

**AFPP-SEPTIEME CONFERENCE INTERNATIONALES SUR LES  
MALADIES DES PLANTES  
TOURS, FRANCE, 3-4-5 DECEMBRE 2003**

**STRUCTURATION DES POPULATIONS D'OÏDIUM DE LA VIGNE ET  
RESISTANCE AUX FONGICIDES : AFLP ET OUTILS MOLECULAIRES  
DE DETECTION.**

M-F. CORIO-COSTET, J. BOUSCAUT, F. DELMOTTE, L. DOUENCE,  
S. RICHART-CERVERA, L. AMRANI

UMR Santé Végétale, (INRA-ENITA), INRA-Bordeaux, BP 81,  
33883 Villenave d'Ornon.

**RESUME :** A l'aide d'outils AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), nous avons étudié la structuration des deux biotypes A(I) et B(III) de l'oïdium de la vigne. Une quinzaine de loci AFLP sont significativement différents au sein des deux populations. De nouveaux marqueurs moléculaires spécifiques des deux écotypes ont été élaborés (tub2, transposon) et des tests fongicides réalisés sur les deux groupes révèlent que les souches du groupe A sont plus sensibles aux fongicides que les souches du groupe B. Ainsi nous démontrons que les souches résistantes aux fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols appartiennent majoritairement au groupe B. De plus, nous disposons des séquences de gènes impliqués dans la résistance aux DMIs et aux strobilurines (CYP51 et Cyt bc1) et par conséquent d'outils potentiels détectant les mutants naturels résistants à ces fongicides dans les vignobles.

Mots-clés : AFLP, diagnostics moléculaires, *Uncinula necator*, résistance aux fongicides, structuration des populations.

**SUMMARY :**

**GENETIC STRUCTURE OF POWDERY MILDEW AND FUNGICIDES  
RESISTANCE : AFLP AND MOLECULAR TOOLS OF DETECTION**

Genetic structure of powdery mildew biotypes has been studied with AFLP markers. We prove that exist two distinct genotype of powdery mildew in vineyard (A(I) and B(III)), which have different sensitivity to fungicides. New molecular tools have been developed to detect the two biotypes (tub2, transposon) and the resistant strains to fungicides (CYP51, Cyt bc1). Strains belonging biotype B are more resistant to fungicides that strains of biotype A.

Key words: AFLP, molecular diagnosis, *Uncinula necator*, fungicide resistance, population structure.

## INTRODUCTION

L'Oïdium de la vigne (*Uncinula necator*) est responsable de l'une des principales maladies du vignoble mondial. En dépit de son ancienneté, ce pathogène est encore mal connu et la structure génétique de ses populations peu decryptée.

Au sein de l'UMR Santé Végétale, nous avons démontré l'existence de corrélations entre la résistance au triadiménol, la biodiversité de l'oïdium et le polymorphisme du gène CYP51 d'*U. necator*. Ce gène code pour la C14-déméthylase cible des fongicides DMI (ex : triazoles) et a révélé l'existence de deux types de polymorphismes (DELYE *et al.*, 1997a). L'un correspond à la présence d'une mutation ponctuelle sur le codon 136 du gène et conduit à la substitution d'un acide aminé dans la protéine (une tyrosine par une phénylalanine), laquelle corrèle parfaitement avec une forte résistance au triadiménol (DELYE *et al.*, 1997b). Le second polymorphisme détecté, relie la présence de mutations ponctuelles (codon en position 37 et 156) à l'existence de deux sous populations d'oïdium de la vigne génétiquement distinctes (DELYE et CORIO-COSTET, 1998; DELYE *et al.*, 1999). Cette distinction génétique entre les deux biotypes est liée à leur mode de conservation hivernale sexué ou asexuée. Le biotype A (I) correspond essentiellement aux symptômes « drapeaux » issus d'une conservation asexuée du mycélium dans les bourgeons en hiver et le biotype B (III) provient essentiellement d'une conservation sexuée sous forme de cleistothèces et s'exprime majoritairement sous forme d'un inoculum primaire provenant de la projection d'ascospores en début de saison (DELYE *et al.*, 1999).

Une telle découverte n'est pas sans conséquence sur l'épidémiologie du champignon et sur la gestion de la résistance aux fongicides, puisqu'en effet, ainsi que nous l'avons démontré, la reproduction sexuée peut avoir un rôle capital dans l'évolution et l'apparition de souches résistantes (CORIO-COSTET *et al.*, 1997). Plus récemment, la dynamique spatio-temporelle des deux écotypes a été réalisée sur différents vignobles et révélait des changements drastiques de l'équilibre des deux groupes dans les vignobles, avec le groupe A généralement majoritaire en début de saison et le groupe B qui s'imposait comme écotype majeur à partir de mi-juillet (CORIO-COSTET *et al.*, 2000).

Toutefois, peu d'études existent sur la structuration des populations d'oïdium de la vigne (DELYE *et al.*, 1997c; EVANS *et al.*, 1997) capables d'apporter des renseignements concernant la dynamique et les capacités adaptatives de ces populations face aux pressions environnementales

Dans l'optique de confirmer l'éloignement génétique des deux populations A et B et d'étudier la diversité de l'oïdium, nous avons développé de nouveaux outils de type AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Le second aspect développé concerne les capacités adaptatives des deux écotypes face aux pressions de sélection. Ne disposant que de l'outil moléculaire CYP 51 pour les identifier, nous avons mis au point deux autres outils PCR (Tub2, transposon) plus facile d'emploi, et nous cherchons également à disposer d'outils moléculaires susceptibles

d'être utilisés pour la détection de la résistance aux strobilurines à l'instar des outils existant pour l'oïdium des céréales (FRAAIJE *et al.*, 2002).

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **1- Matériel fongique utilisé**

A partir de deux cent prélèvements réalisés sur les vignobles de Bégadan, de St-Ciers (Gironde), St Jean de Blaignac (Entre-deux-mers) en 1999, après isolement moconidien et multiplication du matériel, nous avons obtenu 130 ADN issus des trois populations prélevées (60 Bégadan et 60 St-Ciers, 11 St Jean).

Pour réaliser l'étude de la diversité des populations A et B, 20 isolats appartenant au biotype A et 20 appartenant au biotype B ont été prélevés dans différentes régions de France et du continent européen. Après multiplication, les 40 ADN ont été stockés au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2-Tests de sensibilité aux fongicides**

Les tests de sensibilité aux fongicides ont été réalisés sur des disques de feuilles (var. Cinsaut) selon une variante de la méthode décrite par STEVA et CLERJEAU (1990). L'application des fongicides a été réalisée par pulvérisation des disques de feuilles, avec différentes solutions de fongicides. Les tests ont été répétés au minimum trois fois. Les souches utilisées sont issues de la collection du laboratoire et proviennent d'isolats naturels clonés.

### **3- Outils moléculaires utilisés**

Nested allele specific PCR: Deux outils moléculaires ont été utilisés pour identifier les deux biotypes (gènes CYP 51 et Tub2) et un troisième basée sur la mutation en 136 du gène Cyp51, pour détecter un fort niveau de résistance aux fongicides DMIs. Les séquences utilisées pour le gène CYP 51 qui permettent l'identification des deux biotypes et la détection de la résistance ont été décrites précédemment (DELYE *et al.*, 1997b, 1999). Les amorces utilisées pour le gène de la  $\beta$ -tubuline (Tub 2), sont celles décrites dans AMRANI *et al.*, (2003). N° d'accension des séquences des gènes (Genbank/EMBL) : gène de la tubuline: AY07934; Sterol-C14-déméthylase-CYP51: AF 042067.

#### PCR Direct:

Deux outils de PCR directe ont été fabriqués, un premier permettant d'amplifier spécifiquement un retro-transposon présent uniquement dans les souches de biotype A (BOUSCAUT et CORIO-COSTET, 2003). Le second consiste à amplifier la séquence du gène du Cyt bc1 qui correspond au site actif, à l'aide deux amorces désignées suite au clonage et séquençage du gène que nous avons réalisé (Genbank/EMBL: N°AY077480).

#### - Analyse AFLP

Le protocole utilisé dérive de celui décrit par VOS *et al.*, (1995). L'ADN après digestion par deux enzymes de restriction (EcoR1 et Mse I), subi une ligation des bouts cohésifs avec des adaptateurs EcoR1 et Mse I, de séquence connue, qui rallonge le fragment de 20 bases de part et d'autre. Les fragments sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces correspondant à la séquence des adaptateurs, prolongés en 3'

par une base arbitraire. Puis une seconde amplification est réalisée en utilisant les mêmes amorces mais prolongées en 3' par deux bases supplémentaires arbitraires. Seuls les fragments possédant le site complémentaire seront amplifiés. Après électrophorèse sur un gel d'acrylamide, plusieurs dizaine de fragments sont révélés. Nous avons utilisés les 8 amorces suivantes: EAC\*-CTA, EAC\*-CTT, EAC\*-CAA, EAC\*-CTC, ETA\*-CAA, ETA\*-CAT, ETA\*-CTC, ETA\*-CTA, EAT\*-CTT, EAT\*-CAA, ( EAC: EcoR1 + bases AC marqué radioactivement).

## RESULTATS

### 1- Comparaison de l'identification des deux biotypes à l'aide des différents outils PCR.

Sur 40 souches appartenant au biotype A (20) au biotype B (20) de diverses origines (Aude, Nîmes, Pyrénées-orientales, Allemagne, Inde, etc...), nous avons testé nos différents outils de PCR allele-spécifique ou de PCR directe.

Tableau I : Détection des différents biotypes A et B de l'oïdium de la vigne en fonction de l'outil utilisé (exprimée en pourcentage).

(Detection of powdery mildew biotypes with différents PCR tools)

Biotypes	CYP 51*		TUB2		Transposon
	Mut /37 A	Mut37/ B	TUB/A	TUB/B	A
% de détection					
<b>A</b>	100	0	100	0	100
<b>B</b>	0	100	0	100	0

CYP51\*: amorces spécifiques d'une mutation sur le 37ème codon après amplification du gène CYP51 (Délye *et al.*, 1999).

TUB2: amorces spécifique d'une mutation ponctuelle présente dans l'intron 3 de la tubuline utilisée après pré-amplification du gène de la tubuline (Amrani et Corio-Costet, 2003).

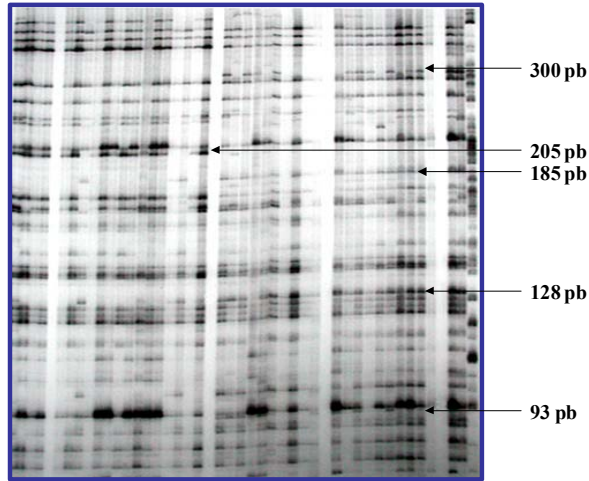
Nous mettons en évidence que les parties du génome amplifiées (gène de la C14 $\alpha$ -déméthylase, gène de la  $\beta$ -tubuline, insertion d'un transposon) permettent de distinguer les deux biotypes, sans ambiguïtés. Pour les trois amorces utilisées, 40 souches testées, aucune recombinaison n'a été détectée.

### 2- Analyses AFLP des populations d'oïdium de la vigne

480 marqueurs AFLP (bandes majeures) de tailles différentes ont été détectés (Figure 1). 80 bandes ont été utilisées dont 55 polymorphes pour cette étude, soit un polymorphisme de 68,8%. Parmi l'ensemble des marqueurs obtenus, 17 discriminent les deux groupes A et B, et deux semblent corrélés avec le mating-type (signe sexuel).

Figure 1 : Profil AFLP obtenu avec l'amorce EAT\*-CAA. Chaque piste correspond au profil d'une souche. Quelques bandes polymorphes sont indiquées.

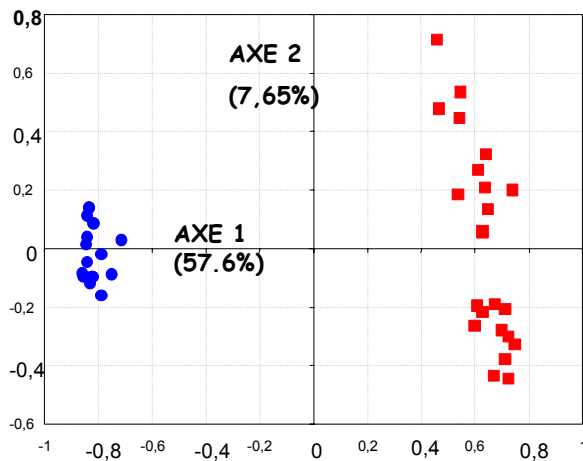
(A representative Amplified Fragment Length Polymorphism gel run)



#### Etude des biotypes A et B

Une analyse des correspondances multiples réalisée à partir des données AFLP (matrice binaire) obtenues lors de l'étude des souches A et B, a permis d'obtenir les résultats de la figure 2.

Figure 2 : ACM des données AFLP pour les biotypes A (O) et B (□)  
(MCA analysis of powdery mildew AFLP data)



Les fréquences des marqueurs AFLP et les indices de diversité ont été calculés au sein des populations bordelaises de biotype B (Bégadan, St-Cier) et au sein des deux groupes d'individus appartenant aux deux biotypes A et B (Figure 2).

Nous avons obtenu les résultats suivants:

- Les souches de groupe A et de groupe B sont génétiquement distinctes et se répartissent en deux groupes sur un axe expliquant 57,6% de la diversité génétique.
- Toutes les souches de groupe A, bien que différentes sont regroupées quelle que soit leur origine.
- Les souches de groupe B se dispersent sur un axe qui explique 7,65% de la diversité

A noter que 90% de souches appartenant au signe sexuel (-) se trouve en haut de l'axe 2 alors que les souches de signe (+) se répartissent autour de l'axe 1.

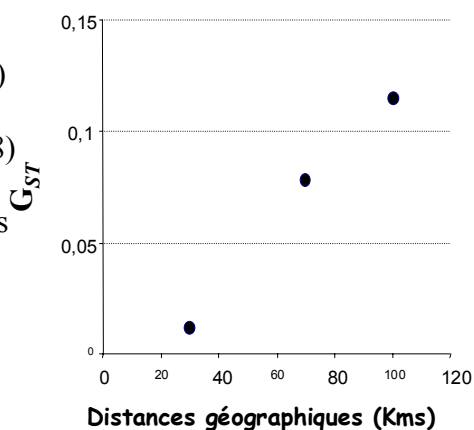
#### Etude des populations de Bégadan et St-Ciers

Concernant la structuration de ces populations située en Aquitaine, l'analyse des données par ACM, donne une structuration identique à celle des souches B de la figure 2. Aucune structuration n'apparaît réellement entre les populations de Bégadan et de St-Ciers. Toutes les souches sont différentes, on retrouve une répartition des souches de signe sexuel (-) en haut de l'axe et un fort regroupement des souches de signe (+) à l'opposé.

Figure 3: Différenciation des populations en fonction de leur éloignement géographique

(Expression of powdery mildew différenciation in terms of geographic distance)

L'indice de diversité ( $G_{ST}$ ) des populations de Bégadan et de St-Ciers est faible (0,01) (distante d'une trentaine de kilomètres). Si nous comparons l'indice de diversité (0,08) entre St-Ciers et St-Jean de Blaignac (distance 70km) avec celui des populations de Bégadan et de St Jean de Blaignac (100 km), il apparaît que plus la distance entre les parcelles est importante, plus l'indice est fort. Il semble exister un lien entre éloignement géographique et différenciation des populations.



#### Biodiversité et sensibilités des souches A et B aux fongicides

Si nous examinons la sensibilité au triadiménol des 20 souches de biotype A et des 20 souches de biotype B analysées précédemment Nous obtenons les résultats suivants:

- 100% des souches A ont une  $CI_{90}$  comprise entre 0 et 1 mg/l (S)
- 18% des souches B ont une  $CI_{90}$  comprise entre 0 et 1 mg/l (S)
- 45,5 % des souches B ont une  $CI_{90}$  comprise entre 1 et 10 mg/l (S/R)
- 36,5 % des souches B ont une  $CI_{90}$  comprise supérieure à 10 mg/l (R).

Des résultats similaires ont été obtenus par examen de la sensibilité moyenne de lots de souches appartenant aux deux biotypes à différents fongicides (table II)

Table II: Sensibilité des populations A et B à différents fongicides  
(Fungicides sensitivity of the two populations of powdery mildew)

Biotype	Fongicides				
	1	2	3	4	5
	CI <sub>50</sub> moyenne ± SEM				
<b>A</b>	<b>0,32</b> ± 0.03	<b>0,90</b> ± 0.03	<b>0,12</b> ± 0.02	<b>0,20</b> ± 0.12	<b>0,08</b> ± 0.03
<b>B</b>	<b>5,09</b> ± 1.51	<b>3,93</b> ± 1.24	<b>0,73</b> ± 0.33	<b>0,45</b> ± 0.05	<b>0,19</b> ± 0.02
<b>FD</b>	<b>15,9</b>	<b>4,4</b>	<b>6</b>	<b>2,2</b>	<b>2,4</b>

DMI: 1, 2, 3: triadimérol, penconazole, tébuconazole; 4: azoxystrobilurine; 5: Quinoxifén;  
FD : rapport des CI<sub>50</sub> des souches B sur les souches A.

Il apparaît de manière significative que les souches du groupe B sont moins sensibles aux fongicides que les souches appartenant au biotype A. Le phénomène est particulièrement amplifié pour les fongicides de type (1,2, 3). A noter que pour des molécules récentes telles que les strobilurines et le quinoxifén, nous observons un FD d'un facteur 2, qui tend à montrer qu'il existe déjà une différence métabolique entre les deux groupes de souches vis à vis des voies de biosynthèse potentiellement touchées par ces deux molécules. C'est pourquoi nous avons mis au point un outil PCR après clonage et séquençage du gène du Cyt BC1 d'*U. necator* (N° Genbank: AY077480) afin d'amplifier le gène et vérifier si des mutations ponctuelles existent (en position 143 et/ou ailleurs) potentiellement impliquées dans la résistance aux strobilurines.

### CONCLUSION

La méthode AFLP est pertinente pour l'étude des populations, mais s'avère lourde pour un parasite obligatoire tel que l'oïdium, d'où notre intérêt pour les outils microsatellites dans le futur. Toutefois il est possible d'extraire des marqueurs spécifiques d'un caractère phénotypique et permet également l'analyse de flux gène entre différentes populations.

Les travaux réalisés confirment l'existence de deux groupes génétiquement distincts: biotypes A (I) et B (III) que l'on peut qualifier d'écotypes puisque leur différenciation génétique s'accompagne de différences phénotypiques (résistance, signe sexuel, mode de conservation).

Nous démontrons que les souches de l'écotype B qui peuvent se reproduire aisément dans la nature possèdent un plus fort pouvoir d'adaptation face aux pressions environnementales.

Nous disposons d'outils moléculaires qui permettent d'identifier, de détecter les différents biotypes mais également de caractériser leurs caractères phénotypiques, et donc d'outils permettant de suivre la résistance aux fongicides.

Il est possible d'établir en fonction des vignobles un bilan sanitaire des parcelles en identifiant le biotype à risque et son niveau de résistance aux fongicides, afin d'appliquer une meilleure protection raisonnée.

**REMERCIEMENTS** : Les auteurs remercient le département Santé des plantes et environnement de l'INRA, le Comité Interprofessionnel des Vins de Bordeaux et la région Aquitaine pour leur soutien financier. Nous remercions également l'ITV de Bordeaux (M Raynal) pour la mise à disposition des parcelles.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMRANI L., CORIO-COSTET M-F., 2003, Single nucleotide polymorphism (SNP) in  $\beta$ -tubulin gene distinguishes two ecotypes of *U. necator*: PCR assays and distribution in the vineyard. *Mycol Res.*, soumise.
- BOUSCAUT J., CORIO-COSTET M-F., 2003, Biodiversity of the powdery mildew : role of a retrotransposon discriminating by PCR genetic groups of *U. necator*. *Actualités œnologiques 2003, 7<sup>ème</sup> Symposium international, sous presse.*
- CORIO-COSTET M-F., STIEVENARD C., DELYE C., CHAPUIS C., DOUENCE L., 1997, Résistance de l'oïdium de la vigne aux fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols: reproduction sexuée, et caractérisations biologique et moléculaire. *ANPP, 5<sup>ème</sup> Conf. Int. sur les Maladies des Plantes* (Tours, 3-5 décembre) I, 463-470.
- CORIO-COSTET M-F., DOUENCE L., RICHART-CERVERA C, DELYE C., BARREAU C., MOROY S., 2000- Résistance de l'oïdium de la vigne aux fongicides : rôle de la biodiversité. *ANPP, 6<sup>ème</sup> Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes* (Tours, 3-5 décembre) II, 763-770
- DÉLYE C., LAIGRET F., CORIO-COSTET M-F., 1997a- Cloning and sequence analysis of the eburicol 14 $\alpha$ -demethylase gene of the obligate biotrophic grape powdery mildew fungus. *Gene*, 195, 29-33
- DÉLYE C., LAIGRET F., CORIO-COSTET M-F., 1997b- A mutation in the 14 $\alpha$ -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl. Envir. Microbiol.*, 63, 2966-2970.
- DÉLYE C., LAIGRET F., CORIO-COSTET M-F., 1997c- RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. *Phytopathology*, 87, 670-677
- DÉLYE C., CORIO-COSTET M-F., 1998- Origin of primary infections of grape powdery mildew *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminate two biotypes. *Mycol. Research*, 102, 283-288
- DÉLYE C., RONCHI V., LAIGRET F., CORIO-COSTET M-F., 1999- Nested allele-specific PCR distinguish genetic groups in *Uncinula necator*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3950-3954.
- EVANS K.J., WHISSON D.L., STUMMER B.E., SCOTT E.S., 1997, DNA markers identify variation in australian populations of *Uncinula necator*. *Mycol. Res.*, 101, 923-932.
- FRAAIJE B.A., BUTTERS J.A., COEHLO J.M., JONES D.R., HOLLOMON D.W., 2002, Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* sp tritici using quantitative allele-specific real time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathol.*, 51, 45-54.
- STEVA H., CLERJEAU M., 1990- Cross resistance to sterol biosynthesis inhibitor fungicides in strains of *U. necator* isolated from France and Portugal. *Med. Landbouww. Rijkuniv. Gent.*, 55, 983-988.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HOWES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUPIER M., ZABEAU M., 1995, AFLP: a new technique for DNA printing, *Nuc. Acid Res.*, 19: 861-866.