

**AFPP- 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS-8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**MISE AU POINT D'OUTILS DE q-PCR POUR LA DETECTION ET LA QUANTIFICATION
DES DEUX GROUPE GENETIQUES (A, B), DE LA RESISTANCE AUX DMIS ET AUX
QoIs CHEZ L'OÏDIUM DE LA VIGNE (*ERYSIPHE NECATOR*) EN FRANCE.**

M.-C DUFOUR¹, S. FONTAINE², A. MICOUD², M.-F CORIO-COSTET¹

1: INRA, UMR Santé végétale, ISVV, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883, Villenave d'Ornon, France

2: AFSSA, 31, avenue Tony Garnier, 69364 LYON Cedex 07

RESUME :

Des outils de détection et de quantification rapides ont été développés pour *Erysiphe necator* (l'oïdium de la vigne) pour évaluer la distribution des deux groupes génétiques A et B dans le vignoble français, ainsi que le niveau de résistance aux fongicides IDMs (Inhibiteur de la C14-sterol déméthylase) et QoIs (Quinone outside inhibitor, inhibiteur de la respiration mitochondriale). Sur la base de la détection de différents SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) positionnés respectivement en position G37V et Y136F du gène *Cyp51* de la C14-éburicol déméthylase et en position G143A du gène mitochondrial du cytochrome b, différents marqueurs de PCR quantitative ont été développés et testés dans le vignoble français. Cinquante populations d'oïdium de la vigne collectées en 2008 et provenant de différentes régions ont permis de décrire un nouvel état de la variabilité et de la résistance de l'oïdium de la vigne en France.

Mots-clés :Oïdium de la vigne, fongicide QoI, IDM, résistance, groupe génétique A et B, Detection, Q-PCR

SUMMARY:

**REAL TIME PCR ASSAYS FOR QUANTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF
ERYSIPHE NECATOR GENETIC GROUPS IN GRAPEVINE SAMPLES**

Real time PCR assays using SYBR green technology were developed to detect and quantify several *Cyp51* gene SNPs and one mitochondrial *cyt b* gene SNP of grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*). These tools allowed to identify and quantify the two genetic groups A and B of *E. necator*, the presence or absence of a high resistance to fungicides DMIs (Demethylase inhibitors), and the presence or absence of resistance to QoIs (Quinone outside inhibitor) in powdery mildew populations in French vineyard. Fifty populations sampled in six French regions were used, describing a new picture of *E necator* population diversity in French vineyard.

Keywords: grape powdery mildew, DMI fungicide, QoI, genetic group, grapevine, Q-PCR.

INTRODUCTION

L'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*, syn : *Uncinula necator*) depuis son apparition sur le continent en 1845, a régulièrement fait écho de par la gravité de ses attaques dans le vignoble français, en particulier en 1852 où les pertes de récolte atteignirent entre 50 et 70%. Combattu à l'aide du soufre, puis à l'aide de molécules de synthèse, il est souvent considéré comme un agent pathogène bien connu et maîtrisé. Pourtant, sporadiquement des viticulteurs rencontrent d'importants problèmes dans la gestion des épidémies qui résultent parfois non pas de traitements mal administrés mais bien de la sélection de souches d'oïdium résistantes. Parmi les fongicides les plus utilisés, les IDMs (inhibiteur de la C14-stérol déméthylase) inhibent la biosynthèse d'un lipide (stérol) nécessaire à la constitution des membranes cellulaires fongiques. Suite à leur usage parfois intensif, la résistance est apparue vers la fin des années 80 (Steva *et al.*, 1989). Cette dernière a été bien gérée dans la plupart des vignobles en appliquant les principes classiques de gestion de la résistance : une utilisation raisonnée du nombre de traitements à l'aide de ces molécules et l'alternance des familles chimiques possédant des modes d'action différents.

Plus récemment, l'arrivée sur le marché de molécules fongicides bloquant la respiration cellulaire (QoI ex : strobilurines) a permis d'obtenir d'excellentes efficacités vis-à-vis de l'oïdium de la vigne (Wong et Wilcox, 2002). Cependant, des cas de résistance ont été décrits dans les vignobles américains en 2008 (Baudoin *et al.*, 2008), et dans le vignoble Hongrois (D. Bencéné, comm. pers) associées à des difficultés dans la maîtrise des épidémies.

Ce parasite obligatoire présente également la particularité d'être représenté sur le territoire français par deux groupes de populations appelés A et B (I et III) qui sont génétiquement assez éloignés et qui possèdent des modes de conservation hivernale différents. Ainsi la population B se conserve-t-elle majoritairement par reproduction sexuée (cleistothèces) mais peut également hiverner dans les bourgeons dormants (Corio-Costet, 2007). A l'inverse, la population A hiverne dans les bourgeons dormants et semble à ce jour, peu capable, voire incapable, de se reproduire sexuellement en France (Délye *et al.*, 1997 ; Peros *et al.*, 2006, Corio-Costet, 2007). La distribution et la signification épidémiologique de ces deux groupes sont encore mal connues (Amrani et Corio-Costet, 2006 ; Corio-Costet, 2007 ; Montarry *et al.*, 2008). Des travaux réalisés dans notre laboratoire montrent également que le groupe A serait plus sensible aux fongicides que les souches appartenant au groupe génétique B (Corio-Costet *et al.*, 2000).

Les méthodes de détection moléculaires basées sur des méthodes PCR-RFLP, Nested-PCR, utilisée à ce jour impliquaient d'isoler chaque individu pour déterminer son appartenance à un groupe (Corio-Costet, 2007). Concernant les populations, les tests biologiques existant permettent d'estimer la proportion de la population résistante ou non, mais implique un lourd travail de tests fongicides sur des feuilles de vigne inoculées avec les échantillons de terrain.

La méthode de détection et de quantification de la variabilité des souches d'oïdium décrite dans cet article, fait appel à une technique quantitative de détection moléculaire de différentes mutations présentes dans les gènes impliqués dans la résistance aux fongicides de type IDMs ou QoIs. En complément, toujours basé sur ce même principe de détection qualitatif et quantitatif nous avons également évalué la distribution des deux groupes génétiques A et B d'oïdium dans le vignoble. L'objectif de cette étude a donc été de dresser un état des lieux de la résistance pour d'anciennes molécules telles que les IDMs et pour de plus récentes telles que les QoIs dans le vignoble français, associé à la distribution des groupes génétiques A et B.

MATERIEL ET METHODE

Echantillonnage

Dans différentes parcelles de diverses régions viticoles françaises (tableau I), des lésions isolées (689) ont été prélevées entre mai et septembre à l'aide d'un emporte-pièce de 6 mm de diamètre. Chaque échantillon provenant d'une parcelle correspond à un minimum de 15 lésions. Pour les grappes, le matériel fongique est gratté sur les baies et réuni dans un tube Eppendorf et stocké à -20°C, en attendant d'en extraire l'ADN.

Tableau I: Localisation géographique et nombre de parcelles échantillonnées dans le vignoble français en 2008.

(Table I: Geographic Localization and number of sampled parcel in French Vineyard in 2007)

Région viticole	Nombre de parcelles échantillonnées
Aquitaine	5
Bourgogne	6
Champagne	5
Languedoc-Roussillon 1*	6
Languedoc-Roussillon 2*	11
Midi-Pyrénées (dont 5 « Gers »)	15
PACA	2

* : LR1 prélèvement réalisés début juillet, LR2 prélèvement réalisés début mai

Collection d'isolats et production d'inoculum

Les souches utilisées pour mettre au point la méthode de Q-PCR proviennent de la collection du laboratoire (tableau II)

Tableau II : Caractéristiques des souches utilisées pour la mise au point du test Q-PCR

Table II : List of *E. necator* isolates used to Q-PCR assays

Nom	Origine géographique et date de prélèvement	Groupe génétique	Sensibilité DMI ^b	Sensibilité Qol ^c
TOU01	Languedoc-Roussillon, France, 2004	A	S	S
ROU08	Languedoc-Roussillon, France, 2004	A	S	S
PVR 43	Languedoc-Roussillon, France, 2004	A	S	S
LAT12	Aquitaine, France, 2003	B	S	S
CHL02	Aquitaine, France, 2004	B	S	S
IBA11	Bengalore, Inde, 1995	A	R	S
HU1	Eger, Hongrie, 2008	-	-	S
HU3	Eger, Hongrie, 2008	-	-	R

b : Sensibilité aux fongicides triadiménole, penconazole, tébuconazole ; c : sensibilité à la trifloxystrobine

Les différents isolats ont été multipliés en condition stérile sur des feuilles de vigne Cabernet-Sauvignon dans des boîtes de Pétri comme décrit par Délye et Corio-Costet, 1998. Les inoculations ont été réalisées avec 1000 à 1500 conidies par cm² de feuilles et les boîtes sont mises à incuber durant 12 jours à 22°C dans une chambre climatique. Le matériel fongique est récupéré par grattage, puis déposé dans un tube Eppendorf et stocké à -20°C.

Détermination de la sensibilité aux fongicides

La sensibilité aux IDMs (triadiménol) a été déterminée selon la méthode décrite par Délye *et al.*, 1997 et la présence de la mutation en position 136 du gène *Cyp51* a été recherchée comme décrit par Délye *et al.*, 1999. La sensibilité aux QoI a été déterminée sur la base d'une dose discriminante de 10mg/L de matière active de trifloxystrobine appliquée sur des disques de feuilles inoculés avec 600 conidies par cm².

Extraction D'ADN et confirmation des biotypes

L'ADN est isolé soit de tissus d'*E. necator* congelés, soit directement à partir de disques de feuilles infectés provenant du vignoble. Le matériel est extrait dans un mélange chloroforme-alcool isoamylique (Délye *et al.*, 1995). L'ADN récupéré en solution aqueuse est quantifié par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm et stocké à -20°C.

Une méthode de PCR-RFLP, utilisant l'enzyme *Acc1*, après amplification d'un fragment du gène de la β -tubuline (Genbank N°AY074934) permet d'identifier l'appartenance au groupe A ou B sur la détection d'une simple substitution T/C (Amrani et Corio-Costet, 2006 ; Montarry *et al.*, 2008).

Amplification par Q-PCR

Cette méthode de diagnostic permet d'évaluer quantitativement la proportion de chaque type d'allèle dans des échantillons réunissant plusieurs prélèvements. La spécificité de l'amplification est obtenue en plaçant l'extrémité 3' d'une des amorces directement sur un SNP qui permet uniquement l'amplification de l'allèle spécifique. L'allèle spécifique est alors quantifié comme une quantité relative en utilisant un allèle commun aux deux biotypes (EN pour *Erysiphe necator*) considéré comme standard interne. La différence entre les résultats des deux réactions PCR ($\Delta Cq = Cq_{EN} - Cq_{\text{allèle spécifique}}$) servira pour calculer la fréquence allélique en exploitant la corrélation qui existe entre le ΔCq et le logarithme décimal de la fréquence allélique.

Les réactions sont réalisées dans un volume de 14 μ l contenant 7 μ l d'un mélange fluorescent pour Q-PCR Blue SYBR[®] Green fluorescein, 5 μ l d'ADN et 1 μ l de chaque amorce (10nM). Chaque mesure est au minimum dupliquée. La réaction est effectuée dans un thermocycler real-time thermal icycler iQ. Trois étapes sont réalisées : un premier cycle à 95°C durant 15 min ; puis 40 cycles à 95°C pendant 10s, puis 10 s à la température adéquate selon l'amorce (56°C pour les amorces génotypiques, 58°C pour détecter la résistance DMI et 60°C pour la détection de la résistance QoI), et à 72°C pendant 20 s. La fluorescence du SYBR green est enregistrée à 72°C. L'absence de produit indésirable est confirmée par une analyse de la courbe de fusion automatique des amplicons avec une augmentation de 0,5°C graduelle de 65°C à 95°C. Les amorces utilisées dans cette étude ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 sur la base de séquences des gènes et sont décrites dans Dufour *et al.*, 2009). Elles génèrent des fragments de 153, 78 et 100 pb pour le gène *Cyp51* (N° genbank : AF042067).

Pour valider la Q-PCR, les efficacités d'amplification des différents jeux d'amorces doivent être similaires. Pour chaque amorce des tests de normalisation ont donc été effectués.

Des courbes de calibration standard ont été réalisées pour des fréquences alléliques variant de 0,36 à 100% en utilisant des ADN purs spécifiques de chaque allèle. La méthode a également été validée en recherchant les limites de détection (LOD) de quantification (LOQ) selon la méthode décrite par Schwarz *et al.*, (2007). En supposant une distribution normale des ΔCq , la LOD et la LOQ ont été calculées à partir de l'écart-type résiduel de la régression linéaire obtenue de la manière suivante :

$$LOD = 3 \times (S_{xy}/b)$$

$$LOQ = 10 \times (S_{xy}/b)$$

où S_{xy} est la déviation standard résiduelle et b est la pente de l'équation de la régression linéaire.

Validation de la méthode

Des disques de feuilles contaminés avec chaque génotype à tester (groupe A, B, IDM S, IDM R, QoI S, QoI R) sont utilisés pour réaliser différents mélanges des deux allèles à quantifier et obtenir différentes proportions connues (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% de groupe A, IDM R et QoI R). Les ΔC_q s obtenus pour ces échantillons, pris comme inconnus, sont utilisés pour calculer les fréquences alléliques suivant les équations de droites obtenues avec les courbes de calibration. Ainsi, la corrélation entre les fréquences alléliques mesurées par cette méthode et les fréquences alléliques connues est-elle établie.

RESULTATS

Spécificité des amorces dessinées pour les réactions de q-PCR

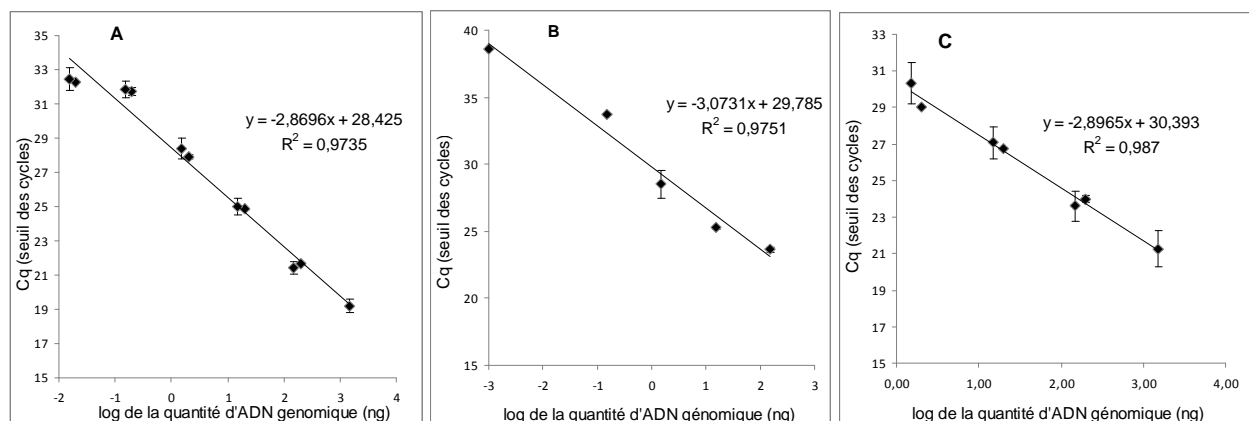
La mutation ponctuelle spécifique du groupe A (T143G) se situe en position 143 de la séquence AF042067 le nucléotide T chez les souche du groupe A est remplacé par un G chez les souches de groupe B, conduisant à une substitution d'une glycine en position 37 de la séquence en acide aminé pour les groupes A vers une valine pour les groupes B (G37V). Le jeu d'amorces dessiné pour amplifier spécifiquement l'allèle de groupe A (37A) génère un fragment de 79 bp.

La mutation ponctuelle conférant la résistance aux IDMs (A495T) se situe en position 495 de la séquence AF042067, le nucléotide A chez les sensibles est remplacé par un T chez les isolats résistants. La séquence en acides aminés de la protéine est modifiée en position 136, une phénylalanine est remplacée par une tyrosine (Y136F). Le jeu d'amorces dessiné pour amplifier spécifiquement l'allèle résistant (136 R) génère un fragment de 100 bp.

Un jeu d'amorce est dessiné dans une zone du gène *Cyp51* ne présentant aucune mutation ponctuelle spécifique à un allèle donné, commune à tous les groupes alléliques, mais spécifique d'*Erysiphe necator*. Ce jeu d'amorce (EN) sert de calibrateur interne et génère un fragment de 153 bp. Le jeu d'amorces utilisé pour quantifier la résistance aux QoIs a été emprunté à Baudouin *et al.*, 2008.

Figure 1 : Courbes standard obtenues par amplification Q-PCR, avec (A) la paire d'amorce pour amplifier le gène *Cyp51* d'*E. necator*, (B) la paire d'amorces spécifiques du groupe génétique A d'*E. necator*, (C) la paire d'amorces spécifiques de la mutation 136 impliquée dans la résistance aux IDMs.

(Figure 1 : Standard curves obtained by real-time PCR amplifications with (A) the primer pair specific to *E. necator*, (B) primer pair specific of genetic group A, (C) primer pair specific to DMI resistance)



Chaque système PCR (EN, 37 A, 136R et 143 R) est testé sur différentes dilutions d'ADN d'*E. necator* appartenant soit au groupe A, soit au groupe IDM-résistant (dont le triadiménol) (Figure 1). Les valeurs de Cq sont directement proportionnelles au logarithme de la quantité d'ADN. À partir de ces courbes, on en déduit une bonne efficacité de PCR proche de 1.

Des amplifications de Q-PCR avec les différentes paires d'amorces sont également réalisées sur des échantillons de disques de feuilles avec une inoculation calibrée, possédant des fréquences alléliques variables, pour réaliser des courbes de calibration. À partir de ces courbes, les différentes fréquences alléliques des échantillons analysés sont calculées (tableau III).

Les seuils de détection sont inférieurs à 1% pour l'ensemble des amorces de q-PCR et les seuils de quantification sont compris en 2,4 et 2,85% pour la détection du groupe génétique A et la résistance aux IDMs et de l'ordre de 10% pour la détection de la résistance aux Qols.

Distribution des différents allèles dans le vignoble français

Répartition des génotypes A et B

La présence du génotype A est détectée sur 17 parcelles, soit 34% des prélèvements étudiés (tableau III), avec des variations importantes de 0 à 100% selon les parcelles et les régions.

Le groupe A est majoritairement présent dans les régions du pourtour méditerranéen, avec certaines parcelles constituées de 100% de génotype A (Languedoc-Roussillon). La moyenne nationale de la fréquence du génotype A est de 12,07%, avec des différences importantes d'une région à une autre. Ainsi dans les régions d'Aquitaine, de Bourgogne et de Champagne, le groupe A est peu ou pas présent (de 0 à 1,156 %, moyenne par région). À l'inverse dans les vignobles du Sud, il représente de 7,16 à 54,66 % (Figure 2A).

Répartition de l'allèle de résistance F136Y (résistance aux fongicides IDMs)

La présence de l'allèle de résistance est détectée sur 7 parcelles, soit 14% des prélèvements évalués (tableau III). La variabilité de l'allèle est comprise entre 0 et 93,85%, avec une moyenne nationale de l'ordre de 2,41%. Peu ou pas d'allèle (moins de 3%) de résistance aux IDMs ont été détectés dans les régions d'Aquitaine, de Champagne Ardennes et du Languedoc-Roussillon. L'allèle de résistance a été détecté en Bourgogne (6,42%), dans la région Midi-Pyrénées, en particulier dans une parcelle du Gers (MP-0812) qui exhibe 93,85% de l'allèle de résistance F136Y.

L'ensemble des autres parcelles évaluées de cette région ne contenait pas l'allèle de résistance. Il semble que les parcelles les plus touchées par la résistance sont celles dans lesquelles le génotype A est absent ou peu présent (ex : les parcelles B-083 et MP-0812 dans lesquelles seul le génotype B est présent, montre une résistance de 25,07 et 93,85 %). Aucune parcelle contenant 100 % de génotype A n'a été détectée résistante.

Répartition de l'allèle de résistance G143A (résistance aux fongicides Qols)

Parmi l'ensemble des parcelles évaluées une seule a répondu positivement, il s'agit de la même parcelle du Gers (MP-0812) qui présentait déjà un fort pourcentage de l'allèle F136Y, pour laquelle nous avons quantifié 30,99% d'allèle de résistance aux Qols. À notre connaissance il s'agit de la première mise en évidence de la présence de cet allèle dans le vignoble français.

DISCUSSION

Groupe génétique A d' *E. necator*

À l'aide de différents outils moléculaires développés au laboratoire, il est possible de détecter et de quantifier différents génotypes du parasite obligatoire *E. necator* sur la base de SNP présent dans le gène *Cyp51*. Cette première étude nationale conforte les résultats précédents, à savoir que les souches de groupe A sont plus présentes dans les vignobles du

Sud que dans les vignobles septentrionaux ou le Bordelais (Corio-Costet, 2007 ; Montarry *et al.*, 2009). Cependant des populations contenant de l'ordre de 5% de souches A ont été détectées en Bourgogne et en Champagne. Est-ce à dire que les souches A colonisent plus aisément les vignobles du Nord suite au réchauffement climatique ? Est-ce que les souches A possèdent aujourd'hui la capacité de se reproduire sexuellement dans les vignobles français, ce qui n'était pas le cas en France jusqu'en 1998 ? Est-il possible d'obtenir des hybrides entre les souches A et B en France en 2008 ? De nouvelles campagnes de quantification des deux groupes génétiques en collaboration avec l'AFSSA de Lyon sont actuellement en cours et devrait permettre de conforter ces résultats.

Tableau III : Fréquences des différents allèles quantifiés par Q-PCR dans les 50 prélèvements du vignoble français.

(Table III: Frequency of genotype A and Y136F allele in field populations of *E. necator* determined by allele-specific real-time PCR)

Nom de l'échantillon	Région (N° du département)	Pourcentage de génotype A	Pourcentage de résistance aux DMIs
AQ-081, AQ-082, AQ-083, AQ-085	Aquitaine (33)	0	0
AQ-084	Aquitaine (33)	Tr ²	0
B-081	Bourgogne (21)	5,62	0
B-082	Bourgogne (21)	0	0
B-083	Bourgogne (21)	Tr	25,07
B-084	Bourgogne (21)	0	5,78
B-085	Bourgogne (21)	0	7,71
B-086	Bourgogne (21)	Tr	0
CA-081, CA-083, CA-085	Champagne Ardennes (51)	0	0
CA-082	Champagne Ardennes (51)	Tr	0
CA-084	Champagne Ardennes (51)	5,78	0
LR1-081, LR1-082,	Languedoc-Roussillon (34)	0	0
LR1-083	Languedoc-Roussillon (34)	40,92	0
LR1-084	Languedoc-Roussillon (34)	25,42	0
LR1-085	Languedoc-Roussillon (34)	Tr	0
LR1-086	Languedoc-Roussillon (34)	Tr	0
LR2-081	Languedoc-Roussillon (11)	100	0
LR2-082	Languedoc-Roussillon (11)	15,49	4,99
LR2-083	Languedoc-Roussillon (11)	100	0
LR2-084	Languedoc-Roussillon (66)	6,62	9,26
LR2-085	Languedoc-Roussillon (66)	0	0
LR2-086	Languedoc-Roussillon (66)	100	0
LR2-087, LR2-088	Languedoc-Roussillon (11)	100	0
LR2-089	Languedoc-Roussillon (11)	79,19	0
LR2-0810, LR2-0811	Languedoc-Roussillon (11)	100	0
MP-081, MP-083, MP- 0810, MP-0813	Midi Pyrénées (31, 32)	Tr	0
MP-082, MP-087, MP- 0814	Midi Pyrénées (31, 32)	0	0
MP-084	Midi Pyrénées (82)	57,59	0
MP-085	Midi Pyrénées (82)	44,08	0
MP-086, MP-089, MP- 0811	Midi Pyrénées (81)	Tr	Tr
MP-088	Midi Pyrénées (81)	0	Tr
MP-0812¹	Midi Pyrénées (32)	0	93, 85
MP-0815	Midi Pyrénées (32)	5,78	0
PA-081	PACA (13)	15,62	Tr
PA-082	PACA (13)	3,15	5,23

¹ : Seul l'échantillon, MP-0812 a été détecté comme résistant aux QoI, avec un pourcentage trouvé de 30,99%.

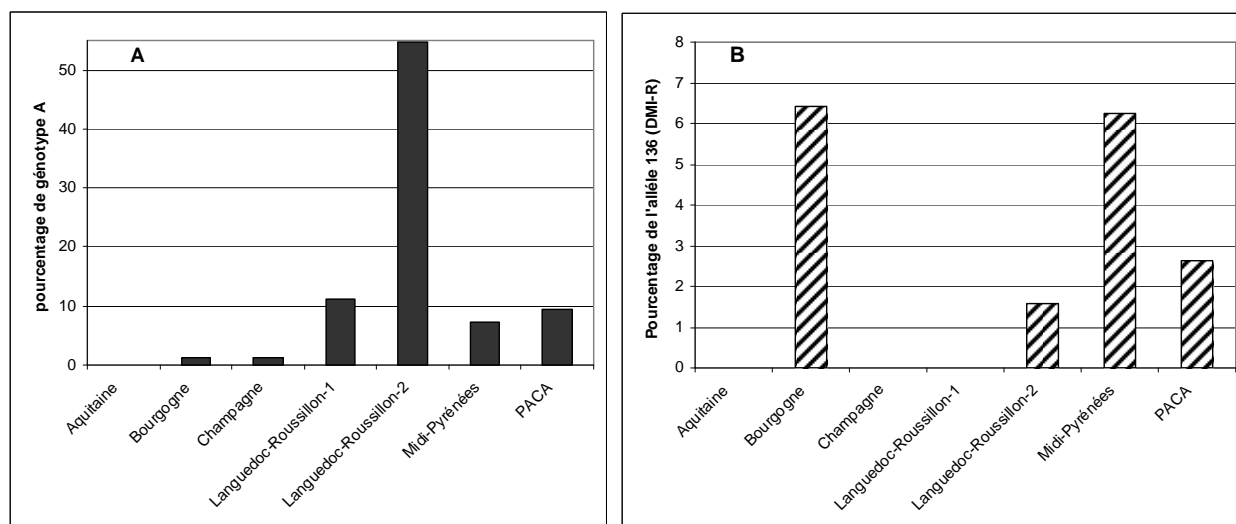
² : Tr = trace c'est-à-dire un pourcentage de détection > 0 mais inférieur au seuil de quantification.

Détection et quantification de l'allèle de résistance Y136F

La présence de l'allèle de résistance aux fongicides IDMs a été corrélée dans le passé à une forte résistance au triadiménol mais également à d'autres fongicides IDMs, malgré l'existence d'une résistance aux IDMs d'ordre polygénique (Corio-Costet *et al.*, 2000 ; Délye *et al.*, 1998). L'outil de PCR quantitative élaboré permet la détection de cette mutation et montre que la résistance est peu présente, à l'exception de quelques parcelles dans lesquelles elle est fortement implantée (Gers : 93,85 et Bourgogne : 25,07). Le panorama obtenu suggère qu'il est tout à fait possible de gérer cette situation de résistance dans la plupart des parcelles et des régions. Les préconisations d'usage consistant à limiter l'utilisation des DMIs et à les alterner avec d'autres molécules possédant des modes d'action différents paraissent efficaces. Toutefois, l'Oïdium de la vigne réalisant un cycle de reproduction sexuée annuel, il convient d'être prudent et un suivi pluriannuel des parcelles, sur lesquelles la présence de cet allèle a été détectée, serait intéressant pour évaluer le poids de la reproduction sexuée dans l'évolution de la résistance. Une question cependant demeure, quel est le poids des groupes génétiques A et B dans l'évolution de la résistance ? Des résultats obtenus en 2000 montraient que les souches de groupe A sensibles contrôlées par des traitements fongicides (triadiménol, tébuconazole, penconazole, azoxystrobine, quinoxyfène) étaient significativement plus sensibles que les souches de groupe B également contrôlées (Corio-Costet *et al.*, 2000). Sous la pression de sélection des traitements fongicides, quelle évolution peut-on envisager pour les deux groupes de souches aujourd'hui dans le vignoble français ?

Figure 2 : Fréquences des différents allèles, (A) génotype A, (B) allèle Y136F, dans les différentes régions viticoles françaises.

Figure 2 : Frequency of V37G (A) et Y136F (B) alleles in different French vineyard areas.



Détection de l'allèle de résistance G143A

La présence de l'allèle de résistance G143A impliqué dans la résistance aux fongicides inhibiteurs du cytochrome b mitochondrial a été détectée pour la première fois en France dans un vignoble. Il se trouve qu'il s'agit de la même parcelle du Gers qui montrait également une forte présence de l'allèle de résistance aux DMIs. 30,99% de la population récoltée serait résistante aux QoIs lors du prélèvement réalisé début septembre. Dans cette parcelle il serait intéressant d'obtenir des prélèvements d'organes oïdiés en début de saison

pour évaluer également le poids de la reproduction sexuée sur la résistance de la parcelle, sachant que le support héréditaire du gène du cytochrome b est mitochondrial.

CONCLUSION

En conclusion, il est possible aujourd'hui de quantifier, à partir de pools de fragments de feuilles ou de baies oïdiées, le taux de résistance d'une parcelle aux fongicides de types DMIs ou Qols. De même, réaliser la typologie oïdium d'un vignoble en estimant les proportions des deux groupes génétiques présents sur une parcelle est aujourd'hui réalisable sans passer par des analyses lourdes « prélèvement par prélèvement » (tache par tache).

Il faut noter que cette étude a également permis de confirmer la présence d'allèle de résistance aux fongicides Qol (G143A) dans le vignoble français, sachant que cette résistance est observée ponctuellement en Europe depuis 2007 (détection en Hongrie et en France, www.frac.info)

Cette première année d'étude devrait se poursuivre en 2009 par le suivi d'un plus grand nombre de parcelles, afin d'estimer l'évolution de la résistance aux Qols et aux DMIs, sachant qu'aujourd'hui la situation est loin d'être dramatique exceptée dans la parcelle du Gers où 31% de résistance aux Qols et 93,85% de résistance aux DMIs ont été trouvés.

Néanmoins, si la situation est loin d'être catastrophique, il convient d'être attentif et d'appliquer les préconisations de la « note nationale oïdium de la vigne 2009 », pour éviter les problèmes de résistance. Afin d'anticiper les problèmes de résistance et appliquer une protection raisonnée, il paraît important de suivre les populations d'oïdium via un monitoring afin de déceler d'éventuelles dérives des produits et de suivre leur évolution spatio-temporelle. Ainsi selon le profil « Oïdieux » de la parcelle, des traitements plus adéquats peuvent être envisagés afin de limiter les traitements à risque et d'obtenir une bonne qualité de récolte.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient D. Bencené (Hongrie) pour les souches résistantes aux Qols, tous les SRAL, FREDON et P Cartolaro pour le prélèvement d'échantillons. Un grand merci à J Grosmann du SRAL de Lyon pour avoir permis la réalisation de ce projet. Ce travail a bénéficié d'un financement de la région Aquitaine et de l'INRA.

BIBLIOGRAPHIE

- Amrani L., Corio-Costet M-F.. 2006 - Single nucleotide polymorphism (SNP) in β -tubulin gene distinguishes two genotypes of *E. necator* : PCR assays from different symptoms in the vineyard, *Plant Pathology*, 55, 505-512.
- Baudoin A I., Olaya G., Delmotte F., Colcol J. F. Sierotzki H., 2008 - Qol 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
- Corio-Costet M.F., 2007 - *Erysiphe necator*. Monographie, Tec/Doc Lavoisier, Paris, 132 p.
- Corio-Costet M-F., Douence L., Richard-Cervera S., Delye C., Barreau C. Moroy S., 2000 - Résistance de l'oïdium de la vigne aux fongicides. Rôle de la biodiversité. AFPP, 6^{ème} Conférence Internationale sur les maladies des plantes (Tours, 6-8 décembre), II, 763-770.
- Délye C., Corio-Costet M-F., Laigret F., 1995 - A RAPD assay for strain typing of the biotrophic grape powdery mildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium. *Experimental. Mycol.*, 19, 234-237.

Délye C., Laigret F., Corio-Costet M-F, 1997 - New tools for studying epidemiology and resistance of grape powdery mildew to DMI fungicides. *Pesticide Science* 51(3): 309-314.

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.

Délye C., V Ronchi, Laigret F., Corio-Costet M.-F., 1999 -Nested allele-specific PCR primers distinguish genetic groups of *Uncinula necator*. *Appl. Envir. Microbiol.* 65, 3950-3954.

Dufour M.-C., Montarry J., Corio-Costet M.-F., 2009 – High-throughput SNP allele frequency determination of genetic groups (biotypes and DMI resistant) of *Erysiphe necator* in pooled field samples by a real-time PCR assay. En préparation pour *Appl. Envir. Microbiol.*

Montarry J., Cartolaro P., Jolivet J., Willocquet L., 2008 - Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during Grapevine powdery mildew epidemics. *Appl. Envir. Microbiol.* 74, 6327-6332.

Montarry J., Cartolaro P., Richard-Cervera S., Delmotte F., 2009 - Spatio-temporal distribution of *Erysiphe necator* genetic groups and their relationship with disease levels in vineyards, *European J. Plant Pathol*, 123, 61-70.

Peros J.P., Nguyen T.H., Troulet C., Michel-Romiti C., Notteghem J.L., 2006 - Assessment of powdery mildew resistance of grape and *Erysiphe necator* pathogenicity using a laboratory assay. *Vitis*, 45, 29-36.

Schwarz G., Baumler S., Block , A., Felselstein F.G., Wenzel G., 2004 - Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR. *Nucleic Acids Research* 32(3): E24.

Steva H., Clerjeau M., Da Silva M.T., 1989 - Reduced sensitivity to triadimenol in Portuguese field populations of *Uncinula necator*. *ISPP Chem. Control Newletters*, 12, pp. 30-31.

Wong F.P., Wilcox W.F., 2002 - Sensitivity to azoxystrobin among isolates of *Uncinula necator*: baseline distribution and relationship to myclobutanil sensitivity. *Plant Dis.* 86, pp. 394-404.