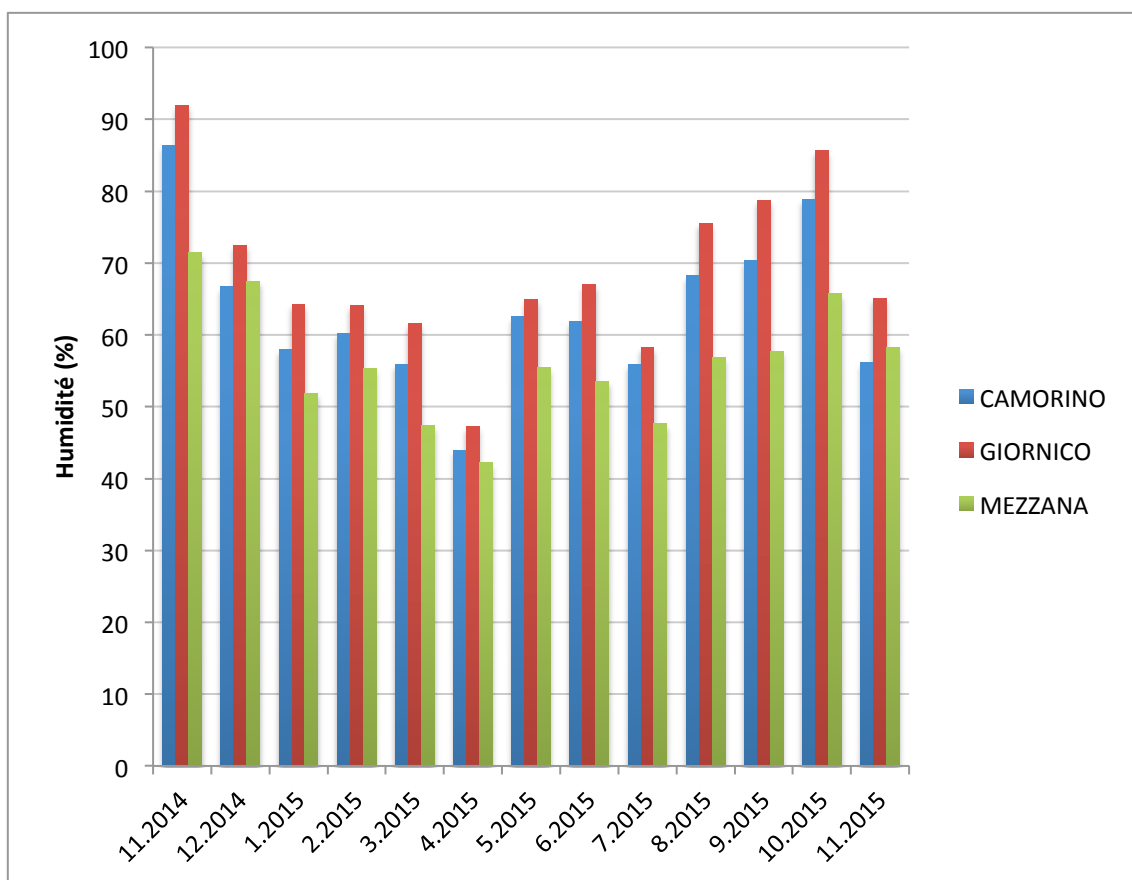
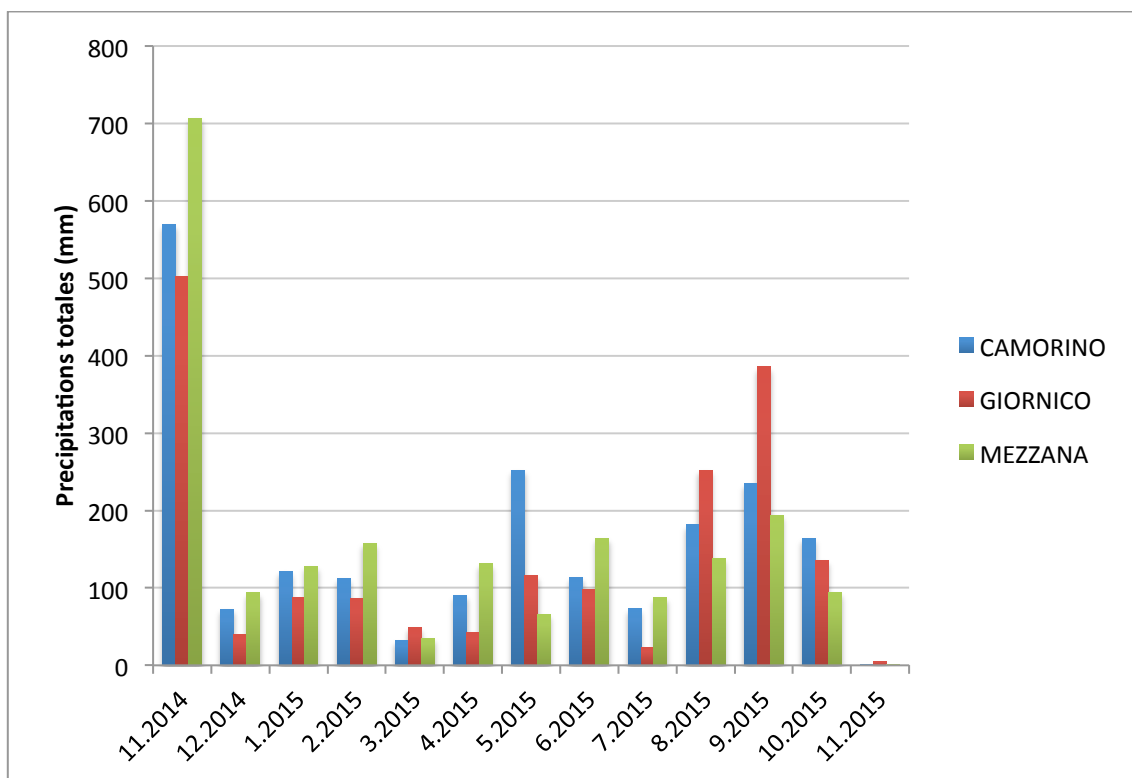
## Annexe 1 : comparaison de plusieurs *G. smithogilvyi*

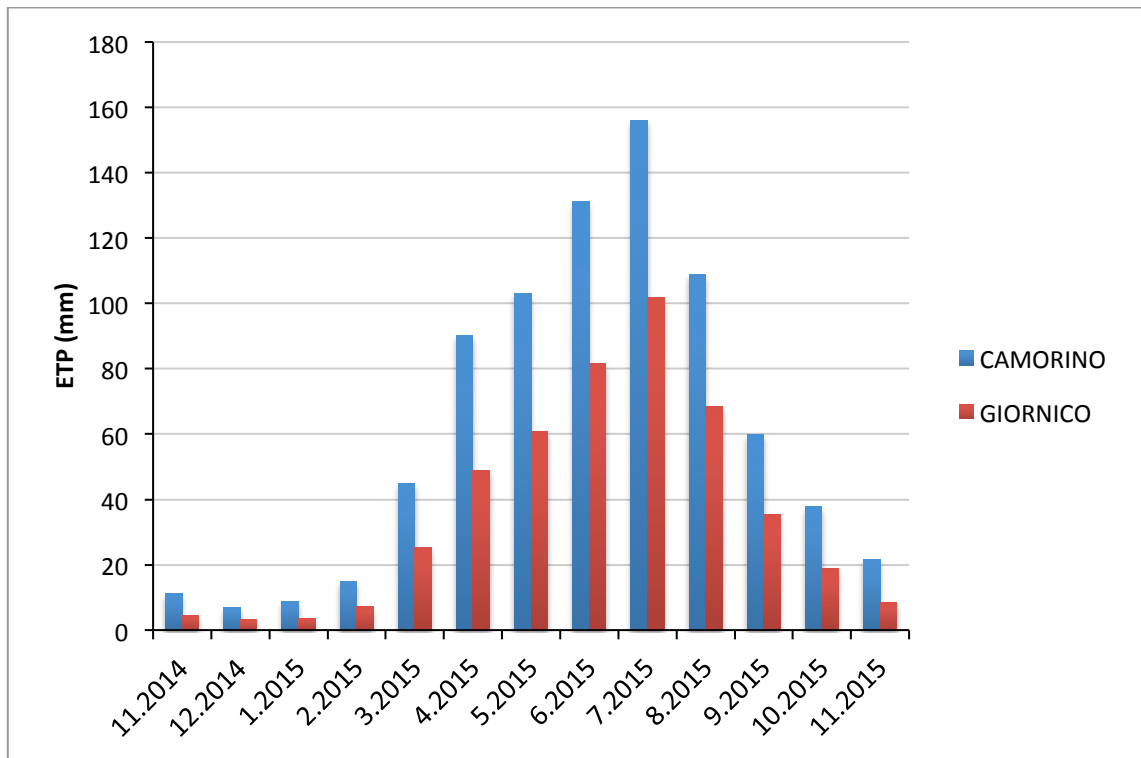
Source	Conidies	Structure reproductive	Mycelium	Taux de croissance
<b><i>G. smithogilvyi</i>, Ticino (Pasche, 2013)</b>	6.5-7x2.5-2.5 µm, hyaline, obovales, fusiformes, multi-vesiculées; droites ou courbées; couleur beige	Pycnidies oranges - rouges, éruptentes ou superficielles, circulaires, seules ou en groupe; 265-401.4 µm diam sur scions infectés	Mycelium gris-brun avec cercles concentriques; plat sur MEA et laineaux sur MYA et PGA	6.5mm/24h à 22°C et 8.1mm/24h à 27°C
<b><i>G. smithogilvyi</i>, Genève (Pasche, 2013)</b>	5.5-6.5x2.5 µm, hyaline, obovales, fusiformes, multi-vesiculées; droites ou courbées; couleur beige	Pycnidies oranges - rouges, éruptentes ou superficielles, circulaires, seules ou en groupe; 244.9-375 µm diam sur scions infectés	Mycelium gris-brun avec cercles concentriques; plat sur MEA et laineaux sur MYA et PGA	10.8mm/24h à 22°C et 11.1mm/24h à 27°C
<b><i>G. smithogilvyi</i> CBS 130190 (Shuttleworth et al., 2012)</b>	6.5-8x2.5-3 µm, hyaline, ovale, obovales, fusiformes, pyriforme, multi-vesiculées; droites ou courbées, sans appendices; gris-orangé (MEA), orange clair (MYA), orange pâle (PDA)	Pycnidies abondantes, noires-brunes, globulose, éruptentes et immergés en un milieu de plusieurs couleurs; 203.5-288.5µm de hauteur x 2.17.5-305.5µm de largeur	Mycelium gris-brun avec cercles concentriques; plat et transparent sur MEA et laineaux sur MYA et PGA	10.8mm/24h à 22°C et 11.1mm/24h à 27°C

Source : (Pasche, 2013)

## Annexe 2 : graphiques météorologiques tessinois















## Annexe 4 : concentration d'ADN, rapports 260/280 et 260/230 de la totalité des échantillons

Sample ID	Date	ng/ul	260/280	260/230
<b>Echantillons avec chancre</b>				
1.1	03.10.16	278.78	1.57	1.23
1.2	03.10.16	124.63	1.94	1.94
2.1	03.10.16	266.23	1.42	0.87
2.2	03.10.16	36.96	1.63	0.95
3.1	04.10.16	443.29	1.42	0.92
3.2	03.10.16	96.03	1.87	1.31
4.1	04.10.16	503.64	1.36	1.01
4.2	03.10.16	139.66	1.99	1.93
5.1	03.10.16	227.27	1.56	1.26
5.2	03.10.16	99.73	1.98	1.78
6.1	04.10.16	349.03	1.53	1.11
6.2	04.10.16	419.92	1.45	1.15
7.1	04.10.16	303.12	1.69	1.26
7.2	04.10.16	339.23	1.62	1.18
<b>Scions trempés dans antagonistes</b>				
1.1	12.10.16	385.2	7.704	5.321
1.2	12.10.16	433.5	8.67	6.313
1.3	12.10.16	152.82	3.056	2.002
2.1	12.10.16	172.62	3.452	2.316
2.2	12.10.16	146.61	2.932	1.932
2.3	12.10.16	78.37	1.567	1.045
3.1	12.10.16	309.52	6.19	4.161
3.2	12.10.16	877.62	17.552	13.503
3.3	12.10.16	104.47	2.089	1.39
<b>Pousses, racines et feuilles des porte-greffes</b>				
P1	04.07.16	365.04	2	1.98
P2	05.07.16	242.62	2.1	1.79
P3	05.07.16	250.2	2.08	1.82
P4	05.07.16	117.67	2.05	1.8
P5	05.07.16	282.89	2.09	1.9
P6	05.07.16	66.25	2	1.62
P7	05.07.16	259.84	2.13	2.05
P8	05.07.16	223.72	2.11	1.96
P9	05.07.16	348.37	2.12	2.09
P10	05.07.16	252.34	2.1	1.92
P11	05.07.16	396.46	2.11	2.01
P12	05.07.16	349.79	2.08	2.11
P13	05.07.16	533.99	2.1	2.02

P14	05.07.16	222.84	2.14	1.92
P15	05.07.16	404.37	2.08	1.9
P16	05.07.16	244.11	2.09	1.94
P17	05.07.16	354.06	2.09	2.02
P18	05.07.16	244.63	2.08	1.81
P19	05.07.16	69.33	2.02	1.59
P20	05.07.16	219.52	2.14	1.95
P21	05.07.16	318.94	2.08	1.92
P22	05.07.16	207.73	2.1	1.95
P23	05.07.16	225.37	2.14	1.97
P24	05.07.16	241	2.1	1.93
P25	05.07.16	192.65	2.09	1.89
P26	05.07.16	183.9	1.9	1.43
P27	05.07.16	205.98	1.99	1.7
P28	05.07.16	203.53	1.94	1.56
P29	05.07.16	162.15	2.04	1.66
P30	05.07.16	17.78	1.82	1.01
P31	05.07.16	148.65	1.93	1.63
P32	05.07.16	170	1.96	1.64
P33	11.07.16	307.1	2.07	1.85
P34	05.07.16	187.88	2.01	1.64
P35	05.07.16	138.81	2.01	1.74
P36	05.07.16	173.89	2.05	1.64
P37	05.07.16	229.2	2.08	1.82
P38	05.07.16	224.44	2.02	1.65
P39	05.07.16	89.29	2.03	1.49
P40	05.07.16	346.77	1.99	1.56
P41	05.07.16	258.88	2.05	1.7
R1	05.07.16	365.78	1.94	1.42
R2	04.07.16	427.71	1.98	1.61
R3	05.07.16	279.23	1.97	1.5
R4	05.07.16	191.44	1.93	1.34
R5	05.07.16	152.07	1.93	1.3
R6	05.07.16	267.45	1.89	1.35
R7	05.07.16	256.9	1.89	1.35
R8	05.07.16	247.38	1.92	1.37
R9	05.07.16	255.83	1.9	1.31
R10	06.07.16	336.56	1.93	1.45
R11	06.07.16	187.32	2.08	1.72
R12	06.07.16	252.98	2.06	1.75
R13	06.07.16	305.62	2.08	1.88
R14	06.07.16	190.19	1.94	1.5
R15	06.07.16	250.62	2	1.72
R16	06.07.16	217.26	2.02	1.73
R17	06.07.16	283.76	1.97	1.56
R18	06.07.16	252.85	2.05	1.65

R19	06.07.16	261.86	1.87	1.58
R20	06.07.16	217.5	2.02	1.6
R21	06.07.16	974.26	1.56	0.83
R22	06.07.16	474.8	2.06	1.78
R23	06.07.16	390.01	1.99	1.61
R24	06.07.16	1298.73	1.56	0.87
R25	06.07.16	693.14	1.69	1.01
R26	06.07.16	211.79	1.99	1.51
R27	06.07.16	210.26	1.94	1.52
R28	06.07.16	391.64	1.98	1.6
R29	06.07.16	309.28	2.03	1.66
R30	06.07.16	716.17	1.68	0.97
R31	06.07.16	310.11	1.93	1.41
R32	06.07.16	812.37	1.56	0.82
R33	06.07.16	389.65	1.97	1.57
R34	06.07.16	325.83	1.68	0.99
R35	06.07.16	266.28	1.85	1.31
R36	06.07.16	459.18	1.63	1
R37	06.07.16	233.19	1.84	1.19
R38	06.07.16	300.82	1.81	1.23
R39	06.07.16	266.35	1.7	1.03
R40	06.07.16	152.01	1.8	1.13
R41	06.07.16	328.01	2	1.66
R42	06.07.16	893.15	1.91	1.51
R43	06.07.16	716.56	1.86	1.57
R44	06.07.16	538.92	1.66	1
R45	06.07.16	148.43	1.85	1.27
R46	06.07.16	375.25	2.02	1.68
R47	06.07.16	276.84	1.99	1.65
R48	06.07.16	272.53	1.87	1.33
R49	06.07.16	881.31	1.88	1.4
R50	06.07.16	150.97	1.94	1.41
R51	06.07.16	270.26	1.89	1.57
R52	06.07.16	316.2	2.06	1.9
R53	06.07.16	103.27	1.66	1.31
R54	06.07.16	226.95	1.98	1.53
R55	06.07.16	719.32	1.68	0.91
R56	06.07.16	213.87	1.99	1.59
R57	11.07.16	203.39	1.96	1.44
R58	11.07.16	221.82	2.01	1.54
R59	11.07.16	185.19	1.95	1.4
R60	11.07.16	184.21	2.01	1.59
F1	11.07.16	4091.16	2.08	2.18
F2	11.07.16	813.42	2.07	2.16
F3	11.07.16	2441.67	2.1	2.24
F4	11.07.16	527.04	2.07	2.07

F5	11.07.16	315.63	2.08	2.01
F6	11.07.16	317.3	2.06	1.91
F7	11.07.16	692.15	2.08	2.03
F8	11.07.16	2973.13	2	1.96
F9	11.07.16	253.65	2	1.76
F10	11.07.16	680.05	2.06	2.02
F11	11.07.16	521.01	2.05	1.93
F12	11.07.16	472.17	2.01	1.92
F13	11.07.16	479.39	2.09	2.07
F14	11.07.16	942.63	2.1	2.16
F15	11.07.16	348.19	2.05	2.08
F16	11.07.16	374.35	1.96	1.7
F17	11.07.16	394.92	2.05	1.91

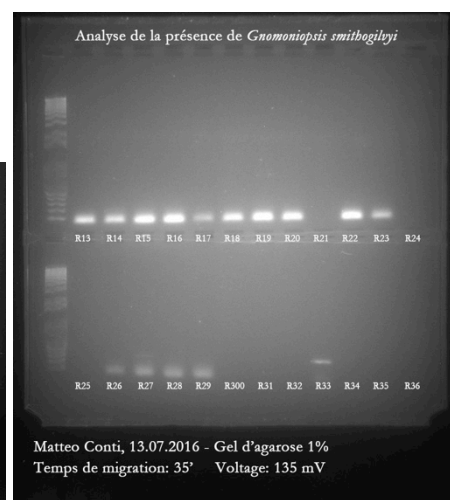
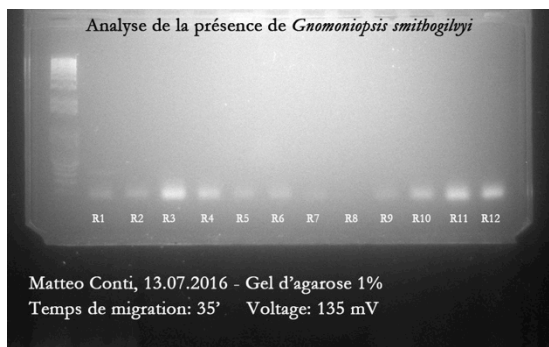
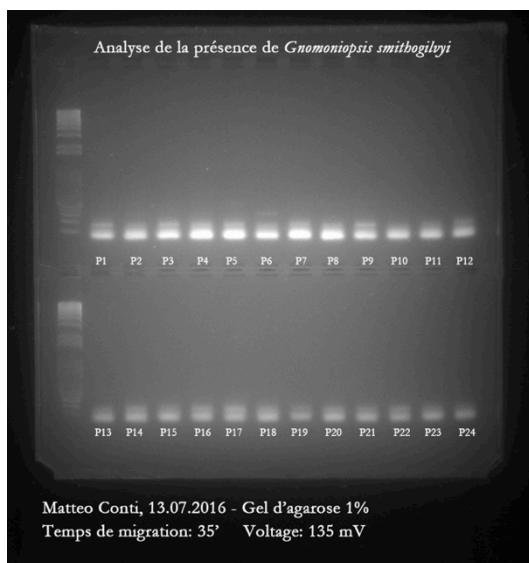
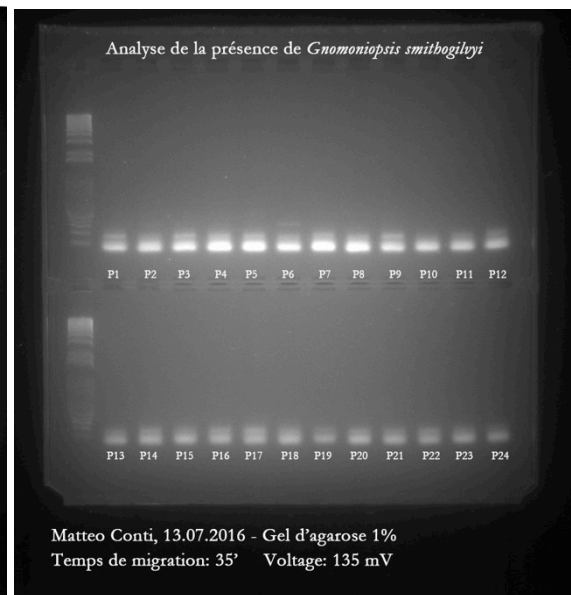
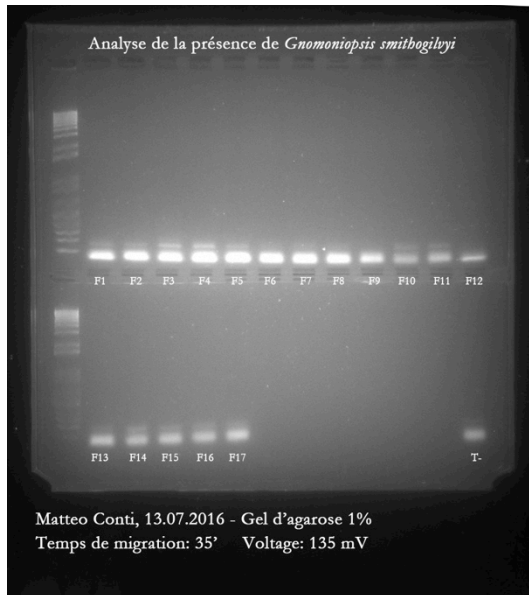
**Couples porte-greffe / greffon**

PV1	29.08.16	413.3	2.05	2.22
MV1	29.08.16	92.52	1.93	1.5
PV2	29.08.16	110.82	2.04	2.09
MV2	29.08.16	106.53	1.91	1.35
PV3	30.08.16	465.33	2.06	2.11
MV3	29.08.16	104.34	1.91	1.26
PV4	30.08.16	150.8	2.08	2.11
MV4	29.08.16	111.58	1.85	1.35
PV5	30.08.16	128.41	2.04	1.89
MV5	29.08.16	120.38	1.91	1.56
PV6	30.08.16	91.48	1.97	2.06
MV6	29.08.16	103.29	1.9	1.53
PV7	30.08.16	96.76	1.96	2.02
MV7	29.08.16	140.36	1.88	1.49
PV8	30.08.16	84	1.97	2
MV8	29.08.16	136.16	1.82	1.15
PV9	30.08.16	96.37	1.92	1.81
MV9	29.08.16	108.08	1.81	1.25
PV10	30.08.16	95.97	1.94	1.87
MV10	29.08.16	88.3	1.87	1.4
PG1	29.08.16	96.65	2.04	1.95
MG1	29.08.16	160.15	2.02	1.99
PG2	29.08.16	173.12	2	1.85
MG2	29.08.16	248.08	2.03	2.03
PG3	29.08.16	157.24	2.08	2.05
MG3	29.08.16	173.55	1.99	1.8
PG4	29.08.16	98.16	2.06	1.99
MG4	29.08.16	112.08	2.02	1.84
PG5	29.08.16	692.31	2.08	2.2
MG5	29.08.16	105.93	1.99	1.82
PG6	29.08.16	107.1	2.05	1.88

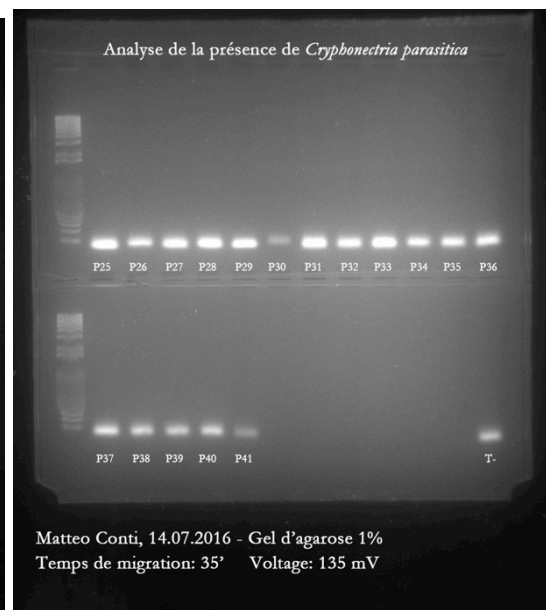
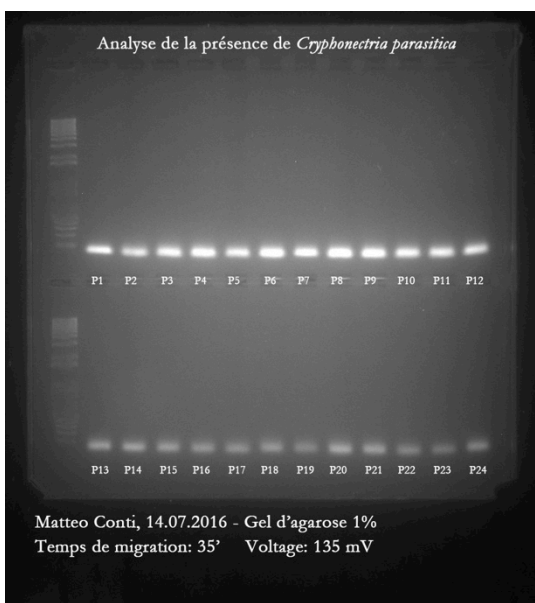
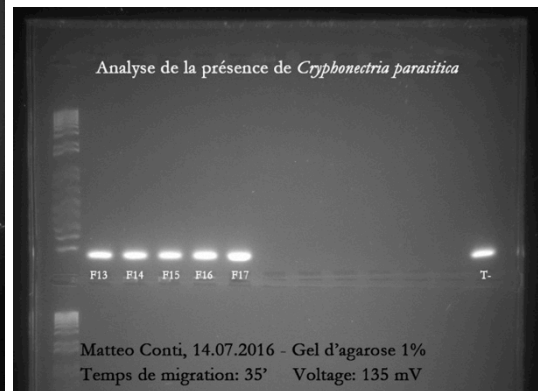
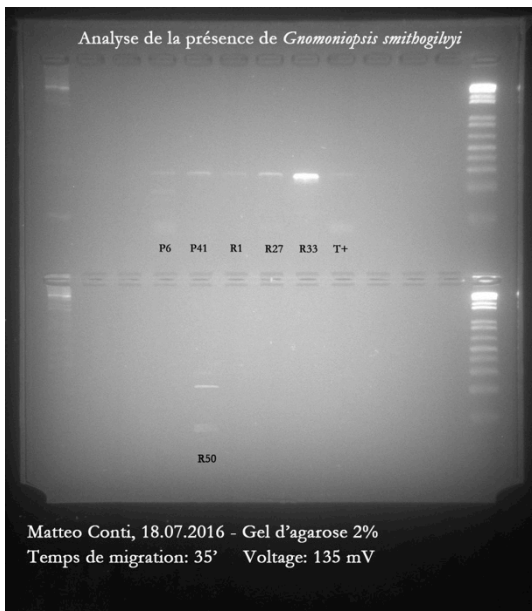
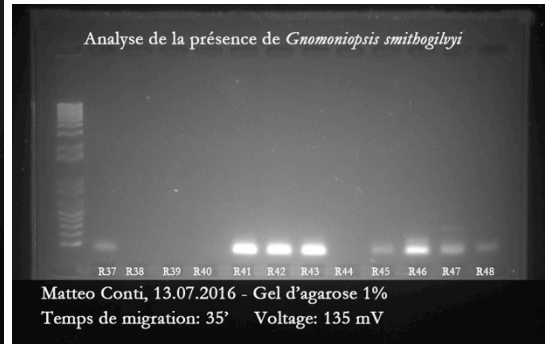
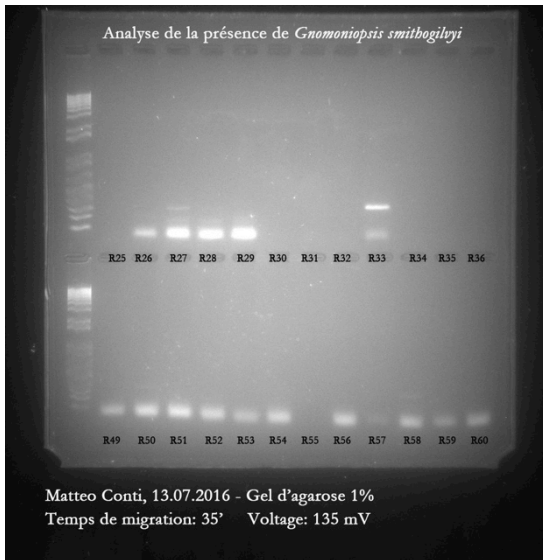
MG6	29.08.16	74.91	1.92	1.49
PG7	29.08.16	360.93	2.06	2.09
MG7	29.08.16	99.02	1.95	1.7
PG8	29.08.16	391.04	2.09	2.06
MG8	29.08.16	109.09	1.97	1.57
PG9	29.08.16	129.44	2	1.96
MG9	29.08.16	149.55	2.02	1.9
PG10	29.08.16	129.44	2.05	1.95
MG10	29.08.16	150.97	2	1.91
PT1	30.08.16	333.76	2.05	2.17
MT1	30.08.16	127.59	2.02	1.76
PT2	30.08.16	172.08	2.07	2
MT2	30.08.16	120.05	2.07	1.79
PT3	30.08.16	178.52	2.08	2.11
MT3	30.08.16	107.25	2	1.68
PT4	30.08.16	199.5	2.1	2.16
MT4	30.08.16	149.31	2	1.68
PT5	30.08.16	181	2.08	2.08
MT5	30.08.16	136.58	1.92	1.38
PT6	30.08.16	155.2	2.11	2.17
MT6	30.08.16	72.95	2.07	1.79
PT7	30.08.16	129.33	2.07	2.18
MT7	30.08.16	141.34	2	1.78
PT8	30.08.16	182.59	2.01	2.15
MT8	30.08.16	174.2	1.9	1.43
PT9	30.08.16	224.33	2.04	2.17
MT9	30.08.16	161.58	2.01	1.95
PT10	30.08.16	386.17	2.06	2.13
MT10	30.08.16	125.11	1.96	1.77
PM1	29.08.16	410.65	2.04	1.94
MM1	29.08.16	108.36	2.03	1.63
PM2	29.08.16	199.14	2.09	2.07
MM2	29.08.16	115.03	2.04	1.85
PM3	29.08.16	144.39	2.08	1.99
MM3	29.08.16	102.94	2.07	1.76
PM4	29.08.16	574.15	2.08	2.13
MM4	29.08.16	65.48	2.01	1.63
PM5	29.08.16	514.9	2.05	2.04
MM5	29.08.16	142.56	2.06	1.92
PM6	29.08.16	102.65	2.05	1.83
MM6	29.08.16	92.56	2.02	1.88
PM7	29.08.16	82.65	2.11	1.92
MM7	29.08.16	132.11	2	1.74
PM8	29.08.16	142	2.04	1.97
MM8	29.08.16	134.89	2.01	1.62
PM9	29.08.16	121.72	2	2

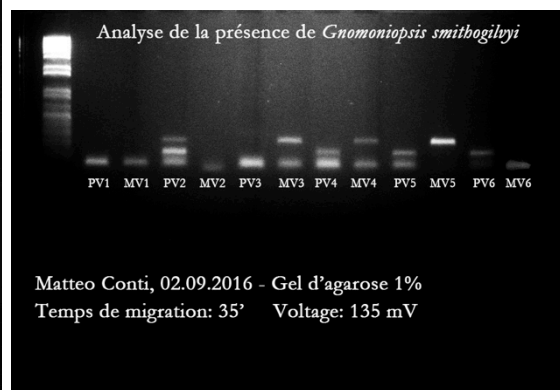
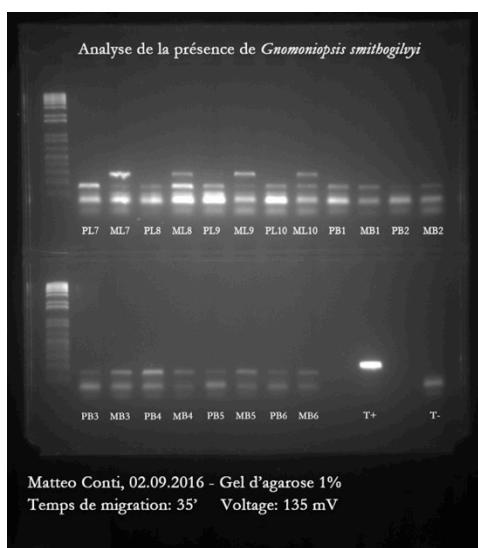
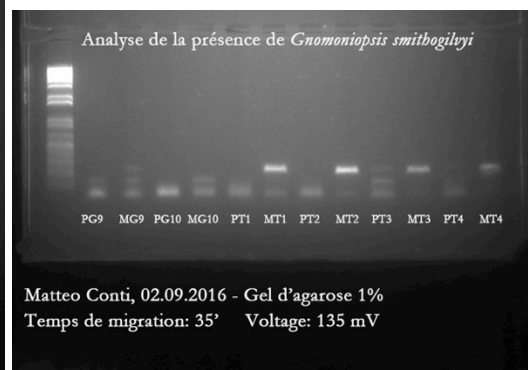
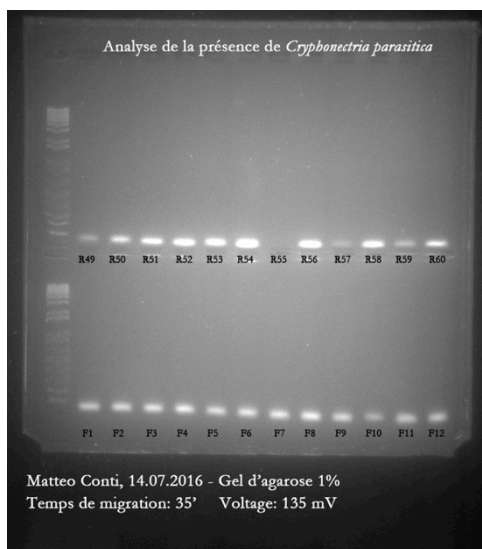
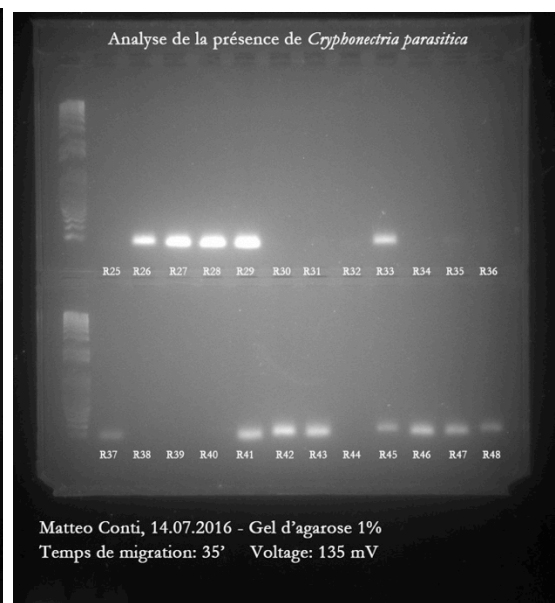
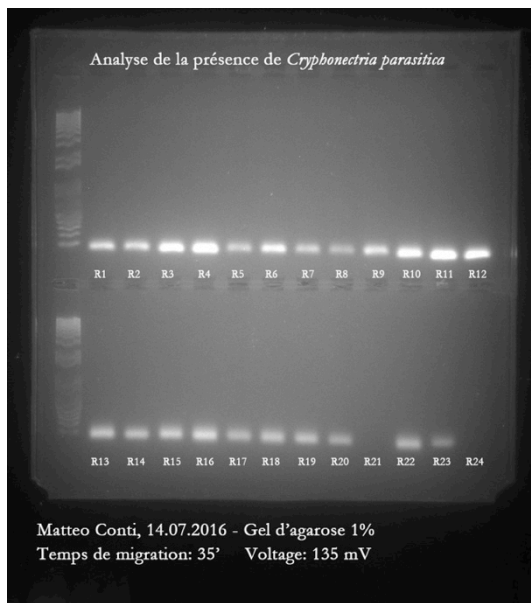
MM9	29.08.16	97.83	2.06	1.8
PM10	29.08.16	211.69	2.07	2.03
MM10	29.08.16	149.37	2.03	2.03
PL1	30.08.16	172.32	2.06	2.21
ML1	29.08.16	144.42	1.96	1.87
PL2	29.08.16	208.07	2.06	2.12
ML2	29.08.16	149.44	1.91	1.73
PL3	29.08.16	319.08	2.04	1.99
ML3	29.08.16	141.95	1.94	1.78
PL4	29.08.16	274.19	2.06	2.06
ML4	29.08.16	163.92	1.97	1.91
PL5	29.08.16	112.6	2.08	1.93
ML5	29.08.16	126.15	1.98	1.79
PL6	29.08.16	283.45	2.08	2.13
ML6	29.08.16	120.3	2.01	1.95
PL7	29.08.16	150.84	2.04	2.15
ML7	29.08.16	140.77	1.94	1.63
PL8	29.08.16	529.33	2.08	2.08
ML8	29.08.16	203.43	1.99	1.87
PL9	29.08.16	141.86	2.05	2.06
ML9	29.08.16	60.51	1.91	1.27
PL10	29.08.16	565.33	2.05	2
ML10	29.08.16	118.23	1.97	1.74
PB1	30.08.16	302.72	2.05	2.08
MB1	30.08.16	119.61	1.95	1.77
PB2	30.08.16	217.85	2.06	2.23
MB2	30.08.16	148.66	2.01	1.9
PB3	30.08.16	50.31	1.88	2
MB3	30.08.16	110.95	1.98	1.78
PB4	30.08.16	221.08	2.02	2.23
MB4	30.08.16	134.48	2.02	1.88
PB5	30.08.16	139.53	2.01	1.97
MB5	30.08.16	134.47	1.97	1.79
PB6	30.08.16	128.04	1.98	2.05
MB6	30.08.16	142.98	1.94	1.84

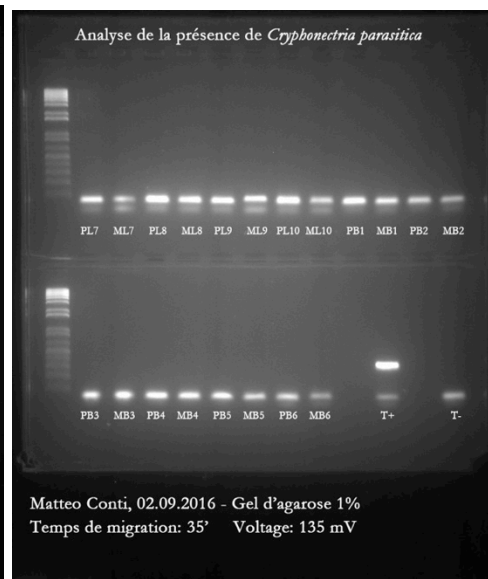
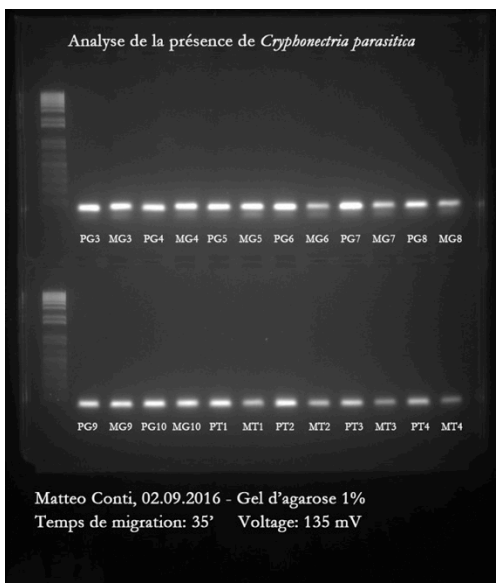
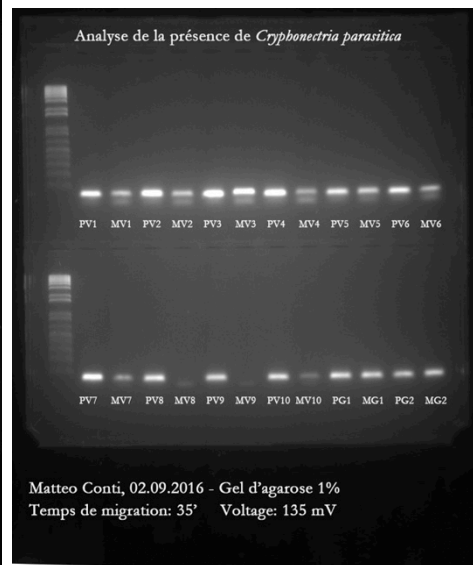
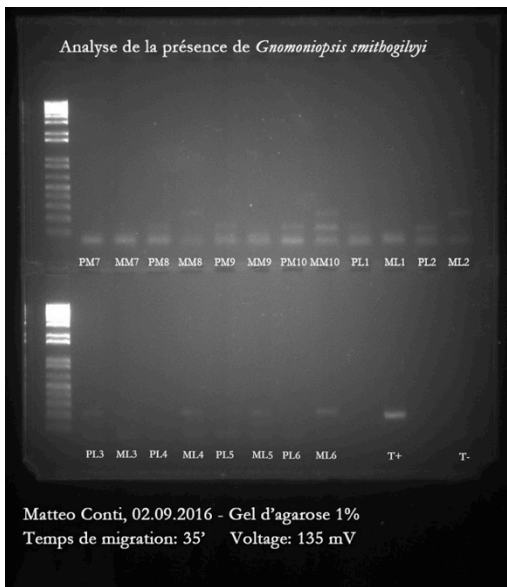
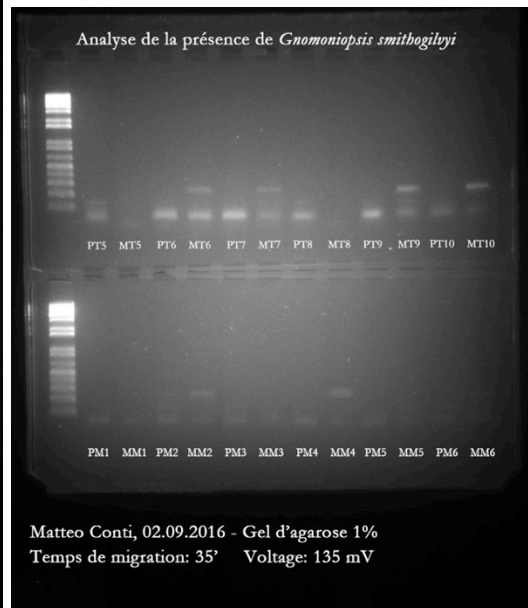
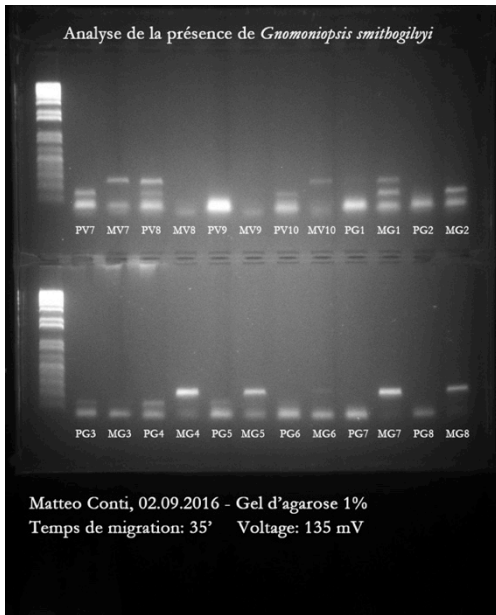
## Annexe 5 : électrophorégrammes de la totalité des échantillons

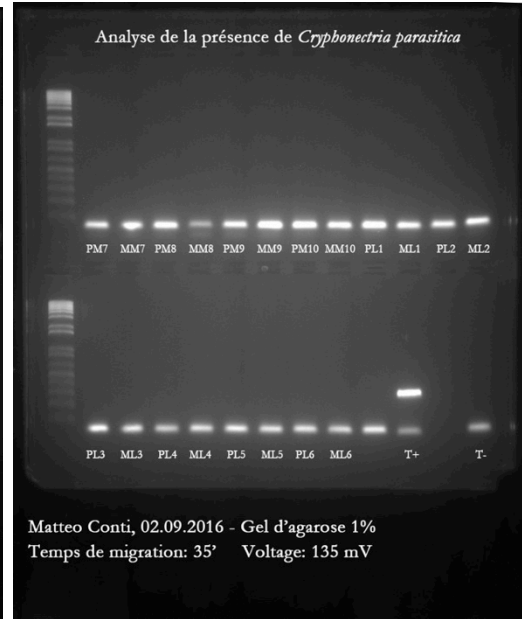
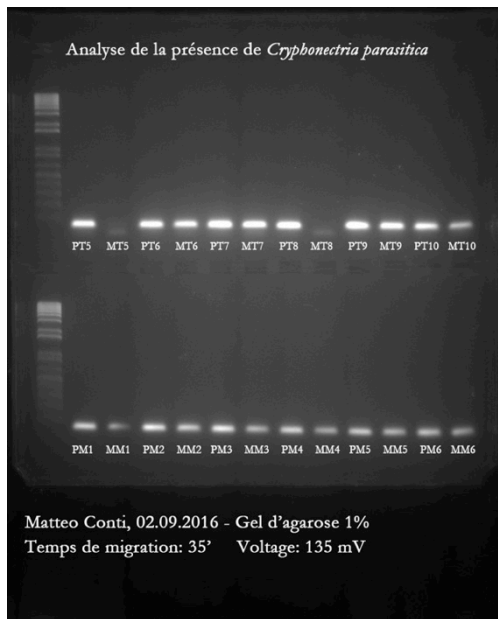




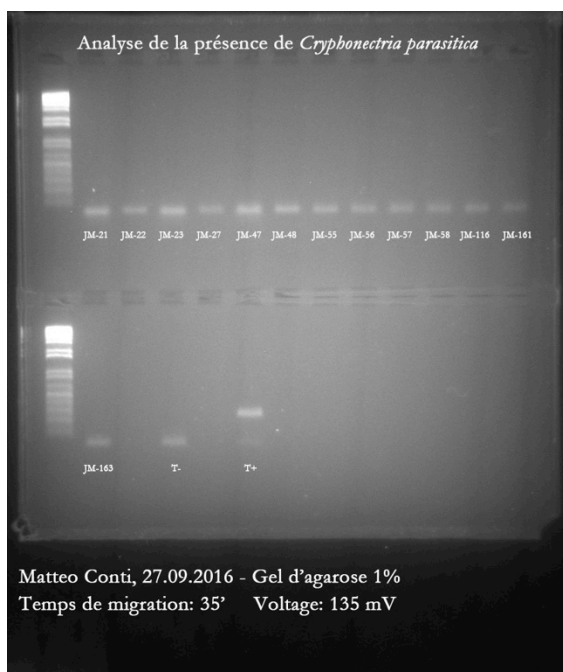
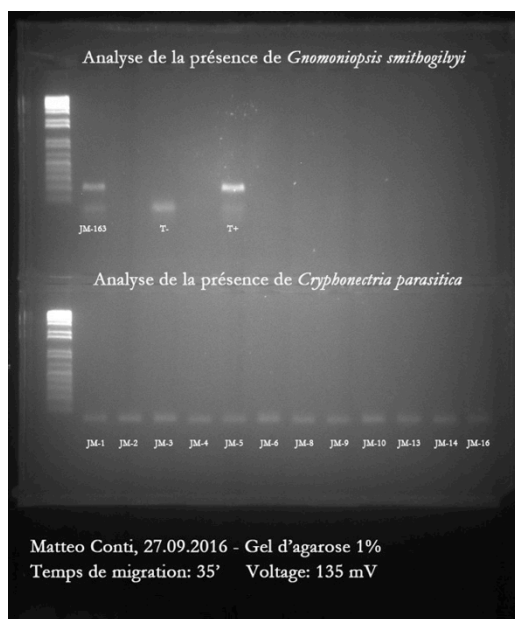
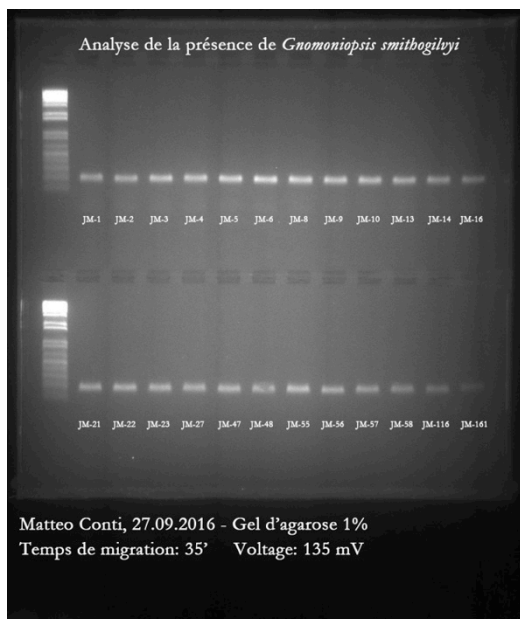








## Annexe 6 : électrophorégrammes des échantillons (galles) fournies par le centre WSL



# Annexe 7 : protocole suivi pour l'extraction de l'ADN

## Extraction d'ADN végétal tampon CTAB

(Protocole Doyle, optimisé par J.C. <http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=7020>)

### **Avant l'extraction:**

**Matériel végétal :** broyer les échantillons à l'azote dans un mortier propre et autoclavé, les réduire en très fine poudre (3 broyages successifs), en prélever **50mg** et les mettre dans un tube Eppendorf 2ml annoté.

Allumer le thermomixer sous hotte chimique, le régler à **65°C**. Placer le tampon d'extraction sur un agitateur magnétique chauffant, réglé à **65°C** et **300rpm**, laisser chauffer le tampon **15min** minimum.

### **Extraction :**

1. Ajouter **1ml** de tampon d'extraction préchauffé à **65°C** à chaque échantillon + **100µl** de solution de bisulfite de sodium à 10%. Bien vortexer vos échantillons.
2. Incuber les échantillons dans le thermomixer **30min** à **65°C**, **1'400rpm**.
3. Sortir les échantillons du thermomixer, ajouter **700µl** de Chloroform / Isoamyl alcohol 24:1. Bien vortexer.
4. Centrifuger les tubes pendant **15min** à **20°C**, **14'000rpm**.
5. Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube annoté (environ 800 µl) et y ajouter un volume de **1/1** d'Isopropanol, mélanger par inversion.
6. Centrifuger les tubes pendant **3min** à **20°C**, **14'000rpm**.
7. Eliminer le surnageant, puis ajouter **1ml** d'éthanol 70%, vortexer.
8. Centrifuger les tubes pendant **3min** à **20°C**, **14'000rpm**.
9. Eliminer le surnageant et laisser le culot d'ADN sécher **5min** en plaçant les tubes sur un portoir, sous hotte, bouchon ouvert.
10. Resuspendre le culot d'ADN dans **100µl** de H<sub>2</sub>O ultra pure stérile.
11. Solubiliser l'échantillon en le plaçant **1min** à **65°C** et **400rpm** dans le thermomixer.
12. La quantité et la qualité de l'ADN sont estimées par dosage au spectrophotomètre Nanodrop en utilisant 2µl d'ADN solubilisé.

# Annexe 8 : protocole suivi pour la purification de l'ADN

## Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A9280, A9281, A9282, AND A9285.

Quick  
PROTOCOL

### DNA Purification by Centrifugation

#### Gel Slice and PCR Product Preparation

##### A. Dissolving the Gel Slice

1. Following electrophoresis, excise DNA band from gel and place gel slice in a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Add 10µl Membrane Binding Solution per 10mg of gel slice. Vortex and incubate at 50–65°C until gel slice is completely dissolved.

##### B. Processing PCR Amplifications

1. Add an equal volume of Membrane Binding Solution to the PCR amplification.

#### Binding of DNA

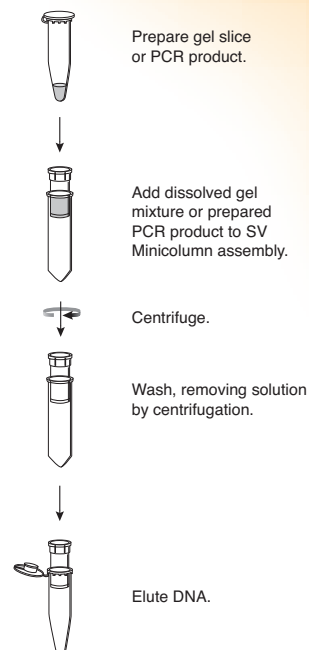
1. Insert SV Minicolumn into Collection Tube.
2. Transfer dissolved gel mixture or prepared PCR product to the Minicolumn assembly. Incubate at room temperature for 1 minute.
3. Centrifuge at  $16,000 \times g$  for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.

#### Washing

4. Add 700µl Membrane Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at  $16,000 \times g$  for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.
5. Repeat Step 4 with 500µl Membrane Wash Solution. Centrifuge at  $16,000 \times g$  for 5 minutes.
6. Empty the Collection Tube and recentrifuge the column assembly for 1 minute with the microcentrifuge lid open (or off) to allow evaporation of any residual ethanol.

#### Elution

7. Carefully transfer Minicolumn to a clean 1.5ml microcentrifuge tube.
8. Add 50µl of Nuclease-Free Water to the Minicolumn. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at  $16,000 \times g$  for 1 minute.
9. Discard Minicolumn and store DNA at 4°C or –20°C.



Additional protocol information is available in Technical Bulletin #TB308, available online at: [www.promega.com](http://www.promega.com)

#### ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

[www.promega.com](http://www.promega.com) • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

© 2002, 2004, 2005 and 2009 Promega Corporation. All Rights Reserved.



Promega


Printed in USA. Revised 11/09  
Part #9FB072

3760MA07\_2A

Source : <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protcards/wizard-sv-gel-and-pcr-clean-up-system-quick-protocol.pdf>

## Annexe 9 : composition des milieux de réaction et programmes d'amplification PCR, avec la Taq Biotools et la Taq Bioline

		Cycle PCR avec Taq Biotools		M.C.		
		primers : GS ou CP		XX.XX.2016		
Master mix V=50[ul] / puits	µl / rxn : x1	µl / rxn : x	Programme :			
			T [°C]:	t :	Cycle:	
10x Buffer	5		1	95	5'	1x
MgCl <sub>2</sub>	2		2	95	1'	
Primer Forward / Reverse	5		3	58	40''	40x
dNTP	1.25		4	72	1'	
H <sub>2</sub> O	34.75		5	72	7'	1x
Taq BIOTOOLS	1		6	4	Pause	1x
DNA 50ng/µl	1		ADN des échantillons			
Vtot	50					

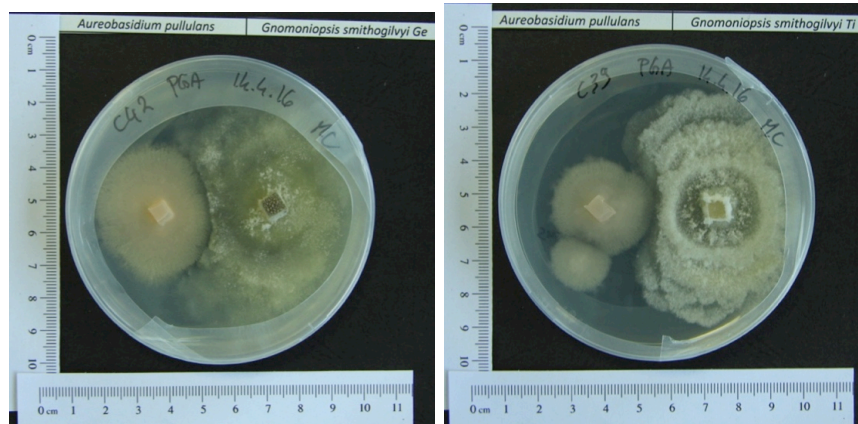
		Cycle PCR avec Taq Bioline		M.C.		
		primers: GS ou CP		XX.XX.16		
Master mix V=50[ul] / puits	µl / rxn : x1	µl / rxn : 13	Programme : MYTAQ			
			T [°C]:	t :	Cycle:	
My Taq Reaction Buffer	10		1	95	1'	1x
			2	95	15''	
Primer For. / Rev. (0.4µM final)	4		3	58	15''	35x
			4	72	10''	
H <sub>2</sub> O	34.75		5	72	1'	1x
My Taq HS DNA Polymerase	0.25		6	4	Pause	1x
DNA 50ng/µl	1	/				
Vtot	50					



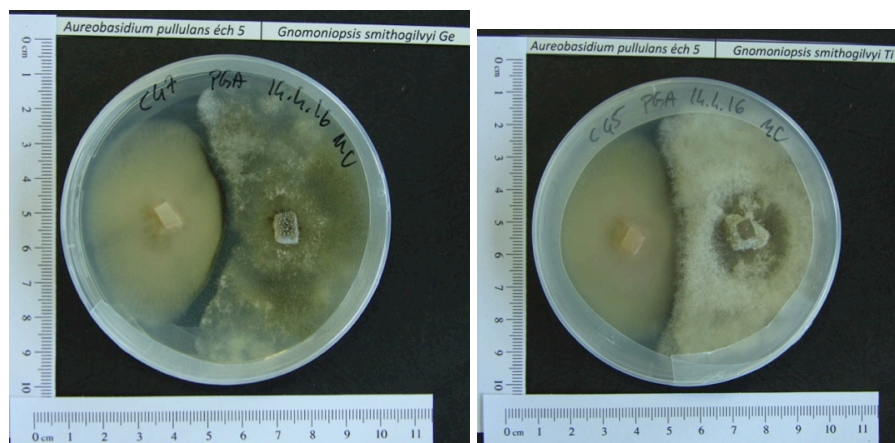
## Annexe 10 : Confrontations in vitro entre *G. smithogilvyi* et le différents agents de lutte biologique

Photos : M. Conti

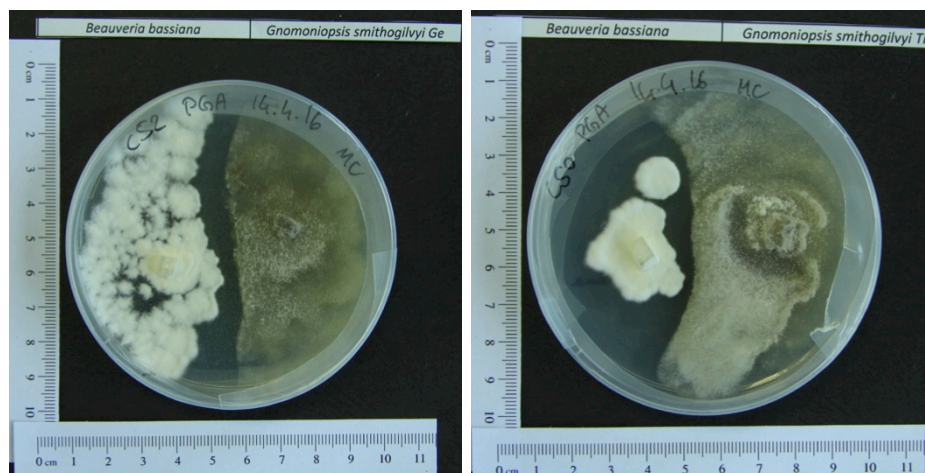
### Confrontation *A. pullulans* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



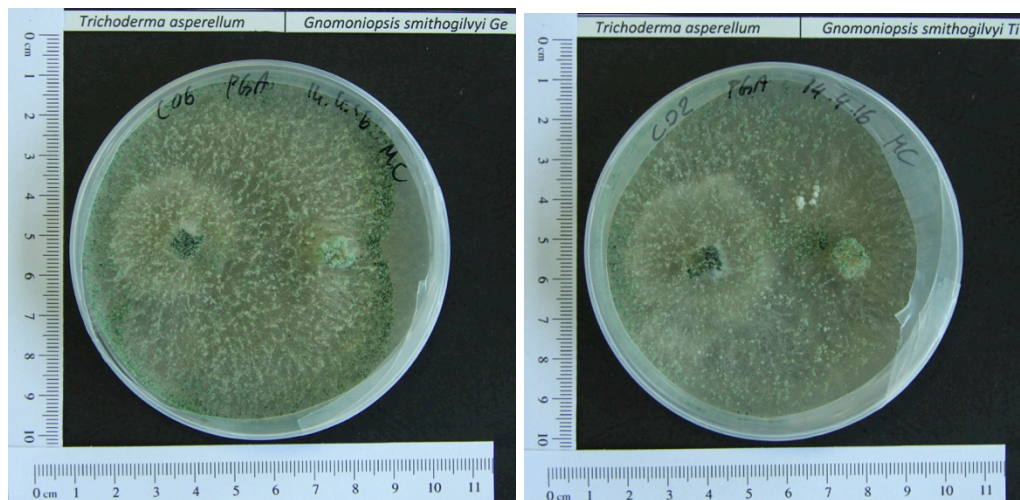
### Confrontation *A. pullulans* éch.5 – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



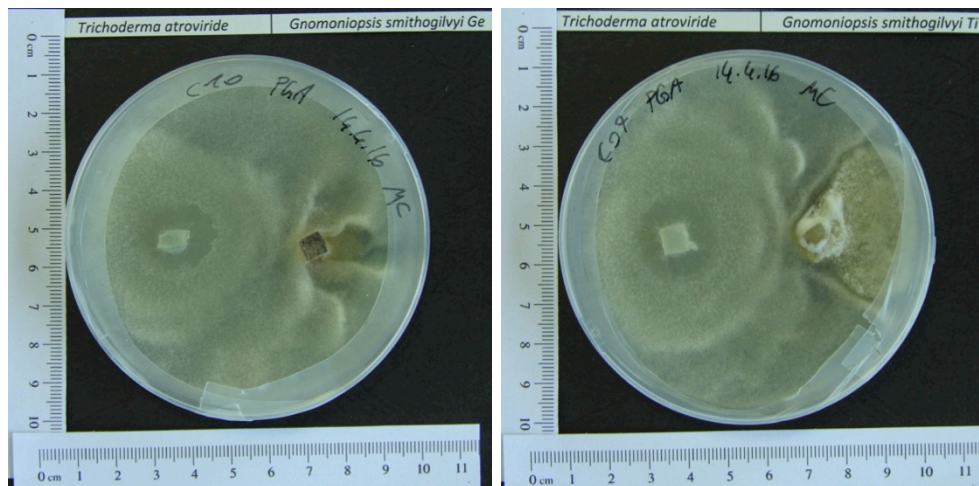
### Confrontation *B. bassiana* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



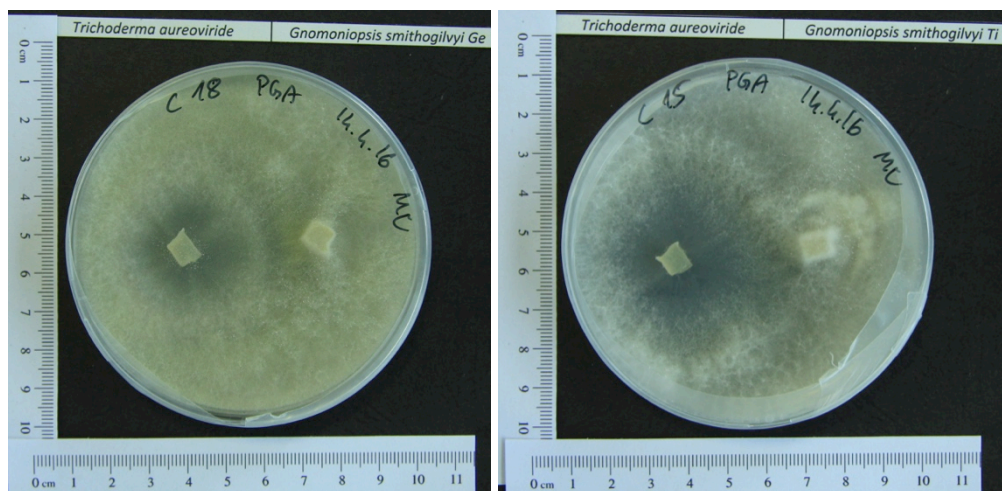
Confrontation *T. asperellum* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



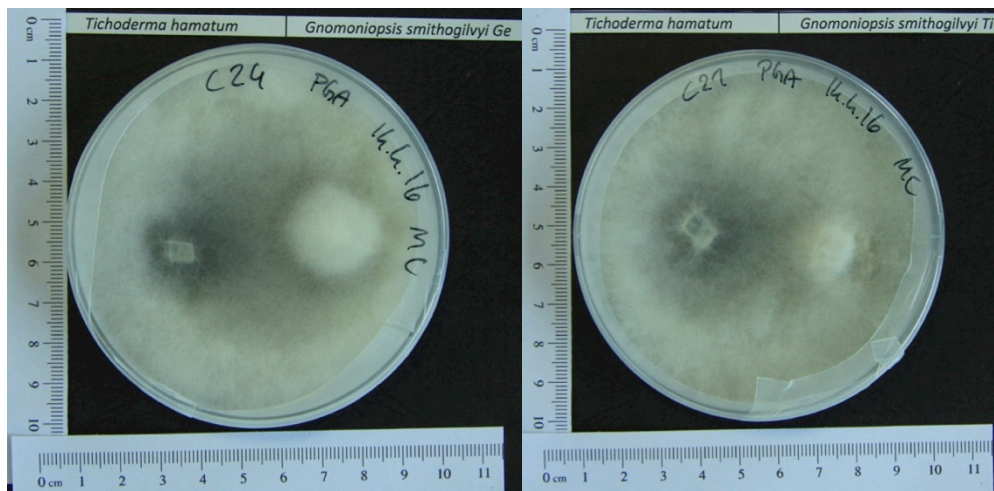
Confrontation *T. atroviride* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



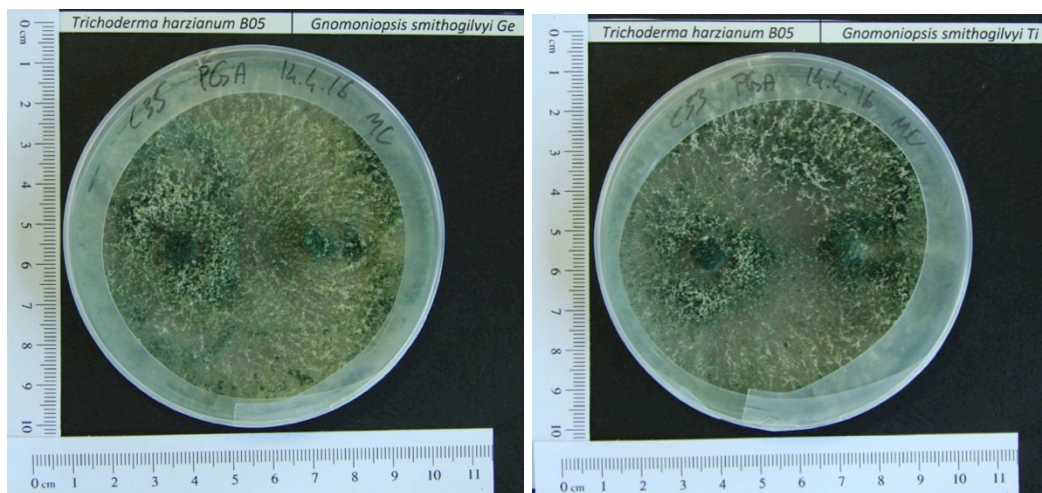
Confrontation *T. aureoviride* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



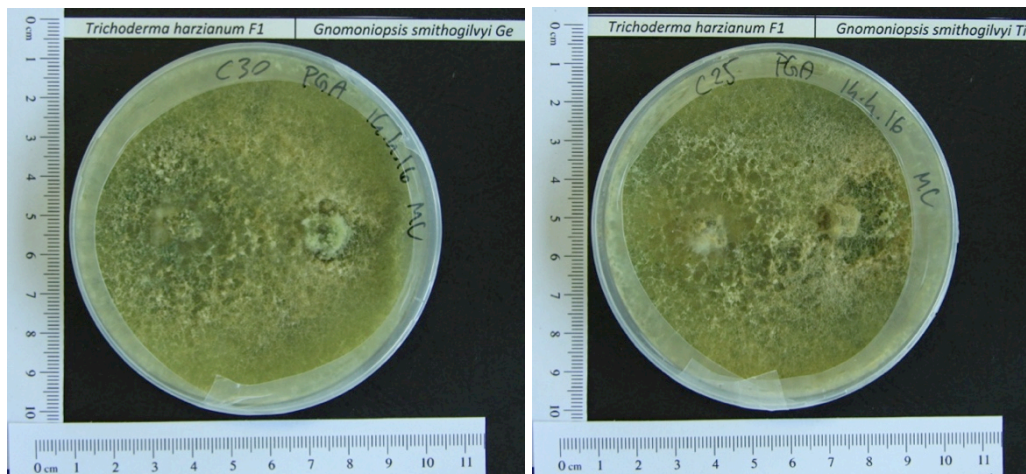
Confrontation *T. hamatum* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



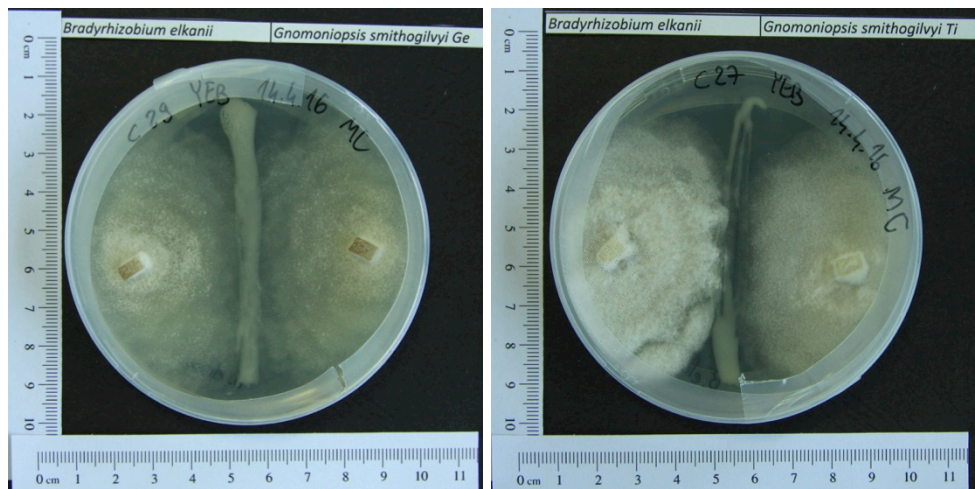
Confrontation *T. harzianum* B05 – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



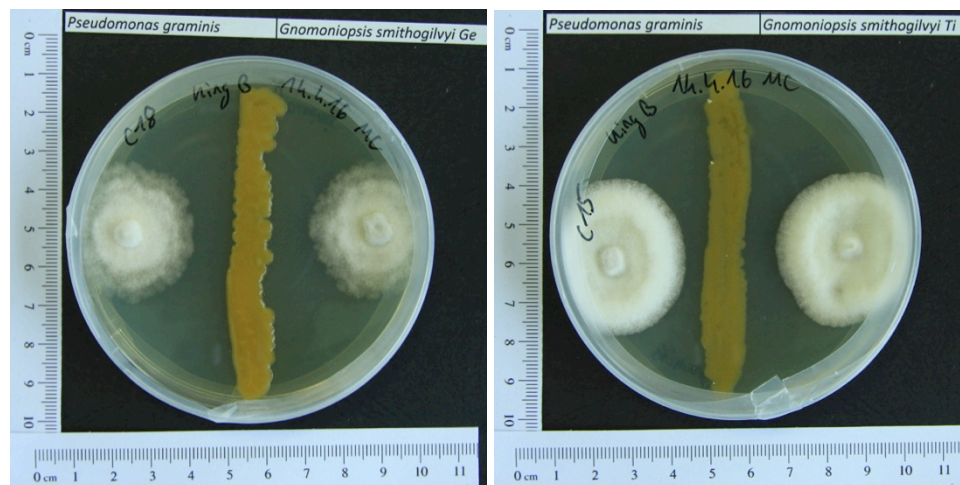
Confrontation *T. harzianum* F1 – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



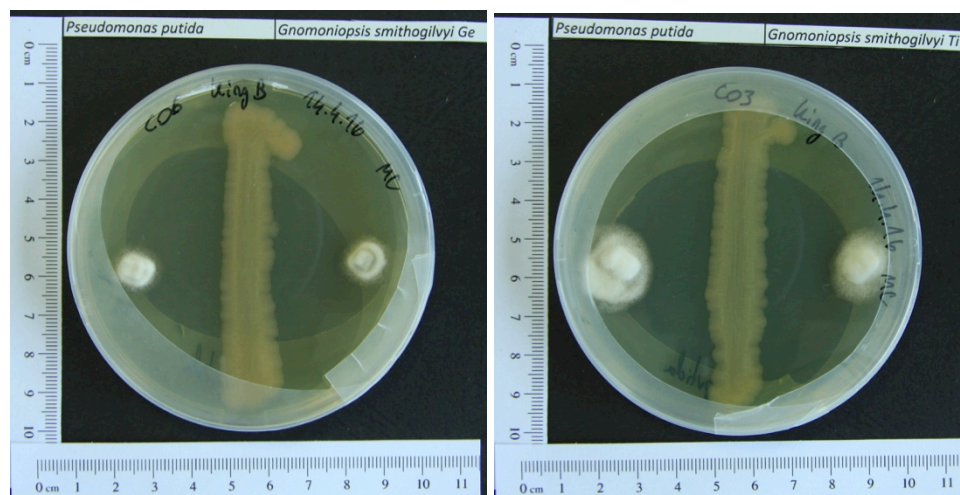
Confrontation *B. elkanii* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



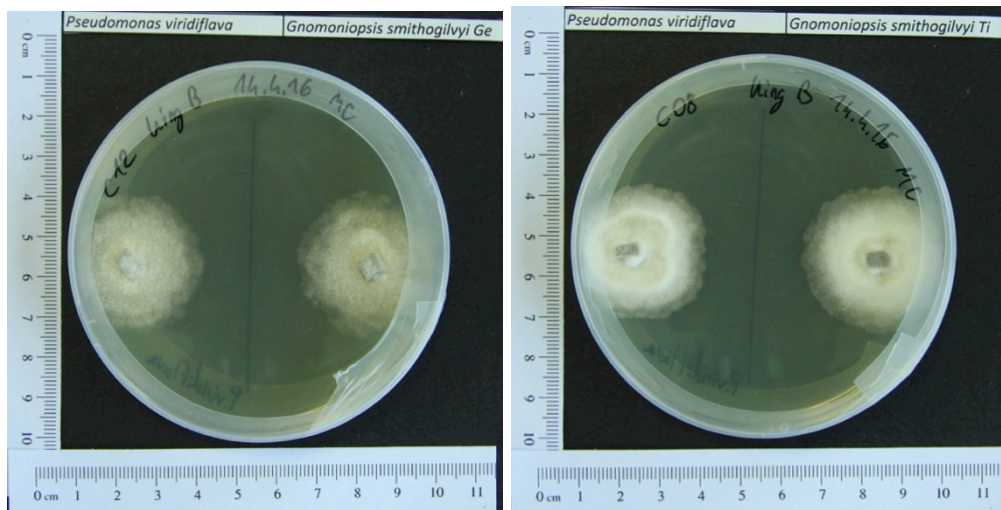
Confrontation *P. graminis* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



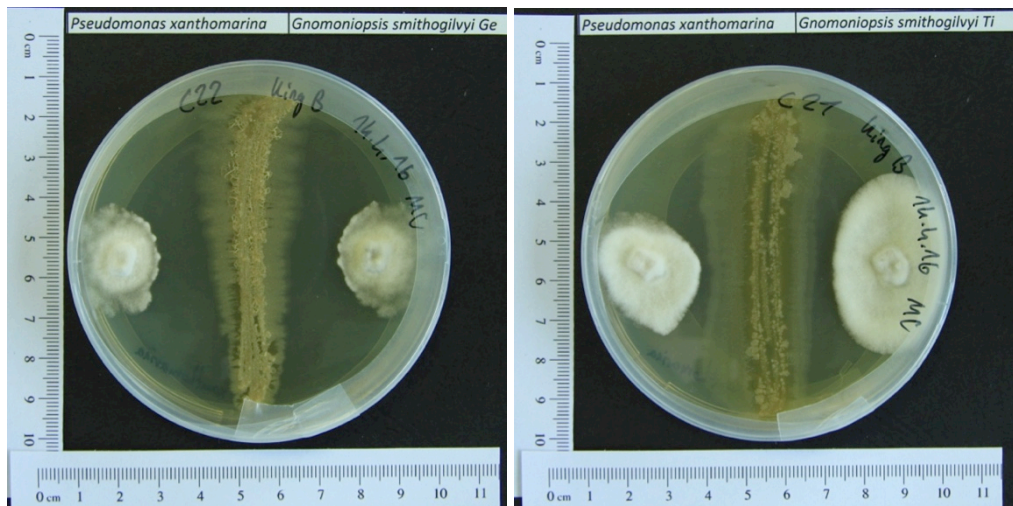
Confrontation *P. putida* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



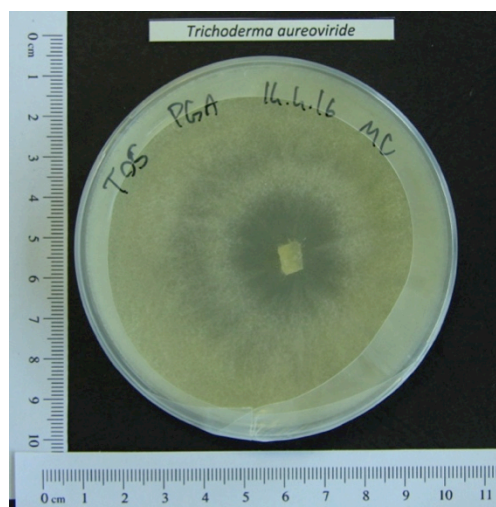
Confrontation *P. viridiflava* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



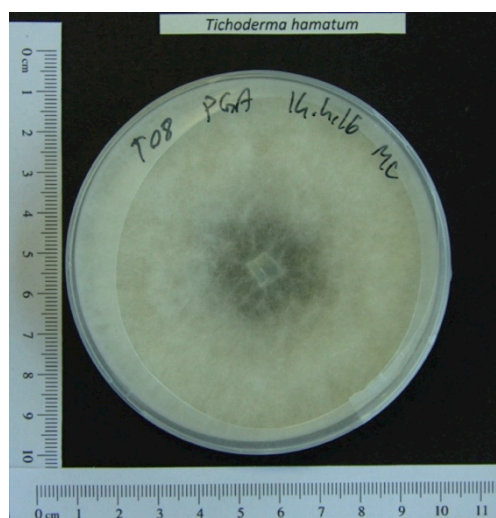
Confrontation *P. xanthomarina* – *G. smithogilvyi* Ge / Ti



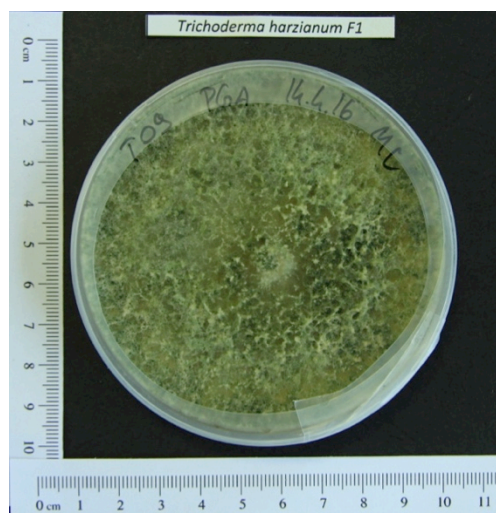
Témoin – *T. aureoviride*



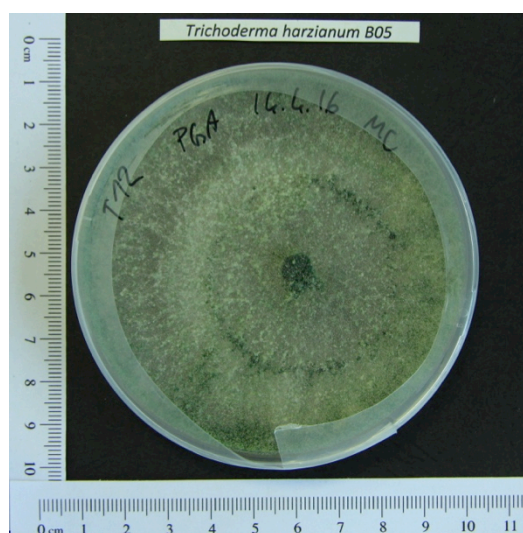
Témoin – *T. hamatum*



Témoin – *T. harzianum* F1



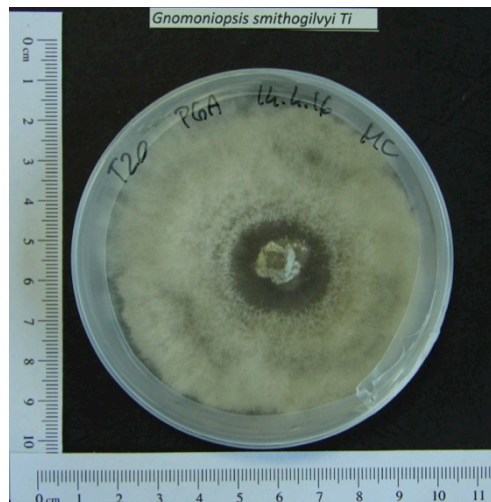
Témoin – *T. harzianum* B05



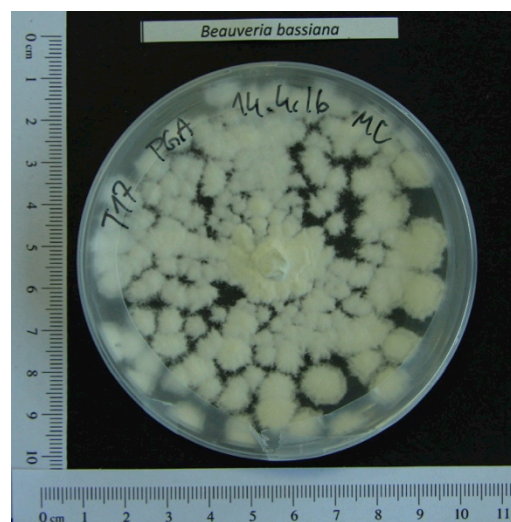
Témoin – *G. smithogilvyi* Ge, milieu PGA



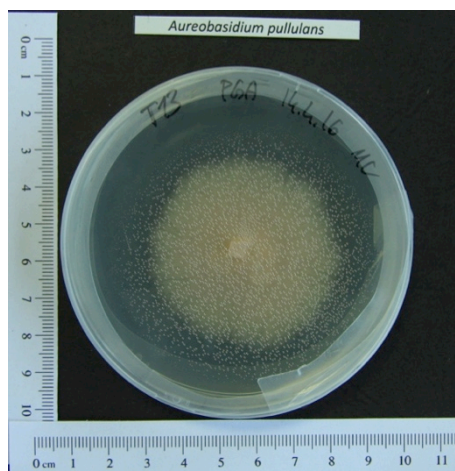
Témoin – *G. smithogilvyi* Ti, milieu PGA



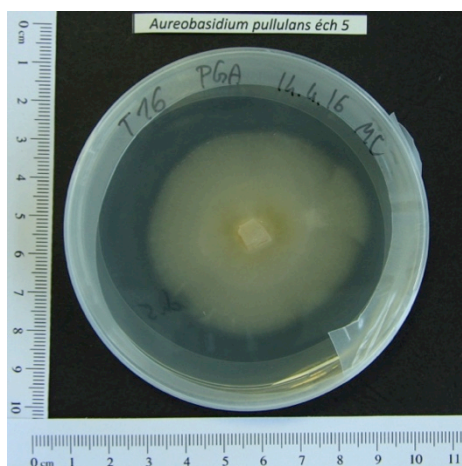
Témoin – *B. bassiana*



Témoin – *A. pullulans*



Témoin – *A. pullulans* éch. 5

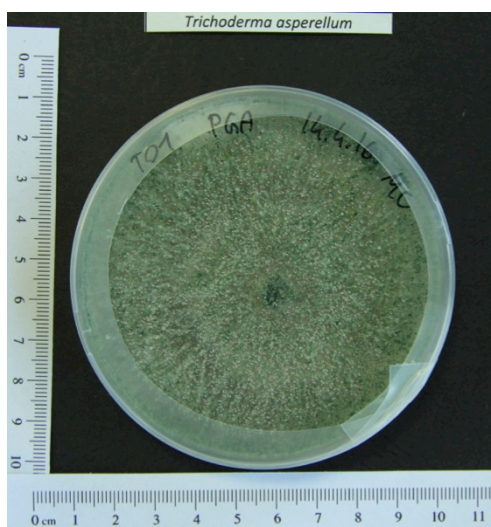


Témoin – *T. atroviride*





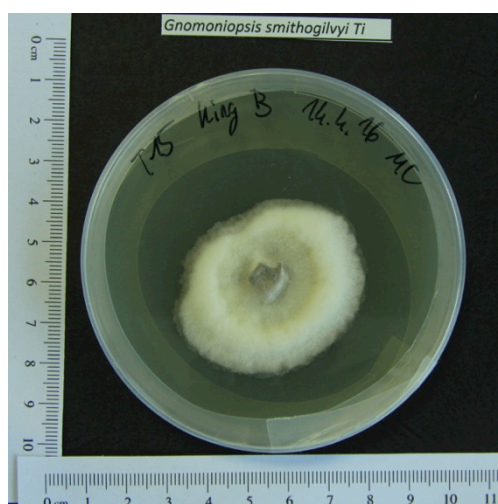
Témoin – *T. asperellum*



Témoin – *G. smithogilvyi* Ti, milieu YEB



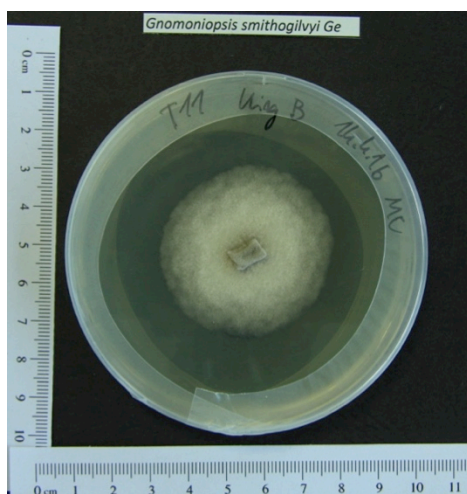
Témoin – *G. smithogilvyi* Ti, milieu King B



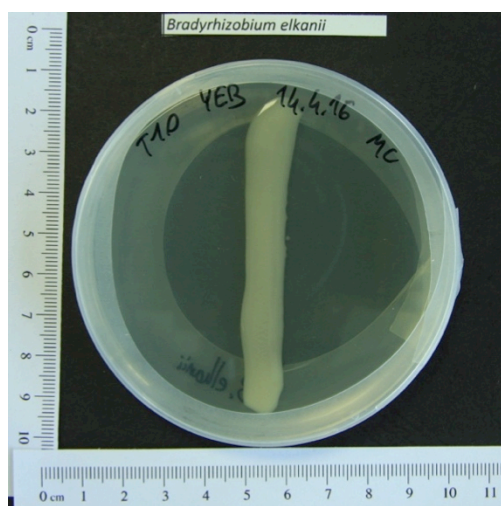
Témoin – *G. smithogilvyi* Ge, milieu YEB



Témoin – *G. smithogilvyi* Ge, milieu King B



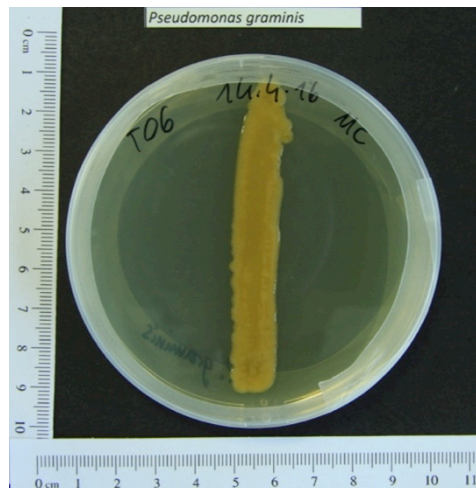
Témoin – *B. elkani*



Témoin – *P. xanthomarina*



Témoin – *P. graminis*



Témoin – *P. putida*



Témoin – *P. viridiflava*



## Annexe 11 : Confrontations in vivo sur scions de châtaignier après 6 semaines

Photos : M. Conti

*T. aureoviride* – *G. smithogilvyi* Ti



*T. harzianum* F1 – *G. smithogilvyi* Ti



*T. hamatum* – *G. smithogilvyi* Ti



*T. asperellum* – *G. smithogilvyi* Ti



*B. amyloliquefaciens* Ba4 – *G. smithogilvyi* Ti



*P. putida* – *G. smithogilvyi* Ti



*T. harzianum* B05 – *G. smithogilvyi* Ti



*B. amyloliquefaciens* Ba2 – *G. smithogilvyi* Ti





Témoin

