

**AFPP- 8^{ème} CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS - 5 ET 6 DECEMBRE 2006**

**RESISTANCE AUX QOIS DU MILDIU DE LA VIGNE (*PLASMOPARA VITICOLA*) :
ORIGINE ET DIVERSITE**

M.-F. CORIO-COSTET, F. DELMOTTE, F. MARTINEZ, X. GIRESSE, M. RAYNAL²,
S. RICHART-CERVERA, L. DOUENCE, M.-L. PANON¹, W.J. CHEN

INRA-Bordeaux, UMR Santé Végétale (1065, INRA-ENITA), ISVV, BP 81, 33883 Villenave
d'Ornon. France. ¹: CIVC, France, ²: ITV de Bordeaux, France,
contact : Coriocos@bordeaux.inra.fr.

RESUME :

La lutte contre le mildiou de la vigne à l'aide des fongicides Qols a rapidement conduit à des pertes d'efficacité dans les vignobles mondiaux. Grâce au séquençage complet du gène codant pour le cytochrome b (cible des Qols) et de marqueurs neutres (microsatellites), la présence d'une mutation ponctuelle ou SNP (G143A) dans le gène du Cyt b a été détectée, et la diversité du mildiou de la vigne a été étudiée. Deux groupes d'haplotypes mitochondriaux (M1, M2) répartis au sein d'une seule espèce de mildiou de la vigne en Europe pouvant présenter ou non la mutation 143 ont été mis en évidence. Aux USA, trois sous-espèces de mildiou ont été identifiées. La répartition des différents haplotypes a été réalisée au sein de populations de mildiou de vignobles Européens. 28% des populations sont résistantes aux Qols en début de saison dont l'origine correspond à au moins deux événements mutationnels indépendants. Une étude plus fine de l'évolution des populations révèle que les souches résistantes présentes sur une parcelle ne sont pas issues d'un seul clone, mais d'un grand nombre de génotypes différents pouvant ou non se multiplier de manière asexuée.

Mots-clés : Diversité, Cytochrome b, *Plasmopara viticola*, Qols, Résistance fongicide

SUMMARY :

RESISTANCE OF *PLASMOPARA VITICOLA* TO FUNGICIDES Qol: ORIGIN AND DIVERSITY

Decreased effectiveness in grape downy mildew control with Qois fungicides occurred quickly in European and recently in American vineyards. From the mitochondrial cytochrome b sequence of *Plasmopara viticola*, a single nucleotide polymorphism (SNP) (G143A) has been detected that conferred Qols resistance. Polymorphism studies of mitochondrial genome including *cyt b* gene showed that two different mitochondrial haplotypes coexisted in European vineyards exhibiting or not the SNP 143 belonging to one species of downy mildew. By contrast, three different sub-species of downy mildew were identified in the American vineyard. The distribution of haplotypes and resistance to Qols have been considered in 2003 or 2004 in French and European vineyards. The rate of Qol resistance was 28% of populations at the beginning of the growing season and at least two independant events have led to the emergence of Qols resistance.

Key-words : Diversity, Cytochrome b, Fungicide resistance, *Plasmopara viticola*, Qols fungicides

INTRODUCTION

Dès l'utilisation des Qols (strobilurines, famoxadone, fenamidone) en 1996 dans le vignoble, des phénomènes de résistance sont apparus rapidement au sein des populations de mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) (Genet et Vincent, 1999 ; Magnien *et al.* 2002, Wong et Wilcox, 2000 ; Gullino *et al.*, 2004). Ces fongicides inhibent le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et en particulier le complexe enzymatique du cytochrome bc1 (Andrieu *et al.*, 2001 ; Bartlett *et al.*, 2002 ; Jordan *et al.*, 1999, Wong et Wilcox, 2001). Dès le milieu des années 90, des isolats résistants ont été détectés dans les populations de pathogènes de nombreuses cultures (Avila-Adam et Köller, 2003 ; Ishii *et al.*, 2001 ; Gisi *et al.*, 2002 ; Heaney *et al.* 2000; Sierotski *et al.* 2000). Cette résistance résulte majoritairement de la présence de mutations ponctuelles dans le gène du Cytochrome b soit en position 143 par la substitution d'une glycine en alanine (G143A), soit par la modification d'un résidu phénylalanine en leucine en position 129 (F129L) (Grasso *et al.*, 2006).

Récemment différentes études permettent de quantifier la résistance à l'aide de méthodes quantitatives de biologie moléculaire (Mc Cartney *et al.*, 2003 ; Baumler *et al.*, 2003 ; Fraaije *et al.*, 2002), mais aucune étude n'aborde l'identification des souches résistantes, ni leur origine, ni leur dispersion.

C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier la diversité des populations de mildiou de la vigne à l'aide de marqueurs neutres (microsatellites) et sélectionnés (marqueur de résistance) afin de connaître l'origine des souches résistantes et leur capacité à envahir leur environnement. Des outils moléculaires issus du séquençage d'un fragment mitochondrial de 2528 nucléotides incluant le gène du Cytochrome b ont été mis au point et testés sur des populations de mildiou de la vigne européen et américain.

Les objectifs sont donc de comprendre quels mécanismes permettent aux pathogènes d'acquérir et de maintenir la résistance au niveau des populations, et d'appréhender la gestion de l'utilisation des fongicides en fonction des populations présentes et de leur potentiel évolutif. Ainsi les études développées doivent permettre, 1/ d'évaluer la diversité des souches résistantes aux Qols de *P. viticola* et d'identifier les mutations potentielles dans le gène du cytochrome b impliquées dans la résistance, 2/ d'évaluer l'origine des gènes de résistance (un ou plusieurs évènements indépendants), 3/ de quantifier la fréquence des gènes de résistance dans les populations de pathogènes, 4/ d'évaluer le niveau de dispersion des souches résistantes en développant des outils permettant d'aborder des études de démogénétique.

MATERIEL ET METHODES

Echantillonnage et suivi

Une trentaine d'isolats (population) ont été collectés en début d'épidémie, dans différents vignobles de France et d'Europe en 2003 et 2004 sur différentes parcelles. Ainsi, 23 populations proviennent du vignoble bordelais, 26 du vignoble champenois, 4 de la région de Loire, 2 de Bourgogne, 2 du Sud-ouest, 2 de la vallée du Rhône. Au niveau européen, nous avons collectés 3 populations espagnoles, 4 italiennes, 3 suisses, 4 allemandes, 1 grecque, et 4 d'Europe de l'Est. Les prélèvements ont été réalisés avant tout traitement fongicide. Pour le suivi de 2 populations en Champagne, environ 800 individus ont été récoltés sur deux parcelles : Chouilly (cépage Pinot Noir, non traitée, parcelles de 20 ceps x 15 rangs contiguës à une parcelle traitée) et Barbonne (Chardonnay, 8 ceps x 6 rangs, non traitée, implantée dans une parcelle traitée). Les échantillons ont été prélevés fin juin-début juillet, fin juillet-début août et début septembre de manière non destructive.

Test de sensibilité aux Qols

La méthode utilisée est proche de celle décrite par Genet et Vincent (1999). Des disques foliaires sont traités par pulvérisation avec une gamme de concentrations de famoxadone (0 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,08 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,5 ; 0,7 ; 0,9 ; 2 ; 5 ; 10 ; 100 ; 1000 ; 1500) puis inoculés par dépôt de 3 gouttes de 15 µl contenant 20 000 sporanges/ml. Le tout est placé dans des

boîtes de Pétri humidifiées mise en incubation à 22°C dans une chambre climatique. La croissance est évaluée 7 jours plus tard.

Marqueurs mitochondriaux

A partir d'une séquence de 2528 pb du génome mitochondrial obtenu au laboratoire (Chen *et al*, 2004, 2006) contenant le gène du cytochrome b, des amorces spécifiques ont été préparées afin d'amplifier la zone du gène incluant la mutation en 143. A l'aide de la méthode CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) nous identifions la présence ou non de la mutation 143 en utilisant une enzyme de restriction qui coupe après la mutation (*Sat I*) (Giresse, 2005). Ainsi les fragments digérés par l'enzyme sont séparés sur un gel d'agarose et selon le polymorphisme de taille des fragments, les souches sensibles (S) ou résistantes (R) sont détectées. Le même système appliqué sur un fragment plus long permet à l'aide de l'enzyme *Hinf1* d'identifier deux haplotypes mitochondriaux M1 et M2 indépendants de la présence ou non de la mutation en 143 (Chen *et al*, 2006). En combinant cette double approche, nous obtenons des profils permettant de détecter 4 haplotypes mitochondriaux chez *P. viticola* sensibles (M1-S, M2-S) ou résistants aux Qois (M1-R, M2-R) (Figure 1).

Figure 1 : Taille des différents fragments obtenus après digestion par les enzymes de restriction permettant d'identifier les différents haplotypes et de détecter la résistance. Identification of different mitochondrial haplotypes (resistant to QoI or not) by CAPS method.



Marqueur microsatellites

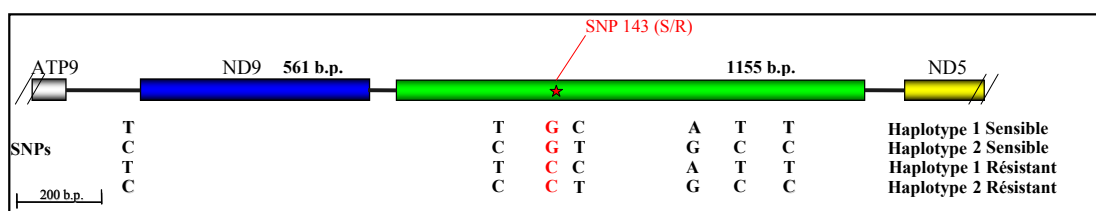
Huit marqueurs microsatellites ont été développés au laboratoire qui permettent aujourd'hui d'évaluer la diversité des isolats de mildiou. A partir d'amorces spécifiques pour chaque locus microsatellite, les différents allèles sont identifiés par passage sur un séquenceur automatique (Delmotte *et al.*, 2006).

RESULTATS

Diversité de l'ADN mitochondrial incluant le gène du *cyt b*

L'analyse de fragments d'ADN mitochondrial de 2528 pb incluant le gène du Cytochrome b (N° d'accension à la Genbank :DQ 459459 à DQ 45469) révèle la présence de deux haplotypes mitochondriaux caractérisés par la présence de 6 mutations permettant de différencier deux groupes (M1 et M2). De plus au sein de chaque haplotype, la mutation en position 143 (G143A) peut être présente ou non générant ainsi 4 haplotypes différents mitochondriaux (M1-S, M1-R, M2-S, M2-R) (figure 2)(Chen *et al.*, 2004, 2006).

Figure 2 : Représentation du fragment d'ADN mitochondrial étudié et séquences différenciant les différents haplotypes M1 et M2 et la mutation en position 143.
Schematic representation of mitochondrial DNA sequence used to identified different haplotypes



En utilisant le polymorphisme mitochondrial couplé à l'analyse de l'ADN ribosomique 28S sur des échantillons prélevés en Europe et aux Etats-Unis, l'existence d'une espèce Européenne et de 4 haplotypes mitochondriaux a été mise en évidence. Par contre, à partir d'échantillons prélevés dans la région des grands lacs aux Etats-Unis, nous identifions outre l'espèce européenne, trois nouvelles sous-espèces de mildiou de la vigne sur la base du polymorphisme de l'ADN mitochondrial et du 28S (Chen *et al*, 2004).

Résistance aux Qois et détection

La sensibilité à la famoxadone de 14 souches sensibles d'origine bordelaise appartenant aux deux haplotypes mitochondriaux (7 M1 et 7 M2) et de 14 souches résistantes (12 M1 et 2 M2) a été testée. Toutes les souches sensibles sont contrôlées par le QoI avec des CMI comprise entre 0,5 et 1 mg/L. A l'inverse, pour la totalité des souches résistantes la CMI est supérieure à 1500 mg/l. A l'aide de la méthode CAPS, les différents haplotypes sont identifiés et toutes les souches résistantes possèdent la mutation (G143A).

Répartition de la résistance et des haplotypes mitochondriaux dans différents vignobles

A l'aide des marqueurs mitochondriaux, nous avons évalué la répartition des différents haplotypes en 2003 et 2004 sur 59 populations de France et 19 d'Europe. Quelle que soit l'origine nous trouvons de 22% à 33% des individus résistants aux Qois en début de saison. La fréquence en France des deux haplotypes mitochondriaux M1 et M2 se répartie selon des proportions proches de 2/3 d'haplotype M1 pour 1/3 d'haplotype M2, à l'exception toutefois des populations champenoises où l'haplotype M2 est sous-représenté (10%).

Tableau I: Fréquence de la résistance aux Qois et des deux haplotypes mitochondriaux au sein de différentes populations.

QoI resistance and haplotype frequencies in different populations of *P. viticola*

Origine	année	Fréquence de résistance	Fréquence de d'haplotype M1	Fréquence de l'haplotype M2
Bordeaux	2003	0,29 ± 0,22	0,72 ± 0,07	0,28 ± 0,07
Champagne	2004	0,33 ± 0,21	0,90 ± 0,1	0,10 ± 0,08
France	2003	0,28 ± 0,21	0,75 ± 0,08	0,25 ± 0,08
Europe	2003	0,21 ± 0,22	0,79 ± 0,1	0,21 ± 0,11

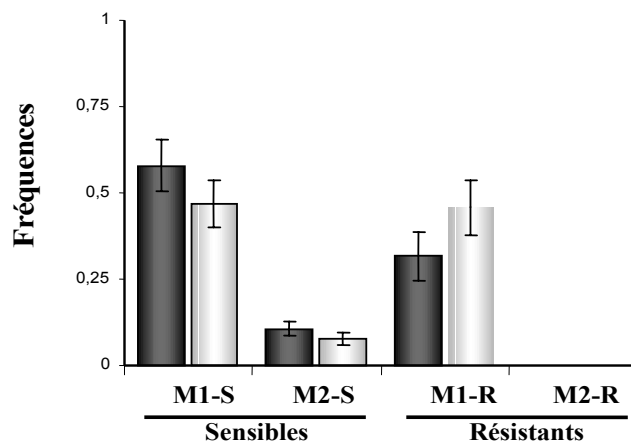
Au sein des populations bordelaises, nous détectons 46,9% de souches sensibles et 25,1% de souches résistantes appartenant à l'haplotype M1, et 24% de souches sensibles et 4% de souches résistantes appartenant à l'haplotype M2. Au niveau Européen les chiffres sont proches avec 59% d'haplotype M1-S, 20% de M1-R, 19% de M2-S et 2% de M2-R. Par contre en Champagne en 2004, nous obtenons, 58% de M1-S, 33% de M1-R, 10% de M2-S et 0% de M2-R. La majorité des souches résistantes appartiennent à l'haplotype M1. Toutefois, pour une résistance moyenne de 28% sur l'ensemble des populations, un calcul

théorique de répartition de la résistance au sein des deux haplotypes donne 21% de souches M1-R et 7% de souches M2-R. Or, sur l'ensemble des populations étudiées nous sommes systématiquement en dessous de ce 7% théorique, puisque les valeurs observées des fréquences de résistance de l'haplotype M2 sont comprises entre 0 et 4% de souches (F_q moyenne de souches résistantes d'haplotype M2 = 0,017).

A noter que la résistance est répartie de manière très inégale au sein des différentes parcelles étudiées dans chaque région. Ainsi nous trouvons des parcelles dans le bordelais ou le champenois, dans lesquelles la résistance est inexistante ou faible (entre 0 et 3%, données non montrées). A l'inverse certaines parcelles présentent dès le début de saison un fort taux de souches résistantes (60 à 80%). Afin d'estimer si cette situation est liée aux traitements effectués sur les parcelles les années précédentes, une étude de la fréquence de la résistance en fonction des parcelles traitées ou non a été réalisée sur les données des 23 populations de Champagne de 2004 (Figure 3).

Figure 3 - Fréquences des différents haplotypes mitochondriaux (M1-S, M2-R, M1-R, M2-R) sur les parcelles non traitées (*noir*) et traitées (*blanc*) aux Qols en 2003-2004 dans le champenois.

Mitochondrial haplotype frequencies in treated (white) and untreated (black) field plots in Champagne vineyard.



Les haplotypes M1-S et M2-S sont majoritaires chez les populations non traitées aux Qols en 2003 et 2004. Nous notons une différence significative pour les parcelles ayant subi des traitements à l'aide de Qols les années précédentes. Cependant, parmi les parcelles champenoises non traitées quelques unes présentent de la résistance. C'est notamment le cas d'une parcelle biologique avec 21% de résistance et de deux parcelles dites « non traitées » qui affichent des taux de résistance de 56,7 et 75,9%.

L'ensemble des populations a également été analysé à l'aide de marqueurs neutres de type microsatellites mis au point au laboratoire (Delmotte *et al.*, 2006) qui ont permis de réaliser une AMOVA hiérarchique afin de tester l'hypothèse selon laquelle les populations traitées sont moins différenciées entre-elles que les populations non traitées. A l'intérieur des populations l'indice de fixation $F_{st} = 0,14$ est significatif ($P < 10^{-5}$) et indique qu'au sein des populations il existe des sous-populations différenciées. 86% de la variabilité totale est due à la différenciation intra-populationnelle. Par contre, si l'on compare le groupe traité et non traité l'indice $F_{st} = 0,0014$ (NS) correspond à une variabilité de 0,14%. Ceci signifie que les populations d'un groupe ne sont pas plus semblables entre elles qu'elles ne diffèrent des populations de l'autre groupe. Globalement la différenciation entre les populations de Champagne est faible et il ne semble pas y avoir d'isolement par la distance entre les différentes populations qu'elles soient sensibles ou résistantes aux Qols.

Suivi de la résistance sur deux parcelles champenoises en 2004

Deux parcelles en Champagne ont été étudiées, afin d'évaluer l'évolution de la résistance et des génotypes en cours de saison. A l'aide des marqueurs microsatellites et

des marqueurs mitochondriaux précédemment décrits, l'évolution des populations a été suivi sur les parcelles non traitées l'année du prélèvement.

La majorité des génotypes appartient à des haplotypes sensibles M1-S ou M2-S. Nous notons l'absence totale de souches M2-R et la présence de souches M2-S en faible proportion de 13 à 25% sur Barbonne en fonction des dates de prélèvements et de 0 à 4% sur la parcelle de Chouilly (Tableau II). A noter également le taux moyen de souches résistantes de 13% sur la parcelle de Barbonne et de 24% à Chouilly. La parcelle de Barbonne est moins résistante que la parcelle de Chouilly. Toutefois sur la parcelle de Barbonne une augmentation sensible (d'un facteur 3) du nombre d'isolats résistants est observée lors du deuxième prélèvement. La fréquence des deux haplotypes mitochondriaux est également différente sur les deux parcelles : 0,75 à 0,87 d'haplotype M1 à Barbonne et de 0,63 à 1 à Chouilly

Tableau II : Distribution des différents haplotypes de *P. viticola* sur deux parcelles champenoises

Haplotype frequencies of *P. viticola* in two field plots in Champagne.

	N	Fréquence haplotype M1		Fréquence haplotype M2		Fréquence des totale de chaque haplotype	
		M1-S	M1-R	M2-S	M2-R	M1	M2
Barbonne							
Date 1	36	0,80	0,06	0,14	0	0,86	0,14
Date 2	111	0,67	0,20	0,13	0	0,87	0,13
Date 3	130	0,62	0,13	0,25	0	0,75	0,25
Chouilly							
Date 1	226	0,72	0,26	0,02	0	0,98	0,02
Date 2	148	0,77	0,16	0,07	0	0,93	0,07
Date 3	145	0,70	0,30	0	0	1	0

Les prélèvements collectés sur les deux parcelles ont été analysés à l'aide de marqueurs neutres pour les deux premières dates de prélèvements. La troisième date n'a pas été utilisée car plus de 60% des échantillons sont des mélanges de souches rendant impossible l'analyse avec ces marqueurs (tableau III).

Tableau III : Diversité, clonalité et fréquences des génotypes sur les deux parcelles champenoises.

Diversity, clonality and genotype frequencies in two field plots in Champagne

	N	G/N	N _{clone}	M _{repet} /N	Fq-	Fq-R
					généotypes communs à deux dates	clones résistants
Barbonne						
Date 1	43	0,53	8	3,87	0,41	0,03
Date 2	85	0,61	12	3,92		0,15
Chouilly						
Date 1	175	0,39	21	4,9	0,51	0,19
Date 2	100	0,56	10	3,7		0,18

G/N : nombre de génotypes différents divisé par le nombre d'individus analysés

N_{clone} : nombre de souches clonales répétées au minimum deux fois.

M_{repet}/N : nombre moyen de répétition d'un génotype clonal

Fq-généotypes communs à deux dates : fréquence des génotypes retrouvés aux deux dates de prélèvements.

Fq-R : fréquence de clones résistants trouvés au sein des souches clonales (trouvés au moins deux fois)

L'examen de la diversité (G/N) met en évidence une diversité plus importante sur la parcelle de Barbonne en début de saison avec 53% des isolats récoltés différents, contre seulement 39% sur la parcelle de Chouilly. Cette diversité augmente sensiblement de +17% sur la parcelle de Chouilly entre les deux dates et pourrait être reliée à un début d'épidémie rapide et intense avec un grand nombre de clones répétés (21). Ce facteur conduirait à une diminution du G/N. A noter que lors du premier prélèvement sur Barbonne tous les symptômes de mildiou ont été prélevés de manière non destructive et 0,5% des feuilles étaient attaquées. A l'inverse, à Chouilly l'échantillonnage n'a pas été exhaustif suite à l'importance de la maladie à cette date, 4% des feuilles étaient attaquées.

Sur les deux parcelles, quelques génotypes sont clonaux avec un nombre de répétitions moyen de 4 qui peut être très variable. La majorité des clones sont répétés entre 2 à 6 fois et quelques génotypes dominants peuvent être répétés un grand nombre de fois (ex : 31 fois à Chouilly).

La spatialisation des génotypes révèle qu'un même génotype peut être présent sur un même cep, dans un même rang sur des ceps différents, mais également sur des rangs différents. Sur l'ensemble des génotypes 41% à 51% sont communs à deux dates.

La proportion de clones sensibles et résistants aux Qols reste constante entre les deux dates sur la parcelle de Chouilly, mais augmente d'un facteur 5 sur la parcelle de Barbonne. Cette augmentation de la fréquence de clones résistants, ainsi que l'augmentation globale de la résistance sur cette parcelle en cours de saison (X 3, tableau II) peut être le reflet de la situation de cette parcelle non traitée située au milieu d'une parcelle traitée.

L'étude de la différenciation des populations entre les deux parcelles révèle que les deux populations de Barbonne et Chouilly sont faiblement différenciées. En effet l'indice de différenciation F_{st} est de 0,016, soit 1,6% de différenciation entre ces deux populations. Ce résultat peut être interprété comme l'existence d'un fort flux de gènes qui s'opère entre les populations et se traduit par une homogénéisation des populations dans le champenois.

CONCLUSION-DISCUSSION

A partir du séquençage d'un fragment d'ADN mitochondrial de 2528 pb, des marqueurs spécifiques de la résistance aux fongicides Qois et des marqueurs de la diversité mitochondriale ont été mis au point. Ils permettent aujourd'hui d'identifier 4 haplotypes mitochondriaux (M1-S, M1-R, M2-S et M2-R) d'une espèce de *P. viticola* en Europe (Chen *et al.*, 2004, 2006). Parmi la soixantaine de souches résistantes séquencées, toutes présentent la même mutation ponctuelle (SNP) en position 143 du gène du Cytochrome b ou un résidu glycine est remplacé par un résidu alanine (G143A). Cette mutation est parfaitement corrélée avec un fort niveau de résistance des souches de *Plasmopara viticola* aux fongicides Qols (FR > 1500). La présence de cette mutation en position 143 est en accord avec les travaux de la littérature concernant la résistance des champignons phytopathogènes (Avila-Adam et Köller, 2003 ; Kim *et al.*, 2003 ; Ishii *et al.*, 2001 ; Ma et Michailides, 2005). Une autre mutation peut être impliquée dans la résistance c'est notamment le cas d'une mutation en 129 (F129L) qui conférerait cependant un niveau de résistance moindre (Grasso *et al.*, 2006). Cette mutation n'a pas été trouvée dans les souches que nous avons séquencées de *P. viticola*. De plus, nous n'avons pas isolé de souche de mildiou de la vigne présentant une sensibilité intermédiaire aux Qois. Les quelques cas de souches présentant des CI_{50} comprises entre 10 et 1000 mg/l se sont avérés être des mélanges de souches sensibles et résistantes. Ce point est aisément vérifiable avec les marqueurs microsatellites.

Au cours d'études de phylogéographie par séquençage de l'ADNr 28 S et de 2528 pb du génome mitochondrial, une diversité plus importante du mildiou de la vigne a été mise en évidence dans son bassin d'origine (le continent américain), où trois nouvelles sous-espèces ont été identifiées (Chen *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2006).

Grâce aux marqueurs neutres microsatellites (Delmotte *et al*, 2006), il est possible aujourd'hui d'évaluer la diversité allélique des populations de mildiou. Si des travaux récents font état d'études épidémiologiques à l'aide de marqueurs microsatellites (Gobbin *et al*, 2005), aucune étude n'a entrepris de combiner l'utilisation de marqueurs neutres (microsatellites) et de marqueurs sélectionnés (SNP impliqué dans la résistance). Les résultats obtenus montrent que la diversité génotypique du mildiou est forte en début de saison. Ce point est en accord avec le cycle biologique du mildiou et la germination d'oeufs d'hiver en début de saison issus de la reproduction sexuée. Il est nécessaire de le pondérer en fonction de la précocité de l'épidémie et de la multiplication asexuée potentielle qui peut s'effectuer sur une parcelle dès le début de saison. Comme le montre la parcelle de Chouilly, où le nombre de répétitions des clones est plus important en début de saison que sur la parcelle de Barbonne. Selon la parcelle nous observons ou non une augmentation du nombre de génotypes en cours de saison. C'est notamment le cas pour la parcelle de Chouilly. Ce fait peut être la conséquence soit d'un apport de nouveaux génotypes sur la parcelle suite à des conditions favorables (période pluvieuse du 15 au 22 juillet) qui ont précédé le deuxième prélèvement, soit du à la projection d'oospores tardives comme suggéré par l'équipe Suisse, ou encore à la présence discrète de génotypes présents à la première date mais en cours de développement et donc non détectés. Concernant l'hypothèse d'une projection tardive d'oospores ce point nécessite d'être validé en champagne, sachant que dans le Bordelais après 10 ans d'études sur la projection des oeufs d'hiver de mildiou dès fin juin la totalité des projections est réalisée (G Froidefond, comm. pers.). Ces trois hypothèses ne sont pas exclusives.

Concernant la résistance, les allèles de résistances sont portés par des individus présentant des génotypes différents, et d'une parcelle à une autre ce niveau de résistance peut être variable. Néanmoins, la fréquence moyenne de la résistance au niveau Européen est de l'ordre de 28% en début de saison. Au niveau des populations champenoises traitées ou non l'année précédant la collecte de 2004, il semble que la fréquence moyenne de résistants atteignent 49,5% sur les parcelles traitées aux Qols et 22,6% sur les parcelles dites « non traitées ». Il existe cependant une très grande variabilité qui peuvent s'expliquer : soit les parcelles dites « non-traitées » ont reçu des Qols (ex : anti-oïdiums) qui participeraient à la sélection des souches résistantes, soit le mildiou migre sur de grande distances et les parcelles non traitées sont contaminées par des individus des parcelles traitées voisines, ou des traitements ont eu lieu les années antérieures et après reproduction sexuée les souches résistantes se maintiennent sur les parcelles dans les populations ce qui suggérerait un bon fitness des souches résistantes. Ce dernier point irait à l'encontre des données actuelles de la littérature (Genet *et al*, 2006).

L'utilisation combinée pour la première fois de marqueurs neutres et sélectionnés sur des populations de mildiou de la vigne *in natura* apporte des données inédites sur la dynamique des populations des souches résistantes. Ainsi nous démontrons qu'il ne s'agit pas d'une parcelle envahie par un isolat résistant, mais de la présence d'un grand nombre d'isolats résistants pouvant ou non être présents à l'état de clones. Il serait intéressant à l'aide des différents outils neutres et sélectionnés de combiner des études de suivi de la résistance et de suivi épidémique afin de mieux appréhender le poids des souches résistantes dans les épidémies, mais également de mieux comprendre leur capacité à se disperser.

Pour conclure :

- 1/ Une mutation en 143 du gène du cytochrome b (G143A) est responsable e la résistance chez *P. viticola*,
- 2/ Il existe 4 haplotypes mitochondriaux du mildiou de la vigne en Europe et une espèce,
- 3/ Il existe plusieurs sous-espèces de mildiou aux Etats-Unis (4),
- 4/ La répartition des deux haplotypes mitochondriaux M1 et M2 est variable selon les régions (peu de M2 en Champagne) et l'haplotype M1 est largement majoritaire,
- 5/ Il existe au moins deux origines indépendantes à l'apparition de la résistance aux Qois en Europe (M1-R et M2-R),

6/ En début de saison en 2003 et 2004 la fréquence moyenne des gènes de résistance sur le vignoble européen est de 28%,

7/ Il existe un lien entre la présence de souches résistantes et les traitements avec des Qols,

8/ Grâce aux marqueurs microsatellites, il est possible d'identifier, spatialiser et de suivre une souche sensible ou résistante sur une parcelle et de réaliser de études spatio-temporelles,

9/ La présence de la résistance sur une parcelle ne résulte pas de la présence d'un clone résistant qui se disperse mais de plusieurs individus génétiquement distincts.

A l'avenir il s'agira de mieux comprendre comment le taux de résistance peut augmenter en cours de saison, si nous voulons parvenir à modéliser le développement de la résistance au vignoble. Des études d'appareillement des souches entre elles au sein des parcelles sont en cours (Delmotte et al, 2006) et nous tentons d'évaluer la persistance des souches résistantes au vignoble en étudiant leur fitness et leur compétitivité.

REMERCIEMENTS : Les auteurs remercient le personnel de l'ITV, de l'ETH de Zurich et du CIVC pour leurs aides et leurs participations aux collectes. Nous remercions également, l'ITV, le CIVC, La Région Aquitaine et l'INRA pour leurs soutiens financiers.

BIBLIOGRAPHIE

- Andrieu N., Jaworska G., Genet J.L., Bompeix G. 2001- Biological mode of action of famoxadone on *Plasmopara viticola* and *Phytophthora infestans*. *Crop Protection*, 20, 253-260.
- Avila-Adam C., Köller W., 2003 - Characterization of spontaneous mutant of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo- inhibiting fungicide azoxystrobin. *Current genetics*, 42, 3332-3338.
- Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobrzanski B.P., 2002 – The strobilurin fungicides. *Pesticide Management Science*, 58, 649-662.
- Baumler S., Sierotzki H., Gisi U., Mohler V., Feselstein F.G., Schwarz G, 2003 - Evaluation of *Erysiphe graminis* f sp *tritici* field isolates for resistance to strobilurin fungicides with different SNP detection systems. *Pesticide management science*, 59, 310-314.
- Delmotte F., Chen W.-J., Richard-Cervera S., Greif C., Papura D., Giresse X., Mondor-Genson G., and Corio-Costet M.-F. 2006 - Microsatellite loci from the grape downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 379-381.
- Delmotte F., Martinez F., Némorin A., Chen W.J., Richart-Cervera S., Corio-Costet M.-F., 2006 - Spatial genetic structure of grapevine downy mildew epidemic . 5th Int. Workshop on Grapevine downy and powdery mildews (San Michele, 18-23 june).
- Chen W.J., Delmotte F., Richart S., Douence L., Greif C., Corio-Costet M-F., 2006 - A rapid adaptation to QoI fungicides in grapevine downy mildew populations in France. Soumis à *Applied Environmental Microbiology*.
- Chen W.J., Delmotte F., Richart-Cervera S., Douence L., Caroli R., Ménaouli S., Corio-Costet M-F., 2004 - Evolution of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. In: 8th Evolution and biology Meeting (Marseille, 22-24 sept., France).
- 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* f sp *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR green I. *Plant pathology*, 41, 45-54.

- Giresse X., 2005 - Adaptation d'un pathogène à la pression fongicide: le cas de *Plasmopara viticola*, l'agent du mildiou de la vigne. Rapport de master Biologie-Santé, option: microbiologie-immunologie, Université de Bordeaux 2, pp. 20.
- Genet J.-L., Vincent O., 1999 - Sensitivity to famoxate of European *Plasmopara viticola* populations. *Medelingen Faculteit Landbouw. University Gent*, 64, 559-564.
- Genet J.L., Jaworska G., Deparis F., 2006 – Effect of dose rate and mixtures of fungicides on selection for QoI resistance in populations of *Plasmopara viticola*. *Pesticide management Science*, 62, 188-192.
- 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 Pathology*, 54, 522-534.
- Gisi U., Sierotzki H., Cook A., Mc Caffery A., 2002 - Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pesticide Management Science*, 58, 859-867.
- Grasso V., Palermo S., Sierotzki H., Garibaldi A., Gisi U. 2006 - Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pesticide management science*, 62, 465-472.
- Gullino M.L., Gilardi G., Tinivella F., Garibaldi A., 2004 - Observations on the behaviour of different populations of *Plasmopara viticola* resistant to QoI fungicides in Italian vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 341-350.
- Heaney S.P., Hall A.A., Davies S.A., Olaya G., 2000 - Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives, *Proc. BCPC Brighton Conf. Pest and diseases*, pp 755-764.
- Ishii H., Fraaije B.A., Sugiyama T., Noguchi K., Nishimura K., Takeda T., Amano T., Hollomon D.W. 2001 - Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*, 91, 1166-1171.
- Jordan D.B., Livingston R.S., Bisaha J.J., Duncan K.E., Pember S.O., Picollelli MA., Schwartz R.S., Sternberg J.A., Tang X., 1999 – Mode of action of famoxadone. *Pesticide Science*, 55, 105-108.
- Kim Y.S., Dixon E.W., Vincelli P., Farman M.L., 2003 - Field resistance to strobilurin (Qoi) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology*, 93, 891-900.
- Ma Z., Michailides T.J., 2005 – Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop protection*, 24, 853-863.
- Mc Cartney H.A., Foster S.J., Fraaije B.A., Ward E. 2003 - Molecular diagnosis for fungal plant pathogens. *Pesticide management science*, 59-129-142.
- Magnien C., Micoud A., Galin M., Remusson F., 2002 – La résistance du mildiou de la vigne aux Qoi. Plan de surveillance et essais de comportement en 2002. 7th Int. Conf. on plant diseases, Tours, CD ROM. pp 8.
- Sierotzki H., Wullschleger J., Gisi U. 2000 - Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and physiology*, 68, 107-112.
- Wong F.P., Wilcox W.F., 2000 – Distribution of baseline sensitivities to azoxystrobin among isolates of *Plasmopara viticola*. *Plant disease*, 84, 275-281.
- Wong F.P., Wilcox W.F., 2001 – Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb and metalaxyl against *Plasmopara viticola*. *Plant disease*, 85, 649-656.