



PROFIL

MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE



Coordination : Marc RAYNAL et Xavier BURGUN
Institut Français de la Vigne et du Vin
UMT SEVEN, INRAE, UMR SAVE, 71 avenue Edouard Bourlaux, CS
20032, 33882 Villenave d'Ornon
xavier.burgun@vignevin.com

**RAPPORT FINAL D'UN PROJET DE RECHERCHE FINANCE DANS LE
CADRE DU PLAN ÉCOPHYTO II+**



PROFIL MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOLOGAMIQUES DE LA VIGNE

APR 2019 “ Les approches globales pour limiter
l'utilisation des produits phytopharmaceutiques ”
***Rapport final [X. BURGUN, M. RAYNAL, M.
VERGNES, J-P. GOUTOULY, F. DELMOTTE, C.
POEYDEBAT, L. DELIERE, S. DUPIN, P-A. ROUX]***



Coordination : Marc RAYNAL et Xavier BURGUN
Institut Français de la Vigne et du Vin
UMT SEVEN, INRAE, UMR SAVE, 71 avenue Edouard Bourlaux, CS
20032, 33882 Villenave d'Ornon
xavier.burgun@vignevin.com

Action pilotée par les Ministères chargés de la Transition Ecologique et de la Cohésion des Territoires (MTECT), de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire (MASA), du Travail, de la Santé et des Solidarités (MTSS), et de la l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), avec l'appui financier de l'Office Français pour la Biodiversité (OFB), par les crédits issus de la redevance pour pollutions diffuses attribués au plan Écophyto II+

Table des matières

SYNTHÈSE	4
Contexte général et enjeux scientifiques et techniques	4
Objectifs généraux du projet.....	4
Quelques éléments de méthodologie (et difficultés éventuelles rencontrées)	5
Résultats obtenus	5
Implications pratiques, recommandations, réalisations pratiques, valorisation.....	11
Partenariats mis en place, projetés, envisagés	12
Pour en savoir plus (quelques références)	12
Liste des opérations de valorisations issues du contrat (articles de valorisation, participation à des colloques, enseignement et formation, communication, expertises...)	13
Résumés	14
RAPPORT SCIENTIFIQUE	17
Annexe : textes des publications	34
Annexe : partie confidentielle.....	34

SYNTHÈSE

Contexte général et enjeux scientifiques et techniques

La vigne est une culture d'importance économique notable mais reste encore fortement dépendante des pesticides de synthèse. La viticulture occupe 3 % de la SAU tout en utilisant près de 20% des volumes de produits phytosanitaires utilisés en agriculture (hors usage domestique). Cette filière est ainsi mise en cause de façon récurrente par les médias sur les questions d'impacts environnementaux et de résidus dans les vins, ou sur l'éventuelle contradiction entre une viticulture dite conventionnelle et l'image de « produit du terroir » donnée aux vins de qualité. Aussi, réduire l'usage des intrants en viticulture demeure un défi majeur (Fouillet et al., 2022). Parmi les leviers utiles à cette réduction, se trouvent les solutions de biocontrôle (Pandit et al., 2022) et la prophylaxie, mises en avant par le plan Ecophyto et la loi d'avenir pour l'agriculture. Ces stratégies, qui s'inscrivent également dans la transition agroécologique (Altieri et al., 2017 ; Gary et al., 2017), correspondent à un véritable changement de paradigme. En effet, leurs principes sont fondés sur la gestion des équilibres des populations de bioagresseurs plutôt que sur leur éradication. Ceci est donc fondamentalement différent des objectifs de la lutte phytosanitaire classique.

Dans le cas de la prophylaxie, les méthodes utilisées à ce jour sont des opérations d'aération du feuillage avec un effet indirect sur les maladies. Les méthodes avec un effet direct sur les maladies sont très rarement utilisées à cause de l'efficacité des produits chimiques disponibles, de leur coût et de l'absence de preuve de leur intérêt dans une démarche systémique à long terme. En effet, baisser la pression épidémique en diminuant directement la quantité d'inoculum primaire, suppose une action récurrente sur la durée et des outils mécaniques pour extraire l'inoculum des parcelles.

Cette approche consistant à gérer les résidus de cultures est utilisée pour maîtriser certaines maladies aériennes en grandes cultures et en arboriculture. Ainsi, le retrait des feuilles contaminées par la tavelure du pommier à l'inter-saison permet des diminutions de 50% à 80% de fruits atteints en fonction des années (Gomez et al. 2006). La technique est aujourd'hui utilisée dans les conditions de la pratique, notamment dans les vergers plantés avec des variétés à résistances partielles et dans les situations de fortes pressions épidémiques.

Ainsi, le projet PROFIL vise à faire la preuve de concept et à évaluer un nouveau levier de réduction des intrants phytosanitaires reposant sur l'extension de la période actuelle de lutte contre le mildiou de la vigne. À l'automne, la reproduction sexuée de *P. viticola* donne lieu à la formation d'oospores dans les feuilles. Une fois au sol, ces formes de conservation hivernale peuvent survivre plusieurs années et constituent l'inoculum primaire des futures épidémies. La réduction de l'inoculum primaire par exportation du feuillage hors du vignoble après la récolte (e.g., par arrachage ou ramassage au sol) est une piste pour limiter l'accumulation d'inoculum au fil du temps et faire baisser la pression épidémique.

Objectifs généraux du projet

Le projet repose sur la mise en œuvre d'un principe de lutte mécanique, *a priori* très simple, dans l'objectif d'atténuer la pression épidémique et de retarder l'initiation des épidémies.

Les objectifs du projet visent donc à

- (1) mettre au point une méthode d'extraction mécanique du matériel biologique contaminé au vignoble et de compostage visant à détruire les formes de conservation hivernales avant restitution de la matière organique (MO) hygiénisée sur le parcellaire,
- (2) évaluer l'impact de cette méthode sur les stocks d'inoculum du sol, et sur le développement des épidémies sur sites expérimentaux puis sur des îlots en conditions de production

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGRAMIQUES DE LA VIGNE

(3) vérifier enfin la résilience des ceps défoliés précocement et l'aptitude de cette méthode nouvelle à être intégrée dans une gestion globale des stratégies de traitement favorisant les produits naturels peu préoccupants (PNPP) pour préparer son transfert vers la profession.

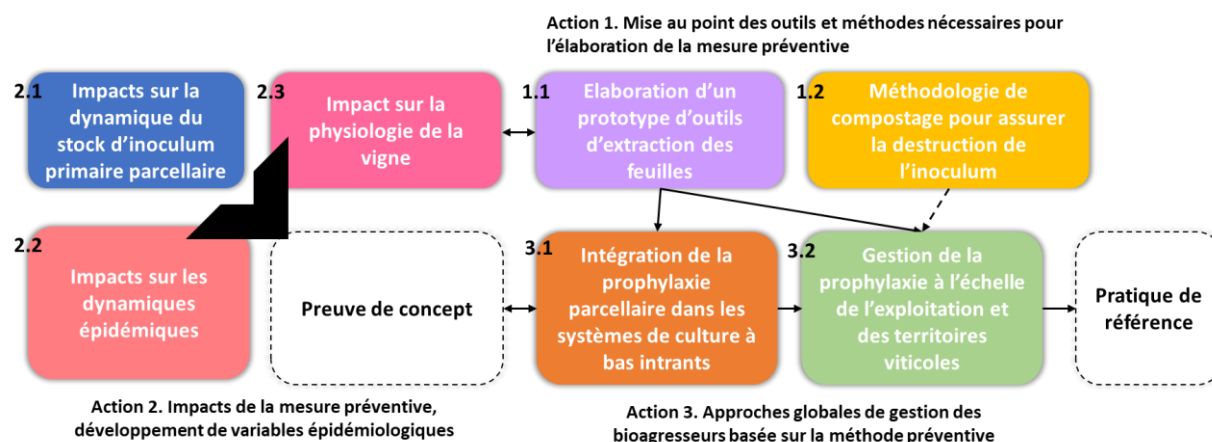


Figure 1 : Schéma conceptuel du projet PROFIL

Quelques éléments de méthodologie et difficultés éventuelles rencontrées

Le modèle biologique étudié est d'abord centré sur la gestion du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) pour être ensuite élargi au triptyque mildiou/oïdium/black rot. Des difficultés méthodologiques doivent être mentionnées car elles retardent le planning initial d'obtention des résultats ; elles ne sont cependant pas de nature à modifier l'orientation des travaux.

Difficultés rencontrées :

- Montage budgétaire nécessaire à la réalisation du prototype extracteur de la biomasse (pour rappel, ce volet n'est pas pris en charge dans le financement OFB).
- Méthodologies de conservation des oospores et d'évaluation de leur infectiosité.
- Méthodologies de mesure de la concentration des oospores dans le sol en fonction du type de sol.

Dans ce contexte, nous avons concentré nos efforts de recherche sur le mildiou.

Résultats obtenus

Action 1 : Mise au point des outils et méthodes nécessaires à l'élaboration de la mesure préventive

Tâche 1.1. Elaboration d'un prototype d'outils d'extraction mécanique des feuilles

Le développement d'une machine pour collecter les feuilles sur le rang et au sol répond aux problématiques de temps et de main d'œuvre prohibitifs générées par cette pratique. Sa mécanisation facilitera son adoption et sa généralisation auprès des viticulteurs. Un cahier des charges a été rédigé pour élaborer un prototype d'outil d'extraction des organes de la vigne porteurs des formes de conservation des pathogènes. La conception de cet outil n'est pas budgétisée dans le cadre de ce projet et fait l'objet d'un financement spécifique et régional de la Nouvelle Aquitaine.

Plusieurs pistes ont été envisagées et testées pour détruire ou collecter les feuilles sur les pieds de vigne :

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOLOGAMIQUES DE LA VIGNE

- Le dessèchement du feuillage et la dénaturation des formes de conservation des pathogènes par un radiant thermique. Cette solution n'a pas été retenue en raison de l'utilisation d'énergie fossile pour cette pratique.
- Un système d'effeuillage par aspiration des feuilles et coupe de ces dernières par une barre de coupe. La surface que couvre ces têtes est insuffisante et nécessite beaucoup de puissance motrice pour couvrir les deux faces entières du rang.
- L'arrachage des feuilles avec un système de doigts qui "brossent" le feuillage. Le prototype a montré de nombreux défauts dont la fragilité du système.
- Des rouleaux de brosse qui, par leur rotation, arrachent et/ou déchiquettent les feuilles. Cette dernière piste a été retenue parce que le concept était simple à la base et obtenait d'excellents résultats jusqu'à 98% d'efficacité d'effeuillage.



Figure 2 : Prototype avec des rouleaux de brosse

L'élaboration du prototype est toujours en cours avec l'objectif de s'adapter aux différentes configurations du vignoble français. Le système d'effeuillage est breveté depuis peu et le développement de la collecte au sol, du convoyage et du stockage des feuilles restent à réaliser.

Tâche 1.2. Méthodologie de compostage pour assurer la destruction de l'inoculum

Lors de précédentes recherches, l'intérêt du compostage pour hygiéniser le matériel végétal contaminé par des maladies du bois a déjà été montré. Dans le cadre de ce projet, nous avons donc souhaité étudier si le concept développé pour la gestion des maladies du bois pouvait être déployé pour hygiéniser la matière contaminée par les maladies cryptogamiques. Pour étudier cela, plusieurs étapes ont été mises en place.

La première étape a été de travailler sur un protocole de test biologique (basé sur la méthode des disques flottants) afin d'évaluer la viabilité et la capacité germinative d'oospores de *Plasmopara Viticola* présentes dans les fragments de feuilles de vigne. Les feuilles contaminées sont broyées et mises en solution. Des disques de feuilles sains sont mis en contact avec la solution contenant les fragments contaminés puis observés à intervalles réguliers. La contamination du matériel végétal est détectée via sporulation sur les disques flottants.

Une fois la méthode des disques flottants validées, une étude a été lancée pour déterminer si la chaleur pouvait détruire la capacité germinative des oospores de *P. viticola*. Les transformations qui se passent dans un compost sont plus diverses qu'uniquement une augmentation de chaleur mais la température est le paramètre le plus facile à maîtriser. Nous avons ainsi lancé un essai visant à appliquer une température de 50 ou 70°C sur des oospores de mildiou pendant 1 à 2 mois puis à vérifier leur capacité à germer. Les résultats ont mis en avant que les spores n'étaient plus en capacité de germer après ce passage en étuve. Cette étude a permis de présager que le compostage devrait pouvoir inhiber la capacité de germination des oospores.

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

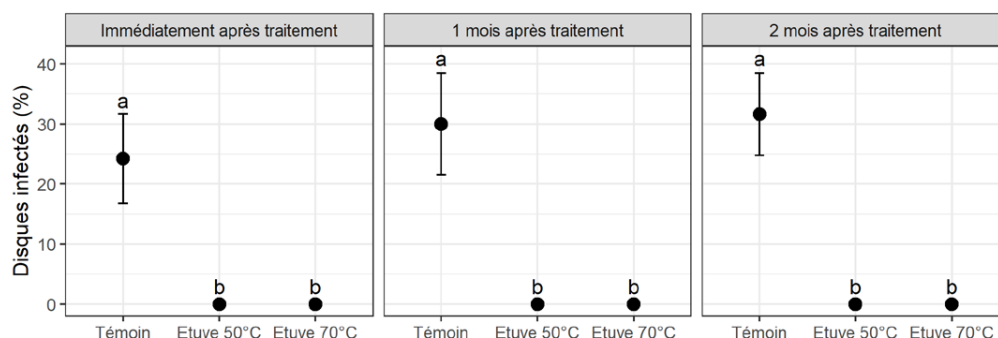


Figure 3 : Pourcentage de disques pièges infectés utilisés comme indicateur de la capacité germinative des oospores contenues dans les échantillons de feuilles de vigne, hivernés en conditions naturelles (témoins) ou placés 1 mois dans une étuve à 50 °C ou 70 °C. Différentes lettres indiquent des différences significatives.

Afin de compléter la preuve de concept, une étude sur un compost d'exploitation viticole a été mise en place. Les températures atteintes dans le tas de compost ont été régulièrement monitorées, de même que les dates de brassage du tas de compost ou d'arrosage. Des pochons, réalisés dans un tissu dont le maillage est plus serré que la taille d'une spore de mildiou, contenant du tissu contaminé par du mildiou ont été positionnés au cœur du tas de compost. Ils ont été retirés du tas à plusieurs dates puis la capacité de germination du matériel a été étudiée. Un témoin laissé au sol pendant la période d'exposition au compost a servi de comparaison. Le matériel végétal du témoin a permis la germination de spores sur les disques flottants tandis que celui venant du compost n'a produit aucune germination. Ce résultat confirme que le compostage du matériel végétal peut permettre d'inhiber la capacité germinative des oospores de mildiou et donc d'hygiéniser la matière organique extraite de la parcelle afin d'envisager ensuite de la restituer au champ.

Action 2 : Impacts de la mesure préventive, preuves de concept

Tâche 2.1. Impacts sur la dynamique du stock d'inoculum primaire parcellaire

Notre hypothèse est que le retrait du feuillage ou de litière de feuilles après les vendanges permet de réduire la quantité d'oospores dans le sol des parcelles viticoles.

Au démarrage du projet, aucune méthode opérationnelle ne permettait de quantifier cet inoculum dans le sol. Les équipes de recherche ont donc développé une nouvelle méthodologie, en collaboration avec la plateforme GENOSOL de l'INRAE de Dijon, s'appuyant sur des outils de biologie moléculaire et la technologie ddPCR. Cette méthode permet de quantifier dans un échantillon de 2 g de sol l'ADN du mildiou et de le traduire en nombre d'oospores par gramme de sol. La limite de détection de cette méthode est de 1 oospore pour 2 g de sol.

Une étude a été menée sur la parcelle « BIO3 » du vignoble expérimental de l'INRAE, conduite en agriculture biologique à Villenave d'Ornon, afin d'évaluer la distribution spatiale de l'inoculum primaire de mildiou à l'échelle d'une parcelle de 0,2 ha. Les résultats montrent que l'inoculum primaire est distribué de manière hétérogène dans une parcelle avec en moyenne 300 oospores par gramme de sol. L'inoculum s'accumule principalement sous le rang de vigne et dans les 10 premiers centimètres du sol. Un protocole d'échantillonnage optimisé a été formalisé à partir de ces résultats.

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

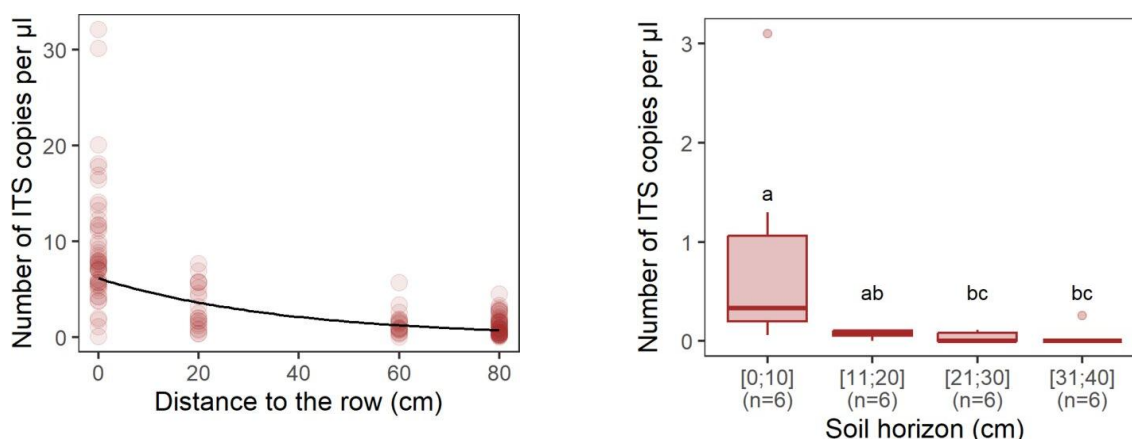


Figure 4 : Abondance de l'inoculum primaire du mildiou (exprimée en nombre de copies ITS par μL estimées par ddPCR) selon les gradients de distance à la rangée (panneau supérieur) et de profondeur du sol (panneau inférieur). Des lettres différentes entre les profondeurs dans le panneau inférieur indiquent une différence significative.

Dans le cadre de la chaire Alexis Millardet, ce protocole a été utilisé à partir de 2023 sur un réseau de cinq parcelles viticoles dans le Libournais pour évaluer l'effet du retrait de la litière de feuilles ou du feuillage sur la quantité d'oospores dans le sol. Les premiers résultats montrent une baisse continue de la quantité d'oospores dans les parcelles défoliées entre 2023 et 2025. Cette baisse n'est pas observée dans les témoins avec des quantités d'inoculum primaire retrouvées dans les sols variables en fonction du millésime.

Ces travaux ouvrent la voie à la création d'une variable simple du niveau d'inoculum primaire dans le sol, qui pourrait aider les viticulteurs à mieux anticiper et gérer le risque de mildiou. Des travaux complémentaires sont nécessaires au niveau méthodologique et scientifique pour mobiliser cette variable à un niveau opérationnel avec des cas d'usage concrets. Il semble notamment prometteur d'étudier son intérêt pour accompagner le déploiement de la prophylaxie chez les vignerons et améliorer l'analyse du risque à l'échelle individuelle (OAD) et collective (BSV).

Tâche 2.2. Impact sur les dynamiques épidémiques

Notre hypothèse est que le retrait de l'inoculum issu de la reproduction sexuée (oospores) permet une réduction de la précocité et de l'intensité des épidémies l'année suivante.

Une première expérimentation a été mise en œuvre en 2022 et 2023 dans des conditions semi-contrôlées avec l'utilisation de mésocosmes. En effet, des plants de Cabernet Sauvignon ont été confrontés à différents niveaux d'inoculum (nul, faible, moyen, fort) et soumis aux pluies naturelles, complétées par un arrosage artificiel. La pluviométrie enregistrée au printemps 2022 sur le site INRAE de Villenave d'Ornon n'a pas été favorable aux contaminations primaires. Néanmoins, les dernières séries de plants installés sur le dispositif semblent avoir profités de pluies favorables aux contaminations, les données indiquent une relation positive entre quantité d'inoculum primaire et quantité de contaminations primaires. En 2023, la pression mildiou a été particulièrement forte et les plantes pièges ont probablement été contaminées par de l'inoculum secondaire provenant du vignoble alentour.

Afin de simplifier l'étude de cette relation et être moins soumis aux conditions abiotiques, un test biologique basé sur la méthode des disques flottants a été mis au point afin d'évaluer dans des conditions contrôlées le potentiel d'échantillons de sol à infecter des disques de feuille de vigne. Le principe du test consiste à placer des échantillons de sol dans des conditions optimales de température et d'humidité favorables à la germination des oospores, à piéger les zoospores libérées à l'aide de disques foliaires de vignes sensibles, puis à évaluer le pourcentage de disques foliaires touchés et le pourcentage de la surface des disques atteint par le mildiou. Dans des conditions contrôlées, le test

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

biologique a permis de mettre en évidence sur 40 échantillons d'1 g de sol de la parcelle « BIO3 » une relation entre la quantité d'ADN de mildiou dans un sol (obtenue par ddPCR) et les infections primaires. Les résultats montrent que plus le sol est chargé en inoculum primaire plus le risque de contaminations primaires est important.

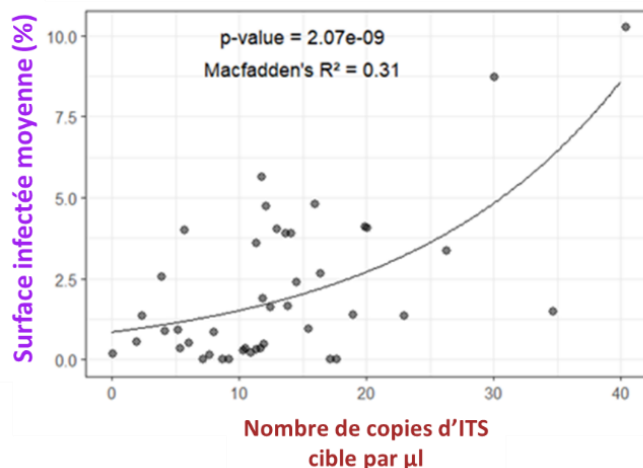


Figure 5 : Relations entre l'abondance de l'inoculum primaire du mildiou dans le sol (mesurée comme le nombre de copies ITS par μL par ddPCR) et le potentiel infectieux du sol évalué par un bioessai, exprimé par la surface moyenne infectée des disques pièges (panneau inférieur).

La relation positive entre le potentiel d'infection obtenue par test biologique et la quantité d'oospores dans les sols est encourageante et renforce l'intérêt de nos recherches. Le test biologique est complémentaire de l'approche de biologie moléculaire et permet d'approcher les notions de viabilité et d'infectiosité. Il serait intéressant de mobiliser ce type de test pour répondre à des questions d'ordre épidémiologique, évaluer des méthodes alternatives (lutte biologique augmentative, prophylaxie) ou pour analyser le risque d'infection à l'échelle collective (BSV). Des travaux complémentaires sont nécessaires au niveau méthodologique pour opérationnaliser cette variable pour un usage à haut-débit.

Tâche 2.3. Impact sur le fonctionnement de la plante et effets induits sur la qualité de récolte

Un dispositif expérimental visant à mesurer l'impact d'une défoliation précoce sur la quantité et la qualité de la vendange a été mis en place à l'automne 2020, dans le but de s'assurer qu'il est possible de concilier le retrait des feuilles de la parcelle pour baisser le niveau d'inoculum primaire, et la pérennité de la vigne. Quatre modalités de défoliation annuelle sont testées : 1) directement après la récolte, 2) 1 mois après la récolte, 3) 2 mois après la récolte et 4) une modalité consistant à décaler la date de défoliation chaque année, de sorte qu'une défoliation à la récolte en année n soit suivie en $n+1$ d'une défoliation en post-récolte à $+1$ ou $+2$ mois, dans l'hypothèse que cela impacte moins fortement la capacité de la vigne à mettre en réserve. Ces modalités sont comparées avec une modalité témoin non défoliée.

Si des différences ont été observées dans l'analyse des réserves dans les bois, la privation de la mise en réserve automnale entre 2020 et 2024 n'a pas permis de mettre en évidence une baisse significative du poids des bois de taille et une baisse du potentiel de rendement. D'après les données bibliographiques, de telles défoliations précoces touchent le rendement à partir de la deuxième année. Des conditions d'essai particulières ont été observées avec des fortes sécheresses en 2022, des fortes attaques d'Eudémis en 2023 et de mildiou en 2024. Même si dans le cadre de PROFIL, il n'a pas été mis en évidence une altération du rendement dans le cadre d'une défoliation drastique, il faut rester prudent quant à la généralisation de la méthode de défoliation à la récolte.

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

Des tests supplémentaires sont à prévoir pour vérifier l'effet de la défoliation sur les composantes du rendement pour d'autres variétés que le Cabernet Sauvignon et dans d'autres vignobles. Bien que les viticulteurs soient très attentifs aux effets sur la physiologie de la vigne, il est relativement aisé de mettre en place des mesures compensatoires permettant de limiter les impacts délétères de la défoliation. Il serait intéressant dans un nouvel essai de tester des mesures compensatoires avec l'apport de fertilisation foliaire et de raccourcir le temps entre les modalités.

Action 3 : Approches globales de gestion des bioagresseurs basées sur la mesure préventive

Tâche 3.1. Intégration de la prophylaxie parcellaire dans les systèmes de culture à bas intrants.

Les organes de conservations du mildiou se forment et se conservent dans les feuilles puis dans le sol une fois celles-ci tombées à terre. La mesure de prophylaxie évaluée dans cette action consiste à observer si le retrait préventif des feuilles, rafles et rameaux de vigne de la parcelle après vendange et mise en réserve permet de réduire la dynamique épidémique du mildiou en diminuant l'inoculum. La parcelle étudiée est très favorable au développement de ce pathogène. L'expérimentation mise en place est divisée en 2 zones contiguës de même dimension et menées de manière identique : une référence viticulteur et une zone défoliée avant la chute naturelle des feuilles. Un suivi de la phénologie a été également mené pour observer l'impact de cette manipulation sur la mise en réserve de la vigne et sur sa vigueur.



Figure 6 : Parcelle de Montagne après la défoliation à l'automne

Les résultats obtenus sur ces 4 ans ne permettent pas de valider pleinement le concept. Les résultats des prélèvements de sol à l'automne 2022 montre après deux ans de défoliation une réduction du stock d'oospores de 45% par rapport au témoin. Les résultats sanitaires ne proposent que très peu de différences entre les deux zones même si une tendance est observée en 2024 sur une année avec une pression très importante. Ces résultats sont à nuancer par rapport à l'important historique de la parcelle vis-à-vis du mildiou et la forte pression rencontrée 3 années sur les 4 qui n'ont pas permis de maintenir des stratégies bas intrants. Les évaluations de la phénologie et du développement de la vigne n'ont pas montré d'impact de la défoliation. Dans l'ensemble, cette méthode prophylactique n'a pas montré d'effet délétère sur 4 ans.

Un accroissement de la zone d'essai est envisagé pour limiter les risques de contamination des zones adjacentes ainsi que la remise en place de stratégies de réduction des intrants.

Tâche 3.2. Gestion de la prophylaxie à l'échelle de l'exploitation et des territoires viticoles

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

Cette tâche n'a pas débuté car l'équipe projet a fait le choix d'assurer les preuves de concept et les résultats scientifiques avant de chercher à déployer sur des territoires entiers cette nouvelle méthode de prophylaxie et de convaincre les vignerons de son intérêt. Les difficultés techniques rencontrées ont aussi impacté l'action avec le retard dans le prototypage d'un outil d'extraction du feuillage. En effet, réaliser manuellement l'effeuillage total d'une parcelle de vigne nécessiterait un personnel très important. Le changement d'échelle n'a donc pas été possible dans ce cadre. Depuis 2025, le soufflage des feuilles en dehors de parcelles est testé pour faciliter les extractions. A l'heure actuelle, l'échelle de réalisation de nos tests reste à la parcelle. Cela nous permet de suivre plus précisément la réaction de la plante, de faire des notations et de consolider nos résultats. Dès que la preuve de concept sera aboutie, un changement d'échelle pour passer à l'échelle d'un îlot ou d'un petit territoire sera alors effectivement réalisé.

Un réseau de 5 parcelles a toutefois été mis en place en 2022 dans le cadre de la Chaire Alexis Millardet par l'INRAE. Les résultats indiquent que le retrait des feuilles à l'automne tend à faire baisser la quantité d'inoculum dans le sol des parcelles d'année en année. Le retardement des traitements dans l'une des parcelles du réseau a permis de montrer que cela se traduisait par un retard du démarrage épidémique.

Implications pratiques, recommandations, réalisations pratiques, valorisation

Implications pratiques : Les avancées du projet permettent d'envisager la gestion des débris de culture et l'évaluation de son impact chez les vignerons. Les surfaces de défoliation vont pouvoir être augmentées grâce au prototype développé en partenariat avec la société Souslikoff (Proto Profil – Financement région Nouvelle-Aquitaine). Le système d'extraction des feuilles par brossage a fait l'objet d'un brevet, nous espérons une commercialisation à partir de l'automne 2026.

Recommandations : Pas de recommandations à ce stade du projet, les données sont insuffisantes pour démontrer l'effet de la défoliation sur la réduction des épidémies de mildiou.

Limites ou généralisations éventuelles des résultats :

- Il n'y a pas de matériel commercialisé ou de méthodes disponibles à l'échelle des vignerons pour assurer la défoliation de la vigne en fin de campagne.
- Il est nécessaire de vérifier l'effet de la défoliation sur les composantes du rendement pour d'autres variétés que le Cabernet Sauvignon et dans d'autres contextes pédoclimatiques ou de tester des approches compensatoires par rapport à la diminution de la mise en réserve.
- Baisser la pression épidémique en diminuant directement la quantité d'inoculum primaire, suppose une action récurrente longue et sur des surfaces significatives et/ou isolées en raison de la propagation possible par voie aérienne.

Réalisations pratiques et valorisation :

-Brevet pour l'extraction du feuillage par brossage déposé par la société Souslikoff – hors financement OFB (tâche 1.1)

--Elaboration d'un protocole d'échantillonnage et d'analyse de sols pour caractériser la quantité d'inoculum primaire à l'échelle d'une parcelle (tâche 2.1)

-Développement d'un biotest pour mesurer le potentiel infectieux d'un sol (tâche 2.2)

--Réalisation d'un dispositif expérimental comprenant des mésocosmes plus ou moins enrichis en inoculum primaire et des phytomètres pour mesurer le lien entre la quantité d'inoculum primaire et les contaminations primaires (tâche 2.2)

-Dépôt de plusieurs projets pour intégrer la prophylaxie dans l'itinéraire de production des viticulteurs à l'échelle nationale

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOLOGAMIQUES DE LA VIGNE

SAVOIR (PARSADA) : Test de stratégies intégrées de gestion préventive non chimique du mildiou et du black rot pour une viticulture économe en intrants. Ce projet permettra de poursuivre les preuves de concept sur le retrait des organes de conservation des maladies cryptogamiques de la vigne à l'échelle nationale.

PROFIL BEE (DEPHY EXPE) : Propose de mettre en place 4 systèmes agroécologiques à l'échelle nationale pour combiner le retrait mécanique des organes porteurs d'inoculum et l'usage prioritaire de biosolutions. Une évaluation multicritère de ces systèmes sera réalisée.

TRANSFERTS (PARSADA) : Évaluation de dispositifs d'acquisition et de transfert des pratiques et des connaissances, transposables à grande échelle, pour améliorer la gestion et la maîtrise du mildiou et du black-rot de la vigne.

-Conférences orales auprès de groupes de viticulteurs, techniciens et scientifiques.

Partenariats mis en place, projetés, envisagés

- Partenariat engagé avec un équipementier de Nouvelle-Aquitaine pour réaliser l'extraction de la biomasse foliaire des vignes (Etablissements Souslikoff).
- Collaboration avec la plateforme GENOSOL du centre INRAE de Dijon pour le développement du protocole d'extraction d'ADN (dont ADN de *Plasmopara viticola*) à partir de sol.
- Collaboration avec le Château Haut-Brion (Pessac) pour engager chez eux l'étude sur l'effet du compostage des feuilles de vigne sur la viabilité des oospores de *P.viticola*.
- La dynamique générée par le projet PROFIL a donné lieu au montage de la Chaire Alexis Millardet en 2021. Cette Chaire vise à rechercher de nouveaux moyens de lutte contre le mildiou de la vigne qui soient fondés sur la prévention et une meilleure prévision des risques épidémiques. Elle est centrée sur des fronts de science peu explorés jusqu'ici, en particulier la compréhension de la phase sexuée du cycle de vie de l'agent pathogène. Les avancées devront déboucher sur la mise au point de nouvelles méthodes de lutte basées sur la rupture du cycle et la réduction de l'inoculum primaire du pathogène. La chaire est portée par une équipe pluridisciplinaire de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) associant l'INRAE, l'université de Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro et l'Institut français de la vigne et du vin (IFV). Elle s'inscrit dans le cadre du « Fonds ISVV – une ambition internationale au service de la filière ». Avec le concours de la Fondation Bordeaux Université, elle bénéficie du soutien en mécénat de quatre propriétés : le Château Ausone, le Château Cheval Blanc, le Château Montrose et Petrus. Les activités de la Chaire ont démarré en 2022 et dureront jusqu'en 2027.

Pour en savoir plus (quelques références)

- Les vidéos de la journée technique de l'UMT SEVEN – Stratégie de lutte contre le mildiou – 25 avril 2023 : <https://umt-seven.hub.inrae.fr/communication-diffusion/conferences-journees-scientifiques-et-techniques/2023-strategies-de-lutte-contre-le-mildiou>
 - La prophylaxie, un premier levier pour lutter contre les contaminations – Charlotte Poeydebat (BSA - SAVE) - [lien vers le replay](#)
 - Le compostage pour lutter contre la propagation des épidémies - Séverine Dupin (chambre d'agriculture de la Gironde) - [lien vers le replay](#)

Liste des opérations de valorisations issues du contrat (articles de valorisation, participation à des colloques, enseignement et formation, communication, expertises...)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	
Publications scientifiques parues	Poeysdebat, C., Courchinoux, E., Delière, L., Raynal, M. and Delmotte, F. (2022). Quantification and management of <i>Plasmopara viticola</i> primary inoculum in soil – Towards prophylactic control of grapevine downy mildew. 9th International workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildews, 20-22/07/2022, Cremona (Italy) Poeysdebat, C., Courchinoux, E., Demeaux, I., Rodriguez, M., Chataigner, A., Lelievre, M., Goutouly, J.-P., Rossi, J.-P., Raynal, M., Delière, L., and Delmotte, F. (2024). Quantitative assessment and spatial distribution of <i>Plasmopara viticola</i> oospores in vineyard soil. bioRxiv, 2024-07. Courchinoux, E., Roux, P.-A., Rodriguez, M., Demeaux, I., Dupin, S., Delière, L., Raynal, M., & Poeysdebat, C., (in press). Le compostage des feuilles de vignes pour réduire l'inoculum primaire de <i>Plasmopara viticola</i> au vignoble ? IVES Technical Reviews.
Publications scientifiques à paraître	Poeysdebat, C., Courchinoux, E., Mazet, I. D., Rodriguez, M., Chataigner, A., Lelièvre, M., Goutouly, J.-P., Rossi, J.-P., Raynal, M., Delière, L. & Delmotte, F. (2025). Digital droplet PCR quantification and field-scale spatial distribution of <i>Plasmopara viticola</i> oospores in vineyard soil. Applied and Environmental Microbiology,
Publications scientifiques prévues	Publication scientifique des résultats de l'effet de la prophylaxie sur le fonctionnement de la plante (tâche 2.3)
COLLOQUES	
Participations passées à des colloques	Séminaire Vins et Environnement organisé par l'ISVV et Innovin, le 10/11/2021 à Bordeaux Sciences Agro sur le thème "Mildiou de la vigne : les contaminations primaires sont-elles d'importance secondaire ?" : interventions de M. Raynal et F. Delmotte en présence de scientifiques et de viticulteurs ayant démontré un fort intérêt pour la thématique de la prophylaxie . 9th International workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildews, 20-22/07/2022 à Cremona (Italy), présentation d'un poster intitulé "Quantification and management of <i>Plasmopara viticola</i> primary inoculum in soil – Towards prophylactic control of grapevine downy mildew" Conférence au salon Vinitech organisée le 26 novembre 2024 à Bordeaux "Mildiou, le défi des années à venir ». Intervention de F. DELMOTTE. Journée technique UMT SEVEN – Stratégie de lutte contre le mildiou – 25 avril 2023 : • La prophylaxie, un premier levier pour lutter contre les contaminations – Charlotte Poeysdebat (BSA - SAVE) - lien vers le replay • Le compostage pour lutter contre la propagation des épidémies - Séverine Dupin (chambre d'agriculture de la Gironde) - lien vers le replay Poeysdebat, C., Courchinoux, E., Rodriguez, M., Delière, L., Raynal, M., et Delmotte F. 2023. Vers une gestion préventive des épidémies de mildiou de la vigne basée sur la rupture du cycle sexué de <i>Plasmopara viticola</i>. Colloque conjoint E3GP3 et GPR Bordeaux Plant Science, 4-6 décembre 2023, Bordeaux France. (présentation orale) Poeysdebat, C., Rossi, J.-P., Demeaux, I., Courchinoux, E., Rodriguez, M., Raynal, M., Delière, L., et Delmotte, F. (2024). Vers une gestion préventive des maladies des plantes cultivées fondée sur la rupture du cycle sexué des agents pathogènes. 14èmes Rencontres de Phytopathologie – Mycologie, Journées Jean Chevaugéon, 15-19 janvier 2024, Aussois, France. (présentation orale) Poeysdebat, C., Rossi, J.-P., Courchinoux, E., Rodriguez, M., Demeaux, I., Goutouly, J.-P., Raynal, M., Delière, L., et Delmotte F. 2024. Vers une gestion préventive des épidémies de mildiou de la vigne basée sur la rupture du cycle sexué de <i>Plasmopara viticola</i>. Journées annuelles du projet ANR VITAE, 12-14 mars 2024, Cognac, France. (présentation orale)

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

Participations futures à des colloques	Poeydebat, C., Rossi, J.-P., Courchinoux, E., Rodriguez, M., Demeaux, I., Châtaigner, A., Goutouly, J.-P., Raynal, M., Delière, L., et Delmotte F. 2024. Vers une gestion préventive des épidémies de mildiou de la vigne basée sur la rupture du cycle sexué de <i>Plasmopara viticola</i>. Journée de l'ISVV, 25 juin 2024, Villenave d'Ornon, France. (Présentation orale) Colloque de restitution finale Ecophyto Recherche et innovation, Jeudi 26 juin 2025.
THÈSES	
Thèses passées	Non
Thèses en cours	Non
ARTICLES DE VALORISATION/ VULGARISATION	
Articles de valorisation parus	
Articles de valorisation à paraître	
Articles de valorisation prévus	Effet de la prophylaxie sur l'inoculum primaire après 3 années (résultats obtenus au lycée de Montagne St-Emilion) et sur les initiations épidémiques (tâche 2.2) Résultats des travaux sur le compostage de la biomasse pour la destruction de l'inoculum primaire de Mildiou (tâche 1.2)
AUTRES ACTIONS VERS LES MÉDIAS	
Actions vers les médias (interviews...) effectuées	Vitisphere : https://www.vitisphere.com/actualite-99220-ramasser-les-feuilles-apres-les-vendanges-plutot-que-le-mildiou-lannee-dapres.html https://www.vitisphere.com/actualite-104258--50-de-symptomes-en-moins-reduire-linoculum-du-mildiou-dans-les-vignes-ca-paye-.html https://www.vinopole.com/wp-content/uploads/2025/03/fiche-technique-n7-Plan-Mildiou.pdf
Actions vers les médias prévues	
ENSEIGNEMENT/ FORMATION	
Enseignements/formations dispensés	Cours master2 ISVV Formation biocontrôle IFV
Enseignements/formations prévus	
EXPERTISES	
Expertises menées	
Expertises en cours	Expertise de l'IFV pour accompagner le prototypage d'un outil pour extraire les feuilles de vigne après les vendanges.
Expertises prévues	
MÉTHODOLOGIES (GUIDES...)	
Méthodologies produites	Protocole d'extraction d'ADN à partir d'échantillon de sol de 2g (en collaboration avec GENOSOL) Détection et quantification de l'inoculum de Mildiou dans le sol par ddPCR Méthode des disques flottants pour déterminer la viabilité et la capacité infectieuse de l'inoculum primaire de Mildiou
Méthodologies en cours d'élaboration	Méthodologie d'échantillonnage optimisée pour caractériser l'inoculum primaire dans une parcelle
Méthodologies prévues	Détection et quantification de l'inoculum de Mildiou dans les tissus foliaires (frais et décomposés) par qPCR
AUTRES	
Techniciens, conseillers, viticulteurs	Présentation du projet aux conseillers viticoles de la Chambre d'agriculture 33 (09/12/2021)

Résumés

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGRAMIQUES DE LA VIGNE

□ Résumé court

Le projet PROFIL vise à extraire de la parcelle les feuilles hébergeant les formes de conservation hivernale « oospores » du mildiou de la vigne pour réduire la pression sanitaire. Il a permis le développement d'indicateurs pour évaluer la quantité d'oospores dans l'environnement et d'accompagner le prototypage d'un outil pour extraire le feuillage après les vendanges. Des premiers résultats ont été obtenus sur l'effet de ce levier sur les dynamiques épidémiques et la physiologie de la vigne. Le compostage des feuilles a été étudié afin de pouvoir restituer une matière organique hygiénisée.

□ Résumé long

- Contexte général et enjeux scientifiques et techniques

Les mesures prophylactiques connues pour lutter contre les maladies cryptogamiques de la vigne sont encore peu mobilisées en viticulture en raison de la capacité de survie à moyen terme (*i.e.* plusieurs années) des formes de conservation des agents pathogènes, et de leur efficacité partielle au regard de celle des produits phytopharmaceutiques (PPP). Cependant, l'intégration de ces mesures (qui reposent sur l'évitement des contaminations) dans une approche globale de protection des cultures contre les bioagresseurs mérite d'être reconsidérée face aux objectifs de réduction drastique de l'usage des PPP, portés notamment par le plan ECOPHYTO. Ainsi, le projet PROFIL vise à faire la preuve de concept et à évaluer un nouveau levier de réduction des intrants phytosanitaires reposant sur l'extension de la période actuelle de lutte contre le mildiou de la vigne et proposant une nouvelle cible d'intervention, *i.e.* la phase sexuée du cycle des parasites, phase responsable du maintien pluriannuel de l'endoinoculum et des contaminations primaires sur l'ensemble de la saison.

- Objectifs

Le projet repose sur la mise en œuvre d'un principe de lutte mécanique, *a priori* très simple, dans l'objectif d'atténuer la pression épidémique et de retarder l'initiation des épidémies.

Les objectifs du projet visent donc à (1) mettre au point une méthode d'extraction mécanique du matériel biologique contaminé au vignoble et de compostage visant à détruire les formes de conservation hivernales avant restitution de la matière organique (MO) hygiénisée sur le parcellaire, (2) évaluer l'impact de cette méthode sur les stocks d'inoculum du sol, et sur le développement des épidémies sur sites expérimentaux puis sur des îlots en conditions de production, (3) vérifier enfin la résilience des ceps défoliés précocement et l'aptitude de cette méthode nouvelle à être intégrée dans une gestion globale des stratégies de traitement favorisant les produits naturels peu préoccupants (PNPP) pour préparer son transfert vers la profession.

- Méthodologie :

Mise au point des outils et méthodes nécessaires à l'élaboration de la mesure préventive non chimique : Un cahier des charges a été élaboré en 2020 pour concevoir un prototype destiné à l'extraction du matériel végétal, dans le cadre d'une stratégie prophylactique en viticulture. Transmis à la société Souslikoff en août 2020, il a permis la réalisation et l'évaluation de plusieurs prototypes testés en parcelles. Des observations visuelles ont été menées pour apprécier la qualité d'extraction du feuillage ainsi que l'impact sur l'intégrité des ceps. L'effet du compostage sur les oospores a été évalué via un test biologique (basé sur la méthode des disques flottants) dans des conditions contrôlées en étuve et dans les conditions de la pratique à l'intérieur d'un compost de sarments.

Évaluation de l'impact de la mesure prophylactique : Un protocole mobilisant les outils de la biologie moléculaire basée sur la technologie de la ddPCR a été développé et validé pour détecter l'ADN de *Plasmopara viticola* dans des échantillons de sol, le quantifier, et transformer les quantités d'ADN retrouvées en nombre d'oospores par gramme de sol. Des mésocosmes ont été mis en place en 2022 et 2023 pour évaluer l'effet de la quantité d'inoculum primaire au sol sur les initiations épidémiques.

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

Un essai en micro-placettes a été mis en œuvre pour évaluer l'effet de quatre modalités de défoliation sur la physiologie de la vigne.

Intégration de la prophylaxie parcellaire dans les systèmes de culture à bas intrants : L'étude de l'impact de la prophylaxie sur l'efficacité des stratégies de lutte à bas intrants a démarré en 2020 sur un dispositif expérimental en bande sans répétition sur le site du Lycée agro-viticole de Libourne-Montagne. Des suivis réguliers de la phénologie et de l'état sanitaire des deux zones ont été réalisés au cours de la saison culturale, chaque année depuis le début du projet.

- Principaux résultats obtenus

Le prototypage de l'extracteur de biomasse foliaire est bien avancé et un brevet a été déposé pour la méthode de défoliation. Les avancées du projet permettent d'envisager la gestion des débris de culture et l'évaluation de son impact chez les vigneron.

Les premiers tests d'évaluation de la dégradation des formes de conservation ont été réalisés en étuve et par compostage. La capacité germinative des oospores est inhibée après une exposition en étuve à 50°C et 70°C pendant deux mois et après un séjour de 3 mois dans un compost viticole de sarments à une température moyenne de 50°C.

Une méthodologie est disponible pour échantillonner les sols et détecter l'ADN de *Plasmopara viticola*, le quantifier, et transformer les quantités d'ADN retrouvées en nombre d'oospores par gramme de sol. La quantité d'inoculum est distribuée de manière hétérogène dans une parcelle et il se trouve sur les 10 premiers cm du sol et en quantité 5 fois plus importante sous le rang que dans l'inter-rang. À l'aide d'un bio-essai sur disques foliaires, nous avons montré que le potentiel infectieux du sol augmentait significativement avec la concentration en oospores évaluée par ddPCR.

- Sorties opérationnelles pour décideurs, applications éventuelles

Les avancées du projet permettent d'envisager la gestion des débris de culture et l'évaluation de son impact chez les vigneron. Les surfaces de défoliation vont pouvoir être augmentées grâce au prototype développé en partenariat avec la société Souslikoff.

Les variables épidémiques développées dans le projet pourront être mobilisées pour valider d'autres leviers prophylactiques. Leur usage pourra également être élargi afin d'améliorer l'analyse du risque, tant à l'échelle individuelle, via des outils d'aide à la décision (OAD), qu'à l'échelle collective, dans le cadre des Bulletins de Santé du Végétal (BSV).

- Recommandations

Pas de recommandations techniques à ce stade du projet, les données sont insuffisantes pour démontrer l'effet de la défoliation sur la réduction des épidémies de mildiou. Les travaux pour obtenir une preuve de concept se poursuivent dans le cadre de la Chaire Millardet à Bordeaux et plus largement à l'échelle nationale dans le cadre du projet ciblé PARSADA SAVOIR (2025-2030). Des travaux sont également nécessaires pour évaluer l'association de la prophylaxie (défoliation après la récolte) avec des itinéraires bas intrants. Le projet Dephy EXPE PROFIL BEE va proposer une démarche de protection agroécologique de la vigne couplant la défoliation après la récolte et l'utilisation de biosolutions pour lutter contre le mildiou.

- ☐ Mots-clés : Prophylaxie, vigne, inoculum primaire, oospores, défoliation, biomasse contaminée



RAPPORT SCIENTIFIQUE



PROFIL MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOLOGIQUES DE LA VIGNE

APR 2019 “ Les approches globales pour limiter
l'utilisation des produits phytopharmaceutiques “
***Rapport final [X. BURGUN, M. RAYNAL, M.
VERGNES, J-P. GOUTOULY, F. DELMOTTE, C.
POEYDEBAT, L. DELIERE, S. DUPIN, P-A. ROUX]***

Coordination : Marc RAYNAL et Xavier BURGUN
Institut Français de la Vigne et du Vin
UMT SEVEN, INRAE, UMR SAVE, 71 avenue Edouard Bourlaux, CS
20032, 33882 Villenave d'Ornon
xavier.burgun@vignevin.com

Action pilotée par les Ministères chargés de la Transition Ecologique et de la Cohésion des Territoires (MTECT), de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire (MASA), du Travail, de la Santé et des Solidarités (MTSS), et de la l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), avec l'appui financier de l'Office Français pour la Biodiversité (OFB), par les crédits issus de la redevance pour pollutions diffuses attribués au plan Écophyto II+

Action 1. Mise au point des outils et méthodes nécessaire pour l'élaboration de la mesure préventive

Tâche 1.1. Elaboration d'un prototype d'outils d'extraction mécanique des feuilles

Nous avons rédigé le cahier des charges décrivant les fonctionnalités complètes attendues pour le prototype d'outil d'extraction mécanique des feuilles, en regard des objectifs du projet. Ce cahier des charges a été présenté à un équipementier local (les Établissements Souslikoff (ES)) qui nous paraissaient susceptible d'être particulièrement intéressés par notre approche et le produit à développer, celui-ci étant complémentaire au Vignalex, un équipement de compostage développé proposé par les ES à la profession viticole (médaille d'or au trophée de l'innovation Vinitech 2012). Suite à l'intérêt manifesté par le dirigeant de l'entreprise, Mr. Dominique Souslikoff, un dossier de financement R&D Collaborative a été déposé par les ES auprès de la région Nouvelle-Aquitaine pour leur permettre d'initier le projet.

Les travaux de réalisation d'un élément extracteur de feuilles ont débuté dans le courant de l'année 2022. Un premier élément prototype a pu être testé deux fois en 2022. Parallèlement, différentes méthodologies d'évaluation de l'efficacité de l'extraction des feuilles ont été comparées. Nous avons retenu celle utilisant le NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) en raison de sa simplicité et sa rapidité de réalisation associées à une bonne corrélation avec le nombre de feuilles supprimées. En raison de la trop grande puissance motrice nécessaire et malgré une bonne efficacité de cet extracteur (80-90%), ES s'est orienté vers un système d'arrachage des feuilles. Deux principes ont été essayés en 2023 et le brossage a été préféré au "peigne".

Hormis les difficultés liées à la fourniture des éléments du nouveau système dans les délais, le choix de la matière des brosses, de leur nombre et de la configuration du système a retardé la finalisation du prototype. Chaque année (2023 et 2024) a fait l'objet de tests pour améliorer l'existant et définir les évolutions nécessaires pour obtenir le meilleur rendement de travail et d'efficacité dans la suppression des feuilles sur les ceps de vigne. Les paramètres de réglages se sont affinés. 2025 sera l'année où un prototype finalisé sera proposé tant pour la collecte des feuilles sur le rang et au sol que pour son stockage. Il est également prévu une adaptation du prototype aux différents écartements inter-rang. Nous souhaitons au-delà des tests d'efficacité et de réglages, procéder au ramassage des feuilles sur des sites d'essai où la pratique est encore actuellement manuelle.

Tâche 1.2. Méthodologie de compostage pour assurer la destruction de l'inoculum

Une des actions du projet est l'évaluation de l'effet du compostage sur la viabilité des oospores afin de pouvoir restituer une matière organique assainie au vignoble.

Effet de températures élevées sur la viabilité des oospores de *P.viticola*

Au cours du compostage, la matière organique est décomposée par divers processus physico-chimiques et par l'action de micro-organismes qui engendrent une augmentation de la température. Pendant cette phase dite « thermophile », la température du compost peut dépasser 70 °C. Parmi les réactions observables dans un compost, l'effet température est le plus facile à maîtriser (Bollen et al, 1989 ; Hoitink et al, 1986).

Pour évaluer l'effet de températures élevées sur la capacité germinative des oospores, des feuilles de vigne (cépage Merlot) contenant des oospores ont été récoltées à l'automne 2021 et réparties (sous forme de disques de feuilles) en 15 échantillons (3 modalités et 5 répétitions). Pendant un mois, 5 des échantillons ont été placés dans une étuve humide à 50 °C et 5 autres dans les mêmes conditions, mais à 70 °C. Les 5 derniers, en tant que témoins, ont été conservés en conditions naturelles sur le sol durant la même période. Un test biologique a permis d'analyser la capacité germinative des oospores dès la sortie de l'étuve (mars), un mois (avril) et deux mois après (mai) : i) les feuilles sont placées dans des

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

conditions de température et d'humidité optimales pour la germination des oospores (i.e., 20 °C obscurité et immersion dans l'eau) ; ii) les zoospores libérées sont piégées en utilisant des disques de feuilles de vigne sensible (disques pièges) et iii) la viabilité des oospores est évaluée en caractérisant le degré d'infection des disques de feuilles incubés en conditions optimales de sporulation (i.e., 20 °C alternance 12 h jour/12 h nuit, 100 % d'humidité) (Hill, 1998 ; Poeydebat et al, 2024). En moyenne, $28,6 \pm 4,2$ % (écart-type) des disques pièges témoins (n = 350) ont été infectés. Aucune infection n'a été observée à partir des échantillons passés à l'étuve (Figure 7, n = 700). Ces résultats semblent donc indiquer que les oospores de *P.viticola* perdent leur capacité germinative quand elles sont exposées pendant 1 mois à des températures telles que celles rencontrées durant la phase thermophile d'un compost.

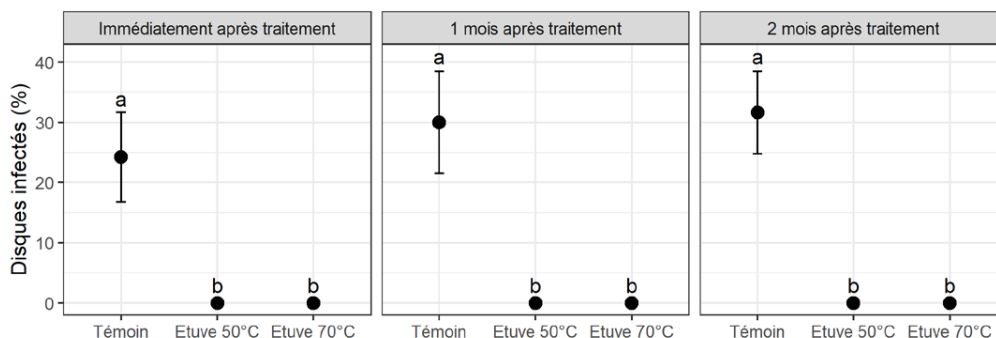


Figure 7 : Pourcentage de disques pièges infectés utilisés comme indicateur de la capacité germinative des oospores contenues dans les échantillons de feuilles de vigne, hivernés en conditions naturelles (témoins) ou placés 1 mois dans une étuve à 50 °C ou 70 °C. Différentes lettres indiquent des différences significatives.

Effet de la température sur la viabilité des oospores en conditions réelles de compostage

Pour donner suite à ce premier résultat en conditions contrôlées, l'effet sur la capacité germinative des oospores a été évalué en conditions réelles avec un compost de 50 m³ composé majoritairement des sarments de vigne et de la tonte, retourné et arrosé mensuellement. Des feuilles de vigne contenant des oospores, collectées à l'automne 2022, broyées et homogénéisées, ont été réparties équitablement dans 30 sachets de toile à bluter (mailles de 11 µm, suffisamment fine pour assurer le maintien du matériel test) et placés dans le tas de compost. Ces sachets ont été enfouis, en mars 2023, à différentes profondeurs pour tenir compte de la stratification verticale de la température. Douze échantillons y ont été maintenus pendant 3 mois de mars à mai et douze autres durant 4 mois jusqu'à juin (4 répétitions par modalité : durée x profondeur). Des relevés thermiques ont été effectués en différents points sur les 3 niveaux du compost toutes les 1 à 2 semaines (Figure 8). Six sachets de broyat de feuilles issus du même lot ont été placés en conditions naturelles au sol à proximité du tas de compost, en tant que témoins (4 répétitions par durée). Le compost a atteint 60 °C en moyenne à son lancement et s'est maintenu au-dessus de 50 °C pendant deux mois. Les températures ont ensuite diminué, oscillant entre 37 °C et 54 °C selon la zone, jusqu'à la sortie des premiers échantillons mi-mai. Au cœur du compost, la température n'est jamais descendue sous les 50 °C. Les températures atteintes sont cohérentes avec les températures attendues dans un compost pour donner lieu à son hygiénisation naturelle.

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

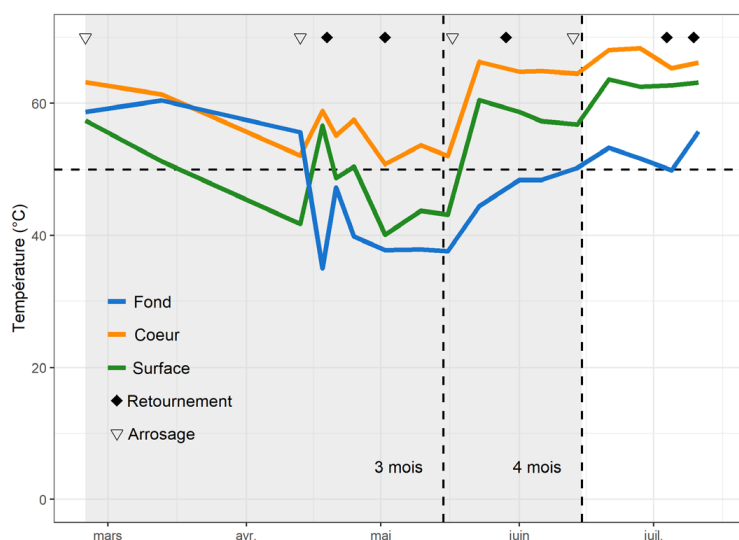


Figure 8 : Évolution de la température moyenne de différentes couches du compost : au niveau du sol – fond (bleu), au coeur (orange) et en surface (vert) du tas, de sa mise en place en février 2023 à juillet 2023. La période grisée correspond à la période de présence des échantillons dans le tas de compost. Les évènements de retournement et d'arrosage du tas de compost sont indiqués respectivement par les losanges noirs et les triangles blancs. Les lignes pointillées verticales indiquent les dates de sortie des lots. La ligne pointillée horizontale correspond à 50 °C, la température minimale testée en conditions contrôlées (étuve).

La capacité germinative des oospores présentes dans les échantillons compostés et témoins a été évaluée à l'aide du test biologique décrit ci-dessus. Aucune infection n'a été observée sur les disques pièges mis en contact avec les oospores placées dans le compost ($n = 960$), quelles que soient la durée et la profondeur d'enfouissement (Figure 9). A contrario, pour les sachets d'inoculum témoins, $11,5 \pm 3,98$ % (écart-type) et $2,84 \pm 1,48$ % (écart-type) des disques pièges respectivement en mai ($n = 160$) et juin ($n = 160$) ont été infectés (taux de germination des oospores connu pour décliner après un pic en avril). La sporulation des témoins est en revanche plus faible que l'année précédente en raison d'un inoculum initial différent, la pression mildiou étant plus faible en 2022 qu'en 2021.



Figure 9 : Pourcentage de disques pièges infectés comme indicateur de la viabilité des oospores contenues dans des échantillons de feuilles de vigne hivernés en conditions naturelles (témoins ; $n = 4$) ou placés 3 ou 4 mois dans un compost à trois profondeurs : au fond du tas ($n = 4$), au coeur du tas ($n = 4$) ou en surface du tas de compost ($n = 4$).

Les oospores de *P.viticola* contenues dans les feuilles de vigne semblent ainsi perdre de leur capacité germinative après un passage de 3 ou 4 mois au sein d'un compost se maintenant à des températures comprises entre 40 et 70 °C.

Conclusion : Nos essais ont montré une inhibition de la germination des oospores de *Plasmopara viticola* après un passage à température élevée, aussi bien en conditions contrôlées qu'en conditions réelles de compostage. Le compostage des feuilles de vigne extraites des parcelles à l'automne semble

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

ainsi être efficace pour limiter le pouvoir infectieux de l'inoculum primaire du mildiou de la vigne et d'envisager une restitution de la matière organique assainie au vignoble. Bien que l'étude se focalise sur le paramètre « température », la composition, les propriétés intrinsèques et la gestion du compost sont des points indispensables, pour maîtriser la réussite de ce procédé de lutte contre les formes de conservation hivernale du mildiou de la vigne. Le dispositif de compostage des feuilles de vignes, fondé sur la réduction de l'inoculum primaire de *P. viticola* pourrait s'inscrire dans une démarche globale de gestion préventive des épidémies de mildiou.

Action 2. Impacts de la mesure préventive, preuves de concept

Tâche 2.1. Impacts sur la dynamique du stock d'inoculum primaire parcellaire

Un protocole mobilisant les outils de la biologie moléculaire basée sur la technologie de la ddPCR a été développé et validé. La mesure est réalisée à partir d'un échantillon de sol de 2g. Cette quantité de sol, relativement élevée par rapport aux kits d'extraction classiques, permet d'améliorer la limite de détection. Nous sommes maintenant en mesure de détecter l'ADN de *Plasmopara viticola* dans des échantillons de sol, de le quantifier, et de transformer les quantités d'ADN retrouvées en nombre d'oospores par gramme de sol.

L'analyse d'échantillons de sol enrichis avec des concentrations connues d'oospores a révélé que notre méthode peut détecter l'ADN des oospores de *P. viticola* à très faible concentration (c'est-à-dire 1 oospore dans 2 g de sol) et constitue un outil adéquat et répétable pour la quantification relative de l'ADN des oospores de *P. viticola* dans le sol de vignoble. Cependant, la méthode présente certaines limites pour la quantification absolue, notamment en raison d'une efficacité variable (et parfois faible) et d'un biais de sous-estimation. Ces limitations reflètent l'accumulation d'erreurs liées à la représentativité de l'échantillonnage après homogénéisation du sol, aux erreurs techniques lors de la préparation des échantillons, à l'extraction d'ADN (par ex., pipetage irrégulier) ou à l'essai ddPCR. Des améliorations méthodologiques, telle que l'automatisation, pourraient contribuer à les réduire.

Un inconvénient potentiel de l'utilisation d'une séquence d'ADN multicopie comme amorce réside dans la variabilité possible du nombre de copies de la séquence selon les génotypes. Dans notre étude, nous avons constaté que le nombre de copies ITS1/5,8S dans le génome diploïde de *P. viticola* variait de 175 à 281 copies selon la souche (n = 7), ce qui faisait varier les estimations de concentration de l'inoculum primaire de 232 à 372 oospores par gramme de sol en moyenne. La plage de nombre de copies ITS observée dans notre étude se situe dans celle estimée pour l'oomycète *Aphanomyces euteiches*, mais elle est plus restreinte (ce qui signifie qu'elle est possiblement sous-estimée), probablement parce qu'elle a été estimée à partir d'un plus petit nombre de souches (Gangneux et al, 2014 ; Gibert et al, 2021). D'autres analyses devraient être entreprises afin de mieux évaluer la répartition de ITS1/5,8S au niveau de la population de *P. viticola*.

Enfin, *P. viticola* peut persister sous différentes formes dans les sols de vignoble, y compris sous forme d'oospores et de structures non viables, telles que des cellules mycéliennes mortes issues des feuilles tombées, ainsi que des sporanges ou zoospores qui se déposent au sol sans rencontrer d'hôte. Par conséquent, les méthodes basées sur l'ADN utilisées pour quantifier le réservoir d'inoculum du mildiou dans les sols de vignoble doivent être interprétées avec prudence car l'ADN extracellulaire pourrait être amplifié, ce qui conduirait à une surestimation de l'inoculum viable. Dans notre étude, l'échantillonnage du sol a été délibérément réalisé bien après la fin de la saison de croissance (mi-mars) afin de maximiser la dégradation de l'ADN extracellulaire et de limiter ce biais.

Pour mieux évaluer et réduire le risque de surestimation de l'inoculum viable, des méthodes empêchant l'amplification de l'ADN extracellulaire devraient être envisagées, telles que le traitement des échantillons avec du propidium monoazide avant l'extraction de l'ADN et/ou l'utilisation de qPCR avec transcriptase inverse (voir par ex. Wang, 2023). De telles approches ont déjà démontré leur efficacité pour améliorer l'évaluation quantitative basée sur l'ADN de pathogènes végétaux viables ou de contaminants de produits végétaux (Al Daoud et al, 2017 ; Crespo et al, 2013).

Tâche 2.2. Impacts sur les dynamiques épidémiques

L'objectif de cette tâche est d'évaluer l'impact de la mesure préventive sur les dynamiques épidémiques. Dans ce but, l'UMR SAVE a développé un biotest pour évaluer le niveau d'infectiosité des sols viticoles et mis en œuvre une expérimentation dans des conditions semi contrôlées en 2022 et 2023.

– Test biologique pour l'évaluation du potentiel infectieux du sol

Le principe du test biologique consiste à placer des échantillons de sol dans des conditions optimales de température et d'humidité favorables à la germination des oospores, à piéger les zoospores libérées à l'aide de disques foliaires de vigne sensibles, puis à estimer le potentiel infectieux du sol en évaluant le pourcentage de disques foliaires touchés et le pourcentage de la surface des disques atteint par le mildiou. La méthode décrite ci-dessous est adaptée de travaux antérieurs (Hill, 1998 ; Rossi et al, 2028).

Le bio essai a été réalisé sur un huitième des 318 échantillons de sol collectés ($n = 40$) pour évaluer l'abondance et la distribution spatiale de l'inoculum primaire de Mildiou à l'échelle d'une parcelle (tâche 2.1).

La relation entre l'abondance de l'inoculum primaire dans le sol (estimée par ddPCR) et le potentiel infectieux du sol a été évaluée en ajustant, pour chacun des indicateurs, un modèle linéaire généralisé (variable réponse suivant une loi de Poisson dans les deux cas), avec le nombre de copies ITS de *P. viticola* par μL comme variable explicative. Les paramètres des modèles ont été estimés par maximum de vraisemblance et la significativité des coefficients de régression ($\alpha = 0,05$) a été testée à l'aide de tests z. Le coefficient de détermination (R^2) des deux modèles a été calculé afin d'identifier l'indicateur le mieux ajusté aux données d'inoculum primaire.

Le nombre cumulé de disques foliaires infectés par *Plasmopara viticola* à partir de 1 g de sol, sur l'ensemble de la durée du bioessai, variait de 0 à 12 disques (sur 40). La proportion moyenne de surface des disques couverte par la sporulation de *P. viticola* variait de 0 % à 10,3 %. Le nombre cumulé de disques infectés augmentait significativement avec le nombre de copies ITS par μL (Figure 10 ; $\beta = 0,029 \pm 0,008$; $P < 0,0001$). De même, la surface moyenne infectée augmentait significativement avec le nombre de copies ITS par μL (Fig. 4 ; $\beta = 0,058 \pm 0,010$; $P < 0,0001$). Les coefficients de détermination étaient faibles dans les deux cas, bien que légèrement plus élevés pour la surface moyenne infectée que pour le nombre cumulé de disques infectés ($R^2 = 0,33$ et $0,19$, respectivement).

Des relations positives entre l'abondance de l'inoculum et la sévérité de la maladie ont été mises en évidence pour des pathogènes telluriques affectant les racines (Moussart et al, 2009), mais la relation entre densité d'inoculum et sévérité de la maladie a rarement été étudiée pour des voies d'infection allant du sol vers les parties aériennes des plantes, comme dans le cas des contaminations primaires du mildiou. Une seule étude récente a montré que le risque d'infections primaires des feuilles de vigne par *Plasmopara viticola* augmentait avec la concentration d'oospores dans la litière foliaire déposée au pied des ceps (Fedele et al, 2025), mais les conditions expérimentales n'étaient pas particulièrement représentatives de la quantité de réservoir d'inoculum primaire présente « naturellement » dans les vignobles (importante accumulation artificielle de feuilles infectées au pied des ceps).

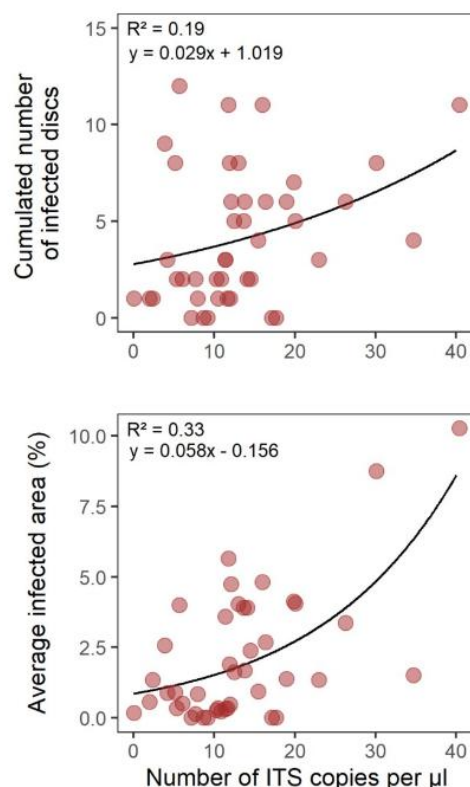


Figure 10 : Relations entre l'abondance de l'inoculum primaire du mildiou dans le sol (mesurée comme le nombre de copies ITS par μL par ddPCR) et le potentiel infectieux du sol évalué par un bioessai, exprimé soit par le nombre cumulé de disques infectés (panneau supérieur), soit par la surface moyenne infectée des disques pièges (panneau inférieur).

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

Nos résultats soutiennent l'idée que la concentration d'oospores de *P. viticola* dans le sol est liée au potentiel infectieux du sol (tel qu'estimé en conditions contrôlées à l'aide d'un bio essai sur disques foliaires). En particulier, nous avons montré que la proportion de disques foliaires infectés lors du bio essai augmentait significativement avec l'abondance de l'inoculum primaire dans le sol (estimée par ddPCR). Toutefois, cette relation restait modérée ($R^2 = 0,33$), probablement en raison des limites de l'estimation du réservoir d'inoculum primaire par des approches basées sur l'ADN, discutées précédemment dans la tâche 2.1.

De plus, la germination des oospores au sein d'une population s'étale sur plusieurs mois (Maddalena et al, 2021) ; notre biotest, réalisé à une seule date, n'a donc probablement capturé qu'une fraction de la population totale d'oospores présente dans les échantillons. Au-delà de ces limites techniques, d'autres facteurs influençant la germination des oospores, encore peu documentés, pourraient contribuer à affaiblir la relation observée. D'une part, les oospores peuvent survivre et germer pendant au moins cinq ans, ce qui implique la coexistence d'oospores d'âges différents dans un sol de vignoble à un instant donné (Caffi et al, 2011). L'effet du vieillissement sur la capacité de germination des oospores reste mal décrit, mais il est probable que le résultat du bio essai dépende de la pyramide d'âge des oospores présentes dans l'échantillon. D'autre part, les conditions automnales et hivernales peuvent affecter le taux et la dynamique de germination des oospores (Jermini et al, 2003 ; Rouzet et al, 2003) ; ainsi, l'hétérogénéité spatiale de ces conditions, y compris à l'échelle intra-parcellaire, peut entraîner une variabilité du résultat du bio essai entre des échantillons présentant des quantités similaires d'oospores ou d'ADN de *P. viticola*.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que, bien que le potentiel infectieux soit indéniablement lié à la quantité d'inoculum primaire — laquelle peut être estimée par des approches moléculaires — les indicateurs issus du bio essai de germination doivent être complétés par des données contextuelles afin de permettre une interprétation épidémiologique pertinente.

– Relation entre la quantité d'inoculum primaire dans les sols et l'initiation de l'épidémie dans des mésocosmes (conditions semi-contrôlées)

Une expérimentation dans des conditions semi-contrôlées a été mise en œuvre au printemps 2022 afin d'évaluer l'effet de la quantité d'inoculum primaire au sol sur les initiations épidémiques. Des plants de Cabernet Sauvignon greffés-soudés (plantes pièges ou phytomètres) ont été placés dans des quadrats présentant différents niveaux d'inoculum primaire (sol témoin sans inoculum, et sols enrichis à des niveaux d'inoculum faible, moyen et fort). Ce dispositif a été soumis aux précipitations naturelles pour induire la contamination des plantes pièges par éclaboussement depuis le sol. Un système d'arrosage complémentaire, simulant les précipitations, a été mis en place pour pallier un éventuel manque de pluie. Après chaque période d'exposition d'une semaine, les plants étaient placés en chambre d'incubation et régulièrement contrôlés pour quantifier les contaminations primaires de mildiou. Au total, six séries de plants ont été exposées successivement entre mi-avril et mi-juin 2022.

La pluviométrie enregistrée ce printemps 2022 sur le site INRAE de Villenave d'Ornon n'a pas été favorable aux contaminations primaires (précipitations faibles et rares). Par ailleurs, le système d'arrosage complémentaire mis en place n'a pas permis d'engendrer des contaminations suffisantes. Néanmoins, les dernières séries de plants installées sur le dispositif semblent avoir profité de pluies favorables aux contaminations, et les données indiquent une relation positive entre quantité d'inoculum primaire et quantité de contaminations primaires. Ce résultat confirme l'hypothèse qu'une réduction de l'inoculum primaire du sol peut permettre de réduire la pression épidémique ; il renforce l'intérêt de nos recherches. Une expérimentation similaire a été menée en 2023. Les résultats obtenus étaient incohérents avec ceux de 2022. Cette saison-là, la pression mildiou a été particulièrement forte et les plantes pièges ont probablement été contaminé par de l'inoculum secondaire provenant du vignoble alentour. Les données n'ont pas été exploitées.

Tâche 2.3. Impacts sur le fonctionnement de la plante et effets induits sur la qualité de récolte

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGRAMIQUES DE LA VIGNE

Le retrait des feuilles de la parcelle de vigne, à l'automne, est une mesure envisagée afin de faire baisser la pression épidémique en diminuant la quantité d'inoculum primaire hivernant au sol. Du point de vue physiologique, la période végétative automnale, entre la récolte et la chute des feuilles, est une période très importante durant laquelle la vigne reconstitue ses réserves azotées et carbonées qui seront stockées dans les parties pérennes (rameaux, tronc, racines). Ces réserves fournissent du carbone et de l'azote pour la croissance des rameaux, des feuilles et des inflorescences au printemps suivant. Les données bibliographiques montrent qu'une défoliation faite annuellement à la récolte ne semble pas une option durable pour assurer la pérennité de la vigne et le soutien de son rendement. Afin de concilier retrait des feuilles de la parcelle (baisse d'inoculum primaire) et pérennité de la vigne, quatre modalités de défoliations annuelles ont été testées : défoliation à la récolte, 1 mois après la récolte et 2 mois après. Une quatrième modalité consiste à ne pas appliquer la défoliation toujours à la même date, mais à assurer une rotation dans les dates, de sorte qu'une défoliation à la récolte en année n soit suivie d'une défoliation en post-récolte +1 ou 2 mois afin de laisser la plante reconstituer ses réserves en année $n+1$. Le dispositif a été installé sur une parcelle de merlot de l'Unité expérimentale Vigne Bordeaux en 2021 (44°47'22.96"N, 0°34'41.87"O). Cette parcelle a été choisie en termes de cépage (le merlot est le cépage le plus planté en Gironde (et en France) ; clone 343, porte-greffe : 101-14 MGt), du point de vue de son âge (plantée en 2010 ; vigne âgée de 11 ans, bien installée), et sur une zone de sol homogène (sol de graves sablo-argileux typique de l'AOC Pessac-Léognan). Voici la liste des modalités testées :

- ND : Non défolié (fait office de témoin)
- DR : Défoliation à la récolte
- R30 : Défoliation 1 mois après la récolte
- R60 : Défoliation 2 mois après la récolte
- DM : Défoliation « mixte », faite une année N à la récolte, puis à 1 mois à $N+1$, puis à 2 mois à $N+2$, puis de nouveau à la récolte à $N+3$.

Description et plan du dispositif : Le dispositif a été construit en 4 blocs avec 5 modalités de conduite du feuillage, 1 Témoin non défolié et 4 modalités de défoliation. Chaque placette est composée de 5 ceps. Les 4 blocs sont représentés par 4 rangs. Chaque rang comprend les 5 modalités. Chaque rang est séparé de l'autre par 4 rangs. Les modalités ont été réparties de façon aléatoire au sein des blocs. La vérification d'absence d'effet sol a été faite à partir des données de résistivité du sol (données Geocarta 2006). Les données Geocarta sont livrées pour 3 profondeurs de sol : 0 – 50 cm, 0 -1 m et 0 – 2 m. Le test de Tukey montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les modalités, et pour les 3 profondeurs de sol ($p > 0.05$)

Défoliation : les défoliations ont été pratiquées à partir du mois de septembre, calées sur la date de récolte optimale de chaque millésime, à laquelle on ajoute 1 ou 2 mois selon la modalité. La modalité mixte (DM) a suivi les défoliations décrites dans le protocole expérimental. L'objectif de cette modalité était de permettre de recharger éventuellement en réserves C et N les différents tissus des ceps de vigne. Certes une défoliation faite à 60 jours post-récolte risque de voir tomber des feuilles au sol et donc de recharger l'inoculum du sol, mais cela ne correspondrait qu'à 1 année sur 3. Et cela permet de tester les hypothèses « impacts de la défoliation sur les composantes du rendement et la durabilité de la vigne ».

Tableau 1 : Liste des modalités équivalentes pour lors de la défoliation de la modalité mixte.

Année	Modalité équivalente pour DM
2020	DM = DR
2021	DM = R30
2022	DM = R60
2023	DM = DR
2024	DM = R30

Résultats :

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGRAMIQUES DE LA VIGNE

– Biomasse produite en termes de bois de taille.

Il n'y a pas de différences significatives entre les modalités pour les 4 millésimes étudiés. Les conditions climatiques ont été assez contrastées entre les années conduisant à des conditions de croissance différentes et à des conditions phytosanitaires compliquées. Sur 2024, cette parcelle a connu une très forte attaque de mildiou (y compris fortement sur rameaux, ce qui est rare) qui a fortement altéré les capacités de photosynthèse de l'ensemble des modalités entraînant 42,6% de production en moins par rapport à 2021, et même de 49,7% par rapport à 2020. L'année 2022 avait été une année qui a connu des conditions chaudes et sèches dès le mois de juin, ce qui a limité la croissance. Cependant une analyse de sol a été programmée pour connaître le statut nutritionnel du sol de la parcelle, car la chute de production de biomasse ne semble pas uniquement la conséquence du mildiou (2023 et surtout 2024).

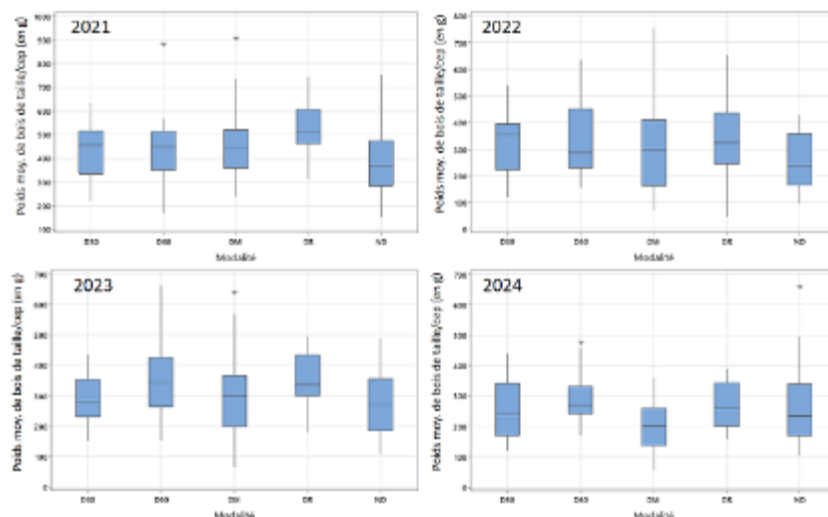


Figure 11 : Poids moyen en bois de taille pour 4 années de mesure, par modalité

– Composantes du rendement : nombre de grappes et poids des grappes.

Le poids des grappes a subi de nombreuses déconvenues au cours des 5 années de suivis. L'année 2020 (année de préprojet) a connu de nombreux dégâts d'oiseaux. Le nombre de grappes est correct, mais pas le poids de grappes, qui est assez faible. Ceci nous a obligé à installer des filets sur les rangs de vignes en post-véraison afin de protéger la récolte pour les années suivantes. L'année 2022 a connu une forte sécheresse estivale et ainsi que des températures élevées, ce qui a entraîné un faible poids de récolte. Quant à l'année 2023, une attaque intense tardive de vers de la grappe a entraîné une dégradation sanitaire rapide de la récolte faussant le poids de grappe au moment de la récolte. Enfin, l'année 2024 a connu une très forte attaque de mildiou sur grappes (et même sur rameaux) entraînant un rendement de zéro grappe, avec une présence de grappes impossible à comptabiliser en totalité.

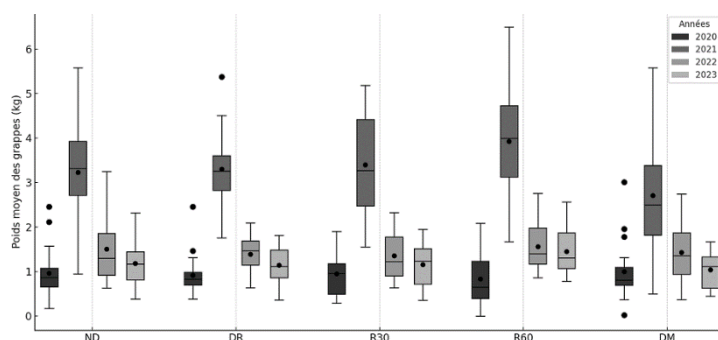


Figure 12 : Poids moyen des grappes par modalité selon 4 années

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

Il est probable que le fort poids moyen de grappes en 2021 soit à mettre sur le compte les conditions climatiques clémentes du millésime. Pour aucune des années, les modalités ne sont statistiquement différentes en termes de poids moyen de grappes (p -values > 0.05).

Le nombre de grappes est donc la seule variable fiable, entre 2020 et 2023 (2024 exclue). La Figure 13 montre par modalité le nombre moyen de grappes par bloc (moyenne de 5 ceps chacun des 4 blocs). Les résultats de l'ANOVA montrent un effet « année » très significatif ($p < 0.0001$), un effet « bloc » significatif, mais modéré ($p = 0.014$) et une absence de significativité de l'effet « modalité » ($p = 0.93$). Les résultats du test de Tukey HSD (cf. Figure 14) montrent un effet année, mais aucun effet modalité. Un faible effet apparaît entre le bloc 2 et 4 ($p \sim 0.055$), mais pas pour les autres blocs entre eux.

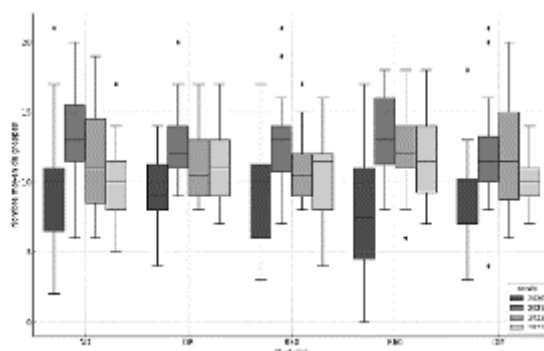


Figure 13 : Nombre moyen de grappes par cep, par modalité, pour 4 années de mesures

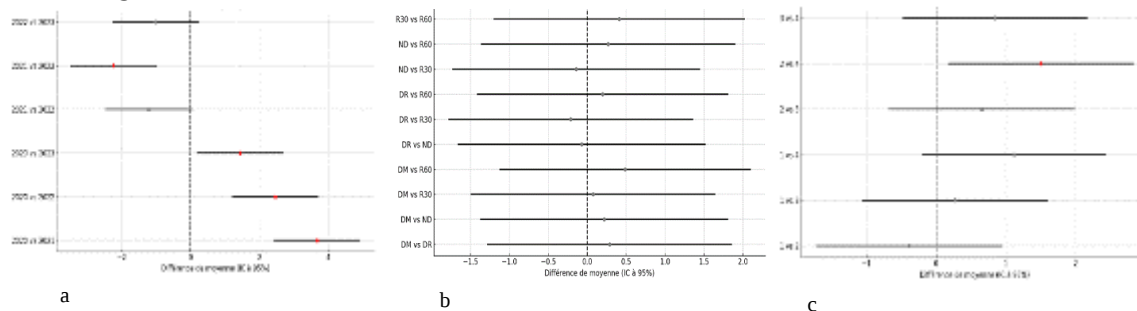


Figure 14 : Test de Tukey HSD : nombre de grappes selon a) les années, b) les modalités et c) les blocs

– Analyses des réserves N et C du bois (bois de taille pour les sarments et tronc au débourrement)

Azote total : La mesure du pourcentage d'azote total dans les sarments lors de la taille montre clairement un effet de l'effeuillage sur cette variable. L'ANOVA pour l'azote total sur les 3 années montre un effet significatif à 5 % pour le facteur « année » (p value = 0,0494), et un effet hautement significatif pour le facteur « modalité » (p value = $3,19 \times 10^{-10}$). La

Figure 15a montre que la modalité non défoliée (ND) présente le plus fort pourcentage d'azote total dans les bois, alors que la modalité défoliée à la récolte (DR) présente le pourcentage le plus bas. La modalité défoliée 2 mois après la récolte (R60) se rapproche du taux de ND, car après deux mois, une grande partie de l'azote des feuilles a pu être digérée et incorporée dans les réserves du bois, après avoir participé à l'absorption de l'azote du sol durant l'arrière-saison. La modalité mixte (DM) présente un taux intermédiaire qui correspond à une moyenne de 3 modalités successives au cours des 3 années, cf. Tableau 1). Ainsi en 2023, DM est égale à DR, ce qui se retrouve dans les valeurs mesurées (cf.

Figure 15a). Il en est de même pour 2022, où DM est égale à R60, ou en où DM=R30. Là encore les valeurs mesurées sont similaires. Ces résultats sont confortés par les données bibliographiques : la défoliation post-récolte influe sur la quantité d'azote total mesurée dans les sarments l'hiver.

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

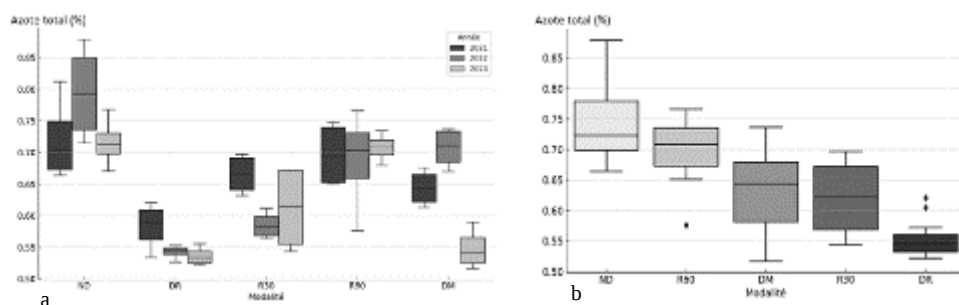


Figure 15 : Comparaison du taux d'azote total (%) dans les sarments à la taille par modalité a) par année et b) pour les 3 années (classement de la moyenne)

Réserve azotée (arginine) : L'arginine est la forme principale de stockage de l'azote chez la vigne. L'ANOVA globale sur les 3 années montre un effet global de la modalité ($p = 0.0045$). Par contre le test de Tukey HSD ne permet pas de caractériser une différence significative lors des comparaisons des modalités deux à deux. Une tendance apparaît si on accepte le seuil de 10% : ND > DR. On retrouve de la même tendance que dans le classement de l'azote total. Malgré cela la relation Arg. (mg/g MS) vs N tot (%) n'est pas constante, varie selon les années et surtout entre les modalités (cf. Figure 17). Il n'y a pas encore d'hypothèses explicatives quant à ces disparités entre modalités.

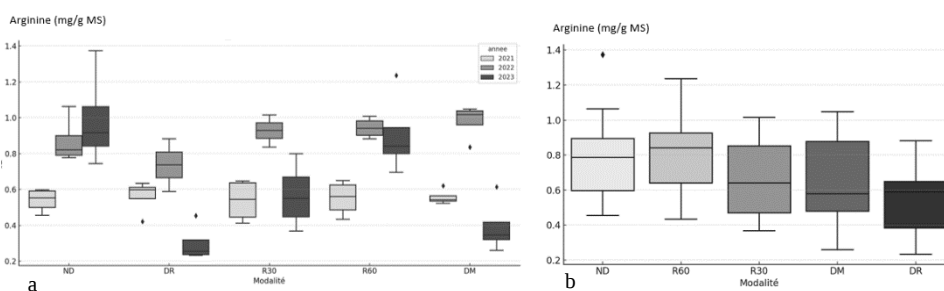


Figure 16 : Comparaison de la quantité d'arginine (mg/g MS) dans les sarments à la taille par modalité a) par année et b) pour les 3 années (classement de la moyenne)

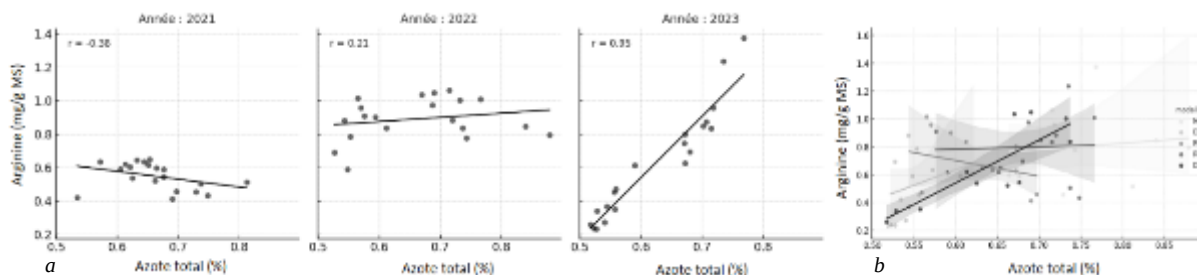


Figure 17 : Expression de la quantité d'arginine en fonction du % d'azote total, a) pour les 3 années (avec r = coefficient de corrélation), b) par modalité (moyenne des 3 années) avec zone grisée = intervalle de confiance 95%

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

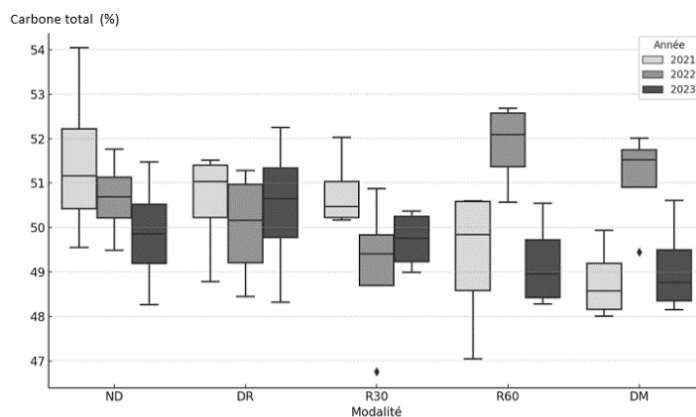


Figure 18 : Comparaison du taux de carbone total (%) dans les sarments à la taille par modalité par année

Carbone total : En termes de teneur en carbone total (%), aucune comparaison entre modalités n'est statistiquement significative pour aucune des trois années (cf. Figure 18). L'effet année n'est pas lui aussi significatif (cf. Figure 19).

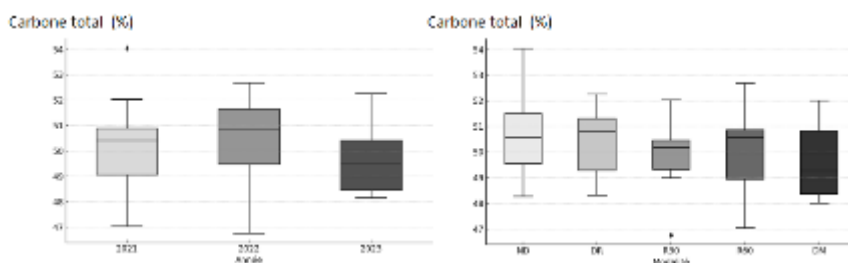


Figure 19 : Comparaison du taux moyen de carbone total (%) dans les sarments à la taille a) par année et b) par modalité pour les 3 années (classement de la moyenne).

Réserves glucidiques : Le dosage des réserves glucidiques a été fait dans les bois de taille récoltés en hiver (chaque mois de janvier, deuxième quinzaine du mois). Après broyage des bois, une extraction eau-éthanol est pratiquée pour le dosage enzymatique des sucres solubles et de l'amidon selon la méthode développée par G. Rolland (<https://hal.inrae.fr/hal-03248002>). Ont été dosés : glucose, fructose, saccharose, amidon. Mis à part entre les deux modalités très tranchées (ND et DR), il n'y a pas de différence significative systématique entre les modalités (cf. Figure 20). Les effets « modalité » varient entre années. L'effet « année » est en revanche significatif à hautement significatif selon la variable mesurée (cf. Figure 21)

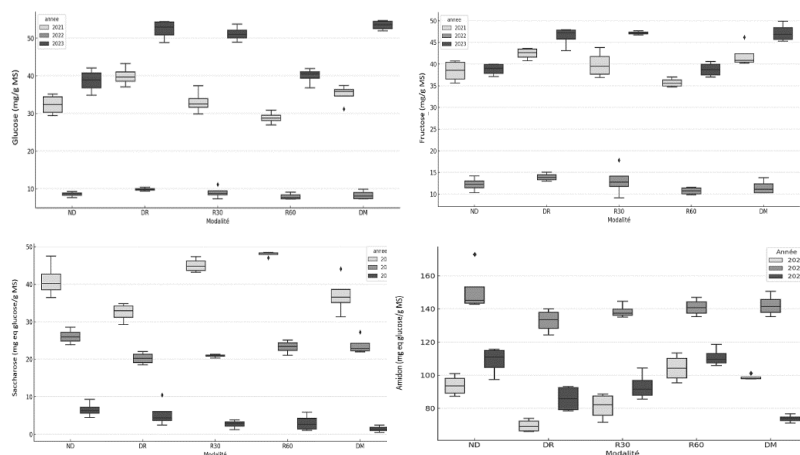


Figure 20: Dosage des sucres solubles et de l'amidon dans le bois de sarments prélevés à la taille hivernale

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

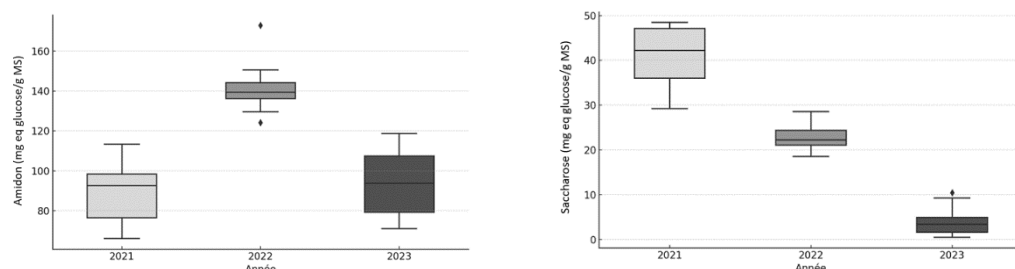
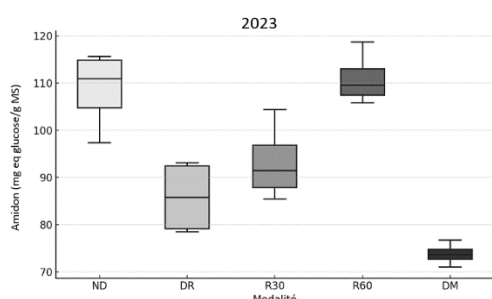


Figure 21 : Comparaison de teneur moyenne en amidon (a) et saccharose (b) toutes modalités confondues selon les années (p value = 1.6×10^{-18} pour Amidon et 0.0242 pour saccharose)

Dans le cas de 2023, l'effet est hautement significatif quand on compare deux à deux les modalités, excepté pour DR et DM (cf.

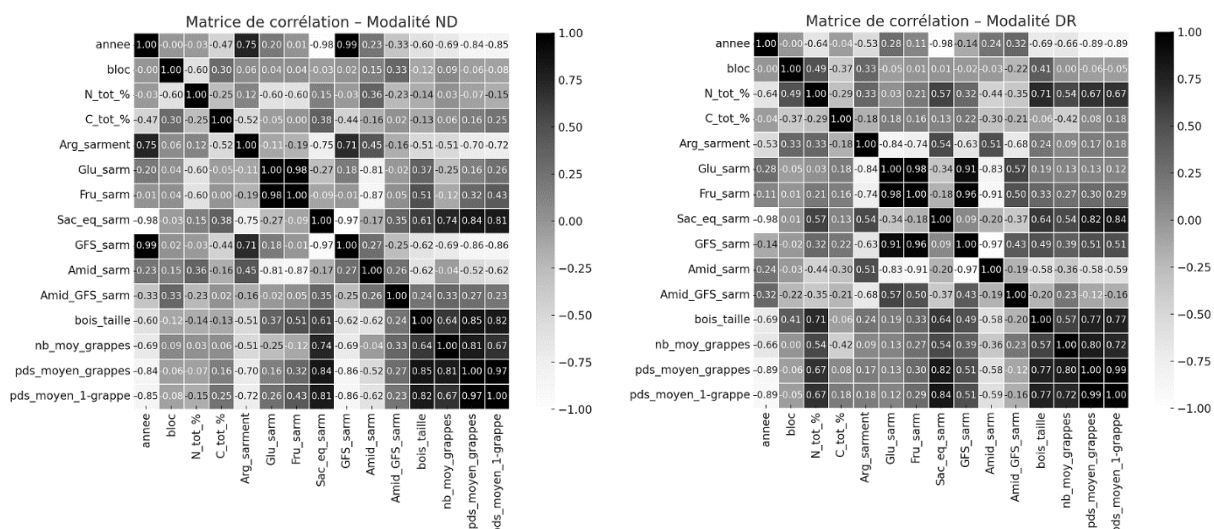
Figure 22). Mais ceci est attendu étant donné qu'en 2023, la modalité DM correspond au même traitement que DR.



Modalités comparées	P value en 2023
DM > ND	$p < 0.001$ (significatif)
DM > R30	$p = 0.0093$ (significatif)
DM > R60	$p < 0.001$ (significatif)
Modalités comparées	P value en 2023
DR vs DM	$p = 0.1538$ (non significatif)
DM > R30	$p = 0.0093$ (significatif)
DM > R60	$p < 0.001$ (significatif)
DR > ND	$p = 0.0024$ (significatif)
DR vs DM	$p = 0.1538$ (non significatif)

Figure 22 : Comparaison des teneurs en amidon selon les modalités en 2023. Valeur de la p value dans le tableau ci-dessus.

La possible cause de variation entre les modalités « intermédiaires » R30 et R60 pourrait provenir des conditions climatiques de l'arrière-saison de chaque millésime. Une arrière-saison pluvieuse et fraîche entraîne une sénescence des feuilles plus précoce (2021), alors que des conditions plus clémentes (2023) permettent un cycle plus long. Dans ce cas, les R60 ne sont pas tout à fait comparables. Malgré l'absence de comportement régulier entre les modalités (excepté pour le couple NR vs DR), il est possible d'étudier la matrice des corrélations pour l'ensemble des variables disponibles sur les 3 années. Cette matrice montre qu'il n'y a pas d'effet bloc. Ce qui était attendu, mais pas certain.



PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

Figure 23 : Matrice des corrélations pour les modalités ND et DR pour les 3 années.

La comparaison des deux matrices de corrélation ND et DR montrent de spécificités différentes, notamment pour l'azote total. Dans le cas de ND, le N total n'est pas très corrélé aux paramètres de biomasse (bois de taille) et de rendement (nombre moyen de grappes et poids moyen des grappes) alors qu'il l'est assez fortement dans le cas de DR. La privation d'azote provenant de la digestion des feuilles lors de la sénescence est un phénomène connu dans la bibliographie.

Conclusion

Il est regrettable que les conditions climatiques et sanitaires sur les quatre années d'études n'aient pas été stables et sans problème. Forte sécheresse et température élevée (2022), forte attaque de mildiou (2024) et de vers de la grappe (2023) ont perturbé l'analyse du rendement par modalité, ainsi que les relations du carbone et de l'azote, de composés de réserve.

Il reste cependant étonnant que la privation de la mise en réserve automnale à la suite de la défoliation n'ait pas impacté plus visiblement les composantes du rendement, surtout dans le cas de la modalité DR. D'après les données bibliographiques, de telles défoliations précoces touchent le rendement à partir de la deuxième ou troisième année. La plante répond pourtant assez bien quand on compare ND et DR en termes de composés de réserves, mais cela ne va pas jusqu'à altérer le rendement. Même si dans le cadre de PROFIL, il n'a pas été mis en évidence une altération du rendement dans le cadre d'une défoliation drastique, il faut rester prudent quant à la généralisation de la méthode de défoliation à la récolte. Les données des analyses chimiques (notamment en termes de dynamiques des composés de réserves entre eux) sont cependant intéressantes quand on prend modalité par modalité, bien qu'un effet sur le rendement ne soit pas mis en évidence. Elles pourront donner lieu à une publication.

Action 3. Approches globales de gestion des bioagresseurs basée sur la mesure préventive

Tâche 3.1. Intégration de la prophylaxie parcellaire dans les systèmes de culture à bas intrants

L'étude de l'impact de la prophylaxie sur l'efficacité des stratégies de lutte à bas intrants (produits de biocontrôle notamment) a démarré fin 2020 sur un dispositif expérimental préexistant conduit en micro-parcelles sur le site du Lycée agro-viticole de Libourne-Montagne. Des suivis réguliers de la phénologie et de l'état sanitaire des deux zones ont été réalisés au cours de la saison culturale, chaque année depuis le début du projet. Les défoliations ont été faites au plus proche de la chute naturelle des feuilles afin de limiter au maximum l'impact sur la mise en réserve.

En 2021, la pression mildiou a été très forte sur l'ensemble du vignoble et tout particulièrement sur la parcelle d'essai, de sorte qu'aucun résultat probant n'a pu être mis en évidence, ni en termes d'efficacité des produits de biocontrôle, ni en termes d'intérêt de la prophylaxie. La forte pression récurrente sur cette parcelle d'essai associée à la faible efficacité des produits de biocontrôles testés ont occasionné de sévères pertes de récolte. Suite à cela, la direction de l'exploitation a exprimé le souhait de stopper les essais de stratégies de biocontrôle après la saison 2021. L'essai prophylaxie a été maintenu sur la parcelle en appliquant une stratégie de protection sanitaire uniforme en conventionnel sur les zones défoliées et références. Cette évolution du dispositif nous a permis de poursuivre l'étude, sur une parcelle très sensible, de l'impact de prophylaxie sur les épidémies de mildiou.

Le millésime 2022, a été marqué par un climat particulièrement chaud et sec pour la région bordelaise peu favorable au développement des maladies fongiques et particulièrement à celui du mildiou. Sur l'aspect phénologique aucune différence n'a été observée concernant des écarts de développement entre les 2 modalités. La pression pathogène a été particulièrement faible en 2022. Aucun symptôme de mildiou n'a été observé sur l'ensemble de l'essai. Le programme de traitement mis en place par l'exploitation a parfaitement suffi à empêcher le développement de maladies fongiques.

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGRAMIQUES DE LA VIGNE

La saison 2023 a mêlé d'importantes précipitations et des températures moyennes particulièrement élevées. La période du 20/05/2023 à la véraison est demeurée dans la plage de températures optimales de développement de *P. viticola* (18°C-26°C). Ces conditions ont également favorisé la croissance de la vigne. Aucune différence phénologique n'a été constatée concernant des écarts de développement (phénologie et longueur de pousse synchrones) entre les 2 modalités. La pression pathogène a été importante mais aucune différence significative n'est visible entre la modalité PROFIL et la référence.

En 2021 et 2023, une tendance semble montrer un léger avantage à la référence en rapport avec la pression mildiou. Néanmoins, aucune explication n'est pour l'heure avancée au vu de la faible différence. En termes de phénologie, aucune différence n'a été constatée.

Le millésime 2024 a de nouveau été particulièrement arrosé mais les températures ont été plus fraîches qu'en 2023 engendrant un ralentissement phénologique. Les diverses contraintes (économiques, techniques, ressources humaines et matérielles) ont conduit à la mise en place d'une stratégie phytosanitaire plus agressive afin d'augmenter les chances de réussite de leur saison. Sur l'aspect phénologique aucune différence n'a été observée concernant des écarts de développement phénologique entre les 2 modalités. La pression pathogène a été importante mais gérée de manière optimale par l'exploitation du lycée viticole de Libourne-Montagne, de fait, aucune différence significative n'est visible entre la modalité PROFIL et la référence viticulteur. Une légère tendance favorable à la zone PROFIL est observable concernant la fréquence d'attaque sur grappes. Cette petite tendance permet pour la première fois, une mise en avant de la méthode par rapport aux saisons passées. Une étude du rendement a été réalisée et montre une tendance non significative de perte de rendement sur la surface défoliée. La poursuite de l'étude sur les prochaines années permettra d'observer si cette baisse de production se confirme ou si nous avons à faire à un biais ponctuel. Les analyses de maturité sont sensiblement les mêmes sur les 2 parties de l'expérimentation.

Les 4 années de l'essai n'ont pas mis en évidence de différence dans l'apparition, la fréquence et l'intensité des symptômes sur l'ensemble de la parcelle. Aucun écart majeur n'apparaît à la fin du projet PROFIL sur l'ensemble des paramètres étudiés et les tendances visualisées au fil du temps ne semblent pas tendre dans une direction précise. La sensibilité importante de la parcelle, les fortes pressions pathogènes rencontrées 3 années sur les 4 et la petite taille du dispositif peuvent en partie expliquer ces résultats et l'absence de tendance cohérente d'une saison à l'autre.

Depuis 2020, les résultats obtenus sont contrastés et montrent la difficulté de travailler sur des solutions avec une efficacité partielle. En effet, l'application de produits phytosanitaires reste nécessaire mais est un problème pour appréhender l'efficacité réelle de la prophylaxie, une solution pourrait être de travailler sur des itinéraires avec une utilisation très basse d'intrants et/ou d'installer des témoins non traités bâchés à l'intérieur des dispositifs expérimentaux. Pour finir, les récents progrès dans la mesure du nombre de spores dans l'air permettent d'envisager une meilleure qualification des épidémies primaires.

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGRAMIQUES DE LA VIGNE

Tableau 2 : synthèse des résultats sur la plateforme défoliée du Lycée de Libourne-Montagne_ 2021-2024

Année	Phénologie et pousse	Pression mildiou TNT		Notation BBCH 75-78 Grappes		Notation BBCH 79 Grappes		Notation BBCH 81 Grappes			Estimation de rendement	
				Référence viticulteur	PROFIL	Référence viticulteur	PROFIL	Référence viticulteur	PROFIL		Référence viticulteur	PROFIL
2021	Synchrone	100 % de destruction au 17/07	Fréquence	55,68	70,53	91,74	96,82					
			Intensité	15,49	21,39	62,61	71,88					
2022	Synchrone	60 % de destruction à véraison	Fréquence	Absence de symptôme								
			Intensité									
2023	Synchrone	98 % de destruction au 03/07	Fréquence	71	77,5	85	88	90	92			
			Intensité	6,80	8,14	29,67	29,95	29,05	36,41			
2024	Synchrone	100 % de destruction au 24/06	Fréquence					4,5	1,5	Rendement hL / ha	43,22	35,53
			Intensité					0,54	0,1	Nombre moyen de grappes / cep	10,37	9,25
										Poids moyens des grappes (g)	102,33	89,86

Tâche 3.2. Gestion de la prophylaxie à l'échelle de l'exploitation et des territoires viticoles

Cette tâche n'a pas débuté, aucun résultat obtenu compte tenu de l'absence d'une machine pour retirer les feuilles à une échelle plus large que la parcelle de vigne. Le système d'extraction des feuilles par brossage a fait l'objet d'un brevet, néanmoins il est nécessaire de travailler en 2025 sur le convoyage et le ramassage des feuilles au sol. Nous espérons une commercialisation à partir de l'automne 2026. Un travail est également à réaliser pour imaginer un modèle économique de déploiement de ces nouvelles pratiques de gestion collective des inocula.

Plusieurs projets ont été acceptés et se basent sur les résultats acquis dans le projet PROFIL pour intégrer la prophylaxie dans l'itinéraire de production des viticulteurs à l'échelle nationale :

- SAVOIR (PARSADA) : Test de stratégies intégrées de gestion préventive non chimique du mildiou et du black rot pour une viticulture économe en intrants. Ce projet va permettre de poursuivre les preuves de concept sur le retrait des organes de conservation des maladies cryptogamiques de la vigne et de tester la mise en place de l'extraction mécanique à l'échelle de l'exploitation et du territoire viticole. Le retrait du feuillage après les vendanges sera testé à l'échelle nationale dans des conditions de production diversifiées et à l'échelle de l'ilot de production.
- PROFIL BEE (DEPHY EXPE) : propose de mettre en place 4 systèmes agroécologiques à l'échelle nationale pour combiner le retrait mécanique des organes porteurs d'inoculum et l'usage prioritaire de biosolutions. Une utilisation du prototype d'extraction du feuillage est envisagée dès 2025 en partenariat avec Souslikoff sur les parcelles de Nouvelle-Aquitaine. Une évaluation multicritère de ces systèmes sera réalisée avec une analyse des coûts et de l'acceptabilité de cette méthode pour les professionnels.

PROFIL : MESURES PROPHYLACTIQUES CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES CRYPTOGRAMIQUES DE LA VIGNE

Bibliographie :

- Altieri M.A., Nicholls C.I., Montalba R., 2017. Technological Approaches to Sustainable Agriculture at a Crossroads: An Agroecological Perspective. Sustainability 9, 349.
- Al-Daoud F, Gossen BD, Robson J, McDonald MR. 2017. Propidium monoazide improves quantification of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* with qPCR. Plant Dis 101:442–447.
- Bollen, G. J., Volker, D., & Wijnen, A. P. (1989). Inactivation of soil-borne plant pathogens during small-scale composting of crop residues. Netherlands Journal of Plant Pathology, 95, 19-30. <https://doi.org/10.1007/BF01974281>
- Caffi T, Rossi V, Lusitani M. 2011. Long-term survival of *Plasmopara viticola* oospores. IOBC wprs Bulletin 67:111–114.
- Crespo-Sempere A, Estiarte N, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. 2013. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products. Int J Food Microbiol 165:214–220.
- Fedele G, Maddalena G, Furiosi M, Rossi V, Toffolatti SL, Caffi T. 2025. Relationship between the oospore dose in the leaf litter above the vineyard ground and primary infections by *Plasmopara viticola*. Front Plant Sci 16:1524959.
- Fouillet E., Delière L., Chartier N., Munier-Jolain N., Cortel S., Rapidel B., Merot A., 2022. Reducing pesticide use in vineyards. Evidence from the analysis of the French DEPHY network. European Journal of Agronomy 136.
- Gary C., Metral R., Metay A., Garcia L., Merot A., Smits N., Wery J., 2017. Towards an agroecological viticulture: advances and challenges. Proceedings of the 20th GiESCO International Meeting, November 5–10, 2017, Mendoza, Argentina, p1122–1127.
- Gangneux C, Cannesan M-A, Bressan M, Castel L, Moussart A, Vitré-Gibouin M, Driouich A, Trinsoutrot-Gattin I, Laval K. 2014. A sensitive assay for rapid detection and quantification of *Aphanomyces euteiches* in soil. Phytopathology 104:1138–1147.
- Gibert S, Edel-Hermann V, Moussa Mcolo R, Gautheron E, Michel J, Bernaud E, Gautheron N, Sol J-M, Capelle G, Galland R, Bardon-Debats A, Lambert C, Steinberg C. 2021. Risk assessment of *Aphanomyces euteiches* root rot disease: quantification of low inoculum densities in field soils using droplet digital PCR. Eur J Plant Pathol 161:503–528.
- Gomez C., Brun L., Chaffour D., De Le Vallée D. (2006). Effect of leaf litter management on scab development in an organic apple orchard, Agriculture, Ecosystems & Environment, volume 118, issues 1-4, January 2007, 249-255
- Jermini M, Gobbin D, Blaise P, Gessler C. 2003. Influence of the overwintering methods on the germination dynamic of downy mildew (*Plasmopara viticola*) oospores. IOBC wprs Bulletin 26:37–42.
- Maddalena G, Russo G, Toffolatti SL. 2021. The study of the germination dynamics of *Plasmopara viticola* oospores highlights the presence of phenotypic synchrony with the host. Front Microbiol 12:698586.
- Moussart A, Wicker E, Le Delliou B, Abelard J-M, Esnault R, Lemarchand E, Rouault F, Le Guennou F, Pilet-Nayel M-L, Baranger A, Rouxel F, Tivoli B. 2009. Spatial distribution of *Aphanomyces euteiches* inoculum in a naturally infested pea field. Eur J Plant Pathol 123:153–158
- Hill, G.K. (1998). Studies on the germination of *Plasmopara viticola* oospores with a floating disc test. Integrated Control in Viticulture. Vol. 21 (2) IOBC OILB.
- Hoitink, H. A., & Fahy, P. C. (1986). Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. Annual review of Phytopathology, 24(1), 93-114. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.000521>
- Pandit M.A., Kumar J., Gulati S., Bhandari N., Mehta P., Katyal R., Rawat C.D., Mishra V., Kaur J., 2022. Major Biological Control Strategies for Plant Pathogens. Pathogens 11, 273. DOI: 10.3390/pathogens11020273
- Poeydebat C., Courchinoux E., Demeaux I., Rodriguez M., Chataigner A., Lelièvre, Goutouly J.-P., Rossi J.-P., Raynal M., Delière M., Delmotte F, 2024. Quantitative assessment and spatial distribution of *Plasmopara viticola* oospores in vineyard
- Rossi V, Caffi T, Bugiani R, Spanna F, Valle DD. 2008. Estimating the germination dynamics of *Plasmopara viticola* oospores using hydro-thermal time. Plant Pathol 57:216–226.
- Rouzet J, Jacquin D. 2003. Development of overwintering oospores of *Plasmopara viticola* and severity of primary foci in relation to climate*. EPPO Bulletin 33:437–442
- Wang D, Liu E, Liu H, Jin X, Niu C, Gao Y, Su X. 2023. A droplet digital PCR assay for detection and quantification of *Verticillium nonalfalfae* and *Valbona atrum*. Front Cell Infect Microbiol 12:1110684.

Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier PDF de préférence). Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.

Annexe : partie confidentielle

Vous pouvez insérer ici toute information ou résultat qui revêt une part de confidentialité.

Merci de préciser le degré de confidentialité de ces données.

Nous vous recommandons de préciser dans la partie non-confidentielle, l'existence de ces données confidentielle et d'expliquer la raison de leur confidentialité.

Cette partie sera diffusée aux évaluateurs mais ne sera pas diffusée en dehors d'eux.

Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier PDF de préférence). Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.

Rien à signaler

Annexe : textes des publications

Quantification and management of *Plasmopara viticola* primary inoculum in soil – Towards prophylactic control of grapevine downy mildew

Poeysdebat¹, C., Courchinoux¹, E., Delière¹, L., Raynal², M., and F. Delmotte¹

¹INRAE, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1065 Sante et Agroécologie du Vignoble, 33882, Villenave d'Ornon, France

²Institut français de la vigne et du vin, Pôle Nouvelle Aquitaine / UMT SEVEN, 33882, Villenave d'Ornon, France

Downy mildew (DM) caused by the oomycete *Plasmopara viticola* is one of the most devastating disease of grapevine (*Vitis vinifera*) worldwide. Its control mainly relies on intensive use of fungicides throughout the growing season, which leads to environmental pollution threatening both biodiversity and human health. Moreover, the efficacy of this fungicide-based strategy may decrease over time due to the emergence of pathogen resistant strains. There is a need to develop alternative disease management strategies to shift from a curative approach to an agroecological approach based on prevention and improved agroecosystem resistance. In France, this transition is encouraged by public institutions through policies and research funding, and a strong social incentive.

Agroecological alternatives to fungicides in wine growing generally have partial effects and must be combined to attain acceptable pathogen control levels. They include for instance the cultivation of disease-resistant varieties, the use of biocontrol products, the stimulation of plant defenses, or plant diversification of the vineyard to promote ecological pathogen control. Most of these disease management options target the plant (*e.g.* growth or defense stimulation) or the asexual reproduction phase of the pathogen life cycle, *i.e.* mycelial growth and formation of asexual spores responsible for secondary contaminations. They require cultural interventions during the grapevine growing season, when workload is already high. A complementary - rather neglected - strategy would consist in reducing pathogen primary inoculum in the vineyard to lower epidemic pressure year after year. Such prophylactic measures have been successfully developed in other crop-pathogen systems. For example, the sweeping and ploughing of apple leaf litter previously attacked by *Venturia inaequalis* in apple orchards resulted in significant reduction of apple scab primary inoculum (*i.e.* *V. inaequalis* ascospores released from pseudothecia) and severity the next year (Gomez *et al.*, 2007). To our knowledge, no equivalent disease management approach has been developed for oomycete-caused crop diseases.

Primary inoculum plays a major role in grapevine DM epidemics (Gessler *et al.*, 2011). Therefore, there is a major challenge to develop prophylactic methods based on the management of the primary inoculum of grapevine DM. In autumn, sexual reproduction occurs in infected grapevine leaves between thalli of compatible mating type (*P. viticola* is heterothallic) leading to the formation of diploid oospores (Figure 1). Leaves will then fall on the ground and decompose, liberating the oospores that can survive in the soil during winter for up to 5 years. The

stock of oospores in the soil constitute the primary inoculum of DM in the spring and determine the initial epidemic pressure.

At spring when temperatures rise up ($\geq 11^{\circ}\text{C}$), the oospores of *P. viticola* present in the soil germinate and release the zoospores that cause primary DM contaminations on sprouting grapevines. This first generation of zoospores, which are biflagellated and mobile in water, reach the foliage via rain splashes and then encyst on the leaf surface before entering the leaves through stomata. Germination assays have shown that primary contaminations can occur throughout the entire growing season (Maddalena *et al.*, 2021), highlighting the importance of the primary inoculum in DM epidemics. Few days after infection and mycelial growth inside the leaves, sporangiophores form on the abaxial face. Zoospores released from the sporangiophores will disseminate and cause secondary contaminations. This asexual reproduction phase repeats many times during the growing season, depending on how favorable climatic conditions are.

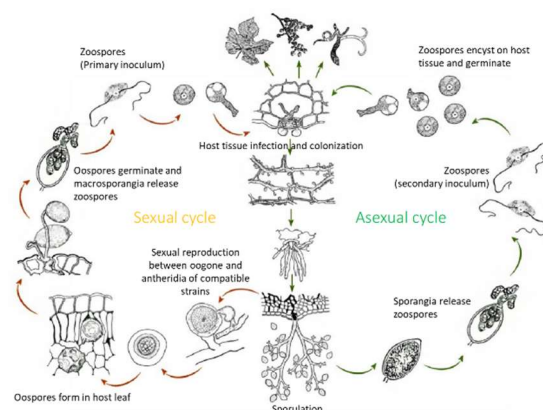


Figure 1. Life cycle of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew.

Managing primary inoculum of grapevine DM requires developing tools to detect and quantify oospores in the soil. Canadian researchers have recently developed such molecular tools for the quantification of another plant pathogen oomycete in soil samples (*Peronospora destructor* causing onion DM) oospores in soil samples (Van der Heyden *et al.*, 2020). However, to our knowledge, this has never been done for *P. viticola*.

Here, we present a method to detect and quantify the primary inoculum of *P. viticola* in vineyard soils. Our objectives are i) to provide a quantitative assessment of

grapevine DM primary inoculum in the field, and ii) to characterize its spatial heterogeneity at field scale. We also aim at describing the relationship between the amount of primary inoculum in the soil and epidemic initiations, in order to determine whether inoculum reduction (through prophylactic measures) could lead to reduced epidemic initiations. Our goal is to bring new insights on *P. viticola* primary inoculum to open new perspectives for the prophylactic management of grapevine DM.

Molecular detection and quantification of *P. viticola* oospores in inoculated soil samples.

To validate the DNA extraction protocol and establish a standard curve for the quantification of *P. viticola* oospore concentration in environmental soil samples, we inoculated 250mg-soil samples with a suspension of mature oospores at different concentrations: 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 and 10^5 oospores per gram of dry soil. We prepared three replicates of each oospore concentration. Oospores used for inoculation were derived from crosses between *P. viticola* strains of compatible mating types produced in controlled conditions on Cabernet Sauvignon leaf discs. At the time of the experiment, oospores were mature and had artificially overwintered for 8 months at 5°C in saturated humidity conditions.

Total DNA was extracted from soil samples using the DNEasy PowerSoil Pro kit (QIAGEN). Each replicate was amplified three times in separate wells. The reaction mixes contained LAMP specific primers targeting the ITS2 sequence of *P. viticola* (Kong *et al.*, 2016), MasterMix ISO-004, PCR-grade water, and DNA extraction for a final volume of 25µl (Douillet *et al.*, submitted). In negative control, DNA template was replaced by PCR-grade water. Reaction was conducted at 65°C for 45 minutes using Genie® HT thermocycler (OptiGene Limited). The reaction time (Rt in minutes) was defined as the point on the amplification curve at which the linear phase of matrix amplification was effective (point of inflection of the fluorescent sigmoid with respect to time).

Quantification of soil primary inoculum in a vineyard.

In the spring, we collected samples of sandy gravel soil from an experimental organic vineyard in Villenave d'Ornon (SW France, 44°47'32.15"N, 0°34'36.92"O). This plot was planted in 2011 on a 0,2 ha area (70 x 32 m) and consisted of 18 rows of 68 Merlot vine stocks managed according to the French organic farming standards. Half of the inter-rows were untilled and covered with spontaneous vegetation and half were tilled and sowed with a mix of plant species used for green manuring. In 2009, soil resistivity was measured in the plot using a geolocated electronic probe system according to a 2 m²-grid.

We collected 117 soil samples in the rows and 117 soil samples in the inter-rows according to a regular grid pattern that covered the whole field (*i.e.* one sampling point every 5 vine stocks along the row, one row out of two). At each sampling point, we collected 250g of soil from the top 10 cm. Each sample was homogenized, passed through a 4 mm sieve and air dried at room

temperature for 24 to 48h. We assessed oospore concentration in each sample using the molecular approach described above.



Figure 2. Experimental vineyard in Villenave d'Ornon (SW France) and a map of the regular grid pattern used for soil sampling.

From this data, we describe the range of oospore concentration encountered in the field and characterized its spatial variability. We further used linear models to evaluate whether variability in DM primary inoculum could be explained by the row vs the inter-row position, by the type of inter-row (tilled or untilled) or by soil resistivity.

Relationship between the amount of primary inoculum and epidemic initiations.

To assess the effect of primary inoculum concentration on DM epidemic initiations, we conducted a study consisting of grapevine phytometers exposed to varying quantity of primary inoculum. Briefly, we prepared four 100 x 100 x 5cm sandy gravel soil mesocosms with contrasted amount of primary inoculum (*i.e.* none, low, intermediate and high). Primary inoculum (oospores) was incorporated to the soil in the form of grapevine leaves with DM mosaic symptoms (collected in October 2021 and overwintered in natural conditions) that were roughly grounded. Assuming that oospore abundance in the leaves was proportional to leaf biomass, we generated low, intermediary and high primary inoculum levels by incorporating low, intermediate and high leaf biomass, respectively. The four mesocosms were installed outside on a previously weeded location

Every 10 days from the beginning of April to the end of May, we placed 10 rooted grafts Cabernet Sauvignon grapevine plants (*i.e.* phytometers) at the 6-leaf stage on each mesocosm. Each time, we simulated a rain event using a rotative spray boom during two days in order to allow primary contaminations of the grapevine leaves through rain splashes. We then moved the phytometers to a climatic chamber with conditions favorable to *P. viticola* development (*i.e.* 20°C and 90% relative humidity). After 5 days (enough time to observe sporulation while avoiding secondary contaminations), we carefully checked all

phytometer leaves and counted the number of *P. viticola* sporulation spot, or primary contaminations per plant.

Conclusion.

We aim at promoting new ways of controlling grapevine downy mildew that are based on prevention and better prediction of epidemic risks. This approach requires addressing cutting-edge scientific issue that have been little explored until now. For grapevine downy mildew, this translates into a better understanding of the sexual phase of the pathogen's life cycle. Indeed, a rather neglected strategy consists in reducing DM primary inoculum with the aim to lower the epidemic pressure of the following year. The two experiments described here will increase our understanding of the distribution of the primary inoculum in the vineyard and of the impact of the quantity of inoculum on the epidemics. Beyond these experiments, this research program should lead to the development of new control methods based on breaking the cycle and reducing the primary inoculum of the pathogen.

Acknowledgements

This action is led by the Ministries for an Ecological Transition, for Agriculture and Food, for Solidarity and Health and of Higher Education, Research and Innovation, with the financial support of the French Office for Biodiversity, as part of the call for research projects “Overall approaches to limit the use of phytosanitary products : coupling preventive and curative solutions within agricultural sectors from farmers to consumers”, with the fees for diffuse pollution coming from the Ecophyto II+ plan.

Literature cited

1. Maddalena G., Russo G. and Toffolatti S. 2021. The study of the germination dynamics of *Plasmopara viticola* oospores highlights the presence of phenotypic synchrony with the host. *Frontiers in Microbiology*, 12, 698586.
2. Gomez C., Brun L., Chauffour D. and De Le Vallée D. 2007. Effect of leaf litter management on scab development in an organic apple orchard. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 118, 249-255.
3. Gessler C., Pertot I. and Perazzolli M. 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia mediterranea*, 50, 3-44.
4. Van der Heyden H., Bilodeau G.-J., Carisse O. and Charron J.-B. 2020. Monitoring of *Peronospora destructor* primary and secondary inoculum by real-time qPCR. *Plant Disease*, 104, 3183-3191.
5. Kong X., Qin W., Huang X., Kong F., Schoen C.D., Feng J., Wang Z. and Zhang H. 2016. Development and application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Plasmopara viticola*. *Scientific Reports* 6, 28935.
6. Douillet A., Laurent B., Beslay J., Harte I., Massot M., Delmotte F. and Raynal M. submitted. LAMP assay allows in-field quantitative assessment of *Plasmopara viticola* airborne inoculum. *Journal of Applied Microbiology*.



Le compostage des feuilles de vignes pour réduire l'inoculum primaire de *Plasmopara viticola* au vignoble ?

Eva Courchinoux¹, Pierre-Adrien Roux², Marie Rodriguez¹, Isabelle Demeaux¹, Séverine Dupin², Laurent Deliere¹, Marc Raynal³, Charlotte Poeydebat⁴

¹ INRAE, Bordeaux Sciences Agro, SAVE, ISVV, 33140, Villenave-d'Ornon, France

² Chambre d'agriculture de la Gironde - Pôle Viticulture-Cœnologie—Vinopôle Bordeaux-Aquitaine - 33295 Blanquefort Cedex France

³ IFV, UMT Seven, 33140 Villenave-d'Ornon, France

⁴ Bordeaux Sciences Agro, INRAE, SAVE, ISVV, 33140 Villenave-d'Ornon, France

La réduction de l'inoculum primaire de *Plasmopara viticola* par des mesures prophylactiques

À l'automne, la reproduction sexuée de *P. viticola* donne lieu à la formation d'oospores dans les feuilles. Une fois au sol, ces formes de conservation hivernale peuvent survivre plusieurs années et constituent l'inoculum primaire des futures épidémies. La réduction de l'inoculum primaire par exportation du feuillage hors du vignoble après la récolte (e.g., par arrachage ou ramassage au sol) est un moyen pour limiter l'accumulation d'inoculum au fil du temps et faire baisser la pression épidémique. Une des actions du projet est l'évaluation de l'effet du compostage sur la viabilité des oospores afin de pouvoir restituer une matière organique assainie au vignoble.

Effet de températures élevées sur la viabilité des oospores de *P. viticola*

Au cours du compostage, la matière organique est décomposée par divers processus physico-chimiques et par l'action de micro-organismes qui engendrent une augmentation de la température. Pendant cette phase dite « thermophile », la température du compost peut dépasser 70 °C. Parmi les réactions observables dans un compost, l'effet température est le plus facile à maîtriser^{1, 2}.

Pour évaluer l'effet de températures élevées sur la capacité germinative des oospores, des feuilles de vigne (cépage Merlot) contenant des oospores ont été récoltées à l'automne 2021 et réparties (sous forme de disques de feuilles) en 15 échantillons (3 modalités et 5 répétitions). Pendant un mois, 5 des échantillons ont été placés dans une étuve humide à 50 °C et 5 autres dans les mêmes conditions, mais à 70 °C. Les 5 derniers, en tant que témoins, ont été conservés en conditions naturelles sur le sol durant la même période. Un test biologique a permis d'analyser la capacité germinative des oospores dès la sortie de l'étuve (mars), un mois (avril) et deux mois après (mai) : i) les feuilles sont placées dans des conditions de température et d'humidité optimales pour la germination des oospores (i.e., 20 °C obscurité et immersion dans l'eau) ; ii) les zoospores libérées sont piégées en utilisant des disques de feuilles de vigne sensibles (disques pièges) et iii) la viabilité des oospores est évaluée en caractérisant le degré d'infection des disques de feuilles incubés en conditions optimales de sporulation (i.e., 20 °C alternance 12 h jour/12 h nuit, 100 % d'humidité)^{3, 4}.

En moyenne, 28.6 ± 4.2 % (écart-type) des disques pièges témoins (n = 350) ont été infectés. Aucune infection n'a été observée à partir des échantillons passés à l'étuve (Figure 1, n = 700). Ces résultats semblent donc indiquer que les oospores de *P. viticola* perdent leur

Le mildiou de la vigne causé par l'oomycète *Plasmopara viticola* est l'une des maladies les plus préjudiciables au vignoble. Les enjeux actuels autour de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques incitent à évaluer des stratégies de protection incluant des étapes de prévention des risques épidémiques. Le projet PROFIL vise à étendre la période de lutte contre cet oomycète sur la période hivernale.

capacité germinative quand elles sont exposées pendant 1 mois à des températures telles que celles rencontrées durant la phase thermophile d'un compost.

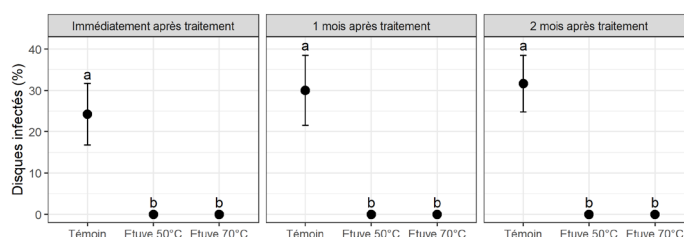


FIGURE 1. Pourcentage de disques pièges infectés utilisés comme indicateur de la capacité germinative des oospores contenues dans les échantillons de feuilles de vigne, hivernés en conditions naturelles (témoins) ou placés 1 mois dans une étuve à 50 °C ou 70 °C. Différentes lettres indiquent des différences significatives.

Effet de la température sur la viabilité des oospores en conditions réelles de compostage

Suite à ce premier résultat en conditions contrôlées, l'effet sur la capacité germinative des oospores a été évalué en conditions réelles avec un compost de 50 m³ composé majoritairement des sarments de vigne et de la tonte, retourné et arrosé mensuellement. Des feuilles de vigne contenant des oospores, collectées à l'automne 2022, broyées et homogénéisées, ont été réparties équitablement dans 30 sachets de toile à bluter (mailles de 11 µm, suffisamment fine pour assurer le maintien du matériel test) et placés dans le tas de compost. Ces sachets ont été enfouis, en mars 2023, à différentes profondeurs pour tenir compte de la stratification verticale de la température. Douze échantillons y ont été maintenus pendant 3 mois de mars à mai et douze autres durant 4 mois jusqu'à juin (4 répétitions par modalité : durée x profondeur). Des relevés thermiques ont été effectués en différents points sur les 3 niveaux du compost toutes les 1 à 2 semaines (Figure 2). Six sachets de broyat de feuilles issus du même lot ont été placés en conditions naturelles au sol à proximité du tas de compost, en tant que témoins (4 répétitions par durée). Le compost a atteint 60 °C en moyenne à son lancement et s'est maintenu au-dessus de 50 °C pendant deux mois. Les températures ont ensuite diminué, oscillant entre 37 °C et 54 °C selon la zone, jusqu'à la sortie des premiers échantillons mi-mai. Au cœur du compost, la température n'est jamais descendue sous les 50 °C. Les températures atteintes sont cohérentes avec les températures attendues dans un compost pour donner lieu à son hygiénisation naturelle².

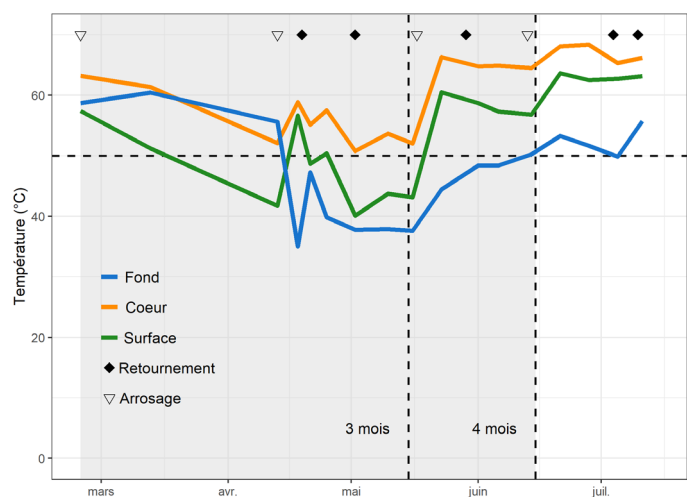


FIGURE 2. Évolution de la température moyenne de différentes couches du compost : au niveau du sol – fond (bleu), au cœur (orange) et en surface (vert) du tas, de sa mise en place en février 2023 à juillet 2023. La période grisée correspond à la période de présence des échantillons dans le tas de compost. Les événements de retournement et d'arrosage du tas de compost sont indiqués respectivement par les losanges noirs et les triangles blancs. Les lignes pointillées verticales indiquent les dates de sortie des lots. La ligne pointillée horizontale correspond à 50 °C, la température minimale testée en conditions contrôlées (étude).

La capacité germinative des oospores présentes dans les échantillons compostés et témoins a été évaluée à l'aide du test biologique décrit ci-dessus.

Aucune infection n'a été observée sur les disques pièges mis en contact avec les oospores placées dans le compost ($n = 960$), quelles que soient la durée et la profondeur d'enfouissement (Figure 3). *A contrario*, pour les sachets d'inoculum témoins, $11.5 \pm 3.98 \%$ (écart-type) et $2.84 \pm 1.48 \%$ (écart-type) des disques pièges respectivement en mai ($n = 160$) et juin ($n = 160$) ont été infectés (taux de germination des oospores connu pour décliner après un pic en avril). La sporulation des témoins est en revanche plus faible que l'année précédente en raison d'un inoculum initial différent, la pression mildiou étant plus faible en 2022 qu'en 2021.

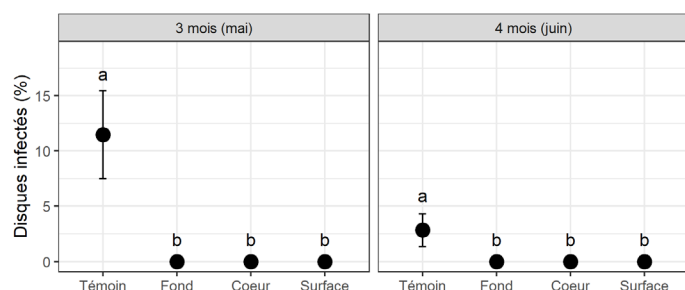


FIGURE 3. Pourcentage de disques pièges infectés comme indicateur de la viabilité des oospores contenues dans des échantillons de feuilles de vigne hivernés en conditions naturelles (témoins ; $n = 4$) ou placées 3 ou 4 mois dans un compost à trois profondeurs : au fond du tas ($n = 4$), au cœur du tas ($n = 4$) ou en surface du tas de compost ($n = 4$).

Les oospores de *P. viticola* contenues dans les feuilles de vigne semblent ainsi perdre de leur capacité germinative après un passage de 3 ou 4 mois au sein d'un compost se maintenant à des températures comprises entre 40 et 70 °C.

Une méthode prophylactique prometteuse à conforter et à intégrer dans une stratégie préventive globale

Nos essais ont montré une inhibition de la germination des oospores de *Plasmopara viticola* après un passage à températures élevées, aussi bien en conditions contrôlées qu'en conditions réelles de

compostage. Le compostage des feuilles de vigne extraites des parcelles à l'automne semble ainsi être efficace pour limiter le pouvoir infectieux de l'inoculum primaire du mildiou de la vigne et d'envisager une restitution de la matière organique assainie au vignoble. Bien que l'étude se focalise sur le paramètre « température », la composition, les propriétés intrinsèques et la gestion du compost sont des points indispensables, pour maîtriser la réussite de ce procédé de lutte contre les formes de conservation hivernale du mildiou de la vigne^{1 5 6 7}.

Le dispositif de compostage des feuilles de vignes, fondé sur la réduction de l'inoculum primaire de *P. viticola* pourrait s'inscrire dans une démarche globale de gestion préventive des épidémies de mildiou.

La mise au point d'une méthode de défoliation mécanique pour le retrait de la biomasse foliaire contaminée sur des surfaces significatives à l'automne, et des travaux sur les effets induits sur la physiologie de la vigne et la qualité de la récolte sont en cours. Une méthode de dosage de l'inoculum de mildiou dans le sol a déjà été mise au point⁴ afin d'évaluer l'assainissement progressif des sols viticoles.

Si cette pratique d'extraction-compostage permet effectivement de réduire la pression épidémique, elle pourrait limiter le recours aux fongicides de synthèse et mieux valoriser les stratégies de protection à base de produits de biocontrôle qui restent à ce jour plus difficiles à maîtriser que les fongicides classiques, tout en encourageant le compostage des sarments (plutôt que leur brûlage) et en contribuant à la fertilisation organique des vignobles. ■

Remerciements : Le projet PROFIL est financé par l'OFB en tant que lauréat de l'AAP R&I du plan Ecophyto 2+ : "Les approches globales pour limiter l'utilisation des produits phytopharmaceutiques : coupler le préventif et le curatif au sein des filières, des agriculteurs jusqu'aux consommateurs". Les auteurs tiennent à remercier les membres de la Chambre d'Agriculture de la Gironde, de l'IFV, de l'Unité Expérimentale Vigne-Vin de Bordeaux (INRAE) et de l'Agrocampus Bordeaux Gironde (lycée viticole de Libourne-Montagne) ayant concouru aux expérimentations.

¹ Bollen, G. J., Volker, D., & Wijnen, A. P. (1989). Inactivation of soil-borne plant pathogens during small-scale composting of crop residues. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95, 19-30. <https://doi.org/10.1007/BF01974281>

² Hoihtink, H. A., & Fahy, P. C. (1986). Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual review of Phytopathology*, 24(1), 93-114. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.000521>

³ Hill, G.K. (1998). Studies on the germination of *Plasmopara viticola* oospores with a floating disc test. *Integrated Control in Viticulture*. Vol. 21 (2) IOBC OILB.

⁴ Poeydebat C., Courchinoux E., Demeaux I., Rodriguez M., Chataigner A., Lelièvre, Goutouly J.-P., Rossi J.-P., Raynal M., Delière M., Delmotte F, 2024. Quantitative assessment and spatial distribution of *Plasmopara viticola* oospores in vineyard soil. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2024.07.29.605284>

⁵ Ylimäki, A., Toivainen, A., Kallio, H., & Tikanmäki, E. (1983). Survival of some plant pathogens during industrial-scale composting of wastes from a food processing plant. *Annales Agriculturae Fenniae*, 1983, Vol. 22, No. 2, 77-85 ref. 11

⁶ Larbi, M. (2006). Influence de la qualité des composts et de leurs extraits sur la protection des plantes contre les maladies fongiques (Doctoral dissertation, Institut de recherche de l'agriculture biologique FiBL, CH-Frick; l'Université de Neuchâtel). <https://orprints.org/id/file/54614>

⁷ Mehta, C. M., Palni, U., Franke-Whittle, I. H., & Sharma, A. K. (2014). Compost: its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste management*, 34(3), 607-622. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.012>

Digital droplet PCR quantification and field-scale spatial distribution of *Plasmopara viticola* oospores in vineyard soil

Charlotte Poeydebat,¹ Eva Courchinoux,² Isabelle D. Mazet,² Marie Rodriguez,² Alexandre Chataigner,² Mélanie Lelièvre,³ Jean-Pascal Goutouly,⁴ Jean-Pierre Rossi,⁵ Marc Raynal,⁶ Laurent Delière,² François Delmotte²

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 16.

ABSTRACT Grapevine downy mildew, caused by the oomycete *Plasmopara viticola*, is one of the most devastating diseases affecting grapevine worldwide. Primary inoculum (i.e., oospores) plays a decisive role in downy mildew epidemics, but we still know very little about its abundance in vineyard soil. This study presents a novel molecular method for quantifying *P. viticola* oospore concentration in vineyard soil using digital droplet PCR (ddPCR). The development of this method enabled the characterization of both the abundance and spatial distribution of oospores in a vineyard at the onset of the growing season. Following a regular grid, a total of 198 soil samples (0–15 cm horizon) were collected in March 2022 in grapevine rows in a 0.22 ha vineyard planted with cv. Merlot and conducted according to French organic viticulture specifications. Additional samples were collected from the same field within five nested sampling plots with three distance levels, including samples collected in the inter-rows. Using ddPCR, we found *P. viticola* DNA in all soil samples except one, and we estimated that oospore concentration ranged from 0 to 1,858 oospores per gram of soil (303 ± 308 on average). The distribution of oospores at field scale was not random but characterized by 15-m diameter patches of concentrically increasing oospore concentration. Oospores accumulated five times more below the vine stocks than in the inter-row. Using a leaf disc bioassay, we found that soil infectious potential significantly increased with oospore concentration assessed by ddPCR. However, the low coefficient of determination of the relationship indicated that DNA-based oospore quantification lacked clear epidemiological significance. Both ddPCR and bioassay methods are valuable tools that could be used to assess reservoirs of *P. viticola* primary inoculum across different agroclimatic contexts, thereby bringing greater genericity. Further methodological improvement will also help refine the accuracy of DNA-based assessment of primary inoculum reservoir and improve our understanding of the relationship between primary inoculum reservoir and epidemic dynamics. Ultimately, these data will be essential for improving epidemic risk models and evaluating new preventive disease management strategies targeting the primary inoculum.

IMPORTANCE Grapevine downy mildew caused by the oomycete *Plasmopara viticola* affects leaves and bunches and leads to important economic losses for viticulturists. Recently, evidence has accumulated that soilborne primary inoculum (i.e., oospores in the soil) importantly contributes to disease progress. The significance of our work is in presenting a direct and sensitive method for assessing soil oospore concentration, as well as quantitative and spatially explicit data on downy mildew primary inoculum. This opens the way to new research, the evaluation of new disease control strategies based on primary inoculum management and the improvement of epidemic risk models, which will potentially contribute to lower fungicide use in viticulture *in fine*.

Editor Jennifer F. Biddle, University of Delaware, Lewes, Delaware, USA

Address correspondence to Charlotte Poeydebat, charlotte.poeydebat@agro-bordeaux.fr.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 16.

Received 21 August 2025

Accepted 13 October 2025

Published 4 November 2025

Copyright © 2025 Poeydebat et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](#).

KEYWORDS oomycete, downy mildew, primary inoculum, geostatistics, ddPCR, bioassay, soil infectious potential

While crop protection from pest and diseases is largely ensured by the use of pesticides worldwide (1), there is accumulating evidence that they are responsible for environmental pollution, threatening both biodiversity (2, 3) and human health (4). In Europe and France, policies are clearly encouraging the reduction of the use of chemical plant protection products (European Green Deal and National Action Plan Ecophyto [5]), either by improving use efficiency or by developing alternative pest and disease management strategies. Grapevine downy mildew, caused by the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara viticola*, is one of the most devastating diseases of grapevine worldwide. Its management still relies mainly on intensive use of fungicides throughout the growing season. In 2006, the French wine-growing area covered 3.3% of utilized agricultural land but contributed up to 14.4% of national fungicide use (6). In 2019, more than 80% of the treatment frequency index was made up of fungicides used against downy mildew and powdery mildew (7).

In temperate regions, the life cycle of *P. viticola* comprises a phase of asexual multiplication on its host tissues during the growing season and a phase of sexual reproduction, which occurs in infected grapevine leaves between thalli of sexually compatible strains (as *P. viticola* is heterothallic [8]) leading to the formation of oospores. Leaves then fall on the ground and oospores overwinter in leaf debris or as free propagules in the soil. The stock of oospores in the soil constitutes the primary inoculum for the next growing season, which will be responsible for the onset of the epidemics. After the first primary contaminations have occurred, epidemic development depends on both primary and secondary infections, whose relative contributions depend on climatic conditions of the season (9). However, primary inoculum is increasingly considered to play a more important role in grapevine downy mildew epidemics than previously thought (10, 11) for several reasons. First, population genetic studies evidenced that grapevine downy mildew populations are panmictic across European vineyards (12, 13) showing that genetic mixing resulting from sexual reproduction largely structures pathogen populations. Second, in contrast to the widely held assumption that primary contaminations rarely occur after flowering, it has been shown that oospores are able to germinate and cause infections throughout the growing season (until late September in the northern hemisphere [14, 15]) and that a substantial amount of infections, including in the middle of the growing season, can arise from oospores (up to 40% of contaminations in the most favorable conditions [16, 17]). Third, while the epidemic continues to progress after harvest (from what we observe in surveyed vineyards), the incidence of typical mosaic-like downy mildew symptoms on grapevine leaves was shown to be proportional to the amount of oospores formed in the leaves (18). Finally, downy mildew incidence at the end of the season was found to explain the precocity and intensity of the disease the following season in Canadian vineyards (19).

While actual control of grapevine downy mildew primarily targets the asexual propagation of the disease, the contribution of *P. viticola* primary inoculum to epidemic dynamics suggests that measures targeting the primary inoculum (e.g., post-harvest leaf removal, biosolutions preventing sexual reproduction or oospore survival, practices limiting oospore germination or splashing) could contribute to downy mildew management, in particular under circumstances favorable to primary contaminations. At least, decisions on the application of fungicides should better account for the abundance of primary inoculum and its contribution to epidemic risk. Although the stages of the sexual reproduction cycle of *P. viticola* are well known (10), their quantitative description remains incomplete. The study of disease inoculum abundance and spatial distribution in agricultural soils is generally restricted to soilborne pathogens, including oomycetes (20, 21). To our knowledge, these questions have rarely been addressed regarding strictly airborne biotrophic pathogens with a telluric conservation life stage. Molecular

approaches have been developed and used to quantify airborne asexual inoculum of grapevine downy mildew, as well as oospores in grapevine leaves (18, 22–24). Direct indicators of the pathogen abundance in the vineyards, such as spore concentration in the air, are progressively included in decision tools or regional monitoring programs (25, 26). Yet, the prediction of downy mildew epidemic risk in decision support systems is mainly based on meteorological variables that control the development of *P. viticola* (27–30). Indicators of primary inoculum reservoir in the soil compartment have never been accounted for until now, partly because quantitative data are scarce. Instead, predictive models assume a fictitious quantity of primary inoculum and calculate rates of change (associated with maturation, dispersal, or germination [28]). Recently, a molecular method based on real-time quantitative PCR (qPCR) was used to quantify oospores in soil of vineyards in China (31). Quantitative data on oospores obtained from such methods support the transition to more sustainable downy mildew management in viticulture by improving epidemiological models for epidemic risk prediction and enabling evaluation of control strategies based on primary inoculum management.

Here, we present a direct and sensitive method for the quantification of *P. viticola* oospores in vineyard soil based on the quantification of *P. viticola* DNA by digital droplet PCR (ddPCR). We provide an estimation of the number of copies of the ITS sequence used for amplification (ITS1/5.8S) in the genome of *P. viticola* that we used to convert the ddPCR output into a number of oospores per gram of soil. By means of geostatistics, we described the spatial distribution of downy mildew primary inoculum in a vineyard at the onset of the growing season. Finally, we build on previous works to conduct a bioassay to assess the infectious potential of soil samples and discuss the epidemiological significance of DNA-based assessments of downy mildew primary inoculum.

MATERIALS AND METHODS

Soil sampling and preparation

We conducted our study in an experimental vineyard with a sandy-gravel soil located at the INRAE Bordeaux Nouvelle-Aquitaine research center (Villenave d'Ornon, France; 44.79194,-0.57702) within the Pessac-Léognan appellation area. The surveyed vineyard was planted in 2011 with 18 rows of 68 Merlot grapevine stocks over a 0.22 ha surface (70 × 32 m), corresponding to a density of 6,600 vines per ha (i.e., 1.6 m between rows and 0.95 m between vines along the row). It was managed according to French organic farming specifications, meaning that Bordeaux mixture (copper) was the only chemical fungicide allowed to control downy mildew. Inter-rows were either sown with a mix of plant species selected for green manuring or covered by spontaneous vegetation in an alternating arrangement rotating every year. All inter-rows were tilled before grapevine budburst. For winter protection and weed management purposes, soil from both sides of the row was turned over on the lower part of the vines in the fall. The ridge formed under the row was then reopened in the spring. The surveyed vineyard was bordered on each of its long sides by a diversified shrubby hedgerow (ca. 1.5–2 m high) that separated it from other experimental vineyards.

Soil sampling was done in March 2022. We collected 198 soil samples at the nodes of a 2.85 × 3.2 m regular grid covering the entire surface of the vineyard; that is, one sample every three vine stocks in the row, in one row out of two (Fig. 1). To explore the spatial structure of primary inoculum of downy mildew in the soil at a finer scale, we delineated five plots in the experimental vineyard, within which we collected soil samples following a nested sampling design with three distance levels. Each plot consisted of a 2.85 × 3.2 m rectangle containing 28 sampling points (Fig. 1). The first distance level corresponded to the four corners of the plot ($n_3 = 4$); hence, sampling points were separated by about 3 m (samples were the same as for the regular grid sampling). The second distance level was set at 0.8 m (half the inter-row width), and sampling points were located in the corners of four 0.8 m squares located in each corner of the plot ($n_{0.8}=16$, including four points in common with the first distance level; see Fig. 1). The third distance level was set at

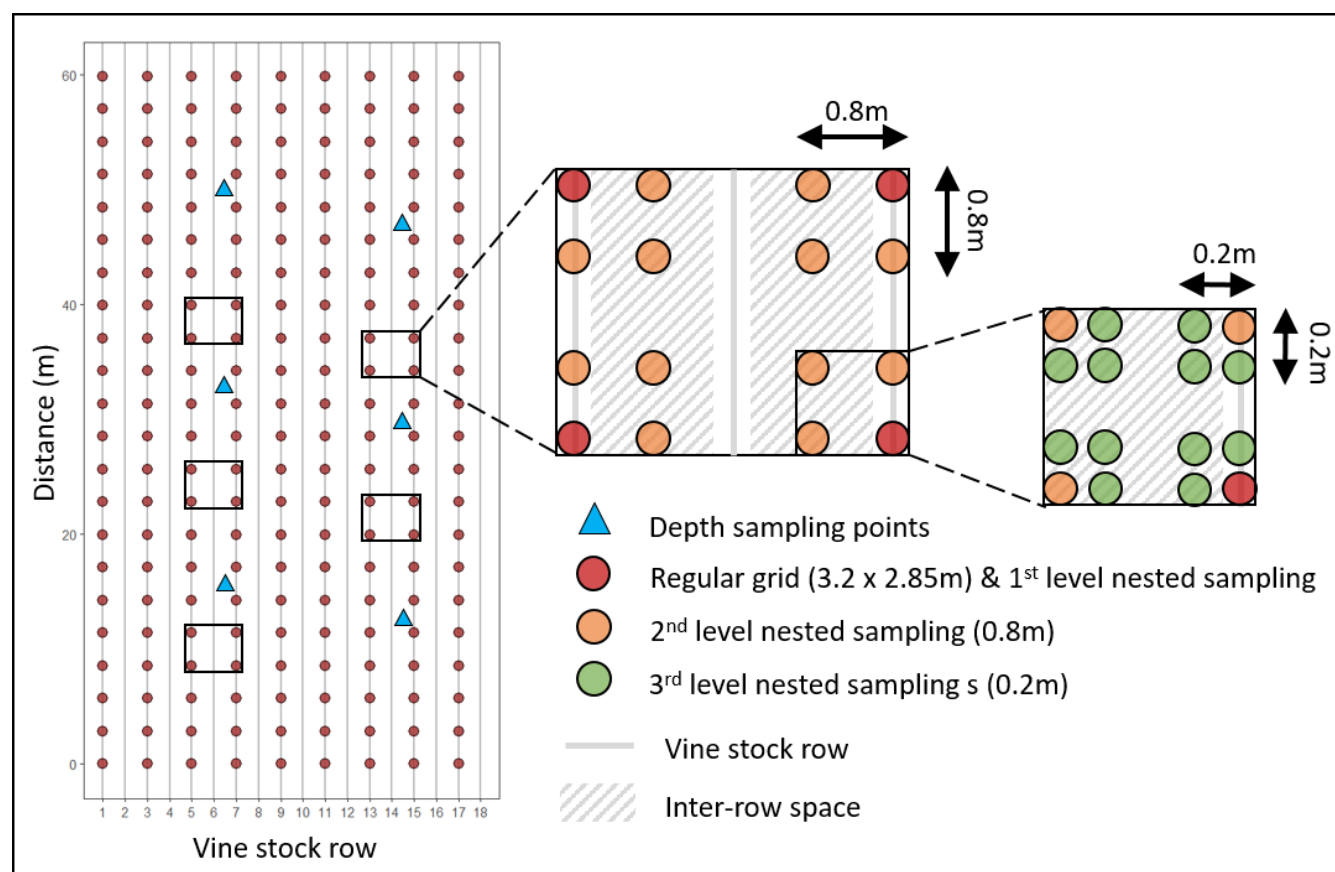


FIG 1 Map of the soil sampling points within the experimental vineyard.

0.2 m with sampling points corresponding to the corners of four 0.2 m squares located in the corners of one of the four 0.8 m squares ($n_{0.2}=16$, including one point in common with the first distance level and four points in common with the second distance level; see Fig. 1). We also considered that the points from the regular grid were located in the row, while the points from the 2nd and 3rd levels of the nested sampling were located in the inter-row space. At each sampling point of both the regular grid and the nested sampling plots, we collected 500 g of soil from the top 15 cm using an auger. We ended with 318 soil samples, including 198 samples from the regular grid and 120 additional samples from the five nested sampling plots.

To investigate the vertical distribution of *P. viticola* primary inoculum in the soil, we dug a hole 40 cm deep and 30 cm in diameter at six points located in the inter-row space in the experimental vineyard (Fig. 1). We divided the soil profile into four strata of 10 cm (0–10 excluding leaf debris on soil surface, 11–20, 21–30, and 31–40 cm) and sampled 500 g of soil from each stratum, starting at the bottom of the profile to avoid contaminating deeper layers with upper ones. This corresponded to 24 samples in total (4 samples per hole or sampling location). All soil samples were stored at 5°C before processing.

Quantification of *Plasmopara viticola* primary inoculum in vineyard soil samples

DNA extraction

Each sample was passed through a 4 mm mesh sieve and thoroughly homogenized for 30 s using an electric mixer set at medium speed. Directly after homogenization, ca. 6 g of the sample was collected and placed in a 5 mL tube to be freeze-dried. Then, a

2 g subsample of dry soil was placed in a 15 mL Falcon tube containing 4 g of 0.1 mm diameter silica beads, 5 g of 1.4 mm diameter ceramic beads, and eight 4 mm diameter glass beads (as recommended by MP-Biomedicals for TeenPrep Lysing Matrix E). For the grinding and lysis extraction step, a volume of 8 mL of lysis buffer composed of 100 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM EDTA (pH 8), 100 mM NaCl, 20% SDS, and ultra-pure water was added to each tube. Mechanical cell lysis was achieved by placing the tubes in a FastPrep-24 classic instrument (MP-Biomedicals) set for three runs of 30 s at 4 m.s^{-1} . Tubes were then incubated for 30 min at 70°C to activate chemical lysis and centrifuged at $5,000 \times g$ for 7 min at 20°C to eliminate particles in suspension. DNA extraction was carried out using 1 mL of supernatant obtained from the centrifugation, as follows: (i) deproteinization, or the addition of 100 μL potassium acetate 3 M pH 5.5 to the sample, homogenization, and incubation on ice for 15 min to precipitate proteins, followed by centrifugation at $14,000 \times g$ for 5 min at 4°C to eliminate precipitated proteins (supernatant recovery and pellet disposal); (ii) DNA precipitation, or the addition of 900 μL cold isopropanol (vol/vol) to the supernatant from the deproteinization, gentle agitation of the tubes that were then placed at -20°C for 30 min, centrifugation at 13,000 rpm for 30 min at 4°C , and elimination of the supernatant; (iii) DNA washing, or rinsing of the pellet with 400 μL 70°C cold ethanol, centrifugation at 13,000 rpm for 5 min at 4°C , elimination of the ethanol supernatant, and drying of the pellet by placing the tubes in a drying oven at 60°C for 20 min; (iv) DNA purification, or resuspension of the pellet in 500 μL of ultra-pure water. Raw DNA extracts were further purified using a NucleoSpin Soil kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's protocol from step 4 (addition of SL3 buffer). Finally, purified DNA extracts were eluted in 60 μL of buffer (Tris-HCL, 5 mM, pH 8.5) and stored at -20°C .

Digital droplet PCR

To avoid common PCR inhibition problems with the soil matrix and to obtain direct absolute DNA quantification (no standard curve needed), samples were analyzed by ddPCR using the QX200 ddPCR system (Bio-Rad), composed of a droplet generator, a thermal cycler, and a droplet reader. We used the specific PCR primers and TaqMan probe (Giop set) designed by Valsesia et al. (23) that target the ITS1/5.8S to amplify *P. viticola* DNA in our samples.

For each sample, we added 4 μL of DNA extract diluted to the tenth to 18 μL of a PCR mix composed of 11 μL of $2\times$ ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad), 2.2 μL of 7.5 μM Giop F, 2.2 μL of 7.5 μM Giop R, 2.2 μL of 5 μM Giop P-VIC, and 0.4 μL of ultra-pure water. The samples (20 μL) were first placed in the droplet generator to proceed to the breakdown of the samples into 15,000 to 20,000 micro-droplets using oil. Samples were then carefully transferred to 96-well plates with a pipette, with one sample per well (one single analysis per sample). The sample plates were placed in the thermal cycler for DNA to be amplified according to the following program: (i) an initial phase at 95°C for 5 min; (ii) 40 cycles of 30 s at 95°C then 1 min at 60°C then 30 s at 72°C ; and (iii) a final phase at 98°C for 10 min. Samples were cooled at 12°C before being transferred to the droplet reader for DNA quantification (ratio of positive vs negative droplets). Finally, we obtained one value per sample that corresponded to the number of ITS1 copies per μL of reaction mix.

Performance of the method to quantify *P. viticola* oospore DNA in soil

To determine the performance of the overall method to quantify *P. viticola* oospore DNA in soil, we spiked and analyzed non-infected 2 g soil samples with *P. viticola* oospores at different known concentrations (see details in Table S1 in the supplemental material). In particular, we assessed the linearity (using a linear regression analysis) and the efficiency (as the percentage of expected DNA actually measured) of the method. In addition, we conducted a separate analysis on two subsets of the soil samples taken from the vineyard to assess the repeatability of the DNA extraction and ddPCR assay steps on

environmental samples naturally containing oospores (see Box S2 in the supplemental material for details).

Estimation of ITS1/5.8S copy number in *Plasmopara viticola* genome

To estimate the ITS1/5.8S copy number in the genome of *P. viticola*, we compared the ddPCR signals obtained with the ITS primer pairs (23) vs primers targeting the single copy β -tubulin gene (32). First, sporangia of seven *P. viticola* strains frequently used in the laboratory for genetic applications were collected with a paintbrush from grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) leaves infected beforehand on purpose and placed into separate 2 mL microcentrifuge tubes with 1 mL Tris-EDTA buffer. Second, freeze-dried samples were extracted following an SDS-based method (adapted from reference [33]), and DNA quantity and quality were checked by dosage with either Qubit 4 or Denovix-11. About 35 sequences from NCBI (12, 34) were aligned with *P. viticola* genome (from [35]) using Geneious Prime. Since none existed yet, β -tubulin primers (Forward: ACAG CCAATTTTCGTAAGTCC, Reverse: GCCTTGACGACATTTGCTTT) and a TaqMan probe (5' FAM-TGTCCGGGAAATCGAAGGCA-MGB 3') were designed using the consensus sequence with 100% similarity. Specificity was tested using NCBI Blast (blast.ncbi.nlm.nih.gov) and by running quantitative PCRs on pure *P. viticola* strain, *P. viticola* with grapevine leaf, or grapevine leaf only (see Fig. S2 in the supplemental material) using a QuantStudio 5 (Life Technologies). The reaction mix was composed of 10 μ L of 2 $\times$ PCR Buffer (Takyon Low Rox Probe MasterMix—Eurogentec), 1.6 μ L of each β -tubulin primer (forward and reverse) at 10 μ M, 0.4 μ L of probe at 10 μ M, 3.9 μ L of molecular biology water (Sigma), and 2.5 μ L of DNA template for a 20 μ L final volume. Due to a large copy number difference between both genes and ddPCR sensitivity, we run the reactions for each marker in separate reaction wells. In consequence, each sample was normalized with a final quantity of 5 pg for ITS samples and 5 ng for β -tubulin samples. All reactions were run with a cycling program starting with 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 94°C alternating with 60 s at 60°C. For each strain, the number of ITS1/5.8S copies was estimated as the ratio of β -tubulin to ITS copy number per ng.

Spatial structure of *Plasmopara viticola* primary inoculum in a vineyard

The spatial structure of *P. viticola* primary inoculum in the experimental vineyard was investigated at both field scale and plot scale by analyzing the regular grid data and the nested sampling plots data, respectively, using a geostatistical approach. Hereafter, we describe the field-scale analysis only, but the same methodology (except model fitting and kriging) was applied for the plot-scale analysis (see Table S3 in the supplemental material for details).

Plasmopara viticola DNA in soil samples, expressed as the number of ITS copies per μ L of reaction mix, was log-transformed before analysis to reduce the skewness of the distribution and limit variance inflation and variogram distortion (36). First, all pairs of data ($N = 19,503$) were segregated into distance classes. The maximal distance between two points in our data set was 65.09 m. In our analysis, however, we considered a maximal separation distance of 60 m to exclude the highest distance classes with a number of point pairs below the empirical threshold for semivariance estimates accuracy (at least 30–50 pairs required [37, 38]). We considered a spatial lag of 2 m, which led to a total of 29 distance classes, with 79–1,498 pairs each. The sampling points in the first distance class were separated by a median distance of 3.02 m. We then computed the semivariance for each distance class using the Matheron estimator (39), defined as follows:

$$\gamma(h) = \frac{1}{2n(h)} \sum_{(i=1)}^{n(h)} [Z(X_i) - Z(X_{i+h})]^2,$$

where $Z(X_i)$ is the primary inoculum at the first point of the i th pair, $Z(X_{i+h})$ is the primary inoculum at the second point of the i th pair, h is the median of the class of distance considered, and n is the number of point pairs in the distance class considered.

We tested for anisotropy in the data (i.e., spatial variation depending on direction) by computing directional experimental semivariograms (0° , 45° , 90° , and 135°). Results revealed no clear anisotropy (see Fig. S3; Table S4). Hence, we represented the omnidirectional experimental semivariogram of the primary inoculum of *P. viticola* in the vineyard by plotting the semivariance against the sampling point separation distance h . A semivariogram shows how the similarity between samples changes with increasing separating distance, that is, spatial dependence. It can take various forms, and semi-variance often increases with distance until it reaches a plateau at which point it remains stable. The variogram is flat in the absence of spatial structure.

To determine the theoretical model best fitting our experimental semivariogram, we used the “autofitVariogram()” function of the “autofit” package in R to fit different variogram models to the data and calculate the sum of squared errors (sserr) between the experimental semivariogram and each fitted model (see Table S4). Using the sserr as the criterion to select the best-fitting model (40), we choose to fit a Matérn model (with a smoothness parameter equal to 0.2) to the experimental semivariogram using ordinary least squares residuals method (41). The Matérn model $F(h)$ and the associated semivariance $\gamma(h)$ are as follows:

$$F(h) = \frac{1}{2^{\kappa-1}\Gamma(\kappa)} \left(\frac{h}{a}\right)^{\kappa} K_{\kappa}\left(\frac{h}{a}\right)$$

$$\gamma(h) = C_0 + C \left(1 - \frac{1}{2^{\kappa-1}\Gamma(\kappa)} \left(\frac{h}{a}\right)^{\kappa} K_{\kappa}\left(\frac{h}{a}\right)\right)$$

where h is the separation distance, K_{κ} is a modified Bessel function of the second kind of order κ (42), Γ is the gamma function, and κ is the smoothness parameter. The model parameter estimates were regarded as quantitative descriptors of the spatial pattern of the data. They included (i) the spatial range a , or the distance beyond which variance is constant; (ii) the nugget variance C_0 , an estimate of error measurement plus error due to uncontrolled variability at distance lags shorter than the shortest lag considered; (iii) the structural variance C ; and (iv) the sill $C_0 + C$, or sample variance.

Finally, we performed kriging, a spatial interpolation method widely used in geostatistics to obtain predicted values of the variable of interest (in this case, the soil content of primary *P. viticola* inoculum) outside the measurement point at unsampled locations, based on the semivariogram model obtained from the observed data. First, we checked for the possibility of a trend in the data by comparing our raw experimental semivariogram to both a linear trend model ($x + y$) and a second-order polynomial (quadratic) trend model ($x + y + x^2 + y^2$). The linear trend had a negligible effect on the empirical semivariogram (see Fig. S4 in the supplemental material), indicating the absence of a significant large-scale drift. In contrast, the quadratic trend model effectively removed the spatial structure, resulting in an almost flat variogram. This suggested that the quadratic trend absorbed not just a trend but the spatial variability itself. Removing it would therefore eliminate meaningful spatial information. Based on these results, we concluded that explicit trend removal was not appropriate for our data set. Consequently, we applied ordinary kriging to preserve spatial dependence and ensure reliable spatial predictions. We therefore used the shape and parameter estimates of the raw omnidirectional semivariogram model to interpolate *P. viticola* primary inoculum values at unsampled locations over a $0.05 \text{ m} \times 0.05 \text{ m}$ grid by ordinary kriging, which is an optimal interpolation procedure described in detail in various sources (43, 44). After back-transforming the resultant values, we produced a contour map of the spatial distribution of the primary inoculum in the field, as interpolated from our data (i.e., given the local conditions and our sampling plan).

All geostatistical analyses were performed using the package *gstat* (45) in the R statistical software (v4.3.1) (46). The contour map was designed using the *ggplot2* package (47).

***Plasmopara viticola* primary inoculum along depth and distance-to-row gradients**

In the nested sampling plots, the sampling points were located either below the vine stocks in the row (10 samples per plot) or in the inter-row space at 20, 60, or 80 cm from the nearest row (respectively 4, 4, and 10 samples per plot). We used this data to test whether the amount of primary inoculum in the soil varied along a gradient of distance to the row. We fitted a linear mixed model with the log-transformed number of ITS copies per μL as a response variable, the distance to the row as a fixed effect, and the plot as a random intercept effect (to account for the dependence of the data within one plot). Model parameters were estimated by restricted likelihood estimation, and the significance ($\alpha = 0.05$) of the regression coefficients was tested with Student's *t* tests and Satterthwaite's approximation for degrees of freedom, using the *lmer* function of the *lmerTest* package (48). We evaluated model fit by calculating the percentage of variance explained by fixed (R^2_m) and by fixed plus random effects (R^2_c) (49). Finally, we tested whether the amount of primary inoculum varied with the depth of sampling using a Kruskal-Wallis test and a Dunn test of multiple comparison. Statistical analyses were conducted using the R statistical software (v4.3.1; [46]).

A bioassay to assess soil infectious potential

The principle of the bioassay is to place soil samples in optimal temperature and humidity conditions for oospore germination, to trap the released zoospores using susceptible grapevine leaf discs, and finally to approximate the infectious potential by evaluating the extent to which leaf discs are infected. The method described below was adapted from previous works (50–52).

We performed the bioassay on one-eighth of our 318 soil samples ($n = 40$) using a 1 g portion per sample. Each sample was placed in the bottom of a 10 cm diameter circular plastic box half-filled with osmosed water and incubated at 20°C in the dark to stimulate oospore germination (day 0). The sample was held at the bottom of the box using a piece of blotting cloth (80 μm mesh). We collected leaves from untreated *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon grafted plants (SO4 rootstock) grown in greenhouses. We specifically picked the third or fourth leaves from the apex, as leaves at this stage of development are particularly susceptible to downy mildew infection (Isabelle Demeaux, personal communication). We cut 10 mm diameter discs in the leaf blade with a manual round cutter. On the first day of the incubation (day 0), we placed 10 discs from 10 different leaves (to avoid biases due to differences in downy mildew susceptibility between leaves) on the surface of the water (abaxial face down) in each box. The leaf discs were used to trap the zoospores released into the water following germination of oospores present in the soil sample; that is, the zoospores swam to the leaf discs and infected them via the stomata. The blotting cloth allowed the zoospores to pass through but prevented the discs from coming into direct contact with the soil and limited contamination of the discs by saprophytic microorganisms. A separation structure was used to prevent the discs in a box from overlapping and maintain the same trapping surface in each box (see Fig. S5 in the supplemental material). After 48 h, we placed the 10 discs abaxial face up on a moist Whatman filter paper sheet in a transparent box sealed with plastic film (to maintain high humidity) and incubated at 20°C with a 12-h–12h day-night light cycle for 6 days. After 6 days of incubation, we visually inspected the discs and evaluated the percentage of the area covered with *P. viticola* sporangiophores for each disc. The germination of a cohort of oospores under optimal conditions (immersed in water, in the dark and at 20°C) extends over 6–8 days, with a peak around the second and third days of incubation (Isabelle Demeaux, personal communication). To account for germination dynamics, we repeated zoospore trapping

using leaf discs on days 2, 4, and 6 from incubation start (day 0). We used the cumulative number of infected discs and the mean percentage of leaf area infected as indicators of the infectious potential of the soil.

We assessed the relationship between the abundance of primary inoculum in the soil (as estimated with the ddPCR approach) and soil infectious potential by fitting one generalized linear model per indicator (response variable following Poisson distribution in both cases) with the number of *P. viticola* ITS copies per μL as a predictor. In both cases, model parameters were estimated by maximum likelihood, and the significance ($\alpha = 0.05$) of the regression coefficients was tested with z tests. We computed the coefficient of determination (R^2) of the two models to determine the indicator best fitting the primary inoculum data. Statistical analyses were conducted using the R statistical software (v4.3.1; [46]).

RESULTS

Quantification of *Plasmopara viticola* primary inoculum in vineyard soil samples

Considering the regular grid and nested sampling plot data, we found *P. viticola* DNA in all samples except one, with 6.62 ± 6.68 ITS copies per μL on average. The value for positive samples varied from 0.05 to 40.4 ITS copies per μL . A map of the raw data is available in the supplemental material (Fig. S6).

By comparing the ITS1/5.8S to the β -tubulin signal obtained by ddPCR for seven *P. viticola* strains, we found that the diploid genome of *P. viticola* contains, on average, 215 ± 37 copies of the ITS sequence, but varies from 175 to 281 copies depending on the strain (see Table S2 in the supplemental material for details). Using the average estimate for the number of ITS1 copies, we estimated that the number of oospores per gram of soil ranged from 0 to 1,858 and that there was, on average, 303 ± 308 oospores per gram of soil in the experimental vineyard (see Fig. S7 in the supplemental material for computation details). Using the minimal and maximal estimates for the number of ITS1 copies, the average number of oospores per gram of soil was 372 ± 378 or 232 ± 235 , respectively.

Performance of the method to quantify *P. viticola* oospore DNA in soil

P. viticola was detected at very low concentrations (i.e., 1 oospore in 2 g of soil; see Table S1) when analyzing spiked soil samples with our method. Different definitions of detection limit exist in the field of quantitative PCR (including ddPCR; see [53] for example), of which many correspond to a more or less conservative threshold rate of positive replicates (or detection frequency). In our study, *P. viticola* DNA was detected in 1 out of 5 replicates for the lowest concentrations (i.e., 1 and 10 oospores in 2 g of soil), and in 5 out of 5 replicates for higher concentrations (i.e., 50, 100, 500, and 1,000 oospores in 2 g of soil; see Table S1). This means that the detection limit of our method lies between 1 and 50 oospores per 2 g of soil, depending on the degree of conservatism applied. Besides, the analysis of the relationship between oospore concentration (or expected ITS copy number) and the ddPCR-assessed ITS copy number revealed that the method showed a good degree of linearity for the dynamic range tested in the present study (Pearson's $r = 0.97$; see Fig. S1). However, the degree of fit between the data and the linear regression was rather low for this type of analysis ($R^2 = 0.93$) and the number of ITS copies tended to be underestimated compared to what was expected (slope = 0.77). In addition, the efficiency of the method varied from 11% to 92% of expected DNA across the oospore concentrations tested (see Table S1). Consistently, the repeatability (expressed as within-sample coefficient of variation) of the DNA extraction and the ddPCR assay was found to be variable across vineyard soil samples (see Box S2 in the supplemental material for detailed results of the analysis of variance). On the positive side, median values for within-sample coefficients of variation were relatively low overall, for both the DNA extraction and the ddPCR assay (30% and 17%, respectively). Moreover,

the analysis of variance also indicated that the error of measurement associated with the DNA extraction procedure and with the ddPCR assay was low compared to the between-sample variability. Altogether, these results indicate that although the repeatability and the efficiency of the method could be improved, it is useful to quantify *P. viticola* oospore DNA in vineyard soil.

Spatial structure of *P. viticola* primary inoculum in a vineyard

After log-transformation, the skewness of the distribution of *P. viticola* DNA data was reduced from 1.69 to -0.35 for the regular grid, and from 2.40 to 0.42 for the nested sampling plots. The shape of the fitted Matérn model (regular grid data) revealed that the downy mildew primary inoculum was spatially structured at the field scale (Fig. 2). The range was 15.83 m. The nugget variance, the structural variance, and the sill were 0.156, 0.354, and 0.510, respectively. The map of the values interpolated by ordinary kriging using the fitted model is shown in Fig. 2.

The pattern of the plot-scale experimental semivariogram was not typical, with semivariance alternatively increasing and decreasing along the gradient of separation distance (Fig. S8 in the supplemental material). Semivariance peaks corresponded to distance classes with a higher proportion of heterogeneous pairs of points, that is, pairs consisting of one sampling point in a row and one sampling point in an inter-row. On the other hand, the lowest semivariance values corresponded to distance classes with a higher proportion of homogeneous pairs of points, that is, pairs with two sampling points in a row or pairs with two sampling points in an inter-row (Fig. S8 in the supplemental material). We consistently found that semivariance was higher for heterogeneous pairs of points than for homogeneous ones, on average (anova $P < 0.0001$, Fig. S8; Table S6 in the supplemental material).

P. viticola primary inoculum along depth and distance-to-row gradients

Our results clearly indicated that there was a decreasing gradient of primary inoculum from the row to the middle of the inter-row (Fig. 3; $\beta = -0.0263 \pm 0.0023$; $df = 133$; t value = -11.54 ; $P < 0.001$; $R^2_m = 0.48$; $R^2_c = 0.50$). Downy mildew primary inoculum was on average five to six times more concentrated in the ridge of soil below the vine stocks (9.32 ± 6.32 ITS copies per μL) than in the inter-row space (1.72 ± 1.66 ITS copies per μL). These results were in line with the results from the geostatistical analysis of nested sampling plot data (see above). We also found that the primary inoculum concentration decreased with soil depth (Fig. 3; Kruskal-Wallis test statistic = 12.1; $df = 3$; $P < 0.01$). In particular, it was significantly lower between 21 and 30 cm and between 31 and 40 cm than in the first 10 cm from the soil surface (see results of Dunn's post hoc test in Table S7 in the supplemental material).

Although we were not seeking to address this point, we also found that primary inoculum concentration in the soil varied between rows, with significantly less *P. viticola* DNA on average in the westernmost row compared to others in the vineyard (Fig. S9 in the supplemental material; $F = 6.522$; $P < 0.001$; see Table S8 in the supplemental material for results of Tukey's multiple comparison test). This unexpected result was consistent with the distribution of primary inoculum as predicted by kriging of observed data (Fig. 2).

A bioassay to assess soil infectious potential

The cumulated number of leaf discs infected by *P. viticola* from 1 g of soil sample over the duration of the assay varied from 0 to 12 discs (out of 40). The average proportion of disc area covered with *P. viticola* sporulation varied from 0% to 10.3%. The cumulated number of infected discs significantly increased with the number of ITS copies per μL (Fig. 4; $=0.029 \pm 0.008$; $P < 0.0001$). In addition, the average infected area significantly increased with the number of ITS copies per μL (Fig. 4; $=0.058 \pm 0.010$; $P < 0.0001$). The coefficients of determination were low in both cases, although it was slightly higher for

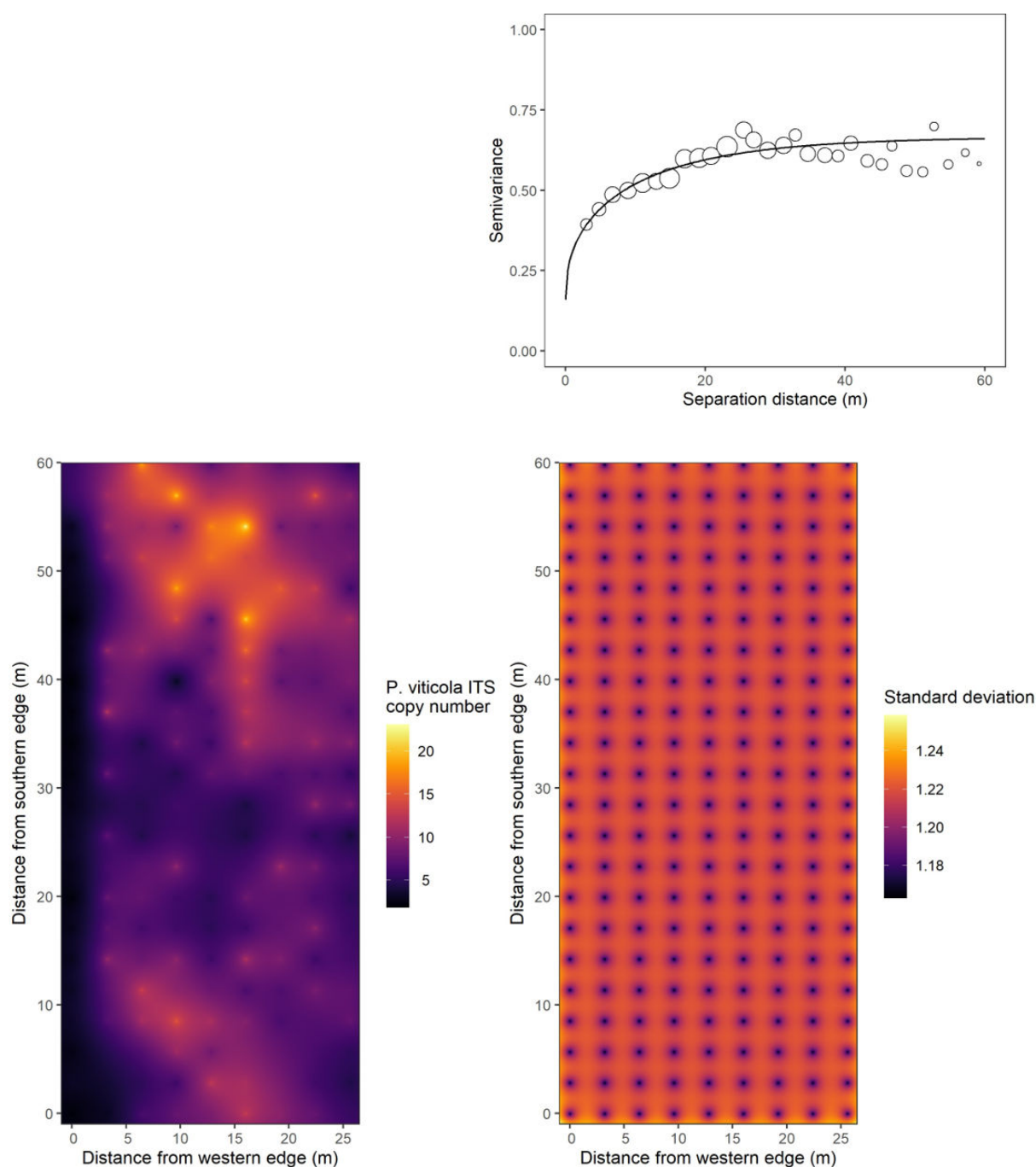


FIG 2 Experimental omnidirectional semivariogram of *P. viticola* DNA (expressed as log-transformed number of ITS copies per μL of reaction mix) in the soil of the experimental vineyard (top right panel; open circles size is proportional to the number of data pairs; solid line corresponds to the fitted Matern model). Map of the experimental vineyard with interpolated values of *P. viticola* DNA (expressed as the number of ITS copies per μL of reaction mix) obtained by ordinary kriging (left bottom panel). Map of the kriging standard deviation (right bottom panel).

the average infected area than for the cumulated number of infected discs ($R^2 = 0.33$ and 0.19 , respectively).

DISCUSSION

We presented a method for the quantification of *P. viticola* oospores in vineyard soil samples based on a ddPCR approach. We used this method to describe the spatial distribution of downy mildew primary inoculum (oospores) at different spatial scales in

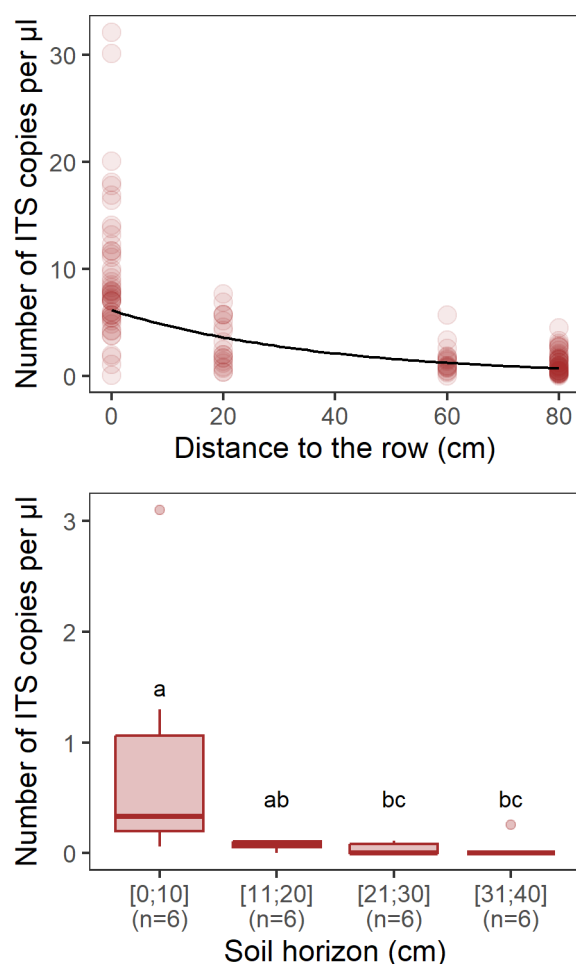


FIG 3 Abundance of downy mildew primary inoculum (as number of ITS copies per μL estimated by ddPCR) along gradients of distance to the row (upper panel) and soil depth (lower panel). A solid line in the upper panel corresponds to model predictions. Different letters between depths in the lower panel indicate a significant difference.

one vineyard. We also evaluated whether the ddPCR-based assessment of inoculum concentration was related to the soil infectious potential as assessed using a bioassay.

The method used for inoculum assessment in soil is based on the ddPCR technique, which provides an absolute quantification of DNA and is particularly well-suited for rare targets in complex matrices. We combined these advantages with the use of an ITS sequence occurring in numerous copies, which increases the probability of detection of *P. viticola* DNA in small quantities in the sample. The partition of the samples into thousands of droplets improves the yield of amplification and the sensitivity of the analysis as compared to qPCR, including in the case of oomycete quantification in soil samples (54–56). Using ddPCR and the average estimate for the number of ITS1/5.8S copies in the genome of *P. viticola* (215 copies), we found that the number of oospores per gram of soil ranged from 0 to 1,858 in the experimental vineyard and averaged 303 oospores per gram of soil. This result falls within the range of values (i.e., from a few dozen to 4000 oospores per gram of soil approximately) previously estimated by Yang et al. (31) in Chinese vineyards using qPCR.

The analysis of soil samples spiked with known concentrations of oospores revealed that our method can detect *P. viticola* oospore DNA at very low concentration (i.e., 1 oospore in 2 g of soil) and is an adequate and repeatable tool for the relative quantification of *P. viticola* oospore DNA in vineyard soil. However, the method showed some limitations for absolute quantification purposes, in particular because of variable (and

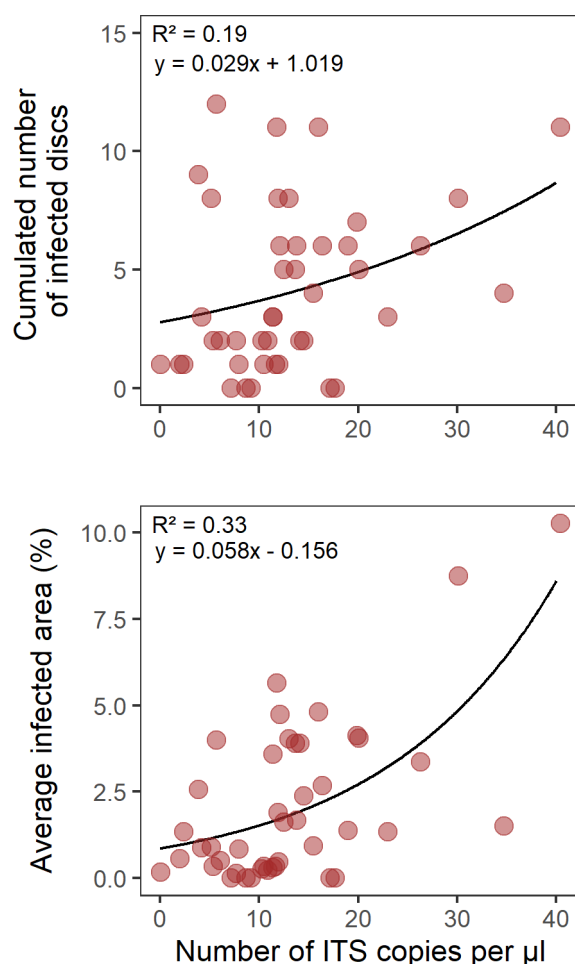


FIG 4 Comparison of bioassay and digital droplet PCR. Relationships between the abundance of DM primary inoculum in the soil (measured as number of ITS copies per µL by ddPCR) and the infectious potential of the soil measured by a bioassay, as either the cumulated number of infected discs (upper panel) or the average trap disc infected area (lower panel). Solid lines represent fitted model predictions.

sometimes low) efficiency and underestimation bias. Such limitations reflect the accumulation of errors regarding the representativeness of sampling after soil homogenization, technical errors during sample preparation, DNA extraction (e.g., irregular pipetting), or ddPCR assay. Further methodological improvements, such as automation, could help reduce them.

A potential drawback of the use of a multicopy DNA sequence as a primer lies in the potential variability of the number of copies of the sequence among genotypes. In our study, we found that the number of ITS1/5.8S copies in *P. viticola* diploid genome varied from 175 to 281 copies depending on the strain ($n = 7$), which caused the primary inoculum concentration estimates to vary from 232 to 372 oospores per gram of soil on average. The range of ITS copy number found in our study is included in the range estimated for the oomycete *Aphanomyces euteiches*, but is more restricted (meaning it is probably underestimated), probably because it is estimated from a smaller number of strains (57, 58). Further analyses should be undertaken to better assess the occurrence of the ITS1/5.8S on a *P. viticola* population level.

Finally, *P. viticola* may persist under various forms in vineyard soils, including oospores and non-viable structures such as dead mycelial cells from fallen leaves, as well as sporangia or zoospores that settle on the ground without encountering a host. Consequently, DNA-based methods used to quantify downy mildew inoculum reservoir in vineyard soils must be interpreted with caution, as extracellular DNA could

be amplified, leading to an overestimation of the viable inoculum. In our study, soil sampling was deliberately conducted well after the end of the growing season (mid-March) to maximize extracellular DNA degradation and to limit this bias. In the microcosm experiment, bacterial and plant extracellular DNA were found to persist from a few hours to 70 days and from 3 months to 2 years in the soil, respectively (59). The rate of degradation varied depending on abiotic conditions, soil management practices, and whether the DNA was protected from enzymatic degradation within plant tissue (59, 60). No data have been published on oomycete extracellular DNA. To further assess and reduce the risk of overestimating the viable inoculum, methods that prevent extracellular DNA amplification should be considered, such as treating the samples with propidium monoazide before DNA extraction and/or reverse-transcriptase qPCR (see e.g. [61]). Such approaches have already proven to improve DNA-based quantitative assessment of viable plant pathogens or plant-product contaminants (62, 63).

The relatively high nugget value found in the semivariogram (0.156) indicated that very close points could be quite dissimilar in terms of primary inoculum, suggesting the existence of a source of variation operating at a scale finer than that of the regular grid (i.e., sub-grid variability). Alternatively, it could reflect measurement error related to the methodological limitations in the ddPCR approach discussed above (i.e., ITS copy number variability, amplification of extracellular DNA, variable efficiency). In our study, *P. viticola* was encountered at all sampled locations in the field, contrary to soilborne pathogens whose presence is generally restricted to some areas (20, 21). This difference may be explained by the greater dispersal ability of the airborne form of *P. viticola* (as compared to strictly soilborne pathogens), resulting in a more even distribution of the disease in the field. Still, we showed that the distribution of downy mildew oospores was not random or regular on a field scale, but that it was characterized by 15 m diameter patches of concentrically increasing oospore concentration. This pattern could be related to the distribution of the disease in the vineyard at the end of the growing season, which we unfortunately did not assess the year before our soil survey (but see Box S3 in the supplemental material for comparisons of the spatial distribution of primary inoculum against soil electrical resistivity and grapevine NDVI distributions, as indirect proxies for disease incidence). Alternatively, environmental factors could affect grapevine leaf litter (containing the oospores) distribution or the survival or maturation of the inoculum during autumn and winter (e.g., copper or other fungicidal substances, soil moisture, antagonistic microbial species presence). Future studies should investigate the relationship between the spatial distribution of the symptoms at the end of the growing season and the distribution of the inoculum in the soil the following year.

We found that, on average, oospores accumulate preferentially in the ridge of soil below the vine stocks (or “row location”) at a rate of 4–5 times the inter-row space, and in the first 10 cm of soil. Although oospore concentration varied on a wider spatial scale within the field (15 m patches), this row vs inter-row contrast was observed at all locations in the field. Moreover, oospore concentration was more similar at two row locations, whatever the distance between the two points, than when comparing row vs inter-row locations. This suggests that the distribution of oospores is primarily determined by the distribution of grapevine leaf litter that carries them, which falls and accumulates at the foot of the grapevines. However, the distribution of grapevine leaf litter may change during autumn and winter under the influence of the wind and of cultural practices. Instead, we hypothesize that soil ridging at the foot of the vines has reinforced this distribution pattern by preventing the dispersion of the fallen leaves by the wind during winter (see Fig. S10 in the supplemental material for an illustration)

Our study also revealed that soil oospore concentration can vary between rows within a field and be subject to border effects. Indeed, we found that the primary inoculum was 7–8 times less concentrated in the westernmost row compared to the rest. This difference might arise from various mechanisms mediated by the presence of a tree hedgerow alongside the experimental field, possibly limiting disease incidence of leaf litter abundance locally. These mechanisms include (i) wind erosion and microclimate

modification in the vicinity of the hedgerow (64, 65), (ii) modulation of grapevine vigor and susceptibility to downy mildew potentially due to competition for resources (66; but see also 67), and (iii) interception of airborne spores (68). In our case, the absence of a border effect on the east side of the field (also bordered by a hedgerow) suggests that mechanisms at play operate asymmetrically, which restricts the choice to mechanisms associated with wind erosion and microclimate modification. In any case, these results raise questions regarding the effects of agroecological infrastructures on downy mildew epidemiology, as well as their possible contribution to preventive disease management strategies.

Positive relationships between inoculum abundance and disease severity were found for soilborne root pathogens (21), but the inoculum density-disease severity relationship has rarely been studied for soil-to-aerial plant parts infection pathways, such as in the case of downy mildew primary contaminations. Only one recent study demonstrated that the risk of primary infections of grapevine leaves by *P. viticola* increased with the concentration of oospores in the leaf litter deposited at the foot of the vine stocks (69), but the experimental conditions were not particularly representative of the amount of primary inoculum reservoir found “naturally” in vineyards (important amount of infected leaf litter artificially accumulated at the foot of the grapevines). Our results supported the idea that the concentration of *P. viticola* oospores in the soil is related to soil infectious potential (as estimated in controlled conditions using a leaf disc bioassay). In particular, we found that the proportion of leaf discs infected during the bioassay significantly increased with primary inoculum abundance in the soil (as estimated by ddPCR). However, the relationship was not so strong ($R^2 = 0.33$), which was possibly due to the limitations in DNA-based estimation of primary inoculum reservoir discussed above. Moreover, as oospore germination in a population extends over several months (15), our bioassay (carried out on a single date) likely “captured” only part of the oospore population present in the samples. Besides technical limitations, overlooked factors driving oospore germination could contribute to lower the strength of the relationship that we found. First, oospores can survive and germinate for at least 5 years, meaning that oospores of different ages coexist in a vineyard soil at time t (70). The effect of aging on oospore germination remains undescribed, but it is likely that the outcome of the germination bioassay will depend on the age pyramid of the oospores present in the sample. In addition, autumn and winter conditions can affect oospore germination rate and timing (71, 72), so that spatial heterogeneity of conditions (including within a field) can lead to variability in the outcome of the germination bioassay between samples with similar *P. viticola* oospores or DNA contents. Altogether, this suggests that, even if the infectious potential is undoubtedly related to the amount of primary inoculum (which can be assessed by means of a DNA-based approach) to some extent, the indicators derived from our germination bioassay should be complemented with contextual data for epidemiological interpretation.

As agriculture moves away from chemical biocides, the design of sustainable, adaptive, and cost-effective crop disease management strategies will rely more and more on the prevention of epidemic risks and a predictive evaluation of pathogen population dynamics. In this context, the quantitative and spatially explicit survey of inoculum reservoirs is crucial. The replication of primary inoculum survey in different contexts and years, with varying pedoclimatic, epidemiological, or cultural conditions, will provide a more generic understanding of the abundance and spatial distribution of *P. viticola* primary inoculum in vineyards. Altogether, a better characterization of the variability of ITS1/5.8S copy number among *P. viticola* genotypes, the consideration of extracellular *P. viticola* DNA in vineyard soils, and methodological improvements to limit measurement error will enable more accurate estimates of the quantity of primary inoculum in the soil and a better understanding of the relationship between the quantity of inoculum and epidemics. Ultimately, a DNA-based survey of primary inoculum could contribute to the design of monitoring and decision-making tools (e.g., epidemic risk prediction models).

to accompany the implementation of sanitation measures preventing primary inoculum accumulation in the vineyard from one season to the next.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Experimental Viticultural Unit of Bordeaux 1442, INRAE, F-33883 Villenave d'Ornon, for the maintenance of the experimental vineyard that was used in this study, as well as the GenoSol platform (DOI [10.15454/L7QN45](https://doi.org/10.15454/L7QN45)) for sharing its expertise and helping with methodological development for DNA extraction from soil samples. Part of the experiments (ddPCR analysis) was performed at the Genome Transcriptome Platform of Bordeaux (PGTB; doi:[10.15454/1.5572396583599417E12](https://doi.org/10.15454/1.5572396583599417E12)) with the help of Adline Delcamp and Emilie Chancerel. Finally, we are grateful to the sponsors of the Chaire Alexis Millardet for their support to research activities, namely Château Ausone, Château Cheval Blanc, Petrus, and Château Montrose.

This work was initiated thanks to the Ministries for an Ecological Transition, for Agriculture and Food, for Solidarity and Health and of Higher Education, Research and Innovation, with the financial support of the French Office for Biodiversity, as part of the call for research projects "Overall approaches to limit the use of phytosanitary products: coupling preventive and curative solutions within agricultural sectors from farmers to consumers," with the fees for diffuse pollution coming from the Ecophyto II + plan (PROFIL project 2020-2024). This work was also financially supported by the ISVV Fund of the Fondation Bordeaux Université, through the Chaire Alexis Millardet program. We acknowledge the financial support of the French National Research Agency (ANR) under the grant 20 - PCPA - 0010 (Vitae project from the PPR Cultiver et Protéger Autrement). The GenoSol platform (DOI [10.15454/L7QN45](https://doi.org/10.15454/L7QN45)) of the infrastructure ANAEE-Services received a grant from the French state through the National Agency for Research under the program "Investments for the Future" (reference ANR-11-INBS-0001), as well as a grant from the Regional Council of Bourgogne Franche-Comté. The BRC GenoSol is a part of BRC4Env ([10.15454/TRBJTB](https://doi.org/10.15454/TRBJTB)), the pillar "Environmental Resources" of the Research Infrastructure AgroBRC-RARE ([10.15454/b4ec-tf49](https://doi.org/10.15454/b4ec-tf49)).

AUTHOR AFFILIATIONS

¹Bordeaux Sciences Agro, INRAE, SAVE, ISVV, Gradignan, France

²INRAE, Bordeaux Sciences Agro, SAVE, ISVV, Villenave d'Ornon, France

³Université Bourgogne Franche-Comté, INRAE, AgroSup Dijon, Agroécologie, Dijon, France

⁴INRAE, Université de Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, EGFV, ISVV, Villenave d'Ornon, France

⁵INRAE, CIRAD, IRD, Institut Agro, CBGP, Montferrier-sur-Lez, France

⁶IFV, Bordeaux Nouvelle Aquitaine, UMT SEVEN, Villenave d'Ornon, France

AUTHOR ORCIDs

Charlotte Poeydebat  <http://orcid.org/0009-0004-8553-5983>

FUNDING

Funder	Grant(s)	Author(s)
Office Français de la Biodiversité		Charlotte Poeydebat
		Eva Courchinoux
		Marc Raynal
		Laurent Delière
		François Delmotte
Fondation Bordeaux Université		Charlotte Poeydebat

Funder	Grant(s)	Author(s)
		Marie Rodriguez Laurent Delière François Delmotte
Agence Nationale de la Recherche	20 - PCPA - 0010	Alexandre Chataigner François Delmotte
Agence Nationale de la Recherche	ANR-11- INBS-0001	Mélanie Lelièvre
Conseil régional de Bourgogne-Franche-Comté		Mélanie Lelièvre

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Charlotte Poeydebat, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing | Eva Courchinoux, Investigation, Methodology, Writing – review and editing | Isabelle D. Mazet, Methodology | Marie Rodriguez, Investigation, Methodology, Writing – review and editing | Alexandre Chataigner, Investigation, Methodology, Writing – review and editing | Mélanie Lelièvre, Methodology | Jean-Pascal Goutouly, Investigation, Writing – review and editing | Jean-Pierre Rossi, Investigation, Methodology, Writing – review and editing | Marc Raynal, Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Writing – review and editing | Laurent Delière, Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Writing – review and editing | François Delmotte, Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Supervision, Writing – original draft, Writing – review and editing

ADDITIONAL FILES

The following material is available [online](#).

Supplemental Material

Supplemental material (AEM01667-25-s0001.pdf). Boxes S1 to S3, Tables S1 to S8, and Fig. S1 to S10.

REFERENCES

- Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, Kohli SK, Yadav P, Bali AS, Parihar RD, Dar OI, Singh K, Jasrotia S, Bakshi P, Ramakrishnan M, Kumar S, Bhardwaj R, Thukral AK. 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl Sci* 1:1446. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Beaumelle L, Tison L, Eisenhauer N, Hines J, Malladi S, Pelosi C, Thouvenot L, Phillips HRP. 2023. Pesticide effects on soil fauna communities—A meta-analysis. *J Appl Ecol* 60:1239–1253. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.14437>
- Beketov MA, Kefford BJ, Schäfer RB, Liess M. 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:11039–11043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305618110>
- Dall'Agnol JC, Ferri Pezzini M, Suarez Uribe N, Joveleviths D. 2021. Systemic effects of the pesticide mancozeb – A literature review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 25:4113–4120. https://doi.org/10.26355/eurrev_202106_26054
- Lamichhane JR, Messéan A, Ricci P. 2019. Research and innovation priorities as defined by the Ecophyto plan to address current crop protection transformation challenges in France. *Adv Agron* 154:81–152. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2018.11.003>
- Butault J-P, Delame N, Jacquet F, Zardet G. 2011. L'utilisation des pesticides en France: état des lieux et perspectives de réduction, p 7–26. In *Notes et Etudes Socio-économiques*
- Agreste. 2023. Enquêtes pratiques culturelles en viticulture en 2019, IFT et nombre de traitements, données révisées
- Wong FP, Burr HN, Wilcox WF. 2001. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathol* 50:427–432. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00573.x>
- Rumbou A, Gessler C. 2004. Genetic dissection of *Plasmopara viticola* population from a Greek vineyard in two consecutive years. *Eur J Plant Pathol* 110:379–392. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000021061.38154.2>
- Gessler C, Pertot I, Perazzolli M. 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol Mediterr* 50:3–44. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360
- Gobbin D, Jermini M, Loskill B, Pertot I, Raynal M, Gessler C. 2005. Importance of secondary inoculum of *Plasmopara viticola* to epidemics of grapevine downy mildew. *Plant Pathol* 54:522–534. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01208.x>
- Fontaine MC, Labbé F, Dussert Y, Delière L, Richart-Cervera S, Giraud T, Delmotte F. 2021. Europe as a bridgehead in the worldwide invasion history of grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*. *Curr Biol* 31:2155–2166. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.009>
- Fontaine MC, Austerlitz F, Giraud T, Labbé F, Papura D, Richard-Cervera S, Delmotte F. 2013. Genetic signature of a range expansion and leap-frog event after the recent invasion of Europe by the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Mol Ecol* 22:2771–2786. <https://doi.org/10.1111/mec.12293>
- Kennelly MM, Gadoury DM, Wilcox WF, Magarey PA, Seem RC. 2007. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 97:512–522. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-4-0512>
- Maddalena G, Russo G, Toffolatti SL. 2021. The study of the germination dynamics of *Plasmopara viticola* oospores highlights the presence of

- phenotypic synchrony with the host. *Front Microbiol* 12:698586. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698586>
16. Gobbin D, Pertot I, Gessler C. 2003. Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis. *Eur J Plant Pathol* 109:153–164. <https://doi.org/10.1023/A:1022565405974>
 17. Hong C, Brewer MT, Brannen PM, Scherm H. 2020. Temporal disease dynamics and relative importance of sexual and asexual reproduction of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) in an isolated vineyard in the North Georgia Mountains, USA. *Plant Pathol* 69:1721–1730. <https://doi.org/10.1111/ppa.13263>
 18. Si Ammour M, Bove F, Toffolatti SL, Rossi V. 2020. A Real-Time PCR assay for the quantification of *Plasmopara viticola* oospores in grapevine leaves. *Front Plant Sci* 11:1202. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01202>
 19. Carisse O. 2016. Development of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) under northern viticulture conditions: influence of fall disease incidence. *Eur J Plant Pathol* 144:773–783. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0748-y>
 20. Botero-Ramirez A, Hwang S-F, Strelkov SE. 2021. *Plasmodiophora brassicae* inoculum density and spatial patterns at the field level and relation to soil characteristics. *Pathogens* 10:499. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050499>
 21. Moussart A, Wicker E, Le Delliou B, Abelard J-M, Esnault R, Lemarchand E, Rouault F, Le Guennou F, Pilet-Nayel M-L, Baranger A, Rouxel F, Tivoli B. 2009. Spatial distribution of *Aphanomyces euteiches* inoculum in a naturally infested pea field. *Eur J Plant Pathol* 123:153–158. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9350-x>
 22. Douillet A, Laurent B, Beslay J, Massot M, Raynal M, Delmotte F. 2022. LAMP for in-field quantitative assessments of airborne grapevine downy mildew inoculum. *J Appl Microbiol* 133:3404–3412. <https://doi.org/10.1111/jam.15762>
 23. Valsesia G, Gobbin D, Patocchi A, Vecchione A, Pertot I, Gessler C. 2005. Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 95:672–678. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0672>
 24. Carisse O, Van der Heyden H, Tremblay DM, Hébert PO, Delmotte F. 2021. Evidence for differences in the temporal progress of *Plasmopara viticola* clades *riparia* and *aestivalis* airborne inoculum monitored in vineyards in eastern Canada using a specific multiplex quantitative PCR assay. *Plant Dis* 105:1666–1676. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1164-RE>
 25. Brischetto C, Bove F, Languasco L, Rossi V. 2020. Can spore sampler data be used to predict *Plasmopara viticola* infection in vineyards? *Front Plant Sci* 11:1187. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01187>
 26. Douillet PA. 2023. Étude pluriannuelle de la sporée aérienne de *Plasmopara viticola* par quantification moléculaire : un nouvel indicateur de risque des épidémies du mildiou de la vigne. Université de Bordeaux
 27. Dubuis P-H, Viret O, Bloesch B, Fabre A, Naef A, Bleyer G, Kassemeyer H, Krause R. 2012. Lutte contre le mildiou de la vigne avec le modèle VitiMeteo-Plasmopara. *Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture* 44
 28. Rossi V, Caffi T, Giosuè S, Bugiani R. 2008. A mechanistic model simulating primary infections of downy mildew in grapevine. *Ecol Modell* 212:480–491. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2007.10.046>
 29. Stryzik S. 1983. Modèle d'état potentiel infection: application à *Plasmopara viticola*. Association de Coordination Technique Agricole
 30. Park E, Seem R, Gadoury D, Pearson R. 1997. DMCAST: a prediction model for grape downy mildew development. *Wein-Wissenschaft* 52:182–189.
 31. Yang L, Chu B, Deng J, Yuan K, Sun Q, Jiang C, Ma Z. 2023. Use of a real-time PCR method to quantify the primary infection of *Plasmopara viticola* in commercial vineyards. *Phytopathol Res* 5:19. <https://doi.org/10.1186/s42483-023-00178-w>
 32. Weerakoon ND, Roberts JK, Lehen LP, Wilkinson JM, Marshall JS, Hardham AR. 1998. Isolation and characterization of the single β -tubulin gene in *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia* 90:85–95. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026883>
 33. Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res* 20:6115–6116. <https://doi.org/10.1093/nar/20.22.6115>
 34. Rouxel M, Mestre P, Comont G, Lehman BL, Schilder A, Delmotte F. 2013. Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete. *New Phytol* 197:251–263. <https://doi.org/10.1111/nph.12016>
 35. Paineau M, Minio A, Mestre P, Fabre F, Mazet ID, Couture C, Legeai F, Dumartinet T, Cantu D, Delmotte F. 2024. Multiple deletions of candidate effector genes lead to the breakdown of partial grapevine resistance to downy mildew. *New Phytol* 243:1490–1505. <https://doi.org/10.1111/nph.19861>
 36. Oliver MA, Webster R. 2014. A tutorial guide to geostatistics: computing and modelling variograms and kriging. *CATENA* 113:56–69. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2013.09.006>
 37. Chiles J-P, Delfiner P. 1999. Geostatistics: modeling spatial uncertainty. John Wiley & Sons, New York.
 38. Journel AG, Huijbregts CJ. 1976. Mining geostatistics. Academic Press, London.
 39. Matheron G. 1963. Principles of geostatistics. *Econ Geol* 58:1246–1266. <https://doi.org/10.2113/gsecongeo.58.8.1246>
 40. Hiemstra PH, Pebesma EJ, Twenhöfel CJW, Heuvelink GBM. 2009. Real-time automatic interpolation of ambient gamma dose rates from the Dutch radioactivity monitoring network. *Comput Geosci* 35:1711–1721. <https://doi.org/10.1016/j.cageo.2008.10.011>
 41. Cressie N. 1985. Fitting variogram models by weighted least squares. *Math Geol* 17:563–586. <https://doi.org/10.1007/BF01032109>
 42. Abramowitz M, Stegun IE. 1972. Handbook of mathematical functions, with formulas, graphs, and mathematical tables. 10th ed. U.S. Department of Commerce, National Bureau of Standards, Washington DC.
 43. Goovaerts P. 1998. Geostatistical tools for characterizing the spatial variability of microbiological and physico-chemical soil properties. *Biol Fertil Soils* 27:315–334. <https://doi.org/10.1007/s003740050439>
 44. Oliver MA, Webster R. 2015. Basic steps in geostatistics: the variogram and kriging. Springer International Publishing, Cham. <https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-15865-5>.
 45. Pebesma EJ. 2004. Multivariable geostatistics in S: the gstat package. *Comput Geosci* 30:683–691. <https://doi.org/10.1016/j.cageo.2004.03.012>
 46. R Core Team. 2023. R: a language and environment for statistical computing (4.3.1). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
 47. Wickham H. 2016. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag, New York.
 48. Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB. 2017. lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *J Stat Soft* 82. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
 49. Nakagawa S, Schielzeth H. 2013. A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed - effects models. *Methods Ecol Evol* 4:133–142. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00261.x>
 50. Hill G. 1998. Studies on the germination of *Plasmopara viticola* oospores with a floating disc test. *IOBC wprs Bulletin* 21
 51. Pertot I, Zulini L. 2003. Studies on *Plasmopara viticola* oospore germination in Trentino, Italy. *IOBC WPRS Bulletin* 26:43–46.
 52. Rossi V, Caffi T, Bugiani R, Spanna F, Valle DD. 2008. Estimating the germination dynamics of *Plasmopara viticola* oospores using hydro - thermal time. *Plant Pathol* 57:216–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01738.x>
 53. Hunter ME, Dorazio RM, Butterfield JSS, Meigs-Friend G, Nico LG, Ferrante JA. 2017. Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence-absence surveys of environmental DNA. *Mol Ecol Resour* 17:221–229. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12619>
 54. Gossen BD, Al - Daoud F, Dumonceaux T, Dalton JA, Peng G, Pageau D, McDonald MR. 2019. Comparison of techniques for estimation of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil. *Plant Pathol* 68:954–961. <https://doi.org/10.1111/ppa.13007>
 55. Rački N, Dreot T, Gutierrez-Aguirre I, Blejec A, Ravnikaar M. 2014. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods* 10:42. <https://doi.org/10.1186/s13007-014-0042-6>
 56. Wen R, Lee J, Chu M, Tonu N, Dumonceaux T, Gossen BD, Yu F, Peng G. 2020. Quantification of *Plasmodiophora brassicae* resting spores in soils using droplet digital PCR (ddPCR). *Plant Dis* 104:1188–1194. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0584-RE>
 57. Gangneux C, Cannas M-A, Bressan M, Castel L, Moussart A, Vitré-Gibouin M, Driouch A, Trinsoutrot-Gattin I, Laval K. 2014. A sensitive assay for rapid detection and quantification of *Aphanomyces euteiches* in soil. *Phytopathology* 104:1138–1147. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-13-0265-R>

58. Gibert S, Edel-Hermann V, Moussa Mcolo R, Gautheron E, Michel J, Bernaud E, Gautheron N, Sol J-M, Capelle G, Galland R, Bardon-Debats A, Lambert C, Steinberg C. 2021. Risk assessment of *Aphanomyces euteiches* root rot disease: quantification of low inoculum densities in field soils using droplet digital PCR. *Eur J Plant Pathol* 161:503–528. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02325-5>
59. Nielsen KM, Johnsen PJ, Bensasson D, Daffonchio D. 2007. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res* 6:37–53. <https://doi.org/10.1051/ebr:2007031>
60. Sirois SH, Buckley DH. 2019. Factors governing extracellular DNA degradation dynamics in soil. *Environ Microbiol Rep* 11:173–184. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12725>
61. Wang D, Liu E, Liu H, Jin X, Niu C, Gao Y, Su X. 2023. A droplet digital PCR assay for detection and quantification of *Verticillium nonalfalfae* and *V. albo-atrum*. *Front Cell Infect Microbiol* 12:1110684. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1110684>
62. Al-Daoud F, Gossen BD, Robson J, McDonald MR. 2017. Propidium monoazide improves quantification of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* with qPCR. *Plant Dis* 101:442–447. <https://doi.org/10.1094/PDI-5-05-16-0715-RE>
63. Crespo-Sempere A, Estiarte N, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. 2013. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products. *Int J Food Microbiol* 165:214–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.017>
64. Campi P, Palumbo AD, Mastrorilli M. 2009. Effects of tree windbreak on microclimate and wheat productivity in a Mediterranean environment. *Eur J Agron* 30:220–227. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.10.004>
65. Jacobs SR, Webber H, Niether W, Grahmann K, Lüttschwager D, Schwartz C, Breuer L, Bellingrath-Kimura SD. 2022. Modification of the microclimate and water balance through the integration of trees into temperate cropping systems. *Agric For Meteorol* 323:109065. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.109065>
66. Favor K, Udawatta RP. 2021. Belowground services in vineyard agroforestry systems, p 65–94. In Udawatta RP, Shibu J (ed), *Agroforestry and ecosystem services*. Springer International Publishing.
67. Bourgade E, Alonso Ugaglia A, Bustillo V, Dufourcq T, Grimaldi J, Guenser J, Montagne V, Ranjard L. 2020. VITIFOREST: evaluation de l'impact de l'arbre agroforestier en contexte viticole. *Innovations Agronomiques* 79:471–497. <https://doi.org/10.15454/73ry-yq72>
68. Delatouche L, Tixier P, Sainte-Rose J, Daribo M-O, de Lapeyre de Bellaire L. 2024. How do hedgerow characteristics alter the dispersal of *Pseudocercospora fijiensis* propagules? *Pest Manag Sci* 80:1454–1464. <https://doi.org/10.1002/ps.7876>
69. Fedele G, Maddalena G, Furioli M, Rossi V, Toffolatti SL, Caffi T. 2025. Relationship between the oospore dose in the leaf litter above the vineyard ground and primary infections by *Plasmopara viticola*. *Front Plant Sci* 16:1524959. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1524959>
70. Caffi T, Rossi V, Lusitani M. 2011. Long-term survival of *Plasmopara viticola* oospores. *IOBC wprs Bulletin* 67:111–114.
71. Jermini M, Gobbin D, Blaise P, Gessler C. 2003. Influence of the overwintering methods on the germination dynamic of downy mildew (*Plasmopara viticola*) oospores. *IOBC wprs Bulletin* 26:37–42.
72. Rouzet J, Jacquin D. 2003. Development of overwintering oospores of *Plasmopara viticola* and severity of primary foci in relation to climate*. *EPPO Bulletin* 33:437–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2003.00670.x>