

INCIDENCE ŒNOLOGIQUE DU TRAITEMENT BIOLOGIQUE DE LA VIGNE PAR *TRICHODERMA VIRIDE* A L'EGARD DE LA POURRITURE GRISE

B.S. GAINA *, Suzanne LAFON-LAFOURCADE **
et Bernadette DUBOS ***

* Centre de Recherches Scientifiques Vitivinicole de Moldavie, 277019 Kichinev, U.R.S.S.

** Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

*** Station de Pathologie Végétale I.N.R.A., 33140 Pont de la Maye (France)

INTRODUCTION

Le nombre important des traitements chimiques effectués pour protéger la vigne pendant la période végétative n'est pas sans danger ; on observe :

a) une accumulation de produits chimiques dans le sol et dans les eaux,

b) une contamination des raisins et des préparations qui en découlent (jus du raisins, vins, concentrés, etc...) .

En Moldavie, par exemple, au cours de la campagne 1979, le cépage *Fetiaska alba* a subi 11 traitements chimiques parmi lesquels 9, effectués avec la « bouillie bordelaise » ; le jus de raisins contenait 9 mg de cuivre libre par litre et 130-170 mg de calcium par litre (GAINA, 1980). La présence de calcium à cette concentration complique la technologie de la préparation des jus et des concentrés de raisins, et compromet la stabilisation physico-chimique des moûts et des vins (précipités de pectinate de calcium, d'acides tartrique et malique). De plus, la microflore endogène du sol et du vignoble est diminuée (CEROL, 1981).

Dans les régions où se pratique une viticulture intensive, la solution à la pollution des sols passe par la lutte biologique. Le principe, en ce qui concerne la pourriture grise, consiste en l'utilisation du champignon antagoniste *Trichoderma viride* Pers. (DUBOS et BULIT, 1981).

Dès 1951, WOOD mit en évidence l'efficacité du *Trichoderma* contre le *Botrytis*, parasite de la laitue. Des essais fondamentaux sur l'utilisation du germe *Trichoderma* comme source de préparations biologiques (enzymes cellulolytiques, antagonismes microbiens) sont dus à FENIC-

SOVA (1969-1977). En U.R.S.S. le *Trichoderma lignorum* Harz. a été employé avec succès contre la pourriture grise du fraisier (LIKHACHEV et VASIN, 1974), puis un peu plus tard, en Norvège (TRONSMO et DENNIS, 1979). FEDORINCHIK et al., (1977) a mis au point une préparation efficace contre certaines maladies des cultures agricoles. DUBOS et BULIT (1978-1981) préconisent de répandre *Trichoderma viride* sur les organes aériens de la vigne pour assurer la protection de celle-ci contre la pourriture grise.

Trichoderma viride est un champignon saprophyte de couleur verte abondamment répandu dans le sol, le bois mort. Il agit sur les moisissures en enroulant des hyphes autour du mycelium des parasites et en le pénétrant par lyse enzymatique. La souche sélectionnée par DUBOS et BULIT se caractérise par sa tolérance au soufre et au cuivre ; elle présente également une bonne résistance aux fongicides, notamment aux dithiocarbamates et phtalimides, d'un usage courant pour protéger le vignoble à l'égard de l'oïdium et du mildiou (DUBOS et BULIT, 1981). Le traitement optimal consiste à répandre, à raison de 450 litres à l'hectare, une suspension titrant 10^9 conidies par ml. Le développement de *Botrytis cinerea* est alors retardé d'un mois environ et l'efficacité contre la pourriture grise est de l'ordre de 70 p. 100 (DUBOS et BULIT, 1981).

Dans des conditions climatiques favorables, des spores de *T. viride*, présentes sur le raisin peuvent être entraînées dans le moût, puis dans le vin. Comme la plupart des champignons, celui-ci pourrait posséder des hydrolases, cellulases (FENICSOVA et al., 1970), β -1,3, glucanase, chitinase (TOYAMA et OGAWA, 1968) ainsi que d'autres enzymes, en particulier des oxydases.

Ce travail se propose, dans un premier temps, de vérifier, que *T. viride* agit non seulement sur *Botrytis cinerea* mais aussi sur d'autres moisissures susceptibles de se développer sur le raisin *Aspergillus carneus*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium roqueforti* (*). Nous avons ensuite étudié l'incidence du développement de ces champignons sur la fermentescibilité des moûts et sur la qualité des jus et des vins.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La souche de *T. viride* provient de la collection de la Station de Pathologie végétale, I.N.R.A., Centre de Bordeaux ; les souches *B. cinerea* (1), *A. carneus* (2), *P. frequentans* (3), *P. roqueforti* (4) sont issues de la collection de l'Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II. La sporulation de *T. viride* est obtenue sur un milieu contenant par litre : flocons d'avoine broyés : 45 g ; gélose : 13 g. Après une heure de cuisson, on stérilise 20 minutes à 120 °C. On recueille les spores après 5 jours d'incubation à 27 °C. Chacun des autres champignons est inoculé dans du

* Nous remercions M.B. PUCHEU-PLANTÉ (Section Ampélogie, Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II) pour les souches de champignons.

moût stérilisé (Salins du Midi, 170 g/l de sucre, pH : 3.20) ; celui-ci est réparti dans des erlenmeyers de telle sorte que le milieu présente une surface à l'air de 350 cm² et une hauteur de 1 cm. Un dernier erlenmeyer est inoculé à la fois avec les souches (1), (2), (3). Pour chaque condition, on prévoit trois erlenmeyers et quatre répétitions. Après trois jours d'incubation, lorsque le mycelium recouvre environ 40 à 50 p. 100 de la surface du moût de raisin, on fait deux parts du volume de liquide contenu dans chaque erlenmeyer. L'un est conservé comme témoin, l'autre est ensemencé avec des spores de *T. viride*.

Dans un autre essai, lorsque la surface du moût est entièrement envahie par les champignons (7 jours), on sépare les mycelium du milieu de culture.

Le mycelium est broyé dans un tampon phosphate-citrate 0,1 M, pH 3,0, traité par ultra-sons 10 mn, amplitude à 7,0 μ à 10 °C. On centrifuge 10 mn à 900 v/mn à 10-12 °C.

La concentration en fragments de mycelium est d'environ 10³ à 10⁵/ml. On inocule le moût de raisin, réparti dans des flacons de 150 ml contenant 100 ml de jus, avec simultanément, 1 ml de suspension de *Saccharomyces cerevisiae* Killer, *Schizosaccharomyces* et *Leuconostoc oinos*, contenant 10⁷ cellules par ml environ (tableau I). D'autre part, le milieu de culture de ces champignons est également ensemencé de la même manière en levures et bactéries. Des flacons de moût sain fermentent parallèlement, servant de témoins (tableaux I et II). On porte à incubation à 23-25 °C. On détermine la cinétique des fermentations par pesée des flacons ; la diminution de poids rend compte du gaz carbonique dégagé.

TABLEAU I

Antagonisme *T. Viride*/Moisissures, cultivées sur moût de raisin

Moisissures	Botrytis cinerea (1)	Aspergillus carneus (2)	Penicillium frequentans (3)	Penicillium roqueforti (4)	(1) (2) (3)
Développement sur moût de raisin	+	+	+	+	+
48 h après l'addition des spores <i>T. viride</i>	-	-	-	-	-

+ = mycelium recouvrant 40 à 50 p. 100 de la surface du moût.

- = envahissement de la surface du moût par *T. viride* et destruction du mycelium des autres champignons.

TABLEAU II

Incidence de la présence de débris mycéliens sur la fermentescibilité des moûts et les caractéristiques des vins

Microflore	MOÛT		CARACTERISTIQUES DES VINS					
	Energie de fermentation (1)	Retard de départ de la fermentation (heures)	Densité optique 420 nm	Oxygène dissous (mg/l)	Biomasse en g de poids frais par litre	Sucres résiduels (g/l)	pH	Acidité totale (g H ₂ SO ₄ par litre)
Jus de raisin	0	0	310	0	0	170,0	3,20	4,9
<i>Sacch. cerevisiae</i> K-1	5,30	0	300	3,4	47,7	1,0	3,33	4,7
<i>Shizosaccharomyces</i>	3,77	0	298	3,2	41,0	1,7	3,77	2,1
<i>Leuconostoc oinos</i>	2,39	0	288	3,0	21,1	-	3,55	3,9
<i>Sacch. + T. viride</i>	5,30	0	308	3,0	43,4	1,2	3,40	4,5
<i>Schizo. + T. viride</i>	3,62	0	300	2,8	39,9	1,7	4,10	1,9
<i>L. oinos + T. viride</i>	2,19	24	293	2,2	19,7	-	3,60	3,7
<i>Sacch. + B. cinerea</i>	5,01	48	730	4,7	40,8	3,7	3,46	4,0
<i>Sacch. + A. carneus</i>	4,81	48	695	4,5	37,7	4,1	3,48	4,1
<i>Sacch. + P.frequentans</i>	5,07	48	602	4,1	38,0	4,0	3,49	4,3
<i>Schizo. + B. cinerea</i>	3,33	60	580	4,0	38,3	4,9	4,00	1,9
<i>Schizo. + A. carneus</i>	3,07	60	560	4,0	36,4	5,4	3,71	2,1
<i>Schizo. + P.frequentans</i>	3,21	60	575	3,7	34,9	5,2	3,52	2,3
<i>L. oinos + B. Cinerea</i>	2,11	72	380	3,9	17,1	-	3,66	3,3

(*) L'énergie de fermentation (g CO₂/jour) est la moyenne des sept premiers jours. Les suspensions de mycelium des divers champignons sont ajoutés à raison de 1 ml.

Après 21 jours de conservation à 12-15 °C on apprécie le taux d'oxydation des vins par mesure de la densité optique à 420 nm sous 1 cm de chemin optique ; on détermine la concentration en oxygène dissous, la biomasse en poids frais et le sucre résiduel à l'arrêt de la fermentation.

L'activité laccase est mesurée à pH 4,7, en tampon phosphate-citrate 0,1 M, en présence d'hydroquinone, par méthode polarographique (DUBERNET, 1974).

RESULTATS

L'addition de *T. viride* dans la culture des autres champignons entraîne, en deux jours, la destruction totale des mycelium ; il en est de même dans la condition correspondant au mélange des populations (1), (2), (3). La surface du moût se couvre d'une pellicule vert-bleu spécifique du développement de *T. viride*.

L'addition de débris de mycelium de *T. viride* au moût (tableau I) simultanément à son ensemencement en levures et bactéries lactiques, n'intervient pas de manière significative sur la vitesse fermentaire, l'oxydation du milieu et la quantité totale de sucre fermenté ; l'acidité fixe est légèrement diminuée, le pH légèrement augmenté : la concentration en oxygène dissous et les biomasses levuriennes formées sont un peu moins élevées que dans le moût témoin.

Par contre, l'addition de débris de mycelium de *B. cinerea*, *A. carneus* et *P. frequentans* au moût sain, agit défavorablement sur tous les paramètres considérés, notamment les teneurs en sucre résiduel sont plus importantes et la densité optique doublée. On observe sensiblement le même phénomène dans les milieux de culture de ces mêmes champignons, fermentés avec *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* et *L. oinos* (tableau II).

Au niveau de la consommation en oxygène des différences importantes apparaissent entre les vins (comparaison des tableaux I et II). Cette consommation est fortement accrue par rapport au vin témoin par l'addition au moût de débris de mycelium de tous les champignons autres que *T. viride* ; elle est au contraire diminuée dans les vins issus de la fermentation des milieux de culture. L'activité laccase dans les suspensions de débris de mycelium de *B. cinerea*, *A. carneus* et *P. frequentans* est 5-7 fois plus élevée que dans les milieux ; ceci confirme la localisation de cette enzyme essentiellement dans le mycelium. En outre, la présence de débris mycéliens de *T. viride* n'intervient pas sur la fermentation lactique et malolactique (tableau I).

DISCUSSION

Le *T. viride* peut être utilisé avec succès pour lutter contre certains parasites de la Vigne, tout particulièrement contre le *Botrytis cinerea*

TABLEAU III

Incidence du développement de certaines moisissures sur la fermentescibilité des moûts et les caractéristiques des vins.

Microflore	MOÛT			CARACTERISTIQUES DES VINS					
	Energie de fermentation (1)	Retard de départ de la fermentation (heures)	Densité optique 420 nm	Oxygène dissous (mg/l)	Biomasse en g de poids frais par litre	Sucres résiduels (g/l)	pH	Acidité totale (g H ₂ SO ₄ par litre)	
Jus de raisin	0	0	310	0	0	170,0	3,20	4,9	
<i>Sacch. cerevisiae K-1</i>	5,30	0	300	3,4	47,7	1,0	3,33	4,7	
<i>Schizosaccharomyces</i>	3,77	0	298	3,2	41,0	1,7	3,77	2,1	
<i>Sacch. T. viride</i>	5,30	12	311	2,7	44,1	1,5	3,36	4,6	
<i>Schizo.</i>	3,69	12	303	2,5	41,3	2,0	3,96	1,9	
<i>Sacch. B. cinerea</i>	4,98	24	660	2,2	41,4	4,7	3,42	4,1	
<i>Sacch.</i>	3,57	36	640	2,1	37,9	5,1	4,10	1,9	
<i>Sacch. A. carneus</i>	4,77	24	650	1,9	39,1	5,0	3,48	4,3	
<i>Schizo.</i>	3,44	36	642	1,7	37,1	5,3	3,96	2,1	
<i>Sacch.</i>	4,99	24	631	1,4	37,9	5,0	3,44	4,4	
<i>Schizo.</i>	3,63	36	611	1,2	36,1	5,2	3,92	2,3	

comme cela est bien connu, mais aussi contre *A. carneus*, *P. frequentans*, *P. roqueforti* qui constituent une partie de la microflore fongique des raisins atteints de pourriture grise. De plus, et contrairement aux autres champignons, *T. viride* n'intervient pas défavorablement sur la fermentescibilité du moût, ni par son mycelium, ni par des produits de son métabolisme. Il ne semble pas modifier la composition du moût et du vin, et leur couleur. Ceci peut s'expliquer par des activités oxydases (laccase, glucose oxydase) très faible. L'activité hydrolase (polysaccharidase) semble plus intense ; les vins obtenus sont en effet plus limpides. A la dégustation, aucune variation significative n'apparaît par rapport aux vins témoins. Egalement le contact, pendant 12 et 24 h, de débris de mycelium de *T. viride* dans le moût n'effecte pas le goût et l'arôme de celui-ci. L'antagonisme de *T. viride* contre les moisissures parasites du raisin peut donc être mis à profit pour protéger la Vigne sans risque de modification défavorable de la composition du moût, de sa fermentescibilité et des qualités du vin.

Manuscrit reçu le 20 avril 1982 ; accepté pour publication le 17 mai 1982.

RÉSUMÉ

T. viride actif contre **B. cinerea** et d'autres champignons parasites de la vigne (**A. carneus**, **P. frequentans**, **P. roqueforti**) ne modifie ni la composition du moût ni sa couleur ; il ne présente aucune action inhibitrice sur **S. cerevisiae**, **Schizosaccharomyces** et **L. oinos**. Par son activité polysaccharidase, son développement conduit à des vins plus limpides. A la dégustation, aucune variation significative n'apparaît par rapport aux vins témoins. L'antagonisme de **T. viride** peut donc être utilisé sans danger pour les caractères des moûts et des vins.

SUMMARY

T. viride active against **B. cinerea** and other parasitic fungi of the vine (**A. carneus**; **P. frequentans**, **P. roqueforti**) modifies neither the must composition nor its colour : it has no inhibitory influence concerning **S. cerevisiae**, **Schizosaccharomyces** and **L. oinos**. By the use of its polysaccharidase activity its development gives wines with better limpidity. When tasting no significant variations appear when comparing with reference samples. So the antagonism of **T. viride** can be used without any danger for the must and wines characters.

ZUSAMMENFASSUNG

T. viride, wirksam gegen **B. cinerea** und andere parasitäre Pilzkrankheiten der Rebe (**A. carneus**, **P. frequentans**, **P. roqueforti**) hat weder einen Veränderungseinfluss auf die Zusammensetzung der Moste, noch auf die Farbe ; er inhibiert auch nicht **S. cerevisiae**, **Schizosaccharomyces** und **L. oinos**. Durch seine Polysaccharidaseaktivität rägt er zurbessern Klärheit der Weine bei. Der organoleptische Test zeigt heinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Der Antagonismus von **T. viride** kann also ohne Weiteres angewandt werden, der er den Charakter der Moste b z w. der Weine nicht verändert.

RESUMEN

El **T. viride** es activo contra **B. cinerea** y otros hongos parásitos de la vid (**A. carneus**, **P. frequentans**, **P. roqueforti**) y no modifica ni la composición, ni el color del mosto; tampoco presenta ningún efecto inhibitor del **S. cerevisiae**, **Schizosaccharomyces** y **L. oinos**. Su desarrollo da lugar a vinos más limpios debido a su actividad polisacaridasica. En la degustación de vinos tratados no se observa ninguna diferencia significativa con los vinos testigo. Por consiguiente, el efecto antagónico del **T. viride** puede utilizarse sin riesgo para los caracteres de los mostos y vinos.

RIASSUNTO

T. viride attivo contro **B. cinerea** ed altri funghi parassiti della vite (**A. carneus**, **P. frequentans**, **P. roqueforti**) non modificano nè la composizione del mosto, nè il suo colore; presenta nessun azione inibitoria su **S. cerevisiae**, **Schizosaccharomyces** e **L. oinos**. Con la sua attività polisaccaridasi lo sviluppo di **T. viride** conduce a vini più limpidi. Alla degustazione nessun variazione significativa apparisce rispetto ai vini testi. L'antagonismo di **T. viride** può dunque essere adoperato senza pericolo per i caratteri dei mosti e dei vini.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CEROL E., 1981. Influence des herbicides sur la microflore des sols viticoles du Bordelais et participation des microorganismes à leur dégradation. *Thèse docteur en œnologie-ampélogie*, Bordeaux.
- DUBERNET M., 1974. Recherches sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea*. Applications technologiques. *Thèse docteur en chimie-œnologie*, Bordeaux.
- DUBOS B. et BULIT J., 1981. Perspectives nouvelles de lutte biologique contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea* Pers.) de la Vigne. In *Actualités œnologiques et viticoles*. P. Ribéreau-Gayon et P. Sudraud, éd. Dunod-Bordas, Paris, 178-187.
- FENICSOVA R., UEZLA J. et CHALAMBERIDZK N., 1970. Influence des sucres sur la formation des enzymes cellulolitiques du *Trichoderma* Sp. 185. *Microbiologia et virusologia. C.R. Acad. Science U.R.S.S.*, 58, 2, 169.
- FECODORINCHIK N., TARUNING T. et TUTUNNIKOR M. et al, 1977. Le préparat Trichodermin-4 pour la lutte des maladies des plantes. *Selizkohoziast. biologia*, 12, 1, 54-57.
- GAINA B.S., 1980. Influence des modalités de la récolte (vendange manuelle et mécanique) sur la qualité des jus et des vins. *Rapport de la session consacrée au 70^e anniversaire, Institut vinicole de Moldavie*, Kichinev, 92-97.

- LIHKACHEV A. et VASIN V., 1974. Utilisation du *Trichoderma lignorum* Harz. pour lutter contre la pourriture grise du fraisier. *Mikologia et microbiologie*, **8** (1), 37-42.
- TRONSMO A. et DENNIS G., 1971. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherl. J. Plant. Pathol.*, **83**, 449-455.
- TOYAMA N. et OGAWA K., 1968. *Trichoderma viride*. Purification and properties of *Trichoderma viride* Mycolitio Enzyme. *J. Ferment. Technol.*, **46**, 8, 626-633.

