

Résultats des séquençages du cytochrome b de *Plasmopara viticola* sur échantillons prélevés en 2010 et 2011

I.	Séquençage d'échantillons issus de tests 2010, congelés puis repiqués en 2011	2
1.	Séquençage des échantillons classés résistants cyazofamid en 2010 (10-287,10-299 et 10-327)	2
a.	Echantillon 10-287	2
•	Historique 10-287	2
•	Résultat du séquençage 10-287	2
b.	Echantillon 10-299	3
•	Historique 10-299	3
•	Résultat du séquençage 10-299	3
c.	Echantillon 10-327	3
•	Historique 10-327	3
•	Résultat du séquençage 10-327	4
2.	Séquençage des échantillons classés sensibles Qil en 2010 (10-305 et 10-306)	4
a.	Echantillon 10-305	4
•	Historique 10-305	4
•	Résultat du séquençage 10-305	5
b.	Echantillon 10-306	5
•	Historique 10-306	5
•	Résultat du séquençage 10-306	5
3.	Conclusion sur les échantillons 2010	6
II.	Séquençage d'échantillons issus de tests 2011	6
1.	Echantillon 11-96	6
•	Historique 11-96	6
•	Résultat du séquençage 11-96	7
c.	Echantillon 11-345	7
•	Historique 11-345	7
•	Résultat du séquençage 11-345	8
d.	Echantillon 11-352	8
•	Historique 11-352	8
•	Résultat du séquençage 11-352	8
III.	Conclusion générale sur le séquençage	9
	Annexe 1 : détails des prélèvements effectués pour le séquençage	10
	Annexe 2 : MILDIOU 2012 CYAZOFAMID et AMILSULBRON	11

La zone séquencée est la **portion du gène du cytochrome b** contenant le site de fixation des Qil (Grasso *et al*, 2006) (n° d'accension GenBank : DQ209286) mais également le site de fixation des Qol chez *Plasmopara viticola*. Le séquençage se fait en « sens et reverse » pour pallier au problème de « bégaiement » de la Taq (lié à une zone du gène très riche en T). Le détail des prélèvements effectués pour le séquençage se trouve en annexe 1.

I. Séquençage d'échantillons issus de tests 2010, congelés puis repiqués en 2011

Les analyses sur les échantillons 2010 ont été réalisées sur cinq populations : trois classées résistantes lors des tests biologiques effectués en 2010 vis-à-vis de la cyazofamid (10-287, 10-299 et 10-327) et une classée sensible (10-305) ainsi qu'une population prise au hasard dans la collection de 2010 qui n'avait pas fait l'objet d'un test cyazofamid en 2010 (10-306).

1. Séquençage des échantillons classés résistants cyazofamid en 2010 (10-287,10-299 et 10-327)

a. Echantillon 10-287

• Historique 10-287

Pour cet échantillon (origine : essai MP, modalité 5), les spores ont été prélevées une première fois sur les repiquages ayant servi au test du 25/03/11 et une deuxième fois sur les repiquages ayant servi au test du 08/04/11 (figure 1), Dans les deux cas, ces repiquages avaient été réalisés sur milieu non amendé en cyazofamid.

A noter que les résultats du test de résistance effectué en 2010 faisaient apparaître 36% de sporulation à la dose 100 mg/L de cyazofamid.

Figure 1 : Historique de l'échantillon 10-287

2010			2011						
numéro échantillon 2010	nombre de repiquages après réception de l'échantillon	Test de Résistance cyazofamid du 4/11/2010	Date de Décongélation	repiquages	Résultats séquençage (25/03)	Test du 25/03/2011	repiquages	Résultats séquençage (08/04)	Test du 8/04/2011
10-287	6	T +	02/03/2011	3	G143A	T +	1	G143A	T +
		C100 + 36%							C1 -
									C10 -
									C100 -
									Test du 20/05/2011
									Cyazo gamme complète: Sensible
						C1 +	4 + 2 sur boîtes traitées C1		Ametoc gamme complète: Sensible
						C10 -			
						C100 -			

Légende : T + ou Cx + = sporulation observée sur cette dose

T - ou Cx - = pas de sporulation sur cette dose

Résultats des tests

Historique des repiquages

Séquençage

• Résultat du séquençage 10-287

Des deux séquençages effectués à 2 dates différentes sur des sporulations issues de boîtes non amendées, il ressort que l'échantillon 10-287 présente 100% d'identité avec la séquence DQ459466.1 *Plasmopara viticola* **haplotype Eu IR**. Il possède la mutation G143A.

b. Echantillon 10-299

• Historique 10-299

Pour cet échantillon (origine MP), les spores ont été prélevées sur les repiquages ayant servi au test du 08/04/2011 (figure 2). Comme pour l'échantillon précédent, ces repiquages avaient été réalisés sur milieu non amendé en cyazofamid.

A noter que les résultats du test de résistance effectué en 2010 faisaient apparaître 86% de sporulation à la dose 100 mg/L de cyazofamid.

Figure 2 : Historique de l'échantillon 10-299

2010			2011					
numéro d'échantillon 2010	nombre de repiquage après réception de l'échantillon	Test de résistance cyazofamid du 24/11/2010	Date de Décongélation	repiquages	Test du 25/03/2011	repiquages	résultats du séquençage (08/04)	Test du 8/04/2011
10-299	7	T +	07/02/2011	6	T +	1	G143A	T +
		C100 +			C1 -			C1 -
		86%			C10 -			C10 -
					C100 -			C100 -

Légende : T + ou Cx + = sporulation observée sur cette dose

T - ou Cx - = pas de sporulation sur cette dose

Résultats des tests

Historique des repiquages

Séquençage

• Résultat du séquençage 10-299

L'échantillon 10-299 séquençé présente 100% d'identité avec la séquence DQ459466.1 *Plasmopara viticola* haplotype Eu IR. Il possède la mutation G143A.

c. Echantillon 10-327

• Historique 10-327

Pour l'échantillon 10-327 (origine : essai PC, modalité 5), un premier prélèvement a été effectué le 16/05/11 sur une boîte issue d'une boîte témoin suivie de repiquages successifs sans pression de sélection QiI.

Deux autres prélèvements de spores ont été réalisés, l'un le 13/05/11, l'autre le 09/06/11, sur les boîtes de repiquages successifs à partir de sporulations qui provenaient, à l'origine, d'une boîte traitée cyazofamid à 100 mg/L (C100) du 25/03/11 (figure 3).

A noter que les résultats du test de résistance effectué en 2010 faisaient apparaître 65% de sporulation à la dose 100 mg/L de cyazofamid.

Figure 3 : Historique de l'échantillon 10-327

2010			2011								
numéro échantillon 2010	nombre de repiquages après réception de l'échantillon	Test de résistance cyazofamid du 24/11/2010	Date de Décongélation	repiquages	Test du 25/03/2011	repiquages	Résultats du séquençage	Test	Test du 15/04/2011	repiquages	Résultats séquençage
10-327	6	T+	07/02/2011	6	T +	1	08/04/2011	T +	T +	→ 5	G143A (témoin du 16/05/11)
		C100+ 65%				C1 -		C1 -			
						C10 -		C10 -			
						C100 -		C100 -			
		C1 +	6/05/11 et 13/05/11 : repiquages sur boîtes témoin et traitées C1, C10 et C100 : Négatif		20/05/2011	Cyazo gamme complète Sensible		→ 4			
						Ametoc gamme complète Sensible					
		C10 +	1 repiquage --> Echec								
		C100 +	6/05/11 et 13/05/11 : repiquages sur boîtes témoin et traitées C1, C10 et C100 : Négatif	G143A (Témoin du 13/05/11)	20/05/2011	Cyazo gamme complète Sensible		→ 5	G143A (09/06/12)		
						Ametoc gamme complète Sensible					

Légende : T + ou Cx + = sporulation observée sur cette dose T - ou Cx - = pas de sporulation sur cette dose

Résultats des tests

Historique des repiquages

Séquençage

• Résultat du séquençage 10-327

L'échantillon 10-327 présente 100% d'identité avec la séquence DQ459466.1 *Plasmopara viticola* haplotype **Eu IR (cf annexe 4)**. Il possède la mutation G143A que ce soit à partir de spores ayant poussé sur une boîte témoin issue de repiquages sans pression de sélection Qil ou sur une boîte de repiquage issue de repiquages successifs de spores à partir d'une boîte traitée C100.

2. Séquençage des échantillons classés sensibles Qil (10-305 et 10-306)

a. Echantillon 10-305

• Historique 10-305

Pour l'échantillon **10-305** (origine Auvergne), les spores ont été prélevées pour séquençage le 08/04/2011 sur une boîte témoin après 6 repiquages (figure 4 et 5).

Figure 4 : Historique de l'échantillon 10-305

2010			2011						
numéro échantillon 2010	nombre de repiquages après réception de l'échantillon	Test de résistance du 21/10/2010	Date de Décongélation	repiquages	Test du 25/03/2011	Résultats séquençage 08/04	repiquages	Test du 20/05/2011	repiquages
10-305	3	T+	23/02/2011	4	T+ →	G143A	6	Cyazo gamme complète: Sensible	4
		C0,1+ 3%			C1 -			Ametoc gamme complète: Sensible	
					C10 -				
					C100 -				

Légende : T + ou Cx += sporulation observée sur cette dose T - ou Cx - = pas de sporulation sur cette dose

Résultats des tests

Historique des repiquages

Séquençage

• Résultat du séquençage 10-305

L'échantillon 10-305 présente 100% d'identité avec la séquence DQ459466.1 *Plasmopara viticola* haplotype Eu IR. Il possède la mutation G143A, caractéristique de la résistance aux Qols.

b. Echantillon 10-306

• Historique 10-306

Pour l'échantillon 10-306 (origine Auvergne), dont le test de résistance réalisé en 2011 permet de le classer parmi les échantillons sensibles à la cyazofamid, les spores ont été prélevées pour séquençage le 08/04/2011 sur une boîte témoin après 6 repiquages (figure 4 et 5).

Figure 5 : Historique de l'échantillon 10-306

2010			Tests 2011						
numéro échantillon 2010	nombre de repiquage après réception de l'échantillon	Test de résistance 2010	Date de Décongélation	repiquages	Test du 25/03/2011	Résultats séquençage (8/04)	repiquages	Test du 20/05/2011	Nombre de repiquages
10-306	7	Pas de test Qil sur cet échantillon (uniquement iprovalicarbe)	02/03/2011	3	T+ →	G143A	6	Cyazo gamme complète: Sensible	4
					C1 -			Ametoc gamme complète: Sensible	
					C10 -				
					C100 -				

Légende : T + ou Cx += sporulation observée sur cette dose T - ou Cx - = pas de sporulation sur cette dose

Résultats des tests

Historique des repiquages

Séquençage

• Résultat du séquençage 10-306

L'échantillon 10-306 séquençé présente 100% d'identité avec la séquence DQ459466.1 *Plasmopara viticola* haplotype Eu IR. Il possède la mutation G143A, caractéristique de la résistance aux Qols.

3. Conclusion sur les échantillons 2010

La comparaison entre les séquences des prélèvements sensibles (10-305 et 10-306) et résistants (10-287, 10-299 et 10-327) en tests biologiques Qil ne fait apparaître aucune différence entre les séquences : tous les prélèvements soumis au séquençage montrent la présence de la mutation G143A, mais aucune mutation sur la séquence ciblée susceptible d'entraîner la résistance de cible aux Qil.

Il faut cependant noter que, pour les trois échantillons trouvés résistants Qil en tests biologiques en 2010, le séquençage n'a pu être réalisé que sur des sporulations :

- soit issues de boîtes de test Témoin,
- soit issues initialement de boîtes amendées en cyazofamid mais séquencées après plusieurs repiquages sur milieu non amendé.

Par ailleurs, il s'agit de populations prélevées et testées en 2010 puis ayant subi une congélation avant d'être « réactivées » avec plusieurs repiquages successifs, avant d'être à nouveau testées et enfin séquencées.

II. Séquençage d'échantillons issus de tests 2011

Trois échantillons ont été séquencés.

L'échantillon 11-96 (Franche Comté) est issu d'un prélèvement 2011 sur une parcelle qui s'était révélée résistante en 2010 (10-302 : 2% de sporulation à la dose 10 mg/L, CMI=100) (Figure 6).

Cet échantillon 11-96 a été détecté résistant dès le premier test de résistance cyazofamid réalisé en 2011 (avec une CMI > 100 : 2% de sporulation à 100 mg/L).

Un **autre échantillon de France Comté, le 11-345** est issu d'une parcelle testée uniquement en 2011 ; il en est de même pour **l'échantillon 11-352** issu d'une parcelle de Bourgogne (Figures 7 et 8).

L'échantillon 11-345 a lui-aussi été détecté résistant dès le premier test de résistance cyazofamide réalisé en 2011 (avec une CMI > 100 : 4% de sporulation à 100 mg/L).

L'échantillon 11-352 a été détecté comme sensible avec une CMI égale à 1 (1% de sporulation à 0,1 mg/L).

1. Echantillon 11-96

• Historique 11-96

Plusieurs prélèvements de spores ont été effectués en vue de séquençage.

Le 29/07/2011, un prélèvement de spores a été fait sur une boîte amendée en cyazofamid à la dose 100 mg/L. Ce prélèvement a été séquençé le 02/08/2011.

Le 30/09/2011, quatre prélèvements issus d'un test biologique (23/09/11) ont été réalisés :

- un issu d'une boîte témoin
- un issu d'une boîte témoin avec sham
- un issu d'une boîte amendée en azoxystrobine
- un issu d'une boîte amendée en azoxystrobine avec sham

Tous ces échantillons ont été séquencés le 03/10/2011.

N.B. : aucun séquençage n'a pu être réalisé sur les boîtes amendées en cyazofamid car aucune sporulation n'a été observée sur ces boîtes aux concentrations de 1, 10 ou 100 mg/L.

Figure 6 : Historique de l'échantillon 11-96

2010		2011								
numéro échantillon 2010	résultats tests 2010	numéro échantillon 2011	repiquages	test du 15/07/2011	résultats du séquençage (29/07)	repiquages	Test du 26/08/2011	repiquages	Test du 23/09/2011	résultats du séquençage (30/09)
10-302	2% à C10 CMI = 100	11-96	1	T+	spores congelées et conservées					
				C100 + 2%	pas de mutation G143A					
				C1+ et C10+		→ 5	T+	3	T sans sham +	G143A
							C0,1 -		T sham +	G143A
									Az +	G143A
									Az sham +	G143A
									C -	
									C sans sham -	

Légende : T + ou Cx + = sporulation observée sur cette dose T - ou Cx - = pas de sporulation sur cette dose

Résultats des tests

Historique des repiquages

Séquençage

N.B. : doses utilisées lors du test du 23/09/2011 :

- azoxystrobine = dose discriminante 10 mg/L ;
- cyazofamid = gamme de doses de 0,1 à 100 mg/L (raison = 10) ;
- sham = 80 mg/L

• Résultat du séquençage 11-96

Pour le prélèvement de spores fait le 29/07/11 sur une boîte amendée en cyazofamid à la dose 100 mg/L, le séquençage révèle un échantillon avec une séquence identique à 100 % à la séquence DQ459465.1 **Plasmopara viticola haplotype Eu IS** (cf annexe 5). Ce résultat montre donc que **ce premier prélèvement ne possède pas la mutation G143A** qui confère la résistance aux QoI.

Tous les autres prélèvements réalisés le 30/09/11 correspondent à 100% à la séquence DQ459466.1 (**Plasmopara viticola haplotype Eu IR**). Ils possèdent donc la mutation G143A ce qui fait apparaître une réelle différence par rapport au résultat obtenu directement sur la boîte amendée à 100 mg/L. L'hypothèse qui peut être faite pour expliquer cette divergence est que les prélèvements du 30/09 (même s'ils sont issus d'un même échantillon de départ que le prélèvement du 29/07) ont connu un historique différent (ils sont notamment issus de concentrations à 1 ou 10 mg/L (et non à 100 mg/L) du test du 15/07 ; ils ont de plus, connu plusieurs repiquages successifs sur milieu non amendé). La différence de réponse au séquençage pourrait donc s'expliquer par le fait que le deuxième séquençage (du 30/09) a été réalisé sur une population de spores ayant un historique un peu différent de celle prélevée sur la boîte à la concentration 100 mg/mL.

c. Echantillon 11-345

• Historique 11-345

L'échantillon a été prélevé le 18/10/11 après un test cyazofamid, où l'échantillon a poussé à toutes les doses jusqu'à la dose 100 mg/L. Ce sont les spores prélevées sur la dose 100 mg/L qui ont été séquencées.

Figure 7: Historique de l'échantillon 11-345

numéro échantillon 2011	nombre de repiquage après réception de l'échantillon	Test du 7/10/2011	Résultats du séquençage (18/10)	repiquages	Test du 4/11/2011	repiquages	Test du 22/11/2011	repiquages	Test du 29/11/2011
11-345	4	T+	spores congelées et conservées	→ 0	C0,1+	→ 0	C0,1+	0	C0,1+
		C1+							T+
		C10+			T+	→ 0	C1-		
		C100+ 4%	G143A				C0,1+	→ 0	C0,1+
							T+		T+

Légende : T + ou Cx + = sporulation observée sur cette dose T - ou Cx - = pas de sporulation sur cette dose
 Résultats des tests Historique des repiquages Séquençage

- **Résultat du séquençage 11-345**

Le séquençage révèle un échantillon présentant 100% d'identité avec la séquence DQ459466.1 *Plasmopara viticola* haplotype Eu IR. Il possède la mutation G143A, responsable de la résistance aux Qols.

d. Echantillon 11-352

- **Historique 11-352**

Le prélèvement de spores pour séquençage a été réalisé à partir d'une boîte amendée en cyazofamid à la dose 0,1 mg/L issue du test du 21/10/11 (et séquençé le 15/11/2011).

Figure 8 : Historique de l'échantillon 11-352

numéro échantillon 2011	Test du 30/09/2011	repiquages	Test du 21/10/2011	Résultats séquençage (27/10/2011)	repiquages	Test du 04/11/2011
11-352	T+	0	T+		→ 0	T+
	C0,1+ 3%		C0,1+	G143A		C0,1+

Légende : T + ou Cx + = sporulation observée sur cette dose T - ou Cx - = pas de sporulation sur cette dose
 Résultats des tests Historique des repiquages Séquençage

- **Résultat du séquençage 11-352**

Le séquençage révèle un échantillon présentant 100% d'identité avec la séquence DQ459466.1 *Plasmopara viticola* haplotype Eu IR. Il possède la mutation G143A, responsable de la résistance aux Qols.

III. Conclusion générale sur le séquençage

- ↳ **Sur les trois échantillons testés en 2010**, congelés puis repiqués en 2011, les prélèvements pour le séquençage ont uniquement pu être réalisés **à partir de boîtes témoins ou après de nombreux repiquages**. Ils présentent 100% d'identité avec la séquence DQ459466.1 *Plasmopara viticola* haplotype Eu IR. Ils ont donc la mutation G143A, responsable de la résistance aux Qols et aucune mutation ne pouvant s'apparenter à une mutation Qil.

La comparaison entre les séquences des prélèvements sensibles (10-305 et 10-306) et résistants (10-287, 10-299 et 10-327) en tests biologiques Qil ne révèle aucune différence entre les séquences.

Remarque complémentaire : deux échantillons (N°10-287 origine MP et N°10-327 origine PC), tous deux ayant obtenu des CMI > 100 lors des premiers tests effectués en 2010, ont été prélevés dans la modalité 5 (*traitements Rigold F = metalaxyl + folpel*) des essais DGAL 2010.

- ↳ **Sur les échantillons testés en 2011**, les prélèvements ont pu être faits sur des boîtes amendées en cyazofamid aux doses 0,1, 10 ou 100 mg/L.

Les échantillons 11-345 et 11-352, qui présentent des résultats différents en test biologique (le premier étant résistant Qil, le second sensible) présentent tous deux la mutation G143A. Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre ces deux échantillons au niveau de la séquence ciblée (différence qui aurait pu démontrer l'existence d'une mutation correspondant à un profil de résistance aux Qils).

L'échantillon 11-96 donne, par contre, des résultats différents. En effet, sur des prélèvements issus directement d'une boîte de concentration 100 mg/L, **la mutation G143A n'a pas été retrouvée au séquençage**. Par contre, sur ce même échantillon, des prélèvements effectués sur des boîtes sans pression de sélection cyazofamid après plusieurs repiquages (à partir de boîtes amendées en cyazofamid à la dose 1 et 10 mg/L) présentent la mutation G143A. Cette divergence reste à expliquer (même si des hypothèses peuvent être avancées concernant l'historique un peu différent entre les sporulations ayant subi les deux séquençages successifs).

Pour 2012, étant donné que, en tests biologiques, la détection de sporulations résistantes ne peut être obtenue régulièrement au cours du temps à partir des mêmes populations, nous allons essayer de conserver les souches de mildiou résistantes sur vitro-plants, afin de voir s'il est possible d'améliorer la répétabilité des résultats à partir de populations conservées sur ces vitro-plants (plutôt que sur feuilles en survie ou sous forme de suspensions congelées). Cette conservation sur vitro-plants devrait permettre, en outre, de disposer en permanence de matériel biologique résistant.

Par ailleurs, le séquençage sera à faire directement sur les boîtes C10 ou C100 du tout premier test (voir démarche en annexe 2). Enfin, il faudra également être attentif, lors de la notation dans les tests biologiques, à la position des sporulations observées (conidiophores situés ou non en bordure de la goutte initialement déposée) afin d'éviter les faux positifs.

Bibliographie

Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A. and Gisi, U. (2006), Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. Pest. Manag. Sci., 62: 465–472. doi: 10.1002/ps.1236.

Annexe 1 : détails des prélèvements effectués pour le séquençage

échantillon	sur boîte	date prélèvement	historique avant prélèvement	date extraction date pcr	date séquençage	résultat
10-138	T	08/04/11		15/04/11		
10-138	T	19/04/11				
10-287	T	17/03/11		17/03/11		
10-287	T	21/03/11		21/03/11		
10-287	T	25/03/11	décongélation le 02-03-11 puis 3 repiquages	25/03/11	28/03/11	G143A
10-287	T	08/04/11	décongélation le 02-03-11 puis 3 repiquages puis un test et prélèvement sur boîte témoin	15/04/11	21/04/11	G143A
10-287	T	19/04/11				
10-287	T (cyazo 1)	09/06/11		14/06/11		
10-299	T	25/03/11		25/03/11		
10-299	T	01/04/11		15/04/11		
10-299	T	08/04/11		15/04/11	29/04/11	G143A
10-299	T	19/04/11				
10-305	T	25/03/11		25/03/11		
10-305	T	01/04/11		15/04/11		
10-305	T	08/04/11		15/04/11	21/04/11	G143A
10-305	T	19/04/11				
10-305	T	09/06/11		14/06/11		
10-306	T	08/04/11		15/04/11	29/04/11	G143A
10-306	T	19/04/11				
10-307	T	25/03/11		25/03/11		
10-307	T	01/04/11		15/04/11		
10-307	T	08/04/11		15/04/11		
10-307	T	19/04/11				
10-324	T	08/04/11		15/04/11		
10-324	T	19/04/11				
10-327	T	08/04/11		15/04/11		
10-327	T	19/04/11				
10-327	C1	19/04/11				
10-327	T (issu de C100)	13/05/11		17/05/11	20/05/11	G143A
10-327	T	16/05/11		17/05/11	20/05/11	G143A
10-327	T (cyazo 1)	09/06/11		14/06/11		
10-327	T (cyazo 100)	09/06/11		14/06/11	26/03/11	G143A
10-331	T	01/04/11		15/04/11		
10-331	T	08/04/11		15/04/11		
10-331	T	19/04/11				
10-401	T	08/04/11		15/04/11		
10-401	T	19/04/11				
10-401	C1	19/04/11				
10-401	T (cyazo 1)	09/06/11		14/06/11		
10-401	T (cyazo 100)	09/06/11		14/06/11	26/03/12	échec
11-096	cyazo 100	29/07/11		01/08/11	02/08/11	sans G143A
11-096	T	29/07/11		01/08/11		
11-096	T	30/09/11		30/09/11	03/10/11	G143A
11-096	Tsham	30/09/11		30/09/11	03/10/11	G143A
11-096	azo	30/09/11		30/09/11	03/10/11	G143A
11-096	azo sham	30/09/11		30/09/11	03/10/11	G143A
11-345	T-C 0,001-C0,01- C0,1-C1-C10-C100	18/10/11		14/11/11 C100	15/11/11	G143A

Annexe 2 : MILDIOU 2012 - CYAZOFAMID et AMISULBRON

