

Bilan des résultats obtenus par l'INRA- UMR SAVE Bordeaux

Résistance de l'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*)

Plan de surveillance 2014

Résumé

Ce bilan a été réalisé par l'INRA (UMR-SAVE-1065) suite à l'analyse des échantillons prélevés dans le cadre du réseau national de surveillance biologique du territoire.

Un plan de surveillance est réalisé depuis plusieurs années sur la résistance de l'oïdium aux fongicides QoI (inhibiteurs de la respiration mitochondriale cytochrome b, **Q**uinine **o**utside **I**nhibitors), DMI (inhibiteurs de la stérol-C₁₄-déméthylase, **DeM**ethylase **I**nhibitors). Cette année, des suivis de résistance vis-à-vis d'un inhibiteur de la **S**uccinate **d**eshydrogenase **I**nhibitor (SDHI/boscalid) et d'un inhibiteur de signalisation cellulaire (quinoxyfène) ont été effectués.

Les analyses pour la résistance aux fongicides DMI et QoI ont été réalisées en détectant et quantifiant une modification dans la séquence du gène qui conduit à une protéine modifiée moins sensible ou insensible à l'action du fongicide, à l'aide de la technique de PCR quantitative (q-PCR) mise au point au laboratoire (Dufour *et al.*, 2011). Pour la résistance aux DMI, il s'agit de l'allèle Y136F (modification du codon en position 136 du gène de l'eburicol-C₁₄-déméthylase *CYP51*) et, pour les QoI, de l'allèle G143A (modification du codon en position 143 du gène du cytochrome b).

Pour les deux autres fongicides, l'évaluation de la résistance a été réalisée à l'aide de deux doses de fongicides discriminantes (20 et 40 mg/l de matière active pour le quinoxyfène et 15 et 30 mg/l de matière active pour le boscalid).

Mots clés : *Erysiphe necator*, plan de surveillance, QoI, DMI, quinoxyfen, SDHI, q-PCR, Allèle de résistance, dose discriminante

I - Contexte

E. necator, champignon ascomycète, est un parasite obligatoire qui peut se développer en condition de laboratoire, mais uniquement sur du matériel végétal jeune et réceptif (feuilles de vigne). Il est généralement difficile à partir d'échantillons de terrain, de disposer de suffisamment d'inoculum pour la réalisation de test biologique et de ce fait, il est souvent nécessaire d'effectuer un repiquage ou deux (délai de 10 à 12 jours entre chaque repiquage) avant de réaliser le test. Ce qui parfois peut entraîner un biais (tendance

importante à minorer la résistance en début d'émergence, en absence de pression de sélection). De plus, travaillant avec des populations, plus le nombre de repiquages est important et moins les résultats sont représentatifs des fréquences réelles des différents allèles de résistance (en particulier DMI). Pour ces raisons, deux tests de q-PCR ont été réalisés pour les fongicides DMI et QoI (Dufour *et al.*, 2011). Néanmoins, pour la détection de la résistance vis-à-vis de fongicides SDHI et du quinoxyfène, nous avons encore réalisé des tests biologiques, en l'absence d'outils moléculaires. C'est pourquoi au cours de cette campagne, nous nous sommes efforcées de limiter les repiquages à 1 avant le premier test biologique.

La résistance aux fongicides DMI existe depuis 1984, mais cette résistance polygénique, impliquant un gène majeur (CYP51) et conduisant à des baisses de fitness des souches résistantes, a pu être limitée suite aux préconisations de la note technique nationale qui limite leur usage à 3 par saison et jamais de manière consécutive. Cependant la résistance semblait augmenter au cours des dernières années. L'allèle Y136F est un marqueur de l'état de résistance, et les souches qui le possèdent présentent, au minimum, un facteur de résistance de l'ordre 8 à ces fongicides, comme le triadiménol (Délye *et al.*, 1998). Cependant si toutes les souches ayant cet allèle sont plus ou moins résistantes, les souches n'ayant pas cet allèle peuvent être résistantes à d'autres fongicides DMI (*e.g.* autre que triazole).

La résistance aux fongicides QoI, quant à elle, a émergé en 2008, cette résistance monogénique, implique une mutation majeure dans le gène du cytochrome b mitochondrial (G143A) qui conduit à des facteurs de résistance supérieurs à 100. En 2013, la quasi-totalité des parcelles échantillonnées présentaient des fréquences alléliques fortes.

Pour le boscalid et le quinoxyfène, il s'agit d'un plan de détection de résistance éventuelle, sachant qu'en 2013, quelques pertes de sensibilité au quinoxyfène avaient été détectées et que, pour le boscalid, il s'agit d'une nouvelle surveillance.

L'état des résistances a été évalué dans différentes régions selon le cadre du plan de surveillance national de la DGAL. Le plan 2014 avait pour objectif de détecter la présence de résistance dans les régions : Aquitaine (AQ), Champagne-Ardenne (CA), Bourgogne (BO), Centre (CE), Franche-Comté (FC), Languedoc-Roussillon (LR), Midi-Pyrénées (MP), Pays de Loire (PL), Poitou-Charentes (PC), PACA (PA), Rhône-Alpes (RA).

II - Matériel

Le plan de surveillance de 2014 concernait à l'origine 11 régions. Au total, 51 parcelles ont été échantillonnées, dont une deux fois (Cf. tableau 1). Les échantillons sont collectés entre le 30 juin et le 14 octobre 2014. L'ensemble est constitué majoritairement de parcelles de production (37/50). Les autres n'ont pas été renseignées (13/50).

Pour effectuer le tri des prélèvements, les bases de données et les tests biologiques, 3 mois de main d'œuvre occasionnelle ont été nécessaires pour un montant de 6444€, financés pour partie par les factures payées par les CRA et sur nos fonds propres.

Les tests biologiques ont été réalisés sur des feuilles de *Vitis vinifera* Cabernet-Sauvignon (bouture de 3 mois) produites en serre.

Tableau 1 : Nombre prévisionnel de prélèvements, réalisés et analysés selon les régions, en France en 2014

Régions	DMI		Quinoxifène/proquinazid		SDHI (boscalid)	
	N prévu	N reçu	N prévu	N reçu	N prévu	N reçu
Aquitaine	5	8	3	3		
Bourgogne	5	5	3	3	3	3
Centre	5	3				
Champagne-Ardenne	5	6			3	3
Franche-Comté	5	5				
Languedoc-Roussillon	5	6				
Midi-Pyrénées	5	5				
Pays de Loire	5	3				
Poitou-Charentes	5	6				
Provence-Alpes-Côte d'Azur	5	4				
Rhône-Alpes	5	0				
TOTAL	55	51*	6	6	6	6

* dont une parcelle échantillonnée deux fois

III - Méthodes

Les prélèvements sont constitués de 20 à 30 feuilles et/ou d'une dizaine de grappes oïdiées. Pour les prélèvements foliaires, 30 à 45 pastilles de feuilles (découpées à l'aide d'un emporte-pièce) avec de l'oïdium sont réparties dans trois tubes différents. Pour les grappes, 30 morceaux de baies oïdiées provenant de différentes grappes sont aussi répartis dans 2 tubes de collecte. L'ensemble est conservé au congélateur à -20°C avant extraction de l'ADN. L'extraction et la quantification sont réalisées comme décrit dans la publication de Dufour *et al.* 2011.

Les tests biologiques sont réalisés directement sur des feuilles (ou disques de feuilles) traitées avec les différents fongicides sur lesquelles l'oïdium est inoculé par soufflage comme décrit dans Debieu *et al.*, 1995, ou par frottement des baies ou parties oïdiées sur plusieurs feuilles. Si l'inoculum n'est pas suffisant pour inoculer l'ensemble des feuilles pour les tests et le contrôle, deux feuilles sont inocuées sans fongicide et, 12 jours plus tard, le test est effectué par soufflage des conidies. L'ensemble est incubé à 22°C. Les doses choisies pour les tests en 2014 sont de 20 et 40 mg/l de matière active pour le quinoxifène et de 15 et 30 mg/l de matière active pour le boscalid (SDHI).

IV - Résultats

L'interprétation des résultats permet de connaître le pourcentage d'allèles portant la mutation 136, un marqueur de résistance aux fongicides DMI (tableau 2), et la mutation 143, responsable de la résistance aux fongicides QoI (non demandée dans le plan de surveillance) (tableau 3). Les données concernant le quinoxifène et le boscalid sont qualitatives et mettent en évidence une perte de sensibilité aux fongicides. Le nombre de parcelles qui ont permis d'obtenir des résultats exploitables a été de 48 en 2014 (dont 1 en double et 2 qui n'ont pas répondu aux tests biologiques et/ou moléculaires). Aucun échantillon de la région Rhône-Alpes n'a été reçu.

IV.1. Résistance aux DMI

Le tableau 2 présente le nombre d'échantillons répartis dans chacune des classes de fréquence de l'allèle Y136F pour la résistance aux DMI. Ces résultats tiennent compte des résultats sur feuilles et sur grappes. La figure 1 permet de visualiser la répartition des fréquences dans chaque région viticole.

Tableau 2 : Répartition des échantillons par région en fonction de la proportion d'allèle résistant Y136F pour les DMI

Régions	Nbre parcelles analysées	Nbre échantillons par classe de fréquence (%) de l'allèle 136						Fréquence moyenne de l'allèle de résistance par région
		absent	Traces ¹	2 à 19%	20 à 49%	50 à 74%	75 à 100%	
Aquitaine	8	0	0	4	0	1	3	46.53
Bourgogne	4	0	0	3	0	0	1	33.14
Centre	3	1	1	1	0	0	0	5.72
Champagne-Ardenne	6	1	1	2	2	0	0	16.93
Franche-Comté	5	1	3	1	0	0	0	4.37
Languedoc-Roussillon	5	1	0	0	2	2	0	37.65
Midi-Pyrénées	5	2	1	0	2	0	0	12.69
Pays de Loire	3	0	0	1	0	1	1	54.55
Poitou-Charentes	5	1	1	1	1	1	0	17.31
Provence-Alpes-Côte d'Azur	4	1	0	0	2	0	1	35.22
Rhône-Alpes	0							
TOTAL	48	8	7	13	9	5	6	26.41

¹ Trace : détection à la limite du seuil

À noter que le nombre de parcelles varie de 3 à 8 et que la fréquence de l'allèle Y136F varie de 0 à 100%, avec une moyenne de $26,41 \pm 17,39\%$. Si on calcule ce pourcentage uniquement avec les parcelles exhibant plus de 2% de résistance, nous obtenons une moyenne de $31,94 \pm 15,77$. Les régions identifiées comme présentant les plus fortes fréquences d'allèles seraient les régions Pays de Loire, Aquitaine, Bourgogne, PACA et Languedoc-Roussillon qui sont au dessus de la fréquence moyenne nationale. Néanmoins, la situation semble assez stable par rapport à celles des années précédentes. En 2014, 31.25% des parcelles sont encore détectées comme totalement sensibles (régions Centre, Franche-Comté, Champagne-Ardenne, Poitou-Charentes). Cependant il convient d'être prudent car cet allèle n'est qu'un marqueur d'un type de résistance aux DMI et que d'autres types de résistance peuvent co-exister avec cet allèle (d'autres mutations ou mécanismes).

L'examen plus en détail de la répartition des classes de fréquence de cet allèle Y136F (figure 2) montre des situations très variables selon les régions et les parcelles, avec les régions du Centre et de Franche-Comté comme étant les plus sensibles aux fongicides DMI.

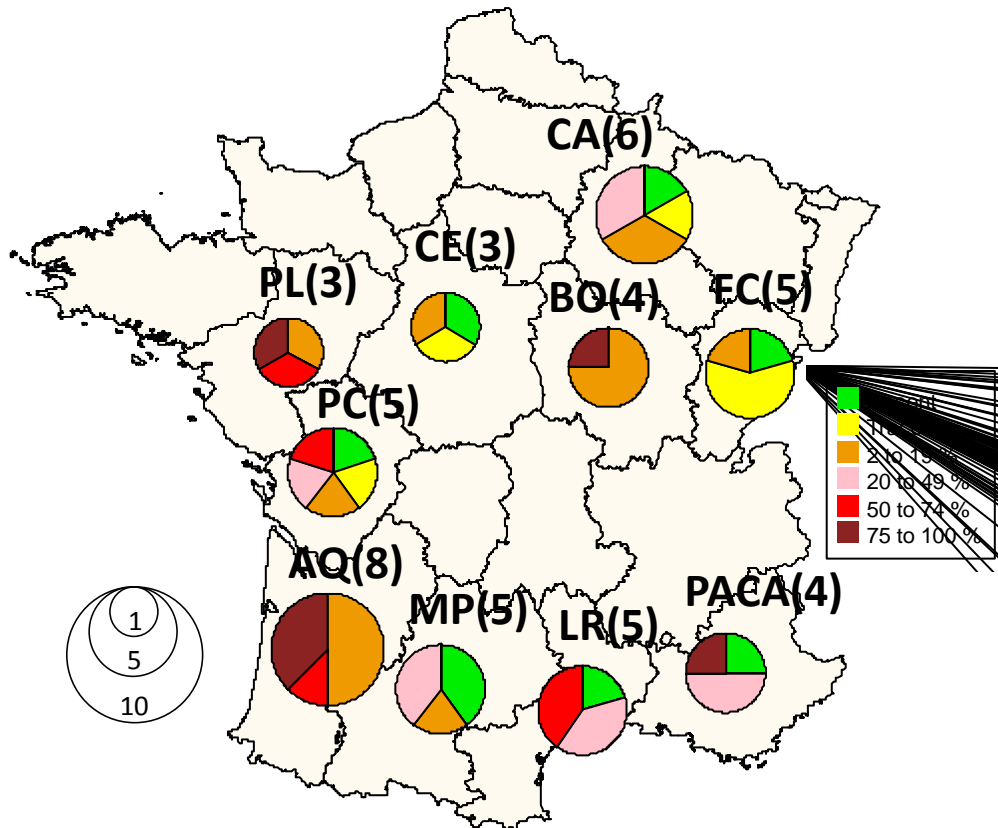


Figure 1 : Répartition par région des échantillons collectés en 2014 en fonction de leur pourcentage d'allèle Y136F. Le chiffre entre parenthèse indique le nombre de parcelles analysées pour chaque région

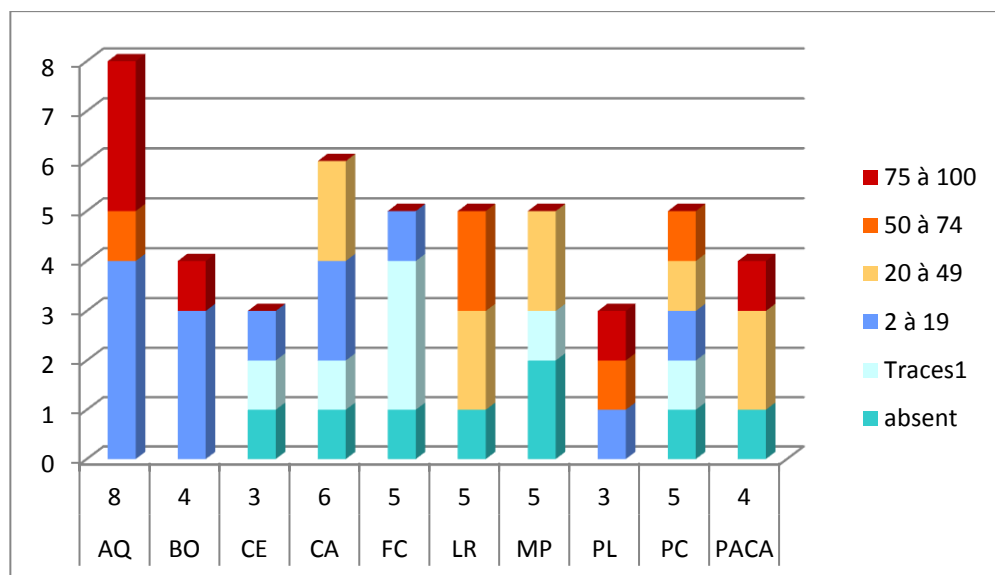


Figure 2 : Répartition en 2014 des fréquences de l'allèle de résistance aux DMI, observées par parcelle dans chaque région viticole analysée. Les chiffres indiquent le nombre de parcelles.

IV.2. Résistance aux Qol

Concernant la résistance aux fongicides Qol, bien que non demandée lors de ce plan de surveillance, nous l'avons analysée afin d'évaluer l'évolution de cette résistance sachant que, suite aux recommandations de la note technique nationale de 2014, peu de ces fongicides devraient être utilisés pour la protection du vignoble contre l'oïdium, puisque que nous étions en situation de résistance généralisée. Le suivi réalisé nous renseigne sur la fitness des populations résistantes aux Qol, et/ou sur la pression de sélection exercée par des anti- oïdiums, ou d'autres produits (ex : anti mildiou, anti-black-rot) contenant des Qol qui pourraient être utilisés.

Tableau 3 : Répartition des échantillons par région en fonction de la proportion d'allèle résistant G143A pour les Qol

Régions	Nbre de parcelles analysées	Nbre d'échantillons par classe de fréquence de l'allèle 143						Fréquence moyenne de l'allèle de résistance par région
		absent	Traces ¹	2 à 19%	20 à 49%	50 à 74%	75 à 100%	
Aquitaine	8	0	0	1	4	1	2	46.11
Bourgogne	4	0	0	0	0	3	1	70.18
Centre	3	0	0	0	2	0	1	54.28
Champagne-Ardenne	6	1	1	2	0	1	1	26.24
Franche-Comté	5	0	0	1	0	2	2	61.29
Languedoc-Roussillon	5	0	1	1	0	3	0	34.59
Midi-Pyrénées	5	0	0	1	1	1	2	55.22
Pays de Loire	3	0	0	1	1	1	0	37.79
Poitou-Charentes	5	0	0	0	1	1	3	70.29
Provence-Alpes-Côte d'Azur	4	0	0	0	0	0	4	94.43
Rhône-Alpes	0							
TOTAL	48	1	2	7	9	13	16	55.04

¹ Trace : détection à la limite du seuil

Les résultats du tableau 3 révèlent une fréquence moyenne de l'allèle G143A de $55.04 \pm 20.21\%$, avec une présence importante de cet allèle dans toutes les régions de France. Si nous ne prenons en compte que les parcelles exhibant une résistance supérieure à 2%, nous obtenons la valeur de $59,49\% \pm 18.81\%$. La figure 3 montre qu'il existe des parcelles sans présence de l'allèle de résistance (1 en Champagne), ou à l'état de trace (Champagne et Languedoc-Roussillon). Les régions les plus résistantes sont les régions PACA, Poitou-Charentes, Bourgogne, Franche-Comté, Midi-Pyrénées et Centre qui dépassent toutes 50% de fréquence allélique en moyenne.

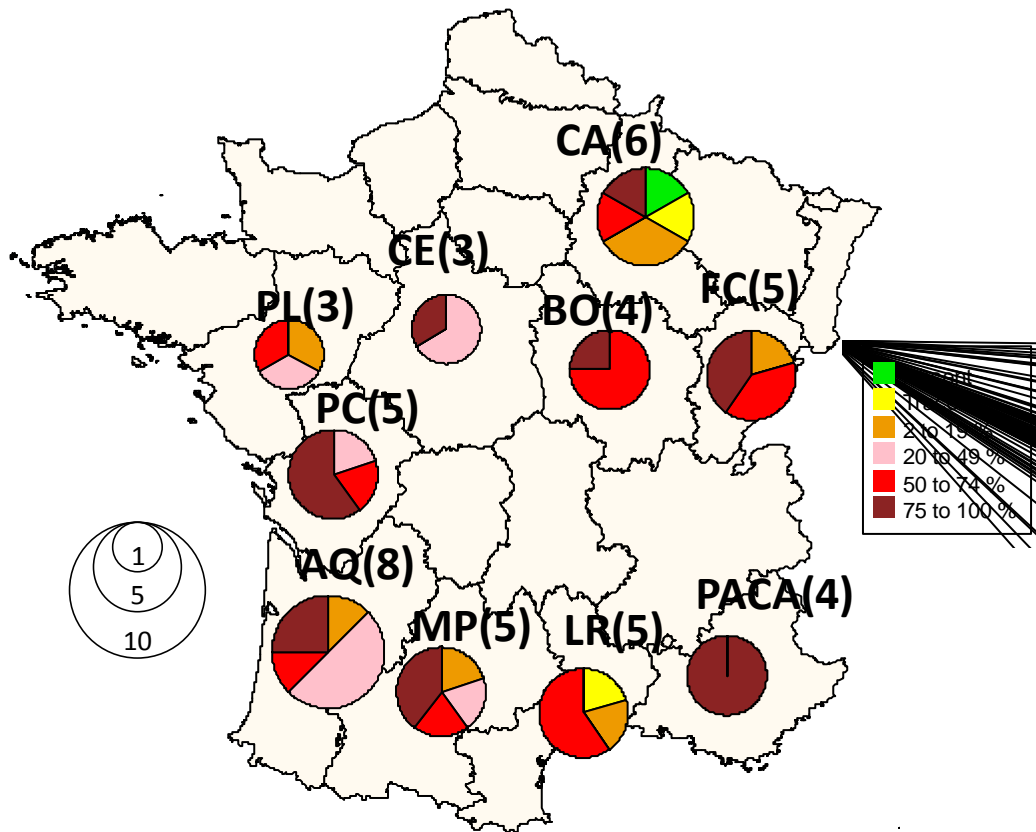


Figure 3 : Répartition par région des échantillons collectés en 2014 en fonction de leur pourcentage d'allèle G143A. Le chiffre entre parenthèse indique le nombre de parcelles analysées pour chaque région

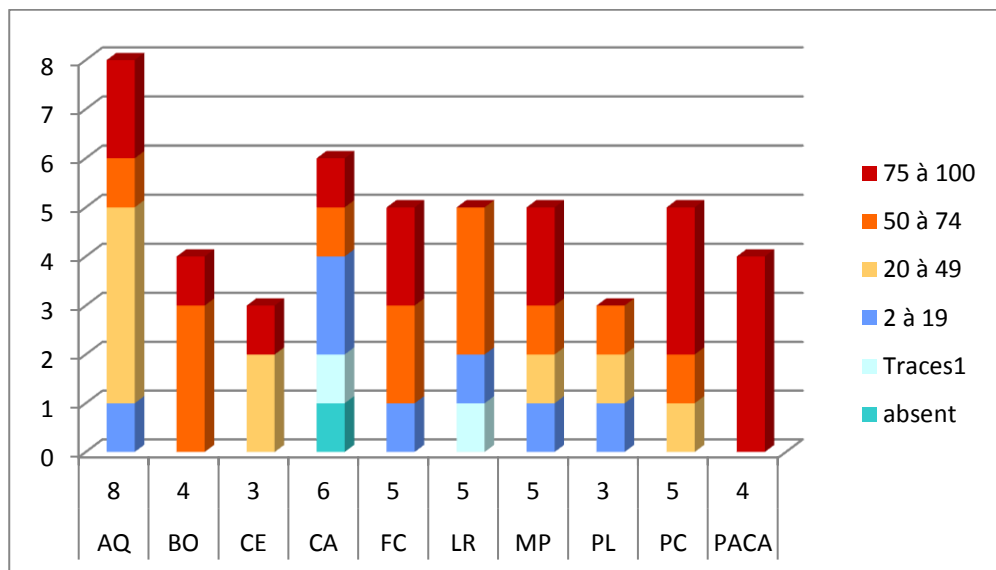


Figure 4 : Répartition en 2014 des fréquences de l'allèle de résistance aux QoI observées par parcelle dans chaque région viticole analysée. Les chiffres indiquent le nombre de parcelles, et les couleurs la classe de pourcentage de l'allèle G143A.

IV.3. Résistance au Quinoxifène et au Boscalid

a - Résistance au quinoxifène

Les tests biologiques réalisés parmi les parcelles testées aux DMI permettent de détecter la perte de sensibilité des populations aux deux produits testés. En 2013, des tests effectués avec une dose de 10 mg/l de quinoxifène montraient une perte de sensibilité de quelques populations. En 2014, les doses discriminantes ont été augmentées à 20 et 40 mg/l pour le quinoxifène et montrent que, parmi les échantillons testés, 7 sur 20 sont capables de se développer à une concentration de 40 mg/l de quinoxifène (tableau 4, figure 5).

Les régions pour lesquelles la perte de sensibilité est la plus forte sont les régions Languedoc-Roussillon, Pays de Loire, Bourgogne et, dans une moindre mesure, Aquitaine. Ces pertes de sensibilité ne signifient cependant pas qu'il y ait perte d'efficacité au vignoble, mais révèlent que les populations sont plus résistantes au traitement.

b - Résistance aux SDHI (boscalid)

Sur l'ensemble des échantillons testés, deux populations ont pu se développer à la dose de 30 mg/l de boscalid. Si les populations conservées sont encore en état, des courbes de sensibilité dose-réponse seront réalisées sur ces deux populations courant 2015 pour valider la présence de cette résistance chez l'oïdium de la vigne. Si c'est le cas, il s'agira des premiers cas de résistance au boscalid détecté dans le vignoble français. Les deux populations proviennent l'une d'une parcelle de Bourgogne et l'autre d'une parcelle de Champagne-Ardenne.

Tableau 4 : - Sensibilité au quinoxifène et au boscalid (SDHI). Pour ces fongicides, des analyses supplémentaires ont été faites en fonction des traitements fongicides. S=sensible, r= développement faible (inférieur à 20%), R= développement supérieur à 20% (sporulation dans tous les cas).

Régions	N parcelles analysées N quinoxifène / N boscalid	Doses discriminantes utilisées pour les deux fongicides (mg/l de matière active)			
		Quinoxifène		Boscalid	
		20 mg/l	40 mg/l	15mg/l	30 mg/l
Aquitaine	4/1	2S, 1r, 1R	3S, 1R	1S	1S
Bourgogne	3/3	2r, 1R	2r, 1R	2S 1R	2S, 1R
Centre	1	1S	1S	1S	1S
Champagne-Ardenne	0/5			4S, 1R	4S, 1R
Franche-Comté	0				
Languedoc-Roussillon	3/1	3R	3R	1S	1S
Midi-Pyrénées	4/4	1S, 3r	1S, 3r	4S	4S
Pays de Loire	2/2	2R	2R	2S	2S
Poitou-Charentes	0				
Provence-Alpes-Côte d'Azur	3/4	3S	3S	4S	4S
Rhône-Alpes	0				
TOTAL	20/21	7S, 6r, 7R	8S, 5r, 7R	19S, 2R	19S, 2R

¹ Trace : détection à la limite du seuil

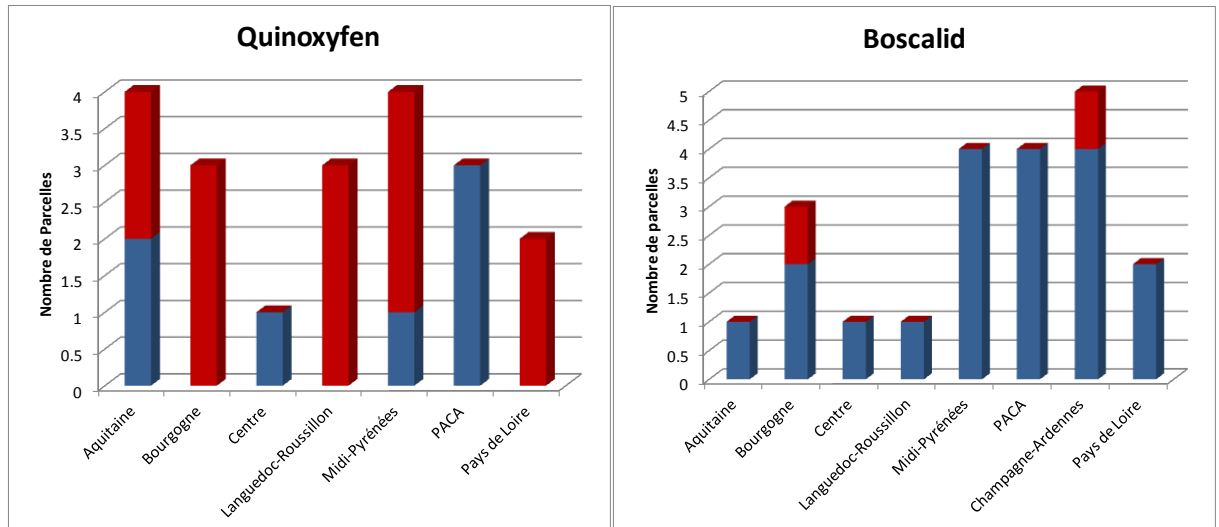


Figure 5 : Répartition de la sensibilité et de la résistance au quinoxyfène et au boscalid dans les différentes régions. En rouge, le nombre de parcelles présentant une perte de sensibilité aux concentrations choisies et en bleu, les parcelles sensibles.

V - Conclusions-perspectives

Ce plan de surveillance 2014, montre que la présence de l'allèle Y136F impliqué dans la résistance aux fongicides DMI est très variable selon les régions (figures 6, 7). Par contre, concernant la résistance aux fongicides QoI, cette dernière est très présente dans la plupart des régions.

Parmi les régions les plus touchées par la résistance à ces deux familles de fongicides, citons les régions de Pays de Loire, Aquitaine, Bourgogne, PACA et Languedoc-Roussillon. Certaines régions sont très résistantes aux QoI mais semblent peu concernées par la résistance aux DMI (*e.g.* Régions Centre, Franche-Comté ou Midi-Pyrénées). Certaines régions atteignent plus de 50% de fréquence moyenne d'allèle pour Y136F ou G143A.

L'examen global de la résistance aux DMI et QoI réalisé entre 2008 et 2014 au laboratoire (INRA-Bordeaux) tend à montrer une stabilisation du phénomène pour ces deux classes de fongicides (figure 8), sachant que les variations observées peuvent être liées à la pression annuelle de la maladie qui fluctue selon les années, et à l'emploi de certaines familles de fongicides.

Concernant la résistance au quinoxyfène et au boscalid, il semble que les pertes d'efficacité soient confirmées pour le quinoxyfène ; pour le boscalid, la présence de deux populations moins sensibles demande à être confirmée en 2015.

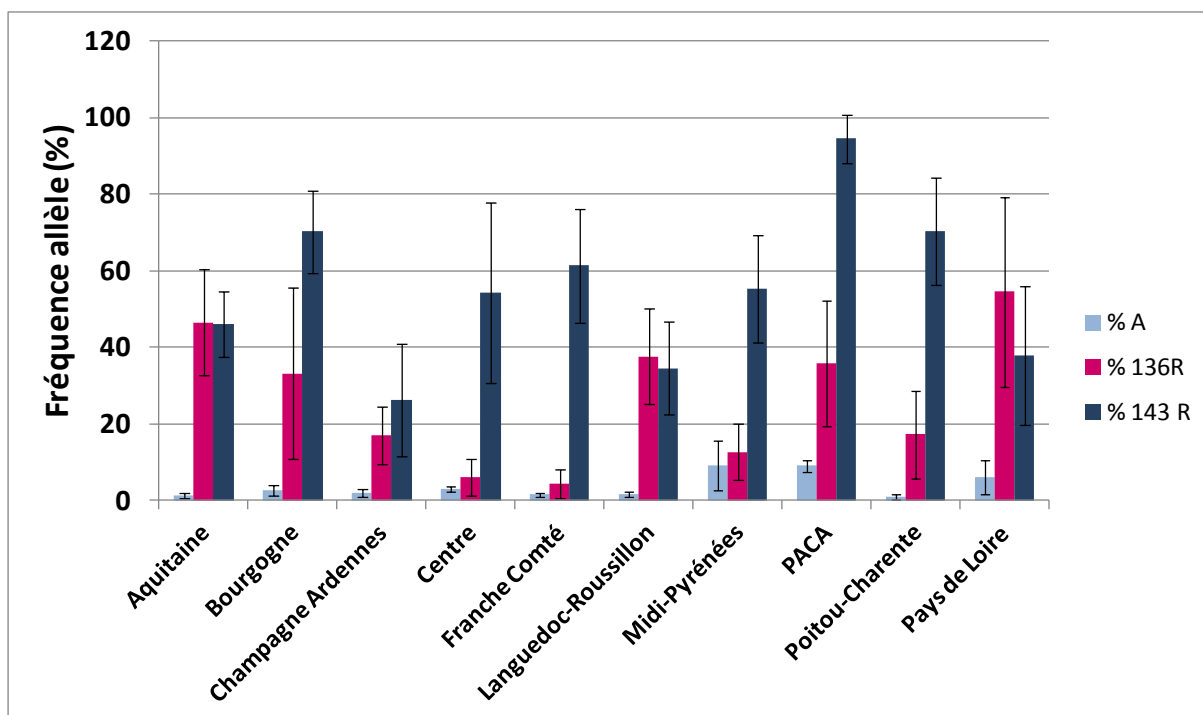


Figure 6 : Répartition des différents allèles de résistance (Y136F et G143A) et du génotype A d'oïdium dans les différentes régions françaises.

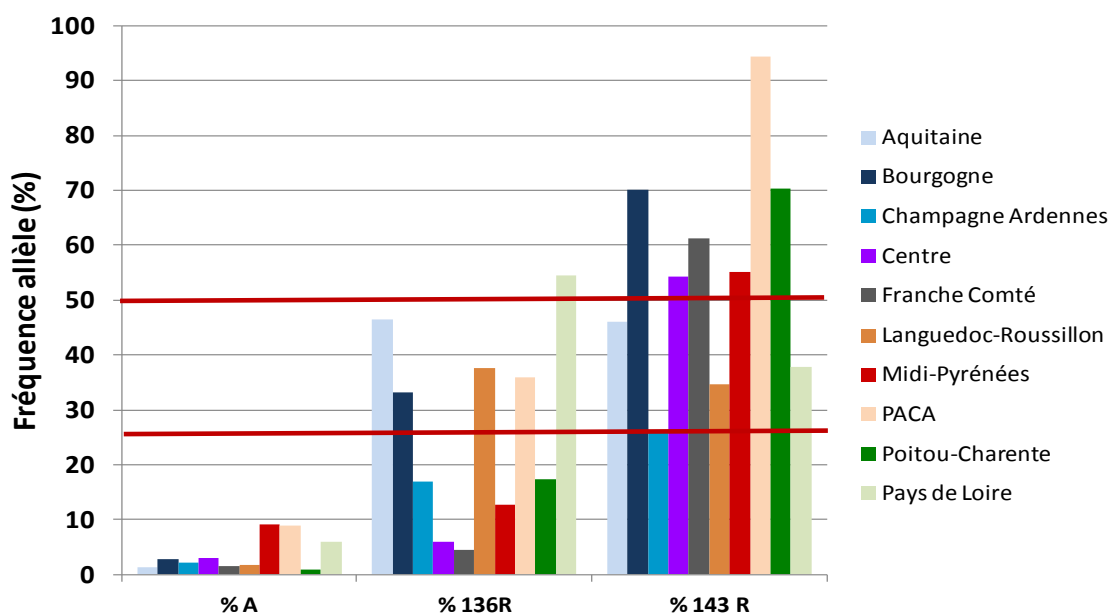


Figure 7 : Distribution par région des différents allèles de résistance et du génotype A d'oïdium.

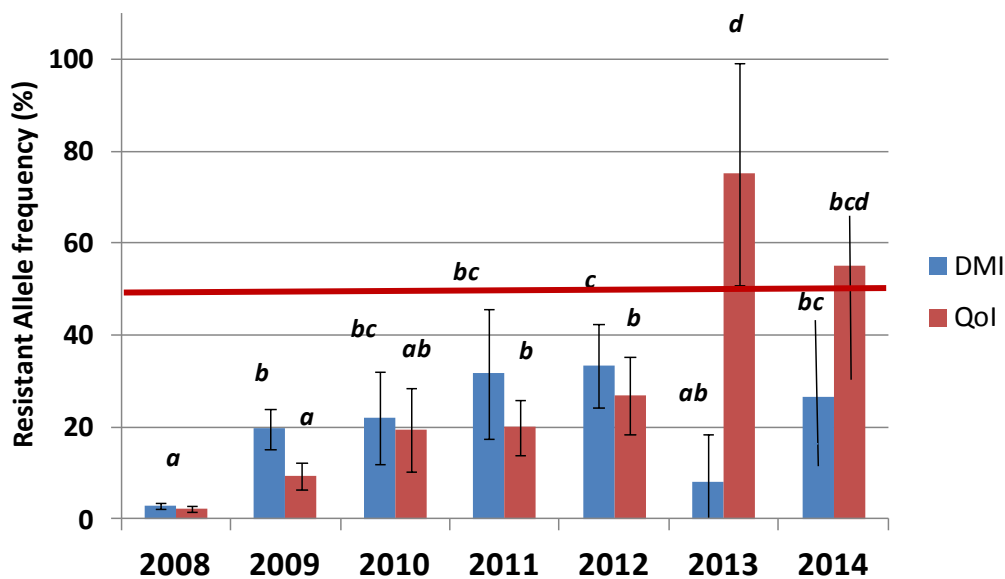


Figure 8 : Distribution des fréquences alléliques entre 2008 et 2014 dans différentes parcelles viticoles (issues essentiellement des plans de surveillance). En bleu, la fréquence de l'allèle Y136F et en rouge, la fréquence de l'allèle G143A. Les lettres donnent la significativité au seuil de 5%.

VI.- Partenaire scientifiques et techniques

- J Grosman (expert référent vigne de la DGAL), A Micoud (laboratoire Anses-Lyon) pour la mise en œuvre du plan
- Réseau DRAAF-SRAL et des organisations professionnelles de la surveillance biologique du Territoire pour la participation aux prélèvements.

Moyens humains mis a disposition par l'UMR SAVE, INRA de Bordeaux:

MOO : Solenn Casteran, Mathilde Chopy (échantillonnages, test biologiques, archivages)

INRA :

S Gambier (production de feuilles de vigne)

MC Medalin (envoi factures et suivi)

MC Dufour (tests q-PCR et analyses des données, tests biologiques, archivages)

MF Corio-Costet (responsable projet, suivi, analyse, courriers et rédaction)

VII - Bibliographie :

- Baudoin, A., G. Olaya, F. Delmotte, F. Colcol, and H. Sierotski. 2008. QoI resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic United states. Plant management Network, Plant health progress. DOI: 10.1094/PHP-2008-0211-02-RS.
- Debieu D., Corio-Costet M-F., Steva H., Malosse C., Leroux P. (1995) Sterol composition of the wine powdery mildew fungus: *Uncinula necator* sensitive or resistant strains to the sterol biosynthesis inhibitor: triadimenol. *Phytochemistry*, **39**, 293-300.
- Délye C., and 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.
- Dufour MC, Fontaine S, Montarry J, Corio-Costet MF (2011) Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Manag. Sci*, **67**: 60-69.